

**THESE  
POUR LE DIPLOME D'ETAT  
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Soutenue publiquement le 29 janvier 2016**

**Par M<sup>elle</sup> Laura RUMEBE**

---

**La lèpre : diagnostic bactériologique et étude de la résistance  
aux macrolides**

---

**Membres du jury :**

**Présidente :** Madame le Docteur Anne GOFFARD  
**Assesseurs :** Monsieur le Docteur François-Xavier BABIN  
Monsieur le Docteur Laurent RASKINE  
**Directeur de thèse :** Madame le Professeur Emmanuelle CAMBAU



## Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX  
☎ 03.20.96.40.40 - 📠 : 03.20.96.43.64  
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>



### Université Lille 2 – Droit et Santé

Président :

Vice- présidents :

Professeur Xavier VANDENDRIESSCHE

Professeur Alain DUROCHER

Professeur Régis BORDET

Professeur Eric KERCKHOVE

Professeur Eric BOULANGER

Professeur Frédéric LOBEZ

Professeur Damien CUNY

Professeur Benoit DEPREZ

Professeur Murielle GARCIN

Monsieur Pierre RAVAUX

Monsieur Larbi AIT-HENNANI

Monsieur Antoine HENRY

Monsieur Pierre-Marie ROBERT

Directeur Général des Services :

### Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Doyen :

Vice-Doyen, 1<sup>er</sup> assesseur :

Assesseur en charge de la pédagogie

Assesseur en charge de la recherche

Assesseur délégué à la scolarité

Assesseur délégué en charge des

relations internationales

Assesseur délégué en charge de la vie étudiante

Professeur Damien CUNY

Professeur Bertrand DECAUDIN

Dr. Annie Standaert

Pr. Patricia Melnyk

Dr. Christophe Bochu

Pr. Philippe Chavatte

M. Thomas Morgenroth

Chef des services administratifs :

Monsieur Cyrille PORTA

### Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
Mme	CAPRON	Monique	Immunologie
M.	DECAUDIN	Bertrand	Pharmacie Galénique
M.	DINE	Thierry	Pharmacie clinique
M.	DUBREUIL	Luc	Bactériologie
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie
M.	DUTHILLEUL	Patrick	Hématologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie
M.	LUYCKX	Michel	Pharmacie clinique
M.	ODOU	Pascal	Pharmacie Galénique
M.	DEPREUX	Patrick	Chimie Organique (ICPAL)

### Liste des Professeurs des Universités

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Physique
M.	BERTHELOT	Pascal	Chimie Thérapeutique 1
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie – Pharmacie clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	Chimie Thérapeutique 2
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences végétales et fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Physique
M.	DEPREZ	Benoît	Chimie Générale
Mme	DEPREZ	Rebecca	Chimie Générale
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences végétales et fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie
Mme	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie Industrielle
M.	GESQUIERE	Jean-Claude	Chimie Organique
M.	GOOSSENS	Jean François	Chimie Analytique
Mme	GRAS	Hélène	Chimie Thérapeutique 3
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie Cellulaire
M.	LUC	Gerald	Physiologie
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie thérapeutique 2
Mme	MUHR – TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PAUMELLE-LESTRELIN	Réjane	Biologie Cellulaire
Mme	PERROY – MAILLOLS	Anne Catherine	Droit et déontologie pharmaceutique
Mme	ROMOND	Marie Bénédicte	Bactériologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SERGHÉRAERT	Eric	Droit et déontologie pharmaceutique
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie Industrielle
M.	STAELS	Bart	Biologie Cellulaire
M	TARTAR	André	Chimie Organique
M.	VACCHER	Claude	Chimie Analytique
M.	WILLAND	Nicolas	Chimie organique
M.	MILLET	Régis	Chimie Thérapeutique (ICPAL)

### Liste des Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie
M.	LANNOY	Damien	Pharmacie Galénique
Mme	ODOU	Marie Françoise	Bactériologie
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacie Galénique

## Liste des Maitres de Conférences

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	AGOURIDAS	Laurence	Chimie thérapeutique 2
Mme	ALIOUAT	Cécile Marie	Parasitologie (90%)
M.	ANTHERIEU	Sébastien	Toxicologie
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
Mme	BANTUBUNGI	Kadiombo	Biologie cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Pharmacie Galénique
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie
M	BELARBI	Karim	Pharmacologie
M.	BERTHET	Jérôme	Physique
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle
M.	BOCHU	Christophe	Physique
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
Mme	CACHERA	Claude	Biochimie
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON	Sandrine	Biologie cellulaire (80%)
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie (80%)
Mme	CHARTON	Julie	Chimie Organique (80%)
M	CHEVALIER	Dany	Toxicologie
M.	COCHELARD	Dominique	Biomathématiques
Mme	DANEL	Cécile	Chimie Analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie (80%)
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire
M.	FARCE	Amaury	Chimie Thérapeutique 2
Mme	FLIPO	Marion	Chimie Organique
Mme	FOULON	Catherine	Chimie Analytique
M.	GELEZ	Philippe	Biomathématiques
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
Mme	HAMOUDI	Chérifa Mounira	Pharmacotechnie industrielle
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
Mme	HOUSSIN-THUILLIER	Pascale	Hématologie
M.	KAMBIA	Kpakpaga Nicolas	Pharmacologie
M.	KARROUT	Youness	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique 1
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie Analytique
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie Analytique
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre Arthur	Sciences végétales et fongiques
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle
Mme	NEUT	Christel	Bactériologie
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques
Mme	RIVIERE	Céline	Pharmacognosie

Mme	ROGER	Nadine	Immunologie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques
M.	YOUS	Saïd	Chimie Thérapeutique 1
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques
M.	FURMAN	Christophe	Pharmacobiochimie (ICPAL)
Mme	GOOSSENS	Laurence	Chimie Organique (ICPAL)

### Professeurs Agrégés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	MAYES	Martine	Anglais
M.	MORGENROTH	Thomas	Droit et déontologie pharmaceutique

### Professeurs Certifiés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	HUGES	Dominique	Anglais
Mlle	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

### Professeur Associé - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	DHANANI	Alban	Droit et déontologie pharmaceutique

### Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BERTOUX	Elisabeth	Pharmacie Clinique - Biomathématiques
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques
M.	FIEVET	Pierre	Information Médicale
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacie Clinique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacie Clinique
M.	WATRELOS	Michel	Droit et déontologie pharmaceutique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques

### AHU

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	DROUET	Maryline	Pharmacie Galénique
Mme	GENAY	Stéphanie	Pharmacie Galénique

***Faculté des Sciences Pharmaceutiques  
et Biologiques de Lille***

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX

Tel. : 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64

<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

**L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.**

A ma Présidente de Thèse

**Madame le Docteur Anne GOFFARD**

*De me faire l'honneur de présider ce jury mais aussi pour vos encouragements dans mes projets les plus fous.*

A ma Directrice de Thèse

## **Madame le Professeur Emmanuelle CAMBAU**

*Pour cet accueil si chaleureux au sein de votre laboratoire.*

*De m'avoir si bien encadrée dans ce sujet passionnant qu'est la lèpre. C'était un plaisir de travailler avec vous.*

*Votre laboratoire restera pour moi un modèle.*

Aux membres de mon jury

## **Monsieur le Docteur François-Xavier BABIN**

*D'avoir accepté de faire partie de ce jury mais avant tout, de m'avoir fait confiance pour cette mission malgache. Elle a changé ma vie.*

*Pour ta disponibilité malgré tes nombreux voyages et pour toutes tes attentions dans les moments difficiles.*

## **Monsieur le Docteur Laurent RASKINE**

*Milles mercis pour tout ce que tu m'as appris dans une bonne humeur incroyable...  
C'était un plaisir de travailler avec toi !*

*J'espère que nos chemins se croiseront à nouveau sous des latitudes plus australes.*

*A Bénédicte...*

*Je te dédie cette thèse parce que sans toi, elle ne serait pas la même. Tu resteras pour moi et pour toujours un modèle de courage, de joie, d'altruisme et de générosité. Misaotra ! Pour tout ce que tu m'as transmis et apporté. Je regrette au plus profond de moi que tu ne sois pas là aujourd'hui mais peut être que d'où tu es tu seras avec moi...*

*Un immense MERCI à mes parents d'avoir réussi à me supporter et à me suivre dans toutes mes aventures les plus heureuses et mes moments les plus durs, ce n'était pas toujours une mince affaire... Merci pour tout ce soutien et cette bienveillance.*

*A mon frère pour ces escapades alpines si précieuses accompagnées d'un ronron ensoleillé*

*A Camille, bien sûr, d'égailler chaque jour un peu plus la grisaille lilloise avec ton rire, tes précieux conseils et toute ta tendresse*

*A Lucette et Grégo pour tous ces moments inoubliables qui nous lient depuis si longtemps*

*A Maxou, le « Dom Juan » qui s'est transformé en « Médecin malgré lui ». Merci pour tous ces fous rires !*

*A Faustine et Jadou, pour le soleil, le soutien et cette grande amitié qui nous lie. Je vais essayer de faire un meilleur show qu'à Venise ! ;)*

*A Fiona, c'est en grande partie grâce à toi que je suis là aujourd'hui*

*A Cellou, pour ta culture, ton intelligence et toute ta douceur guinéenne*

*A mes deux colocos préférées, Laura et Alexia, que de fous rires dans cet appartement en carton !*

*A Aurélie, ma confidente des nuits de garde, merci d'être venue t'immerger dans mon quotidien malgache. Le taxi brousse Fianar-Ranomafana, celui là, on ne l'oubliera pas...*

*A Emeline, pour ton entrain, ton sourire et ta voix quand tu chantes Céline ;)*

*A Hélène, pour ta gentillesse, toute ta patience, ton amitié et ton soutien permanent.*

*A Pauline, parce que j'aimais bien rentrer chez toi, « mettre mes savates et terminé bonsoir ! »*

*A Saida bien sûr, pour tous ces moments partagés, sous une hotte au CICM avec une gélouse qui entre en fusion (Tsy manina !) mais surtout cet été alors que je devenais folle avec mes alignements de séquences.*

*A la « BK-team » pour toute son aide précieuse jusqu'à la dernière minute. Quelle bonne humeur ! Travailler dans le P3 en plein été avec vous : un vrai bonheur. Merci pour tout !*

# SOMMAIRE

<b>SOMMAIRE .....</b>	<b>12</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>14</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>16</b>
<b>I. GÉNÉRALITÉS SUR LA LEPRE.....</b>	<b>17</b>
a. Description du bacille lépreux.....	17
b. Histoire.....	19
c. Epidémiologie.....	20
d. Transmission .....	21
e. Immunologie et réponse de l'hôte.....	22
f. Diagnostic clinique .....	22
g. Traitement de la lèpre.....	26
i. Principales molécules et mécanisme d'action respectifs .....	26
1. Rifampicine .....	27
2. Dapsone .....	27
3. Clofazimine.....	28
ii. Molécules de seconde ligne .....	28
h. Schémas thérapeutiques et alternatives .....	29
i. Résistances aux antilépreux .....	30
i. Rifampicine.....	30
ii. Dapsone.....	30
iii. Les fluoroquinolones.....	31
<b>II. Diagnostic BACTERIOLOGIQUE : mise en place à Lariboisière.....</b>	<b>33</b>
a. Type de prélèvement reçus.....	33
b. Préparation des biopsies.....	33
c. Microscopie et colorations .....	34
i. Fixation du frottis .....	34
ii. Coloration.....	34
iii. Rendu de résultats .....	36
d. Biologie moléculaire .....	36
i. Extraction du matériel génétique.....	36
ii. PCR RLEP.....	37
1. Amorces utilisées .....	37
2. Technique de PCR .....	37
iii. Diagnostic de la résistance aux antilépreux .....	38
<b>III. Etude de la résistance aux macrolides.....</b>	<b>41</b>
a. Contexte : Mayotte et les déficits en G6PD .....	41
b. Mécanisme d'action et de résistance aux macrolides .....	41
i. Description des différentes classes .....	41
ii. Rappel sur la synthèse protéique et rôle du ribosome .....	42
iii. Mécanisme d'action des macrolides .....	42
iv. Mécanismes de résistance.....	43
1. Imperméabilité ou efflux.....	43
2. Inactivation de la cible ribosomale .....	43
3. Inactivation enzymatique de l'antibiotique .....	44
c. Matériel et méthodes.....	44
i. Caractéristiques des patients .....	44
ii. Etude préliminaire des gènes étudiés .....	44

iii.	Choix des amorces.....	47
1.	Gène <i>rrl</i> .....	47
2.	Gène <i>rplD</i> .....	48
3.	Gène <i>rplV</i> .....	49
iv.	Mise au point des PCR .....	49
1.	Gène <i>rrl</i> .....	50
2.	Gène <i>rplD</i> .....	51
3.	Gène <i>rplV</i> .....	51
v.	Séquençage.....	52
d.	Résultats : analyse de séquences.....	53
i.	Gène <i>rplD</i> .....	53
ii.	Gène <i>rplV</i> .....	53
iii.	Gène <i>rrl</i> .....	53
<b>IV.</b>	<b>Discussion .....</b>	<b>55</b>
a.	Diagnostic bactériologique.....	55
b.	Etude de la résistance aux macrolides .....	56
<b>V.</b>	<b>Conclusion et perspectives .....</b>	<b>57</b>
	<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>58</b>

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Tatou commun ou tatou à 9 bandes (*Dasypus novemcinctus*)

Figure 2 : Dissémination de la lèpre à travers le monde

Figure 3 : Répartition des nouveaux cas notifiés dans 103 pays par région OMS en 2013(1)

Figure 4 : Schéma simplifié de l'immunopathologie des différentes formes cliniques de la lèpre

Figure 5 : Différentes formes cliniques de lèpre

Figure 6 : Lèpre Paucibacillaire (PB) et Lèpre Multibacillaire (MB)

Figure 7 : (1) Logophtalmos ; (2) Nodule retrouvé dans un ENL ; (3) Extrémité nécrosée par *M. lepromatosis*

Figure 8 : Plaquette de l'OMS destinée aux centres de santé avec les différentes plaquettes

Figure 9 : Voie de synthèse des folates et mode d'action de la dapsonne

Figure 10 : Fragment d'ADN du gène *folP1* (388pb) montrant les 2 mutations sur les codons 53 et 55

Figure 11: Récapitulatif des différents mécanismes d'action et de résistance aux anti-lépreux

Figure 12 : Examen direct d'une biopsie cutanée (coloration de Ziehl Neelsen à froid) montrant un globi en formation et des BAAR isolés

Figure 13 : Examen direct d'une biopsie cutanée (coloration de Ziehl Neelsen à froid) montrant des BAAR isolés

Figure 14: Examen direct d'une biopsie cutanée (coloration de Ziehl Neelsen à froid) montrant un globi central

Figure 15 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR RLEP

Figure 16 : Matrice de révélation de la bandelette GenoTypeLepraeDR Hain®

Figure 17 : Gène *rpoB* de *M. leprae* et zone d'intérêt pour la recherche de résistance

Figure 18 : Formules développées des macrolides

Figure 19 : Représentation de la sous-unité 50S ribosomale

Figure 20 : Répartition des patients selon leur origine géographique dans l'archipel des Comores

Figure 21 : Alignement des protéines *Erm*, les zones conservées sont encadrées en rouge

Figure 22 : Organisation de la région génique de 4 kpb environnant le gène *erm41* de *M. abscessus* MC719

Figure 23 : Absence du gène *erm* entre *rpsA* et *coaE* chez *M. leprae*

Figure 24 : Zone d'intérêt du gène *rpIV* : acides aminés G83, P91, A93 et G95

Figure 25: Zone d'intérêt du gène *rpID* : acides aminés G69 et G71

Figure 26: Gène *rrl* de *M. leprae*, les deux amorces sont soulignées en gris alors que les deux nucléotides d'intérêt correspondant aux positions 2058 et 2059 sont en gras

Figure 27: Gène *rpID* de *M. leprae* : les amorces sont surlignées en gris et la zone d'intérêt est en gras et soulignée

Figure 28: Gène *rpIV* de *M. leprae* : les amorces sont surlignées en gris et la zone d'intérêt est en gras et soulignée

Figure 29 : Comparaison des différents modes opératoires pour la PCR d'amplification du gène *rrl*

Figure 30 : Electrophorèse en gel d'agarose des produits de PCR du gène *rplD*

Figure 31 : Electrophorèse en gel d'agarose des produits de PCR du gène *rplV*

Figure 32 : Polymorphisme de la souche 21, la zone d'intérêt 2058-2059 correspond ici aux positions 813-814

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Données synthétisées de la répartition des SNP selon l'origine géographique

Tableau 2 : Classification selon l'indice de Ridley-Jopling

Tableau 3 : Schéma thérapeutique recommandé par l'OMS en 2013

Tableau 4 : Résistances mises en évidence sur la bandelette GenoTypeLepraeDR Hain® et mutations associées

# I. GENERALITES SUR LA LEPRE

## a. Description du bacille lépreux

Armauer Hansen découvre le bacille de la lèpre, *Mycobacterium leprae*, en 1873 à Bergen en Norvège avant que Koch ne découvre *M.tuberculosis* ou Bacille de Koch (BK). Mais Koch sera le premier à démontrer le lien particulier qui existe entre une bactérie et une pathologie : il démontre le postulat de Koch.

Avec cette découverte, *M. leprae* est devenue la première bactérie à être directement liée à une pathologie humaine. D'ailleurs en l'honneur de son travail et également pour éliminer la stigmatisation associée à cette maladie, la lèpre est souvent appelée maladie de Hansen. (2)

*M. leprae* est un bacille légèrement incurvé de 1 à 8 µm de long et de 0,3 µm de diamètre. Il est acido-alcool résistant. Cependant la coloration à la fuchsine peut être irrégulière selon la viabilité du bacille (Mandel). Comme les autres mycobactéries, *M.leprae* possède une paroi très riche en lipides et glycolipides, notamment un glycolipide particulier qui possède des antigènes importants : le PGL-1 pour Phenolic GlycoLipid 1. (3)

C'est une bactérie intracellulaire avec un tropisme pour les macrophages mais aussi pour les cellules de Schwann et les nerfs périphériques. *M.leprae* préfère les régions froides du corps, ce qui explique une des méthodes utilisées en diagnostic : effectuer un frottis mince à partir du derme du lobe de l'oreille. (2)

Alors que plus de deux siècles se sont écoulés depuis la découverte du bacille, la physiopathologie du bacille est encore mal élucidée. Même des questions basiques concernant le mode de transmission ou encore le rôle du réservoir environnemental (sol, eau et animaux,...) restent sans réponses claires. L'obstacle majeur pour progresser dans l'étude du bacille est son incapacité à cultiver *in vitro* et sa durée de doublement qui est extrêmement longue : environ 2 semaines.

En 1973, on découvre que la lèpre peut se développer dans un animal possédant une température corporelle comprise en 30 et 35°C. Cet animal est le tatou à 9 bandes d'Amérique (*Dasypus novemcinctus*). Il constitue ainsi un hôte permettant la croissance du bacille de Hansen. Il permet de produire un grand nombre de bacilles lépreux. C'est grâce à cette découverte qu'il a été possible d'extraire suffisamment d'ADN pour séquencer entièrement la souche *M.leprae* TN, originellement isolée d'un patient à Tamil Nadu en Inde. (4)



Figure 1 : Tatou commun ou tatou à 9 bandes (*Dasypus novemcinctus*) <http://tnregneanimal.tableau-noir.net>

Le génome de *M.leprae* contient 3,268,210 pbs et a un GC% moyen de 57,8% (4). Ainsi c'est le plus petit génome du genre mycobactéries mais aussi le plus riche en A+T.

L'analyse de ce génome a permis d'approfondir les connaissances en matière de physiopathologie mais aussi a aidé au diagnostic.

Quand on compare les gènes fonctionnels présents chez *M.tuberculosis* et chez *M.leprae*, on remarque qu'ils sont considérablement plus petits que ceux présents dans le génome du BK. Certains d'entre eux ont même disparu.

Alors que les voies anaboliques principales sont relativement intactes, le répertoire génétique en relation avec la lipolyse a été réduit. Or c'est la principale source d'énergie dans genre mycobactéries. De plus, la possibilité d'utiliser les sources habituelles de carbone, telles que l'acétate ou la galactose, ont été perdues alors qu'il est impossible à la bactérie de produire de l'ATP à partir de l'oxydation du NADPH. Cela pourrait expliquer les restrictions de croissance observées pour le bacille. (4)

De nombreuses caractéristiques d'une évolution réductrice sont retrouvées dans le génome de *M.leprae* : un grand nombre de pseudogènes, l'accumulation de séquences répétées et le faible GC%. On trouve plus de 26 « cadavres » d'éléments de séquences d'insertion rassemblées en 4 familles d'éléments répétés : RLEP (37 copies), RELEP (15 copies), LEPREP (8 copies) et LEPRPT (5 copies). La réduction de la taille du génome de *M.leprae* serait due à des recombinaisons entre ces séquences répétées qui occupent près de 2% du génome de *M.leprae* TN.

Plusieurs observations indiquent que la séquence RLEP ne possède pas de séquence d'insertion et ne serait donc pas issue d'un élément transposable. D'autres études montrent que la dispersion des différentes séquences RLEP dans le génome de *M.leprae* est spécifique de ce microorganisme et peut donc servir comme cible pour le diagnostic de la lèpre(4).

Cependant, avec 50% du génome qui semble dénué de fonction, *M.leprae* est la bactérie qui compte la plus large proportion de pseudogènes en comparaison avec les autres membres du règne des bactéries.

## b. Histoire

La lèpre est une maladie très ancienne. En effet, les premières évocations de cette pathologie ont été retrouvées sur un papyrus Egyptien datant de 1550 avant JC, puis sur un traité sanskrit « *Atharva Veda* » datant d'un millénaire avant JC. Enfin, elle est évoquée dans la Bible, autant dans l'Ancien que le Nouveau Testament (5). Ces textes ont probablement été précédés de transmissions orales bien antérieures (2).

En Europe, la lèpre pose des problèmes de santé publique à partir du Moyen Age. C'est pendant les Croisades que l'on compte le plus grand nombre de lépreux. A cette même période, les premières léproseries voient le jour permettant ainsi d'isoler les malades de la population générale. La lèpre décline peu à peu pour quasiment disparaître du continent européen au XVIIème siècle.

Cependant, les textes anciens ne permettent que d'émettre des hypothèses quant au scénario de la dissémination de la maladie à travers le monde. La comparaison des génomes permettra d'établir un lien généalogique avec un ancêtre commun et de proposer un scénario pour la diffusion mondiale de la lèpre (6).

La lèpre aurait diffusé à partir d'un ancêtre commun en générant 4 « sous-type » de *M.leprae*. Ces sous-types sont caractérisés par des polymorphismes nucléotidiques à des positions spécifiques ou Single Nucleotide Polymorphism (SNP). Deux scénarios de dissémination ont été proposés. Dans le premier, la lèpre serait originaire d'Afrique de l'Est d'où elle aurait migré vers l'Asie du Sud (SNP-type 1) puis vers l'Europe (SNP-type 3) permettant ensuite la propagation de la maladie via le colonialisme et l'esclavage en Afrique de l'Ouest et en Amérique. Dans le second scénario, la lèpre le foyer primaire de la lèpre serait l'Inde à partir duquel elle aurait disséminé dans toute l'Asie puis en Afrique, en Europe et en Amérique

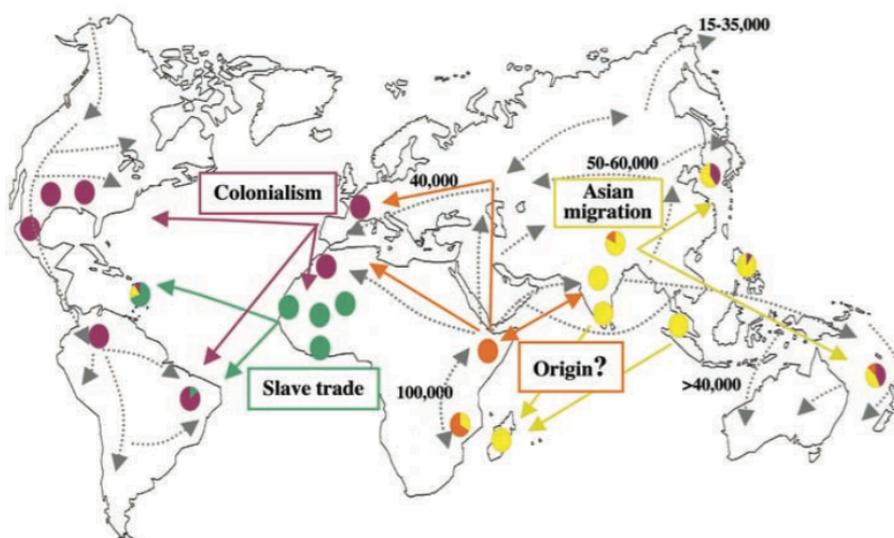


Figure 2 : Dissémination de la lèpre à travers le monde. Les cercles colorés correspondent aux pays d'origine des souches examinées et leurs distributions à travers les 4 SNP-types. Le SNP type 1 apparaît en jaune, le 2 en orange, le 3 en violet et le 4 en vert. Les flèches correspondent aux migrations. (6)

SNP Type	Origine géographique
1	<b>Inde</b> , Philippines, Comores, <b>Madagascar</b>
2	Nouvelle Calédonie, Malawi, Ethiopie, (Inde)
3	Mexique, <b>Brésil</b> , Amérique du sud, Chine, Japon
4	Afrique de l'ouest, Caraïbes

Tableau 1 : Données synthétisées de la répartition des SNP selon l'origine géographique (7)

En croisant les données épidémiologiques de l'OMS et celles des analyses génomiques, il ressort que le SNP 1 est le plus fréquent (puisque l'Inde est le premier foyer lépreux de la planète) suivi du SNP 3 puis le 4 et enfin le 2.

### c. Epidémiologie

En 1991, l'Organisation Mondiale de la Santé a fait voter une résolution visant à « demander l'élimination de la lèpre en tant que problème de santé publique au niveau mondial au plus tard en l'an 2000 » (1)

L'élimination a été définie comme une prévalence inférieure à un cas pour 10 000 habitants. L'élimination de la lèpre au niveau mondial a été atteinte en 2000.

Cependant, le nombre de cas de lèpre est souvent difficile à obtenir et l'OMS considère que les chiffres sont sous-estimés. En effet, la détermination des nouveaux cas de lèpre est difficile pour de multiples raisons. D'abord, c'est une maladie rare, avec une répartition géographique disparate et enfin c'est une maladie « tabou » dans de nombreux pays. Les patients préfèrent donc se cacher ou se rassembler dans des lieux confinés plutôt que de se rendre au centre de santé pour y recevoir un traitement.

Les informations en provenance de 103 pays démontrent que la lèpre demeure un problème de santé publique.

L'application du traitement dans les pays où la lèpre est endémique a permis de diminuer fortement le nombre de cas prévalents, se chiffrant pourtant par millions au niveau mondial dans les années 1980.

Bien que les programmes de lutte contre la lèpre aient accompli des progrès considérables dans la baisse de la charge de morbidité, le dépistage des nouveaux cas s'est maintenu dans une fourchette de 215 000 à 245 000 à l'échelle mondiale entre 2009 et 2013.

Le nombre de nouveaux cas est le plus élevé dans la Région de l'Asie du Sud Est qui concentre 72% de la charge mondiale de la lèpre. L'Inde comptant à elle seule pour 58,85% de la charge mondiale de la lèpre. L'Inde a notifié le plus grand nombre de nouveaux cas en 2013 (126 913), suivie du Brésil (31 044) et de l'Indonésie (16 856).

Parmi les nouveaux cas, 13 289 présentaient une incapacité de degré 2, ce qui traduit un retard au diagnostic, donc une faible sensibilisation au problème de la lèpre dans les communautés et une capacité perfectible des systèmes de santé pour le dépistage rapide de la maladie.

Malgré la diminution du nombre de cas, on peut remarquer que 9,2% des nouveaux cas en 2013 ont concerné des enfants, ce qui indique une transmission continue de la maladie.

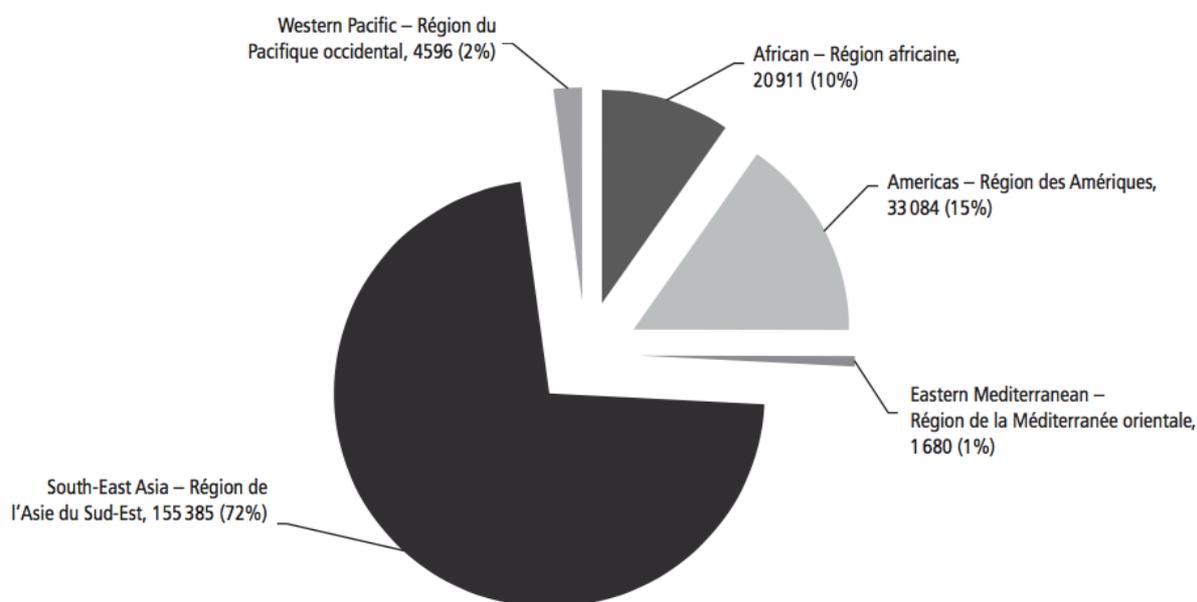


Figure 3 : Répartition des nouveaux cas notifiés dans 103 pays par région OMS en 2013(1)

#### d. Transmission

La durée d'incubation de la maladie est longue mais variable, de 2 à 12 ans.

Le mode de transmission du bacille n'est pas encore clairement établi. Cependant, il est admis que la transmission inter humaine via les aérosols générés par les sécrétions nasales est la voie prédominante de contamination (8,9). De ce fait, les hommes constituent le réservoir principal, alors que le réservoir animal en Amérique via les tatous n'est pas encore bien établi. D'autre part, le contact cutané ne constitue pas un mode de transmission puisque le bacille est incapable de traverser une peau saine.

La majorité des patients lépreux sont peu contagieux puisque le bacille reste intra-cellulaire. Par contre, les patients lépromateux propagent des bacilles via leurs sécrétions nasales et sont contagieux jusqu'à la mise en route du traitement par polychimiothérapie. En effet, il a été montré que l'on retrouve à la fois des BAAR mais aussi l'ADN de la bactérie dans les sécrétions nasales de ces patients (10). Les contacts de ces patients ont donc un risque élevé d'être infectés. Cependant, la magnitude du risque dépend de la proximité du contact : ce sont les patients vivant sous le même toit qui sont les plus à risque de se contaminer. Ce risque reste toutefois à pondérer en fonction de la charge bacillaire du patient. En effet, le risque est deux fois plus élevé dans le cas d'un patient multibacillaire par rapport à un patient paucibacillaire.

## e. Immunologie et réponse de l'hôte

Les différentes formes cliniques de la maladie sont directement corrélées avec le statut immunitaire du patient. En effet, c'est le profil cytokinique du patient qui va dicter la forme de la maladie.(11)

D'un côté, les formes tuberculoïdes résultent d'un profil Th1 avec une immunité cellulaire correcte. Il y a une réaction inflammatoire localisée avec peu de bacilles. Les cytokines retrouvées sont l'interleukine-2 (IL-2), l'interféron gamma et l'IL-12.

On assiste ainsi à des réactions d'hypersensibilité retardée de type granulomateuse (type IV selon la classification de Coombs et Gell) avec formation d'un granulome. Les macrophages s'accumulent et se transforment ensuite en cellules épithélioïdes qui vont elles mêmes s'associer en syncytia : on retrouvera dans la biopsie cutanée des cellules géantes. Ce tableau est spécifique des réactions lépreuses de type 1 ou réactions de réversion qui se manifestent souvent à la mise en place du traitement. Cela correspondrait à une intensification de la réponse cellulaire.

D'autre part, la lèpre lépromateuse correspond à une forme disséminée de la maladie liée à une réponse immunitaire inadéquate. C'est une réponse de type Th2 caractérisée par une absence d'hypersensibilité retardée, une prolifération massive de microorganismes et un fort titre d'anticorps anti-GLP1. Ces anticorps pourront par la suite former des complexes immuns à l'origine des réactions lépreuses de type 2 ou Erythème Nouveau Lépreux (ENL).

Les cytokines mises en jeu dans cette forme clinique sont l'IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 et IL-13. La biopsie mettra en évidence des macrophages spumeux, une absence de lymphocytes et de nombreux bacilles. (12)

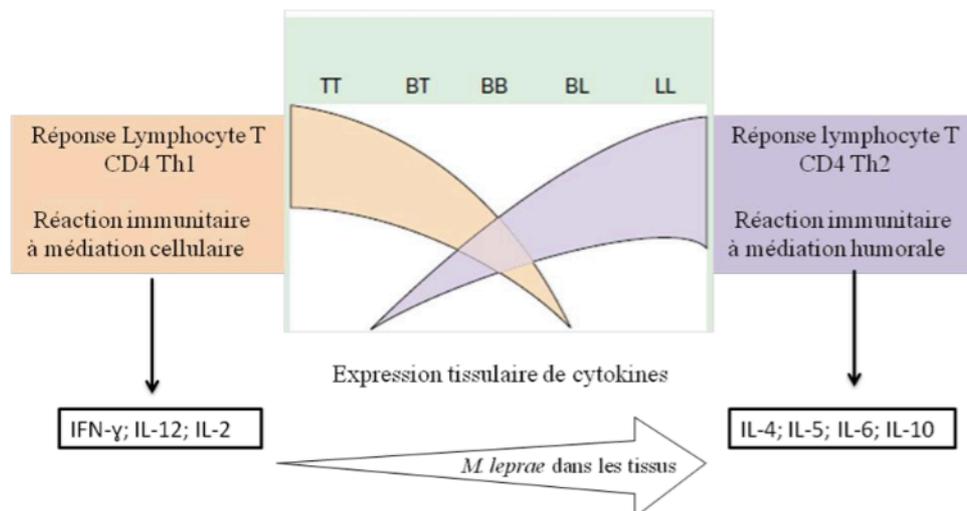


Figure 4 : Schéma simplifié de l'immunopathologie des différentes formes cliniques de la lèpre (10)

## f. Diagnostic clinique

Le diagnostic de la lèpre est avant tout clinique. La lèpre est une pathologie provoquant une inflammation granulomateuse chronique de la peau et des nerfs périphériques. Un patient atteint de

lèpre présentera une ou plusieurs taches cutanées avec une perte nette de sensibilité appelée hypoesthésie.

Les taches cutanées dues à la lèpre peuvent être pâles, rougeâtres ou de couleur cuivrée, plates ou en relief. Elles ne démangent pas et ne font pas mal. Elles sont insensibles à la chaleur, au toucher ou à la douleur. Elles peuvent apparaître sur n'importe quelle zone de la surface cutanée.

Pour évaluer la perte de sensation provoquée par la lèpre il suffit, avec un objet pointu, un stylo par exemple, de stimuler une zone cutanée exempte de tâche en demandant au patient de bien indiquer avec le doigt la zone effleurée. En répétant cet examen au centre de la tâche suspecte, si le patient ne sent rien, il s'agit d'une lèpre.

Les différentes formes cliniques de lèpre sont corrélées à la réponse immunitaire du sujet atteint. En effet, un patient avec une immunité cellulaire correcte aura peu de lésions et pas de mycobactéries visibles dans les tissus alors que les patients anergiques vis-à-vis de *M.leprae* auront de nombreuses lésions avec des bacilles visibles.

Selon la classification de Ridley-Jopling basée sur l'indice bactériologique et le nombre de lésion, on distingue 5 formes de lèpre (schéma ci-après).

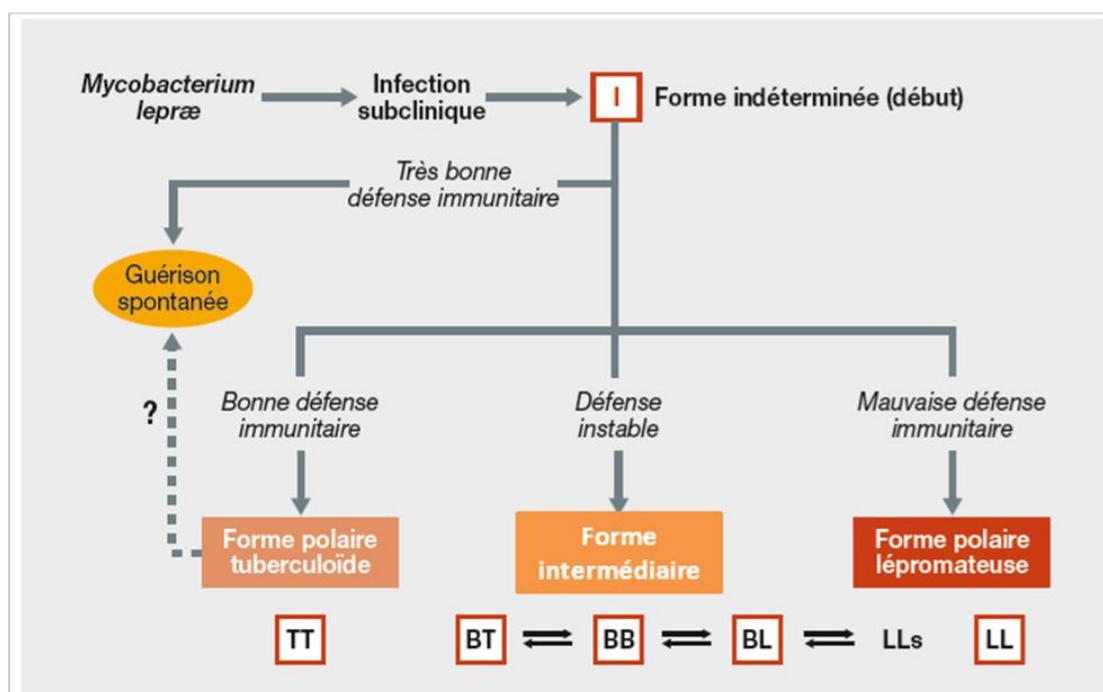


Figure 5 : Différentes formes cliniques de lèpre

TT : lèpre tuberculoïde ; BT lèpre borderline ; BB lèpre borderline borderline ; BL lèpre borderline lépromateuse  
 LLs lèpre lépromateuse subpolaire ; LL lèpre lépromateuse = (schéma tiré de Bouree, P. and G.Y. de Carsalade, [Current status of leprosy]. Rev Prat, 2012.)

Afin d'adapter au mieux le traitement en fonction des formes cliniques, l'OMS a voulu faciliter les choses et a décidé d'une classification selon le nombre de taches cutanées par patient (cf infra). D'une à cinq lésions cutanées: on parle de lèpre paucibacillaire (PB) qui correspondrait à forme

tuberculoïde de Ridley. Au delà de cinq lésions cutanées, c'est la lèpre multibacillaire (MB) ou encore lèpre lépromateuse de Ridley.



Figure 6 :Lèpre Paucibacillaire (PB)



Lèpre Multibacillaire (MB) (13)

De cette classification va découler la composition et donc la durée du traitement donc le type de plaquette délivré par le centre de santé.

Dans les pays endémiques, le diagnostic est le plus souvent uniquement clinique. Cependant, l'OMS valide la numération des bacilles dans le suc dermique du lobule de l'oreille pour déterminer l'index bactériologique (IB). Il est exprimé selon l'index de Ridley et cela correspond au nombre de bacilles par champs.

Dans les formes tuberculoïdes l'IB est négatif dans le suc dermique du lobule de l'oreille et est négatif ou égal à 1+ dans les lésions cutanées.

Dans les formes lépromateuses l'IB est positif, toujours supérieur à 2+, avec des bacilles regroupés en globi.

La diminution de l'IB est un signe de bonne observance du traitement mais n'est plus obligatoire pour le suivi du traitement.

Index bactériologique	Nombre de bacilles par champs microscopiques	Forme clinique de lèpre
Négatif	Absence	Lèpre tuberculoïde
1+	1 à 10 bacilles/ 100 champs	
2+	1 à 10 bacilles/ 10 champs	Lèpre lépromateuse
3+	1 à 10 bacilles/ champs	
4+	10 à 100 bacilles/ champs	
5+	100 à 1000 bacilles/ champs	
6+	> 1000 bacilles/ champs	

Tableau 2 : Classification selon l'indice de Ridley-Jopling

En dehors des manifestations cliniques spécifiques de la lèpre, des réactions immunologiques associées sont fréquentes. On parle de réactions lépreuses.

Les réactions de type 1 ou réactions de réversion sont surtout observées dans les formes tuberculoïdes en début de traitement. Elles sont la conséquence d'une intensification de la réaction

cellulaire. Cliniquement, il y a une inflammation des lésions qui deviennent douloureuses et peuvent même s'ulcérer. L'atteinte nerveuse associée peut toucher les nerfs crâniens en particulier le nerf VII et provoquer ainsi un logophtalmos. Les formes sévères peuvent conduire à la cécité. (10) Ce sont les corticostéroïdes à fortes doses qui sont utilisés pour traiter ces réactions.

Les réactions de type 2 ou Erythème Noux Lépreux (ENL) surviennent dans les formes multibacillaires. Elles résultent d'un dépôt de complexes immuns intra-tissulaires provoquant l'apparition de nodules cutanés. L'ENL est accompagné de réactions systémiques à type de fièvre, lymphadénite, arthrite, etc...(12). Les molécules efficaces contre cette vascularite sont le thalidomide, la clofazimine ou encore les corticostéroïdes. (3)

Enfin, le phénomène de Lucio correspond à une vascularite nécrosante provoquée par l'invasion endothéliale par la bactérie dans les formes multibacillaires. Il en résulte flush et plaques hémorragiques suivies de nécrose pouvant engager le pronostic vital. C'est une forme clinique vue spécifiquement en Amérique Centrale. Certains auteurs s'accordent à dire que cette forme clinique résulte de l'infection par une autre mycobactérie : *M.lepromatosis*. (14,15) (16)

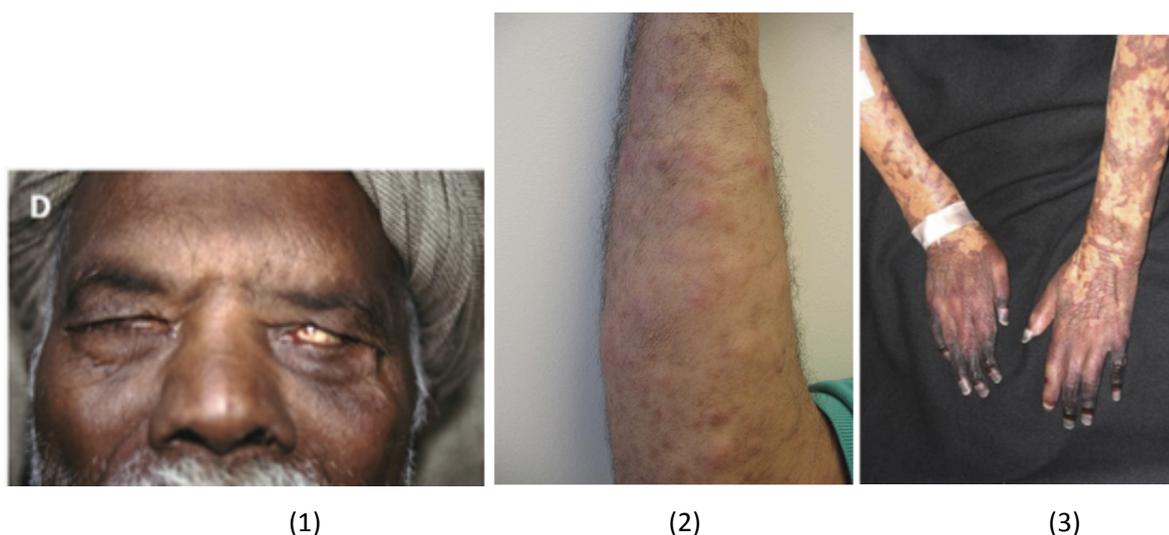


Figure 7 : (1)Logophtalmos (10) ; (2)Nodule retrouvé dans un ENL =(12) ; (3) Extrémité nécrosée par *M.lepromatosis* (16)

En général, on considère qu'un patient est guéri de la lèpre à la fin de son traitement. Cette évolution s'accompagne d'une disparition des papules, des macules et des plaques cutanées ainsi que d'une amélioration des fonctions nerveuses. Il est possible qu'à la fin du traitement le patient présente encore des taches mais elles disparaîtront avec le temps.

On parle de rechute ou de ré-infection quand le patient présente de nouvelles lésions sous traitement ou après arrêt du traitement.

Les réactions lépreuses et les neuropathies tardives peuvent perdurer même après la fin du traitement. Cela est plus fréquent lorsque le patient a été pris en charge tardivement. Ce ne sont pas

des rechutes mais des réactions de réversion tardives qui peuvent alors être contrôlées par de faibles doses de clofazimine (50 à 100 mg 3 fois par semaine).

## g. Traitement de la lèpre

### i. Principales molécules et mécanisme d'action respectifs

Le premier traitement médicamenteux utilisé dans le traitement de la lèpre était l'huile de chaulmoogra. La date précise de sa première utilisation reste inconnue mais l'arbre dont elle est extraite, dont le nom est *Taraktogenos kurzii*, est cité dans le traité indien le *Sushruta Samhita*, en 600 avant JC. Ce traitement ne s'est pas avéré très efficace et ce n'est qu'avec l'avènement de la chimie que les traitements ont évolué.

La dapsonne en monothérapie a été débutée dans les années 1940 (17). Les patients étaient alors traités à vie. Mais peu à peu, dès 1960, sont apparues les premières résistances à la dapsonne. En 1981, l'OMS a mis en place la polychimiothérapie (PCT) permettant de limiter l'émergence de résistances liées à la monothérapie et permettre ainsi une guérison de la lèpre. Dès 1995 une résolution est prise avec les industriels afin que la PCT soit mise à disposition gratuitement pour tous les patients lépreux.

L'OMS facilite le traitement avec un schéma très simple pour guider les praticiens dans les dispensaires : ce sont des plaquettes déjà préparées et prêtes à l'emploi. Selon la catégorisation en lèpre paucibacillaire ou multibacillaire, le schéma varie.

Pour la lèpre paucibacillaire (PB), le traitement consiste en 6 plaquettes de PCT PB.

Pour la lèpre multibacillaire (MB), le traitement consiste en 12 plaquettes de PCT MB.

Cette politique a permis de diminuer l'incidence et la prévalence de la lèpre (1)

**Traitement par la PCT**

**Il est essentiel que les malades comprennent quels médicaments ils doivent prendre chaque mois, et quels médicaments ils doivent prendre chaque jour.**

Chaque plaquette contient le traitement nécessaire pour 4 semaines.

**Plaquette PB adulte :**

**1 fois par mois:** Jour 1  
– 2 gélules de rifampicine (300 mg X 2)  
– 1 comprimé de dapsonne (100 mg)

**1 fois par jour:** Jours 2 à 28  
– 1 comprimé de dapsonne (100 mg)

**Traitement complet PB adulte:**  
6 plaquettes

**Plaquette PB adulte**

**Plaquette PB enfant (10 à 14 ans):**

**1 fois par mois:** Jour 1  
– 2 gélules de rifampicine (300 mg et 150 mg)  
– 1 comprimé de dapsonne (50 mg)

**1 fois par jour:** Jours 2 à 28  
– 1 comprimé de dapsonne (50 mg)

**Traitement complet PB enfant:**  
6 plaquettes.

Adaptez les doses de rifampicine et dapsonne en fonction du poids corporel chez les enfants de moins de 10 ans.

**Plaquette PB enfant**

**Plaquette MB adulte :**

**1 fois par mois:** Jour 1  
– 2 gélules de rifampicine (300 mg X 2)  
– 3 gélules de clofazimine (100 mg X 3)  
– 1 comprimé de dapsonne (100 mg)

**1 fois par jour:** Jours 2 à 28  
– 1 gélule de clofazimine (50 mg)  
– 1 comprimé de dapsonne (100 mg)

**Traitement complet MB adulte:**  
12 plaquettes

**Plaquette MB adulte**

**Plaquette MB enfant (10 à 14 ans):**

**1 fois par mois:** Jour 1  
– 2 gélules de rifampicine (300 mg et 150 mg)  
– 3 gélules de clofazimine (50 mg X 3)  
– 1 comprimé de dapsonne (50 mg)

**1 fois par jour:** Jours 2 à 28  
– 1 gélule de clofazimine tous les 2 jours (50 mg)  
– 1 comprimé de dapsonne (50 mg)

**Traitement complet MB enfant:**  
12 plaquettes.

Adaptez les doses de rifampicine, clofazimine et dapsonne en fonction du poids corporel chez les enfants de moins de 10 ans.

**Plaquette MB enfant**

Figure 8 : Plaquette de l'OMS destinée aux centres de santé avec les différentes plaquettes

Plusieurs molécules antibiotiques sont associées selon un schéma très standardisé. Les molécules utilisées en première ligne comprennent la rifampicine, la dapsonne et la clofazimine.

## 1. Rifampicine

La rifampicine est la molécule clé anti-lépreuse car c'est elle qui possède l'activité bactéricide la plus forte vis-à-vis de *M. leprae*. Cet effet bactéricide marqué permet une administration mensuelle de la molécule avec un bon taux de réponse. Elle agit sur la transcription en bloquant la sous-unité bêta de l'ARN polymérase ADN dépendante, encodée par le gène *rpoB*. (18)

La rifampicine subit un métabolisme hépatique important et se comporte comme un inducteur enzymatique avec, pour conséquence, de nombreuses interactions médicamenteuses.

Cependant, les recommandations de l'OMS d'une administration mensuelle permettent de diminuer voire d'annuler les interactions médicamenteuses tout en gardant son efficacité.

Sa toxicité est liée à la dose administrée. Dans le schéma d'administration mensuelle avec une dose standard de 600 mg, la tolérance est bonne même s'il a été rapporté de rares cas d'hépatite, d'insuffisance rénale, de thrombopénie et de syndrome grippal.

L'OMS recommande ce schéma d'administration mensuelle pour différentes raisons mais surtout pour limiter le coût du traitement. En effet, la rifampicine est une molécule onéreuse.

## 2. Dapsonne

La dapsonne ou 4,4-diaminodiphenylsulfone est un antibiotique de la classe des sulfones synthétiques possédant une activité anti-lépreuse en inhibant la synthèse des folates. Elle bloque la condensation du PABA ou 7,8-dihydro-6-hydroxymethylpterin-pyrophosphate en 7,8-dihydroptéroate. L'enzyme clé est la Dihydroptéroate Synthétase (DHPS) codée par le gène *folP*. Cette inhibition engendre un blocage dans la synthèse d'acide folique, composant indispensable à la croissance de la bactérie. (19)

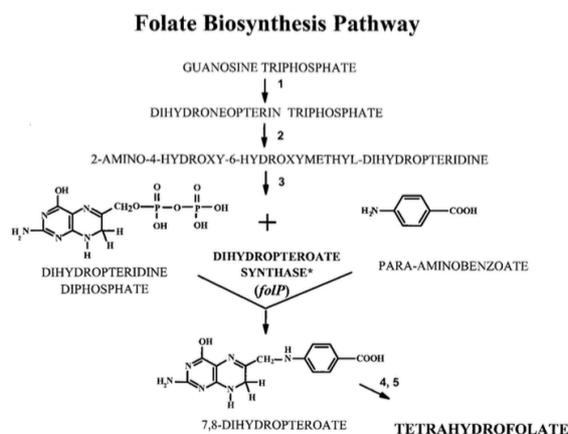


FIG. 1. Folate biosynthetic pathway with proposed sites for dapsonne and sulfonamide inhibitory action (11). Numbers represent enzymes in the pathway: 1, guanosine triphosphate hydrolase; 2, dihydroneopterin aldolase; 3, dihydropteridine pyrophosphokinase; 4, dihydrofolate synthase; 5, dihydrofolate reductase. The asterisk indicates the step in which sulfonamides and dapsonne compete with PABA in the DHPS reaction.

Figure 9 : Voie de synthèse des folates et mode d'action de la dapsonne (19)

C'est une molécule bon marché, correctement absorbée par voie orale, avec une demi-vie longue (28h) permettant une administration quotidienne.

Sa tolérance est bonne pour une grande majorité des patients. Elle peut même être administrée pendant la grossesse.

Elle est habituellement utilisée à la dose de 50 à 100 mg/jour.

Cependant, la dapsonne est susceptible d'engendrer une méthémoglobinémie et une anémie en cas de déficit en G6PD. C'est la raison pour laquelle tous les patients devraient être dépistés avant la mise en route du traitement. En cas de déficit partiel en G6PD, la dapsonne peut être initiée à la dose de 25mg/jour avec une surveillance accrue du taux d'hémoglobine.

Plus rarement, elle peut provoquer une myélosuppression avec neutropénie profonde, des troubles hépatiques (cytolyse et cholestase) et le « dapsonne syndrome » qui survient 6 semaines après la mise en route du traitement et caractérisé par une dermatite exfoliante, une lymphadénopathie généralisée, de la fièvre et une hépatospénomégalie.

### **3. Clofazimine**

C'est une molécule lipophile qui possède une activité bactériostatique vis-à-vis de *M.leprae*. Elle se lie préférentiellement aux zones d'ADN riches en guanine : ce qui pourrait expliquer son spectre d'action limité aux bactéries à génomes à haut GC% comme celui des Mycobactéries(20). Sa demi-vie est très longue (70 jours). Elle aurait également une activité anti-inflammatoire tout aussi importante que son activité bactériostatique même si à l'heure actuelle ce mécanisme n'est pas élucidé. La dose usuelle est de 50 mg/jour mais celle ci peut être augmentée en cas d'ENL .

Sa tolérance est globalement bonne. Elle provoque cependant une coloration de la peau et des conjonctives qui peut perdurer jusqu'à 6 à 12 mois après l'arrêt du traitement et qui est mal acceptée chez les malades à peau claire.

#### **ii. Molécules de seconde ligne**

En complément de ces trois molécules piliers, d'autres peuvent être utilisées en seconde intention. Ces molécules ont été initialement testées dans le but de pouvoir traiter les cas liés aux souches résistantes, mais pourraient également raccourcir le délai de traitement ou encore diminuer le coût de la prise en charge.

D'une part, les fluoroquinolones ont été utilisées avec succès dans des essais cliniques. Ce sont des molécules qui inhibent la réplication bactérienne en inhibant l'ADN gyrase, tétramère composé de deux sous unités A (*gyrA*) et B (*gyrB*). La ciprofloxacine est inactive contre *M.leprae* mais l'ofloxacine, la lévofloxacine, la pefloxacine et la moxifloxacine semblent être bactéricides avec les mêmes concentrations inhibitrices que celles observées pour *M.tuberculosis* (21). C'est la moxifloxacine qui semble être la plus efficace dans le traitement de la lèpre, mais c'est l'ofloxacine qui est généralement administrée car elle est moins coûteuse.(22)

Ensuite, la minocycline est la seule molécule de la classe des tétracyclines qui a montré une action vis-à-vis du *M.leprae* de par son pouvoir lipophile lui permettant de pénétrer à l'intérieur de la bactérie. Elle possède une excellente diffusion dans le système nerveux central ainsi que dans les kératinocytes. (23) La dose standard de 100mg permet d'atteindre des concentrations sériques supérieures de 10 à 20 fois la CMI de la molécule vis à vis de *M.leprae*.

Comme toutes les tétracyclines, elle inhibe la synthèse des protéines bactériennes en se fixant sur la sous unité 30S du ribosome bactérien. Il en résulte un blocage de la fixation de l'ARN de transfert, porteur spécifique d'acides aminés au complexe ribosome-ARN messager. De plus, elle agit en synergie avec d'autres molécules antilépreuses (rifampicine, dapsonne). Récemment l'Agence Nationale de Sécurité des Médicaments et des Produits de Santé (ANSM) a émis une restriction d'utilisation à cause du risque d'hypersensibilité médicamenteuse grave ou DRESS syndrome pouvant engager le pronostic vital. Cette molécule est donc soumise à prescription hospitalière. Elle demeure cependant bon marché (6 euros pour 15 comprimés) et a sa place dans le traitement de seconde ligne où le nombre de molécule est restreint.

Enfin, la classe des macrolides a une place dans le traitement de la lèpre. En effet, la clarithromycine possède une activité anti-lépreuse in vivo (24) confirmée par des essais cliniques (25). Administrée à la dose de 500 mg à des patients lépromateux, elle tuait 99% des bacilles en 28 jours et 99,9% en 56 jours. (26)

## h. Schémas thérapeutiques et alternatives

		Molécules	Posologies	Durée
<b>Lèpre PAUCIBACILLAIRE</b>	Adultes	Rifampicine	600 mg/mois	6 mois
		Dapsonne	100 mg/jour	
	Enfants	Rifampicine	450 mg/mois	6 mois
		Dapsonne	50 mg/jour	
<b>Lèpre MULTIBACILLAIRE</b>	Adultes	Rifampicine	600 mg/mois	12 mois
		Dapsonne	100 mg/jour	
		Clofazimine	300 mg/mois et 50 mg/jour	
	Enfants	Rifampicine	450 mg/mois	12 mois
		Dapsonne	50 mg/jour	
		Clofazimine	150 mg/mois et 50 mg/jour	

Tableau 3 : Schéma thérapeutique recommandé par l'OMS en 2013

Concernant les schémas alternatifs, rien n'est bien codifié même si plusieurs études ont été menées. La seule certitude réside dans le fait que la rifampicine est la molécule clé du traitement avec une bactéricidie bien supérieure à toutes les autres molécules utilisées. Certaines publications montrent un bénéfice à remplacer la prise quotidienne de l'association dapsonne/clofazimine par la clarithromycine ou la minocycline en ajoutant éventuellement une dose d'ofloxacine en une seule

prise mensuelle (Schéma ROM).(27). Devant un patient allergique ou qui rechute, la question se posera et le choix de la molécule sera empirique.

### **i. Résistances aux antilépreux**

Comme toutes les bactéries, *M.leprae* a développé des mécanismes de résistances vis-à-vis des molécules utilisées en thérapeutique. En effet, après avoir utilisé la dapsonne en monothérapie pendant plusieurs années, des patients ont rechuté hébergeant ainsi des souches résistantes : c'est la résistance secondaire. Ils pouvaient alors contaminer de nouveaux patients avec ces souches résistantes : on parle alors de résistance primaire. La résistance à la dapsonne a été mise en évidence dès 1964 (28) et la résistance à la rifampicine en 1976. Depuis, la résistance aux quinolones a aussi été démontrée(29).

Ce phénomène reste exceptionnel mais il existe déjà quelques cas rapportés de multi-résistance définie comme la résistance combinée à la rifampicine et à la dapsonne voire à l'ofloxacine. (30). Cela pose un problème de santé publique dans la mesure où l'arsenal thérapeutique anti-lépreux est restreint. C'est la raison pour laquelle l'OMS a mis en place un réseau sentinelle de surveillance des résistances dans plusieurs pays, d'abord 8 : Brésil, Chine, Colombie, Inde, Birmanie, Pakistan, Philippines et Vietnam puis depuis 2011 une quinzaine. Etant donné l'impossibilité de cultiver *M.leprae* sur les milieux conventionnels, les méthodes génotypiques sont devenues les plus rapides et les moins coûteuses pour surveiller l'émergence de résistance. Cependant, le « gold-standard » reste le modèle de croissance sur coussinet plantaire de souris permettant de cultiver le bacille et de réaliser ensuite des antibiogrammes. Les trois molécules ciblées sont : la rifampicine, la dapsonne et les quinolones. Il n'a pas encore été mis en évidence de résistance à la clofazimine dans la mesure où son mécanisme d'action est mal connu. Il est donc impossible de rechercher des résistances sans connaître la cible de la molécule.

Les mécanismes de résistance des trois molécules sont résumés sur le schéma ci-après (figure 11).

#### **i. Rifampicine**

Une petite région du gène *rpoB* nommée la RRDR pour Rifampicin Resistant Determining Region est le siège des mutations conférant la résistance. Elle se situe entre les codons 407 et 427. (2) La mutation la plus fréquemment retrouvée est la substitution d'une Serine (S) par une Leucine (L). Or la sérine est un petit acide aminé avec une chaîne polaire alors que la leucine est un acide aminé hydrophobe et volumineux. Il en résulte une obstruction du site de fixation de la molécule sur son site actif. (18)

#### **ii. Dapsonne**

Lors du séquençage du génome de *M.leprae* il a été mis en évidence deux gènes potentiellement en cause dans la synthèse des folates et codant pour la dihydroptéroate synthase : *folP1* et *folP2*. A l'heure actuelle, deux mutations séparées sont responsables de la résistance à la dapsonne. Elles sont toutes deux localisées dans une zone très conservée du gène *folP1* pour laquelle des mutations

engendrant la résistance aux sulfonamides a été trouvée pour d'autres espèces. Une équipe japonaise a mis en évidence des mutations sur deux codons 53 et 55 de *folP1* dans 6 souches de lèpre résistante à la dapsonne(31). Dans cet article, trois des mutants avaient une substitution d'une thréonine en isoleucine et une souche montrait une substitution d'une thréonine contre une alanine pour le codon 53. Les trois autres souches comportaient des mutations sur le codon 55 avec une proline à la place d'une leucine. Les travaux de Williams (19) confirment cette hypothèse et permettent de désigner une SRDR (Sulfone Resistance-Determining Region) du gène *folP1* qui renferment la majorité des mutations retrouvées dans les souches de lèpre résistantes à la dapsonne. Aucune mutation n'a été retrouvée dans le gène *folP2*.

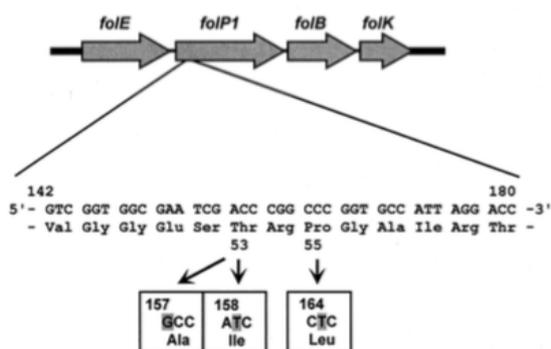


Figure 10 : Fragment d'ADN du gène *folP1* (388pb) montrant les 2 mutations sur les codons 53 et 55 (32)

### iii. Les fluoroquinolones

Les mutations responsables de la résistance à ces molécules se situent dans la région très conservée du gène *gyrA* : on parle là aussi de QRDR pour (Quinolone Resistance Determining Region). Il a été retrouvé des isolats abritant la mutation Ala91Val conférant la résistance (29). En se basant sur les connaissances des mutations de *gyrA* connues chez *M.tuberculosis*, il est envisageable de trouver des mutations conférant la résistance aux quinolones sur les codons 89, 92 et 95. (2). Pour le moment, aucune mutation de *gyrB* n'a été décrite.

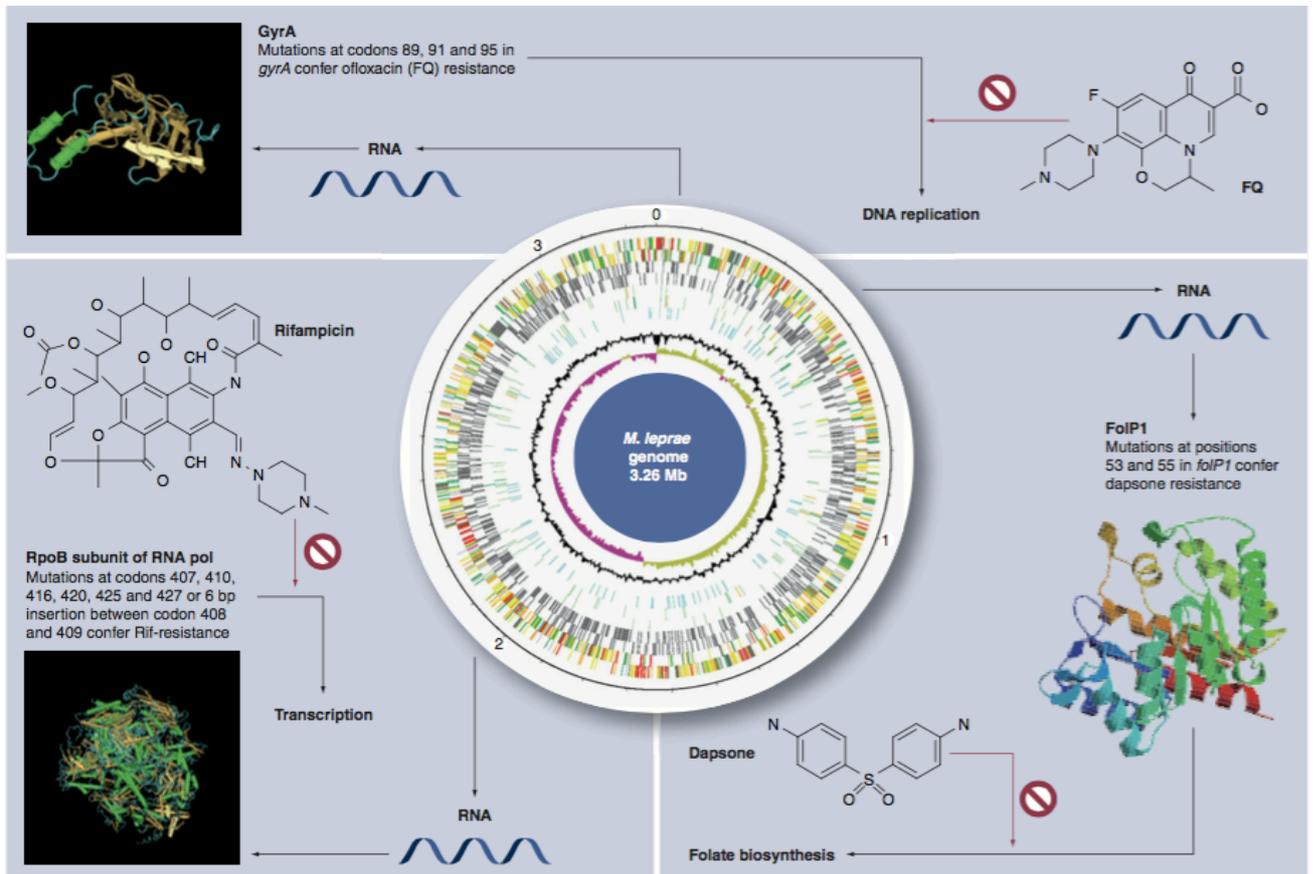


Figure 11: Récapitulatif des différents mécanismes d'action et de résistance aux anti-lépreux(2)

## II. DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE : MISE EN PLACE A LARIBOISIERE

Le laboratoire de bactériologie de l'hôpital Lariboisière héberge une partie du Centre National de Référence (CNR) des Mycobactéries. En 2015, les biopsies de 49 patients vivant en France y sont parvenues. 26 patients étaient atteints de lèpre dont 22 nouveaux cas et 4 rechutes. Parmi ces 26 patients, 16 venaient des DOM-TOM dont 11 de Mayotte (3 de Nouvelle Calédonie et 2 de Tahiti) et 10 étaient des patients vivant en France Métropolitaine mais immigrants de différents pays (Sri Lanka, RDC, Mali, Sénégal, Madagascar et Comores).

### a. Type de prélèvement reçus

Plusieurs types de prélèvement peuvent arriver au laboratoire pour le diagnostic bactériologique de la lèpre.

Le plus fréquent est la biopsie cutanée réalisée par la technique de « punch biopsie » sur une lésion suspecte de lèpre.

Une autre méthode consiste à prélever la sérosité dermique du lobe de l'oreille ou d'une lésion cutanée et de l'étaler ensuite sur une lame de manière à obtenir un frottis fin en vue d'une coloration à la recherche de bacilles lépreux.

### b. Préparation des biopsies

Idéalement les biopsies arrivent dans un tube sec, bien identifiées au nom du patient et associées à une feuille de renseignements cliniques. Dans le cas où la biopsie arrive dans un solvant (sérum physiologique ou éthanol) une étape préalable de séchage sous Poste de Sécurité Microbiologique (PSM) est nécessaire.

La biopsie est manipulée dans un laboratoire de sécurité biologique 3 sous PSM de type I ou II. En effet, *Mycobacterium leprae* est classé dans le groupe 3 des agents biologiques (agent biologique pouvant provoquer une maladie grave chez l'Homme et constituer un danger sérieux pour les travailleurs. Leur propagation dans la collectivité est possible mais il existe une prophylaxie ou un traitement efficace).

La biopsie est d'abord réhydratée avec une solution saline de bicarbonate de sodium tamponnée appelé solution de Hank's (Sigma-Aldrich® H9269) puis prédécoupée avec un scalpel.

Le broyat est alors déposé dans un flacon en verre contenant des billes de verre de 4 mm de diamètre immergées dans 2 ml de solution de Hank's. Le tout sera vortexé pendant 2 min. Il faut ensuite récupérer tout le liquide pour le transférer dans un tube à hémolyse contenant 0.5 ml de Hank's et 2 gouttes de Sérum Albumine Bovine ou BSA (Sigma-Aldrich® A4318). Après avoir laissé décanter pendant 2 minutes, le liquide sera reparti de la manière suivante :

- 200 µl dans un Eppendorf pour la biologie moléculaire ;
- 10 µl sur chaque lame pour faire une coloration de Ziehl- Neelsen ;

- Le reste dans un tube pour la conservation longue durée dans le congélateur à -80 °C.

### **c. Microscopie et colorations**

#### **i. Fixation du frottis**

La solution issue du broyat de la biopsie sera mélangée à part égale avec du lait formolé pour fixer le frottis. Cette solution est préparée à partir de Régilait<sup>®</sup> dilué dans une solution de formol. Le tout sera mis sur une plaque chauffante à 60°C pendant 2h. Une solution de CytoRAL fixatrice (RAL<sup>®</sup> 361400-0150) sera ensuite vaporisée sur chacune des lames.

Pour chaque biopsie, deux lames seront préparées. La première est colorée de suite. Si elle est négative, la seconde servira de confirmation de l'examen direct.

En parallèle, lors de chaque coloration, une lame témoin (connue positive) est mise à colorer pour s'assurer de la bonne réussite de la coloration.

#### **ii. Coloration**

La richesse en acides mycoliques des mycobactéries rend peu efficaces les colorants habituels. Les méthodes utilisées sont basées sur la propriété fondamentale des mycobactéries : leur acido-alcool-résistance (Bacilles Acido-Alcool-Résistants : BAAR). Ils retiennent le colorant malgré l'action combinée de l'acide dilué et de l'alcool. Ils apparaissent alors comme de fins bâtonnets rouges.

La particularité du bacille de la lèpre réside en sa capacité à s'assembler en globi. Lors du décompte, il est impossible de décompter le nombre de bacille composant le globi. On les décompte comme un seul BAAR mais on mentionne leur présence.

En routine, la coloration employée est le Ziehl-Neelsen à froid dite méthode de Kinyoun (décrite en 1915) est employée. La lecture est réalisée à l'objectif à immersion 100.

La coloration se déroule en trois étapes avec les réactifs du kit RAL Stainer Cold Zn (RAL<sup>®</sup> 360240-0000):

- La fixation à l'acide trichloroacétique (R1)
- La coloration à la fuchsine phéniquée (R2) qui colore la couche externe lipidique. Le phénol joue un rôle de mouillant qui permet la pénétration des cellules et remplace l'action de la chaleur ;
- Une décoloration à l'acide chlorhydrique (R3) puis à l'alcool à 90°C ;
- Une contre coloration de contraste au bleu de méthylène (R4) permettant de faciliter la lecture en créant un fond bleu.

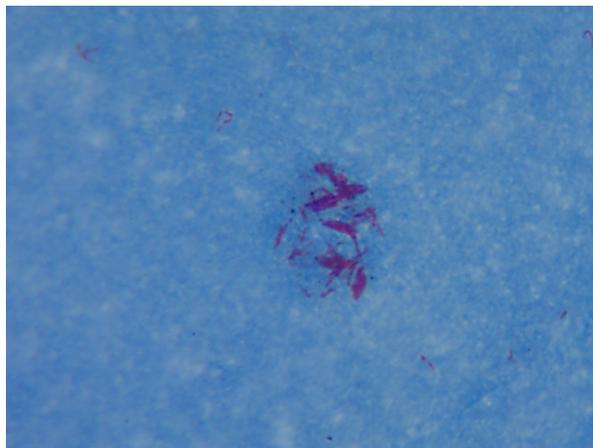


Figure 12 : Examen direct d'une biopsie cutanée (coloration de Ziehl Neelsen à froid) montrant un globi en formation et des BAAR isolés

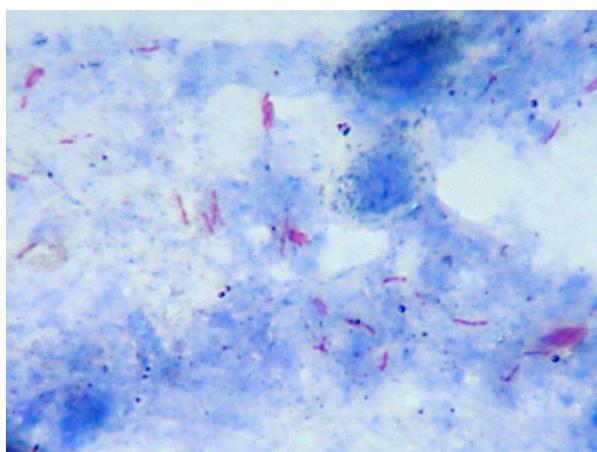


Figure 13 : Examen direct d'une biopsie cutanée (coloration de Ziehl Neelsen à froid) montrant des BAAR isolés

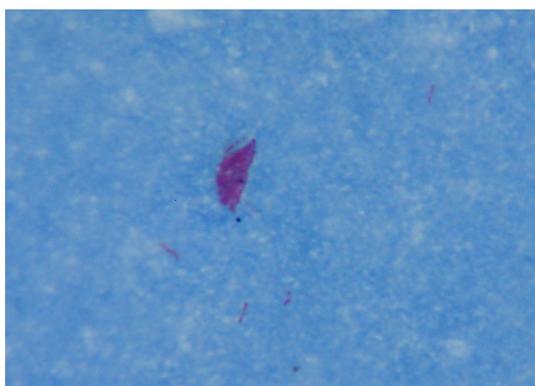


Figure 14: Examen direct d'une biopsie cutanée (coloration de Ziehl Neelsen à froid) montrant un globi central

Lors de notre travail, nous avons testé aussi deux autres colorations: la coloration de Ziehl-Neelsen à chaud et la coloration à l'auramine.

La technique de Ziehl à chaud consiste à chauffer la fuchsine après l'avoir déposée sur la lame jusqu'à émission de vapeurs. C'est la technique la plus utilisée dans les pays endémiques. Sur les lames testées, il n'y avait pas de différence significative avec la méthode à froid.

La coloration à l'auramine aussi appelée méthode de Degommier est une variante utilisant un fluorochrome : l'auramine. Les trois étapes sont identiques à celles de la méthode de Ziehl-Neelsen en utilisant comme kit de coloration le RAL Stainer Fuo-RAL (RAL® 360230-0000) : le colorant est l'auramine Fluo-RAL (CAS 2465-27-2) et comme contre-colorant le rouge thiazine Fluo-RAL (CAS 2150-33-6).

Dans ce cas, les BAAR apparaissent en vert brillant sur fond rouge au microscope à fluorescence à l'objectif 40. Cette méthode permet un examen plus rapide du frottis.

### iii. Rendu de résultats

Il a été décidé de rendre les résultats comme dans le cas de recherche de tuberculose et non pas avec l'index de Ridley puisque l'on travaille essentiellement sur des biopsies et non sur des frottis.

Quantité de BAAR visibles
>1000 BAAR/ champs
100 à 1000 BAAR/ champs
10 à 100 BAAR/ champs
1 à 10 BAAR/ champs
1 à 10 BAAR/ 10 champs
1 à 10 BAAR/ 100 champs

## d. Biologie moléculaire

Le diagnostic moléculaire de la lèpre comporte deux techniques : la PCR RLEP et la PCR hybridation HainLepraeDR®. Il permet de confirmer le résultat de l'examen direct mais aussi d'étudier la résistance aux antibiotiques.

### i. Extraction du matériel génétique

Le choc thermique associé à une sonication a été choisi pour extraire le matériel génétique des biopsies. C'est une technique décrite en 1989 par Woods.

Après inactivation à 95°C pendant 30 minutes dans le laboratoire de sécurité 3, le protocole suivi est le suivant :

- 2 min 100°C
  - 2 min glace
  - 15 min 95°C dans un bain à sec
  - 15 min ultra sons
- } x 5

Si la PCR n'est pas réalisée le même jour les extraits sont conservés dans le congélateur à -20°C.

## ii. PCR RLEP

Cette PCR est spécifique de *M.leprae*. En effet, elle est négative pour les autres Mycobactéries testées (*M. smegmatis*, *M.kansasii*, *M.avium*, *M.tuberculosis*, *M.bovis* et *M. bovis BCG*) ainsi que pour d'autres bactéries (Entérobactéries, Staphylocoques, Streptocoques et Corynébactéries). De plus, des patients atteints d'autres pathologies dermatologiques sont, eux aussi, négatifs pour ce test.

D'autre part, la sensibilité de ce test paraît être grande puisqu'une bande est observée dans un échantillon issu d'une patte de souris ne contenant qu'un BAAR. L'intensité de la bande est corrélée à l'index bactériologique. En effet, celle-ci sera d'autant plus forte que l'index bactériologique sera grand.

Cependant, il n'y a pas de différence significative entre un examen direct après coloration de Ziehl et cette technique de PCR. Le seul avantage serait de détecter les patients malades avec un indice bactériologique négatif. Yoon montre que parmi 10 patients négatifs en microscopie 6 avaient une lèpre diagnostiquée par PCR.

D'autre part, certains cas avec une microscopie très positive ne donnent pas de résultats positifs en PCR. Cela est souvent imputable à des inhibiteurs de la Taq polymérase dans la biopsie cutanée. Mais ces dernières années, une nouvelle espèce est apparue, *M.lepromatosis* qui est très proche de *M.leprae*. Sa particularité serait d'être corrélée avec une forme particulière de lèpre lépromateuse donnant des lésions diffuses non nodulaires. On parle de phénomène de Lucio. On le retrouve surtout chez des patients mexicains ou habitant dans les Caraïbes. Certains auteurs notent une absence de positivité de la PCR RLEP pour cette espèce mais les données restent peu nombreuses à ce sujet. Dans une publication récente {VeraCabrera:2011}, les auteurs recommandent de séquencer le QRDR de *rpoB* des échantillons discordants (microscopie positive/ PCR RLEP négative) pour vérifier s'il s'agit ou non de cette nouvelle espèce.

### 1. Amorces utilisées

Le génome de *M.leprae* contient au moins 28 copies d'une séquence répétée dispersée dans le génome. Cet élément répété, RLEP, contient un domaine central conservé de 545 pbs flanqué en amont et en aval de séquences variables permettant de définir plusieurs types de RLEP. Les amorces R1 et R2 utilisées pour cette PCR ont été décrites en 1990 (33). Elles permettent d'amplifier un fragment de 372 pbs de l'élément RLEP du génome de *M.leprae*.

### 2. Technique de PCR

La technique utilisée est ancienne puisqu'elle a été publiée il y a plus de 20 ans (34). C'est une PCR en point final.

Les réactions de PCR ont été réalisées avec les réactifs suivants :

Réactifs	Volume pour 1 échantillon
GoTaq 2X	12.5 µl
Amorce RLEP YOON F : 5'-CGGCCGGATCCTCGATGCAC-3'	2.5 µl
Amorce RLEP YOON R : 5'-GCACGTAAGCTTGTCGGTGG-3'	2.5 µl
Eau	5.5 µl
ADN	2 µl

Les conditions de PCR sont les suivantes :

Dénaturation : 10min 94°C

Dénaturation : 1min 94°C

Hybridation : 1min 56°C

x40 cycles

Elongation : 1min 72°C

Elongation finale : 10min 72°C

Les produits de PCR sont ensuite déposés sur un gel d'agarose à 1% avec deux témoins positif et négatif. Après la migration électrophorétique, la bande attendue à 372pb est observée sous lumière UV.

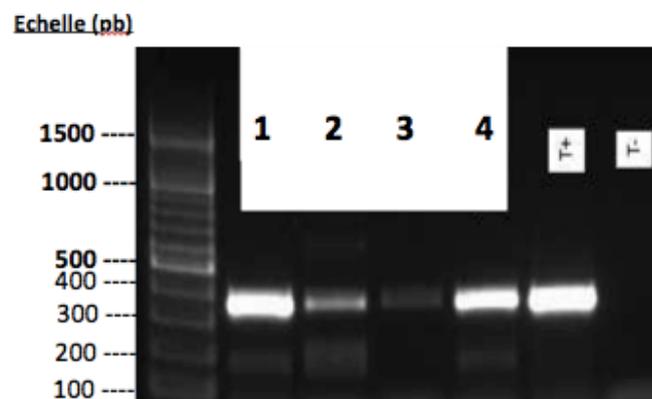


Figure 15 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de la PCR RLEP

### iii. Diagnostic de la résistance aux anti-lépreux

*Mycobacterium leprae* fait partie des bactéries qui ne se cultivent pas in vitro. Le seul moyen de tester les anti-lépreux est de faire une inoculation dans le coussinet plantaire de la souris. Cependant étant donné le temps de division du bacille qui est de 14 jours cette technique est très longue (> 1 an) et très laborieuse. Elle se compose en deux temps. D'abord, on inocule à la souris une suspension réalisée à partir des biopsies cutanées. Au bout de 7, 9 voire 12 mois, si une culture est obtenue sur le coussinet, d'autres souris sont alors inoculées et elles seront traitées par rifampicine, ofloxacine ou dapsonne. Le nombre de bacilles présents dans les souris traitées est comparé à celui des souris témoins inoculées en parallèle mais non traitées.

L'avènement de la biologie moléculaire a révolutionné la détection de la résistance aux anti lépreux. Il suffit maintenant de séquencer les gènes en cause dans le mécanisme d'action des molécules, *rpoB* pour la rifampicine, *gyrA* pour les quinolones et *folP* pour la dapsonne.

Cependant les méthodes de séquençage ne sont pas disponibles dans tous les laboratoires et restent des techniques chronophages. C'est pourquoi un test rapide sur une bandelette d'hybridation inversée a été développé (35). Il permet avec PCR multiplex de mettre en évidence les mutations les plus fréquentes pour les trois gènes cités ci-dessus.

C'est un test qualitatif de diagnostic *in vitro* qui permet aussi l'identification de *M.leprae* par biologie moléculaire et la détermination de sa résistance à la rifampicine et/ou l'ofloxacine et/ou la dapsonne à partir d'échantillons cutanés positifs à la coloration de Ziehl-Neelsen.

La procédure complète comporte 3 phases :

- Extraction de l'ADN à partir des échantillons de biopsies positives à la coloration de Ziehl-Neelsen, comme précédemment décrit pour la PCR RLEP ;
- Amplification multiplex à l'aide d'amorces biotinylées ;
- Hybridation inverse comprenant :
  - o dénaturation de l'ADN amplifié
  - o hybridation des amplicons simples brins biotinylés sur les sondes pré-immobilisées sur la membrane
  - o lavage
  - o addition d'un conjugué streptavidine/phosphatase alcaline
  - o révélation chromogénique.

Les signaux obtenus sont analysés grâce à la matrice fournie dans le test.

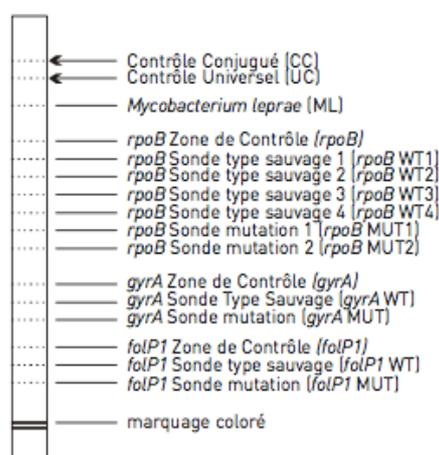


Figure 16 : Matrice de révélation de la bandelette GenoType LepreDR Hain ®

La ligne CC pour Contrôle Conjugué doit être présente sur chaque bandelette car elle témoigne de la bonne fixation du conjugué et donc du bon déroulement de la révélation.

La ligne UC (Contrôle Universel) est une zone qui s'hybride avec toutes les Mycobactéries connues ainsi que les bactéries Gram Positives à haut GC%. Seules les lignes colorées d'intensité environ égale ou supérieure à cette ligne doivent être prises en compte pour l'interprétation.

La ligne ML (*Mycobacterium leprae*) permet d'affirmer la présence de l'ADN de *M.leprae*. L'intensité de cette bande varie en fonction de la quantité d'ADN contenue dans la biopsie.

Les zones de contrôle (*rpoB*, *gyrA*, *folP1*) détectent des régions spécifiques de chaque locus testé et doivent toujours être positives quand la présence de *M.leprae* est documentée au niveau de la zone ML.

Les sondes de type « sauvage » comprennent les séquences non mutées de chaque région du gène impliquée dans la résistance. Lorsque tous les types sauvages d'un même gène sont positifs, il n'y a pas de mutation décelable au sein des régions examinées. La souche est donc sensible pour l'antibiotique correspondant. En cas de mutation, l'amplicon ne peut pas s'hybrider à la sonde sauvage. L'absence de signal sur les sondes sauvages indique la présence d'une mutation. Les sondes mutations détectent les mutations les plus fréquentes à l'origine des résistances.

Molécule analysée	Nom mutation sur la bandelette	Mutation détectée
Rifampicine	rpoBMUT1 (absence WT3)	H451Y
	rpoBMUT2 (absence WT4)	S456L
Quinolones	gyrAMUT	A91V
Dapsone	folP1MUT	P55L

Tableau 4 : Résistances mises en évidence sur la bandelette GenoType LepraeDR Hain® et mutations associées

Dans la bandelette Hain®, le gène *rpoB* (gène cible de la résistance à la rifampicine) a été découpé en 4 zones. Les deux sondes mutations (*rpoBMUT1* et *rpoBMUT2*) ont été respectivement placées dans les zones Wild Type 3 et 4. Cela signifie qu'une bande WT1 ou WT2 peut être manquante si une autre mutation autre que les deux plus fréquentes est présente. Dans ce cas, il sera nécessaire de séquencer le gène pour déterminer la mutation exacte.



Figure 17 : Gène *rpoB* de *M.leprae* et zones d'intérêt pour la recherche de résistance

### III. ETUDE DE LA RESISTANCE AUX MACROLIDES

#### a. Contexte : Mayotte et les déficits en G6PD

La population d'étude est une cohorte de patients vivant dans l'archipel des Comores et en particulier à Mayotte (DOM français). En effet, la lèpre est endémique à Mayotte (BEH 41-42, 10 décembre 2013). Le taux de détection annuel entre 2006 et 2011 était de 2,6/10 000 habitants et la prévalence de 5,0/10 000. L'augmentation de la part des formes multibacillaires souligne une circulation active du bacille.

De plus, la population des Comores comprend de nombreux sujets atteints d'un déficit très commun touchant le globule rouge, le déficit en Glucose-6-Phosphate Deshydrogénase ou G6PD(36). Or ce déficit contre indique l'utilisation de la dapsons car il provoque des crises graves d'anémie hémolytique. Les patients atteints de déficit en G6PD reçoivent parfois un antibiotique comme la clarithromycine à la place de la dapsons. Cette population est donc plus à risque de résistance aux macrolides.

#### b. Mécanisme d'action et de résistance aux macrolides

##### i. Description des différentes classes

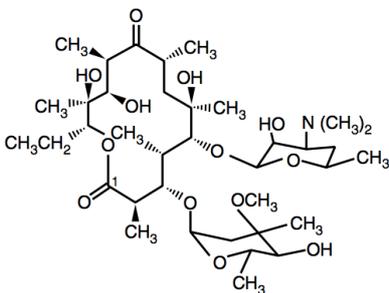


Figure 30-1 Erythromycin base.

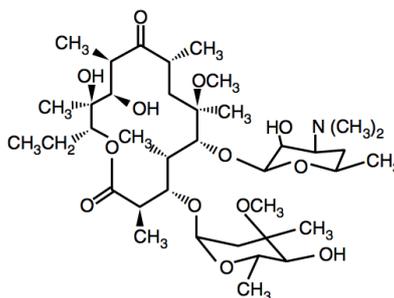


Figure 30-3 Clarithromycin base.

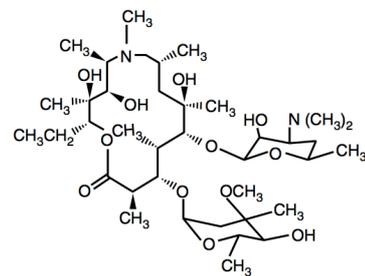
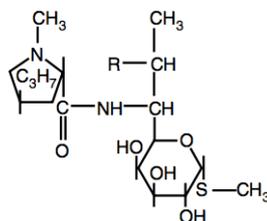


Figure 30-2 Azithromycin base.



trans-L-4-n propylhygrinic acid

Figure 30-5 The lincosamide antibiotics. In lincomycin, R = OH; in clindamycin, R = Cl.

Figure 18 : Formules développées des macrolides (Mandell 7th edition, vol 1&2)

Les macrolides sont des dérivés semi-synthétiques. En effet, en 1952, l'érythromycine a été extraite de *Streptomyces erythreus*. C'est un macrocycle à 14 atomes de carbone comprenant un noyau lactone associé à deux sucres : la désosamine et le L-cladinose.

La clarithromycine diffère de l'érythromycine par la substitution en position 6 sur le cycle lactone d'un groupement méthyle par un groupement méthoxy.

L'azithromycine possède 15 atomes de carbone car le cycle lactone a été substitué par un atome d'azote méthylé (N-CH<sub>3</sub>).

D'autre part, les kétolides qui sont en voie de disparition de par leur hépatotoxicité parfois létale, diffèrent de l'érythromycine par la substitution du L-cladinose en 3 par un groupe cétone d'où leur nom (keto = cétone). Cela les protège de la résistance de type MLSb.

Enfin, le groupe des lincosamides diffère complètement de l'érythromycine. La lincomycine a été extraite d'un *Streptomyces lincolnensis* en 1962. C'est l'assemblage d'un acide aminé relié à un amino-sucrose. La clindamycine est en fait la 7-chloro-7 desoxylincomycine.

## ii. Rappel sur la synthèse protéique et rôle du ribosome

Le ribosome est formé de deux sous-unités : une petite (30S) et une grande (50S). Cette dernière est composée d'ARN 23S et 5S et d'au moins 30 protéines désignées par la lettre L (« large ») et numérotées. La structure secondaire de l'ARN 23S forme 6 domaines numérotés de I à VI. Le domaine V contient le centre peptidyl-transférase (PTC) où s'effectue la synthèse du peptide. Le tunnel à travers duquel cheminent les acides-aminés est formé par les domaines I à IV de l'ARN 23S et les protéines ribosomales L4 et L22.

L'adénine en position 2058 (notée A2058) constitue l'entrée de la partie la plus étroite du tunnel(37) alors que les protéines L4 et L22 forment une constriction montrant la sortie du tunnel (figure 19).

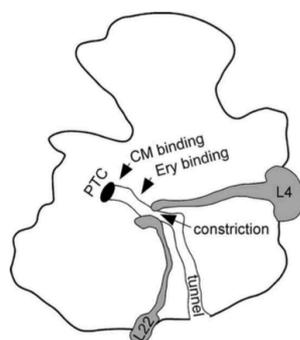


Figure 19 : Représentation de la sous-unité 50S ribosomale montrant le centre peptidyl-transférase et les sites de fixation des antibiotiques Erythromycine et Chloramphénicol(38)

## iii. Mécanisme d'action des macrolides

Les macrolides sont des molécules qui interfèrent avec la synthèse des protéines bactériennes. Ils sont habituellement bactériostatiques mais peuvent, dans certaines conditions de concentration en antibiotique et d'inoculum bactérien, se révéler bactéricides. Leur spectre inclue des bactéries à

Gram positif mais aussi à Gram négatifs, quelques anaérobies et certaines mycobactéries donc celles du groupe *Mycobacterium avium* complex et *M.leprae*.

Ils inhibent la synthèse protéique au stade de l'élongation en se liant au domaine V de l'ARN ribosomal 23S (appartenant à la sous-unité 50S du ribosome bactérien). Leur site de fixation sur le ribosome bactérien se situe à l'entrée du centre peptidyl-transférase. L'une des bases clé de cette fixation est l'adénine en position 2058. Leur liaison entraîne le blocage de l'élongation par obstruction de la sortie du tunnel peptidique. Ainsi l'ARN de transfert se dissocie du ribosome et la synthèse protéique est interrompue.

#### **iv. Mécanismes de résistance**

##### **1. Imperméabilité ou efflux**

Les entérobactéries sont naturellement résistantes aux macrolides de par la présence de la membrane externe, qui confère une faible perméabilité vis-à-vis des macrolides. Cela se retrouve aussi chez *Pseudomonas* spp. et *Acinetobacter* spp.

La présence des acides mycoliques dans le règne des Mycobactéries participe aussi de la faible pénétration des macrolides.

De plus, des pompes d'efflux de différentes classes sont responsables de la résistance aux macrolides et parfois aux lincosamides et streptogramines.

##### **2. Inactivation de la cible ribosomale**

Les mutations dans le domaine V de l'ARN23S confèrent une résistance aux macrolides. Une résistance de haut niveau mise en évidence chez différentes espèces telles que *S.pneumoniae*, *H.pylori*, *M.avium* complex, *B.subtilis*, *S.pyogenes*, *Campylobacter* spp. *E.coli* et *S.aureus* résulte de la diméthylation de l'adénine en position 2058 (A2058). Cette résistance est médiée par les gènes *erm* (erythromycine ribosome methylation) dont différentes classes ont d'ores et déjà été identifiées (ex : *ermA* et *ermC* pour *S.aureus*, *erm A* et *ermB* pour *S.pyogenes*, ... ). On parle de phénotype MLSb car il touche les Macrolides, les Lincosamides et la Streptogramine B. Ce phénomène peut être constitutif ou inductible par des concentrations subinhibitrices de macrolides (mais les lincosamides ne sont pas des inducteurs). Dans ce cas-là, les souches sont résistantes aux macrolides classiques mais *in vitro* restent sensibles à la clindamycine. Cependant il y a un fort risque de sélection de mutants résistants hyper-producteurs de la méthylase, surtout dans les infections avec un fort inoculum.

D'autres gènes chromosomiques peuvent aussi être mutés et provoquer ainsi des résistances aux macrolides : les gènes *rml*, ou ceux codant pour les protéines ribosomales L4 et L22(39). Cela a surtout été décrit pour le Pneumocoque, *H.pylori*, *E.coli* et aussi des Mycobactéries non tuberculeuses.

### 3. Inactivation enzymatique de l'antibiotique

Plusieurs enzymes inactivant les macrolides ont été décrites. D'une part, des phosphoestérases codées par des gènes de type *mphA*, *mphB* et *mphC* pour *E.coli*, *S.aureus* et *Nocardia* spp. D'autre part, des estérases codées par des gènes nommés *ereA* et *ereB* ont été décrites chez des Entérobactéries ainsi que de rares souches de *S.aureus*.

## c. Matériel et méthodes

### i. Caractéristiques des patients

Les 34 patients sélectionnés pour l'étude étaient tous originaires des Comores. La moitié d'entre eux provenaient du Département français d'Outre-Mer de Mayotte.

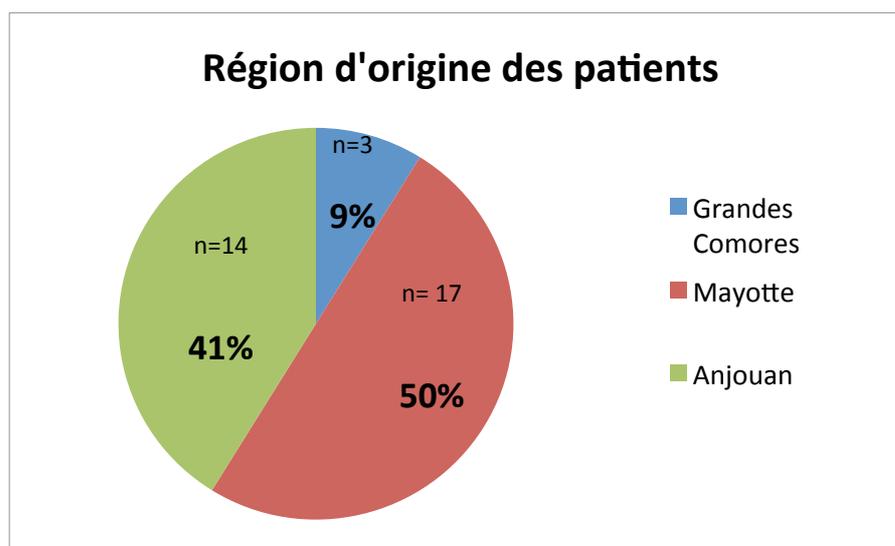


Figure 20 : Répartition des patients selon leur origine géographique dans l'archipel des Comores

La grande majorité des patients étaient des hommes (68%, n=23) et il y avait également 4 enfants de 9 à 16 ans. L'âge moyen de cette cohorte était de 29 ans.

### ii. Etude préliminaire des gènes étudiés

Dans la littérature, les principales résistances aux macrolides dans le genre Mycobactéries concernent les gènes *erm*, *rrl* et les gènes codant pour les protéines ribosomales L4 (gène *rplD*) et L22 (gène *rplV*).

#### - Gène *erm*

Jusqu'à présent, aucun gène *erm* n'a été décrit dans le génome de *M.leprae*. Pour le vérifier, nous avons donc pris des régions de séquences d'acides aminés conservées des protéines Erm parmi 3 mycobactéries (*Erm37* de *M. tuberculosis* H37Rv, *Erm41* de *M.abscessus* ATCC19977, *Erm39* de *M.fortuitum* DSM46621) que nous avons ensuite comparé avec l'outil BLAST (logiciel Blast NCBI) aux séquences du génome de *Mycobacterium leprae*.

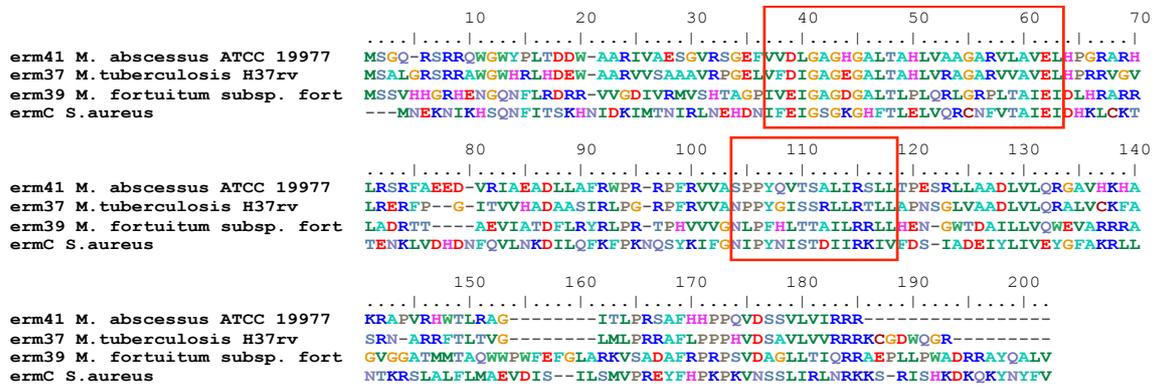


Figure 21 : Alignement des protéines *Erm*, les zones conservées sont encadrées en rouge

Il n'a été trouvé aucune similitude entre ces zones conservées des protéines *Erm* et le génome de *M.leprae*. La seule chose que l'on a pu trouver est la présence du gène *coaE* en aval de *erm* de *M. abscessus*.

Cependant, en regardant l'organisation du gène *erm41* de *M.abscessus*, on remarque la présence de deux autres gènes en amont (*rpsA* = protéine ribosomale 30S S1) et en aval (*coaE* = dephosphoCoA kinase) qui assurent la régulation de la synthèse de la méthyltransférase.

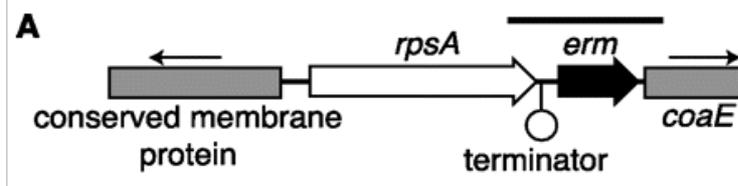


Figure 22 : Organisation de la région génique de 4 kpb environnant le gène *erm41* de *M.abscessus* MC719(40)

En utilisant les amorces signalées par la barre noire sur le schéma ci-dessus, on peut trouver ces deux gènes chez *M.leprae* alors que le gène *erm* est absent.

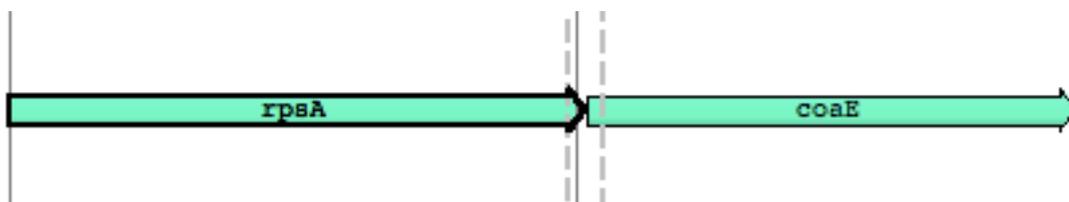


Figure 23 : Absence du gène *erm* entre *rpsA* et *coaE* chez *M.leprae*

Pour d'autres Mycobactéries, le gène *erm* est dans l'environnement proche d'un autre gène *folD*. Comme *M.leprae* possède également ce gène *folD*, nous avons regardé quelle était la composition de cet environnement génique. On ne retrouve pas de gène de méthyltransférase. En conclusion, il ne paraît pas y avoir de gène *erm* dans le génome de *M.leprae*.

- Gène *rrl*

*Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chelonae* ainsi que *Mycobacterium avium* et *intracellulare* sont les espèces pour lesquelles la résistance aux macrolides a été la mieux décrite. Nous nous sommes donc basés sur les données publiées pour ces espèces. En 1996, Wallace et al. ont décrit des mutations du gène *rrl* codant l'ARN23S (41). Il s'agit de mutations survenant au niveau du domaine V de l'ARN23S, impliquant les adénines en position 2058 et 2059. Des résidus guanine ou cytosine remplacent les adénines initiales.

- Gènes *rplD* et *rplV*

Pour ces deux gènes codant pour des protéines ribosomales, aucune donnée n'a été publiée dans le genre des Mycobactéries. Nous avons donc pris les données publiées pour *Streptococcus pneumoniae*. En effet, chez le pneumocoque, le mécanisme de résistance aux macrolides par mutations des protéines ribosomales L4 et L22 a été largement décrit. Ces mutations entraînent des résistances de plus bas niveau que les résistances par mutation de *rrl*.

Les mutations du gène *rplV* entraînent une modification des acides aminés en 91, 93 et 95 (42) avec pour conséquence un élargissement du tunnel peptidique. En comparant les séquences de *rplV* du pneumocoque, de *M. abscessus* et de *M. leprae*, il a été mis en évidence une grande homologie de la zone d'intérêt (encadrée en rouge sur le schéma ci-dessous). Ainsi dans cette étude, il a été choisi de placer les amorces de manière à amplifier cette région du gène *rplV* encadrant les acides aminés d'intérêt.

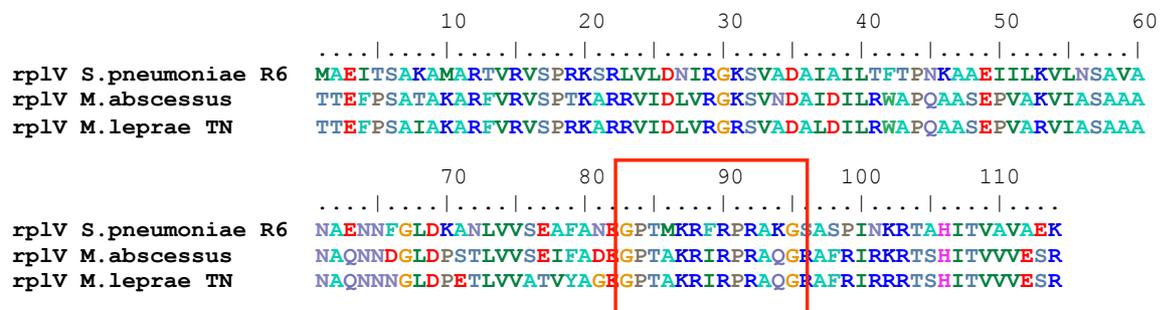


Figure 24 : Zone d'intérêt du gène *rplV* : acides aminés G83, P91, A93 et G95

Les mutations du gène *rplD* décrites sont celles qui entraînent une modification des acides aminés en position 69 et 71 (43) aboutissant à un rétrécissement du tunnel de sortie peptidique. De même que pour *rplV*, la zone d'intérêt était très conservée entre les trois espèces comparées.

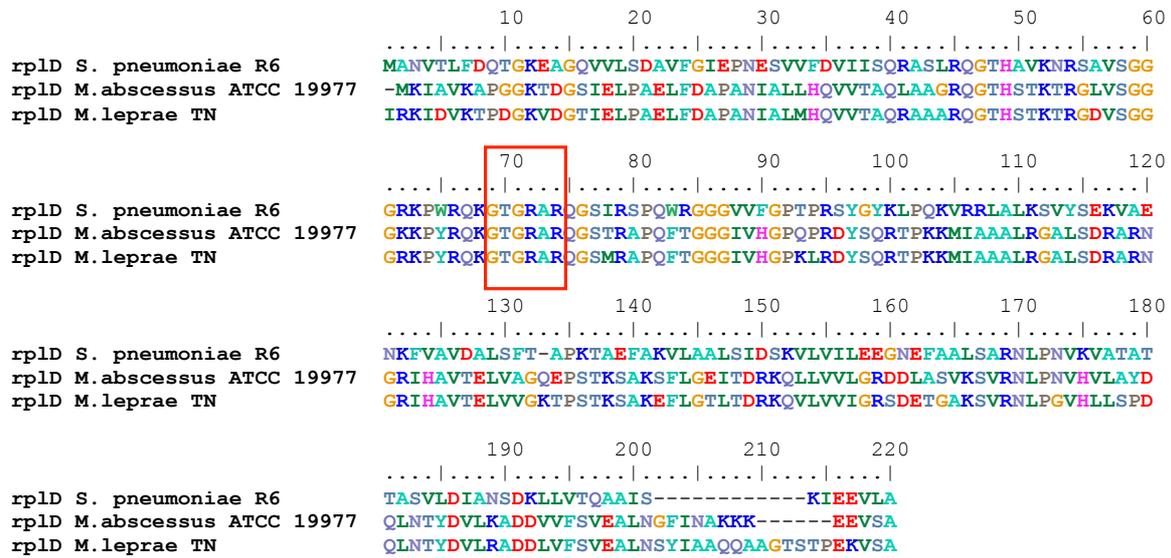


Figure 25 : Zone d'intérêt du gène *rplD* : acides aminés G69 et G71

### iii. Choix des amorces

Les zones d'intérêt des gènes étudiés étant clairement identifiées, nous avons choisi des amorces les encadrant.

Les règles de base de conception des amorces ont été respectées :

- Taille entre 18 et 20 paires de bases (pb) pour éviter la redondance dans le génome ;
- Température d'hybridation (ou Tm) proche pour les deux brins sens (F pour Forward) et antisens (R pour Reverse)
- GC% compris entre 50 et 60%
- Absence de bases complémentaires en début et en fin de séquence pour éviter le repliement de l'amorce.
- Fragment obtenu > 200 pb.

L'absence de redondance dans le génome objectivant la spécificité de l'amorce a été vérifiée pour les deux brins en blastant le primer dans le génome de *M. leprae*. Il a été accepté une différence de 6 bases entre l'oligonucléotide choisi et le suivant permettant ainsi d'assurer une grande spécificité.

Les primers ont ensuite été synthétisés par SIGMA Aldrich<sup>®</sup>. Ils ont été reconstitués à partir du lyophilisat reçu en ajoutant le volume d'eau indiqué par le fabricant pour obtenir une concentration de 100 µM.

#### 1. Gène *rrl*

Pour rechercher la mutation en position 2058- 2059, les deux amorces choisies étaient les suivantes :

	Séquences	Tm (°C)	GC%	Position dans le génome de <i>M. leprae</i>	Taille fragment (pb)
<b>rrl F</b>	GTAAACGGCGGTGTAAC TA	54,7	50	1345096-1345115	437
<b>rrl R</b>	GTGCATTTACTCGCCACC	57	55	1345514-1345533	

## Gène *rrl*(3125 pb)

GTAAGTAAGTGCCTAAGGGCGCATGGTGGATGCCTTGGCATCGAGAGCCGATGAAGGACGTGGGAGGCTG  
 CGATATGCCTCGGGGAGCTGTCAACCCGAGCGTGGATCCGAGGATTTCCGAATGGGGAAACCAACACGAG  
 TCATGTCGTGTTACCCGTATCTGAATATATAGGGTTCGGGAGGGAACCGGGGAAGTGAAACATCTCAGT  
 ACCCGTAGGAGAAGAAAACAATTGTGATTCCGCAAGTAGTGGCGAGCGAACGTGGAATATGGCTAAACCG  
 CACACATGTCTAACTAGGTAGGGGTTGTGTGTGCGGTGTTGTGGGATTGGTATGTCTCAACTCTACCTGG  
 TTGAGGGGTAGTCAGAAAGTGCCGTGGTTAGCGGAAATGGCCTGGGATGGCCTGCCGTAGACGGTGAGAG  
 CCCAGTACGCGAAAGCCTGGCACCTGCCTTGTATCAATTCCCGAGTAGCAGCGGGCCCCGTGGAATCTGCT  
 GTGAATCTGCCGGGACCACCCGGTAAGCCTAAATACTTCTCGATGACCGATAGCGGATCAGTACCGTGAG  
 GGAATGGTGAAGAGTACCCCGGGAGGGGAGTGAATAGTACCTGAAACCGTGTGCCTACAATCCGTCAGA  
 GCCTCTTTGTGGGTGATGGCGTGCCTTTTTGAAGAATGAGCCTGCGAGTCAGGGACATGTCGCGAGGTTA  
 ACCCGTGTGGGGTAGCCGACGCGAAGCGAGTCTGAATAGGGCGTATCACGTGTGAGCGTGTGTAGTGGC  
 GTGTTCTGGACCCGAAGCGGAGTGTATCTACCCATGGCCAGGGTGAAGCGCGGGTAAAGCCGCTGGAGGC  
 CCGAACCCTTAAGTTGAAGATTGAGGGGATGAGTTGTGGGTAGGGGTGAAAGGCCAATCAAACCTCCGT  
 GATAGCTGGTTCTCCCCGAAATGCATTTAGGTGCAGCGTTGCGTGGTTACCACGGAGGTAGAGCTACTG  
 GATGGCCGATGGGCCCTACTAGGTTACTGACGTCAGCCAAACTCCGAATGCCGTGGTTAAAAAGCGTGGC  
 AGTGAGACGGCGGGGATAAGCTCCGTACGTCGAAAGGGAACAGCCAGATCGCCGGCTAAGGCCCTA  
 AGCGTGTGCTAAGTGGAAAAGGATGTGCAGTCGAAAGACAACCAGGAGGTTGGCTTAGAAGCAGCCACC  
 CTTGAAAGAGTGCCTAATAGCTCACTGGTCAAGTGATTGTGCGCCGATAATGTAGCGGGGCTCAAGCACA  
 CCGCCGAAGCCGCGGCACATTCACCTTCTAGGGTGGATGTGGGTAGGGGAGCGTTCCTCATTCAGCGAAG  
 CCTCCGGGTAACCGGTGGTGGAGGGTGGGGAAGTGAAGAATGCAGGCATGAGTAGCGATAAGGCAAGTGAG  
 AACCTTGCCCGCCGTAAGACCAAGGGTTCCTGGGCCAGGCCAGTCCGCCAGGGTGAGTCGGGACCTAAG  
 GCGAGGCCGACAGGCGTAGTCGATGGACAACGGGTTGATATTCCCGTACCCGTGTGTGTGCGCCCGTGAT  
 GAATCAGCGGTACTCACCACCCAAAACCGGATCGACCATATCCCCTTCGGGGGCTATGGAGGTTCCGGGC  
 TGCGTGGGAACCTTCGTTGGTAGTAGTCAAGCGATGGGGTGACGCAGGAAGGTAGCCGTACCAGTCAGTGG  
 TAATACTGGAGCAAGCCCGTAGGGAGAGCGATAGGCAAATCCGTCGTTTCGTGAATCCTGAGAGGTGATGC  
 ATAGCCGATTGAGGCGAATTCGGTAAGCCTCTGCTGCCAAGAAAAGCCTCTAGCGAGCATAACATGCGGCC  
 CGTACCCCAAACCCGACACAGGTGGTCAAGTAGAGCATAACCAAGGCGTACGAGATAACTATGGTTAAGGAA  
 CTCGGGCAAAATGCCTCCGTAACCTTCGGGAGAAGGGGGCCGGAATATCGTGAACACCCCTTGCCTGGGAG  
 CGGGTCCCGGTGCGCAGACCCAGTGAAGAAGCGACTGTTTACTAAAAACACAGGTCCTGCGAAGTTCGTAA  
 GACGATGTATACGGACTGACGCCTGCCCGGTGCTGGAAGGTTAAGAGGACCTGTTAACCCGAAAGGGTGA  
 AGCGGAGAATTTAAGCCCCAGTAAACGGCGGTGGTAACCTA  
 TAACCATCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGT  
 CGGGTAAGTTCGGACCTGCACGAATGGCGTAACGACTTCTCAACTGTCTCAACCATAGACTCGGCGAAAT  
 TGCCTACGAGTAAAGATGCTCGTTACGTGCGGCAGGACGAAAGAGACCCCGGGACCTTCACTACAACCTTG  
 GTATTGATGTTCCGTGCGGTTTGTGTAGGATAGGTGGGAGACTGTGAAACTTCGACGCTAGTTGGGGTGG  
 AGTCGTTGTTGAAATACCACTCTGATTGTATTGAACATCTAACCTCGAACCGTATATCCGGTTTAGGGAC  
 AGTGCCTGGCGGGTAGTTAACTGGGGCGGTTGCCTCCTAAAATGTAACGGAGGCGCCAAAGGTTCCCT  
 CAACCTGGTCCGTAATCAGGTGGCGAGTGTAAATGCACAAGGGGGCTTACTGCGAGACCTACACGTCAA  
 GCAGGGACGAAAGTCGGGATTAGTGATCCGGCACCTCTGAGTGAAGGGGTGTCGCTCAACGGATAAAAAG  
 GTACCCCGGGGATAACAGGCTGATCTCCCCAAGAGTCCATATCGACGGGATGGTTTGGCACCTCGATGT  
 CGGCTCGTCGCATCCTGGGGCTGAAGCAGGTCCCAAGGGTTGGGCTGTTCCGCCATTAAAGCGGCACCGG  
 AGCTGGGTTTAGAACGTGCTGAGACAGTTCCGTCTCTATCCGCCGCGCGCTCAGAAACTTGAGGAAAATC  
 TGTCCCTAGTACGAGAGGACCGGGACGGACGAACCTCTGGTATACCAGTTGTCTCACCAGGGGCACCGCT  
 GGATAGCCACGTTCCGACAAGATAACCGCTGAAAGCATCTAAGCGGGAAACCTTCTCCAAGATCAGGTTT  
 CTTACCCACTTGGTGGGATAAGGCCCCCCCGAGAACACGGGATTGATAGGTCAGACCTAGAAGCTCAGTA  
 ATGAGTGTAGGGAACCTGGCCTAACTGGCCGAAAGCTTACAAAAC

Figure 26 : Gène *rrl* de *M.leprae*, les deux amorces sont soulignées en gris alors que les deux nucléotides d'intérêt correspondant aux positions 2058 et 2059 sont en gras

## 2. Gène *rplD*

Pour rechercher les mutations correspondant aux acides aminés en position 69 et 71, les amorces utilisées étaient les suivantes :

	Séquences	Tm (°C)	GC%	Position dans le génome de <i>M.leprae</i>	Taille fragment (pb)
<b>rplD F</b>	CTGTTGACGACCCCGCGAA	63,1	65	2242835-2242816	251
<b>rplD R</b>	GATCATCTTCTGGGTGTGC	53,6	50	2242603-2242584	

## Gène *rplD* *M.leprae* 693 pb

ATGGCAGCCAAGGTTGAGAACGGTTCCAATATCCGGAAAATCGATGTCAAGACACCAGACGGCAAAGTCGACGGC  
 ACCATCGAGCTGCCGGCTGAGCTGTTTCGACGCACCCGCGAAATATTGCGTTAATGCACCAGGTGGTCACCGCTCAG  
 CGGGCAGCGGCTCGGCAGGGTACGCACCTCAACCAAGACGCGCGGGCGATGTCAGT**GGTGGTGGTTCGCAAGCCT**TAT  
 CGGCAGAAGGGGACCGGTCGCGCTCGGCAGGGGTCGATGCGGGCCCCGCAGTTCACCGGTGGCGGTATTGTGCAC  
 GGTCTAAATTGCGCGACTACAGTCAACGCACACCCAAGAAGATGATCGCCGCGGCGTTGCGCGGGGCGTTATCC  
 GACCGGGCACGCAACGGCCGCATACACGCAGTCACCGAACTAGTGGTGGGTAAGACTCCGTCTACTAAGAGCGCC  
 AAGGAATTCTGGGCACACTGACAGATCGCAAGCAGGTGTTAGTAGTCATCGGCCGTAGCGACGAGACTGGTGGC  
 AAAAGCGTGCACAACCTGCCCGGTGTGCATCTCTGTGCGCCGACCAGCTCAACACCTATGACGTGCTGCGCGCC  
 GACGACTTGGTGTTCAGCGTTGAGGCGCTCAACAGCTATATCGCCGCTCAGCAAGCAGCCGGCACTTCTACACC  
 GAGAAGGTTTTCGGCCTGA

Figure 27: Gène *rplD* de *M.leprae* : les amorces sont surlignées en gris et la zone d'intérêt est en gras et soulignée

### 3. Gène *rplV*

Les amorces choisies pour encadrer les séquences correspondant aux acides aminés en position 83, 91, 93 et 95 sont spécifiées dans le tableau ci-dessous :

	Séquences	Tm (°C)	GC%	Position dans le génome de <i>M.leprae</i>	Taille fragment (pb)
<b>rplV F2</b>	AAGCACGATTTGTGCGAGTG	51,8	50	2240729 -2240710	478
<b>rplV R2</b>	TTCGTTTCAGAAGCCTCAGA	49,7	45	2240252-2240271	

## Gène *rplV* *M.leprae* 528 pb

ATGACTACGACTGAATTTCCGTCGCGCATCGCCA**AAGCACGATTTGTGCGAGTG**TCGCCGAGAAAGGCGCGCCGG  
 GTGATCGACCTGGTGCAGCGAAGGTCCGTGGCAGACGCACTCGACATTCTGCGCTGGGCGCCGACGGCCGCCAGT  
 GAGCCGGTCGCTAGGGTGATTGCGAGTGCTGCGGCCAACGCCAGAACCAACCGACTGGACCCGGAGACTTTG  
 GTGGTTGCCACCGTCTACGCT**GGCGAAGGCCGACCGCCAAACGGATTTCGTCCGCGAGCC**CAGGGACGCGCGTTC  
 CGTATACGCAGGCGGACCAGCCACATCACGGTGGTGGTTGAAAGTCCGGCCGGTCAAAGATCAACGGTTCGGCGGCG  
 TCGACGAAGGCCCGTCCGGCCGAGGCCAGCAAGACTGCCGGCAGAGCCCCAGCGAAAAAGGCCGGGGCCAGTTCT  
 GGGCAACCAAGATGCCGCCTAAGAAGGCATCCGTTAAACT**TCTGAGGCTTCTGAAACGAA**GGGAGGCTCAGAC  
 TAG

Figure 28: Gène *rplV* de *M.leprae* : les amorces sont surlignées en gris et la zone d'intérêt est en gras et soulignée

#### iv. Mise au point des PCR

Toutes les PCR ont été réalisées sur des thermocycleurs Thermo Biorad® MJ Min.

Les réactifs utilisés étaient:

- GoTaq® G2 Hot Start Green Master Mix Promega® contenant :
  - o Taq polymérase : GoTaq® G2 Hot Start 2X
  - o DNTP : 400 µl
  - o Tampon pH : 8,5
  - o MgCl2 : 4 mM
- Amorces sens et antisens Sigma Aldrich® à 100 µM.

Chaque réaction était contrôlée par un témoin positif (patient connu positif) et un négatif (eau).

Le volume total de la réaction est de 25 µl avec un mélange réactionnel commun :

Réactifs	Volume
GoTaq 2X	12.5 µl
Amorce F	2.5 µl
Amorce R	2.5 µl
Eau	5.5 µl

Les cycles de PCR suivaient le schéma suivant :

- Dénaturation : 10 minutes à 94°C puis 1 minute à 94°C
- Hybridation : 1 minute à température ( $T_m - 5^\circ\text{C}$ )
- Elongation : la Taq utilisée amplifie 1kb par minute, la durée d'élongation variait entre 30 secondes et une minute selon le gène étudié.
- Elongation finale : 10 minutes à 72 °C

Le nombre total de cycles variait entre 30 et 40 cycles pour les échantillons les plus difficiles à amplifier.

### 1. Gène *rrl*

Les  $T_m$  des deux amorces étaient respectivement de 54,7 °C et 57°C. Il a donc été testé deux températures d'hybridation : 55 et 60 °C pour choisir la plus optimale.

La durée de l'élongation variait entre 30 secondes et 1 minute pour amplifier un fragment de 437 pb.

Enfin le nombre de cycles variait entre 35 et 40.

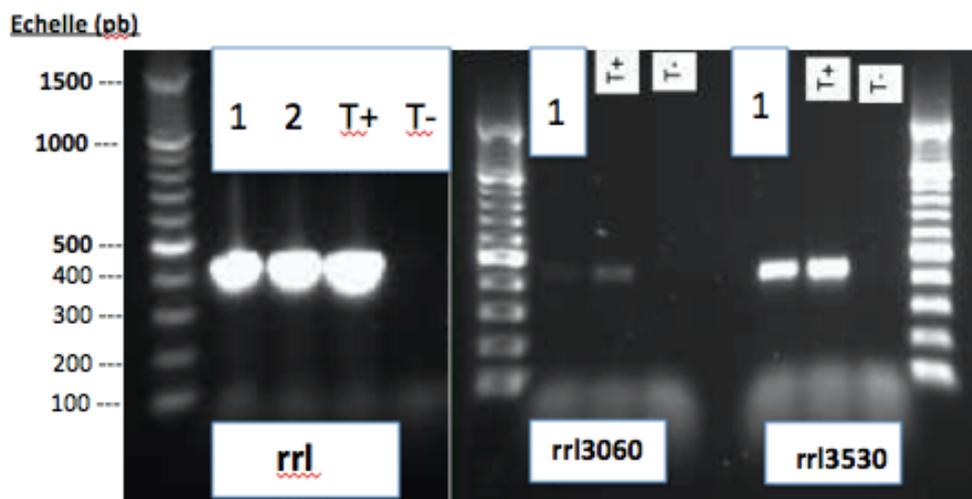


Figure 29 : Comparaison des différents modes opératoires pour la PCR d'amplification du gène *rrl*

*rrl* : Hybridation 60°C, 40 cycles et 1 minute d'élongation

*RRL 3060* : Hybridation 55°C, 30 cycles et 1 minute d'élongation

*RRL 3530* : Hybridation 55°C, 35 cycles et 30 secondes d'élongation

Finalement le protocole retenu est le suivant :

Dénaturation : 10min à 94°C  
Dénaturation : 1min à 94°C  
Hybridation: 1min à 55°C  
Elongation : 30 sec à 72°C  
Elongation finale : 10min à 72°C

} x 35 cycles

## 2. Gène *rplD*

Le programme utilisé pour la PCR RLEP a fonctionné directement avec ce gène. Le  $T_m$  respectif des amorces était de 63,1 °C et 53,6 °C.

- Dénaturation : 10min à 94°C  
- Dénaturation : 1min à 94°C  
- Hybridation: 1min à 60°C  
- Elongation : 1 min à 72°C  
- Elongation finale : 10min à 72°C

} x 40 cycles

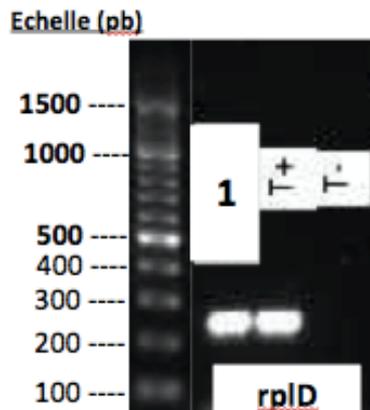


Figure 30 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de la PCR du gène *rplD*

## 3. Gène *rplV*

Pour ce gène, deux températures d'hybridation ont été testées : 55°C et 60°C sachant que le  $T_m$  des amorces étaient respectivement de 51,8°C et 49,7°C.

Mis à part cette variation, le programme comprenait 40 cycles et une durée l'élongation d'une minute.

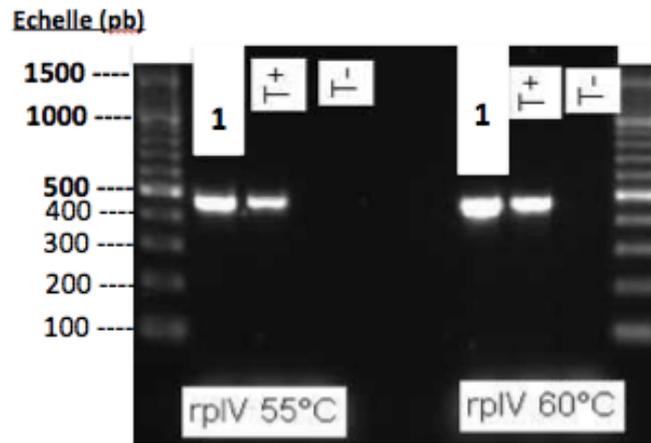


Figure 31 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de la PCR du gène *rplV*

Finalement, le protocole choisi est le suivant :

- Dénaturation : 10min à 94°C
  - Dénaturation : 1min à 94°C
  - Hybridation: 1min à 60°C
  - Elongation : 1 min à 72°C
  - Elongation finale : 10min à 72°C
- } x 40 cycles

Chaque produit de PCR a été déposé sur un gel d'agarose à 1% en tampon contenant du Gelred®, puis soumis à une électrophorèse sous une tension de 100V pendant 25 à 30 minutes. La taille des amplicons obtenue a été évaluée par rapport à la migration d'un marqueur de poids moléculaire de 100 pb.

#### v. Séquençage

Une fois amplifiés, les produits de PCR ont été purifiés sur plaque Nucleofast 96 PCR plate® (Macherey Nagel) par filtration sous vide puis remis en suspension dans de l'eau distillée stérile.

Chaque réaction de séquence était préparée avec le kit PCT Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit de AppliedBioSystem®

- 3,5 µl de BigDye
- 1 µl de tampon
- 1 µl d'amorce
- 2 µl d'ADN
- eau qsp 20 µl

Cycle de séquence :

- 5 minutes à 96°C
  - 10 secondes à 98°C
  - 10 secondes à 50°C
  - 4 minutes à 60°C
- } 25 cycles

Les produits de séquence ont été purifiés par gel-filtration en utilisant la résine SEPHADEX® G50 afin d'éliminer les nucléotides non incorporés et les amorces de PCR en excès. Le séquençage par méthode Sanger a été réalisée sur séquenceur ABI Prism 3130 (Applied®).

#### **d. Résultats : analyse de séquences**

Tous les patients ont pu être analysés sauf un patient pour lequel l'amplification des gènes étudiés s'est avérée impossible. Pourtant ce patient avait une PCR RLEP positive ainsi qu'une bandelette Hain® ne montrant aucune mutation. Pour s'assurer qu'il ne s'agissait pas d'un autre micro organisme, 3 PCR ont été réalisées sur de l'ADN frais à partir de la biopsie congelée: ARN 16S, hsp65 et rpoB. Là non plus il n'y avait aucune bande alors que les témoins de réaction (positif et négatif) étaient bons. Nous n'avons donc pas pu aller plus loin en ce qui concernait ce patient. Il s'agissait peut être d'une dégradation de l'ADN.

##### **i. Gène *rplD***

Aucun des patients testés ne présentait de mutation pour le gène étudié. La séquence analysée était identique à 100% à celle de *M.leprae* TN prise comme référence.

##### **ii. Gène *rplV***

Comme pour *rplD*, tous les patients étaient sauvages pour ce gène.

##### **iii. Gène *rrl***

Pour ce gène, les souches de *M.leprae* provenant des patients étudiés ne présentent pas de variation par rapport à la souche de référence. Aucune mutation sur les deux nucléotides clés 2058 et 2059 n'ont été détectées. Par contre, pour un patient (souche 21) il a été mis en évidence des polymorphismes sur toute la portion séquencée. Il s'agit d'un homme né à Mayotte nouvellement diagnostiqué en 2013.

En blastant la séquence du patient concerné dans NCBI, on retrouve une homologie de 88% (384 bases/438 bases) avec le gène *rrl* de *M.leprae* TN. Par contre, il n'y a aucune séquence correspondant dans le génome de *M.lepromatosis*.

La zone d'intérêt 2058-2059 reste cependant identique à la souche de référence.

```

      650      660      670      680      690      700      710      720
rrl M.lepraeTN .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Contig 2lrrl .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      730      740      750      760      770      780      790      800
rrl M.lepraeTN .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Contig 2lrrl .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      810      820      830      840      850      860      870      880
rrl M.lepraeTN .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Contig 2lrrl .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      890      900      910      920      930      940      950      960
rrl M.lepraeTN .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Contig 2lrrl .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      970      980      990      1000     1010     1020     1030     1040
rrl M.lepraeTN .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Contig 2lrrl .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      1050     1060     1070     1080     1090     1100     1110     1120
rrl M.lepraeTN .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Contig 2lrrl .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

```

Figure 32 : Polymorphisme de la souche 21, la zone d'intérêt 2058-2059 correspond ici aux positions 813-814

## IV. DISCUSSION

### a. Diagnostic bactériologique

A l'heure actuelle en France, la lèpre demeure une pathologie peu connue en dehors de spécialistes. Le diagnostic bactériologique est rarement effectué dans les laboratoires de microbiologie clinique des pays occidentaux. C'est la raison pour laquelle nous nous sommes demandés s'il était envisageable de réaliser ce diagnostic dans la routine d'un laboratoire effectuant déjà le diagnostic des infections à d'autres Mycobactéries.

Compte tenu de la classification du bacille de Hansen dans le groupe 3 des agents pathogènes, les étapes diagnostiques nécessitent l'utilisation d'un laboratoire de confinement L3 avec des équipes habilitées à travailler dans cet environnement. Un plateau technique de biologie moléculaire standard est également nécessaire. Cet équipement n'est pas disponible dans tous les laboratoires de microbiologie clinique.

Les techniques diagnostiques de la lèpre ont pu être adoptées rapidement au sein de l'équipe dans la mesure où la technique est simple et se rapproche de celle utilisée pour les autres mycobactéries. En effet, la préparation de la biopsie varie peu par rapport aux autres biopsies destinées à la recherche de *M. tuberculosis*. Ce sont les réactifs qui diffèrent dans la mesure où il n'y a pas de décontamination puisque la culture ne sera pas réalisée sur les milieux inertes. La solution saline de Hank's sert simplement à raffermir la biopsie pour qu'elle se délite plus facilement lors du broyage. Ensuite, la coloration utilisée pour l'examen direct est exactement la même, ainsi les frottis peuvent être gérés au sein des séries habituelles. Le seul problème que nous ayons rencontré est la difficulté de lecture des examens microscopiques directs, en particulier pour évaluer l'index morphologique et le décompte des bacilles en tenant compte des globis.

En ce qui concerne la biologie moléculaire, en dehors des amorces spécifiques de *M. leprae*, les techniques sont identiques à celles utilisées en routine pour le diagnostic des autres mycobactéries. Enfin, la limite majeure de cette mise en place est la compétence du dermatologue prescripteur. En effet, la biopsie est une étape clé dans le diagnostic et pour cela, il est nécessaire que les praticiens reconnaissent les lésions lépreuses.

Pour conclure, il serait intéressant d'envisager le développement de ce diagnostic dans les territoires français endémiques, plus particulièrement à Mayotte, dans les Antilles-Guyane ou encore en Polynésie Française. Dans un second temps, en France, la possibilité de réaliser la PCR directement sur un frottis permettrait de faire le diagnostic en même temps que l'examen direct à partir des frottis dermiques du lobe de l'oreille.

Enfin, pour pallier au manque d'expérience de l'opérateur dans l'évaluation de la viabilité du bacille, certaines équipes ont mis au point des techniques moléculaires visant quantifier cette viabilité de manière plus fiable. Cela pourrait être bénéfique dans les cas de suivi sous traitement ou suspicion de rechute. L'équipe de Martinez a publié en 2009 sa technique de détermination de la viabilité en

utilisant une technique de RT-PCR (Reverse Transcriptase PCR) avec deux cibles : l'ARN messager du gène *sodA* et l'ARN ribosomal 16S. Ils standardisent leurs résultats en tenant compte de la charge bacillaire initiale via une PCR quantitative RLEP. Ils montrent que le rapport ARNr 16S/RLEP est un bon indicateur de la viabilité du bacille et pourrait ainsi servir à monitorer le traitement. Ils ajoutent également qu'il n'y a pas de corrélation entre l'index bactériologique (IB) et les taux de rRNA 16S/RLEP. Cela indique que le calcul de l'index bactériologique ne reflète en aucun cas la charge de bacilles viables. (44)

## **b. Etude de la résistance aux macrolides**

Les macrolides sont des molécules habituellement indiquées dans les infections ORL (en cas de contre-indication à l'utilisation de bêta-lactamines), dans les pneumopathies atypiques, les infections cutanées bénignes et enfin en stomatologie. Ce sont des molécules souvent prescrites en antibiothérapie probabiliste. Notre cohorte de patient était susceptible de présenter des déficits en G6PD à cause de leur origine ethnique et donc les macrolides auraient pu être indiqués comme alternative à la dapsonne dans le traitement de la lèpre. Dans cette étude, nous avons recherché les potentielles mutations responsables de la résistance aux macrolides chez *M.leprae*.

Toutes les souches testées étaient sauvages pour les trois gènes étudiés. On peut donc supposer que ces souches ne sont pas résistantes aux macrolides. Mais en l'absence de modèle animal utilisé en parallèle nous ne pouvons l'affirmer définitivement.

Nous avons travaillé sur une petite cohorte de 35 patients issus de l'archipel des Comores.

Dans la littérature, une seule étude coréenne s'est intéressée à la résistance à la clarithromycine.

Il s'agit d'une étude menée en 2003 à Séoul (45) portant sur les mutations des gènes impliqués dans la résistance à 4 antilépreux : dapsonne, rifampicine, ofloxacine et clarithromycine. Elle incluait 104 patients présentant une persistance de l'index bacillaire pendant ou après un traitement comprenant dapsonne, rifampicine, ofloxacine ou clarithromycine. Les auteurs n'ont pas mis non plus en évidence de résistance. Les deux amorces utilisées pour la résistance à la clarithromycine étaient situées dans le gène *rrl* et encadraient la zone charnière 2058-2059. On peut donc dire que notre étude est plus robuste que la leur dans la mesure où nous avons étudié 2 gènes supplémentaires (*rplD* et *rplV*), habituellement en cause dans la résistance à ces molécules chez les autres espèces bactériennes.

Nos techniques d'amplification et de séquençage ont bien fonctionné sauf pour une souche pour laquelle aucun des gènes étudiés n'a pu être amplifié. Cela n'était pas dû directement aux cibles étudiées puisque les autres PCR d'identification telles que *hsp65*, *rpoB* et l'ARNr 16S ne fonctionnaient pas non plus. Les causes d'échec évoquées ont été infirmées. En effet, la présence d'inhibiteurs a été testée en diluant, l'ADN a été re-extrait de la biopsie pour avoir du matériel génétique « propre » et les PCR RLEP et la bandelette Hain® fonctionnaient.

Par la suite, il serait envisageable d'inclure ces techniques de recherche de la résistance en routine comme cela est fait pour la rifampicine, la dapsonne et les quinolones. En effet, en émettant

l'hypothèse que la résistance n'apparaît que plusieurs années après la mise en route du traitement, le réseau « sentinelle » pourrait surveiller cette émergence. Il est très probable que les patients atteints de la maladie de Hansen aient été en contact plusieurs fois dans leur vie avec des macrolides. Il est même envisageable que ceux qui sont traités pour la lèpre par la PCT standard reçoivent pour une toute autre affection des macrolides. Il serait intéressant de mener une étude dans ce sens pour monitorer l'émergence potentielle de résistance.

## V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le Centre National de Référence des Mycobactéries joue un rôle central dans le diagnostic bactériologique de la lèpre. En effet, grâce à ces compétences et à la centralisation des prélèvements il parvient à avoir une grande expertise dans le domaine. A l'avenir, il serait intéressant d'envisager d'autres laboratoires associés à ce CNR dans les zones d'endémies pour améliorer la rapidité du diagnostic.

Concernant les macrolides, dans notre étude, nous n'avons pas trouvé de souches résistantes. Cependant, il est possible qu'elles apparaissent dans les années à venir à cause d'une pression de sélection. Ainsi, on pourrait envisager de poursuivre ces techniques de screening sur tous les patients de Mayotte afin de surveiller l'émergence de résistance.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Global leprosy update, 2013; reducing disease burden. *Wkly Epidemiol Rec.* 2014 Sep 5;89(36):389–400.
2. Singh P, Cole ST. *Mycobacterium leprae*: genes, pseudogenes and genetic diversity. *Future Microbiol.* 2011 Jan;6(1):57–71.
3. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev. American Society for Microbiology*; 2006 Apr;19(2):338–81.
4. Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature.* 2001 Feb 22;409(6823):1007–11.
5. Robbins G, Tripathy VM, Misra VN, Mohanty RK, Shinde VS, Gray KM, et al. Ancient skeletal evidence for leprosy in India (2000 B.C.). *PLoS ONE. Public Library of Science*; 2009;4(5):e5669.
6. Monot M, Honoré N, Garnier T, Araoz R, Coppée J-Y, Lacroix C, et al. On the origin of leprosy. *Science. American Association for the Advancement of Science*; 2005 May 13;308(5724):1040–2.
7. Reibel F, Chauffour A, Brossier F, Jarlier V, Cambau E, Aubry A. New Insights into the Geographic Distribution of *Mycobacterium leprae* SNP Genotypes Determined for Isolates from Leprosy Cases Diagnosed in Metropolitan France and French Territories. *PLoS Negl Trop Dis. Public Library of Science*; 2015 Oct;9(10):e0004141.
8. Morgado de Abreu MAM, Roselino AM, Enokihara M, Nonogaki S, Prestes-Carneiro LE, Weckx LLM, et al. *Mycobacterium leprae* is identified in the oral mucosa from paucibacillary and multibacillary leprosy patients. *Clin Microbiol Infect. Elsevier*; 2014 Jan;20(1):59–64.
9. Job CK, Jayakumar J, Kearney M, Gillis TP. Transmission of leprosy: a study of skin and nasal secretions of household contacts of leprosy patients using PCR. *Am J Trop Med Hyg.* 2008 Mar;78(3):518–21.
10. Britton WJ, Lockwood DNJ. Leprosy. *Lancet. Elsevier*; 2004 Apr 10;363(9416):1209–19.
11. Nath I, Saini C, Valluri VL. Immunology of leprosy and diagnostic challenges. *Clin Dermatol.* 2015 Jan;33(1):90–8.
12. White C, Franco-Paredes C. Leprosy in the 21st century. *Clin Microbiol Rev. American Society for Microbiology*; 2015 Jan;28(1):80–94.
13. Talhari C, Talhari S, Penna GO. Clinical aspects of leprosy. *Clin Dermatol.* 2015 Jan;33(1):26–37.
14. Singh P, Benjak A, Schuenemann VJ, Herbig A, Avanzi C, Busso P, et al. Insight into the evolution and origin of leprosy bacilli from the genome sequence of *Mycobacterium lepromatosis*. *Proc Natl Acad Sci USA. National Acad Sciences*; 2015 Apr 7;112(14):4459–64.

15. Pin D, Guérin-Faubleé V, Garreau V, Breyse F, Dumitrescu O, Flandrois J-P, et al. Mycobacterium species related to *M. leprae* and *M. lepromatosis* from cows with bovine nodular thelitis. *Emerging Infect Dis.* 2014 Dec;20(12):2111–4.
16. Vera-Cabrera L, Escalante-Fuentes WG, Gomez-Flores M, Ocampo-Candiani J, Busso P, Singh P, et al. Case of diffuse lepromatous leprosy associated with "Mycobacterium lepromatosis". *J Clin Microbiol. American Society for Microbiology;* 2011 Dec;49(12):4366–8.
17. Rodrigues LC, Lockwood DN. Leprosy now: epidemiology, progress, challenges, and research gaps. *Lancet Infect Dis. Elsevier;* 2011 Jun;11(6):464–70.
18. Honoré N, Cole ST. Molecular basis of rifampin resistance in *Mycobacterium leprae*. *Antimicrob Agents Chemother. American Society for Microbiology (ASM);* 1993 Mar;37(3):414–8.
19. Williams DL, Spring L, Harris E, Roche P, Gillis TP. Dihydropteroate synthase of *Mycobacterium leprae* and dapsone resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000 Jun;44(6):1530–7.
20. De Bruyn EE, Steel HC, Van Rensburg EJ, Anderson R. The riminophenazines, clofazimine and B669, inhibit potassium transport in gram-positive bacteria by a lysophospholipid-dependent mechanism. *J Antimicrob Chemother.* 1996 Sep;38(3):349–62.
21. Matrat S, Petrella S, Cambau E, Sougakoff W, Jarlier V, Aubry A. Expression and purification of an active form of the *Mycobacterium leprae* DNA gyrase and its inhibition by quinolones. *Antimicrob Agents Chemother. American Society for Microbiology;* 2007 May;51(5):1643–8.
22. Pardillo FEF, Burgos J, Fajardo TT, Cruz Dela E, Abalos RM, Paredes RMD, et al. Powerful bactericidal activity of moxifloxacin in human leprosy. *Antimicrob Agents Chemother. American Society for Microbiology;* 2008 Sep;52(9):3113–7.
23. Gelber RH. Activity of minocycline in *Mycobacterium leprae*-infected mice. *J Infect Dis.* 1987 Jul;156(1):236–9.
24. Franzblau SG, Hastings RC. In vitro and in vivo activities of macrolides against *Mycobacterium leprae*. *Antimicrob Agents Chemother. American Society for Microbiology (ASM);* 1988 Dec;32(12):1758–62.
25. Chan GP, Garcia-Ignacio BY, Chavez VE, Livelio JB, Jimenez CL, Parrilla ML, et al. Clinical trial of clarithromycin for lepromatous leprosy. *Antimicrob Agents Chemother. American Society for Microbiology (ASM);* 1994 Mar;38(3):515–7.
26. Ji B, Jamet P, Perani EG, Bobin P, Grosset JH. Powerful bactericidal activities of clarithromycin and minocycline against *Mycobacterium leprae* in lepromatous leprosy. *J Infect Dis.* 1993 Jul;168(1):188–90.
27. Ji B, Jamet P, Perani EG, Sow S, Lienhardt C, Petinon C, et al. Bactericidal activity of single dose of clarithromycin plus minocycline, with or without ofloxacin, against *Mycobacterium leprae* in patients. *Antimicrob Agents Chemother. American Society*

- for Microbiology (ASM); 1996 Sep;40(9):2137–41.
28. PETTIT JH, REES RJ. SULPHONE RESISTANCE IN LEPROSY. AN EXPERIMENTAL AND CLINICAL STUDY. *Lancet*. 1964 Sep 26;2(7361):673–4.
  29. Cambau E, Perani E, Guillemin I, Jamet P, Ji B. Multidrug-resistance to dapsone, rifampicin, and ofloxacin in *Mycobacterium leprae*. *Lancet*. Elsevier; 1997 Jan 11;349(9045):103–4.
  30. Williams DL, Hagino T, Sharma R, Scollard D. Primary multidrug-resistant leprosy, United States. *Emerging Infect Dis*. 2013 Jan;19(1):179–81.
  31. Kai M, Matsuoka M, Nakata N, Maeda S, Gidoh M, Maeda Y, et al. Diaminodiphenylsulfone resistance of *Mycobacterium leprae* due to mutations in the dihydropteroate synthase gene. *FEMS Microbiol Lett*. 1999 Aug 15;177(2):231–5.
  32. Maeda S, Matsuoka M, Nakata N, Kai M, Maeda Y, Hashimoto K, et al. Multidrug resistant *Mycobacterium leprae* from patients with leprosy. *Antimicrob Agents Chemother*. American Society for Microbiology; 2001 Dec;45(12):3635–9.
  33. Woods SA, Cole ST. A family of dispersed repeats in *Mycobacterium leprae*. *Mol Microbiol*. 1990 Oct;4(10):1745–51.
  34. Yoon KH, Cho SN, Lee MK, Abalos RM, Cellona RV, Fajardo TT, et al. Evaluation of polymerase chain reaction amplification of *Mycobacterium leprae*-specific repetitive sequence in biopsy specimens from leprosy patients. *J Clin Microbiol*. American Society for Microbiology (ASM); 1993 Apr;31(4):895–9.
  35. Cambau E, Chauffour-Nevejans A, Tejmar-Kolar L, Matsuoka M, Jarlier V. Detection of antibiotic resistance in leprosy using GenoType LeptraeDR, a novel ready-to-use molecular test. *PLoS Negl Trop Dis*. Public Library of Science; 2012;6(7):e1739.
  36. Beutler E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *N Engl J Med*. 1991 Jan 17;324(3):169–74.
  37. Nissen P, Hansen J, Ban N, Moore PB, Steitz TA. The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science*. 2000 Aug 11;289(5481):920–30.
  38. Lawrence MG, Lindahl L, Zengel JM. Effects on translation pausing of alterations in protein and RNA components of the ribosome exit tunnel. *J Bacteriol*. American Society for Microbiology; 2008 Sep;190(17):5862–9.
  39. Gregory ST, Dahlberg AE. Erythromycin resistance mutations in ribosomal proteins L22 and L4 perturb the higher order structure of 23 S ribosomal RNA. *J Mol Biol*. 1999 Jun 18;289(4):827–34.
  40. Nash KA, Brown-Elliott BA, Wallace RJ. A novel gene, *erm(41)*, confers inducible macrolide resistance to clinical isolates of *Mycobacterium abscessus* but is absent from *Mycobacterium chelonae*. *Antimicrob Agents Chemother*. American Society for Microbiology; 2009 Apr;53(4):1367–76.
  41. Wallace RJ, Meier A, Brown BA, Zhang Y, Sander P, Onyi GO, et al. Genetic basis for

- clarithromycin resistance among isolates of *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrob Agents Chemother*. American Society for Microbiology (ASM); 1996 Jul;40(7):1676–81.
42. Canu A, Malbruny B, Coquemont M, Davies TA, Appelbaum PC, Leclercq R. Diversity of ribosomal mutations conferring resistance to macrolides, clindamycin, streptogramin, and telithromycin in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 Jan;46(1):125–31.
  43. Doktor SZ, Shortridge VD, Beyer JM, Flamm RK. Epidemiology of macrolide and/or lincosamide resistant *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates with ribosomal mutations. *Diagn Microbiol Infect Dis*. Elsevier; 2004 May;49(1):47–52.
  44. Martinez AN, Lahiri R, Pittman TL, Scollard D, Truman R, Moraes MO, et al. Molecular determination of *Mycobacterium leprae* viability by use of real-time PCR. *J Clin Microbiol*. American Society for Microbiology; 2009 Jul;47(7):2124–30.
  45. You E-Y, Kang TJ, Kim S-K, Lee S-B, Chae G-T. Mutations in genes related to drug resistance in *Mycobacterium leprae* isolates from leprosy patients in Korea. *J Infect*. 2005 Jan;50(1):6–11.

Université de Lille 2  
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES DE LILLE  
**MEMOIRE de DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES**  
(tenant lieu de Thèse en vue du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie)  
Année Universitaire 2015/2016

**Nom : RUMEBE**

**Prénom : Laura**

**Titre du mémoire / thèse :**

**La lèpre : diagnostic bactériologique et étude de la résistance aux macrolides**

**Mots-clés :**

***Mycobacterium leprae*, lèpre, microbiologie, Mayotte, clarithromycine, gènes *rrl*, *rplD*, *rplV***

---

**Résumé :**

**Contexte :** *Mycobacterium leprae*, agent de la lèpre, infecte aujourd'hui plus de 250 000 patients à travers le monde. En France, le laboratoire du Centre National de Référence (CNR) des Mycobactéries doit être capable d'établir le diagnostic de cette pathologie.

Nos objectifs étaient d'abord d'étudier la mise en place du diagnostic microbiologique de la lèpre dans un laboratoire de microbiologie clinique puis d'étudier la résistance aux macrolides dans une cohorte de patients de Mayotte. En effet les patients de Mayotte sont potentiellement candidats pour recevoir de la clarithromycine, car en cas de déficit en G6PD (fréquent dans cette population), la dapsonne est contre-indiquée pour éviter les anémies hémolytiques.

**Méthode :** Les biopsies cutanées suspectes de lèpre ont été soumises à un examen microscopique et une PCR RLEP à des fins diagnostiques ainsi qu'à une recherche de résistance aux anti-lépreux par PCR-hybridation sur bandelettes. La cohorte étudiée était de 34 nouveaux cas de lèpre issus de patients de Mayotte. Pour l'étude de la résistance aux macrolides, nous avons recherché par PCR-séquence des mutations sur les 3 gènes principalement impliqués dans la résistance aux macrolides : gène de l'ARNr 23S (gène *rrl*) et gènes codant pour les protéines ribosomales L4 et L22 (gènes *rplD* et *rplV*).

**Résultats :** Nous avons pu mettre en place le diagnostic de la lèpre grâce à l'expertise déjà acquise pour le diagnostic de la tuberculose et des autres infections à mycobactéries. Le diagnostic est affirmé sur les résultats de l'examen microscopique (BAAR +) et de la PCR RLEP positive. Il est complété par l'étude de la résistance aux antibiotiques avec les gènes *rpoB*/rifampicine, *folP*/dapsonne, *gyrA*/ofloxacine.

En ce qui concerne la résistance aux macrolides chez *M.leprae*, nous n'avons pas mis en évidence de gène *erm*, habituellement responsable de la résistance inductible et constitutive aux macrolides. Aucune mutation acquise n'a été retrouvée dans notre cohorte de patients, pour aucun des trois gènes étudiés.

**Conclusion et perspectives :** Il est primordial de centraliser le diagnostic de cette pathologie rare dans un laboratoire expert afin de conserver les compétences nécessaires. Nous n'avons pas mis en évidence de souches résistantes à la clarithromycine mais il serait intéressant de continuer à surveiller la potentielle émergence de résistance aux macrolides chez *M.leprae*. En effet, ces antibiotiques sont largement prescrits pour des infections autres que la lèpre (ORL, respiratoires, cutanées) et peuvent donc être pris chez des patients atteints de lèpre et générer ainsi une pression de sélection.

**Membres du jury :**

<b>Président :</b>	Madame le Docteur Anne GOFFARD
<b>Assesseurs :</b>	Monsieur le Docteur François-Xavier BABIN Monsieur le Docteur Laurent RASKINE
<b>Directeur de thèse :</b>	Madame le Professeur Emmanuelle CAMBAU