



HAL
open science

**EVALUATION DU STATUT EN
MICRONUTRIMENTS ESSENTIELS CHEZ DES
TUBERCULEUX MULTIRÉSISTANTS (TB-MDR_s)
DE LA VILLE D'ABIDJAN, CÔTE D'IVOIRE**

Gnogbo Alexis Bahi

► **To cite this version:**

Gnogbo Alexis Bahi. EVALUATION DU STATUT EN MICRONUTRIMENTS ESSENTIELS CHEZ DES TUBERCULEUX MULTIRÉSISTANTS (TB-MDR_s) DE LA VILLE D'ABIDJAN, CÔTE D'IVOIRE. Maladies infectieuses. Université Félix Houphouët-Boigny (Abidjan, Côte d'Ivoire), 2017. Français. NNT: . tel-02387681

HAL Id: tel-02387681

<https://theses.hal.science/tel-02387681v1>

Submitted on 30 Nov 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



REPUBLIQUE DE COTE D'IVOIRE
Union-Discipline-Travail

Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique



Laboratoire de
Pharmacodynamie – Biochimique

Année Universitaire
2016-2017

THESE

Présentée pour l'obtention du Titre de Docteur de
l'Université Félix HOUPHOUËT- BOIGNY

Spécialité : Biologie Fonctionnelle et Moléculaire

Numéro d'ordre
2051/2017

BAHI GNOGBO ALEXIS

EVALUATION DU STATUT EN MICRONUTRIMENTS ESSENTIELS CHEZ DES TUBERCULEUX MULTIRESISTANTS (TB-MDRs) DE LA VILLE D'ABIDJAN, CÔTE D'IVOIRE.

Soutenue publiquement
Le 22/09/2017

Commission du jury

M. DJAMAN Allico Joseph	Professeur Titulaire	UFHB	Président
M. BIDIE Alain Dit Philippe	Maître de Conférences	UFHB	Directeur
M. KRA Kouassi A. Séverin	Maître de Conférences	UFHB	Rapporteur
M. KOUADIO N. E. Parfait	Maître de Conférences	UNA	Rapporteur
M. HORO Kigninlman	Professeur Titulaire	UFHB	Examinateur



DEDICACE

Je dédie cette œuvre à :

Dieu Tout-Puissant et Miséricordieux, pour sa Grâce qu'il m'accorde à chaque instant de ma vie et toute l'inspiration qui a guidé la réalisation de ce présent travail.

Mes défunts grands parents **GNAHORE Prospère** et **NANON Madeleine** et mes défunts oncles **GNAHORE Théodore** et **GNAHORE Alphonse** sans qui je ne serais pas devenu ce que je suis aujourd'hui.

Mon père **GNAHORE BAHI Albert** et ma mère **N'GUESSAN Lucie**, pour toutes leurs prières et leur soutien sans faille au cours de mon cursus scolaire et universitaire.

Ma tante **GNAHORE Eugénie**, son époux, mes cousins et cousines, pour tous ces moments de prières et tous le soutien indéfectible à mon endroit.

Mon fils **BAHI Prince Ariel**, pour tout le bonheur qu'il me procure chaque jour et l'envie qu'il suscite en moi à aller de l'avant.

Ma fiancée, **ZINTA Pascaline**, pour son soutien inestimable dans la réalisation et l'aboutissement de ce travail.

Tous mes amis, pour tous ces moments d'échange qu'il y a eu au cours de ce travail et dans la rédaction de ce manuscrit.

REMERCIEMENTS

Au Président de l'Université Félix Houphouët-Boigny de Cocody, le Professeur **Abou KARAMOKO** et au Doyen de l'UFR Biosciences, le Professeur **KOUAMELAN Essétchi Paul**. Je voudrais vous exprimer toute ma gratitude pour avoir accepté d'accorder votre autorisation pour la réalisation de ce projet de Thèse.

A Madame **DOSSO Mireille**, Professeur titulaire de Bactériologie-Virologie, Directrice de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (IPCI). Qu'il me soit permis de vous adresser mes vifs remerciements pour m'avoir accordé l'honneur d'effectuer mes travaux de recherche au sein de cette illustre structure dont vous assurez la direction avec abnégation et loyauté.

A Monsieur **DJAMAN Allico Joseph**, Professeur titulaire de Biochimie-Parasitologie, Directeur du laboratoire de Pharmacodynamie-Biochimique de l'UFR Biosciences à l'Université Felix Houphouët-Boigny, Chef du Département de Biochimie Clinique et Fondamentale à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, Chercheur associé à l'UPR 3294 CNRS, Université Paris-Sud, Orsay (France). Je voudrais vous témoigner ma profonde gratitude et reconnaissance pour votre amour du travail bien fait et pour votre disponibilité à aider les autres. Sans être le Directeur de cette thèse, vous avez contribué substantiellement à la réalisation de ce travail. Merci pour toutes ces qualités humaines. Puisse Dieu vous le rendre au centuple. Merci également d'avoir accepté de présider le jury de la soutenance de cette thèse.

A Monsieur **BIDIE Alain Dit Philippe**, Maître de conférences de Biochimie à l'UFR Biosciences de l'Université Felix Houphouët-Boigny. Veuillez recevoir ici mes sincères remerciements pour avoir accepté volontiers de diriger cette thèse. J'ai particulièrement apprécié votre liberté d'esprit et votre ouverture aux autres qui ont considérablement œuvrées à la réalisation de cette thèse. Merci pour tout et que Dieu puisse vous le rendre au-delà de vos espérances.

Aux responsables du Département de Biochimie Clinique et Fondamentale, Madame **EDJEME-AKE Angèle** (Professeur Agrégé en Biochimie), Monsieur **COULIBALY Founzégué Amadou** (Maître de conférences de Biochimie), Madame **BOYVIN Lydie** et Messieurs **M'BOH Gervais** et **MEITE Souleymane** (Chargés de recherche). J'aimerais vous adresser mes sincères remerciements pour avoir accepté d'examiner ce travail et pour m'avoir fait bénéficier de votre expérience. Votre esprit d'analyse et votre goût au travail m'ont permis d'acquérir des compétences dans plusieurs domaines.

A Monsieur **N'GUESSAN Kouassi Raymond**, Maître de Recherche, responsable de l'Unité de Mycobactéries Tuberculeuses et Atypiques (UMTA) de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, merci pour votre franche collaboration concernant les informations sur les données des examens microbiologiques des TB-MDRs.

A tous les enseignants-chercheurs et chercheurs du laboratoire de Pharmacodynamie-Biochimique de l'UFR Biosciences de l'Université Félix Houphouët-Boigny de Cocody.

Messieurs **COULIBALY Adama**, **N'GUESSAN Jean David** et **YAPI Houphouët Felix**, (Professeurs Titulaires), Messieurs **BAHI Calixte**, **COULIBALY Founzegué Amadou**, **DOUMBIA Idrissa**, **KRA Adou Mathieu**, **OUATTARA Karamoko**, **TREBISSOU Johnson Jean Noël**, **YAPO Adou Francis** et **YEO Dodéhé**, Maîtres de Conférences, Madame et Messieurs **AHUA Maximin**, **BAGRE Issa**, **BLA Kouakou Brice**, **DJYH Bernard Nazaire**, **KOUASSI Kouakou Serge**, **OUATTARA Sitapha** et **THES Péhé Marie Epse SOUMAHORO**, Maîtres-Assistants, Madame et Messieurs **AKAKPO Akué Joël**, **ASSOHOU Constance Epse LUTY**, **KIPRE Gueyraud Rolland**, Chargés de Recherche, Madame et Messieurs **AGRE Don Josette Epse Kouadio**, **KOUASSI Konan** et **PAKORA Gilles Alex**, Assistants. Je vous dis merci pour votre soutien inconditionnel et pour vos encouragements tout le long de mon parcours universitaire et plus précisément au cours de cette thèse.

Aux membres du jury de soutenance, plus précisément à Messieurs **KRA Kouassi A. Séverin** et **KOUADIO N'Guessan Parfait**, Maîtres de Conférences de Biochimie et **Rapporteurs** de cette thèse, pour avoir accepté d'instruire cette thèse et donné un avis favorable pour la soutenance. Egalement à Monsieur **HORO Kigninlman**, **Professeur Titulaire de pneumologie**, Chef du service des urgences du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Cocody, **Examineur** dans le jury de soutenance, pour avoir accepté d'examiner ce travail et contribué substantiellement à améliorer le manuscrit.

A tout le personnel de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire et plus particulièrement au personnel et aux stagiaires du Département de Biochimie Clinique et Fondamentale :

A **Mme GNON Edwige**, Assistante de Direction au Département de Biochimie Clinique et Fondamentale de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, toujours disponible à nous aider dans les procédures administratives. Merci pour ce soutien inestimable.

A **YEO Kadjowely**, Ingénieur en chimie industrielle, merci pour ton apport considérable dans la réalisation du dosage des vitamines liposolubles à l'aide de HPLC.

Aux techniciens du Département, merci pour votre contribution à la réalisation du volet hématologique et biochimique de ces travaux de recherche.

Aux Doctorants du Département, **AKE Armande, AYEKOUE Jules Eric, BEDOU Kouassi Denis, N'GUESSAN Marie Florence, N'ZI Konan Sylvère** et **SERY Kipré Laurent**.
Merci pour tous ces moments de bonne humeur que nous avons partagés en ensemble au cours de cette période de stage.

A tous les patients TB-MDRs, que Dieu vous accorde un prompt rétablissement.

Aux témoins volontaires, merci d'avoir accepté de donner votre consentement à participer à cette étude et que Dieu vous accorde une santé de fer.

A tous ceux qui ont contribué de loin ou de prêt à cette étude. Merci pour votre contribution même minime pour l'aboutissement de cette œuvre.

TABLE DES MATIERES

DEDICACE.....	I
REMERCIEMENTS.....	II
TABLE DES MATIERES.....	IV
LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS.....	VII
LISTE DES FIGURES.....	IX
LISTE DE PHOTOGRAPHIES.....	X
LISTE DES TABLEAUX.....	XI
INTRODUCTION.....	1
I-GENERALITES.....	4
1.1-Tuberculose multirésistante.....	5
1.1.1- Définition.....	5
1.1.2- Epidémiologie de la tuberculose multirésistante.....	5
1.1.3- Diagnostic de la tuberculose multirésistante.....	5
1.1.4- Traitement de la tuberculose multirésistante.....	11
1.1.5- Relation entre la tuberculose multirésistante et la malnutrition.....	11
1.2-Micronutriments.....	12
1.2.1- Interaction entre le traitement antituberculeux et micronutriments.....	12
1.2.2- Vitamines liposolubles.....	13
1.2.2.1- Métabolisme du rétinol ou vitamine A.....	15
1.2.2.2- Métabolisme du calciférol ou vitamine D.....	17
1.2.2.3- Métabolisme de l'alpha-tocophérol ou vitamine E.....	22
1.2.3- Oligoéléments.....	24
1.2.3.1- Métabolisme du fer.....	24
1.2.3.2- Métabolisme du cuivre.....	28
1.2.3.3- Métabolisme du zinc.....	30
1.2.3.4- Ratio Cuivre/Zinc.....	31
1.3- Marqueurs hématologiques et biochimiques en rapport avec le statut micronutritionnel.....	33

1.3.1- Marqueurs hématologiques.....	33
1.3.2- Marqueurs biochimiques.....	33
II- MATERIEL ET METHODES.....	37
2.1- Matériel.....	38
2.1.1- Cadre site et de l'étude.....	38
2.1.2- Echantillons de l'étude.....	38
2.1.2.1- Critères d'inclusion.....	38
2.1.2.2- Critères de non inclusion.....	38
2.1.3- Matériel biologique.....	39
2.1.4- Matériel technique.....	39
2.1.5- Réactifs.....	42
2.2- Méthodes.....	42
2.2.1- Recueil des échantillons.....	42
2.2.2- Méthodes de dosage des marqueurs hématologiques et biochimiques en rapport avec le statut en micronutriments.....	43
2.2.2.1- Méthodes de dosage des marqueurs hématologiques.....	43
2.2.2.1.1- Principe du Sysmex XN-1000i Kobe.....	43
2.2.2.1.2- Méthode analytique des marqueurs hématologiques.....	44
2.2.2.2- Méthodes de dosage des marqueurs biochimiques.....	44
2.2.2.2.1- Principe du Cobas C311 Hitachi.....	44
2.2.2.2.2- Méthode analytique des paramètres biochimiques.....	45
2.2.3- Méthode d'évaluation des teneurs en oligoéléments.....	50
2.2.3.1- Principe de la spectrométrie d'absorption atomique flamme/aire acétylène.....	51
2.2.3.2- Conditions spectrales.....	51
2.2.3.3- Calibration des standards de fer, cuivre et zinc.....	51
2.2.3.4- Analyse quantitative.....	52
2.2.4- Méthode d'évaluation des concentrations en vitamines liposolubles.....	54
2.2.4.1- Principe de la chromatographie liquide à haute performance.....	54
2.2.4.2- Conditions chromatographique.....	54
2.2.4.3- Validation de la méthode analytique.....	55
2.2.4.4- Analyse quantitative.....	58
2.2.5- Analyse statistique.....	60

III- RESULTATS ET DISCUSSION.....	61
3.1- Résultats.....	62
3.1.1- Marqueurs hématologiques et biochimiques en rapport avec le statut micronutritionnel.....	62
3.1.1.1- Paramètres hématologiques	62
3.1.1.2- Paramètres biochimiques.....	66
3.1.2- Concentrations en oligoéléments.....	77
3.1.3- Concentrations en vitamines liposolubles.....	85
3.2- Discussion.....	96
V- CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	105
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	108

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

ADN	: Acide Désoxyribonucléique
ARN	: Acide Ribonucléique
BAAR	: Bacilles Acido-Alcool Résistants
CAT	: Centres Anti-Tuberculeux
CCMH	: Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine
CRABP	: Cellular Retinoic Acid Binding Protein
CRBP	: Cellular Rétinol Binding Protein
CS	: Coefficient de Saturation de la Transferrine
CTF	: Capacité Totale de Fixation de la transferrine
Cu	: Cuivre
DBP	: Vitamin D Binding Protein
DMT	: Divalent Metal Transporter
ERO	: Espèces Réactives de l'Oxygène
FGF23	: Fibroblast Growth Factor 23
HCP	: Heme Carrier Protein
HDL	: High Density Lipoprotein
HPLC	: High Performance Liquid Chrommatography
IPCI	: Institut Pasteur de Côte d'Ivoire
LDL	: Light Density Lipoprotein
LED	: Light Emitting Diode
MDA	: Malondialdéhyde
MODS	: Microscopic observation drug susceptibility
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
ONU	: Organisation des Nations Unies
PCCC	: Preci Control Clin Chem Multi
PNLT	: Programme National de Lutte contre la Tuberculose
PTH	: Parathormone
RBP	: Retinol Binding Proteine
SAA	: Spectromètre d'Absorption Atomique
SOD	: SuperOxyde Dismutase
TB-MDR	: Tuberculose Multi-Drug Résistante
TBUR	: Tuberculose UltraRésistante

TCMH	:	Teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine
Tf	:	Transferrine
TTR	:	Transthyréline
UV	:	Ultra-Violet
VDR	:	Vitamin D Receptor
VGM	:	Volume Globulaire Moyen
VIH	:	Human Immunodeficiency Virus
Vit A	:	Vitamine A
Vit D	:	Vitamine D
Vit E	:	Vitamine E
VLDL	:	Very Light Density Lopoprotein
WHO	:	World Heath Organisation
Zn	:	Zinc

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Diagnostic bactériologique de la TB-MDR	10
Figure 2 : Points de la regulation de l'immunité par les micronutriments.....	14
Figure 3a : Structure chimique de la vitamine A.....	16
Figure 3b : Métabolisme général de la vitamine A	16
Figure 4a : Structure des différentes formes du calciférol ou vitamine D	19
Figure 4b : Sources et métabolisme de la vitamine D.....	19
Figure 5 : Métabolisme et mécanismes d'action de la vitamine D	20
Figure 6 : Actions immunomodulatrice et antituberculeuse de la vitamine D	21
Figure 7 : Structure des tocopherols et tocotrienols.....	23
Figure 8 : Répartition du fer dans l'organisme.....	27
Figure 9 : Mécanisme de contrôle du métabolisme du fer.....	27
Figure 10 : Différents étapes du métabolisme du cuivre.....	29
Figure 11 : Schéma des flux corporels de zinc.....	32
Figure 12 : Principe de fonctionnement du spectrophotomètre d'absorption atomique	53
Figure 13 : Principe de fonctionnement d'une chromatographie liquide à haute performance.....	56
Figure 14 : Concentrations en fer sérique des TB-MDRs et témoins	80
Figure 15 : Concentrations en zinc des TB-MDRs et témoins	80
Figure 16 : Concentrations en cuivre des TB-MDRs et témoins	81
Figure 17 : Ratio cuivre/zinc des TB-MDRs et témoins	81
Figure 18 : Pourcentage de réduction du fer chez les TB-MDRs.....	83
Figure 19 : Pourcentage de réduction du zinc chez les TB-MDRs.....	83
Figure 20 : Profil chromatographique des vitamines A, D et E des témoins.....	87
Figure 21 : Profil chromatographique des vitamines A, D et E des malades TB-MDRs.....	88
Figure 22 : Concentrations de rétinol ou vitamine A des TB-MDRs et témoins	91
Figure 23 : Concentrations en cholécalférol ou vitamine D des TB-MDRs et témoins	91
Figure 24 : Concentrations en α -Tocophérol ou vitamine E des TB-MDRs et témoins	92
Figure 25 : Pourcentage de réduction de la vitamine A chez les TB-MDRs.....	92
Figure 26 : Pourcentage de réduction de la vitamine D chez les TB-MDRs.....	93
Figure 27 : Pourcentage de réduction de la vitamine E chez les TB-MDRs.....	93

LISTE DES PHOTOGRAPHIES

Photographie 1 : Automate Cobas C311 HITACHI de Roche Diagnostic	40
Photographie 2 : Automate Sysmex XN-1000i.....	40
Photographie 3 : Spectromètre d'absorption atomique à flamme-air/acétylène Varian Spectr AA - 20 Victoria®	41
Photographie 4 : Chromatographe liquide de type HPLC, Waters.. ..	41

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Concentrations moyennes des marqueurs hématologiques chez les patients TB-MDRs et les témoins non tuberculeux	63
Tableau II : Valeurs comparatives des marqueurs hématologiques selon le stade de suivi des TB-MDRs.....	64
Tableau III : Valeurs comparatives des marqueurs hématologiques du métabolisme du fer chez les TB-MDRs selon le sexe.....	65
Tableau IV : Valeurs des contrôles qualités de la ferritine et de la transferrine	67
Tableau V : Valeurs des contrôles qualités du calcium, du phosphore et la créatinine.. ...	68
Tableau VI : Valeurs des contrôles qualités des paramètres lipidiques.....	69
Tableau VII : Valeurs moyennes des marqueurs biochimiques chez des patients TB-MDRs et les témoins non tuberculeux.....	72
Tableau VIII : Résultats d'analyse comparative des valeurs des paramètres biochimiques selon les stades de suivi des TB-MDRs.....	73
Tableau IX : Valeurs comparatives des marqueurs biochimiques du métabolisme du fer selon le sexe chez les TB-MDRs	74
Tableau X : Analyse comparative des valeurs du bilan phosphocalcique et de la créatinine selon le sexe chez les TB-MDRs.....	75
Tableau XI : Analyse comparative des concentrations des paramètres lipidiques selon le sexe chez les TB-MDRs	76
Tableau XII : Concentrations moyennes des oligoéléments chez les patients TB-MDRs et les témoins non tuberculeux	79
Tableau XIII : Analyse comparative des concentrations en oligoéléments selon les stades de suivi des patients TB-MDRs.....	82
Tableau XIV : Analyse comparative des concentrations en oligoéléments et du ratio Cu/Zn selon le sexe chez les TB-MDRs	84
Tableau XV : Valeurs des paramètres de validations de la méthode de dosage des vitamines.....	86
Tableau XVI : Concentrations moyennes des vitamines liposolubles A D E chez les patients TB-MDRs et les témoins non tuberculeux.....	90
Tableau XVII : Analyse comparative des concentrations en vitamines selon le stade de suivi des TB-MDRs.....	94
Tableau XVIII : Analyse comparative des concentrations vitaminiques selon le sexe chez les TB-MDRs.....	95

INTRODUCTION

La tuberculose multirésistante (TB-MDR pour tuberculosis multi-drugs resistant) est une pathologie causée par *Mycobacterium tuberculosis* résistant au moins aux deux antituberculeux majeurs du traitement de première ligne que sont l'Isoniazide et la Rifampicine (OMS, 2008). Elle est tout comme le paludisme et l'infection à VIH l'une des maladies infectieuses la plus meurtrière de notre temps et représente une réelle menace contre tous les efforts accomplis ces dernières années pour le contrôle et l'éradication de la tuberculose (Edem *et al.*, 2016). En effet, selon le rapport de l'organisation mondiale de la santé en 2015, 480.000 personnes ont été atteintes de tuberculose multirésistante avec 190.000 décès enregistrés dans le monde (OMS, 2015). La prévalence de la TB-MDR en Afrique et précisément en Côte d'Ivoire est respectivement de 14 % (Schaaf *et al.*, en 2009) et 2,5% (Anonyme 1, 2012). Les taux élevés d'échecs thérapeutiques aux antituberculeux de seconde ligne entraînant de nouvelles résistances rendent difficile la prise en charge médicale de cette forme de tuberculose. En effet, le taux d'échecs thérapeutiques de la cohorte des cas de TB-MDR détectés en 2010 a été de plus de 50% et environ 9,6% de ces TB-MDRs ont évolué vers une forme de tuberculose ultrarésistante (TBXDR, pour Tuberculosis Extensive Drug Resistant) en 2012 (OMS, 2015). Cette observation entrave fortement les objectifs pour le développement durable (ODD) qui visent à éradiquer la tuberculose sous toutes ses formes d'ici 2030 (ONU, 2015).

La tuberculose multirésistante est caractérisée par une baisse de l'activité phagocytaire des macrophages, une diminution de la prolifération lymphocytaire et une réduction de l'érythropoïèse (Madebo *et al.*, 2003; Shahemabadi *et al.*, 2007). En outre, le niveau élevé de stress oxydant au cours du processus inflammatoire causé par l'infection mycobactérienne contribue à la détérioration de l'intégrité des membranes phospholipidiques des cellules immunitaires (Madebo *et al.*, 2003; Shahemabadi *et al.*, 2007).

Une autre caractéristique de l'infection à *Mycobacterium tuberculosis* est la différenciation des macrophages infectés en cellules de mousse riches en lipides (Russell *et al.*, 2009). Ces cellules accumulent des gouttelettes lipidiques, organites de stockage des lipides qui sont nécessaires pour la croissance bacillaire intracellulaire (Martin *et al.*, 2006). Probablement par leur capacité à fournir aux Mycobactéries des nutriments essentiels particulièrement les micronutriments essentiels (vitamines et oligoéléments) qui sont indispensables au bon fonctionnement de l'organisme humain (Russell *et al.*, 2009).

Une meilleure prise en charge médicale de la TB-MDR recommande un contrôle efficient de ces troubles biologiques. Dans cette dynamique, l'étude de l'interaction entre les micronutriments essentiels et les défenses immunitaires suscite un intérêt particulier. En effet les propriétés antioxydantes et immunostimulantes des vitamines A, D, E et des oligoéléments

tels que le cuivre, le fer et le zinc ont été l'objet de plusieurs études ces dernières années. Selon ces travaux, les vitamines A et D sont essentielles à la normalisation des fonctions des lymphocytes B et T, à la production d'anticorps et à l'activation des macrophages (**Chocano-Bedoya et Ronnenberg, 2009 ; Gupta, et al., 2009**). La vitamine E augmente la prolifération lymphocytaire et l'activité phagocytaire des alvéoles macrophagiques. Elle protège également l'intégrité des cellules immunitaires contre l'agression par les radicaux libres (**Pawar et al., 2011**). Concernant les oligoéléments ; le fer, en plus d'être un constituant essentiel de l'hémoglobine, possède des effets stimulateurs sur la prolifération et la potentialisation des lymphocytes T et sur l'activité phagocytaire des macrophages (**Wanger et al., 2005 ; Isanaka et al., 2011**). Le cuivre et le zinc sont essentiels dans l'activation des enzymes antioxydants tels que la catalase, la superoxyde dismutase et la glutathion peroxydase dont ils sont des cofacteurs (**Kassu et al., 2006**). Ainsi, une supplémentation en ces micronutriments chez des TB-MDRs en cours de traitement antituberculeux pourrait-elle contribuer à renforcer de façon sélective des parties importantes de leurs défenses immunitaires (**Macallan, 1999; Van Lettow et al., 2004**).

Vue l'importance de ces vitamines liposolubles et oligoéléments dans la défense infectieuse, l'étude de la relation entre les micronutriments et la tuberculose multirésistante représente une approche essentiel pour l'optimisation de la prise en charge médicale de ces patients TB-MDRs. Il s'agit donc d'une étude préliminaire dont l'objectif général est de contribuer à l'amélioration de la prise en charge médicale des sujets souffrant de tuberculose multirésistante à travers l'étude de l'impact de l'infection à *Mycobacterium tuberculosis* et du traitement antituberculeux de seconde ligne sur le statut micronutritionnel de ces TB-MDRs.

Pour atteindre cet objectif général, différents objectifs spécifiques ont été fixés :

- ✓ Déterminer le profil des marqueurs hématologiques et biochimiques en rapport avec le métabolisme des micronutriments chez les tuberculeux multirésistants (TB-MDRs).
- ✓ Déterminer les teneurs en oligoéléments tels que le cuivre, le fer, le zinc et le ratio Cu/Zn chez ces tuberculeux multirésistants (TB-MDRs).
- ✓ Déterminer les concentrations en vitamines liposolubles telles que les vitamines A, D et E chez ces tuberculeux multirésistants (TB-MDRs).

I-GENERALITES

1.1- Tuberculose multirésistante

1.1.1- Définition

La tuberculose multirésistante est définie comme une pathologie causée par des bacilles *Mycobacterium tuberculosis* résistants, au moins, à l'Isoniazide et la Rifampicine, les deux antituberculeux majeurs utilisés en traitement des personnes atteintes de tuberculose active. Dans l'approche de la TB-MDR, deux types de résistance sont à distinguer : la résistance de type primaire concernant ceux n'ayant pas d'antécédent de traitement antituberculeux et la résistance de type secondaire qui désigne des cas ayant un antécédent de traitement antituberculeux pendant au moins un mois (OMS, 2008).

1.1.2- Epidémiologie de la tuberculose multirésistante

La tuberculose multirésistante est un problème réel de santé publique. Le rapport global de l'OMS (OMS, 2015) sur la lutte contre la tuberculose dans le monde, indiquait une nette augmentation du nombre personnes atteintes d'une TB-MDR de 42% en 2012 dont 3,6% de cas de résistance primaire et 20,6% de cas de résistance secondaire. De plus, selon ce même rapport, à la fin de l'année 2012, au moins un cas de tuberculose ultrarésistante (TBXDR) avait été notifié par 92 pays. Soit une moyenne de 9,6% de TB-MDR évoluant vers une TBXDR. En Côte d'Ivoire, la prévalence de la TB-MDR était évaluée à 2,5% en 2006 (Anonyme 1, 2012) dont 53,2% des cas recensés étaient précédemment traités (N'Guessan *et al.*, 2016). L'une des principales causes de l'émergence de la tuberculose multirésistante en Côte d'Ivoire serait la longue crise sociopolitique qu'a connue ce pays selon le programme national de lutte contre la tuberculose (PNLT).

1.1.3- Diagnostic de la tuberculose multirésistante

➤ Diagnostic clinique

Les signes cliniques de la tuberculose multirésistante sont essentiellement ceux observés dans le cas d'une tuberculose active sensible, à savoir principalement la fièvre, les sueurs nocturnes et une toux persistante.

➤ Diagnostic radiographique et histologique

La radiographie thoracique permet la détection des lésions pulmonaires quand l'histologie oriente vers la découverte d'un granulome épithélioïde et giganto-folliculaire.

➤ Diagnostic biologique de la tuberculose multirésistante

Le diagnostic biologique (Figure 1) est le seul moyen de détection d'une tuberculose multirésistante. Il s'effectue selon les recommandations de l'OMS (OMS, 2011) et comprend plusieurs étapes :

✓ **La microscopie directe des expectorations**

Dans la démarche diagnostic de la tuberculose pulmonaire l'examen microscopique direct demeure un outil très simple et rapide renseignant sur la présence de Bacilles Acido-Alcool Résistants (BAAR) dans les échantillons biologiques (**Small & Pai, 2010**). Cet examen renseigne sur le caractère bacillifère et donc contagieux du patient, permettant ainsi de conforter voire d'imposer l'isolement respiratoire du patient et de dépister les éventuels contacts. Cette étape clé repose le plus souvent sur une coloration fluorescente à l'auramine, plus sensible que celle de Ziehl-Neelsen qui est la coloration de référence (**Steingart et al., 2006**). La lecture après coloration à l'auramine, requiert un microscope à lampe à mercure récemment supplantée par l'utilisation de light emitting diode (LED), moins coûteuse, plus robuste et de performance identique (**Parsons et al., 2011**). Quant à la coloration au Ziehl-Neelsen, la lecture nécessite un microscope optique à la lumière blanche. Les BAAR apparaissent sous forme de bacilles verts fluorescents sur fond rouge pour les frottis colorés à l'auramine et rosés sur fond bleu après coloration de Ziehl-Neelsen. Le dénombrement des BAAR se fait selon la standardisation du Centers for Disease Control and Prevention (CDCP), Atlanta, USA. Le résultat de l'examen microscopique est positif lorsqu'on observe 1 à 9 BAAR pour 100 champs microscopiques, 10 à 99 BAAR pour 100 champs, ou plus de 100 BAAR par champ. Lorsque le nombre total de bacilles observés est inférieur à 10 BAAR après coloration à l'auramine ou à 5 BAAR après coloration de Ziehl-Neelsen, il est prudent, en raison du risque de confusion entre BAAR et débris cellulaires, de considérer le résultat comme douteux. Cet examen est limité par son seuil de détection microscopique élevé (10^4 BAAR/mL d'échantillon) et sa sensibilité variable en fonction du type de prélèvement. La sensibilité est de 10 - 20 % pour les prélèvements extrapulmonaires et 65 % pour les prélèvements pulmonaires (**Urbanczik, 1985**).

✓ **Culture sur milieux liquide et solide des échantillons biologiques**

Bien que la croissance des mycobactéries du complexe *tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*) soit très lente, le diagnostic de la tuberculose et la culture demeurent indissociables car elle reste la méthode la plus sensible. Son intérêt réside dans le fait qu'elle permet d'isoler la souche bactérienne, support technique nécessaire à l'identification de l'espèce et aux tests de sensibilité aux antituberculeux. La méthode la plus performante associe culture en milieu solide et liquide. Le faible seuil de détection qui est de 10 à 100 bacilles/mL d'échantillon biologique est un avantage majeur pour cette technique. Le délai de culture est fonction de la charge bactérienne et peut être corrélé aux résultats de l'examen direct. Les cultures en milieu solide se positivent en 2 à 6 semaines. Les cultures en milieux liquides sont pour la plupart couplées à une détection automatique de la croissance

microbienne. Ceci grâce à des automates avec incubateurs incorporés, développés à la fin des années 1990 tels que les mycobacteria growth indicator tube, Bactec MGIT960® de marque Becton Dickinson, VersaTREK®, Trek Diagnostics ou BacT/ALERT®, BioMérieux. L'usage de ces automates présente l'avantage de réduire significativement le délai de positivité des cultures de 10 à 14 jours en moyenne par rapport aux cultures en milieu solide (**Wan, 2012**). Malgré tout, les longs délais de rendu des résultats restent encore un des facteurs limitant de cette technique (**Parrish et Carroll, 2011**).

✓ **Tests moléculaires de GenXpert® MTB/RIF**

Le test de GenXpert MTB/RIF® est un test moléculaire unitaire qui permet la détection dans les prélèvements biologiques des fragments d'ADN du génome des mycobactéries du complexe *tuberculosis* et leur éventuelle résistance à la rifampicine en deux heures. Il est réalisé sur GenXpert® (Cepheid). Ce test automatisé semi-quantitatif de PCR en temps réel permet de réaliser, à la demande et dans une seule cartouche, les différentes étapes d'extraction, purification, amplification d'ADN, hybridation des sondes et détection multiplex. L'amplification génique cible la région de 81 pb du gène *rpoB*, qui code la sous-unité β de l'ARN polymérase et qui héberge les principales mutations responsables de la résistance à la rifampicine. Cinq sondes de type « balise moléculaire » couvrent l'ensemble de cette région et s'hybrident avec les séquences sauvages. Une étude réalisée sur des dilutions en série de suspensions bactériennes préparées à partir de souches de référence du complexe *tuberculosis* a démontré que la technique GenXpert MTB/RIF fournissait une évaluation rapide et fiable de la charge bactérienne au-dessus d'un seuil de 100 bactéries par échantillon (**Van Zyl-Smit et al., 2011**). De ce fait, dans des cas de forte suspicion de tuberculose pulmonaire ou extra-pulmonaire, cette technique permet sur des prélèvements microscopiques négatifs d'optimiser un diagnostic rapide de tuberculose en moins de 2 heures (**Theron et al., 2013**). L'étape de lavage intégrée dans la cartouche du test permet de ne conserver que les organismes intacts sans toutefois faire la distinction entre organismes viables et non viables (**Helb et al., 2010**). Les études récentes sur l'évaluation de la performance diagnostique de ce test ont montré que la sensibilité par rapport à la culture était de plus de 98 % pour les prélèvements à microscopie positive et de 68 % pour les prélèvements à microscopie négative (**Steingart et al., 2013**). La résistance à la rifampicine est un bon marqueur prédictif de la multirésistance avec une sensibilité et une spécificité du test supérieure à 98 %. De plus, ce test présente l'avantage d'être simple, rapide, sensible et spécifique pour les prélèvements pulmonaires à microscopie positive. Ceci permet ainsi d'accélérer une prise en charge adéquate des patients en termes d'isolement, mais aussi de traitement antituberculeux si le patient présente des facteurs de risque d'avoir été en contact avec une souche multirésistante

(Park, 2013). Cependant cette technique n'est pas encore généralisable à toutes les résistances, d'où l'intérêt, d'un antibiogramme.

✓ **Antibiogramme en milieu solide et liquide**

Cet outil est intéressant car il permet de tester la sensibilité à différents antibiotiques utilisés dans la lutte contre la tuberculose et permet la détection des souches multirésistantes (MDR) ou ultrarésistante (XDR). On distingue deux principaux types d'antibiogramme : les antibiogrammes en milieu solide et en milieu liquide.

- **Antibiogramme en milieu solide**

L'antibiogramme en milieu solide demeure la méthode de référence pour la détermination de la sensibilité aux antituberculeux de première intention notamment la rifampicine, l'isoniazide, l'éthambutol, la streptomycine et le pyrazinamide.

- **Antibiogramme en milieu liquide**

L'antibiogramme en milieu liquide est le plus souvent réalisé sur l'automate Bactec MGIT960 ou VersaTREK. Ces antibiogrammes sont majoritairement effectués à partir d'un premier isolat obtenu en milieu liquide, en moyenne deux semaines après la prise en charge initiale du prélèvement. L'intérêt repose sur la diminution significative du délai de rendu du résultat qui est de 10 jours après une première culture contre 3 à 4 semaines en milieu solide (Parrish & Carrol, 2008). Des études ont montré que des antibiogrammes sur milieu liquide peuvent être réalisés directement à partir d'échantillons dont l'examen microscopique direct est positif, permettant ainsi d'optimiser le délai de rendu de résultat (Parrish & Carrol, 2008; Lin *et al.*, 2009). Ces antibiogrammes en milieu liquide automatisé sont très performants (Espasa *et al.*, 2012), à l'exception toutefois de la détermination de la sensibilité au pyrazinamide, rendue difficile par la nécessité d'un pH acide et d'un inoculum élevé, entraînant souvent une fausse résistance au pyrazinamide (Chang *et al.*, 2011). La sensibilité aux antituberculeux de 2^{ème} ligne peut également être testée en milieu liquide. Elle se fait à l'aide du Bactec MGIT960 pour ce qui est de l'amikacine, la capréomycine, l'éthionamide, la kanamycine, l'ofloxacine, la moxifloxacine, le linézolide, l'acide para-amino salicylique et la rifabutine (Zhao *et al.*, 1994; Sharma *et al.*, 2011). Elle peut être également réalisée à l'aide de microplaque de type Sensititre MYCOTB (Trek Diagnostics) comprenant 8 antibiotiques de 2^{ème} intention en plus des antituberculeux majeurs.

- **Technique microscopique d'observation direct « microscopic observation drug susceptibility (MODS) »**

La détermination de la sensibilité aux antituberculeux majeurs peut également être réalisée selon la technique «microscopic observation drug susceptibility», (MODS). Une technique qui repose sur l'observation microscopique quotidienne de BAAR dans des cultures issues d'expectorations en présence ou non d'antituberculeux. Cette technique peu coûteuse est surtout utilisée dans les pays en voie de développement où elle permet de détecter rapidement la présence de souches multirésistantes avec une sensibilité et une spécificité respectivement de 100% et 94% (**Shah *et al.*, 2011**).

L'antibiogramme complet est un outil important dans l'établissement d'un traitement adéquat car il permet d'identifier les antibiotiques auxquels les souches isolées sont encore sensibles. Cependant, cette technique ne permet pas l'identification de l'espèce mycobactérienne présente.

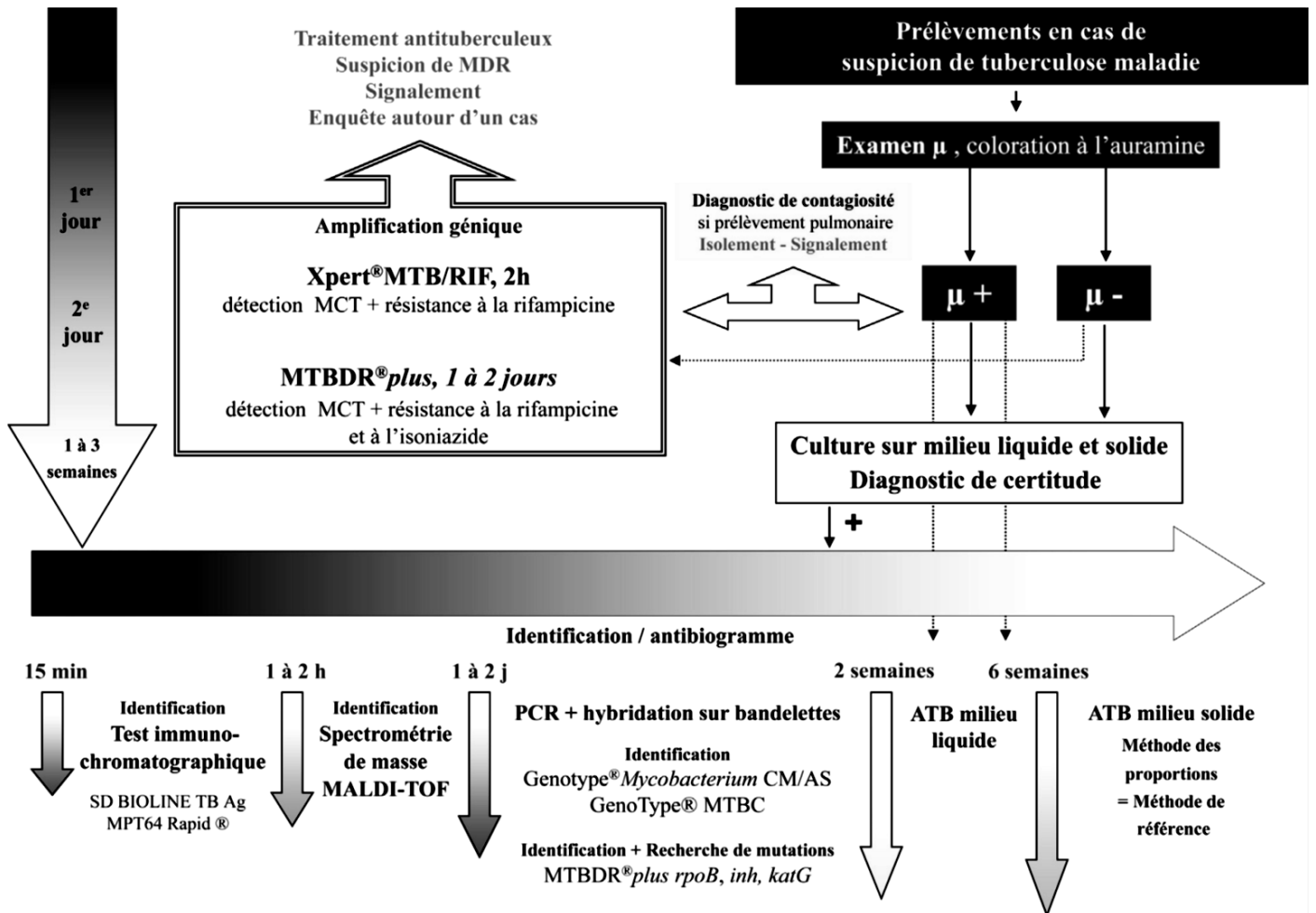


Figure 1 : Diagnostic bactériologique de la TB-MDR (Guillet-Caruba *et al.*, 2014)

Les différentes étapes de l'algorithme du diagnostic biologique de la tuberculose multirésistante partant de la microscopie à la culture en milieu solide suivie de l'antibiogramme.

Examen μ : examen microscopique.

ATB: Antibiogramme.

MCT: *Mycobacterium*.

MDRTB: Multi Drugs Resistant Tuberculosis.

1.1.4- Traitement de la tuberculose multirésistante

Le traitement de la tuberculose multirésistante comprend généralement cinq (5) molécules en fonction de la sensibilité des souches de *Mycobacterium tuberculosis* aux antibiotiques disponibles et selon le protocole adopté par la Côte d'Ivoire: le traitement dure au total 24 mois (2 ans) dont une phase intensive de 6 mois avec l'administration de Pyrazinamide (Z) - Kanamycine (Km) - Levofloxacin (Lfx) - Prothionamide (Pto) - Acide P-aminosalicylique (PAS) et une phase d'entretien de 18 mois avec l'administration de Pyrazinamide (Z) - Levofloxacin (Lfx) - Prothionamide (Pto) - Acide P-aminosalicylique (PAS) (**Anonyme 2, 2011**).

Un protocole plus court de 9 mois recommandé par l'OMS, l'union internationale contre la tuberculose et les maladies respiratoires (UICMR) et le Fonds Mondial au regard de ses excellents résultats est adopté et appliqué par le PNLT après consensus. Il comprend une phase intensive de 4 mois avec l'utilisation de Kanamicine (Km) - Gatifloxacin (Gfx) - Protthionamide (Pto) – Isoniazide (H) - Clofazimine (Cfz) - Ethambutol (E) - Pyrazinamide (Z) et une phase d'entretien de 5 mois avec l'utilisation de Gatifloxacin (Gfx) - Clofazimine (Cfz) - Ethambutol (E) - Pyrazinamide (Z). Si à la fin du 4^{ième} mois le frottis est toujours positif, la phase intensive est prolongée de 2 mois et la durée de la phase d'entretien reste inchangée. Pendant la prolongation de la phase intensive, la Kanamycine est donnée trois fois par semaine. Pour les patients dont les frottis demeurent toujours positifs en fin de la prolongation de la phase intensive, le traitement standardisé est arrêté et il revient aux cliniciens d'adapter un régime thérapeutique approprié le cas échéant (**Anonyme 2, 2011**).

1.1.5- Relation entre la tuberculose multirésistante et la malnutrition.

Des carences en plusieurs nutriments essentiels notamment les micronutriments ont été observées chez les TB-MDRs (**Edem et al., 2016**). Ce déficit nutritionnel est dû à l'infection mycobactérienne caractérisée par un stress nutritionnel et une perte de poids, affaiblissant ainsi l'état nutritionnel et par conséquent les fonctions immunitaires de ces patients (**Chandra, 1991**). La malnutrition serait en plus de la mauvaise observance, un facteur essentiel contribuant à la progression de la tuberculose multirésistante. Plusieurs études ont montré que cette forme de tuberculose est caractérisée par la malnutrition, la détérioration du système immunitaire et par l'anémie (**Chan, 1997 ; Krishna et al., 2009 ; Gupta et al., 2012**). En effet la malnutrition généralisée, en réduisant l'expression de l'interféron gamma, le facteur alpha de nécrose tumorale, et d'autres substances mycobactéricides, peut compromettre de façon sélective la réponse immunitaire à médiation cellulaire et la fonction phagocytaire (**Macallan, 1999 ; Perronne, 1999 ; Van Lettow et al., 2004**). Elle peut également réduire la production d'anticorps et de cytokines qui sont importants pour contenir

et limiter la progression de la tuberculose (**Macallan, 1999 ; Perronne, 1999 ; Van Lettow et al., 2004**). La relation entre la malnutrition et le déficit immunitaire dans la progression de la TB-MDR a été démontrée par une étude qui a révélé une production élevée d'IL-4 chez les TB-MDRs par rapport aux témoins sains. Ceci a contribué à la suppression de l'immunité à médiation cellulaire marquée par une diminution significative de la prolifération des lymphocytes T CD4 + et T CD8 + et de la production de l'IFN- γ chez ces TB-MDRs (**Shahemabadi et al., 2007**). Il existe ainsi un lien étroit entre la malnutrition, la baisse de l'activité des défenses immunitaires et la réduction de l'efficacité du traitement antituberculeux (**Chan, 1997 ; Gupta et al., 2009 ; Martineau et al., 2007 et 2011**). Un déficit en ces nutriments essentiels notamment en micronutriments pourrait compromettre l'efficacité des traitements antituberculeux et partant la prise en charge médicale des patients TB-MDRs.

1.2- Micronutriments

Les micronutriments sont des nutriments en très faible quantité, sans valeur énergétique mais essentiels pour le bon fonctionnement de l'organisme. Ce sont les vitamines, les sels minéraux et les oligoéléments. Certains de ces micronutriments sont dits essentiels parce qu'ils ne peuvent pas être synthétisés par l'organisme. Ils doivent par conséquent être fournis par l'alimentation. En raison de leurs diverses caractéristiques métaboliques et fonctionnelles, les micronutriments ont été considérés comme étant essentiels pour une santé humaine optimale. Ainsi, la carence en micronutriments est-elle considérée comme la cause la plus fréquente de l'immunodéficience secondaire et de morbidité liée aux infections y compris la tuberculose (**Gupta et al., 2009**).

Parmi ces micronutriments, les vitamines liposolubles et les oligoéléments occupent une place importante dans la modulation de l'activité du système immunitaire et dans la lutte anti-infectieuse (**Scrimshaw et San Giovanni, 1997 ; Castle, 2000 ; Lesourd, 2004 ; Maggini et al., 2007**). Cependant, le traitement antituberculeux provoque de nombreux effets secondaires entraînant une déplétion accrue de ces micronutriments essentiels chez les tuberculeux en cours de traitement (**Karyadi et al., 2000**).

1.2.1- Interactions entre le traitement antituberculeux et les micronutriments

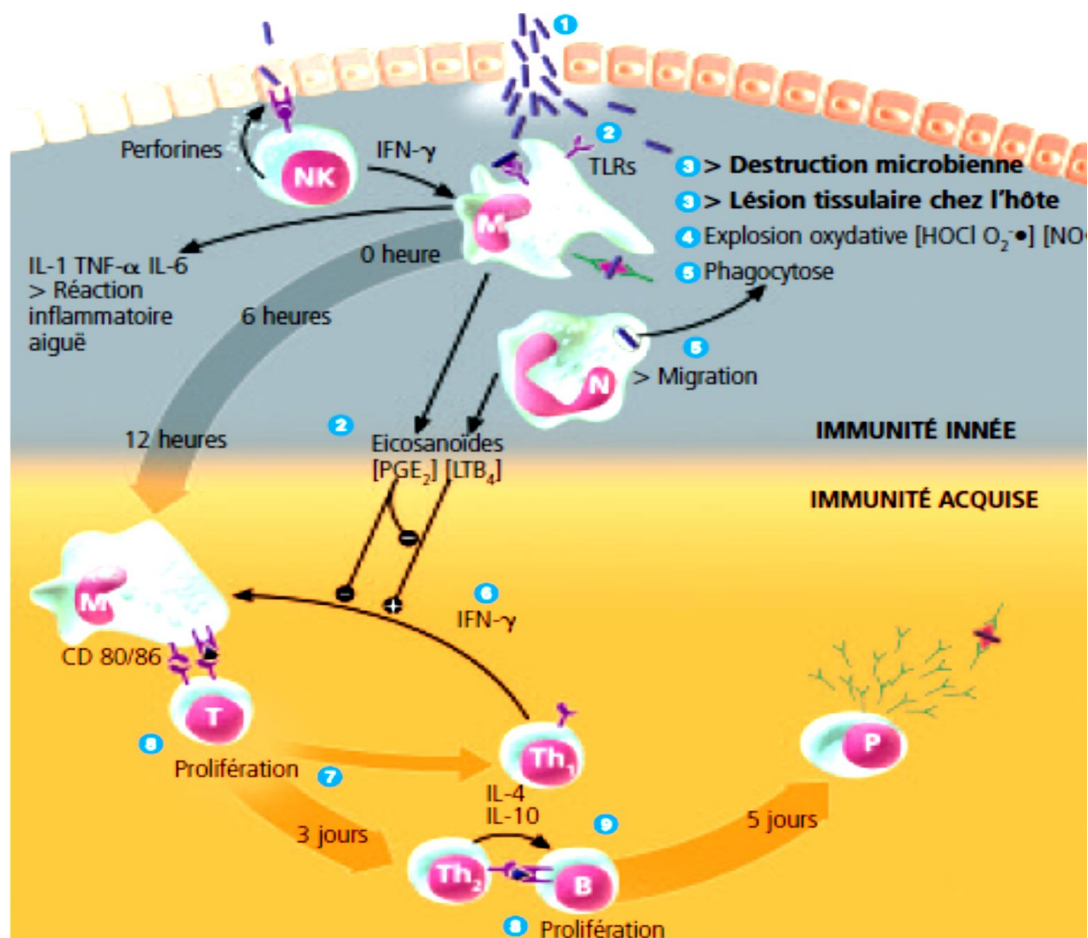
Une des préoccupations principales des médicaments antituberculeux de deuxième ligne est leur potentialité à provoquer des effets secondaires dont les principaux sont la perte de poids, la perte d'appétit, les vomissements, les nausées, l'hépatotoxicité et la néphrotoxicité (**Shin et al., 2007**). Ces effets secondaires sont généralement accompagnés d'une altération du statut micronutritionnel par un catabolisme accru des micronutriments

(**Karyadi et al., 2000**). Ainsi, la survenue d'une réaction indésirable associée à un déficit en micronutriments a été liée à des résultats médiocres du traitement antituberculeux de seconde ligne. Toutefois, un apport proportionné en ces micronutriments essentiels chez des tuberculeux en cours de traitement a contribué à une négativation plus rapide des examens bactériologiques et une élimination des lésions pulmonaires (**Karyadi et al., 2002 ; Irfan et al., 2011**). Une supplémentation en micronutriments tels les vitamines liposolubles et oligoélément peut contribuer à renforcer les défenses immunitaires, l'efficacité du traitement et donc réduire le risque d'apparition et de développement de la tuberculose multirésistante (**Edem et al., 2015**).

Plusieurs travaux portant sur l'importance des micronutriments dans la régulation des défenses immunitaires en générale et plus précisément au cours de la tuberculose active ont révélé qu'un déficit en ces micronutriments peut affecter non seulement les défenses immunitaires, mais contribuer à compromettre l'efficacité des traitements antituberculeux (**Thurnham, 2005 ; Maphelo, 2012**). En revanche, une supplémentation en ces micronutriments peut, tout en réduisant les effets secondaires associés au traitement médicamenteux, renforcer l'efficacité du traitement standard contre la tuberculose selon les observations de **Turchenko et al. (2008)**. L'action des micronutriments sur les défenses immunitaires concerne autant l'immunité innée que l'immunité acquise. Les vitamines A, D et E interviennent dans l'activation de l'activité phagocytaire des macrophages et dans la prolifération des lymphocytes B et T. Elles sont également impliquées dans la production d'interféron- γ (INF- γ) et dans la protection des membranes cellulaires contre les radicaux libres. Quant au fer, le cuivre et le zinc, ils occupent une place importante dans l'activité antioxydante contre les radicaux libres mais également dans la prolifération cellulaire du système immunitaire (**Kuo et al., 1996**) (Figure 2).

1.2.2- Vitamines liposolubles

Les vitamines liposolubles sont des vitamines solubles dans les fractions lipidiques. Ce sont les vitamines A, D, E et K. Parmi elles, les vitamines A, D et E jouent un rôle essentiel dans la modulation de l'efficacité des défenses immunitaires et dans la lutte antituberculeuse. En effet l'huile de foie de mérone riche en vitamines A et D était jadis utilisée avant l'avènement de la streptomycine pour le traitement de la tuberculose, probablement grâce à leurs propriétés immunostimulantes (**Whalen et Semba, 2001 ; Van Lettow et al., 2003**). La vitamine E quant à elle, possède d'excellentes propriétés antioxydantes et immunostimulantes selon les travaux de **Wintergerst et al., (2007)**.



2 5 8 Vitamines A, D et E, Fe et Zn

4 Vitamine E, Cu et Zn

1 6 7 Vitamines D, E et Fe

Figure 2: Points de la régulation de l'immunité par les micronutriments (Cave, 2008).

Les points saillants de la régulation des défenses immunitaires par les micronutriments. De l'immunité innée à l'immunité acquise. + : Activation. - : Inhibition.

1.2.2.1- Métabolisme du rétinol ou vitamine A

✓ Sources de la vitamine A

La principale source de la vitamine A (Figure 3a) est exogène (alimentaire). On la trouve en grande quantité dans les aliments d'origine animale tels que les huiles de poisson, le foie, et en quantité beaucoup plus faible dans le lait et les œufs. Dans les végétaux notamment la carotte, la laitue et le chou, elle existe sous forme de provitamine A (caroténoïdes) qui sont moins actifs et difficilement absorbés au niveau intestinale.

✓ Distribution de la vitamine A

Lorsque le rétinol est ingéré, environ 50 à 90% sont absorbés au niveau de l'intestin grêle puis transportés par les chylomicrons jusqu'au foie où ils sont stockés essentiellement sous forme de palmitate de rétinyl (Rétinyl ester). En fonction des besoins de l'organisme, les rétinyl esters sont hydrolysés en rétinol libre qui est sécrété dans le plasma. Ce rétinol libre est véhiculé en plus des lipoprotéines (LDL et VLDL) par un complexe protéique assurant le transport de 95 à 99% de la vitamine A circulante. Ce complexe est composé de la Retinol Binding Protein RBP (21kD) qui lie spécifiquement la molécule de rétinol et de la transthyréline ou TTR (**Monaco, 2000**) qui permet de réduire la filtration glomérulaire du rétinol par sa haute masse moléculaire (55kD) et d'augmenter l'affinité de RBP pour le rétinol (**Bellovino et al., 2003**). Au niveau de la cellule cible, le rétinol est capté grâce à une interaction de la RBP avec un récepteur membranaire, le STRA6, récemment découvert (**Kawaguchi et al., 2007**). Une fois dans le cytoplasme, le rétinol est pris en charge par la Cellular Rétinol Binding Protein (CRBP), une protéine de transport cytoplasmique qui assure son transfert au niveau des récepteurs nucléaires (Figure 3b).

✓ Propriétés immunostimulantes de la vitamine A

La vitamine A est impliquée dans divers fonctions métaboliques notamment dans la différenciation cellulaire et dans la stimulation du système immunitaire. Des travaux ont rapporté que la Vitamine A empêche la multiplication des bacilles virulents dans les macrophages humains (**Crowle et al., 1989**). Elle joue également un rôle essentiel dans la prolifération des lymphocytes en maintenant la fonction des tissus épithéliaux. A l'inverse, l'insuffisance en Vitamine A augmente l'adhésion des mycobactéries aux cellules épithéliales respiratoires. Cette vitamine présente ainsi un caractère essentiel pour la normalisation du fonctionnement des lymphocytes B et T, l'activation des macrophages et dans la production des anticorps (**Chandra, 1991 ; Semba, 1998 ; Gupta, et al., 2009 et 2012**).

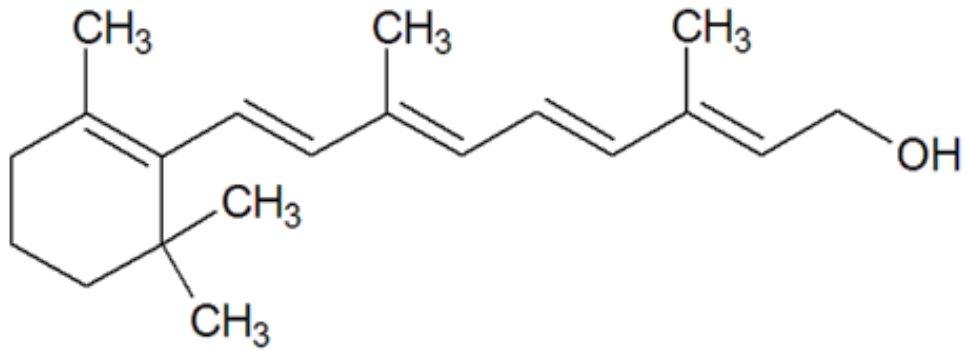


Figure 3a : Structure chimique de la vitamine A (Rétinol)

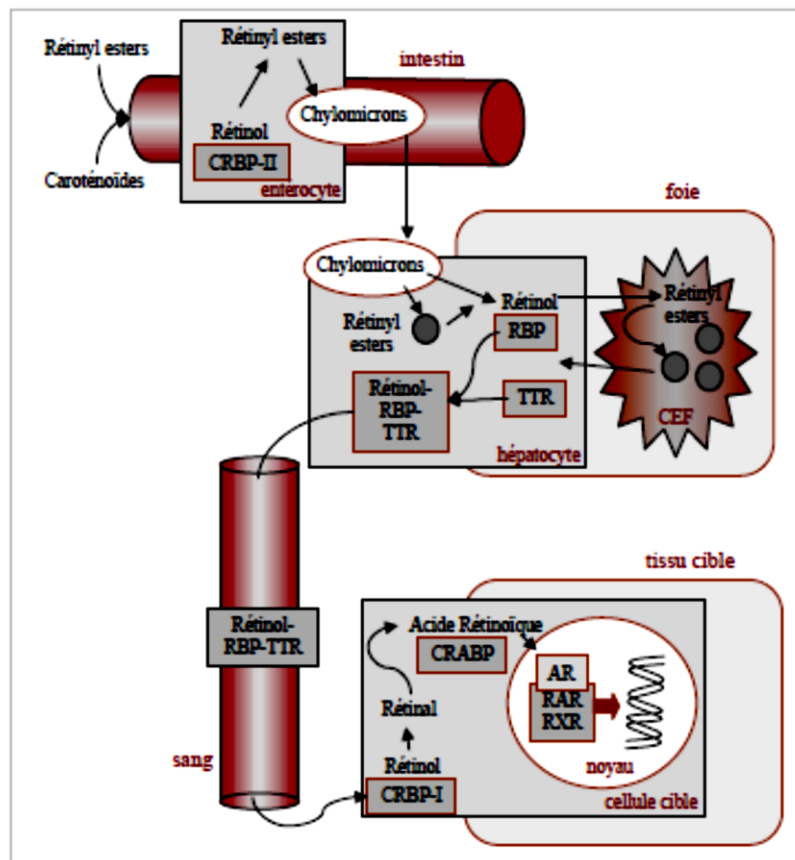


Figure 3b : Métabolisme général de la vitamine A

Figure 3 : Structure chimique et Métabolisme de la vitamine A (Bellovino *et al.*, 2003)

Métabolisme de la vitamine A depuis son absorption au niveau intestinal jusqu'à son site d'action en passant par son transport plasmatique. RBP-TTR : Retinol Binding Protein-transferrine. RXR : Récepteur de l'acide rétinoïque. CRBP : Cellular Retinol Binding Protein. CRABP : Cellular Retinoic Acid Binding Protein.

1.2.2.2- Métabolisme du Calciférol ou vitamine D

La vitamine D ou calciférol se présente principalement sous deux formes dans la nature: le cholécalciférol ou vitamine D₃ d'origine animal et l'ergocalciférol ou vitamine D₂ d'origine végétale (Figure 4a).

✓ Sources de la vitamine D

A la différence des autres vitamines liposolubles, la vitamine D a deux origines: la synthèse cutanée et l'apport alimentaire. La synthèse cutanée s'effectue au niveau de l'épiderme à partir du 7-dehydrocholestérol, un intermédiaire de synthèse du cholestérol présent dans les membranes des cellules du derme et de l'épiderme. Cette synthèse se fait sous l'effet des rayons ultra-violet B (UVB) du soleil et aboutit à la provitamine D₃ qui est rapidement convertit en vitamine D₃ ou cholécalciférol sous l'action de la chaleur. Après sa synthèse, la vitamine D₃ est libérée dans la circulation sanguine. Cette voie est la principale source de vitamine D (50 à 70%).

L'alimentation apporte la vitamine D₂ ou ergocalciférol d'origine végétale et la vitamine D₃ d'origine animale. Après son absorption, le transport plasmatique de la vitamine D alimentaire est majoritairement dépendant de son incorporation dans les chylomicrons, au sein desquels la vitamine D est véhiculée jusqu'au foie. Les vitamines D₂ et D₃ ont un métabolisme sensiblement identique et dépendant des mêmes complexes enzymatiques chez l'homme (**Landrier, 2014**).

✓ Distribution de la vitamine D

La vitamine D issu de l'alimentation ou provenant de la synthèse cutanée est transportée au niveau plasmatique vers le foie par la vitamine D binding protein (VDBP). Une protéine de transport dont les variations de sa concentration et du polymorphisme de son gène sont en rapport avec les faibles concentrations vitaminiques D selon les travaux de **Bellamy et al. (1999)**. A partir du foie, la vitamine D subit deux hydroxylations successives : une au niveau du foie sous l'action de la 25-hydroxylase hépatique conduisant à la 25-hydroxyvitamine D ou calcidiol (métabolite stockable). Et la seconde hydroxylation dans le tubule rénal grâce à la 1-hydroxylase pour donner la 1,25-dihydroxyvitamine D ou calcitriol qui est le principal métabolite actif de cette vitamine (**Dusso, et al., 2005**).

La régulation du métabolisme de la vitamine D est assurée par le *Fibroblast growth factor 23* (FGF23) et la concentration circulante de 1,25(OH)₂D, selon un mécanisme classique de rétrocontrôle négatif (**Landrier, 2014**). Cette régulation permet d'éliminer l'excès de vitamine D vers une voie d'inactivation (**Schuster, 2011**). En effet, le calcitriol ou le FGF23 induit l'expression de la 24-hydroxylase qui convertit la 25(OH)D₃ et la

1,25(OH)₂D₃ en métabolites inactifs (24,25 (OH)₂ vitamine D et 1,24,25(OH)₃ vitamine D) transformés ensuite en acide calcitroïque inactif (**Holick, 2007 ; Holick et Chen, 2008**). Le métabolite actif, la 1,25-dihydroxyvitamine D agit en se fixant sur ses récepteurs nucléaires (VDR) (**Schuster, 2011 ; Freeman et al., 2014**). La présence de ces récepteurs au niveau de tous les types de cellules et tissus notamment au niveau des cellules de l'immunité tels que les macrophages, les lymphocytes et les cellules épithéliales permet à la vitamine D d'exercer des actions immunostimulantes (Figure 4b).

✓ **Propriétés immunostimulantes de la vitamine D**

En plus de son rôle de régulation de l'homéostasie phosphocalcique, cette vitamine présente des effets extraosseux (**Briot et al, 2009**). En effet, de nombreuses études ont démontré qu'un apport en vitamine D chez des TB-MDRs déficients en cette vitamine peut contribuer à renforcer l'efficacité relativement faible des antituberculeux de seconde ligne (**Schön et al., 2013**). Selon **Eklund et al. (2013)** une supplémentation en Vitamine D déclenche une réponse inflammatoire dans les macrophages humains. Cette inflammation est accompagnée d'une augmentation de la sécrétion de cytokines permettant d'accroître la capacité des monocytes humains isolés des macrophages des patients avec une tuberculose active de limiter la croissance mycobactérienne. Une autre étude in vitro a montré que la vitamine D permettait d'activer les macrophages à synthétiser un peptide antimicrobien, la cathélicidine, impliqué dans la défense contre *Mycobacterium tuberculosis* (**Chocano-Bedoya & Ronnenberg, 2009**) (Figures 5 et 6).

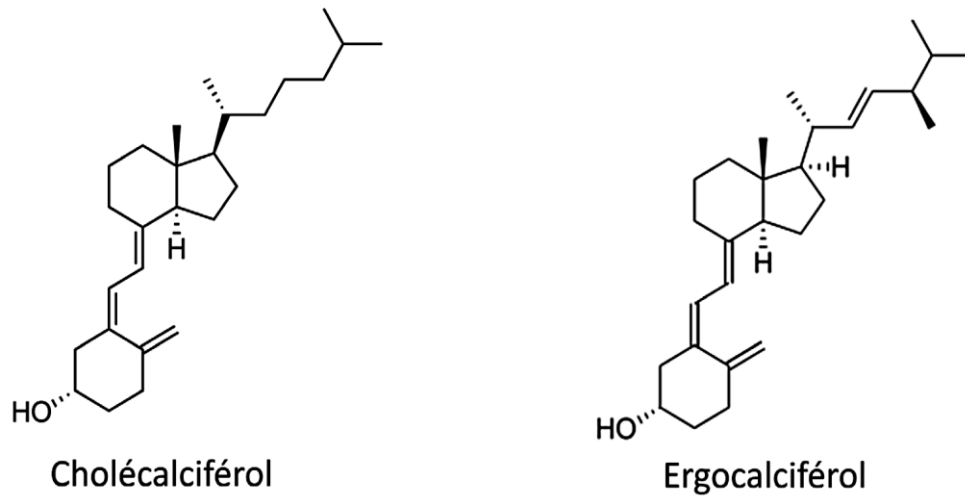


Figure 4a : Structure des différentes formes du calciférol ou vitamine D

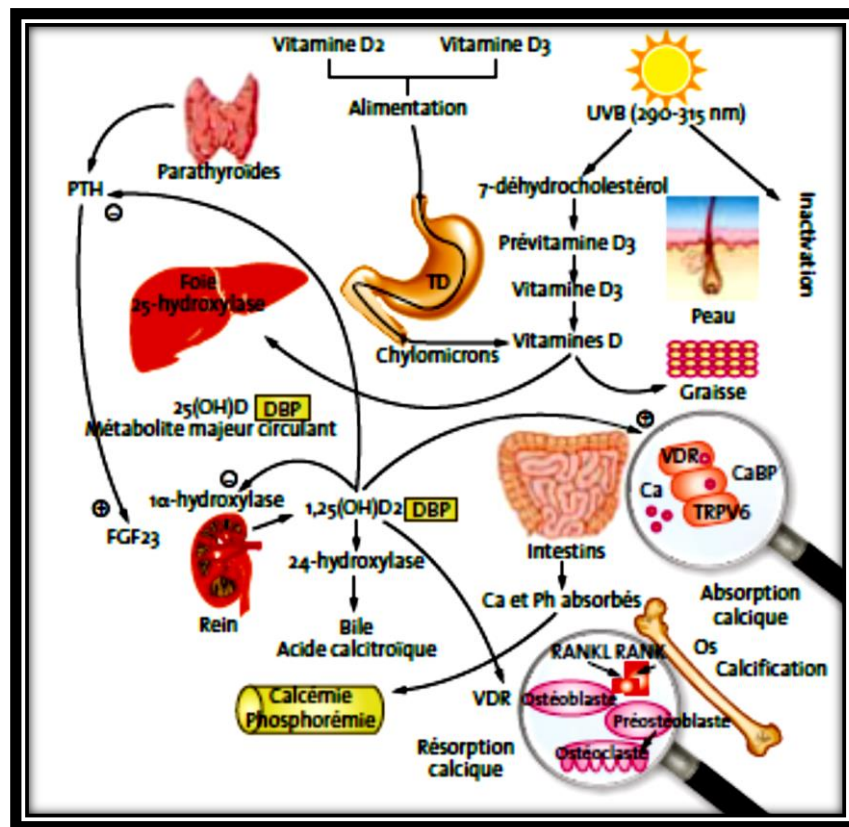


Figure 4b : Sources et métabolisme de la vitamine D

Figure 4 : Structure, sources et métabolisme de la vitamine D (Vidaihlet *et al.*, 2012).

Structure et mécanisme de transformation de la vitamine D (Vitamine D2 et D3) de la forme native à la forme active (1,25-dihydroxyvitamine D). FGF23 : *Fibroblast Growth Factor 23*. PTH : Parathormone. + : activation. - : inhibition. DBP : Vitamin D Binding Protein. VDR : Vitamin D Receptor.

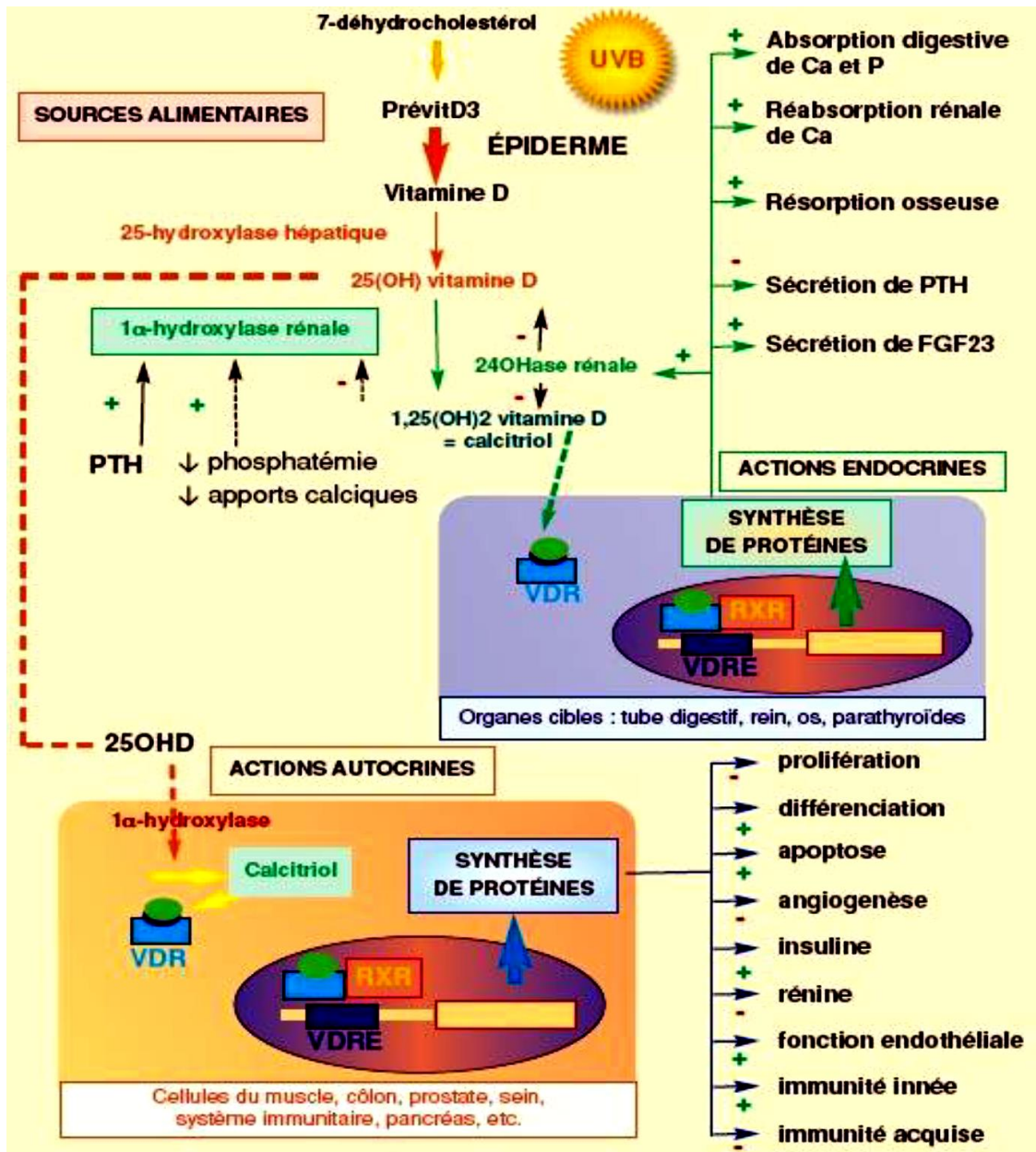


Figure 5 : Métabolisme et mécanismes d'action de la vitamine D (Murry, 2011)

Les actions autocrines et endocrines de la vitamine D dans le métabolisme cellulaire. + : Activation. - : Inhibition. PTH : Parathormone. FGF23 : *Fibroblast Growth Factor 23*. VDR : Vitamin D Récepteur. VDRE : Élément de Réponse à la Vitamine D. 25OHD : 25-Hydroxyvitamine D.

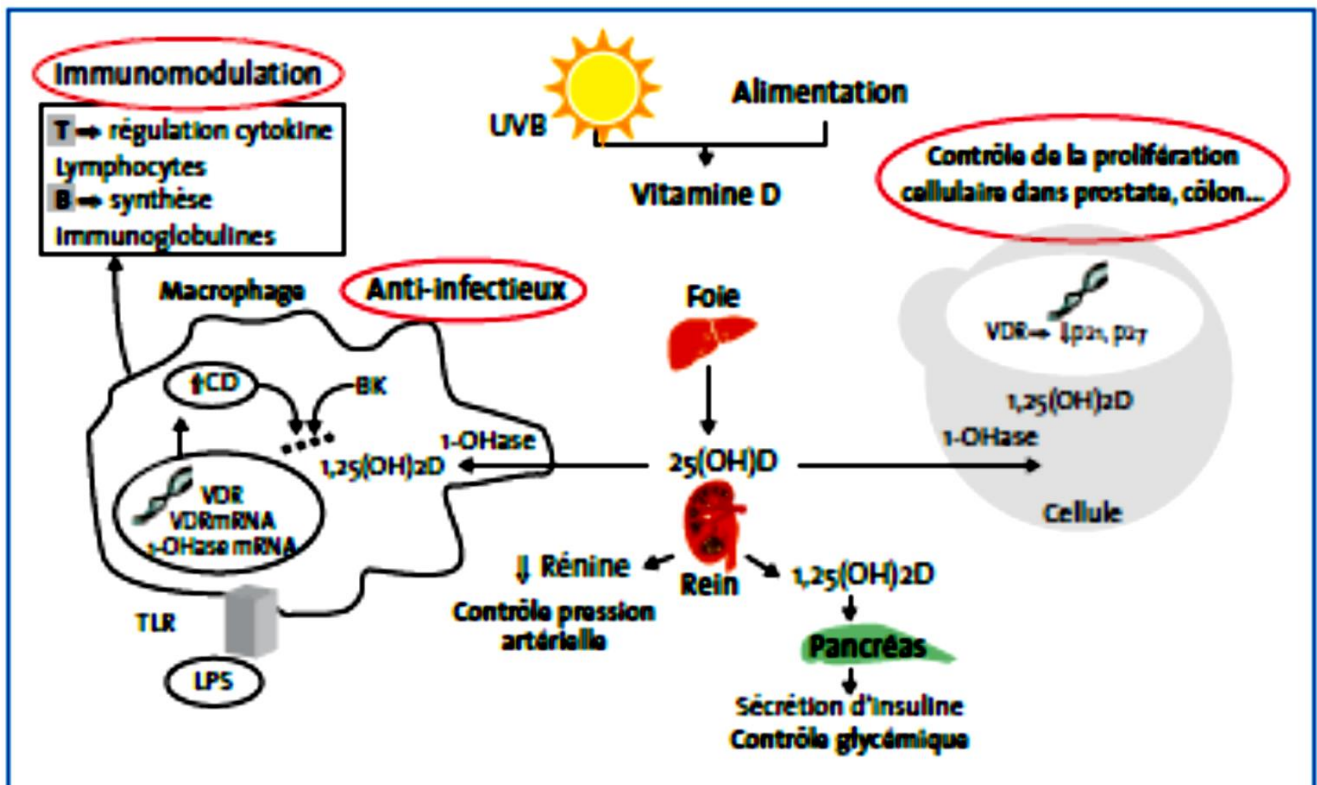


Figure 6 : Actions immunomodulatrice et antituberculeuse de la vitamine D (Mallet, 2013)

Actions immunostimulantes de la vitamine D contre les infections, plus spécifiquement sur *Mycobacterium tuberculosis*. De l'activation de macrophages à l'immunomodulation des lymphocytes B et T. VDR : Récepteur de la Vitamine D. 1-OHase : 1-Hydroxylase. BK : Bacille de Koch

1.2.2.3- Métabolisme de l'alpha-Tocophérol ou vitamine E

La vitamine E naturelle est un complexe vitaminique liposoluble qui regroupe deux grandes familles, les tocophérols et les tocotriénols avec chacune quatre (4) molécules α , β , γ , δ (**Landrier, 2011**) (Figure 7). Dans ces familles, l' α -tocophérol est celui qui possède l'activité biologique la plus importante et représente la forme plasmatique la plus abondante (**Ford et Sowell, 1999**).

✓ Sources de la vitamine E

La principale source de vitamine E est alimentaire. Elle est présente dans de nombreux aliments notamment dans les huiles végétales telles les huiles de tournesol, de maïs, d'olive, de colza, d'arachide, les margarines mais également dans le germe de blé, l'abat, l'œuf et le lait.

✓ Distribution de la vitamine E

L'absorption intestinale de la vitamine E est passive et elle a lieu au niveau de la partie médiane de l'intestin grêle. Ce passage nécessite la présence de graisses monoglycérides, acides gras libres pour la formation des micelles, de sels biliaires et d'enzymes pancréatiques (estérases) pour être incorporée dans les micelles. Par conséquent, cette absorption est étroitement associée à celle des acides gras. Après la traversée de la barrière intestinale, le tocophérol est incorporé dans les chylomicrons pour son transfert et son stockage au niveau des tissus adipeux (**Traber et Kayden, 1987**).

Dans la circulation sanguine, la vitamine E est transférée des chylomicrons aux lipoprotéines circulantes telles que les lipoprotéines de haute densité (HDL) et de faible densité (LDL et VLDL). Chez un adulte en bonne santé à jeûn, la distribution de la vitamine E sur les lipoprotéines est la suivante (**Landrier, 2011**):

- 15 % dans les VLDL,
- 45 % dans les LDL,
- 40 % dans les HDL.

Ainsi les taux de vitamine E plasmatiques sont proportionnels à la concentration lipidique. Ceci explique que les concentrations de vitamine E doivent être rapportées aux teneurs lipidiques pour dépister une carence éventuelle. L'élimination de la vitamine E se fait par voie biliaire ou urinaire après dégradation hépatique (**Landrier, 2011**).

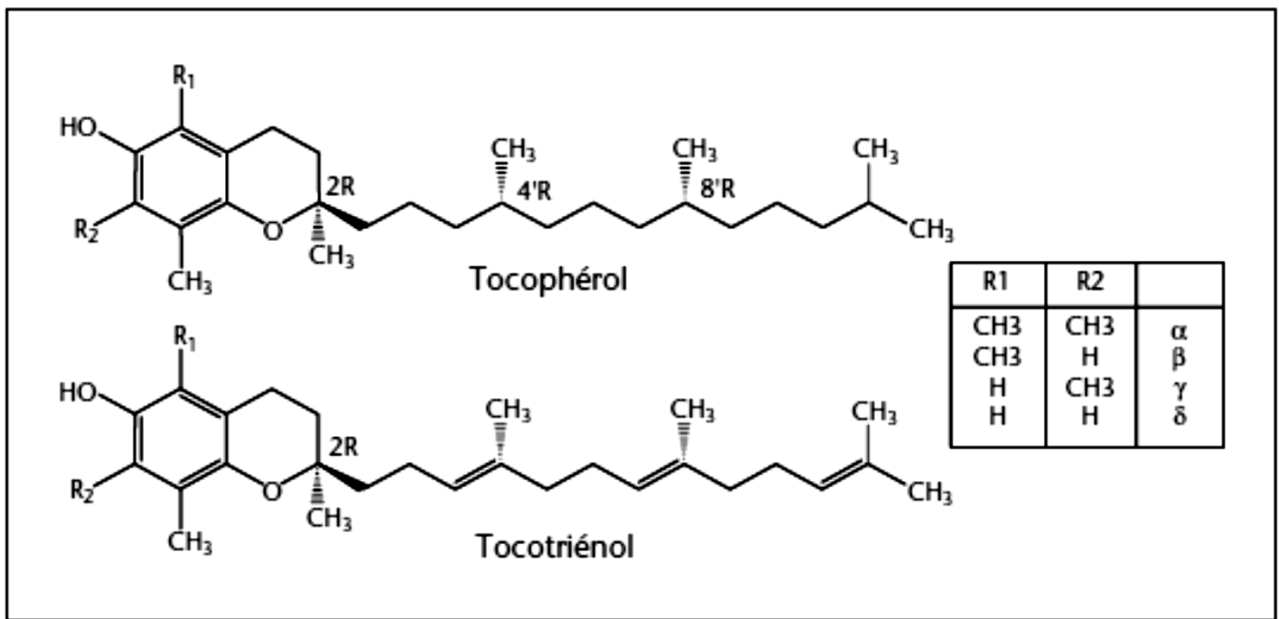


Figure 7 : Structure des tocopherols et tocotrienols

✓ Propriétés immunostimulantes de la vitamine E

La vitamine E présente de nombreux effets stimulateurs sur les cellules des défenses immunitaires. Elle protège les membranes phospholipidiques des cellules et les lipoprotéines contre l'action délétère des espèces réactives de l'oxygène (ERO) produites par le *Mycobacterium tuberculosis* contribuant à restaurer l'immunité. Son action antiradicalaire se traduirait par son utilisation par les cellules des tissus pulmonaires pour bloquer la production des espèces réactives de l'oxygène et d'azote induite par *Mycobacterium tuberculosis* pour échapper à l'action phagocytaire des macrophages humains (**Seyedrezazadeh et al., 2006**). Par ailleurs une supplémentation en cette vitamine augmente la prolifération lymphocytaire, la production de l'IL-2, l'activité des cellules NK cytotoxiques et l'activité phagocytaire des alvéoles macrophagiques (**Pawar et al., 2011**). Selon **Meydani et al. (2005)**, des concentrations plus élevées en vitamine E contribuent à promouvoir la réponse médiée par le Th2 cytokine au détriment de celle de Th1 pro-inflammatoire. D'autres études ont indiqué que la vitamine E possède des effets modulateurs sur les cellules T CD4 et T CD8 et dans la production des interleukines Il-2 (**Hernandez et al., 2008**).

1.2.3- Oligoéléments

Tout comme les vitamines liposolubles, les oligoéléments sont des substances organiques de faibles concentrations dans l'organisme et dont la principale source est alimentaire. Parmi ces oligoéléments, le fer, le cuivre et le zinc en tant que acteurs faisant partie intégrante de nombreux enzymes, jouent un rôle primordial dans l'organisme humain à travers leurs nombreux effets antioxydant et immunostimulant.

1.2.3.1- Métabolisme du fer

✓ Sources du fer

Le fer a deux principales sources. Une partie issue du recyclage après dégradation des globules rouges sénescents par les macrophages et l'autre partie d'origine alimentaire. Le fer de recyclage représente la principale voie de fourniture du fer à l'organisme (**Bauduer, 2009 ; Lasocki et al., 2011 ; Loréal et al., 2012a**). Les érythrocytes sénescents (d'environ 120 jours) sont phagocytés par les macrophages. L'hémoglobine est libérée au cours du processus de phagocytose, ce qui met particulièrement en jeu l'hème-oxygénase qui permet la libération du fer (**Andrews, 1999**). Celui-ci est alors orienté soit vers la ferritine, une protéine de stockage du fer, soit vers le secteur plasmatique sous forme complexé à la transferrine. La sortie du fer des macrophages fait intervenir la ferroportine, une protéine transmembranaire qui exporte le fer cellulaire sous forme de Fe^{2+} après son oxydation par la céruloplasmine (**Donovan et al.,**

2000 ; McKie *et al.*, 2001 ; Pietrangelo, 2004). Cette voie représente environ 95% du fer disponible dans l'organisme.

Les autres 5% sont apportés par l'alimentation. Les principales sources alimentaires sont:

- La viande et les produits animaux pour le fer héminique caractérisé par une excellente absorption intestinale (20 à 25%).
- Les végétaux (céréales, légumineuses, légumes verts) pour le fer non héminique caractérisé par une faible absorption (5 à 10%).

L'absorption du fer d'origine alimentaire est assurée par l'entérocyte au sommet de la villosité intestinale et comprend une phase apicale de transfert vers le cytoplasme, puis une phase basolatérale de transfert vers le plasma selon des mécanismes bien précis.

Le fer non héminique est réduit en Fe^{2+} par une enzyme (DCYTb) exprimée au niveau de la membrane apicale des entérocytes. Celui-ci est en suite pris en charge par Divalent Metal Transporter 1 (DMT1) qui permet son entrée dans la cellule.

Le fer héminique quant à lui, est capté dans la lumière digestive via un récepteur de l'hème, hème carrier protein 1 (HCP1), dont la fonction reste discutée. L'hème transféré dans le cytoplasme subit l'action de l'hème oxygénase qui libère le fer ; celui-ci sera alors soit stocké dans la ferritine entérocytaire soit transféré vers le pôle basolatéral d'où il est exporté vers le plasma sous forme complexée à la transferrine par la ferroportine membranaire (**Loréal *et al.*, 2012b**).

✓ **Distribution de fer**

Une fois dans l'organisme, le fer se présente sous forme héminique (65%) dans l'hémoglobine, la myoglobine et les enzymes respiratoires (cytochromes, oxydases, peroxydases, etc.) et sous forme non héminique (35%) repartit comme suit : une grande partie est captée par la ferritine, la protéine majeure de stockage intracellulaire et une faible fraction est présente dans le plasma associée à la transferrine (Tf), une protéine plasmatique, assurant son transport vers les cellules (Figure 8).

L'homéostasie du fer est régulée par l'hepcidine, une protéine pro-inflammatoire produite par les hépatocytes et qui maîtrise la sortie du fer des macrophages et des entérocytes (**Loréal *et al.*, 2005 ; Anderson *et al.*, 2005**) comme le montre la figure 9. Une partie infime du fer est éliminée par desquamation cellulaire, saignements et pertes urinaires.

✓ **Propriétés immunostimulantes du fer**

Le fer est un métal de transition nécessaire à la vie cellulaire. Ce rôle est en grande partie lié à sa capacité de pouvoir passer d'un état ferreux Fe^{2+} à un état ferrique Fe^{3+} et vice versa. Ce qui lui permet de jouer un rôle dans les grandes fonctions biologiques. Il est le

constituant essentiel de l'hémoglobine où il assure le transport de l'oxygène. Il joue le rôle de cofacteur dans un grand nombre de réactions enzymatiques impliquées dans la production d'énergie et dans de grandes fonctions métaboliques telles que le métabolisme des protéides, des lipides et des glucides ainsi que dans la synthèse de l'ADN. Il est également impliqué dans la modulation des défenses immunitaires et dans le contrôle de la tuberculose. En effet, des études menées par **Isanaka *et al.* (2011)** ont montré que l'anémie ferriprive est également un facteur de l'échec des traitements antituberculeux et d'apparition des bacilles multirésistants. Ces études expérimentales et épidémiologiques suggèrent qu'une fonction immunitaire appropriée exige la présence de fer. Et que l'insuffisance en fer compromet l'immunité cellulaire en réduisant la prolifération et la potentialisation du nombre de cellules T et en diminuant l'activité des macrophages. Ce qui peut réduire la capacité du système immunitaire à contrôler l'infection mycobactérienne. Selon ces travaux, l'insuffisance en fer peut changer l'équilibre entre les cytokines Th 1 et Th 2 en favorisant une domination de la réponse Th 2 qui a été liée à la maladie chronique de tuberculose et dont l'on suggère jouer un rôle important dans la progression du virus d'immunodéficience humain (VIH). Plusieurs autres auteurs ont également rapporté une anémie chez des tuberculeux en cours de traitement même si ces études n'ont pas été précises sur le type d'anémie (**Devi *et al.*, 2003 ; Kotru *et al.*, 2004 ; Tritar *et al.*, 2005 ; Chen *et al.*, 2010**).

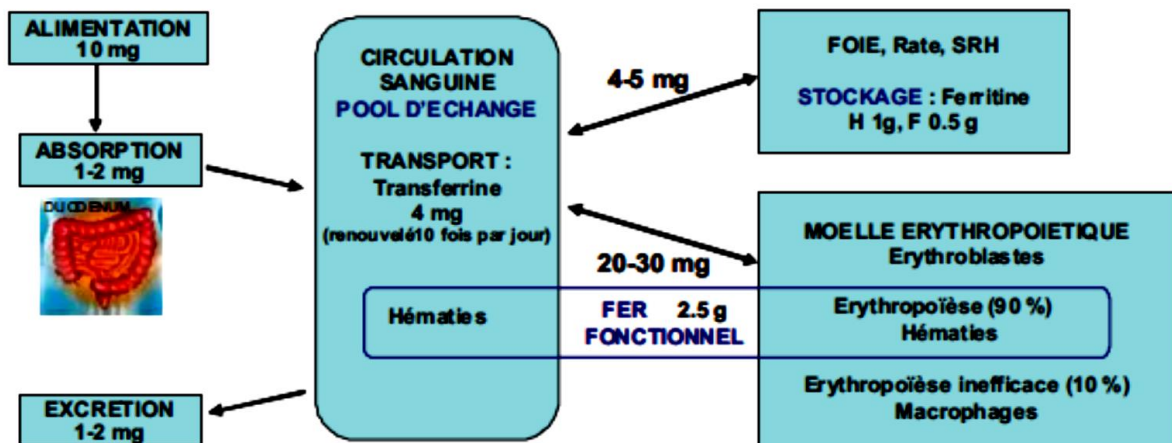


Figure 8 : Répartition du fer dans l'organisme (Loréal *et al.*, 2012a)

Les différentes formes du fer dans l'organisme avec les quantités réparties dans chaque compartiment : le pool d'échange lié à la transferrine, la forme de stockage complexée à la ferritine et les voies d'élimination des quantités non utilisées.

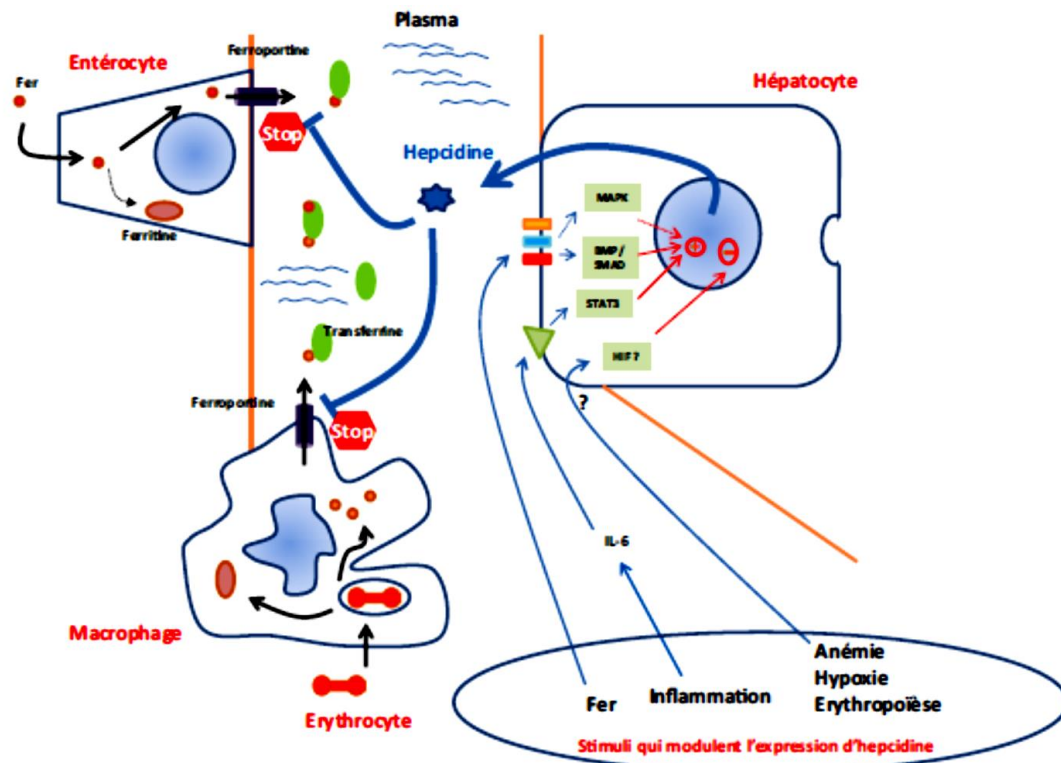


Figure 9 : Mécanisme de contrôle du métabolisme du fer (Loréal *et al.*, 2012b)

Mécanisme de régulation du métabolisme du fer avec les enzymes clés et les différents points d'intervention de ces enzymes. + symbolise l'activation et - symbolise l'inhibition

1.2.3.2- Métabolisme du cuivre

✓ Sources du cuivre

L'alimentation est la source principale du cuivre. On le retrouve essentiellement dans le foie de veau, le cacao, le thé, les légumes secs, les noix, les champignons, le pain blanc, la viande de bœuf, le lait de vache et les pommes. L'absorption du cuivre peut interférer avec un certain nombre de constituants des aliments. Chez l'Homme, l'absorption du cuivre est estimée à 36% de la quantité ingérée lorsque sa concentration est « normale » dans l'aliment. Son absorption digestive est un mécanisme actif, impliquant par définition des protéines de transport dont les métallothionéines qui assurent son transport et son stockage au niveau du foie (Terada *et al.*, 1999).

✓ Distribution du cuivre

Dans la circulation sanguine, 70 à 80 % du cuivre se trouvent sous forme associée à la ceruloplasmine, une ferroxidase sécrétée par les hépatocytes (Kosman, 2002). Une infime partie est liée à l'albumine. La principale voie d'excrétion est la voie biliaire, à raison de 2,5 mg/jour. Le reste de l'élimination se fait à partir des urines et les sucs intestinaux (Jaouen, 2013) (Figure 10).

✓ Propriétés immunostimulantes du cuivre

Le cuivre occupe une place prépondérante dans le métabolisme cellulaire. Il joue un rôle essentiel dans la formation de l'hémoglobine. En effet la ceruloplasmine qui a pour rôle de réduire le fer ferreux en fer ferrique, nécessaire à l'érythropoïèse, utilise le cuivre comme cofacteur pour son activité ferroxidase. Il intervient également comme cofacteur de la cytochrome C oxydase, enzyme impliqué dans la respiration cellulaire et la superoxyde dismutase (SOD), un antioxydant enzymatique qui permet la dismutation de l'anion super oxyde. Il a été démontré que les macrophages augmentent les concentrations intracellulaires en cuivre afin de contrer la multiplication des bactéries y compris *Mycobacterium tuberculosis* (Wanger *et al.*, 2005 ; White *et al.*, 2009 ; Achard *et al.*, 2012). Cependant des concentrations élevées en cuivre pourraient entraîner une augmentation du niveau de stress oxydant par la production excessive de radicaux libres. Cela a été constaté par Kassu *et al.* (2006) dans une étude qui a montré des concentrations en cuivre et un ratio Cu/zinc significativement élevés chez des tuberculeux en cours de traitement comparativement aux témoins.

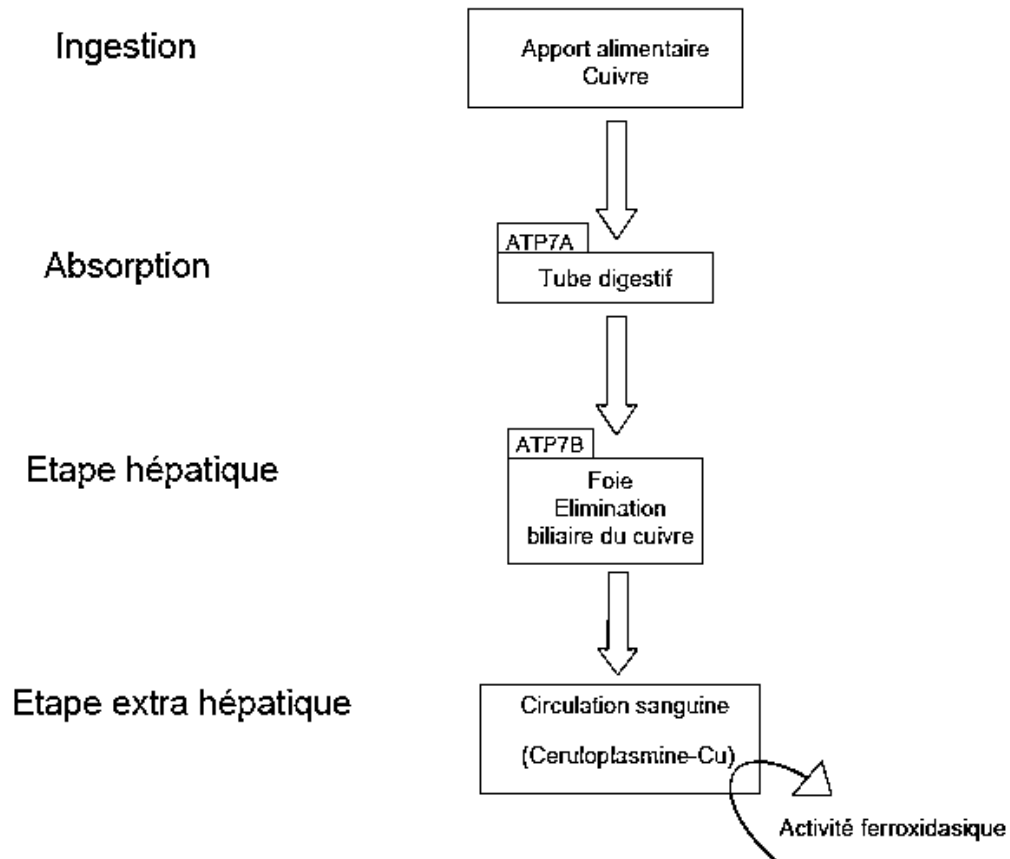


Figure 10 : Différentes étapes du métabolisme du cuivre (Woimant et Trocello, 2014)

1.2.3.3- Métabolisme du zinc

✓ Sources du zinc

L'apport de zinc (Zn) est garanti chez l'homme grâce aux aliments d'origine animale. La viande, le fromage dur, les abats, quelques crustacés tels que scampis et huîtres sont de bonnes sources de zinc. Les céréales, les légumineuses telles que les lentilles et graines de soja, les noix, les amandes et les semences contiennent également des quantités notables de zinc. Les légumes, les fruits et les produits à base de farine blanche n'en contiennent par contre que très peu (**Reinhard et al., 2010**). L'absorption du zinc se fait par deux procédés: le premier est l'absorption paracellulaire, un processus passif et non saturant qui dépend du gradient de concentration intraluminaire et interstitielle. Le second est un mécanisme transcellulaire actif et saturable (**Krebs, 2000**). Cette dernière voie d'absorption est considérée comme prédominante (**Miller et al., 2007**). L'absorption du zinc se fait dans le duodénum et le jéjunum par des systèmes de transport consommant de l'énergie.

✓ Distribution du zinc

Le zinc organique total dans l'organisme est approximativement de 1,5 g chez la femme et 2,5 g chez l'homme. Après le fer, le zinc est l'oligoélément le plus important quantitativement pour l'être humain. La plus grande portion (98%) du zinc est localisée au niveau intracellulaire: Le tissu musculaire, le foie, les organes de reproduction masculins, les os, la rétine et l'iris en ont des concentrations élevées. Seul 0,1% du zinc total se trouve dans le sérum, 2/3 sont liés à l'albumine et 1/3 à l'alpha-2-macroglobuline. L'excrétion se fait à 90% par les selles et 10% par les urines ; des quantités minimales sont éliminées par la transpiration, la peau, les cheveux, le sperme et les menstrues (**Reinhard et al., 2010**) (Figure 11).

✓ Propriétés immunostimulantes du zinc

Le zinc occupe une place importante dans la croissance, le développement et le maintien des défenses immunitaires (**Walker et Black, 2004**). Il est essentiel dans la prolifération cellulaire particulièrement dans les systèmes immunitaires inné et acquis. Son insuffisance affecte les défenses immunitaires par plusieurs moyens. Elle a comme conséquences la diminution de la phagocytose, la réduction du nombre de cellules T circulantes ainsi que la réduction de l'activité de la tuberculine circulante chez les animaux (**Beck et al., 1997**). L'insuffisance en zinc contribue également à la réduction de la production de l'INF γ , IL-1 et TNF- α . (**Fraker et al., 2000**). Selon une étude réalisée *In vitro*, l'activité bactéricide des macrophages s'est avérée réduite pendant l'insuffisance en Zinc et rapidement reconstituée après supplémentation en Zinc. Le Zinc joue également un rôle important dans le

métabolisme de la Vitamine A en stimulant la synthèse des protéines transporteuses de la vitamine A tel que le rétinol binding protein. Ce qui contribue à augmenter la concentration plasmatique en rétinol. Un apport proportionné en Zinc peut aussi limiter les dommages causés par les radicaux libres sur la membrane cellulaire pendant l'inflammation en tant que activateur des enzymes antioxydants tels la superoxyde dismutase (SOD), la catalase, la glutathion peroxydase (**Gupta, et al., 2012**). Toutefois certains antituberculeux de seconde ligne tel que l'éthambutol peut réduire l'absorption intestinale du zinc et entraîner une élimination excessive du zinc par les urines. Ceci peut contribuer à une réduction de la concentration du zinc circulant (**King et Schwartz, 1987**).

1.2.3.4- Ratio Cuivre / Zinc

Le ratio cuivre/zinc est un facteur important dans la détermination du statut immunitaire et le niveau du stress oxydant dans le cas de maladies infectieuses (**Dede et al., 2008 ; M'boh et al., 2012 ; Kolia et al., 2014**). En effet, il a été démontré qu'une corrélation existe entre différents marqueurs du système immunitaire et le ratio cuivre/zinc (**Gao et al., 2011**). Ces travaux ont révélé que les perturbations du ratio cuivre/zinc sont responsables d'une diminution de la capacité antioxydante, d'une réponse inflammatoire accrue et d'un dérèglement de la régulation de la sécrétion des lymphocytes T et B. De plus, il a été rapporté que la production de malondialdéhyde (MDA) et des composés carbonyles est fortement liée à un ratio cuivre/zinc élevé. Ainsi le ratio cuivre/zinc plasmatique pourrait être un marqueur d'intérêt pour évaluer le statut nutritionnel, le niveau de stress oxydant, le processus inflammatoire et l'efficacité du système immunitaire (**Gao et al., 2011**). Selon les travaux réalisés par **Kassu et al. (2006)**, une augmentation du ratio Cu/Zn chez les tuberculeux est un indicateur du statut nutritionnel en zinc. Dans cette même étude, les auteurs ont également montré qu'un ratio Cu/Zn supérieur à 2 est l'expression de la sévérité de l'infection Mycobactérienne.

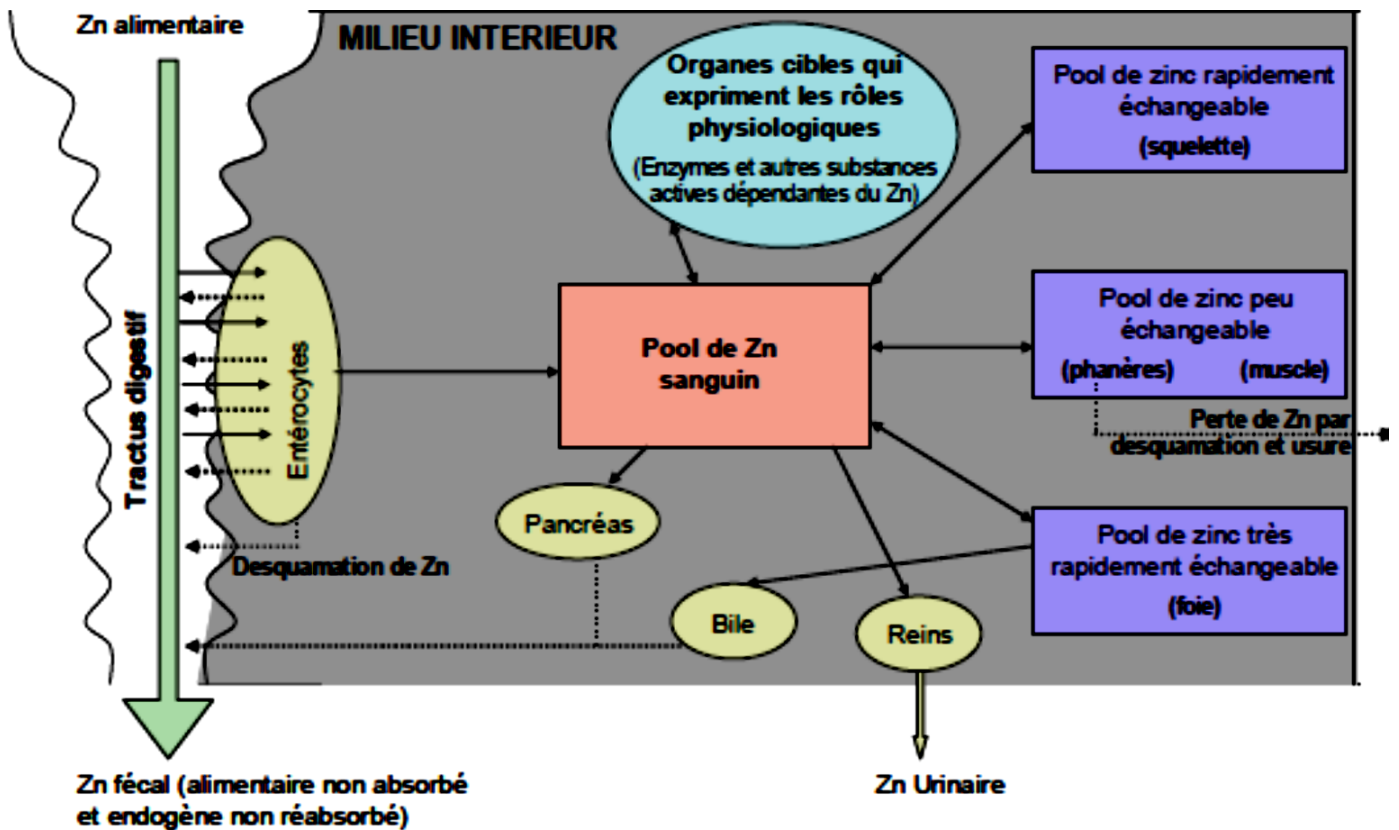


Figure 11 : Schéma des flux corporels de zinc (Schlegel, 2010)

Absorption et répartition de zinc dans l'organisme humain avec le pool sanguin, les pools de réserve rapidement échangeable, les organes cibles et les différentes voies d'élimination des quantités de zinc non utilisées.

1.3- Marqueurs hématologiques et biochimiques en rapport avec le statut micronutritionnel.

Une meilleure appréciation du statut en micronutriment dans le cas des maladies infectieuses est nécessairement accompagnée du dosage de certains paramètres hématologiques et biochimiques de la phase aiguë ou chronique de l'infection impliqués dans le métabolisme de ces micronutriments. Il s'agit du bilan ferrique pour le métabolisme du fer, du bilan lipidique pour le métabolisme de l'ensemble des Vitamine liposolubles (A, D et E) et du bilan phosphocalcique en rapport avec le métabolisme de la vitamine D.

1.3.1- Marqueurs hématologiques

Les paramètres indispensables dans le diagnostic de laboratoire des troubles du métabolisme du fer sont les constantes hématimétriques. Il s'agit notamment de :

- Taux d'hémoglobine (Hb) dont la baisse des valeurs est caractéristique d'une anémie
- Le volume globulaire moyen (VGM) qui définit le caractère microcytaire ou macrocytaire ou normocytaire de l'anémie.
- La concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH) et la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH), deux marqueurs qui déterminent le caractère hypochrome ou normochrome de l'anémie.

Si ces paramètres hématologiques permettent de déterminer le type d'anémie (**Zandeki et al., 2007**), ils ne sont pas précis sur l'origine nutritionnelle ou inflammatoire de cette anémie. D'où l'intérêt de les associer aux paramètres biochimiques du métabolisme du fer.

1.3.2- Marqueurs biochimiques

Le dosage du fer sérique seul ne suffit pas pour évaluer de façon objective le statut en fer d'un individu (**Wanger, 2000**). Il doit par conséquent être couplé à d'autres marqueurs biochimiques du métabolisme du fer notamment la ferritine, la transferrine, la capacité totale de fixation de la transferrine (CTF) et le coefficient de saturation de la transferrine (CS). L'ensemble de ces paramètres biochimiques permet de préciser l'origine de l'anémie observée chez ces sujets.

➤ Ferritine sérique

La ferritine est une macromolécule sphérique constituée d'un ensemble de 24 sous unités de deux types (H = *Heart* et L = *liver*) en proportion variable et délimitant une capsule centrale au sein de laquelle est stocké le fer sous forme de micelles d'oxydes de fer hydraté et phosphaté. Elle est capable de stocker jusqu'à 4500 atomes de fer à l'intérieur de la sphère

(Loréal *et al.*, 2012b) et elle est retrouvée principalement dans le foie, la rate et la moelle osseuse (Wanger, 2000). La ferritine constitue avec l'hémosidérine, la principale réserve spécifique en fer des cellules. Elle protège également la cellule des effets toxiques du fer sous forme ionisée grâce à son enveloppe protéique. La concentration de la ferritine intracellulaire est corrélée par sa concentration sérique ou plasmatique. Ainsi en l'absence d'inflammation, de pathologie du métabolisme du fer ou d'atteinte hépatique, la ferritine sérique est le reflet fiable des réserves totales en fer de l'organisme (Celi *et al.*, 2011). Les valeurs normales de la ferritine sérique sont de 30 à 300 µg/L chez l'homme et de 20 à 200 µg/L chez la femme (Wanger, 2000). Cependant au cours des processus inflammatoires aigus et chroniques, dans le cas des maladies inflammatoires chroniques telles que les maladies infectieuses, la synthèse de la ferritine est directement augmentée par l'inflammation, et ce indépendamment et au-delà du niveau de réserves en fer. La ferritine ne reflète donc plus strictement les réserves en fer de l'organisme. Dans cette situation le dosage isolé de la ferritine sérique ne représente aucun intérêt majeur permettant de déterminer le statut ferrique. Il serait donc nécessaire de l'associer au dosage de la transferrine sérique, la détermination de la capacité totale de fixation de la transferrine (CTF) et le coefficient de saturation de la transferrine (CS) à partir des concentrations du fer sérique.

➤ **Transferrine sérique, capacité total de fixation de la transferrine et coefficient de saturation de la transferrine.**

La transferrine ou sidérophiline est une glycoprotéine assurant le transport du fer depuis les entérocytes intestinaux jusqu'aux érythroblastes médullaires et la récupération du fer après destruction des érythrocytes par le système macrophagique. Il s'agit d'une β -globuline synthétisée par le foie et présentant une très forte affinité pour les ions Fe^{3+} . Chaque molécule de transferrine peut lier 2 ions Fe^{3+} au maximum, soit 1,25 mg de fer pour 1 gramme de transferrine (Herklotz et Huber, 2010). Les valeurs habituelles chez l'adulte sont de 1,6 à 3,2 g/L. Les facteurs de diminution sont la surcharge en fer, l'insuffisance hépatocellulaire et la dénutrition majeure via une diminution de sa synthèse, les syndromes néphrotique et inflammatoire par augmentation de son catabolisme. La transferrine est augmentée pendant la carence en fer. La diminution de la transferrine ne survient que lorsque les réserves sont épuisées, le fer sérique diminué et que l'érythropoïèse devient insuffisante. Deux éléments théoriques sont calculés à partir de ce dosage pondéral de la transferrine (Wanger, 2000):

- la capacité totale de fixation en fer de la transferrine (CTF), également appelée capacité totale de saturation en fer de la transferrine (CTS).

$$\text{CTF } (\mu\text{mol/L}) = \text{transferrine } (\text{g/L}) \times 25$$

Ou

$$\text{CTF } (\text{mg/L}) = \text{transferrine } (\text{g/L}) \times 1,395.$$

La capacité de fixation de la transferrine normale est de l'ordre de 40 à 80 $\mu\text{mol/L}$. Il représente la quantité de fer disponible pour l'érythropoïèse si la transferrine est saturée à 100 %. Elle est généralement en baisse au cours d'inflammations aiguës et chroniques.

- le coefficient de saturation en fer de la transferrine (CS), qui correspond au rapport entre le fer sérique et la capacité totale de fixation de la transferrine.

$$\text{CS } (\%) = \frac{\text{Fer sérique } (\mu\text{mol/L})}{\text{CTF } (\mu\text{mol/L})} \times 100.$$

Il renseigne sur le transport et la livraison du fer aux cellules utilisatrices. Les valeurs habituelles chez l'adulte sont situées entre 20 et 40 %. Il reflète la quantité de fer effectivement disponible pour l'érythropoïèse (**Wanger, 2000**). Contrairement au CTF, ce paramètre peut être légèrement abaissé ou normal au cours des processus inflammatoires aiguës et chroniques.

➤ Bilan phosphocalcique

Le bilan phosphocalcique comprend le dosage du calcium sérique, du phosphore sérique et la créatinine. Le calcium et le phosphore sont les électrolytes les plus importants de l'organisme. La plus grande portion, soit 99 % du calcium et du phosphore se trouvent dans le squelette et les dents sous forme d'hydroxy-apatite phosphocalcique et 1 % dans le milieu intérieur dont 0,9 % dans les cellules. Le calcium est indispensable au remodelage du tissu osseux et joue un rôle important à l'état ionisé dans la perméabilité cellulaire, l'excitabilité neuromusculaire et dans l'activation de certains systèmes enzymatiques notamment dans la coagulation (**Haynes, 2012**). Le phosphore quant à lui occupe une place essentielle dans le fonctionnement du cerveau en participant à la formation des cellules du cerveau. Il intervient également dans le métabolisme des graisses, des sucres et dans la formation de l'adénosine triphosphate (ATP), la source de l'énergie nécessaire pour le bon fonctionnement des cellules de l'organisme. Les métabolismes du phosphore et du calcium sont étroitement liés et régulés par les mêmes hormones.

La régulation de ce métabolisme phosphocalcique est sous la dépendance d'un double système hormonal. Ce système est composé d'une part de la parathormone et de la vitamine D synthétisée dans la peau et transformée en substance active (1,25-hydroxy vitamine D3) dans

le foie et le rein et d'autre part la calcitonine sécrétée par les cellules parafolliculaires C de la thyroïde. Ces deux systèmes assurent l'homéostasie calcique et du phosphore en jouant sur leur absorption digestive, leur excrétion urinaire et sur leur mobilisation à la demande à partir de l'os. La parathormone et la vitamine D visent à élever la calcémie et la phosphatémie tandis que la calcitonine a un effet hypocalcémiant et hypophosphatémiant. En retour, le calcium et le phosphore exercent un rétrocontrôle sur la synthèse de ces systèmes enzymatiques. Les concentrations du calcium et du phosphore dans le sang sont évocateurs du bon fonctionnement de ces systèmes enzymatiques.

Cependant, une bonne interprétation des résultats du bilan phosphocalcique recommande une évaluation de la fonction rénale à travers le dosage de la créatinémie. La créatinine est issue de la dégradation de la créatine, une protéine produite par le foie et stockée dans les muscles. Sa production de façon constante dans la circulation sanguine et son élimination quasi exclusive par le glomérule rénal, fait d'elle le meilleur marqueur endogène d'évaluation de la fonction rénale en pratique quotidienne (**Canaud, 2008**). Ainsi, une phosphatémie basse avec une calcémie élevée et une créatinémie normale est très évocateur d'une hyperparathyroïdie secondaire à hypervitaminose D. En revanche, une phosphatémie élevée et une calcémie basse avec une créatinémie normale est en faveur d'une hypoparathyroïdie secondaire à hypovitaminose D (**Murry, 2011**).

➤ **Bilan lipidique**

L'absorption et la circulation sanguine des vitamines liposolubles sont très souvent liées à celles des lipides. Une malabsorption des lipides affecte généralement l'assimilation des vitamines A, D et E. Le bilan lipidique comprend le dosage du cholestérol total, le HDL-cholestérol, le LDL-cholestérol et les triglycérides. Il existe une interaction entre le bilan lipidique et les vitamines liposolubles. En effet, les concentrations sériques en lipides sont proportionnelles à celles des vitamines liposolubles notamment la vitamine E. Selon **Landrier (2011)**, la distribution de la vitamine E chez un adulte en bonne santé est de 15% dans les VLDL, 45% dans les LDL et 40% dans les HDL. Ceci explique l'importance de rapporter les concentrations en vitamine E au bilan lipidique avant de dépister une éventuelle carence. Il a été également rapporté qu'au cours des infections bactériennes, des changements significatifs sont observés dans le métabolisme des lipides (**Wendel et al. 2007**). Ces perturbations métaboliques sont dues à une accumulation des lipides notamment les cholestérols et triglycérides dans les macrophages sous formes de cellules de mousses nécessaires à la croissance bactérienne (**Russell et al., 2009 ; Kim et al., 2010**).

II-MATERIEL ET METHODES

2.1- MATERIEL

2.1.1- Cadre et site de l'étude.

Il s'agit d'une étude expérimentale effectuée sur des prélèvements de tuberculeux multirésistants (TB-MDRs) et de témoins non tuberculeux provenant du service pulmonologie du centre hospitalier universitaire (CHU) de Cocody et des cinq centres antituberculeux (CAT) de la ville d'Abidjan (Abobo, Adjamé, Koumassi, Port-Bouet et Yopougon). Elle a été réalisée à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (IPCI) qui est l'un des centres de suivi biologique des patients TB-MDRs.

2.1.2- Echantillons de l'étude

Cette étude a concerné tous les échantillons des patients ayant fait échec au traitement antituberculeux de première ligne et sous un nouveau traitement antituberculeux de seconde ligne (un traitement court de 9 mois). La résistance simultanée à l'Isoniazide et la Rifampicine a été confirmée par des analyses microscopiques et moléculaires réalisées par le laboratoire national de référence de la tuberculose selon les tests recommandés par l'Organisation mondiale de la Santé (OMS). Les échantillons des TB-MDRs et des témoins non tuberculeux ont été retenus selon des critères d'inclusion et de non inclusion.

2.1.2.1- Critères d'inclusion

Sont inclus dans cette étude :

✓ Echantillons TB-MDRs

- Tous les échantillons provenant de personne atteinte d'une TB-MDR après confirmation de la résistance aux deux antituberculeux majeurs du traitement de première ligne (Isoniazide et Rifampicine).
- Tous les échantillons de patients TB-MDRs ayant suivi régulièrement tous les bilans mensuels pendant la phase intensive de traitement antituberculeux de 4 à 6 mois.

✓ Echantillons témoins

Les témoins ont été les échantillons des personnes (en provenance des mêmes sites que les TB-MDRs) ayant accepté volontairement de participer à cette étude et ne présentant aucun signe clinique et biologique de tuberculose active.

2.1.2.2- Critères de non inclusion

Les échantillons non inclus dans cette étude ont été :

✓ Echantillons TB-MDRs

Tous les prélèvements provenant des femmes enceintes et des patients atteints d'autres pathologies immunosuppressives telles que le diabète, le VIH.

✓ **Echantillons témoins**

Tous les échantillons des témoins atteints d'autres pathologies immunosupresseurs telles que le diabète, le VIH.

Selon les critères d'inclusion et de non inclusion, ont été retenus pour cette étude les prélèvements de cent (100) patients TB-MDRs et de cent (100) témoins volontaires non tuberculeux à des proportions égales d'hommes et de femmes (50 pour 50). L'âge de ces individus est compris entre 18 et 55 ans.

2.1.3-Matériel biologique

Le matériel biologique est constitué de sérums et de sang total de patients tuberculeux multirésistants (TB-MDRs) en cours de traitement et de témoins volontaires non tuberculeux.

2.1.4- Matériel technique

Il est essentiellement constitué de :

- Un automate de Biochimie, le COBAS C311 HITACHI de Roche Diagnostic France, utilisé pour le dosage des marqueurs biochimiques (Photographie 1).
- Le Sysmex XN-1000i Kobe, Japon pour le dosage des marqueurs hématologiques de métabolisme du fer (Photographie 2).
- Une chaîne de Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP ou HPLC en Anglais) de marque Waters[®] USA, qui a servi à la détermination des concentrations en vitamines A, D et E (Photographie 3).
- Un Spectromètre d'Absorption Atomique (SAA) à flamme-air/acétylène de marque Varian Spectr AA - 20 Victoria[®] Australlia, pour l'évaluation des teneurs en fer, cuivre et zinc (Photographie 4).
- Une centrifugeuse horizon 642 VES, THE DRUCKER CO., USA.



Photographie 1 : Automate Cobas C311 HITACHI de Roche Diagnostic (Bahi et al., 2017)



Photographie 2 : Automate Sysmex XN-1000i Kobe (Bahi et al., 2017)



Photographie 3 : Spectromètre d'absorption atomique à flamme-air/acétylène (Bahi et al., 2017)



Photographie 4 : Chromatographe liquide de type HPLC, Waters (Bahi et al., 2017)

2.1.5- Réactifs

Les réactifs utilisés sont principalement :

- Le méthanol et l'éthanol *CHEM LAB*, Belgique, l'hexane *CARLO EBRA*, Italie et les standards de Vitamines A, D et E et le Rétinyl acétate de Sigma Aldrich, USA pour le dosage des vitamines.
- Une solution multi standard de fer, cuivre et zinc, L'acide chloridrique (HCl) préparé à 2 M et l'acide nitrique (HNO₃) pour le dosage des oligoéléments.
- Des Kits prêts à l'emploi de Roche Diagnostic France pour le dosage des paramètres biochimiques : FERR4, TRSF2 pour le dosage des paramètres biochimiques du métabolisme du fer ; CA2, PHOS2 pour le bilan phosphocalcique ; CHOL2, HDL-C3, TIGLY pour le bilan lipidique et CREAJ pour le dosage de la créatinémie. Des calibrateurs dont le Cfas multiparamétrique (lyophilisat) utilisé pour la calibration du calcium, du phosphore, du cholestérol total, des triglycérides et de la créatinine sérique, le Cfas lipides (liquide), pour la calibration du HDL-cholestérol et le Cfas protéines (liquide), pour la ferritine et la transferrine. Ainsi que des contrôles qualité des paramètres biochimiques, le « PreciControl ClinChem Multi » abrégé PCCC qui sont deux lyophilisats à base de sérum humain: PCCC1 (contrôle normal) et PCCC2 (contrôle pathologique).
- Des kits prêts à l'emploi de numération formule sanguine pour le dosage des marqueurs hématologiques du métabolisme du fer tels que le taux de l'hémoglobine (Hb), le volume globulaire moyen (VGM), la concentration et la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH et TCMH).

2.2- METHODES

2.2.1- Recueil des échantillons

L'échantillonnage chez les témoins a été effectué en une seule prise de sang. Quant aux malades (TB-MDRs), le recueil des échantillons a été effectué de Janvier 2014 à Décembre 2015 et à différents stades du suivi des malades comme défini ci-après:

- Le stade M₀ a concerné le bilan initial après confirmation du test de multirésistance ci-dessus mentionné et avant le début de tout traitement.
- Les stades M₃ et M₆ pour le bilan de suivi à respectivement 3 et 6 mois de traitement antituberculeux de seconde ligne.

L'échantillonnage chez les TB-MDRs et les témoins volontaires non tuberculeux ont été effectués à jeun sur deux types de tubes :

Deux (2) échantillons par TB-MDR à chaque stade du suivi (M_0 , M_3 et M_6) dont un tube sans anticoagulant ou tube sec et un tube EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid), à raison de 5 mL de sang pour chaque tube ont été retenus.

Chez les témoins volontaires non tuberculeux, deux (2) prélèvements avec un tube sec et un tube EDTA à raison de 5 mL de sang pour chaque tube ont été également effectués.

Au total 600 échantillons TB-MDRs dont 300 tubes sans anticoagulant et 300 tubes EDTA et 200 échantillons témoins (100 tubes sans anticoagulant et 100 tubes EDTA) ont servi pour cette étude. Les échantillons des tubes secs ont été centrifugés à 3000 tours/minutes pendant 5 minutes à l'aide d'une centrifugeuse horizon 642 VES, THE DRUCKER CO., USA. Le sérum a été recueilli dans des tubes Ependorf[®] à raison de trois (3) aliquotes par échantillon (0,5 mL par aliquote) et conservé à -20°C jusqu'au moment des différentes analyses des marqueurs biochimiques et micronutritionnels.

Quant aux tubes EDTA, ils ont servi de façon extemporelle à la détermination des marqueurs hématologiques du métabolisme du fer.

2.2.2- Méthodes de dosage des marqueurs hématologiques et biochimiques en rapport avec le statut en micronutriments

Le dosage des paramètres hématologiques et biochimiques a été effectué à l'unité de biochimie clinique et hémobiologie du Département de Biochimie Médicale et Fondamentale à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (IPCI). Il a été réalisé à l'aide du Sysmex XN-1000i (photographie 1) pour les marqueurs hématologiques et du Cobas C311 Hitachi (photographie 2) concernant les paramètres biochimiques grâce à des Kits prêt à l'emploi fournis par les fabricants.

2.2.2.1- Méthodes de dosage des marqueurs hématologiques

Le dosage des marqueurs hématologiques est réalisée automatiquement grâce à la technologie combinant la variation d'indépendance et la cytométrie de flux (**Ormerod *et al.*, 1993**).

2.2.2.1.1- Principe du Sysmex XN-1000i Kobe

Le système hématologique automatisé XN-1000i de Sysmex utilise la puissance des technologies de la cytométrie de flux fluorescente et de la focalisation hydrodynamique. Grâce à une table de travail de laser à photodiode, la cytométrie de flux fluorescente de Sysmex offre la sensibilité nécessaire pour mesurer et différencier les types de cellules présentes dans le sang.

2.2.2.1.2- Méthode analytique des marqueurs hématologiques

- ✓ Les globules rouges ont été dénombrés dans un canal spécifique en utilisant les méthodes de détection d'un courant continu en combinaison avec la technologie de la focalisation hydrodynamique.
- ✓ L'évaluation du taux d'hémoglobine (Hb) a été réalisée en utilisant le réactif sans cyanure, le sulfate sodique de lauryle (SDL). Le produit fini est un composé coloré qui est mesuré par spectrophotométrie. Étant donné que les déterminations d'hémoglobine sont réalisées à partir d'une dilution et dans une cuve séparée réservée à cette fonction, il n'y a aucune interférence provoquée par des numérations élevées de globules blancs, l'hyperlipidémie ou des protéines anormales.
- ✓ L'amplitude d'impulsion cumulative de toutes les numérations érythrocytaires donne les hématocrites (HCT). Celui-ci est basé sur le principe que l'amplitude d'impulsion (la variation de tension) produite par les cellules qui passent à travers l'ouverture est proportionnelle au volume de la cellule.
- ✓ Le volume globulaire moyen (VGM) est calculé par le rapport de l'hématocrite sur le nombre de globules rouges.
- ✓ La concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH) est le rapport du taux d'hémoglobine sur l'hématocrite et la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH) est le rapport de l'hémoglobine sur le nombre de globules rouges (**Ormerod *et al.*, 1993**).

2.2.2.2- Méthodes de dosage des marqueurs biochimiques

Le dosage des paramètres biochimiques a été réalisé à l'aide des kits prêts à l'emploi et d'un automate, le Cobas C311 Hitachi de Roche diagnostic, France.

2.2.2.2.1- Principe du Cobas C311 Hitachi

Le Cobas C311 est un analyseur de biochimie clinique entièrement automatisé. Son principe est basé sur la réalisation des dosages manuels dans un circuit complètement fermé sans intervention humaine. Son utilisation est prévue pour la détermination qualitative et quantitative d'une vaste gamme d'analyses biochimiques dans différents liquides corporels. C'est un dispositif médical de Diagnostic *in vitro* fabriqué par Roche Diagnostique en Allemagne et distribué par Roche Diagnostique France.

Le dosage des paramètres biochimiques a été effectué selon différentes méthodes après la calibration et le contrôle qualité des kits.

2.2.2.2.- Méthode analytique des paramètres biochimiques

L'analyse quantitative des paramètres biochimiques a été réalisée à partir de 500 µL de sérum après la calibration des kits et la validation des résultats du contrôle qualité. Les résultats sont obtenus directement en concentration après conversion des absorbances à partir des équations des droites d'étalonnage incorporées dans l'automate. Le dosage des marqueurs biochimiques est effectué selon différents principes et méthodes mentionnés dans les notices qui accompagnent les kits des réactifs.

➤ Marqueurs biochimiques du métabolisme du fer

• Ferritine

- Principe de dosage de la ferritine

La ferritine humaine s'agglutine sur les particules de latex recouvertes d'anticorps monoclonaux anti-ferritine. Le précipité issu de l'agglutination est mesuré par turbidimétrie.

- Méthode de dosage de la ferritine

A un volume de 10 µL de sérum humain sont ajoutés 80 µL du réactif R1 constitué de l'immunoglobuline de lapin et un tampon Tris à pH 7,5. A ce mélange est ensuite ajouté 80 µL de R3 contenant une matrice de particules de latex recouvertes d'anticorps de lapin anti-ferritine humaine. Le précipité ainsi formé est mesuré par turbidimétrie au photomètre à 700 nm contre un blanc (**Heidelberger et Kendall, 1935**).

• Transferrine

- Principe de dosage de la transferrine

La transferrine humaine forme un précipité avec un antisérum spécifique. Le précipité obtenu est mesuré par turbidimétrie.

- Méthode de dosage de la transferrine

Le dosage de la transferrine est effectué avec 12,5 µL de sérum auxquels sont ajoutés 140 µL de réactif R1 contenant un mélange tampon phosphate 55 mmol/L à pH 7,2; du NaCl 25 mmol/L et du polyéthylène glycol 5 %. A cet ensemble est ajouté R2 constitué d'un antisérum contenant des anticorps anti-transferrine humaine et du NaCl 100 mmol/L. La lecture de la turbidité est réalisée à 800 nm contre un blanc (**Dubois *et al.*, 1988**).

Les absorbances étant proportionnelles aux concentrations de ferritine et de transferrine dans le sérum, elles sont directement converties en concentration à partir des courbes d'étalonnage intégrées dans l'automate.

La capacité totale de fixation de la transferrine (CTF) et le coefficient de saturation (CS) de la transferrine sont calculés partir des concentrations de transferrine et du fer sérique par les formules suivantes (**Wanger, 2000**):

- CTF ($\mu\text{mol/L}$) = transferrine (g/L) x 25
- CS (%) = (fer sérique ($\mu\text{mol/L}$) / CTF ($\mu\text{mol/L}$)) x 100.

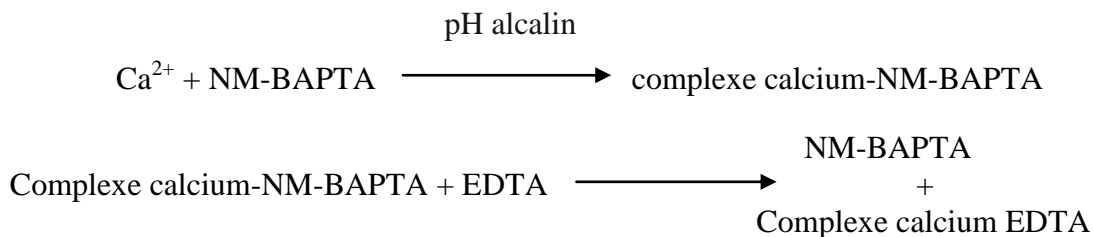
Ces différents marqueurs biochimiques du bilan ferrique fournissent des informations précises sur l'origine de l'anémie.

➤ **Bilan phosphocalcique**

• **Calcium**

- **Principe de dosage du calcium**

Le dosage du calcium est un dosage colorimétrique. Il est basé sur le fait que les ions calcium réagissent avec le 5-nitro-5'-méthyl- BAPTA (NMBAPTA) en milieu alcalin pour former un complexe. Lequel complexe réagit dans une seconde étape avec l'EDTA pour donner un chromophore.



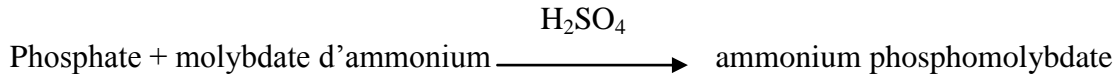
- **Méthode de dosage**

Le dosage du calcium a été effectué avec la méthode de **Endres et Rude (2006)**. Elle consiste à ajouter à 3 μL de sérum, 20 μL de R1 dilué dans 160 μL d'eau déionisée. Le réactif R1 a été préparé à partir d'un mélange de l'acide cyclohexylamino-3-hydroxy-2-propanesulfonique-1 (CAPSO) 557 mmol/L; NM-BAPTA 2 mmol/L, pH 10,0 et un agent tensioactif non réactif. A cet ensemble est ensuite ajouté R2 contenant EDTA 7,5 mmol/L, pH 7,3 et un agent tensioactif non réactif. L'intensité de la coloration du complexe calcium-EDTA développée est directement proportionnelle à la concentration en calcium et mesurée par photométrie à 376 nm contre un blanc.

- **Phosphore**

- **Principe du dosage du phosphore**

En présence d'acide sulfurique, le phosphate inorganique réagit avec le molybdate d'ammonium pour former du phosphomolybdate $(\text{NH}_4)_3[\text{PO}_4(\text{MoO}_3)_{12}]$ détectable à l'UV.



- **Méthode de dosage du phosphore**

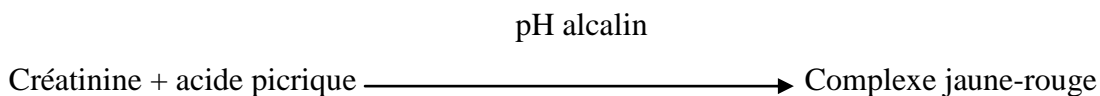
A un volume de 2,5 μL de sérum sont ajoutés 90 μL d'acide sulfurique 0,36 mol/L diluée dans 28 μL d'eau déionisée. A ce mélange sont ajoutés 38 μL de R2 (Molybdate d'ammonium 3,5 mmol/L; acide sulfurique 0,36 mol/L; cholate de sodium 150 mmol/L). La concentration en phosphomolybdate formé est directement proportionnelle à la concentration en phosphate inorganique et est mesurée par photométrie à 700 nm contre un blanc (**Henry, 1974**).

- **Créatinine**

- **Principe de dosage**

Dans une solution alcaline, la créatinine réagit avec le picrate pour former un complexe jaune-rouge dont l'intensité est directement proportionnelle à la concentration de créatinine dans l'échantillon.

Les échantillons de sérum et de plasma contiennent des protéines qui réagissent de manière non spécifique dans la réaction de Jaffé. Ainsi pour que des résultats corrects soient obtenus, une correction est effectuée automatiquement par l'analyseur par soustraction automatique de 18 $\mu\text{mol/L}$ (0,2 mg/dL) sur les valeurs obtenues.



- **Méthode de dosage**

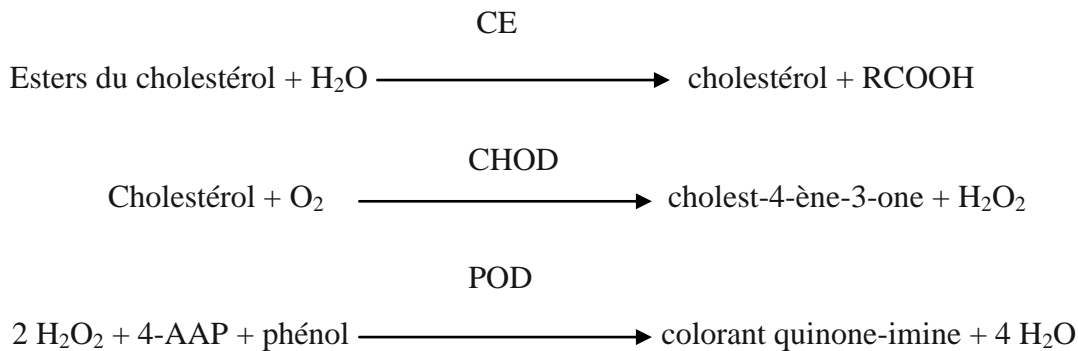
A 10 μL de sérum dilué dans 20 μL d'eau déionisée sont ajoutés 13 μL de Tampon alcalin (R1) dilué dans 71 μL d'eau déionisée et 13 μL d'acide picrique également dilué dans 20 μL d'eau déionisée. L'absorbance de la coloration jaune-rouge est lue au photomètre à 512 nm selon la méthode de **Jaffe (1886)** décrite par **Ng et Blass (1986)**.

- **Bilan lipidique**

- **Cholestérol total**

- **Principe du dosage**

Sous l'action de la cholestérol-estérase (CE), les esters du cholestérol sont scindés en cholestérol libre et en acides gras. Dans une réaction ultérieure, catalysée par la cholestérol oxydase, le cholestérol est transformé, en présence d'oxygène, en cholest-4-ène-3-one avec formation d'eau oxygénée. L'eau oxygénée formée réagit avec le phénol et l' amino-4-phénazone en présence de peroxydase pour donner un dérivé coloré rouge (quinone-imine) dont l'intensité de la coloration est directement proportionnelle à la concentration de cholestérol.



- Méthode de dosage

A un volume de 2 μL de sérum ont été ajouté 140 μL du réactif R dilué au 1/3 (v/v) dans de l'eau déionisée. Le réactif R est un mélange constitué de Tampon PIPES, 225 mmol/L à pH 6,8; Mg^{2+} 10 mmol/L; cholate de sodium 0,6 mmol/L; amino-4 phénazone, 0,45 mmol/L; phénol, 12,6 mmol/L; monoéther d'alcool gras de polyéthylèneglycol, 3 %; cholestérol estérase (de *Pseudomonas*), 1,5 U/mL; cholestérol-oxydase (de *E. coli*), 0,45 UI/mL et de peroxydase (de raifort), 0,75 U/mL.

Ce mélange aboutit à un dérivé coloré. L'intensité du dérivé coloré est directement proportionnelle à la concentration de cholestérol. Elle est déterminée en mesurant l'augmentation de l'absorbance par photométrie à 505 nm (Abell *et al.*, 1958; Allain *et al.*, 1974).

• HDL-Cholestérol

- Principe de dosage

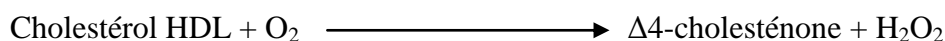
En présence d'ions magnésium, le sulfate de dextran forme de manière sélective des complexes hydrosolubles avec les LDL, les VLDL et les chylomicrons; ces complexes sont résistants vis-à-vis d'enzymes modifiées par le PEG. La concentration en cholestérol des HDL est déterminée par voie enzymatique à l'aide de cholestérol estérase et de cholestérol oxydase modifiées par du PEG (40 % environ des groupes aminés de ces enzymes sont couplés à du PEG). Sous l'action de la cholestérol estérase, les esters du cholestérol sont scindés en cholestérol libre et en acides gras.

PEG-cholestérol estérase

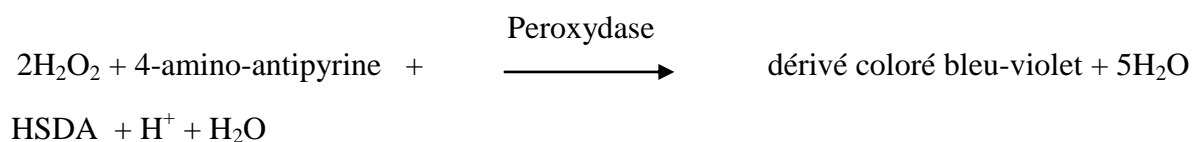


Dans une seconde réaction catalysée par la cholestérol oxydase modifiée par le PEG, le cholestérol est transformé, en présence d'oxygène, en Δ 4-cholesténone avec formation d'eau oxygénée.

PEG-cholestérol oxydase



En présence de peroxydase, l'eau oxygénée formée réagit avec la 4-amino-antipyrine et le sodium N-(hydroxy-2 sulfo-3 propyl) diméthoxy-3,5-aniline (HSDA) avec formation d'un dérivé coloré bleu-violet.



- Méthode du dosage

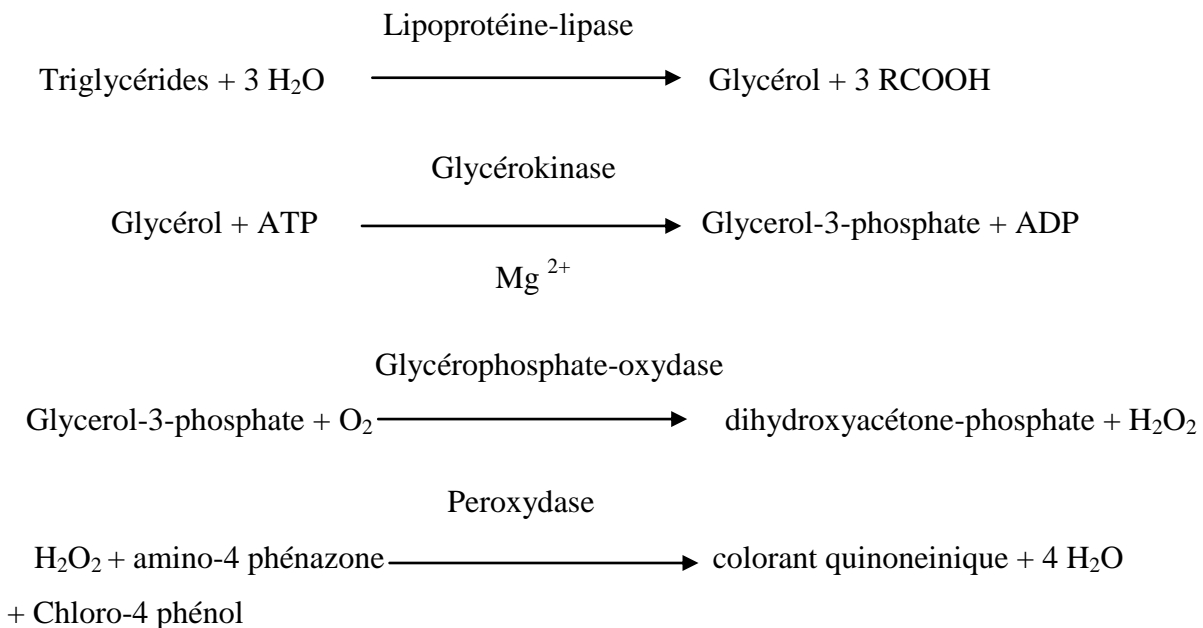
Selon les méthodes de **Sugiuchi *et al.* (1995)**, **Matsuzaki *et al.* (1996)**, à 2,5 μ L de sérum humain sont ajoutés 150 μ L de R1 (Tampon HEPES, 10,07 mmol/L; CHES 96,95 mmol/L, pH 7,4; sulfate de dextran 1,5 g/L; nitrate de magnésium hexahydrate 11,7 mmol/L; HSDA, 0,96 mmol/L; ascorbate-oxydase (d'Eupenicillium, recombinante), 50 μ kat/L et de peroxydase (de raifort) 167 μ kat/L) puis 50 μ L de R2 (Tampon HEPES: 10,07 mmol/L, pH 7,0; PEG-cholestérol estérase (de Pseudomonas), 3,33 μ kat/L; PEG-cholestérol oxydase (de Streptomyces recombinante), 127 μ kat/L; peroxydase (de raifort), 333 μ kat/L et 4-amino-antipyrine, 2,46 mmol/L) pour donner un dérivé coloré bleu-violet. L'intensité de la coloration développée est directement proportionnelle à la concentration en cholestérol et mesurée par photométrie à 505 nm.

• Triglycérides (TRIGLY)

- Principe du dosage

Le test des triglycérides est une méthode enzymatique. Les triglycérides sont hydrolysés par la lipoprotéine-lipase (LPL) en glycérol et en acides gras. Le glycérol est alors phosphorylé en glycérol-3-phosphate par ATP lors d'une réaction catalysée par la glycerolkinase. L'oxydation du glycérol-3-phosphate est catalysée par la glycérol-phosphate-oxydase pour former du dihydroxyacétone-phosphate et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). En présence de peroxydase (POD), le peroxyde d'hydrogène formé entraîne le couplage oxydatif

du 4-chlorophénol et de la 4-aminophénazole pour former un colorant quinoneinique rouge dont l'intensité est directement proportionnelle à la concentration en triglycérides.



- Méthode du dosage

A 2 µL de sérum sont ajouté un mélange de 148 µL contenant 120 µL de R et 28 µL d'eau déionisée. Le reactif R est constitué à partir de tampon PIPES, 50 mmol/L à pH 6,8; Mg²⁺, 40 mmol/L; cholate de sodium, 0,20 mmol/L; ATP, 1,4 mmol/L; amino-4-phénazone, 0,13 mmol/L; chloro-4-phénol, 4,7 mmol/L; lipoprotéine-lipase (*Pseudomonas*), 83 µkat/L; glycérokinase (*Bacillus stearothermophilus*), 3 µkat/L; glycérophosphateoxydase (*E. coli*), 41 µkat/L; peroxydase (raifort), 1,6 µkat/L. L'intensité de la coloration rouge est proportionnelle à la concentration en triglycérides et mesurée au photomètre à 512 nm (**Fossati et Principe, 1982 ; McGowan *et al.*, 1983**).

A partir de ces différents paramètres lipidiques, les valeurs du LDL-Cholestérol et du VLDL-Cholestérol ont été déterminées par la formule de **Friedewald *et al.*, 1972** :

$$\text{VLDL (g/L)} = \text{TRIGLYCERIDES}/5$$

$$\text{LDL (g/L)} = \text{Cholestérol Total} - \text{HDL} - \text{VLDL}$$

Cette formule est valable à condition que **TRIGLYCERIDES** ≤ 4 g/L.

2.2.3- Méthode d'évaluation des teneurs en oligoéléments

L'évaluation des teneurs en oligoéléments tels que le fer, le cuivre et le zinc a été réalisé par spectrométrie d'absorption atomique de marque Varian Spectr AA - 20 Victoria[®], Australlia grâce à la méthode de **Pinta, 1980**.

2.2.3.1- Principe de la spectrométrie d'absorption atomique à flamme/aire acétylène

L'absorption atomique est un processus qui se produit lorsqu'un atome appartenant à l'état fondamental passe à l'état excité par l'absorption d'une énergie, sous la forme d'un rayonnement électromagnétique, qui correspond à une longueur d'onde spécifique. Le principe est basé sur la propriété d'absorption d'un rayonnement lumineux par un composé en fonction de sa concentration dans la solution à analyser. Pour se faire, l'élément à doser dans l'échantillon est préalablement dissocié de ses composés chimiques et porté à l'état non excité et non ionisé dit « état fondamental », cette dissociation thermique est obtenue par la combustion de l'échantillon dans une flamme. Une fois dissocié, cet élément est alors capable d'absorber des radiations de longueurs d'onde bien définies, qu'il est capable d'émettre (figure 14 et Photographie 3).

La quantité d'énergie absorbée, à partir d'un faisceau de rayonnement pour la longueur d'onde d'une raie de résonance, augmentera avec l'augmentation du nombre d'atomes de l'élément sélectionné dans la chambre d'absorption. La relation entre la quantité de lumière absorbée et la concentration de l'analyte présent dans l'échantillon peut être déterminée par la loi de Beer Lambert:

$$A = abc.$$

Avec : **A** = Absorbance, **a** = absorption spécifique, **b** = trajet optique et **c** = concentration du composé (**Lamand M., 1974**)

La lecture de l'instrument peut être calibrée de façon à afficher directement les concentrations de l'échantillon (**Pradyt, 2004**).

2.2.3.2- Conditions spectrales

Les concentrations en fer, cuivre et zinc ont été évaluées à l'aide d'un spectromètre d'absorption atomique (SAA) constitué de lampe à cathodes creuses de fer, de cuivre et de zinc, d'un atomiseur à flamme aire/acétylène oxydante avec des longueurs d'ondes fixées à 248,3 nm, 324,75 nm et 213,8 nm respectivement pour le fer, le cuivre et le zinc. Les exécutions spectrométriques ont été réalisées en 3 reliquats (**Kouassi et al., 2013**).

2.2.3.3- Calibration des standards de fer, cuivre et zinc

La calibration a été réalisée selon un protocole connu et validé par le Laboratoire des Procédés Industriels de Synthèse, de l'Environnement et des Energies Nouvelles (LAPISEN) de l'Institut Polytechnique Houphouët-Boigny de Yamoussoukro. Ce protocole consiste à préparer à partir d'une solution mère multi standard de 1000 ppm, une gamme de concentrations pour chaque ion métallique (0,025 ; 0,5 ; 1,0 ; 1,5 et 2 ppm). Les droites d'étalonnage de chacun des ions (Fe, Cu et Zn) sont tracées, les équations des droites et les

coefficients de régression sont déterminés et toutes ces données sont automatiquement intégrées dans l'appareil à travers le système d'intégration des données.

2.2.3.4- Analyse quantitative

L'analyse quantitative des échantillons sériques a été réalisée après déprotéinisation de 500 µL de sérum par l'acide chloridrique 2 M selon la méthode de **Banjoko et al. (2012)**. Les résultats ont été rendus directement en concentrations par l'automate. Les pourcentages de réduction des oligoéléments chez les tuberculeux multirésistants par rapport aux témoins ont été évalués par la formule suivante :

$$\text{Réduction (\%)} = \frac{\text{Moyenne de témoins} - \text{Moyenne de TBMR}}{\text{Moyenne de témoins}} \times 100$$

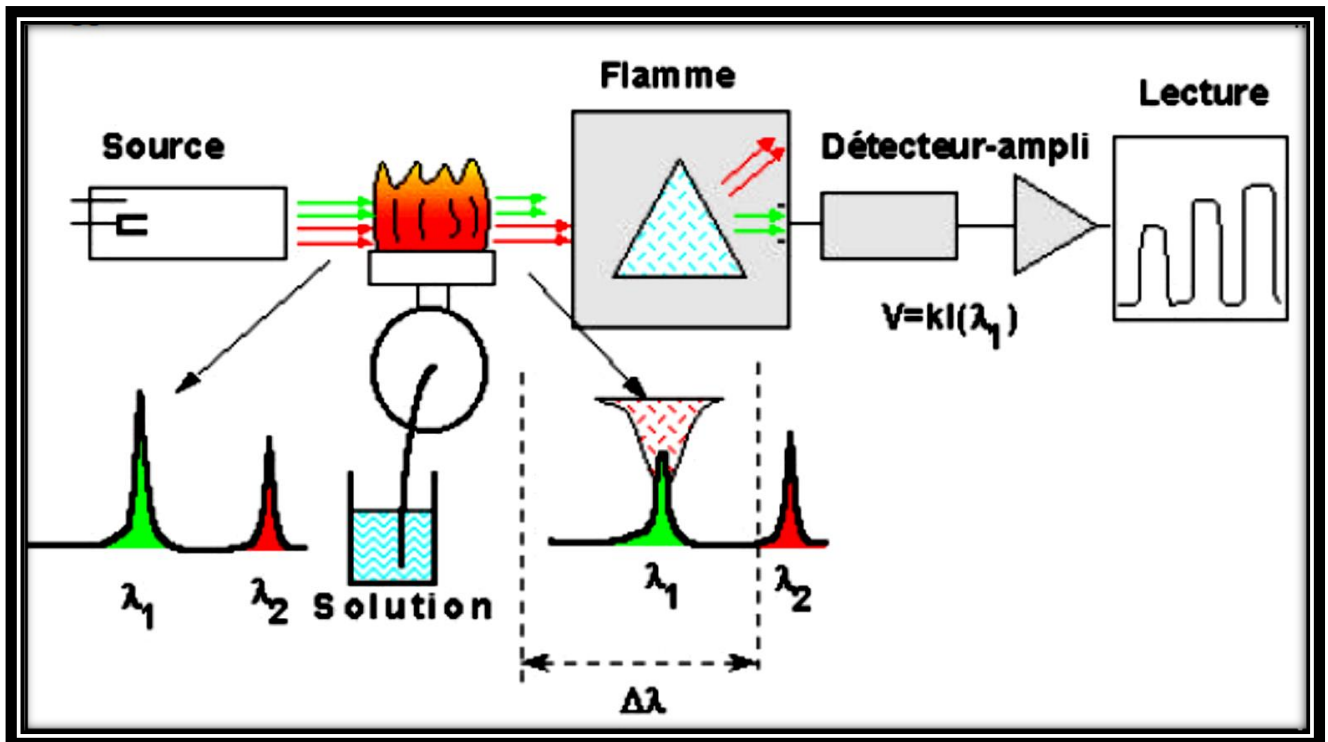


Figure 12 : Principe de fonctionnement du spectrophotomètre d'absorption atomique à flamme
 (Walsh *et al.*, 1955 ; Russell *et al.*, 1957)

2.2.4- Méthode d'évaluation des concentrations en vitamines liposolubles

Les concentrations sériques de vitamines A (Rétinol), D (Cholécalciférol) et E (α -Tocophérol) ont été déterminées à l'unité de Recherche Identification et Evaluation Moléculaire (RIEM) du Département de Biochimie Médicale et Fondamentale à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (IPCI). La quantification a été réalisée par chromatographie liquide à haute performance (HPLC en Anglais), une méthode quantitative basée sur le fait que l'aire des pics chromatographiques est proportionnelle à la concentration des vitamines présentes dans le milieu. La détection se fait à l'aide d'un détecteur UV-Visible qui permet de détecter les pics correspondants aux vitamines A, D et E à une longueur d'onde bien spécifique.

2.2.4.1- Principe de la chromatographie liquide à haute performance

L'échantillon à analyser est poussé par un liquide (appelé phase mobile) dans une colonne remplie d'une phase stationnaire de fine granulométrie (les « grains » sont de très petite taille). Le débit d'écoulement de la phase mobile permet la séparation des éléments présents dans l'échantillon à analyser. Le débit est élevé ce qui entraîne une augmentation de la pression dans le système et une réduction du temps nécessaire pour séparer les composants le long de la phase stationnaire. La fine granulométrie de la phase stationnaire permet une meilleure séparation des composants qui sont représentés par des pics appelés chromatogramme. En effet, pour un même volume de phase stationnaire, la surface d'échange augmente si les « grains » qui la composent sont de diamètre plus petit. Un détecteur UV-visible permet de détecter les pics obtenus, bien séparés, donc bien différencier. Le seuil de détection est également plus bas ce qui permet la détection de faibles quantités de l'analyte présent dans le milieu. Un système d'intégration et de calcul permet de déterminer les concentrations des éléments contenus dans l'échantillon à partir des surfaces des pics. La combinaison de ces attributs: rapidité et résolution élevées conduit à l'appellation « haute performance » (**Rougereau, 1984**) (Figure 16 et Photographie 4)

2.2.4.2- Conditions chromatographiques

L'analyse des vitamines A, D et E a été réalisée à l'aide d'une chaîne HPLC de type Waters[®], USA, en mode isocratique. Une colonne en phase reverse C18 de type Waters SPHERISORB[®] ODS 2, de diamètre 4,0 mm et 25 mm de long avec une taille des particules de 5 μ m a été utilisée comme phase stationnaire. Elle est précédée d'une précolonne adaptée aux colonnes C18. La phase mobile est constituée d'un mélange Méthanol/Eau (97/3 ; v/v) à un débit de 1 mL/mn. Le volume d'injection a été fixé à 20 μ L. La détection a été effectuée à l'UV-Visible à la longueur d'onde de 280 nm et l'analyse des données chromatographiques a

été faite avec le logiciel Breeze 2. Contrairement aux autres méthodes déjà validées, cette dernière a subi une procédure de validation avant l'analyse quantitative des vitamines.

2.2.4.3- Validation de la méthode analytique

Plusieurs essais ont été réalisés pour la validation de la méthode de dosage des vitamines liposolubles dans le sérum humain. Il s'agit d'une nouvelle méthode de dosage simultané des vitamines A, D et E à partir d'une même longueur d'onde ($\lambda = 180$ nm). Cette méthode a été validée en tenant compte du matériel disponible au laboratoire et selon les critères mentionnés dans le guide de validation du Centre d'Expertise en Analyse Environnementale du Québec (**Anonyme 3, 2015**). Ces critères sont la linéarité, la fidélité, l'exactitude, les limites de détection et de quantification de la méthode.

➤ Etude de la linéarité

L'étude de la linéarité a été réalisée en préparant des gammes de concentrations avec du méthanol à partir des solutions mères à 1 g/L des standards de vitamines A, D et E. Au total sept 7 concentrations de chaque vitamine ont été préparées par double dilution : 1 mg/L ; 0,5 mg/L ; 0,25 mg/L ; 0,125 mg/L ; 0,062 mg/L ; 0,031 ; 0,015 mg/L pour les vitamines A et D contre 20 mg/L ; 10 mg/L ; 5 mg/L ; 2,5 mg/L ; 1,25 mg/L ; 0,625 mg/L ; 0,31 mg/L pour la vitamine E. Le domaine de linéarité a été ensuite défini en portant les valeurs des aires obtenues en fonction des concentrations des solutions d'étalonnage. Les droites d'équation de type $y = ax + b$ ont été tracées et les coefficients de régression r^2 (normalement supérieur à 0,98) ont été définis (**James et al., 2011**).

Avec y = valeurs des aires des pics, x = concentration de la solution étalon correspondante (mg/L), a = pente de la droite, b = l'ordonnée à l'origine a été déterminée.

L'étude de la linéarité permet d'établir une bonne proportionnalité entre les densités optiques (DO) et les concentrations des différentes vitamines

➤ Etude de la fidélité de la méthode

La fidélité à un niveau donné correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats obtenus en appliquant le procédé expérimental à plusieurs reprises dans des conditions déterminées. Selon les conditions d'exécution de l'essai, cette caractéristique s'exprime sous forme de répétabilité ou de reproductibilité pour une méthode.

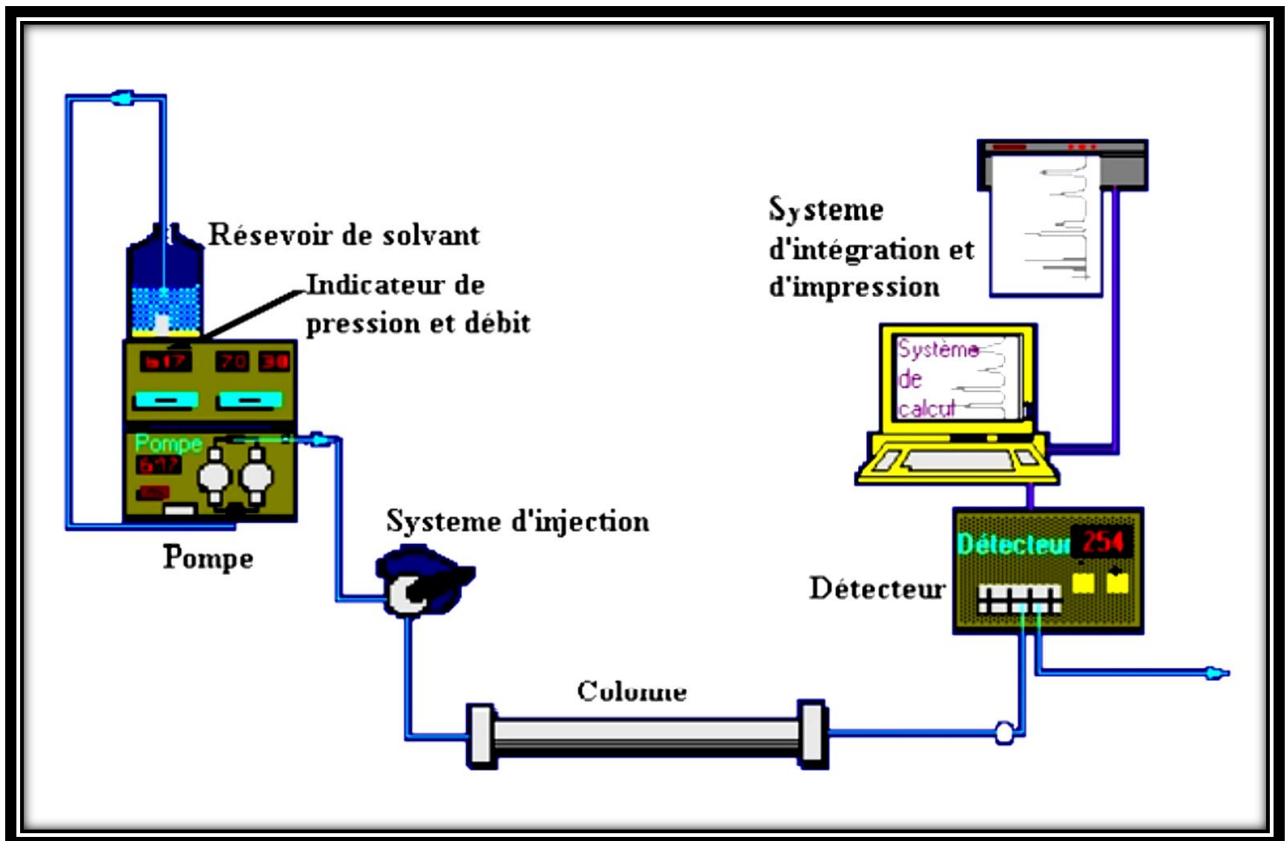


Figure 13 : Principe de fonctionnement d'une chaîne de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) (Rougereau, 1984)

- **La répétabilité**

La répétabilité à un niveau donné correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats individuels successifs obtenus sur le même échantillon soumis à l'essai dans le même laboratoire et dans les conditions suivantes : même analyste, même appareil, même jour.

Cette étude a consisté à préparer à partir de chaque standard de vitamines une gamme de trois (3) concentrations avec du méthanol (1 mg/L ; 0,5 mg/L ; 0,1 mg/L pour les vitamines A et D et 20 mg/L ; 10 mg/L ; 5 mg/L pour la vitamine E). Chacune de ces concentrations est injectée à 6 reprises dans un court intervalle de temps. Les surfaces obtenues ont été rapportées aux courbes de régressions de chaque standard pour déterminer les concentrations équivalentes. La moyenne des concentrations et le coefficient de répétabilité ont été calculés pour chaque standard. Ensuite, en tenant compte des surfaces obtenues à partir des concentrations injectées, un mix à différentes concentrations de standards de vitamines et le standard interne (rétinyl acétate) a été constitué. Les concentrations finales de chaque standard dans ce mix est de 0,5 mg/L pour les vitamines A, D et le rétinyl acétate et de 5 mg/L pour la vitamine E dans un volume total de 4 mL. Un volume de 20 µL de ce mix a été injecté à six reprises dans le chromatographe, les surfaces obtenues pour chacun des standards ont été rapportées au niveau des différentes droites de régressions et la moyenne des concentrations accompagnée du coefficient de répétabilité pour chaque vitamine ont été calculés.

- **La reproductibilité**

La reproductibilité à un niveau donné correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats individuels obtenus sur le même échantillon soumis à l'essai dans le même laboratoire et dont au moins l'un des éléments suivants est différent : l'analyste, l'appareil, le jour.

L'étude de la reproductibilité a consisté à reprendre les mêmes expériences de la répétabilité pendant six jours avec deux différents opérateurs en raison de trois jours par opérateur. Chaque jour est une expérience indépendante des autres. Les moyennes des concentrations et les coefficients de variations sont déterminés pour chaque jour et l'ensemble des coefficients de variations obtenus sur les six jours sont comparés.

➤ **Etude de l'exactitude**

Elle consiste à déterminer le taux de recouvrement ou de récupération de la méthode. Il permet d'identifier, pour un échantillon donné ou un type de matrice donné et à un niveau de concentration donné, la présence d'interférence potentielle lors du processus analytique. Le taux de récupération correspond à la différence (en pourcentage) entre la concentration mesurée d'un échantillon fortifié et la concentration mesurée du même échantillon non fortifié, divisée par la concentration de la substance ajoutée.

Pour ce faire, trois échantillons de sérum ont été exposés à la lumière vive du soleil pendant deux heures afin de détruire les vitamines éventuellement présentes dans ces différents sérums. Ces échantillons ont été ensuite enrichis avec un mix homogène (sans le standard interne) à des concentrations connues de vitamines A, D et E. Ces sérums dits surchargés ont été traités en suivant la procédure d'extraction des vitamines liposolubles à partir de sérum, puis analysés. Le taux de récupération de chaque vitamine est déterminé à partir des concentrations initiales des vitamines et celles obtenues avec les différentes surfaces sur le chromatogramme à partir de la formule suivante:

$$\text{Taux de récupération (\%)} = \frac{\text{CV SV Ech S}}{\text{CV SV Mix}} \times 100$$

CV SV Ech S : Concentrations obtenues à partir des surfaces des vitamines sur le chromatogramme après injection de mix de vitamines et le rétinyl acétate.

CV SV Mix : Concentrations obtenues à partir des surfaces des vitamines sur le chromatogramme après injection de l'extrait de l'échantillon surchargé.

➤ **Limites de quantification et de détection**

La limite de quantification d'une méthode est la concentration minimale qui peut être quantifiée à l'aide d'une méthode d'analyse avec une fiabilité définie et la limite de détection d'une méthode est la plus basse concentration pour un composé analysé dans une matrice réelle qui produit un signal détectable avec une fiabilité définie statistiquement différent de celui produit par un « blanc » dans les mêmes conditions.

Elles sont déterminées en faisant dix injections d'une concentration de standard de vitamine comprise entre cinq (5) fois et sept (7) fois la limite de détection obtenue à partir de la littérature. Les concentrations équivalentes aux surfaces des dix injections sont obtenues à partir des droites d'étalonnage et les moyennes de ces surfaces et celles des écart-types sont déterminées. Les limites de détection et de quantification de chaque vitamine sont calculées en multipliant les écart-types respectivement par 3 et par 10.

2.2.4.4- Analyse quantitative

L'analyse quantitative des vitamines A, D et E a été réalisée après extraction préalable de la fraction lipidique du sérum selon la méthode utilisée par **Boyvin et al. (2013)**.

➤ **Principe de la méthode d'extraction**

Les vitamines liposolubles sont extraites à partir du sérum par précipitation des protéines sériques à l'éthanol et extraction de la fraction lipidique du sérum par l'hexane. Un

étalon interne est ajouté au préalable comme standard interne des vitamines. Le standard interne joue le rôle de contrôle de la procédure d'extraction et permet également de préserver l'intégrité des vitamines dans le milieu.

➤ **Méthode d'extraction**

Dans un tube à hémolyse contenant 300 µL de sérum, sont ajoutés successivement 300 µL de rétinyl acétate (standard interne) préparée à 1 mg/L et 300 µL d'éthanol puis le mélange est porté au vortex pendant 20 secondes. Après homogénéisation, 1200 µL d'hexane (solvant d'extraction) sont ajoutés au mélange et l'ensemble est à nouveau porté au vortex deux fois de suite pendant 30 secondes puis centrifugé à 3500 tours/minute pendant 15 minutes. Ensuite, 900 µL du surnageant (phase hexanique) sont récupérés et passés à l'azote gazeux pour évaporer le solvant. Le résidu dissout dans 300 µL de méthanol (solvant d'élution) par agitation douce, constitue l'extrait utilisé pour l'analyse quantitative des vitamines.

➤ **Analyse quantitative proprement dite**

L'analyse quantitative est réalisée par injection automatique de 20 µL de l'extrait lipidique dans le système chromatographique. Les pics correspondant aux différentes vitamines sont présentés sur le chromatogramme affiché par l'intégrateur enregistreur. Les concentrations des vitamines sont déterminées à partir des surfaces des pics par la formule suivante :

$$C = \frac{SV \text{ Ech}}{SRA \text{ Ech}} \times K \quad \text{avec} \quad K = \frac{CV \text{ GE} \times SRA \text{ GE}}{SV \text{ GE}}$$

SV Ech : Surface du pic de la vitamine dans l'échantillon de sérum,

CV GE : Concentration déterminée à partir de la gamme d'étalon pour chaque vitamine,

SRA GE : Surface du pic de rétinyl acétate correspondant à 1 mg/L obtenu à partir de la gamme d'étalon,

SV GE : Surface du pic correspondant à la concentration de vitamine choisie à partir de la gamme d'étalon,

SRA Ech : Surface du pic de rétinyl acétate dans l'échantillon de sérum correspondant à une concentration de 1 mg/L.

Les pourcentages de réduction des vitamines sont calculés par la formule ci-dessous :

$$\text{Réduction (\%)} = \frac{\text{Moyenne de témoins} - \text{Moyenne de TBMR}}{\text{Moyenne de témoins}} \times 100$$

2.2.5- Analyse statistique

Les valeurs moyennes accompagnées de l'erreur standard sur la moyenne (Moyenne \pm SEM) des données ont été réalisées grâce au logiciel Graph Pad Prism 5.0 (Microsoft, USA). L'analyse statistique des résultats a été effectuée en utilisant l'analyse des variances (ANOVA) suivie du test de comparaison multiple de Tukey. La différence est significative lorsque $p\text{-value} < 0,05$.

III-RESULTATS ET DISCUSSION

3.1- Résultats

3.1.1- Marqueurs hématologiques et biochimiques en rapport avec le statut micronutritionnel

3.1.1.1- Paramètres hématologiques

Les résultats des marqueurs hématologiques ont montré chez les TB-MDRs une baisse significative des paramètres hématologiques du métabolisme du fer (Hb, VGM et TCMH) au bilan initial par rapport aux témoins non tuberculeux $P < 0,05$ (Tableau I). Seul le taux d'hémoglobine (Hb) a connu une hausse significative chez les femmes au cours du traitement antituberculeux de seconde ligne en comparaison au bilan initial (M_0) $P < 0,05$ (Tableau II). Aussi, l'analyse comparative de ces marqueurs n'a montré aucune différence significative entre les sexes (Tableau III). Ainsi, au bilan initial (M_0), le taux d'hémoglobine (Hb) obtenu a été de $12 \pm 0,23$ g/dL chez les hommes et de $10 \pm 0,27$ g/dL chez les femmes. Ensuite à 3 et 6 mois de traitement, il a été de $12 \pm 0,28$ g/dL chez les hommes ; de $11 \pm 0,33$ g/dL chez les femmes à trois mois (M_3) et de $12 \pm 0,21$ g/dL chez les hommes ; $11 \pm 0,25$ g/dL chez les femmes à 6 mois (M_6) contre $14 \pm 1,02$ g/dL pour les témoins hommes ; $13 \pm 0,78$ g/dL pour les témoins femmes.

Concernant le volume globulaire moyen (VGM), les résultats ont été au bilan initial (M_0) de $74 \pm 1,54$ ft chez les hommes et de $73 \pm 0,95$ ft chez les femmes. Ensuite à 3 et 6 mois de traitement, ils ont été de $77 \pm 0,98$ ft chez les hommes ; de $76 \pm 1,21$ ft chez les femmes à trois mois (M_3) et de $79 \pm 1,32$ ft chez les hommes ; $79 \pm 1,09$ ft chez les femmes à 6 mois (M_6) contre $88 \pm 1,43$, $84 \pm 1,07$ ft pour les témoins hommes et femmes respectivement.

Pour ce qui est des concentrations corpusculaires moyennes en hémoglobine (CCMH), les résultats ont donné au bilan initial (M_0) $32 \pm 0,19$ g/dL chez les hommes et $31 \pm 0,22$ g/dL chez les femmes. Ensuite à 3 et 6 mois de traitement, ils ont été de $33 \pm 0,43$ g/dL chez les hommes, $32 \pm 0,27$ g/dL chez les femmes à trois mois (M_3) et de $33 \pm 0,34$ g/dL chez les hommes, $32 \pm 0,31$ g/dL chez les femmes à 6 mois (M_6) contre $34 \pm 0,69$ g/dL et $34 \pm 0,79$ g/dL pour les témoins hommes et femmes respectivement.

Enfin, pour les teneurs corpusculaires moyennes en hémoglobine (TCMH), les résultats ont été au bilan initial (M_0) de $25 \pm 0,31$ pg/GR chez les hommes et de $24 \pm 0,39$ pg/GR chez les femmes. Ensuite à 3 et 6 mois de traitement, ils ont été de $25,32 \pm 0,56$ pg/GR chez les hommes, $24 \pm 0,48$ pg/GR chez les femmes à trois mois (M_3) et de $26 \pm 0,47$ pg/GR chez les hommes, $25 \pm 0,28$ pg/GR chez les femmes à 6 mois (M_6) contre $28 \pm 1,03$ pg/GR et $27 \pm 1,57$ pg/GR pour les témoins hommes femmes respectivement.

Tableau I : Concentrations moyennes des marqueurs hématologiques chez les patients TB-MDRs et les témoins non tuberculeux

		TEMOINS	TB-MDRs M ₀	P	TB-MDRs M ₃	P	TB-MDRs M ₆	P
<u>FEMMES</u>	<u>Hb</u> (Réf.: 12,5-15,5 g/dL)	13 ± 0,78	10 ± 0,27*	0,003	11 ± 0,33*	0,03	11 ± 0,25*	0,03
	<u>VGM</u> (Réf.: 80- 95 ft)	84 ± 1,07	73 ± 0,95*	0,002	76 ± 1,21*	0,02	78 ± 1,09*	0,02
	<u>CCMH</u> (Réf.: 32- 36 g/dL)	34 ± 0,79	31 ± 0,22*	0,48	32 ± 0,27	0,48	32 ± 0,31	0,48
	<u>TCMH</u> (Réf.: 28-32 pg/GR)	28 ± 1,57	24 ± 0,39*	0,01	25 ± 0,48*	0,001	25 ± 0,28*	0,001
<u>HOMMES</u>	<u>Hb</u> (Réf.: 14-17 g/dL)	14 ± 1,02	12 ± 0,23*	0,003	12 ± 0,28*	0,003	12 ± 0,21*	0,003
	<u>VGM</u> (Réf.: 80- 95 ft)	88 ± 1,43	74 ± 1,54*	0,02	77 ± 0,98*	0,02	79 ± 1,32	0,20
	<u>CCMH</u> (Réf.: 32- 36 g/dL)	34 ± 0,69	32 ± 0,19	0,48	33 ± 0,43	0,48	33 ± 0,34	0,48
	<u>TCMH</u> (Réf.: 28-32 pg/GR)	29 ± 1,03	25 ± 0,31*	0,001	25 ± 0,56*	0,001	26 ± 0,47*	0,01

Valeurs des marqueurs hématologiques du métabolisme du fer. Hb : Taux en Hémoglobine. VGM : Volume globulaire moyen. CCMH : Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine. TCMH : Teneurs corpusculaires moyennes en hémoglobine

Réf. : Valeurs de Références

M₀ : Bilan initial.

M₃ : Bilan de suivi à 3 mois de traitement.

M₆ : Bilan de suivi à 6 mois de traitement.

* : Différence significative entre TB-MDR et les témoins non tuberculeux, P < 0,05.

Tableau II : Valeurs comparatives des marqueurs hématologiques selon le stade de suivi des TB-MDRs

		TB-MDRs M ₀	P	TB-MDRs M ₃	P	TB-MDRs M ₆	P
<u>FEMMES</u>	Hb	10 ± 0,27	0,003	11 ± 0,33*	0,03	11 ± 0,25*	0,03
	VGM	73 ± 0,95	0,20	76 ± 1,21	0,20	78 ± 1,09	0,20
	CCMH	31 ± 0,22	0,48	32 ± 0,27	0,48	32 ± 0,31	0,48
	TCMH	24 ± 0,39	0,10	25 ± 0,48	0,10	25 ± 0,28	0,10
<u>HOMMES</u>	Hb	12 ± 0,23	0,30	12 ± 0,28	0,30	12 ± 0,21	0,30
	VGM	74 ± 1,54	0,20	77 ± 0,98	0,20	79 ± 1,32	0,20
	CCMH	32 ± 0,19	0,48	33 ± 0,43	0,48	33 ± 0,34	0,48
	TCMH	25 ± 0,31	0,10	25 ± 0,56	0,10	26 ± 0,47	0,10

Valeurs des marqueurs hématologiques du métabolisme du fer. Hb : Taux en Hémoglobine. VGM : Volume globulaire moyen. CCMH : Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine. TCMH : Teneurs corpusculaires moyennes en hémoglobine

Réf. : Valeurs de Références

M₀ : Bilan initial.

M₃ : Bilan de suivi à 3 mois de traitement.

M₆ : Bilan de suivi à 6 mois de traitement.

* : Différence significative entre les stades de suivi des malades TB-MDRs, P < 0,05.

Tableau III : Valeurs comparatives des marqueurs hématologiques du métabolisme du fer chez les TB-MDRs selon le sexe

	TB-MDRs M ₀			TB-MDRs M ₃			TB-MDRs M ₆		
	Hommes	femmes	P	Hommes	Femmes	P	Hommes	Femmes	P
Hb (g/dL)	12 ± 0,23	10 ± 0,27*	P = 0,0018	12 ± 0,28	11 ± 0,33*	P = 0,0084	12 ± 0,21	11 ± 0,25*	P = 0,003
VGM (ft)	74 ± 1,54	73 ± 0,95	P = 0,201	77 ± 0,98	76 ± 1,21	P = 0,241	79 ± 1,32	79 ± 1,09	P = 0,883
CCMH (g/dL)	32 ± 0,19	31 ± 0,22	P = 0,014	33 ± 0,43	32 ± 0,27	P = 0,423	33 ± 0,34	32 ± 0,31	P = 0,481
TCMH (pg/GR)	25 ± 0,31	24 ± 0,39	P = 0,149	25 ± 0,56	25 ± 0,48	P = 0,671	26 ± 0,47	25 ± 0,28	P = 0,101

Valeurs des marqueurs hématologiques du métabolisme du fer. Hb : Taux en Hémoglobine. VGM : Volume globulaire moyen. CCMH : Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine. TCMH : Teneurs corpusculaires moyennes en hémoglobine. *: Différence significative entre femmes et hommes, P < 0,05

3.1.1.2- Paramètres biochimiques

La calibration des paramètres biochimiques en rapport avec le métabolisme des micronutriments a montré une bonne linearité avec les coefficients de régression supérieurs à 0,98. Les courbes de régression de la ferritine et de la transferrine ont donné comme équations et coefficient de régression : $y = 0,901x + 8,68$, $r^2 = 0,999$ et $y = 1,018x + 0,004$, $r^2 = 0,999$ respectivement pour la ferritine et la transferrine (Annexe I).

Les équations des courbes de régression du calcium, du phosphore et de la créatinine, au niveau du bilan phosphocalcique ont été respectivement de $y = 0,3978 x + 0,237$; $y = 31,713 x + 0,062$ et $y = 0,117x - 0,02$. Les coefficients de régression ont été de $r^2 = 0,999$ pour les trois paramètres (annexe I).

Quant aux paramètres lipidiques, les équations des droites d'étalonnage et les coefficients de régressions du cholestérol total, du HDL-cholestérol et des triglycérides ont été respectivement de $y = 0,391 x + 0,001$; $r^2 = 0,999$, de $y = 0,387 x - 0,001$, $r^2 = 0,999$ et de $y = 0,886 x + 0,016$ avec $r^2 = 0,999$ (Annexes I).

Les résultats des contrôles qualités de ces différents paramètres biochimiques accompagnés des valeurs cibles et les intervalles de confiance des contrôles utilisés sont représentés dans les tableaux III, IV et V. Les valeurs de ces contrôles qualités comprises entre l'intervalle de confiance montrent la fiabilité des résultats obtenus.

Tableau IV : Valeurs des contrôles qualités de la ferritine et de la transferrine

	Ferritine sérique ($\mu\text{g/L}$)			Transferrine sérique (g/L)		
	Valeurs des contrôles	Valeurs cibles	Intervalle de confiance	Valeurs des contrôles	Valeurs cibles	Intervalle de confiance
PCCC1	98,7	94,3	83,9 – 104,7	1,93	1,97	1,85 – 2,09
PCCC2	70,76	69,9	62,2 – 77,6	3,26	3,27	3,07 – 3,47

Les valeurs des contrôles qualités de la ferritine et de la transferrine accompagnées des valeurs cibles et les intervalles de confiance fournis par le fabricant.

Le contrôle qualité est validé lorsque les valeurs des contrôles se retrouvent dans l'intervalle de confiance. PCCC : « PreciControl ClinChem Multi ».

1 : contrôle normal et 2 : contrôle pathologique.

Tableau V : Valeurs des contrôles qualités du calcium, du phosphore et de la créatinine

	Calcium sérique (mg/L)			Phosphore sérique (mg/L)			Créatinine sérique (mg/L)		
	Valeurs des contrôles	Valeurs cibles	Intervalle de confiance	Valeurs des contrôles	Valeurs cibles	Intervalle de confiance	Valeurs cibles	Intervalle de confiance	Valeurs des contrôles
PCCC1	89,2	89,4	85,8 – 93,0	38,0	38,1	36,2 – 40,0	89,2	89,4	85,8 – 93,0
PCCC2	135,5	136,0	131,0 – 141,0	65,0	64,2	61,0 – 67,4	135,5	136,0	131,0 – 141,0

Les valeurs des contrôles qualités du calcium, du phosphore et de la créatinine accompagnées des valeurs cibles et les intervalles de confiance fournis par le fabricant.

Le contrôle qualité est validé lorsque les valeurs des contrôles se retrouvent dans l'intervalle de confiance. PCCC : « PreciControl ClinChem Multi ».

1 : contrôle normal et 2 : contrôle pathologique.

Tableau VI : Valeurs des contrôles qualités des paramètres lipidiques

	CHOLT2 (g/L)			HDL-C3 (g/L)			TRIGLY (g/L)		
	Valeurs des contrôles	Valeurs cibles	Intervalle de confiance	Valeurs des contrôles	Valeurs cibles	Intervalle de confiance	Valeurs des contrôles	Valeurs cibles	Intervalle de confiance
PCCC1	0,96	0,94	0,90 – 0,99	0,31	0,31	0,28 – 0,33	1,10	1,11	1,05 – 1,17
PCCC2	1,78	1,76	1,67 – 1,85	0,65	0,65	0,60 – 0,70	2,09	2,09	1,99 – 2,19

Les valeurs des contrôles qualités des paramètres lipidiques accompagnées des valeurs cibles et les intervalles de confiance fournis par le fabricant.

Le contrôle qualité est validé lorsque les valeurs des contrôles se retrouvent dans l'intervalle de confiance. PCCC : « PreciControl ClinChem Multi ».

1 : contrôle normal et 2 : contrôle pathologique.

Les résultats de tous les paramètres biochimiques en rapport avec le statut en micronutriments sont mentionnés dans le tableau VII.

Pour les marqueurs du métabolisme du fer, il ressort de cette étude, une baisse significativement de la capacité totale de fixation du fer à la transferrine (CTF) chez les tuberculeux multirésistants (TB-MDRs) comparativement aux témoins non tuberculeux et aux valeurs normales ($P < 0,0001$). Tandis que les concentrations de ferritine sérique et le coefficient de saturation de la transferrine (CS) sont restés dans la gamme des valeurs normales.

Chez les tuberculeux multirésistants, au niveau des hommes, les concentrations en ferritine sérique ont été de $211 \pm 21,5 \mu\text{g/L}$, $148 \pm 11,9 \mu\text{g/L}$, $153 \pm 9,9 \mu\text{g/L}$ et pour les femmes $168 \pm 12,0 \mu\text{g/L}$, $164 \pm 14,6 \mu\text{g/L}$, $116 \pm 13,0 \mu\text{g/L}$ respectivement aux stades M_0 , M_3 et M_6 contre $164 \pm 18,2 \mu\text{g/L}$ et $97 \pm 13,1 \mu\text{g/L}$ respectivement chez les hommes et les femmes témoins volontaires non tuberculeux.

Les capacités totales de fixation (CTF) obtenues à partir des valeurs de la transferrine sérique ont été au stade M_0 $41 \pm 1,1 \mu\text{mol/L}$, stade M_3 $47 \pm 0,8 \mu\text{mol/L}$ et au stade M_6 $47 \pm 1,2 \mu\text{mol/L}$ chez les hommes TB-MDRs et chez les femmes au stade M_0 $29 \pm 1,3 \mu\text{mol/L}$, stade M_3 $37 \pm 1,4 \mu\text{mol/L}$ et au stade M_6 $43 \pm 2,0 \mu\text{mol/L}$ contre $66 \pm 1,1 \mu\text{mol/L}$ et $64 \pm 2,1 \mu\text{mol/L}$ respectivement chez les hommes et les femmes témoins non tuberculeux.

Enfin, les coefficients de saturation de la transferrine (CS) obtenus chez les hommes TB-MDRs ont été aux stades M_0 $24 \pm 1,2 \%$, M_3 : $24 \pm 1,0 \%$ et M_6 : $25 \pm 1,2 \%$ et chez les femmes TB-MDRs aux stades M_0 $29 \pm 1,7 \%$; M_3 $25 \pm 1,43 \%$ et M_6 : $24 \pm 2,2 \%$ contre $29 \pm 2,3 \%$ et $28 \pm 1,9 \%$ respectivement chez les hommes et les femmes témoins non tuberculeux.

Ces résultats montrent que la capacité totale de fixation de la transferrine a connu une hausse significative au cours du traitement antituberculeux de seconde ligne, $P < 0,05$ (Tableau VIII). Cependant ce coefficient est resté en baisse par rapport aux témoins non tuberculeux.

Les analyses comparatives entre les deux sexes de ces différents marqueurs biochimiques du métabolisme du fer chez les tuberculeux multirésistants ont montrées des différences significatives entre certaines valeurs (Tableau IX).

Cette étude a également montré pour le bilan phosphocalcique de faibles concentrations en calcium chez les TB-MDRs quel que soit le stade du suivi des malades par rapport aux témoins non tuberculeux, $P < 0,05$ (Tableau VII). Ces valeurs ont toutefois connu une hausse significative au cours du traitement antituberculeux de seconde ligne, $P < 0,05$ (Tableau VIII). Ces concentrations chez les TB-MDRs ont été au stade M_0 $75 \pm 1,68 \text{ mg/L}$ et

53 ± 1,56 mg/L respectivement chez les hommes et les femmes. Au stade M₃, respectivement chez les hommes et femmes, 78 ± 1,25 mg/L et 66 ± 1,19 mg/L et enfin au stade M₆ 83 ± 1,16 pour les hommes, 81 ± 1,48 mg/L pour les femmes contre 96 ± 1,13 mg/L et 95 ± 1,56 chez les témoins hommes et femmes respectivement.

Pour ce qui est du phosphore, des concentrations significativement élevées ont été obtenues chez les TB-MDRs au bilan M₀ par rapport aux témoins, P < 0,05 (Tableau VII) avec une baisse significative de la phosphatémie au cours du traitement, P < 0,05 (Tableau VIII). Les résultats obtenus ont été au stade M₀ 68 ± 5,62 mg/L (hommes), 58 ± 4,65 mg/L (femmes) ; au stade M₃ 56 ± 2,11 mg/L (hommes), 51 ± 2,97 mg/L (femmes) et au stade M₆ 52 ± 3,89 mg/L (hommes), 49 ± 2,29 mg/L (femmes) contre témoins hommes 43 ± 0,76 mg/L et témoins femmes 42 ± 1,53 mg/L.

Les résultats de la créatinine chez les tuberculeux multirésistants ont été chez les hommes de 11 ± 1,21 mg/L, 12 mg/L ± 1,14 et 12 ± 1,12 mg/L respectivement aux stades M₀, M₃, M₆ et chez les femmes de 8 ± 0,97 mg/L, 9 ± 1,06 mg/L et 9 ± 0,73 mg/L respectivement aux stades M₀, M₃, M₆ contre 12 ± 0,78 mg/L pour les témoins hommes et 9 ± 0,68 mg/L pour les témoins femmes.

Il faut noter pour ce marqueur qu'aucune différence significative n'a été observée entre ces concentrations chez les TB-MDRs tous les stades de suivi confondus et les témoins non tuberculeux.

Les analyses comparatives des valeurs de la créatinine, du calcium et du phosphore entre les sexes chez les TB-MDRs ont rapporté quelques différences significatives entre certaines valeurs (P < 0,05) (Tableau X).

Au niveau du bilan lipidique, les résultats des marqueurs lipidiques tels que le cholestérol total, les HDL-cholestérol, les LDL-cholestérol et les VLDL-cholestérol sont présentés dans le tableau VII. Ces valeurs présentent une baisse significative chez les tuberculeux multirésistants comparativement aux témoins non tuberculeux et quel que soit le stade de suivi des malades (P < 0,05). Les valeurs de ce bilan lipidique ne varient pas significativement au cours du traitement antituberculeux de seconde ligne.

Le tableau (XI) présente les analyses comparatives entre les différents sexes au niveau des sujets tuberculeux multirésistants (TB-MDRs) avant et au cours du traitement antituberculeux de seconde ligne. Ces analyses ont montré une différence significative entre les sexes uniquement au bilan initial (P < 0,05).

Tableau VII : Valeurs moyennes des marqueurs biochimiques chez des patients TB-MDRs et les témoins non tuberculeux

		TEMOINS	TB-MDRs M ₀	P	TB-MDRs M ₃	P	TB-MDRs M ₆	P
HOMMES	Ferritine (µg/L) Réf.: H : 3 -300; F : 20 - 200	164 ± 18,2	212 ± 21,5	0,001	148 ± 11,9	0,10	153 ± 9,9	0,10
	(CTF)(µmol/L) Réf.: 60 - 95	66 ± 1,1	41 ± 1,1*	0,0001	48 ± 0,8*	0,0001	48 ± 1,2*	0,0001
	(CS) (%) Réf.:20 - 45	29 ± 2,3	24± 1,2	0,10	24 ± 1,0	0,10	25 ± 1,2	0,10
	Calcium (mg/L) Réf.: 90 - 110	96 ± 1,13	75 ± 1,68*	0,0001	78 ± 1,25*	0,0001	83 ± 1,16*	0,0001
	Phosphore (mg/L) Réf.:28 - 46	43 ± 0,76	68 ± 5,62*	0,0001	56± 2,11	0,0001	52 ± 3,89	0,0001
	Créatinine (mg/L) Réf.:05-12	12 ± 0,78	11 ± 1,21	0,10	12 ± 1,14	0,10	12 ± 1,12	0,10
	CHOLT2 (g/L) Réf.:1,06 - 2,50	1,91 ± 0,07	1,03 ± 0,01*	0,0001	1,23 ± 0,04*	0,0001	1,44 ± 0,04*	0,0001
	HDL-C3 (g/L) Réf.: 0,40 - 0,70	0,45 ± 0,02	0,27 ± 0,02*	0,0001	0,29 ± 0,02*	0,0001	0,31 ± 0,02*	0,0001
	LDL-C (g/L) Réf.: 1,06 - 1,60	1,24 ± 0,06	0,87 ± 0,05*	0,0001	0,95 ± 0,04*	0,0001	0,97 ± 0,04*	0,0001
	VLDL-C (g/L) Réf.: < 0,05	0,03 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,0001	0,14 ± 0,01*	0,0001	0,13 ± 0,01*	0,0001
FEMMES	Ferritine (µg/L) Réf.: H : 3 -300; F : 20 - 200	97 ± 13,1	168 ± 12,0	0,001	164 ± 14,6	0,10	116 ± 13,0	0,10
	CTF (µmol/L) Réf.: 60 - 95	64 ± 2,1	29 ± 1,3*	0,0001	37 ± 1,4*	0,0001	43 ± 2,0*	0,0001
	CS (%) Réf.:20 - 45	28 ± 1,9	29 ± 1,7	0,10	25 ± 1,4	0,10	24 ± 2,2	0,10
	Calcium (mg/L) Réf.: 90 - 110	95 ± 1,56	53 ± 1,56*	0,0001	66 ± 1,19*	0,0001	81 ± 1,48*	0,0001
	Phosphore (mg/L) Réf.:28 - 46	42 ± 1,53	58 ± 4,85	0,0001	51 ± 2,29	0,0001	49± 2,29	0,0001
	Créatinine (mg/L) Réf.:05-12	9 ± 0,68	8 ± 0,97	0,10	9 ± 1,06	0,10	9 ± 0,73	0,10
	CHOLT2 (g/L) Réf.:1,06 - 2,50	1,92 ± 0,04	0,84 ± 0,05*	0,0001	1,00 ± 0,12*	0,0001	1,32 ± 0,05*	0,0001
	HDL-C3 (g/L) Réf.: 0,40 - 0,70	0,43 ± 0,05	0,17 ± 0,02*	0,0001	0,23 ± 0,02*	0,0001	0,33 ± 0,02*	0,0001
	LDL-C (g/L) Réf.: 1,06 - 1,60	1,28 ± 0,06	0,57 ± 0,04*	0,0001	0,83 ± 0,10*	0,0001	0,85 ± 0,05*	0,0001
	VLDL-C (g/L) Réf.: < 0,05	0,02 ± 0,01	0,15 ± 0,01*	0,0001	0,14 ± 0,01	0,0001	0,13 ± 0,01	0,0001

Réf : Valeurs de Références

M₀ : Bilan initial.

M₃ : Bilan de suivi à 3 mois de traitement.

M₆ : Bilan de suivi à 6 mois de traitement.

* : Différence significative entre TB-MDRs et les témoins non tuberculeux, P < 0,05.

Tableau VIII : Résultats d'analyse comparative des valeurs des paramètres biochimiques selon les stades de suivi des TB-MDRs

		TB-MDRs M ₀	TB-MDRs M ₃	P	TB-MDRs M ₆	P
HOMMES	Ferritine (µg/L) Réf.: H : 3 -300; F : 20 - 200	212 ± 21,5	148 ± 11,9	0,10	153 ± 9,9	0,10
	(CTF)(µmol/L) Réf.: 60 - 95	41 ± 1,1	48 ± 0,8*	0,0001	48 ± 1,2*	0,0001
	(CS) (%) Réf.:20 - 45	24± 1,2	24 ± 1,0	0,10	25 ± 1,2	0,10
	Calcium (mg/L) Réf.: 90 - 110	75 ± 1,68	78 ± 1,25*	0,0001	83 ± 1,16*	0,0001
	Phosphore (mg/L) Réf.:28 - 46	68 ± 5,62	56± 2,11	0,0001	52 ± 3,89	0,0001
	Créatinine (mg/L) Réf.:05-12	11 ± 1,21	12 ± 1,14	0,10	12 ± 1,12	0,10
	CHOLT2 (g/L) Réf.:1,06 - 2,50	1,03 ± 0,01	1,23 ± 0,04*	0,0001	1,44 ± 0,04*	0,0001
	HDL-C3 (g/L) Réf.: 0,40 - 0,70	0,27 ± 0,02	0,29 ± 0,02*	0,0001	0,31 ± 0,02*	0,0001
	LDL-C (g/L) Réf.: 1,06 - 1,60	0,87 ± 0,05	0,95 ± 0,04*	0,0001	0,97 ± 0,04*	0,0001
	VLDL-C (g/L) Réf.: < 0,05	0,16 ± 0,01	0,14 ± 0,01*	0,0001	0,13 ± 0,01*	0,0001
FEMMES	Ferritine (µg/L) Réf.: H : 3 -300; F : 20 - 200	168 ± 12,0	164 ± 14,6	0,10	116 ± 13,0	0,10
	CTF (µmol/L) Réf.: 60 - 95	29 ± 1,3	37 ± 1,4*	0,0001	43 ± 2,0*	0,0001
	CS (%) Réf.:20 - 45	29 ± 1,7	25 ± 1,4	0,10	24 ± 2,2	0,10
	Calcium (mg/L) Réf.: 90 - 110	53 ± 1,56	66 ± 1,19*	0,0001	81 ± 1,48*	0,0001
	Phosphore (mg/L) Réf.:28 - 46	58 ± 4,85	51 ± 2,29	0,0001	49± 2,29	0,0001
	Créatinine (mg/L) Réf.:05-12	8 ± 0,97	9 ± 1,06	0,10	9 ± 0,73	0,10
	CHOLT2 (g/L) Réf.:1,06 - 2,50	0,84 ± 0,05	1,00 ± 0,12*	0,0001	1,32 ± 0,05*	0,0001
	HDL-C3 (g/L) Réf.: 0,40 - 0,70	0,17 ± 0,02	0,23 ± 0,02*	0,0001	0,33 ± 0,02*	0,0001
	LDL-C (g/L) Réf.: 1,06 - 1,60	0,57 ± 0,04	0,83 ± 0,10*	0,0001	0,85 ± 0,05*	0,0001
	VLDL-C (g/L) Réf.: < 0,05	0,15 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,0001	0,13 ± 0,01	0,0001

Réf : Valeurs de Références

M₀ : Bilan initial.

M₃ : Bilan de suivi à 3 mois de traitement.

M₆ : Bilan de suivi à 6 mois de traitement.

* : Différence significative entre les stades de suivi des TB-MDRs, P < 0,05.

Tableau IX : Valeurs comparatives des marqueurs biochimiques du métabolisme du fer selon le sexe chez les TB-MDRs

	TB-MDRs M ₀			TB-MDRs M ₃			TB-MDRs M ₆		
	Hommes	femmes	P	Hommes	Femmes	P	Hommes	Femmes	P
FERR (µg/L)	211,6 ± 21,5	168,0 ± 12,0	P = 0,41	148,1 ± 11,9	164,3 ± 14,6	P = 0,70	152,7 ± 9,9	115,6 ± 13,0	P = 0,13
CTF (µmol/L)	41,4 ± 1,1	28,9 ± 1,3*	P = 0,0001	47,1 ± 0,8	36,6 ± 1,4*	P = 0,0001	47,5 ± 1,2	42,6 ± 2,0*	P = 0,0001
CS (%)	23,6 ± 1,2	29,4 ± 1,7	P = 0,02	24,3 ± 1,0	25,5 ± 1,4	P = 0,33	24,8 ± 1,2	24,1 ± 2,2	P = 0,54

Analyses comparatives des marqueurs du métabolisme du fer chez les tuberculeux multirésistants (TB-MDRs) selon les sexes et à différents stades du suivi de ces patients. M₀ : bilan initial. M₃ et M₆ : bilan de suivi à 3 et 6 mois de traitement. FERR : Ferritine. CTF : Capacité totale de fixation du fer à la transferrine. CS : Coefficient de saturation de la transferrine. * : Différence significative entre femmes et hommes.

Tableau X : Analyse comparative des valeurs du bilan phosphocalcique et de la créatinine selon le sexe chez les TB-MDRs

	TB-MDRs M ₀			TB-MDRs M ₃			TB-MDRs M ₆		
	Hommes	femmes	P	Hommes	Femmes	P	Hommes	Femmes	P
Calcium (mg/L)	75,15 ± 1,68	53,47 ± 1,56*	P = 0,0001	77,83 ± 1,25	65,91 ± 1,19*	P = 0,001	82,89 ± 1,16	81,31 ± 1,48	P = 0,06
Phosphore (mg/L)	68,11 ± 5,62	57,81 ± 4,85*	P = 0,032	56,12 ± 2,11	50,97 ± 2,29	P = 0,05	51,89 ± 3,89	48,86 ± 2,29	P = 0,35
Créatinine (mg/L)	11,35 ± 1,21	8,12 ± 0,97*	P = 0,0001	11,65 ± 1,14	8,78 ± 1,06*	P = 0,0001	12,24 ± 1,12	9,32 ± 0,73*	P 0,0001

Analyses comparatives des paramètres du bilan phosphocalcique et de la créatinine chez les tuberculeux multirésistants (TB-MDRs) selon les sexes et à différents stades du suivi de ces patients. M₀ : bilan initial. M₃ et M₆ : bilan de suivi a 3 et 6 mois de traitement. Les différences sont significatives pour P < 0,05. * Différence significative entre femmes et hommes.

Tableau XI : Analyse comparative des concentrations des paramètres lipidiques selon le sexe chez les TB-MDRs

	TB-MDRs M ₀			TB-MDRs M ₃			TB-MDRs M ₆		
	Hommes	femmes	P	Hommes	Femmes	P	Hommes	Femmes	P
CHOLT2 (g/L)	1,03 ± 0,01	0,84 ± 0,05	P = 0,0016	1,23 ± 0,04	1,00 ± 0,12	P = 0,4666	1,44 ± 0,04	1,32 ± 0,05	P = 0,0735
HDL-C3 (g/L)	0,27 ± 0,02	0,17 ± 0,02	P = 0,0019	0,29 ± 0,02	0,23 ± 0,02	P = 0,0910	0,31 ± 0,02	0,33 ± 0,02	P = 0,3371
LDL-C (g/L)	0,87 ± 0,05	0,57 ± 0,04	P = 0,0001	0,95 ± 0,04	0,83 ± 0,10	P = 0,367	0,97 ± 0,04	0,85 ± 0,05	P = 0,367
VLDL-C (g/L)	0,16 ± 0,01	0,15 ± 0,01	P = 0,0003	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,01	P = 0,989	0,13 ± 0,01	0,13 ± 0,01	P = 0,989

Analyses comparatives des valeurs des paramètres lipidiques chez les tuberculeux multirésistants (TB-MDRs) selon les sexes et à différents stades du suivi de ces patients.
M₀ : bilan initial. M₃ et M₆ : bilan de suivi à 3 et 6 mois de traitement. Les différences sont significatives pour P < 0,05.

3.1.2- Concentrations en oligoéléments

Les résultats des teneurs en oligoéléments tels que le fer, le cuivre et le zinc ainsi que le rapport Cu/Zn chez les tuberculeux multirésistants (TB-MDRs) aux différents stades de traitement antituberculeux de seconde ligne et les témoins volontaires non tuberculeux sont représentés dans le tableau XII.

Les concentrations en fer sérique obtenues au cours de notre étude chez les TB-MDRs ont été au bilan initial (M_0) $11 \pm 0,49 \mu\text{mol/L}$ chez les hommes et $8 \pm 0,45 \mu\text{mol/L}$ chez les femmes ; aux bilans de suivi M_3 et M_6 respectivement $12 \pm 0,48 \mu\text{mol/L}$, $12 \pm 0,63 \mu\text{mol/L}$ chez les hommes et $9 \pm 0,55 \mu\text{mol/L}$, $10 \pm 0,92 \mu\text{mol/L}$ chez les femmes contre $18 \pm 1,32 \mu\text{mol/L}$ et $17 \pm 1,12 \mu\text{mol/L}$ respectivement chez les témoins hommes et femmes. Ces concentrations en fer chez les TB-MDRs sont en baisse quel que soit le stade de suivi des patients par rapport aux témoins non tuberculeux ($P < 0,05$). Ces concentrations en fer chez ces TB-MDRs ont subi une hausse non significative au cours du traitement antituberculeux de seconde ligne comparativement au bilan initial (Figure 14).

Les résultats de cette étude ont également montré une baisse significative des teneurs en zinc chez les tuberculeux multirésistants (TB-MDRs) comparativement aux témoins non tuberculeux ($P < 0,05$). Ces teneurs en zinc bien qu'elles aient connu une augmentation significative au cours du traitement antituberculeux par rapport au bilan initial ($P < 0,05$), elles sont restées significativement faibles comparativement aux témoins non tuberculeux ($P < 0,05$). Ces concentrations ont été au bilan initial, chez les hommes $3,1 \pm 0,35 \mu\text{mol/L}$, chez les femmes $3,9 \pm 0,45 \mu\text{mol/L}$ et après 3 et 6 mois de traitement (M_3 et M_6) chez hommes (M_3) $6,3 \pm 0,50 \mu\text{mol/L}$ (M_6) $7,0 \pm 0,37 \mu\text{mol/L}$ VS femmes (M_3) $5,6 \pm 0,90 \mu\text{mol/L}$, (M_6) $5,9 \pm 0,52 \mu\text{mol/L}$ contre $13,4 \pm 0,51 \mu\text{mol/L}$ chez témoins hommes et $13,5 \pm 0,45 \mu\text{mol/L}$ chez les témoins femmes (Figure 15).

Pour ce qui est du cuivre, les valeurs sont dans la gamme de valeurs normales. Ces concentrations ont été de $17,5 \pm 0,76 \mu\text{mol/L}$, $20,7 \pm 1,73 \mu\text{mol/L}$, $20,8 \pm 0,98 \mu\text{mol/L}$ (hommes) et de $16,0 \pm 1,66 \mu\text{mol/L}$, $16,8 \pm 1,11 \mu\text{mol/L}$, $17,1 \pm 2,50 \mu\text{mol/L}$ (femmes) respectivement aux bilans M_0 , M_3 et M_6 contre $17,4 \pm 0,76 \mu\text{mol/L}$ chez les témoins hommes et $16,3 \pm 1,85 \mu\text{mol/L}$ chez les témoins femmes (Figure 16).

En revanche, un ratio Cu/Zn très élevé a été observé chez les TBMR comparativement aux témoins non tuberculeux ($P < 0,05$). Toutefois, au cours du traitement antituberculeux de seconde ligne, ce ratio Cu/Zn a connu une réduction significative par rapport au bilan initial ($P < 0,05$); mais comparé aux témoins non tuberculeux, ce rapport Cu/Zn a connu une hausse significative ($P < 0,05$) (Figure 17 et Tableau XIII).

La baisse des concentrations en fer et en zinc chez les tuberculeux multirésistants (TB-MDRs) avant et au cours du traitement antituberculeux de seconde ligne se traduisent par des pourcentages de réduction élevés chez les TB-MDRs par rapport aux valeurs des témoins non tuberculeux. Les pourcentages de réduction du fer ont été de 30% chez les hommes et 40% chez les femmes quand ceux du zinc ont été de 49% chez les hommes et 56% chez les femmes après les six mois (M₆) de traitement antituberculeux de seconde ligne (Figures 18 et 19).

L'analyse comparative des concentrations en fer, en cuivre, en zinc et le ratio cuivre/zinc chez les tuberculeux multirésistants (TB-MDRs) avant et pendant le traitement antituberculeux de seconde ligne ne présente aucune différence significative entre les deux sexes femmes et hommes (Tableau XIV).

Tableau XII : Concentrations moyennes des oligoéléments chez les patients TB-MDRs et les témoins non tuberculeux.

		Témoins	TB-MDRs M ₀	P	TB-MDRs M ₃	P	TB-MRs M ₆	P
HOMMES	Fer (Réf.: 14 – 32 µmol/L)	18 ± 1,32	11 ± 0,49*	0,0001	12 ± 0,48*	0,0001	13 ± 0,63*	0,0001
	Cuivre (Réf.: 11,0 – 22,0 µmol/L)	17,4 ± 0,76	17,5 ± 0,76	0,10	20,7 ± 1,73	0,10	20,8 ± 0,98	0,10
	Zinc (Réf.: 11,5 – 18,5 µmol/L)	13,4 ± 0,51	3,0 ± 0,35*	0,0001	6,3 ± 0,50*	0,0001	7,0 ± 0,37*	0,0001
	Ratio Cu/Zn (Réf.: 1,1 – 1,3)	1,3 ± 0,12	5,7 ± 1,04*	0,0001	3,3 ± 1,20*	0,0001	3,0 ± 0,68*	0,0001
FEMMES	Fer (Réf.: 11 – 29 µmol/L)	17 ± 1,12	8 ± 0,45*	0,0001	9 ± 0,55*	0,0001	0,10 ± 0,92*	0,0001
	Cuivre (Réf.: 11,0 – 22,0 µmol/L)	16,3 ± 1,85	16,0 ± 1,66	0,10	16,8 ± 1,11	0,10	17,1 ± 2,50	0,10
	Zinc (Réf.: 11,5 – 18,5 µmol/L)	13,5 ± 0,45	3,9 ± 0,45*	0,0001	5,6 ± 0,90*	0,0001	5,9 ± 0,52*	0,0001
	Ratio Cu/Zn (Réf.: 1,1 – 1,3)	1,3 ± 0,19	4,1 ± 1,45*	0,0001	3,2 ± 0,75*	0,0001	2,9 ± 0,64*	0,0001

Réf : Valeurs de Références

M₀ : Bilan initial.

M₃ : Bilan de suivi à 3 mois de traitement.

M₆ : Bilan de suivi à 6 mois de traitement.

* : Différence significative entre TB-MDRs et les témoins non tuberculeux, P < 0,05.

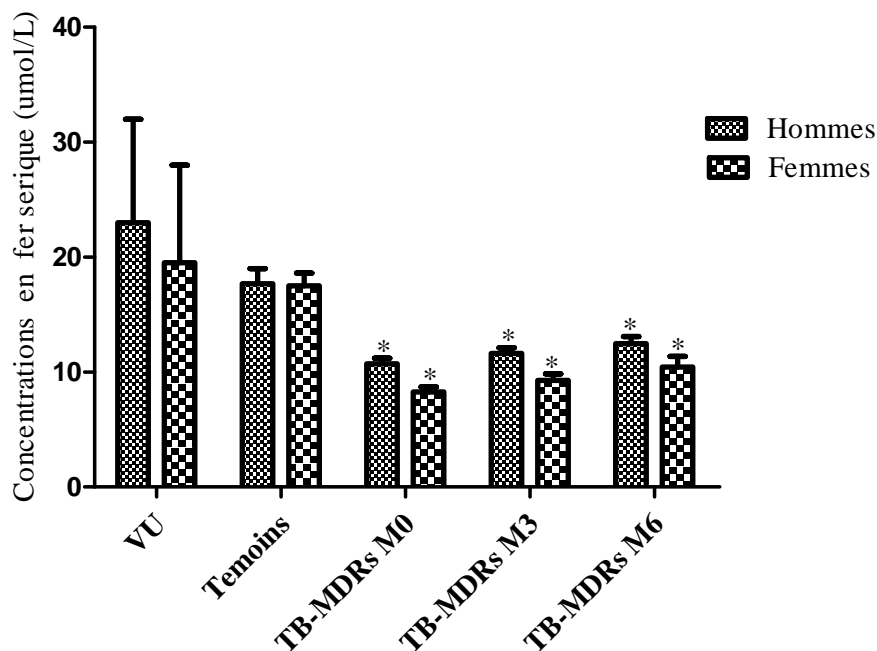


Figure 14 : Concentrations en fer sérique des TB-MDRs et témoins

Concentrations sériques en fer chez les tuberculeux multirésistants (TB-MDRs) et chez les témoins ainsi que les valeurs usuelles. M_0 : bilan initial. M_3 et M_6 : bilan de suivi à 3 et 6 mois de traitement. * : Différence significative entre TB-MDRs et témoins non tuberculeux, $P < 0,05$. VU : Valeurs usuelles.

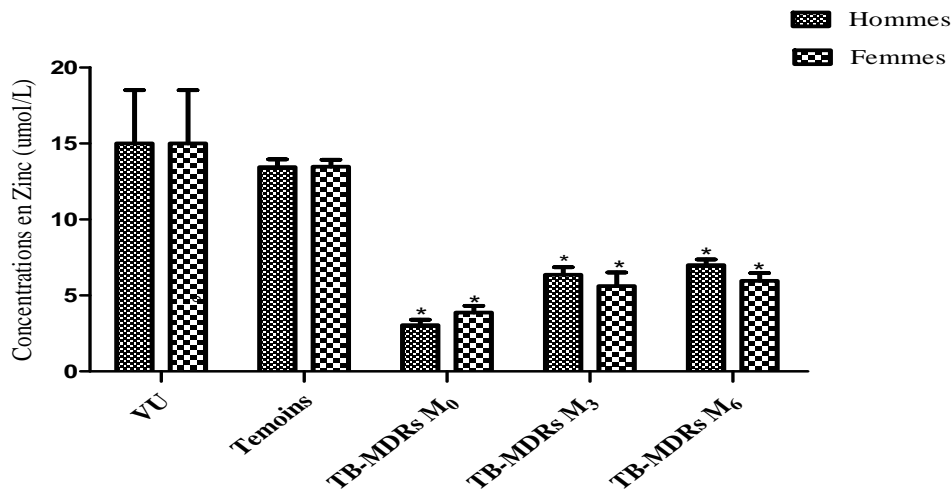


Figure 15 : Concentrations en zinc des TB-MDRs et témoins

Concentrations sériques en fer chez les tuberculeux multirésistants (TB-MDRs) et chez les témoins ainsi que les valeurs usuelles. M_0 : bilan initial. M_3 et M_6 : bilan de suivi à 3 mois et 6 mois de traitement. * : Différence significative entre TB-MDRs et témoins non tuberculeux, $P < 0,05$. VU : Valeurs usuelles.

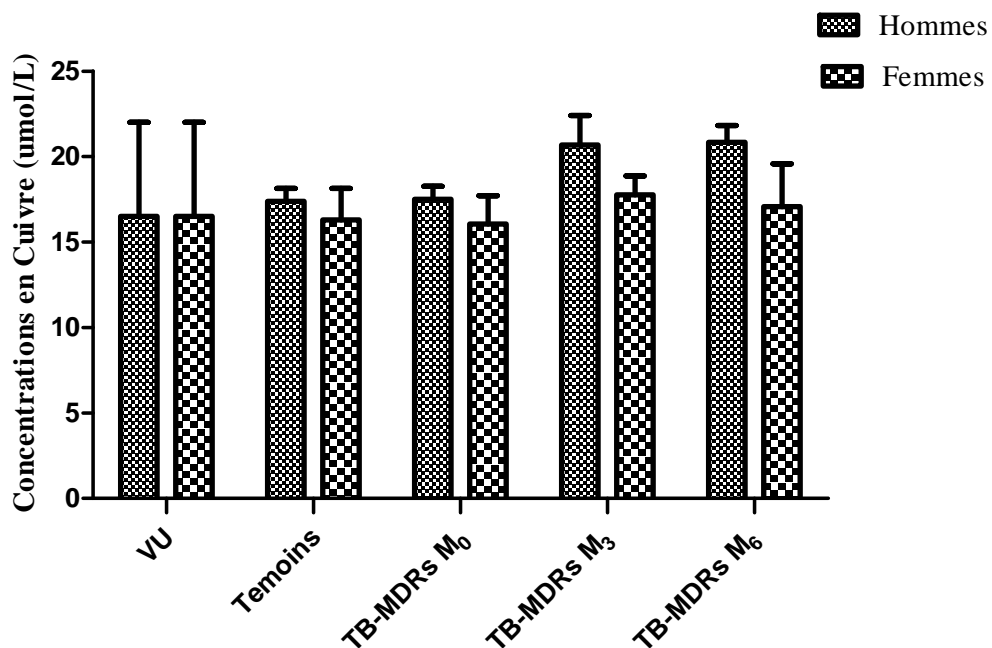


Figure 16 : Concentrations en cuivre des TB-MDRs et témoins

Concentrations sériques en cuivre chez les tuberculeux multirésistants (TBMR) et chez les témoins ainsi que les VU : valeurs usuelles. M₀ : bilan initial. M₃ et M₆ : bilan de suivi à 3 et 6 mois de traitement.

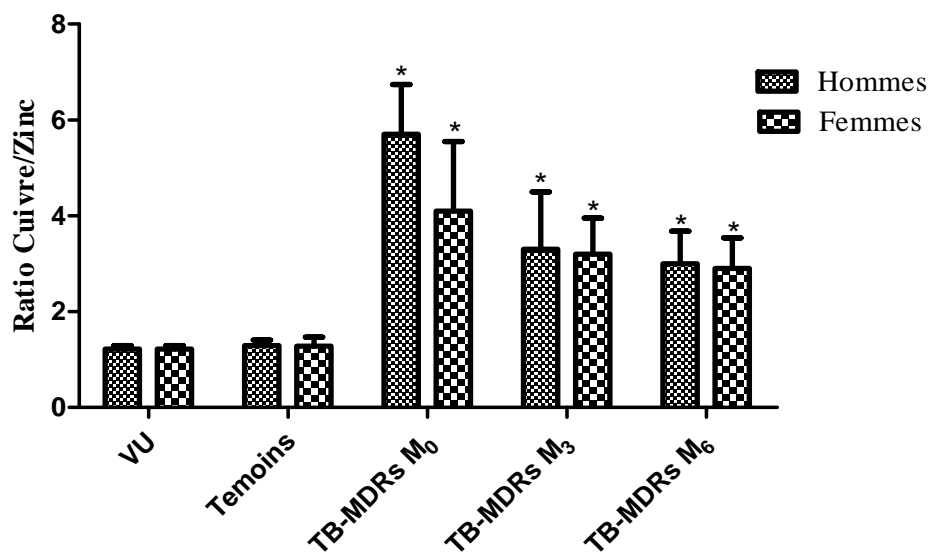


Figure 17 : Ratio cuivre/zinc des TB-MDRs et témoins

Valeurs du ratio Cu/Zn chez les tuberculeux multirésistants (TB-MDRs) et chez les témoins ainsi que les valeurs usuelles. M₀ : bilan initial. M₃ et M₆ : bilan de suivi à 3 et 6 mois de traitement. * : Différence significative entre TB-MDRs et témoins non tuberculeux, P < 0,05.

Tableau XIII : Analyse comparative des concentrations en oligoéléments selon les stades de suivi des patients TB-MDRs

		TB-MDRs M ₀	TB-MDRs M ₃	P	TB-MDRs M ₆	p
HOMMES	Cu	17,5 ± 0,76	20,7 ± 1,73	0,06	20,8 ± 0,98	0,06
	Zn	3,0 ± 0,35	6,3 ± 0,50*	0,001	7,0 ± 0,37*	0,001
	Ratio Cu/Zn	5,7 ± 1,04	3,3 ± 1,20*	0,001	3,0 ± 0,68*	0,001
FEMMES	Cu	16,0 ± 1,66	16,8 ± 1,11	0,06	17,1 ± 2,50	0,06
	Zn	3,9 ± 0,45	5,6 ± 0,90*	0,001	5,9 ± 0,52*	0,001
	Ratio Cu/Zn	4,1 ± 1,45	3,2 ± 0,75*	0,001	2,9 ± 0,64*	0,001

M₀ : Bilan initial.

M₃ : Bilan de suivi à 3 mois de traitement.

M₆ : Bilan de suivi à 6 mois de traitement.

* : Différence significative entre les stades M₀ et M₃, M₆, P < 0,05.

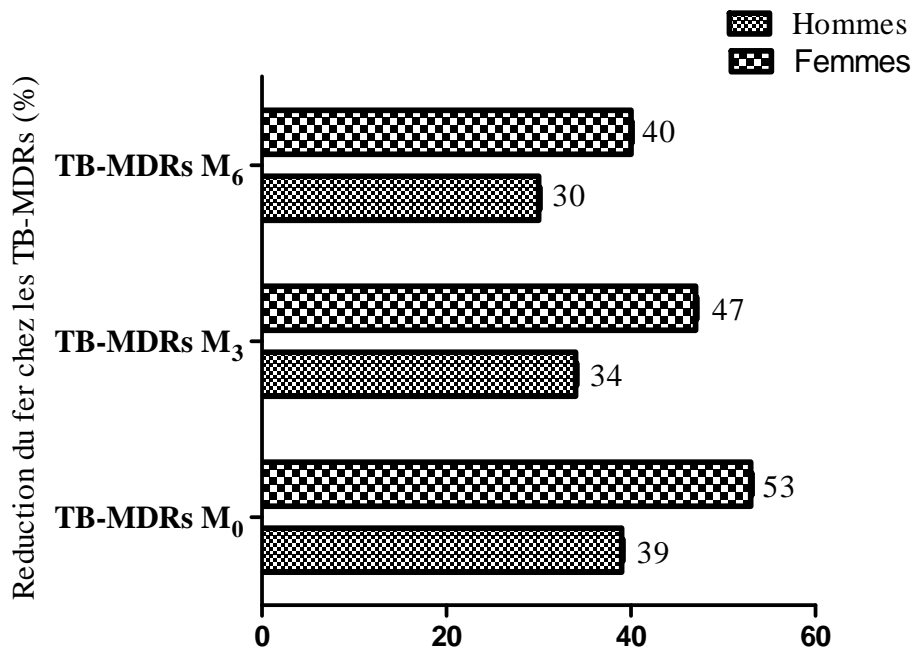


Figure 18 : Pourcentage de réduction du fer chez les TB-MDRs

Pourcentages de réduction du fer chez les tuberculeux multirésistants aux différents stades du suivi par rapport aux témoins volontaires non tuberculeux.

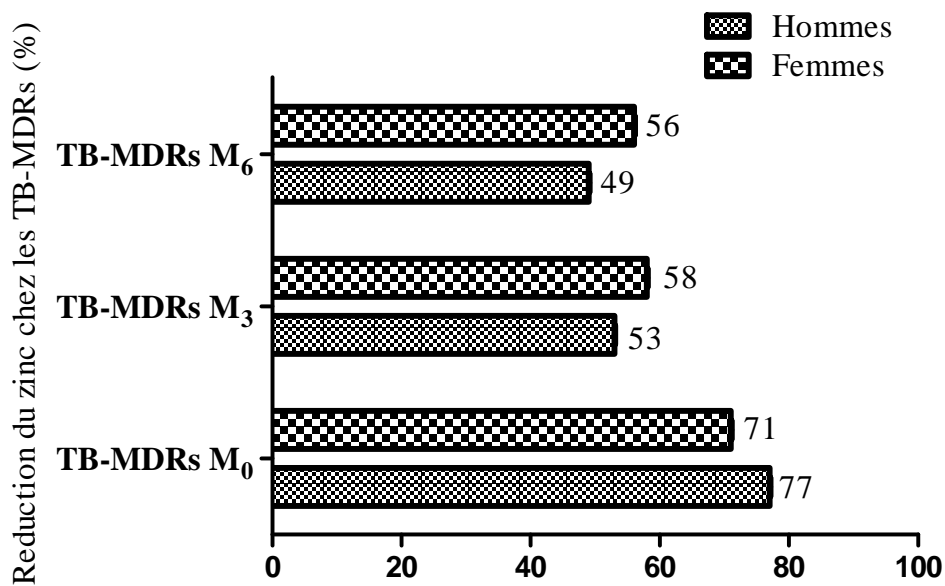


Figure 19 : Pourcentage de réduction du zinc chez les TB-MDRs

Pourcentages de réduction du zinc chez les tuberculeux multirésistants aux différents stades du suivi par rapport aux témoins volontaires non tuberculeux.

Tableau XIV : Analyse comparative des concentrations en oligoéléments et du ratio Cu/Zn selon le sexe chez les TB-MDRs

	TB-MDRs M ₀			TB-MDRs M ₃			TB-MDRs M ₆		
	Hommes	femmes	P	Hommes	Femmes	P	Hommes	Femmes	P
Fer (µmol/L)	11 ± 0,49	8 ± 0,45	0,99	12 ± 0,48	9 ± 0,55	0,33	12 ± 0,63	10 ± 0,92	0,13
Cuivre (µmol/L)	17,5 ± 0,76	16,0 ± 1,66	0,81	20,7 ± 1,73	16,8 ± 1,11	0,77	20,8 ± 0,98	17,1 ± 2,50	0,39
Zinc (µmol/L)	3,1 ± 0,35	3,9 ± 0,45	0,34	6,3 ± 0,50	5,6 ± 0,90	0,29	7,0 ± 0,37	5,9 ± 0,52	0,77
Ratio Cu/Zn	5,7 ± 1,04	4,1 ± 1,45	0,18	3,3 ± 1,20	3,2 ± 0,75	0,82	3,5 ± 0,68	2,9 ± 0,64	0,27

Analyses comparatives des valeurs du fer, du cuivre, du zinc et du ratio Cu/Zn chez les tuberculeux multirésistants (TB-MDRs) selon les sexes et à différents stades du suivi de ces patients. M₀ : bilan initial. M₃ et M₆ : bilan de suivi à 3 et 6 mois de traitement. Les différences sont significatives pour P < 0,05.

3.1.3- Concentration en vitamines liposolubles

Les temps de rétention ont été de 3,84 minutes, 7,29 minutes et 8,23 minutes respectivement pour les vitamines A, D et E. Les profils chromatographiques des pics des vitamines aux temps de rétention données pour les différentes concentrations de la calibration sont représentés sur les figures en annexe II. Les figures du chromatogramme du mix préparé à partir des standards de vitamines en annexe II et les courbes d'étalonnage des vitamines liposolubles sont représentées en annexe I. Les équations de droites et les coefficients de régressions ont été de $y = 17733 x + 5,902$ avec $r^2 = 0,999$; $y = 33401 x + 2877$ avec $r^2 = 0,999$ et de $y = 4606 x - 74,30$ avec $r^2 = 0,999$ respectivement pour les vitamines A (Rétinol), D (Cholécalciférol) et E (α -Tocophérol).

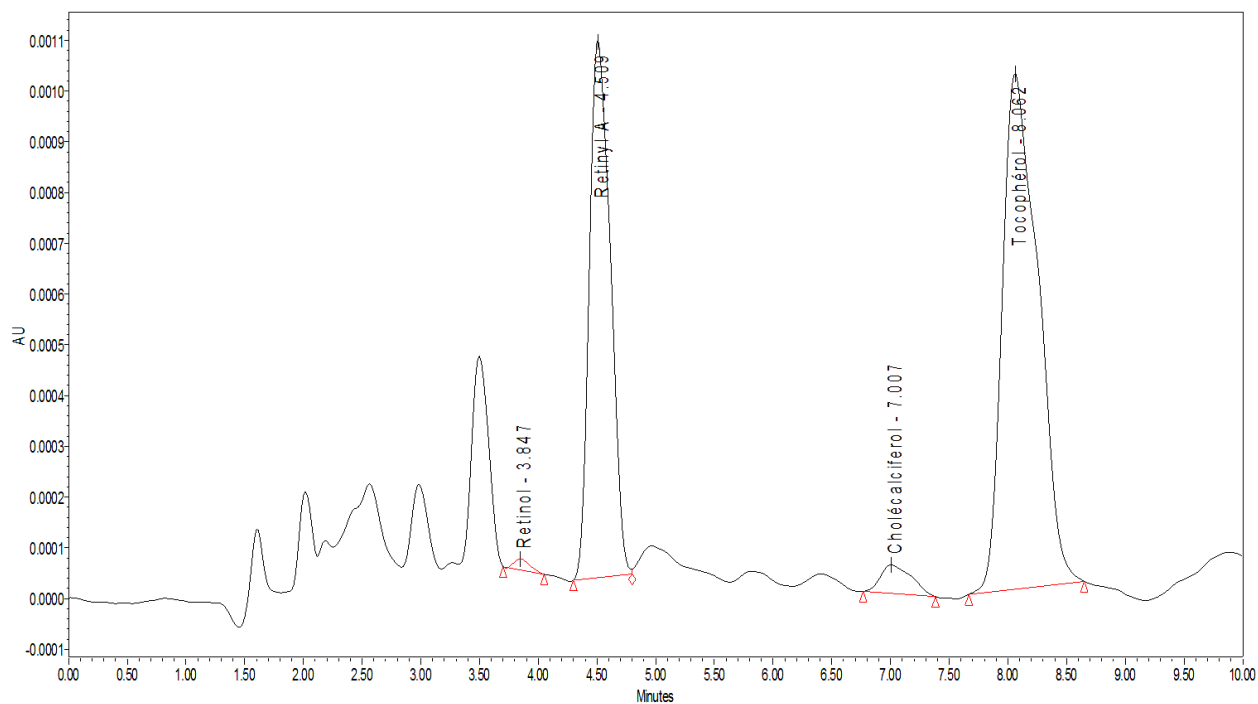
Les résultats de la procédure de validation de la méthode de dosage des vitamines liposolubles à partir d'une seule et même longueur d'onde ont montré que cette méthode de dosage est fiable et reproductible avec une bonne linéarité. Cela se justifie par des coefficients de régression supérieurs à 0,98, des coefficients de variation largement inférieurs à 5 et des taux de récupération compris entre 70 et 110% (Tableau XV).

Les chromatogrammes des patients tuberculeux multirésistants et des témoins volontaires non tuberculeux sont présentés sur les figures 20 et 21.

Tableau XV : Valeurs des paramètres de validation de la méthode de dosage des vitamines

	Rétinol	Cholécalciférol	α -Tocophérol
Coefficients de variations (CV) (%)	3,169	3,859	2,889
Limites de détection (LOD) (mg/L)	0,005	0,006	0,087
Limites de quantification (LOQ) (mg/L)	0,016	0,019	0,289
Taux de récupération (TR) (%)	79,98	87,65	83,79

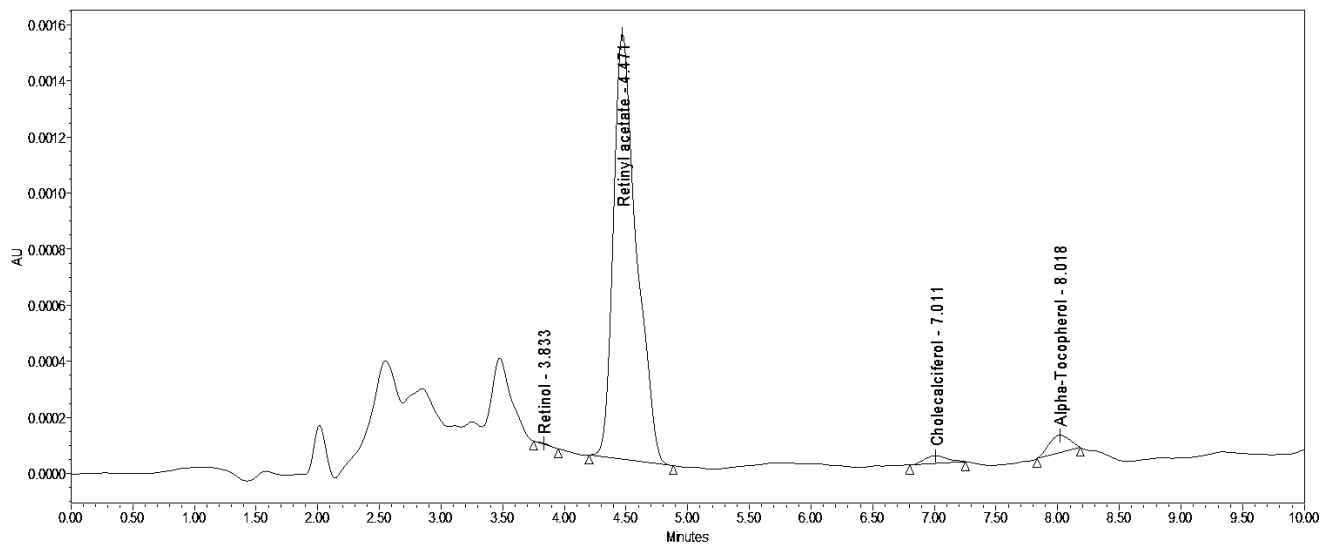
Paramètres de la procédure de validation de la méthode de dosage simultané des vitamines A, D et E par Chromatographie Liquide à Haute performance (HPLC). Coefficient de variation (CV) : Détermine la fidélité de la méthode, il doit être < 5. Limite de détection (LOD): Concentration minimale détectable par le détecteur UV-Visible. Limite de quantification (LOQ): Concentration minimale quantifiable par le dispositif HPLC. Taux de récupération (TR): Détermine l'exactitude de la méthode



	Molécules	Temps de rétention	Air	% Air
1	Retinol	3.847	206	0.57
2	Retinyl A	4.509	13198	76.75
3	Cholécalférol	7.197	1033	2.88
4	Tocophérol	8.162	21478	59.80

Figure 20 : Profil chromatographique des vitamines A, D et E des témoins

Profil normal des vitamines : Concentrations normales des vitamines A, D et E chez des témoins volontaires non tuberculeux.



	Molécules	Temps de rétention	Air	% Air
1	Rétinol	3.833	21	0.10
2	Rétinyl acétate	4.471	13206	84.68
3	Cholécalciférol	7.011	355	1.71
4	Alpha-Tocophérol	8.018	726	3.51

Figure 21 : Profil chromatographique des vitamines A, D et E des malades TB-MDRs

Profil anormal des vitamines : Effondrement des concentrations en vitamines liposolubles (vitamines A, D et E) chez les tuberculeux multirésistants (TB-MDRs).

Les résultats de cette partie de l'étude portant sur les différentes concentrations en vitamines A, D et E sont représentés dans le tableau XVI.

Les concentrations de la vitamine A ou le rétinol chez les TB-MDRs ont été de $0,10 \pm 0,017$ $\mu\text{mol/L}$ chez les hommes, $0,08 \pm 0,038$ $\mu\text{mol/L}$ chez les femmes pour le bilan M_0 , de $0,14 \pm 0,024$ $\mu\text{mol/L}$ chez les hommes, $0,12 \pm 0,084$ $\mu\text{mol/L}$ chez les femmes pour le bilan M_3 et de $0,15 \pm 0,140$ $\mu\text{mol/L}$ chez les hommes, $0,14 \pm 0,174$ $\mu\text{mol/L}$ chez les femmes pour le bilan M_6 contre $0,50 \pm 0,210$ $\mu\text{mol/L}$ et $0,44 \pm 0,192$ $\mu\text{mol/L}$ respectivement chez les témoins hommes et femmes comme le montre la figure 22.

Concernant la vitamine D ou le cholécalciférol, les valeurs enregistrées chez les TBMR ont été de, au stade M_0 $13 \pm 2,599$ nmol/L (hommes) et $5 \pm 2,599$ nmol/L (femmes), au stade M_3 $26 \pm 5,198$ nmol/L (hommes) et $26 \pm 5,797$ nmol/L (femmes) et enfin au stade M_6 $57 \pm 2,599$ nmol/L (hommes) et $55 \pm 2,599$ nmol/L (femmes) contre $108 \pm 4,797$ nmol/L chez les témoins hommes et $104 \pm 3,396$ nmol/L chez les témoins femmes (figure 23).

Pour ce qui est de l' α -tocophérol les résultats ont été pour les hommes $3,181 \pm 0,901$ $\mu\text{mol/L}$, $6 \pm 1,467$ $\mu\text{mol/L}$, $8 \pm 3,676$ $\mu\text{mol/L}$ et pour les femmes $5 \pm 1,711$ $\mu\text{mol/L}$, $5 \pm 1,346$ mg/L , $10 \pm 3,483$ $\mu\text{mol/L}$ respectivement aux bilans M_0 , M_3 et M_6 contre $24 \pm 5,382$ $\mu\text{mol/L}$ chez les témoins hommes et $30 \pm 2,868$ $\mu\text{mol/L}$ chez les témoins femmes (figure 24).

Il ressort des résultats de cette analyse quantitative, une baisse significative des concentrations en vitamines A, D et E chez les TB-MDRs, tant au bilan initial (M_0) qu'au cours du bilan de suivi (M_3 , M_6) comparativement aux témoins non tuberculeux ($P < 0,05$). Cette baisse est révélée par des pourcentages de réduction des concentrations vitaminiques supérieures à 80%, 40% et 50% respectivement pour les vitamines A, D et E chez ces sujets TB-MDRs. Il convient de noter que ces pourcentages de réduction des concentrations des vitamines ont été observés à tous les stades du suivi des patients TB-MDRs (Figures 25, 26 et 27). Aussi, ces résultats ont-ils montré qu'au cours du traitement antituberculeux de seconde ligne, les concentrations en ces vitamines A, D et E ont connu une hausse significative ($P < 0,05$) par rapport au bilan initial (Tableau XVI). Toutefois, il faut relever que les concentrations en vitamine A chez les témoins non tuberculeux quand bien même qu'elles soient dans la gamme des valeurs normales, elles sont significativement basses par rapport à la moyenne des valeurs usuelles ($P < 0,0001$). Les analyses comparatives des concentrations vitaminiques A, D et E selon les sexes chez les TB-MDRs mentionnées dans le tableau XVII présentent des différences significatives entre les deux sexes à certains stades.

Tableau XVI : Concentrations moyennes des vitamines liposolubles A D E chez les patients TB-MDRs et les témoins non tuberculeux.

		Témoins	TB-MDRs M ₀	P	TB-MDRs M ₃	P	TB-MDRs M ₆	P
HOMMES	Vitamine A (Réf.:0,35 - 1,75 µmol/L)	0,50 ± 0,21	0,10 ± 0,02*	0,0001	0,14 ± 0,02*	0,0001	0,15 ± 0,14*	0,0001
	Vitamine D (Réf.:60 - 105 nmol/L)	108 ± 4,80	13 ± 2,60*	0,0001	26 ± 5,20*	0,0001	57 ± 2,60*	0,0001
	Vitamine E (18 – 29 µmol/L)	24 ± 5,38	3 ± 0,90*	0,001	6 ± 1,47*	0,001	7 ± 3,68*	0,001
FEMMES	Vitamine A (Réf.:0,35 - 1,75 µmol/L)	0,44 ± 0,19	0,08 ± 0,04*	0,0001	0,12 ± 0,08*	0,0001	0,14 ± 0,17*	0,0001
	Vitamine D (Réf.:60 - 105 nmol/L)	105 ± 3,40	5 ± 2,60*	0,0001	26 ± 5,80*	0,0001	54 ± 2,60*	0,0001
	Vitamine E (Réf. : 18 - 29µmol/L)	30 ± 2,87	5 ± 1,71*	0,001	5 ± 1,35*	0,001	10 ± 3,48*	0,001

Réf : Valeurs de Références

M₀ : Bilan initial.

M₃ : Bilan de suivi à 3 mois de traitement.

M₆ : Bilan de suivi à 6 mois de traitement.

* : Différence significative entre TB-MDRs et les témoins non tuberculeux, P < 0,05.

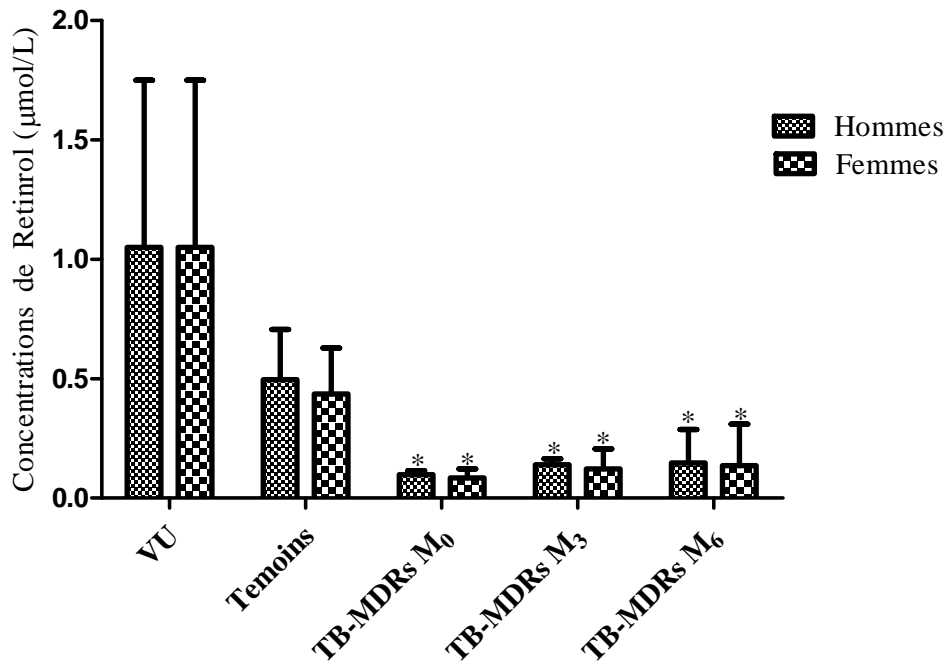


Figure 22 : Concentrations de rétinol ou vitamine A des TB-MDRs et témoins

Concentrations sériques en vitamine A (Rétinol) chez les tuberculeux multirésistants (TB-MDRs) et chez les témoins ainsi que les valeurs usuelles. M₀ : bilan initial. M₃ et M₆ : bilan de suivi à 3 et 6 mois de traitement. * : Différence significative entre TB-MDRs et témoins non tuberculeux, P < 0,0001.

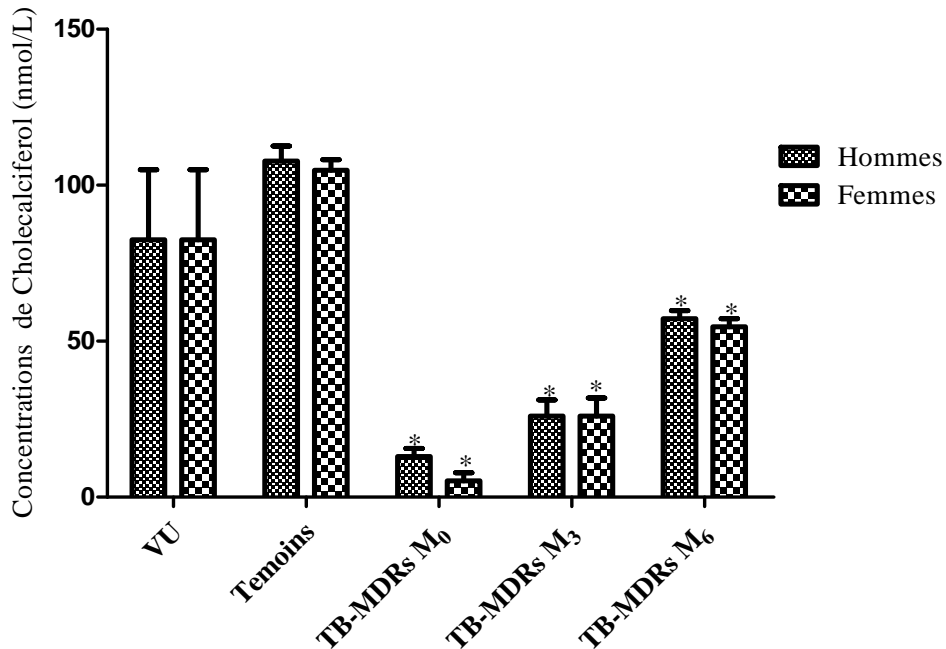


Figure 23 : Concentrations en cholécalciférol ou vitamine D des TB-MDRs et témoins

Concentrations sériques en vitamine D (Cholécalciférol) chez les tuberculeux multirésistants (TB-MDRs) et chez les témoins ainsi que les valeurs usuelles. M₀ : bilan initial. M₃ et M₆ : bilan de suivi à 3 et 6 mois de traitement. * : Différence significative entre TB-MDRs et témoins non tuberculeux, P < 0,0001. VU : Valeurs usuelles.

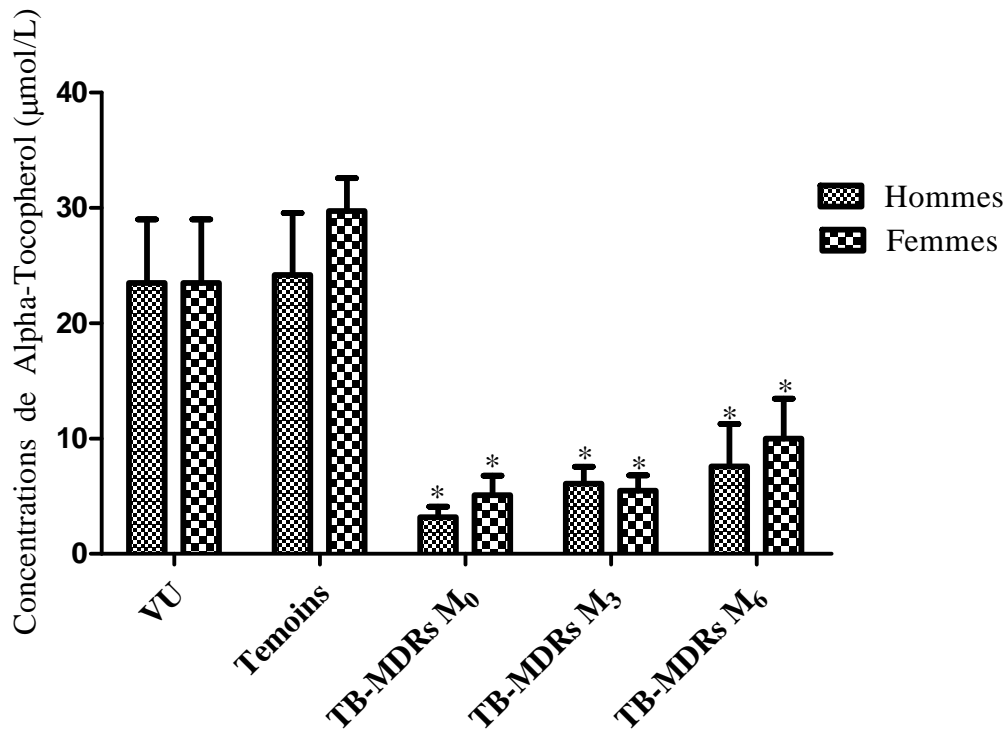


Figure 24 : Concentrations en α -Tocophérol ou vitamine E des TB-MDRs et témoins

Concentrations sériques en vitamine E (α -Tocophérol) chez les tuberculeux multirésistants (TB-MDRs) et chez les témoins ainsi que les valeurs usuelles. M₀ : bilan initial. M₃ et M₆ : bilan de suivi à 3 et 6 mois de traitement. * : Différence significative entre TB-MDRs et témoins non tuberculeux, P < 0,001. VU : Valeurs usuelles.

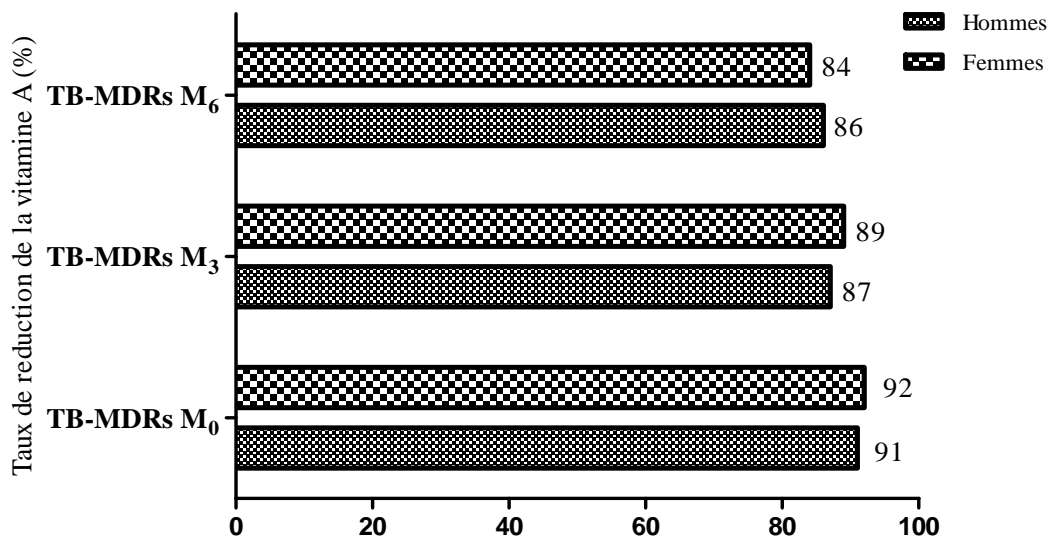


Figure 25 : Pourcentage de réduction de la vitamine A chez les TB-MDRs

Pourcentages de réduction de la vitamine A chez les tuberculeux multirésistants aux différents stades du suivi par rapport aux témoins volontaires non tuberculeux.

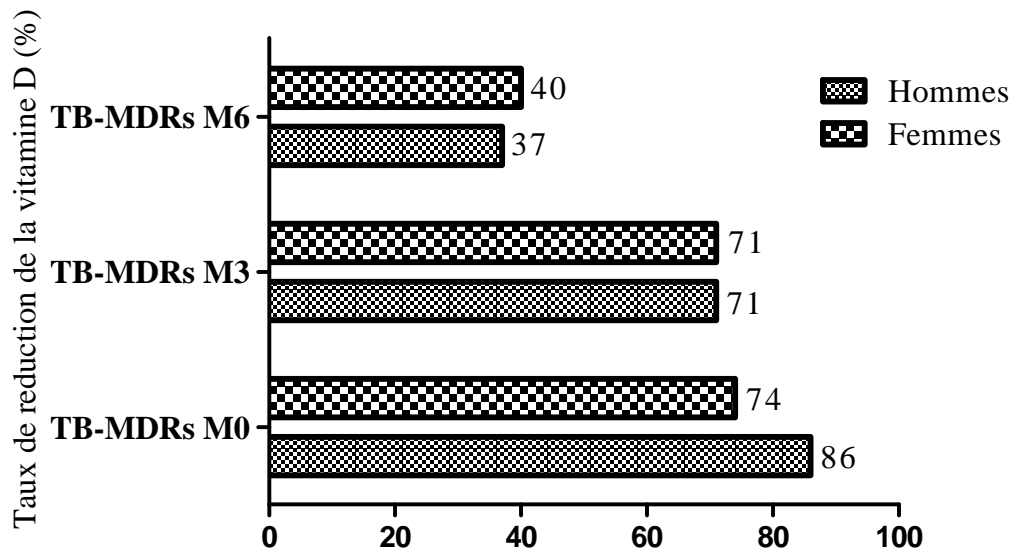


Figure 26 : Pourcentage de réduction de la vitamine D chez les TB-MDRs

Pourcentages de réduction de la vitamine D chez les tuberculeux multirésistants aux différents stades du suivi par rapport aux témoins volontaires non tuberculeux.

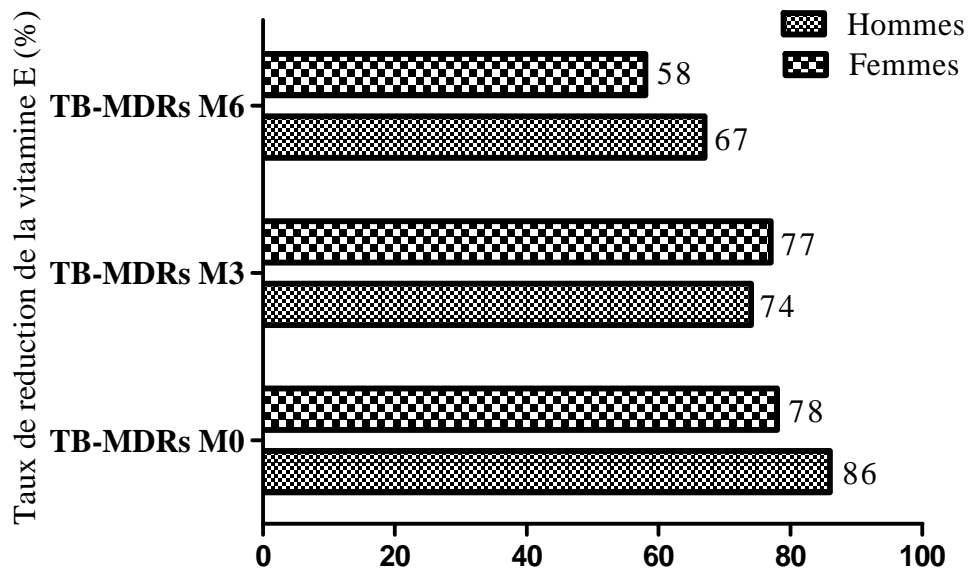


Figure 27 : Pourcentage de réduction de la vitamine E chez les TB-MDRs

Pourcentages de réduction de la vitamine E chez les tuberculeux multirésistants aux différents stades du suivi par rapport aux témoins volontaires non tuberculeux.

Tableau XVII : Analyse comparative des concentrations en vitamines selon le stade de suivi des TB-MDRs

		TB-MDRs M ₀	TB-MDRs M ₃	P	TB-MDRs M ₆	P
HOMMES	Vitamine A (Réf.:0,35 - 1,75 µmol/L)	0,10 ± 0,02	0,14 ± 0,02*	P	0,15 ± 0,14*	P
	Vitamine D (Réf.:60 - 105 nmol/L)	13 ± 2,60	26 ± 5,20*	0,0001	57 ± 2,60*	0,0001
	Vitamine E (18 - 29 µmol/L)	3 ± 0,90	6 ± 1,47*	0,0001	7 ± 3,68*	0,0001
FEMMES	Vitamine A (Réf.:0,35 - 1,75 µmol/L)	0,08 ± 0,04	0,12 ± 0,08*	0,001	0,14 ± 0,17*	0,001
	Vitamine D (Réf.:60 - 105 nmol/L)	5 ± 2,60	26 ± 5,80*	0,0001	54 ± 2,60*	0,0001
	Vitamine E (Réf. : 18 - 29µmol/L)	5 ± 1,71	5 ± 1,35*	0,0001	10 ± 3,48*	0,0001

Réf : Valeurs de Références

M₀ : Bilan initial.

M₃ : Bilan de suivi à 3 mois de traitement.

M₆ : Bilan de suivi à 6 mois de traitement.

* : Différence significative entre les stades M₀ et M₃, M₆, P < 0,05.

Tableau XVIII: Analyse comparative des concentrations vitaminiques selon le sexe chez les TB-MDRs

	TB-MDRs M ₀			TB-MDRs M ₃			TB-MDRs M ₆		
	Hommes	femmes	P	Hommes	Femmes	P	Hommes	Femmes	P
Vit A (µmol/L)	0,10 ± 0,017	0,08 ± 0,038*	P = 0,002	0,14 ± 0,024	0,12 ± 0,084*	P = 0,001	0,15 ± 0,140	0,14 ± 0,174*	P = 0,003
Vit D (nmol/L)	13 ± 2,599	5 ± 2,599 *	P = 0,009	26 ± 5,198	26 ± 5,797	P < 0,927	57 ± 2,599	56 ± 2,599	P = 0,125
Vit E (µmol/L)	3 ± 0,901	5 ± 1,711*	P = 0,030	6 ± 1,467	6 ± 1,346*	P = 0,002	8 ± 3,676	19 ± 3,483*	P = 0,008

Analyses comparatives des concentration des vitamines A, D et E chez les tuberculeux multirésistants (TB-MDRs) selon les sexes et à différents stades du suivi de ces patients. M₀ : bilan initial. M₃ et M₆ : bilan de suivi à 3 et 6 mois de traitement. * : Differences significatives des concentrations vitaminiques entre les sexes chez les TB-MDRs, P < 0,05.

3.2- Discussion

Il ressort de cette étude, une baisse significative des concentrations des marqueurs hématologiques tels que le taux d'hémoglobine (Hb), le volume globulaire moyen (VGM), les concentrations corpusculaires moyennes en hémoglobine (CCMH) et les teneurs corpusculaires moyennes en hémoglobine (TCMH) chez les tuberculeux multirésistants (TB-MDRs) comparativement aux témoins non tuberculeux. Ces résultats définissent le caractère microcytaire et hypochrome de l'anémie constatée chez ces TBMR. Plusieurs auteurs ont rapporté une anémie chez des tuberculeux en cours de traitement même si ces études n'ont pas été précises sur le type d'anémie (**Devi et al., 2003 ; Kotru et al., 2004 ; Tritar et al., 2005 ; Chen et al., 2010**). Ces résultats traduisent un déficit d'approvisionnement en fer du processus érythroïétique.

Par ailleurs, l'analyse des paramètres biochimiques du métabolisme du fer a montré une baisse significative des concentrations sériques du fer et de la capacité totale de fixation du fer à la transferrine (CTF) chez les tuberculeux multirésistants (TB-MDRs) comparativement aux témoins non tuberculeux et aux valeurs normales. Tandis que le taux de ferritine sérique et le coefficient de saturation de la transferrine (CS) sont restés dans la gamme des valeurs normales. Ces résultats sont caractéristiques d'une anémie inflammatoire ou anémie des maladie chroniques comme l'ont rapporté plusieurs travaux (**Celi et al., 2011; Gavazzi, 2014**). Ce type d'anémie serait dû non pas à une carence en fer mais plutôt à un déficit fonctionnel du fer. En effet les valeurs normales de la ferritine qui représente le pool de réserve traduiraient une absence de carence en fer tandis que les faibles valeurs du CTF qui est le pool de fer fonctionnel caractériseraient un déficit fonctionnel du fer disponible (**Marioa, 2012**). Ces résultats sont en accord avec ceux de **Lovey et al., (2010)** qui ont montré qu'une ferritinémie supérieure à 100 µg/L exclu l'hypothèse d'une carence en fer et que le coefficient de saturation de la transferrine (CS) ne diminue que lorsque les réserves en fer sont totalement épuisées. Par contre les faibles concentrations en fer sérique et la diminution de la capacité totale de fixation du fer à la transferrine (CTF) pourraient s'expliquer par deux mécanismes. D'une part, du fait d'une forte rétention du fer issu de la destruction de l'hémoglobine dans les macrophages et d'autre part la diminution de la fourniture du fer à l'érythropoïèse au cours de l'inflammation chronique induite par l'infection Mycobactérienne (**Beaumont et Karim, 2013**).

Les mécanismes conduisant à l'instauration de ce type d'anémie passent par la production de diverses cytokines notamment l'interféron- γ , le TNF- α et les interleukines 1 et 10 qui entraîneraient la séquestration du fer issu de la dégradation des globules rouges

par les macrophages et la répression de la synthèse de l'érythropoïétine. Ce processus serait amplifié par une synthèse excessive de l'hepcidine, une protéine pro-inflammatoire majoritairement produite par l'hépatocyte et excrétée dans le courant sanguin. Cette protéine interagirait avec la ferroportine qui est l'exportateur du fer présent dans les entérocytes et les macrophages provoquant la dégradation de cette dernière. Ceci conduirait à une baisse de l'absorption intestinale du fer et à une rétention du fer dans les macrophages et les hépatocytes, les deux principales voies de fourniture du fer à l'organisme (Celi *et al.*, 2011). Cet ensemble de mécanismes favoriserait la diminution de la concentration du fer sérique et la capacité de fixation du fer à la transferrine (Mariao, 2012). Cette difficulté de mobilisation du fer à partir des réserves entraînerait une diminution de la synthèse de l'hémoglobine, d'où le caractère hypochrome de l'anémie (faible concentration en hémoglobine). Parallèlement, l'on assiste à une augmentation réactionnelle du nombre de mitoses avec comme conséquence, une production de globules rouges de petite taille traduite par le caractère microcytaire de l'anémie (volume globulaire moyen, VGM bas). Quant à la baisse de la capacité totale de fixation du fer à la transferrine (CTF), elle serait due à une diminution du taux de la transferrine plasmatique. En effet, au cours de l'inflammation, la réduction du taux de cette protéine de transport du fer plasmatique est liée d'une part à son hypercatabolisme dans le foyer inflammatoire et d'autre part à la diminution de sa synthèse du fait des réserves en fer pleines, ce dont témoigne les concentrations normales de la ferritine sérique (Lovey *et al.*, 2010).

Toutefois, la légère augmentation des concentrations en fer sérique au cours du traitement antituberculeux de seconde ligne chez les TB-MDRs est contraire aux travaux de Edem *et al.*, (2015) qui ont montré une diminution progressive de ces concentrations en fer chez les tuberculeux au cours du traitement de première ligne. Cette observation serait due au fait que les molécules antituberculeuses de seconde ligne n'auraient aucune action hémolytique chez les TB-MDRs contrairement à celles de première ligne telle que la Rifampicine (Aouam *et al.*, 2007).

Par ailleurs, malgré la hausse significative des concentrations en fer et des valeurs du CTF au cours du traitement, les pourcentages de réduction de ces marqueurs sont tout de même restés élevés après les six mois de traitement (M₆) par rapport aux témoins non tuberculeux. Ce qui pourrait suggérer une inaction des molécules antituberculeux de seconde ligne sur le processus inflammatoire engendré par le bacille *Mycobacterium tuberculosis*.

Notre étude a également montré une baisse des concentrations en zinc chez les TB-MDRs comparativement aux témoins non tuberculeux. Ces faibles concentrations en zinc sont

en conformité avec les résultats de **Edem et al. (2015)** qui ont montré chez des tuberculeux, de faibles teneurs en zinc avec une augmentation de ces concentrations après respectivement 4 et 6 mois de traitement. Ces auteurs ont indiqué que les faibles concentrations en zinc par rapport aux valeurs usuelles s'expliqueraient par une redistribution du zinc circulant dans d'autres tissus, notamment les tissus hépatiques; cela serait dû à une réduction de la production hépatique de l' α -2-macroglobuline (une protéine porteuse du zinc dans le sang) en faveur d'une forte production de la métallothionine qui est une protéine transportant le zinc au niveau hépatique (**Edem et al., 2015**). Cette baisse des concentrations en zinc pourrait également s'expliquer par une excrétion urinaire du zinc due à l'état inflammatoire aiguë et chronique (**Irfan et al., 2011**). L'insuffisance en zinc chez les tuberculeux multirésistants pourrait avoir un impact négatif sur le système immunitaire. En effet, une insuffisance en zinc est responsable d'une altération de la fonction macrophagique et d'une réduction de la production du facteur de nécrose tumoral (TNF- α) et de l'interféron- γ (INF- γ). Des concentrations insuffisantes en Zinc sont également responsables de la diminution de la prolifération et de la différenciation des lymphocytes T et B (**Anuraj et Ananda, 1998 ; Ananda, 2009 ; Rajendra et al., 2012**). Ces facteurs de l'immunité seraient en première ligne dans la performance des défenses immunitaires et la protection contre la tuberculose active (**Wintergerst et al., 2007**). De plus il a été rapporté qu'une supplémentation en zinc et en vitamine A chez des patients adultes souffrant d'une tuberculose active permettait une élimination des Mycobactéries, entraînant une guérison plus rapide de ces patients (**Karyadi et al., 2002**). Cette insuffisance en zinc pourrait donc expliquer la longue durée du traitement antituberculeux de seconde ligne chez les TB-MDRs.

Des concentrations normales en cuivre ont été observées chez les TB-MDRs avec ou sans traitement antituberculeux comparativement aux témoins et aux valeurs usuelles au cours de ce travail. Ces concentrations normales en cuivre pourraient s'expliquer par la non spécificité de la synthèse des protéines de transport du cuivre notamment la céruloplasmine comme l'ont démontré les travaux de **Kassu et al. (2006)**.

En revanche, des valeurs élevées du ratio Cu/Zn chez les TB-MDRs comparativement aux témoins ont été obtenues dans cette étude. Ces ratios Cu/Zn sont en conformité avec des valeurs élevées du ratio Cu/Zn chez des patients souffrant d'une tuberculose active rapportées par les travaux de **Ciftci et al., (2003)**. Ces taux élevés du ratio Cu/Zn seraient dus à l'effondrement des concentrations en zinc; ce qui traduirait le niveau élevé du stress oxydatif chez ces patients TB-MDRs et influencerait négativement le système immunitaire (**Ananda, 2009 ; Mobaien et al., 2010**). Nos observations corroborent avec celles de **Kassu et al. (2006)** qui ont montré une augmentation du ratio Cu/Zn chez des patients

adultes atteints d'une tuberculose active. Ces auteurs estiment que le ratio Cu/Zn est un indicateur du statut nutritionnel en zinc chez ces patients avant de conclure qu'un ratio Cu/Zn supérieur à 2 est l'expression de la sévérité de l'infection bactérienne. Les analyses statistiques entre les sexes chez les TB-MDRs n'ont montré aucune différence significative pour la plus part de ces marqueurs. Ce qui suggèrerait que le métabolisme de ces oligoéléments au cours de la tuberculose multirésistante ne diffère pas d'un sexe à l'autre.

L'analyse quantitative des vitamines liposolubles a eu comme résultats, des faibles concentrations en vitamines liposolubles notamment en vitamines A, D et E chez les tuberculeux multirésistants (TB-MDRs) comparativement aux témoins non tuberculeux. Ces valeurs pourraient s'expliquer principalement par la malnutrition observée chez les sujets tuberculeux multirésistants et la malabsorption des fractions lipidiques contenant les vitamines liposolubles du fait de l'inflammation aiguë et chronique (**Rajendra et al., 2012**). Cette observation se confirmerait avec le bilan lipidique de nos résultats indiquant des faibles concentrations lipidiques chez les tuberculeux multirésistants par rapport aux témoins non tuberculeux. Des concentrations similaires en vitamines ont été rapportées par de nombreux travaux portant sur des patients ayant une tuberculose active notamment en Inde (**Irfan et al., 2011**), en Indonésie (**Karyadi et al., 2000**), au Nigeria (**Edem et al., 2015**) et en Afrique du Sud (**Hanekom et al., 1997**). En dehors de ces facteurs importants favorisant la baisse de teneurs en ces vitamines liposolubles, d'autres mécanismes plus spécifiques liés au métabolisme de chaque vitamine liposoluble pourraient également expliquer cette baisse des concentrations sériques en vitamines.

Concernant la vitamine A, la baisse de ses concentrations sériques chez les TB-MDRs serait due à une excrétion urinaire accrue de cette vitamine et une réduction de la production hépatique de ses transporteurs sériques notamment les Retinol-Binding Protein (RBP). Cette protéine serait nécessaire à la mobilisation plasmatique de la vitamine A (Rétinol) stockée au niveau du foie. Il a été rapporté qu'au cours de la phase aiguë de la maladie, il se produit une forte élimination de la vitamine A par les urines, ce qui a comme conséquences, une baisse de sa teneur. Le niveau élevé de stress oxydant conduisant à une grande production des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote au cours de l'infection Mycobactérienne pourrait également expliquer la réduction des valeurs sériques de cette vitamine aussi considérée comme un puissant antioxydant. En effet selon les études de **Irfan et al. (2011)** la combinaison de son élimination urinaire et de son catabolisme accru au niveau des tissus peut contribuer à réduire ses concentrations chez des sujet ayant une tuberculose active. Aussi, une carence en zinc pourrait-elle être à l'origine de ce déficit en

vitamine A à travers une réduction de l'activation de la synthèse des récepteurs solubles (RBP) de cette vitamine entraînant une réduction de sa mobilisation plasmatique à partir du foie (**Brown et al., 1976 ; Pakasi et al., 2010**).

La réduction des concentrations en vitamine D pourrait, en plus d'un apport alimentaire insuffisant, s'expliquer par un défaut de synthèse sous-cutanée de la vitamine D3 et une réduction de la synthèse de son transporteur plasmatique. En effet, une moindre exposition des patients TB-MDRs à la lumière solaire du fait de leur mise en isolement obligatoire pourrait entraîner une baisse de la production sous-cutanée de la vitamine D3. Par ailleurs, il a été rapporté que la mélanine (pigment de la peau) constituerait un écran solaire naturel et l'augmentation de cette pigmentation mélanique pourrait réduire la synthèse sous-cutanée de la vitamine D3 (**Landrier, 2014**). L'explication la plus plausible serait que des variations au niveau du polymorphisme du gène codant pour la vitamine D Binding Protéin (VDBP) entraîneraient une réduction de cette protéine du transport plasmatique de la vitamine D au niveau du foie. Cela serait à la base de la diminution des concentrations sérique de cette vitamine. Selon **Bellamy et al. (1999)**, ces variations génétiques seraient en association avec le risque élevé de développer une tuberculose active chez les populations africaines.

L'augmentation de la phosphatémie associée à une réduction de la calcémie et une créatinémie normale caractériserait une hypoparathyroïdie secondaire, confirmant ainsi l'hypothèse d'une carence en vitamine D. En effet, les valeurs normales de la créatinémie excluraient la thèse d'une insuffisance rénale et corroboreraient celle d'une hypoparathyroïdie secondaire provoquée par l'hypovitaminose D observée chez les TB-MDRs. Nos résultats pourraient s'expliquer par le fait qu'en présence d'une carence en vitamine D, il se produit une diminution de la synthèse de la 1,25-dihydroxyvitamine D (métabolite actif de la vitamine D) entraînant une inactivation de la synthèse de la parathormone (PTH). Ceci aurait comme conséquence une baisse de l'absorption intestinale et la résorption osseuse du calcium, d'où les faibles concentrations en calcium obtenues chez ces TB-MDRs. Parallèlement à ce mécanisme, une inhibition de la production du *Fibroblast Groth Factor 23* (FGF23), une protéine hypophosphatémiant, en présence de la carence en vitamine D entraînerait une stimulation de la réabsorption tubulaire rénale du phosphore entraînant une augmentation de la phosphatémie chez ces sujets TB-MDRs (**Murry, 2011**).

L'insuffisance en vitamine E serait due principalement au niveau élevé de stress oxydant causé par une surproduction des radicaux libres d'oxygène et d'azote au cours de l'infection bactérienne. Une forte production des radicaux libres d'oxygène et d'azote avec

un niveau élevé de produits de dégradations issus des dommages causés par ces espèces réactives sur les composés cellulaires a été relevée chez les tuberculeux par de nombreuses études. En effet, de faibles concentrations en antioxydants non enzymatiques telle que la vitamine E et une augmentation des concentrations des produits issus de la peroxydation lipidique tels que l'acide thiobarbiturique et le malondialdéhyde chez des tuberculeux nouvellement diagnostiqués et non encore traités ont été rapportés par les travaux de **Vijayamalini et Manoharan (2004)**. L'évaluation du statut en antioxydant total chez des tuberculeux a montré une faible capacité antioxydante totale en rapport avec la baisse des concentrations en vitamine E chez ces patients comparativement aux témoins non tuberculeux dans une étude menée en Inde (**Bhimrao et al., 2011**). Les auteurs ont également montré une régénération du statut antioxydant total chez ces tuberculeux au cours du traitement antituberculeux accompagné d'une supplémentation en complément antioxydant contenant la vitamine E. Les raisons seraient que la production accrue des espèces réactives de l'oxygène et d'azote induite par l'inflammation aiguë et chronique associée à l'infection mycobactérienne pourrait être à l'origine d'un déséquilibre de la balance entre les pro-oxydants et les antioxydants en faveur des premiers. Ceci entraînerait une forte mobilisation des composés antioxydants dont la vitamine E, d'où la baisse des concentrations en cette vitamine chez les TB-MDRs. Ces observations sont en conformité avec nos valeurs du ratio Cu/Zn très élevées chez ces TB-MDRs.

La carence en vitamines liposolubles chez les malades TB-MDRs est plus accentuée au bilan initial (M_0) par rapport aux bilans de suivi à M_3 et M_6 . Nos résultats sont en accord avec ceux de **Edem et al., (2016)** qui ont montré une amélioration du statut micronutritionnel chez les TB-MDRs à respectivement 4 et 6 mois de traitement antituberculeux de seconde génération. Ces résultats pourraient suggérer un contrôle de la phase aiguë de la maladie avec la prise des antituberculeux de seconde génération plutôt qu'une amélioration du statut micronutritionnel chez ces sujets TB-MDRs (**Ramachandran et al., 2004**). Par ailleurs, les analyses statistiques entre les sexes ont montré que la perturbation des paramètres vitaminiques étudiés n'est pas liée au sexe puisque aucune différence significative n'a été observée pour la plupart de ces paramètres.

Les faibles concentrations en ces vitamines liposolubles pourraient être l'une des principales causes du déficit immunitaire entraînant des échecs thérapeutiques chez les tuberculeux multirésistants. Des carences en vitamines liposolubles telles que les vitamines A, D et E ont été associées à une altération des défenses immunitaires dans de nombreuses études menées sur des personnes souffrant d'une tuberculose active (**Karyadi et al., 2000** ;

Gupta et al., 2009). Leurs mécanismes de modulation du système immunitaire concerneraient aussi bien l'immunité innée que l'immunité adaptative.

Concernant les défenses immunitaires innées, la vitamine A augmenterait l'activité des macrophages, empêchant la multiplication des bacilles virulents dans les macrophages humains. Elle réduirait l'adhésion des mycobactéries aux cellules épithéliales en maintenant les fonctions de la barrière épithéliale à travers la production du mucus dans les cellules des alvéoles pulmonaires (**Wintergerst et al., 2007**). Une insuffisance en vitamine A serait en association avec une réduction de l'activité phagocytaire et le pouvoir oxydant des macrophages et pourrait également réduire le nombre des cellules Natural Killer (NK) et leur activité selon **Ramakrishnan et al. (2004)**. Cette vitamine contrôlerait aussi la production de l'Interleukine-12 (IL-12), des promoteurs de la croissance des cellules T et les cytokines pro-inflammatoires INF- α qui activeraient l'action microbicide des macrophages (**Dawson et al., 1999 ; Wang, 2005**).

Pour ce qui est de l'immunité acquise, cette vitamine liposoluble s'impliquerait aussi bien dans l'immunité cellulaire qu'humorale à travers la stimulation de la prolifération des lymphocytes T et B. Elle agirait par l'intermédiaire des acides rétinoïques tous trans, l'acide 9-cis-rétinoïque et les récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque. Ces facteurs occuperaient une place prépondérante dans la régulation des fonctions immunitaires notamment les récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque dont la prolifération des lymphocytes est sous son contrôle. Ainsi la vitamine A jouerait un rôle essentiel dans la prolifération et la différenciation des sous-ensembles des lymphocytes Th1 et Th 2 en maintenant le niveau normale de la réponse aux anticorps médiée par les cytokines Th 2 (**Kominsty et al., 2010**). Il en résulte, une suppression des cytokines pro-inflammatoires tels que les IL-12, TNF- α et INF- γ produit par la réponse Th1 en faveur d'une forte production des cytokines anti-inflammatoires (IL-4, IL-10 et IL-13) qui stimuleraient les lymphocytes B pour la sécrétion des immunoglobulines telles que IgG1, IgE, et IgA (**Cantorna et al., 1994 ; Halevy et al., 1994 ; Long et Santos, 1999**). L'insuffisance en vitamine A aurait donc comme conséquences une moindre résistance des défenses immunitaires contre les infections microbiennes (**Halevy et al., 1994**).

La mise en évidence de l'expression des récepteurs de la vitamine D (VDR) et des enzymes clés de son métabolisme, notamment la 1- α -hydroxylase dans les cellules du système immunitaire est le premier argument de l'implication de cette vitamine dans la modulation du fonctionnement des défenses immunitaires. Contrairement à la vitamine A, les effets immunostimulants de la vitamine D dans le cas des maladies infectieuses telle que la tuberculose concernerait essentielle l'immunité innée (**Viard, 2012**). Pour assurer

ses fonctions, la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (molécule active de la vitamine D) se lierait à un récepteur nucléaire, le VDR. Le complexe VDR- $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ se dirigerait vers le noyau cellulaire où il se fixerait au récepteur de l'acide rétinoïque (RXR). Ce dernier (complexe ternaire RXR-VDR- $1,25(\text{OH})_2\text{D}$) se lierait en suite à l'ADN au niveau des éléments de réponse à la vitamine D (VDRE) qui seraient proches de certains gènes qui verraient leur expression activée ou réprimée. Ce mécanisme influencerait la synthèse de diverses protéines (**Souberbielle et al., 2009**). La démonstration du rôle de la vitamine D sur le système immunitaire inné reposerait avant tout sur son action stimulatrice sur les macrophages et les cellules dendritiques. Le mécanisme d'action de cette vitamine s'expliquerait par le fait qu'elle induirait au niveau des monocytes des macrophages humains, une augmentation de l'expression de l'ARNm de la cathelicidine. Un peptide antimicrobien dont le promoteur du gène contiendrait des éléments de réponse aux facteurs de transcription de cette vitamine (**Liu et al., 2006**). En effet, selon **Nelson et al. (2010)**, la présence de la vitamine D stimulerait les récepteurs Toll Like 2 (TLR2), capables d'induire l'augmentation de l'expression des VDR et de l' $1-\alpha$ -hydroxylase dans les macrophages humains. Ces deux facteurs stimuleraient ainsi l'augmentation de l'expression de l'ARNm de la cathelicidine et partant du pouvoir bactéricide de ces cellules. La preuve de l'implication de cette vitamine dans la modulation des défenses immunitaires a été apportée par des études *in vitro*. Ces travaux ont montré que l'induction de la cathelicidine par la vitamine D augmente la capacité bactéricide des cellules phagocytaires vis-à-vis des agents pathogènes respiratoires tels *Mycobacterium tuberculosis* (**Bouchentouf, 2015**). Ce processus s'accompagnerait également du renforcement parallèle d'autres mécanismes effecteurs de défense des macrophages tels que la libération des radicaux libres et de chimiokines pro-inflammatoires (**Yamshchikov et al., 2009**). Ainsi le déficit en vitamine D ou la variation de certains gènes du polymorphisme des récepteurs de la vitamine D (VDR) seraient associé à une réduction de la performance du système immunitaire innée et à la susceptibilité élevée de développer une tuberculose active (**Bellamy et al., 1999 ; Wilkinson et al., 2000**).

L'action de la vitamine E sur le système immunitaire se trouverait essentiellement dans son rôle d'antioxydant en piégeant les radicaux libres produits au cours de l'inflammation causée par l'infection mycobactérienne. Elle serait, en effet, directement utilisée par les cellules des tissus pulmonaires pour bloquer la production des espèces réactives de l'oxygène et d'azote induite par *Mycobacterium tuberculosis* pour échapper à l'action phagocytaire des macrophages humains (**Seyedrezazadeh et al., 2006**). Ces activités favoriseraient l'action protectrice de cette vitamine sur les membranes phospholipidiques et les lipoprotéines des cellules du système immunitaire

particulièrement vulnérables au stress oxydatif. Ce rôle protecteur de cette vitamine s'expliquerait par la conversion des radicaux superoxyde, hydroxyle et peroxy en des formes moins actives (**Wintergerst *et al.*, 2007 ; Vijayamalini et Manoharan, 2004**). Par ailleurs, il a été indiqué qu'une supplémentation en cette vitamine augmenterait la prolifération lymphocytaire, la production de l'IL-2, l'activité des cellules Naturels Killers (NK) cytotoxiques et l'activité phagocytaire de alvéoles macrophagiques (**Pawar *et al.*, 2011 ; Kaur *et al.*, 2005**). Selon **Meydani *et al.* (2005)**, des concentrations plus élevées en vitamine E contribuent à promouvoir la réponse médiée par le cytokine Th2 au détriment de celle de Th1 pro-inflammatoire. D'autres études ont indiqué que la Vitamine E possède des effets régulateurs sur les cellules T CD4 et T CD8 et sur la production des interleukines Il-2 (**Hernandez *et al.*, 2008**).

IV-CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La prise en charge de la tuberculose multirésistante est devenue un problème majeur de santé publique du fait des taux élevés d'échec thérapeutique. Ces échecs thérapeutiques sont dûs, en plus de la mauvaise observance, à un déficit immunitaire et à l'anémie chez ces personnes atteintes d'une TB-MDR. En vue d'améliorer la prise en charge médicale de ces patients, le statut micronutritionnel représente un volet essentiel d'évaluation de la performance des défenses immunitaires de ces TB-MDRs et partant du succès du traitement antituberculeux de seconde ligne.

Il ressort de cette étude une baisse significative des concentrations sériques en fer, en zinc, et en vitamines liposolubles telles que les vitamines A, D et E chez les tuberculeux multirésistants au bilan initial. Ce statut micronutritionnel a connu une légère amélioration du fait du contrôle de la phase aiguë de l'infection avec la prise des antituberculeux de seconde génération quand bien même que les concentrations de ces micronutriments sont restées inférieures à celles des témoins.

Le caractère oxydatif de l'infection mycobactérienne à bacilles multirésistants a été également démontré au cours de cette étude à travers des niveaux du ratio Cuivre/Zinc largement supérieurs à la normale. Ce niveau élevé de stress oxydant a été confirmé par les faibles concentrations en antioxydants non enzymatiques tels que les vitamines A et E et le zinc.

Aussi les marqueurs hématologiques et biochimiques du métabolisme du fer ont permis de préciser l'origine inflammatoire de l'anémie observée chez ces tuberculeux multirésistants.

La persistance de ces désordres métaboliques après les six mois de la phase intensive du traitement antituberculeux de seconde ligne préconise des mesures additives à l'antibiothérapie. Comme mesures correctives, il serait nécessaire de faire une supplémentation en certains micronutriments essentiels notamment en vitamines A, D, E et en zinc. Cette supplémentation permettrait de stimuler les défenses immunitaires et de rétablir l'équilibre entre la production des radicaux libres et les capacités antioxydants de ces sujets tuberculeux multirésistants (TB-MDRs). En outre une prise en charge efficace du processus inflammatoire serait précieuse pour le contrôle de l'anémie observée chez ces patients. L'ensemble de ces mesures permettront de renforcer l'efficacité du traitement antituberculeux de seconde ligne et de prévenir de nouvelles résistances face aux molécules de seconde ligne. Ceci pourrait également contribuer à réduire la durée du traitement antituberculeux et d'augmenter le taux de guérison chez ces tuberculeux multirésistants.

Cependant, des études supplémentaires permettant de mieux apprécier le statut micronutritionnel de ces sujets TB-MDRs seraient nécessaires. De façon plus spécifique, il s'agira de :

- Evaluer les teneurs en métalloprotéines telles la métallothionéine et la protoporphirine zinc. Deux enzymes qui sont impliqués respectivement dans le transport plasmatique du zinc et dans la fourniture du zinc au processus erythropoéitique.
- Déterminer les concentrations sériques en Retinol Binding Protein (RBP) et l'albumine qui occupent une place importante dans le transport plasmatique de la vitamine A et qui sont en corrélation avec les concentrations sériques du rétinol.
- Evaluer les concentrations et le profil génétique de la *Vitamine D Binding Protein* (VDBP) dont les concentrations et les variations du polymorphisme du gène sont associées à la susceptibilité de développer une tuberculose active chez les populations africaines.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Abell L. L., Levy B. B. & Kendall F. E., 1958.**- Cholesterol in serum. Seligson D (ed.). Standard Methods of Clinical Chemistry. *Academic Press*, New York. **2**: 26–33.
- Achard M. E., Stafford S. L., Bokil N. J., Chartres J., Bernhardt P. V., Schembri M. A., Sweet M. J. & McEwan A.G., 2012.**- Copper redistribution in murine macrophages in response to *Salmonella* infection. *Biochemistry Journal*. **444**: 51–57.
- Allain C. C., Poon L. S. & Chan C. S., 1974.**- Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clinical Chemistry*. **20**: 470 – 475.
- Ananda S. P., 2009.**- Zinc: role in immunity, oxidative stress and chronic inflammation. *Clinical Nutrition and Metabolic Care*, **12**: 646–652.
- Anderson G.J., Frazer D.M., McKie A.T., Vulpe C.D. & Smith A., 2005.**- Mechanisms of haem and non-haem iron absorption: lessons from inherited disorders of iron metabolism. *Biometals*.**18**: 339–348.
- Andrews N. C., 1999.**- Disorders of iron metabolism. *The New England Journal of Medicine* **341**: 1986–1995.
- Anonyme 1, 2012.** Programme National de Lutte Contre la Tuberculose (PNLT), Plan stratégique national 2012 – 2015 de lutte contre la Tuberculose. **65 P.**
- Anonyme 2, 2011.**- Programme National de Lutte contre la Tuberculose (PNLT). Directives nationales de prise en charge thérapeutique de la tuberculose. **8 P.**
- Anonyme 3, 2015.**- Centre d'Expertise en Analyse Environnementale du Québec (CEAEQ). Protocole pour la validation d'une méthode d'analyse en chimie, DR-12-VMC, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques. Québec, Canada. **29 P.**
- Anuraj H. S. & Ananda S. P., 1998.**- Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. *The American Journal of Clinical Nutrition*. **68**: 447–463.
- Aouam, K., Chaabane A., Loussaïef C., Romdhane F. B., Boughattas N.-A. & Chakroun M., 2007.**- Les effets indésirables des antituberculeux: épidémiologie, mécanismes et conduite à tenir. *Médecine et Maladies Infectieuses*. **37**: 253–261.
- Badid N., 2012.**- Stress oxydant et profil nutritionnel chez une population de femmes atteints de Cancer du sein dans la région de Tlemcen. Thèse de Doctorat de l'Université ABOU BEKR BELKAID Tlemcen, Tunisie. **226 P.**

- Banjoko S. O., Oseni F. A., Togun R. A., Onayemi O., Emma-Onkon B. O. & Fakunle J. B., 2012.-** Iron status in HIV-1 infection: implications in disease pathology. *BMC Clinical Pathology* **12**: 26–32.
- Bauduer F., 2009.-** Anémies par troubles du métabolisme du fer. *Encyclopedie de Medecine Chirurgie, Hématologie*. **13**: 6–50.
- Beaumont C. & Karim Z., 2013.-** Actualité du métabolisme du fer. *Revue de Médecine Interne*. **34**: 17–25.
- Beck F. W., Prasad A. S., Kaplan J., Fitzgerald J. T. & Brewer G. J., 1997.-** Changes in cytokine production and T cell subpopulations in experimentally induced zinc deficient humans. *American Journal of Physiology*. **272**: 1002–1007.
- Bellamy R., Ruwende C., Corrah T., McAdam K. P. W. J., Thursz M., Whittle H. C., Hill A. V. S., 1999.-** Tuberculosis and chronic hepatitis B virus infection in Africans and variation in the vitamin D receptor gene. *The Journal of Infectious Diseases*. **179**: 721–724.
- Bellovino D., Apreda M., Gragnoli S., Massimi M. & Gaetani S., 2003.-** Vitamin A transport: in vitro models for the study of RBP secretion. *Molecular Aspects of Medicine*. **24**: 411–420.
- Bhimrao D. P., Adinath N. S. & Archana S. K., 2011.-** Effect of micronutrients supplementation on oxidative stress and antioxidant status in pulmonary tuberculosis. *Biomedical Research*. **22**: 455–459
- Bouchentouf R., 2015.-** Vitamine D et pathologies respiratoires. *Journal franco-vietnamien de Pneumologie*. **17**: 1–53.
- Boyvin L., M'boh G., Ake-Edjeme A., Soumahoro-Agbo M. K., Seri K. L. & Djaman J., 2013.-** Serum level of two antioxidant vitamins (A and E) in ivorian (Cote d'Ivoire) people living with human immunodeficiency virus. *Annals of Biological Research*. **4**: 48–54.
- Briot K., Audran M., Cortet B., Fardellone P., Marcelli C., Orcel P., Vellas B., Thomas T., Roux C. 2009.-** Vitamine D : effet osseux et extra osseux ; recommandations de bon usage. *Presse Medecine*. **38**: 43–54.

- Brown E. D., Chan W. & Smith J. C. Jr., 1976.**- Vitamin A metabolism during the repletion of zinc deficient rats. *Journal of Nutrition*. **106**: 563–568.
- Canaud B., 2008.**- Elévation de la créatininémie - Orientation diagnostique. *Revue du Praticien*. **58**: 1837–4618.
- Cantorna M. T., Nashold F. E. & Hayes C., 1994.**- In vitamin A deficiency multiple mechanism establish a regulatory T helper cell imbalance with excess Th1 and insufficient Th2 function. *The Journal of Immunology*. **152**: 1515–1522.
- Castle S., 2000.**- Clinical relevance of age-related immune dysfunction. *Clinical Infectious Diseases* **31**: 578–585.
- Cave N., 2008.**- Nutrition et immunité. Extrait de l'Encyclopédie de la nutrition clinique féline. *Edition Royal Canin*. **517 P**.
- Celi J., Samii K., Perrier A., & Remi J.-L., 2011.**- Anémie ferriprive, inflammatoire ou mixte : comment orienter le diagnostic? *Revue Médecine Suisse*. **7**: 2018–2023.
- Chan T., 1997.**- Differences in vitamin D status and calcium intake: Possible explanation for the regional variation in the prevalence of hypocalcaemia in tuberculosis. *Calcif tissue int*. **60**: 91–93.
- Chandra R. K., 1991.**- Nutrition and immunity: lessons from the past and new insights into the future. *American Journal of Clinical Nutrition*. **53**: 1087–1101.
- Chang K. C., Yew W. W. & Zhang Y., 2011.**- Pyrazinamide susceptibility testing in *Mycobacterium tuberculosis*: A systematic review with meta-analyses. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. **55**: 4499–4505.
- Chen H.-C., Huang T., Wang H.-C., 2010.**- Severe hemolytic anemia due to active pulmonary tuberculosis. *Fooyin Journal of Health Sciences*. **2**: 113–116.
- Chocano-Bedoya P. & Ronnenberg A. G., 2009.**- Vitamin D and tuberculosis. *Nutrition Review* **67**: 289–293.
- Ciftci T.U., Ciftci B., Yis Ö., Guney Y., Bilgihan A., & Ogretensoy M., 2003.**- Changes in serum selenium, copper, zinc levels and Cu/Zn ratio in patients with pulmonary tuberculosis during therapy. *Biological Trace Element Research*. **95**: 65–71.

- Crowle A. J. & Ross E. J., 1989.**- Inhibition of retinal acid of multiplication on virulent tubercle bacilli in cultured human macrophages. *Infection and Immunity*. **57**: 840–844
- Dawson H. D., Li N. Q., Deciccio K. L., Nibert J. A. & Ross A. C., 1999.**- Chronic marginal vitamin A status reduces natural killer cell number and activity and function in aging Lewis rats. *Journal of Nutrition*. **129**: 1510–1517.
- Dede F., Yilmaz B., Ayli D., Kayataş M., Atilgan G. & Caner S., 2008.**- Acute tubulointerstitial nephritis associated with diffuse large B-cell lymphoma presenting as acute renal failure. *Renal Failure*. **30**: 465–467.
- Devi U., Rao C. M., Srivastava V. K., Rath P. K. & Bhabani S., 2003.**- Effect of iron supplementation on mild to moderate anaemia in pulmonary tuberculosis. *British Journal of Nutrition*. **90**: 541–550.
- Donovan A., Brownlie A., Zhou Y., Shepard J., Pratt S. J. & Moynihan J., 2000.**- Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature*. **403**: 776–781.
- Dubois S., McGovern M. & Ehrhardt V., 1988.**- Eisenstoffwechsel-Diagnostik mit Boehringer Mannheim/Hitachi-Analysen systemen: Ferritin, Transferrin und Eisen. *GIT Labor-Medizin*, **9**: 468–471.
- Dusso A. S., Brown A. J. & Slatopolsky E. 2005.**- Vitamin D. *American Journal of Physiology – Renal Physiology*. **289**: 8–28.
- Edem V. F., Ige O. & Arinola, O. G., 2015.**- Plasma vitamins and essential trace elements in newly diagnosed pulmonary tuberculosis patients and at different durations of anti-tuberculosis chemotherapy. *Egyptian Journal of Chest Diseases and Tuberculosis*. **64**: 675–679
- Edem V. F., Ige O. & Arinola O. G., 2016.** Plasma vitamins and essential trace elements in multi-drug resistant tuberculosis patients before and during chemotherapy. *Egyptian Journal of Chest Diseases and Tuberculosis*. **65**: 441–445.
- Eklund D., Persson H. L., Larsson M., Welin A., Idh J., Paues J., Fransson S-G., Stendahl O., Schön T. & Lerm M., 2013.**- Vitamin D enhances IL-1b secretion and restricts growth of Mycobacterium tuberculosis in macrophages from TB patients. *International Journal of Mycobacteriology*. **2**: 18–25.

- Endres R. K. & Rude D. B., 2006.-** Mineral and Bone Metabolism. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns ED, eds. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, 4th ed. St. Louis (MO): *Saunders Elsevier* : 1891–1965.
- Espasa M, Salvadó M, Vicente E, Tudó G, Alcaide F, Coll P, Martín-Casabona N, Torra M., Fontanals D. & González-Martín J., 2012.-** Evaluation of the VersaTREK system compared to the Bactec MGIT 960 system for firstline drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*. **50**: 488–491.
- Ford, E. S. & Sowell, A., 1999.-** Serum alpha-tocopherol status in the United States population: findings from the third national health and nutrition examination survey. *American Journal of Epidemiology*. **150**: 290–300.
- Fossati P. & Principe L., 1982.-** Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clinical chemistry*. **28**: 2077–2080.
- Fraker P. J., King L. E., Laakko T. & Vollmer T. L., 2000.-** The dynamic link between the integrity of the immune system and zinc status. *Journal of Nutrition*. **130**: 1399–1406.
- Freeman J., Wilson K., Spears R., Shalhoub V., and Sibley P., 2014.-** Influence of Vitamin D Binding Protein on Accuracy of 25-Hydroxyvitamin D Measurement Using the ADVIA Centaur Vitamin D Total Assay. *International Journal of Endocrinology*. **2014**: 1-12.
- Friedewald W.T., Levy R. I. & Fredrickson D. S., 1972.-** Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical. Chemistry*. **18**: 499–502.
- Gao C-H., Chen P-C., Yeh M-S., Hsiung D-Y. & Wang C-L., 2011.-** Cu/Zn ratios are associated with nutritional status, oxidative stress, inflammation, and immune abnormalities in patients on peritoneal dialysis. *Clinical. Biochemistry*. **44**: 275–280.
- Gavazzi G., 2014.-** Métabolisme du fer : physiopathologie et biomarqueurs chez le sujet âgé. *Geriatric et psychologie neuropsychiatrie du vieillissement*. **12**: 5–10.
- Guillet-Caruba C., Martinez V. & Doucet-Populaire F., 2014.-** Les nouveaux outils de diagnostic microbiologique de la tuberculose maladie. *Revue de Médecine Interne*. **35**: 794– 800.

- Gupta A., Kaul A., Tsolaki A. G., Kishore U. & Bhakta S., 2012.-** Mycobacterium tuberculosis: immune evasion, latency and reactivation. *Immunobiology*. **217**: 363–374.
- Gupta K. B., Gupta R., Atreja A., Verma M. & Vishvkarma S., 2009.-** Tuberculosis and nutrition. *Lung India*. **26**: 9–16.
- Halevy, O., Arazi, Y., Melamed, D., Friedman, A. & Sklan, D., 1994.-** Retinoic acid receptor-alpha gene expression is modulated by dietary vitamin A and by retinoic acid in chicken T lymphocytes. *Journal of Nutrition*, **124**: 2139–2146.
- Hanekom W.A., Potgieter S., Malan H., Kessow G., Hussey G. D. & Hughes E. J., 1997.-** Vitamin A status and therapy in childhood pulmonary tuberculosis. *Journal of Pediatrics*. **131**: 925–927
- Haynes L. P., Mc Cue H. V. & Burgoyne R. D., 2012.-** Evaluation and functional diversity of the calcium Binding Proteins (CaBPs). *Frontiers in Molecular Neuroscience*. **5**: 9–25.
- Heidelberger M. & Kendall F. E., 1935.-** A quantitative theory of the precipitin reaction. *Journal of Experimental Medicin*. **62**: 697–720.
- Heijboer A. C., Blankenstein M. A., Kema I. P. & Buijs M. M., 2012.-** Accuracy of 6 Routine 25-Hydroxyvitamin D Assays; Influence of Vitamin D Binding Protein Concentration, *Clinical Chemistry*. **58**: 543–548.
- Helb D, Jones M, Story E, Boehme C, Wallace E, Ho K, Kop J, Owens M. R., Rodgers R., Banada P., Safi H., Blakemore R., Ngoc Lan N. T., Jones-López E. C., Levi M., Burday M., Ayakaka I., Mugerwa R. D., McMillan B., Winn-Deen E., Christel L., Dailey P., Perkins M. D., Persing D. H. & David Alland D., 2010.-** Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology. *Journal of Clinical. Microbiology*. **48**: 229–237.
- Henry R., 1974.-** Clinical Chemistry: Principles and Technics, 2nd ed.. New York, NY: *Harper & Row*. **723 P**.
- Herklotz R. & Huber A., 2010.-** Diagnostic de laboratoire des troubles du métabolisme du fer. *Forum Médecine. Suisse*. **10**: 500–507.

- Hernandez J., Garibay-Escobar A., Mendoza-Mendoza A., Pinelli-Saavedra A. & Valenzuela O., 2008.**- Effect of exogenous vitamin E on proliferation and cytokine production in peripheral blood mononuclear cells from patients with tuberculosis. *British Journal of Nutrition*, **99**: 224–229.
- Holick M. F., 2007.**- Vitamin D Deficiency. *The new england journal of medicine*, **357**: 266–281.
- Holick M. F. & Chen T. C. 2008.**- Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *American Journal of Clinical. Nutrition*. **87**: 1080–1086.
- Irfan A, Srivastava VK, Prasad M, Yusuf M, Safia, Saleen M & Wahid A, 2011.**
Deficiency of micronutrient status in pulmonary tuberculosis patients in North India, *Biomedecal Research.. 22*: 449–454.
- Isanaka S., Mugusi F., Urassa W., Willett W. C., Bosch R. J. Villamor E., Spiegelman D., Duggan C. & Fawzi W. W., 2011.**- Iron deficiency and anemia predict mortality in patients with tuberculosis. *The Journal of Nutrition*, **142**: 350–357.
- James R., Gregg A., Battelle D. & McKermen J., 2011.**- Environnemental technology verification report ETV Advanced Monitoring Systems Center. Zeu-Immunotec, S.L. Microcystin Test Kit : Microsystest, Paris, France. **24 P**.
- Jaouen K., 2013.**- Les isotopes stables des métaux de transition (Cu, Fe, Zn) au service de l’anthropologie. Thèse de Doctorat de l’Ecole normale supérieur de Lyon, Université de Lyon, France. **359 P**.
- Karyadi E., Schultink W., Nelwan R. H. H., Gross R., Amin Z., Dolmans W. M. V., Hautvast J. G. A. J. & West C. E., 2000.**- Poor micronutrient status of active pulmonary tuberculosis patients in Indonesia, *Journal of Nutrition*. **130**: 2953–2958
- Karyadi E., West C., Schultink W., Nelvan R., Gross R., Amin Z., Dolmas W., Schlebus H. & Van der Meer J., 2002.**- A double-blind, placebo-controlled study of vitamin A and zinc supplementation in persons with tuberculosis in Indonesia: Effects on clinical response and nutritional status. *American. Journal of clinical Nutrition*. **75**: 720–727.
- Kassu A., Yabutani T., Mahmoud A., Nguyen N & Huong B. T., 2006.**- Alteration in serums levels of trace elements in tuberculosis and HIV infection. *European Journal of Clinical Nutrition*. **60**: 580–586.

- Kaur K., Kishan J., Bedi G. K. & Ahiet R. S., 2005.-** Oxidants stress and antioxidants in pulmonary tuberculosis. *Chest Meeting Abstracts*. **128**: 397S-b.
- Kawaguchi R., Yu J., Honda J., Hu J., Whitelegge J., Ping P, Wiita P., Bok D. & Sun H., 2007.-** "A membrane receptor for retinol binding protein mediates cellular uptake of vitamin A." *Science*. **315**: 820–825.
- Kim M-J., Wainwright H. C., Locketz M., Bekker L-G., Walther G. B., Dittrich C., Visser A., Wang W., Hsu F-F., Wiehart U., Tsenova L., Kaplan G. & Russell D. G., 2010.-** Caseation of human tuberculosis granulomas correlates with elevated host lipid metabolism. *EMBO Molecular Medicine*. **2**: 258–274.
- King A. B. & Schwartz R., 1987.-** Effects of the anti- tuberculosis drug ethambutol on zinc absorption, turnover and distribution in rats fed diet marginal and adequate in zinc. *Journal of Nutrition*. **117**: 704–708.
- Kolia K. I., M'boh G. M., Bagré I. & Djaman A. J. (2014).-** Assessment of Serum Iron, Manganese and Cu/Zn Ratio in the Course of *falciparum* Malaria among Ivorian Patients (Côte d'Ivoire) *International Journal of Biochemistry Research & Review.*, **4**: 527–535.
- Kominsky D. J., Campbell E. L. & Colgan S. P., 2010.-** Metabolic shifts in immunity and inflammation. *Journal of Immunology*. **184**: 4062–4068.
- Kosman, D. J., 2002.-** FET3P, ceruloplasmin, and the role of copper in iron metabolism. *Advances in Protein Chemistry*. **60**: 221–269.
- Kouassi J. B., Cisse-Camara M., Sess D. E., Tiahou G. G., Monde A. A. & Djohan F. Y., 2013.-** Détermination des teneurs en fer, en calcium, en cuivre et en zinc de deux variétés de gombo. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*. **82**: 22–32.
- Kotru M., Rusia U., Sikka M., Chaturvedi S. & Jain A. K., 2004.-** Evaluation of serum ferritin in screening for iron deficiency in tuberculosis. *Annals of Hematology*. **83**: 95–100.
- Krebs N. F., 2000.-** Overview of zinc absorption and excretion in the human gastrointestinal tract. *Journal of Nutrition*. **130**: 1374–1377.
- Krishna B. G., Rajesh G., Atulya A., Manish V. & Suman V., 2009.-** Tuberculosis and nutrition, *Lung India*. **60**: 9–16.

- Kuo H. P., Ho T. C., Wang CH, Yu C. T. & Lin H. C., 1996.-** Increased production of hydrogen peroxide and expression of CD11b/CD18 on alveolar macrophages in patients with active pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis Lung Diseases*. **77**: 468–475
- Lamand M., 1974.-** Etiopathogénie des carences en oligoéléments dans les ensilages de maïs enrichis en urée et en soufre. *Annales de Recherches Vétérinaires*. **5**: 281–289
- Landrier J. F., 2011.-** Vitamine E et physiologie du tissu adipeux. *OCL*. **18**: 83–87.
- Landrier J. F., 2014.-** Vitamine D : sources, métabolisme et mécanismes d'action. *OCL*. **21**: 302–309.
- Lasocki L., Longrois D., Montravers P & Beaumont C., 2011.-** Hepcidin and anemia of the critically ill patient : bench to bedside. *Anesthesiology*. **114**: 688–694.
- Lesourd B. M., 2004.-** Nutrition: a major factor influencing immunity in the elderly. *Journal of Nutrition Health Aging*. **8**: 28–37.
- Lin S-Y. G., Desmond E., Bonato D., Gross W. & Siddiqi S., 2009.-** Multicenter evaluation of Bactec MGIT 960 system for second-line drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis complex. *Journal of Clinical Microbiology*. **47**: 3630–3634.
- Liu P. T., Stenger S., Li H. Linda Wenzel L., Tan B. H., Krutzik S. R., Ochoa M. T., Schaubert J., Wu K., Meinken C., Kamen D. L., Wagner M., Bals R., Steinmeyer A., Zügel U., Gallo R. L., Eisenberg D., Hewison M., Hollis B. W., Adams J. S., Bloom B. R. & Modlin R. L., 2006.-** Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science*. **311**: 1773–1774.
- Long K. Z. & Santos J. L., 1999.-** Vitamins and the regulation of the immune response. *Pediatric Infectious Diseases Journal*. **18**: 283–290.
- Loréal O., Bardou-Jacquet E., Island M. L., Fatih N., Doyard M. & Detivaud L., 2012a.-** Métabolisme du fer. *Cahiers de nutrition et de diététique*. **47**: 117–124.
- Loréal O., Bardou-Jacquet E., Jouanolle A.-M., Gandon Y., Deugnier Y., Brissot P. & Ropert M., 2012b.-** Métabolisme du fer et outils diagnostiques pour le clinicien. *Revue de Médecine Interne*. **33**: 3–9.
- Loréal O., Haziza-Pigeon C., Troadec M. B., Detivaud L., Turlin B. & Courselaud B., 2005.-** Hepcidin in iron metabolism. *Current Protein and Peptide Science*. **6**: 279–291.

- Lovey P.-Y., Stalder M., Zenhäusern R., & Donzé N., 2010.-** Paramètres biochimiques du métabolisme du fer. *Caduceus Express*. **12**. N° 11.
- Macallan D. C., 1999.-** Malnutrition in tuberculosis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. **34**: 153–157.
- Madebo T., Lindtjorn B., Aukrust P., Berge R. K., 2003.-** Circulating antioxidants and lipid peroxidation products in untreated tuberculosis patients in Ethiopia. *American Journal of Clinical Nutrition*. **78**: 117–122.
- Maggini S., Wintergerst E. S., Beveridge S. & Hornig D. H., 2007.-** Selected vitamins and trace elements support immune function by strengthening epithelial barriers and cellular and humoral immune responses. *British Journal of Nutrition*. **98**: 29–35.
- Mallet E., 2013.-** Dossier Vitamine D : comment mieux comprendre le métabolisme de la vitamine D ? *Réalités Pédiatriques*. **181**: 16–20.
- Maphelo D.T., 2012.-** The relationship between oral candidiasis and micronutrients deficiency in an adult TB cohort in Alexandra, Johannesburg. Master of Dentistry University of Witwatersrand, Johannesburg, Afrique du Sud. **75 P**.
- Marioa N., 2012.-** Marqueurs biologiques pour le diagnostic des troubles du métabolisme du fer. *Revue francophone des laboratoires*. **442**: 39–48.
- Martineau A. R., Honecker F. U., Wilkinson R. J. & Griffiths C. J., 2007.-** Vitamine D in the treatment of pulmonary tuberculosis. *The Journal of Steroid. Biochemistry and Molecular Biology*.: **103**: 793–798.
- Martineau A. R., Timms P. M., Bothamley G. H., Hanifa Y., Islam K., Claxton A. P., Packe G. E., Moore-Gillon J. C., Darmalingam M., Davidson R. N., Milburn H. J., Baker L. V., Barker R. D., Woodward N. J., Venton T. R., Barnes K. E., Mullett C. J., Coussens A. K., Rutterford C. M., Mein C. A., Davies G. R., Wilkinson R. J., Nikolayevskyy V., Drobniewski F. A., Eldridge S. M. & Griffiths C. J., 2011.-** High-dose vitamin D(3) during intensive-phase antimicrobial treatment of pulmonary tuberculosis : A double-blind randomised controlled trial. *Lancet*. **377**: 242–250.

- Martin-Orozco N., Touret N., Zaharik M.L., Park E., Kopelman R., Miller S, Finlay B. B., Gros P. & Grinstein S., 2006.**- Visualization of vacuolar acidification-induced transcription of genes of pathogens inside macrophages. *Molecular Biology of Cell*. **17**: 498–510.
- Matsuzaki Y., Kawaguchi E. & Morita Y., 1996.**- Evaluation of Two Kinds of Reagents for Direct Determination of HDL-Cholesterol. *Journal of Analytical Bio-Science*. **9**: 419–442
- M'boh G. M., Boyvin L., Beourou S. & Djaman A. J. (2012).**- Blood Cu/Zn Ratio in children of School Age, Living in Malaria Endemic Area in Abidjan (Côte d'Ivoire). *International Journal of child health and nutrition*. **2**: 29–33.
- McGowan M. W., Artiss J. D., Strandbergh D. R. & Zak B., 1983.**- A peroxidase-coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerides. *Clinical Chemistry*. **29**: 538–542.
- McKie A. T., Barrow D., Latunde-Dada G. O., Rolfs A., Sager G. & Mudaly E., 2001.**- An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science*. **291**: 1755–1759.
- Meydani S. N., Han S. N. & Wu D., 2005.**- Vitamin E and immune response in the aged: molecular mechanism and clinical implications. *Immunological Reviews*. **205**: 269–284.
- Miller L. V., Krebs N. F. & Hambidge K. M., 2007.**- A mathematical model of zinc absorption in humans as a function of dietary zinc and phylate. *Journal of Nutrition*. **137**: 135–141.
- Mobaien A., Hajiabdolbaghi M., Jafari S., Alipouran A., Ahmadi M., Eini P. Smits H. L., 2010.**- Serum zinc and copper concentrations in brucellosis patient. *Iranian Journal of Clinical Infectious Diseases*. **5**: 96–100.
- Monaco H. L., 2000.**- "The transthyretin-retinol-binding protein complex." *Biochimica et Biophysica. Acta*. **1482**: 65–72.
- Murry Elsa, 2011.**- Actualités sur la vitamine D et nouvelles perspectives thérapeutiques. Thèse de Doctorat en Pharmacie. Université Joseph Fourier de Grenoble, France. **125 P.**
- Nelson C. D., Renhardt T. A., Beitz D. C. & Lippolis J. D., 2010.**- In vivo activation of the intracrine vitamine D pathway in innate immune cells and mammary tissue during a bacterial infection *PloS ONE*. **5**: 1–7.

- Ng D. S. K. & Blass K. G., 1986.-** Jaffe' Reaction Products. *Journal of Clinical Chemistry in Clinical Biochemistry*. **24**: 565–570.
- N'Guessan K. R., Alagna R., Dutoziet C. C., Guei A. Coulibaly F., Seck-Angu H., Assande J-M., Cirillo D. M. & Dosso M., 2016.-** Genotyping of mutations detected with GeneXpert. *International Journal of Mycobacteriology*. **5**: 142–147.
- OMS : Organisation Mondial de la Santé, 2008.-** Principes directeurs à l'intention des programmes antituberculeux pour la prise en charge des tuberculoses pharmacorésistantes. Genève, Suisse. **276 P.**
- OMS : Organisation Mondial de la Santé, 2015.-** Global tuberculosis report. Geneva, Switzerland 20th ed. **192 P.**
- ONU : Organisation des Nations Unies, 2015.-** Projet de document final du Sommet des Nations Unies consacré à l'adoption du programme de développement pour l'après-2015. Soixante-neuvième session. New York, Etats Unis. **41 P.**
- Ormerod M. G., Sun X. M., Snowden R. T., Davies R., Fearnhead H. & Cohen G. M., 1993.-** Increased membrane permeability of apoptotic thymocytes : A flow cytometric study. *Cytometry*. **14**: 595–602.
- Pakasi T. A., Karyadi E., Suratih D. N. M., Salean M., Darmawidjaja N., Bor H., van der Velden K., Dolmans W. M. V. & van der Meer J. W. M., 2010.-** Zinc and vitamin A supplementation fails to reduce sputum conversion time in severely malnourished pulmonary tuberculosis patients in Indonesia. *Nutrition Journal*. **9**: 41.
- Park J. S., 2013.-** Recent advances in tuberculosis and nontuberculous mycobacteria lung disease. *Tuberculosis and Respiratory Diseases*. **74**: 251–255.
- Parrish N. & Carrol K., 2008.-** Importance of improved TB diagnostics in addressing the extensively drug-resistant TB crisis. *Future Microbiology* **3**: 405–413.
- Parrish N. M. & Carroll K. C., 2011.-** Role of the clinical mycobacteriology laboratory in diagnosis and management of tuberculosis in low-prevalence settings. *Journal of Clinical Microbiology*. **49**: 772–776.

- Parsons L M., Somoskövi A., Gutierrez C., Lee E., Paramasivan C. N., Abimiku A., Spector S., Roscigno G. & Nkengasong J., 2011.-** Laboratory diagnosis of tuberculosis in resource-poor countries: challenges and opportunities. *Clinical Microbiology Reviews*. **24**: 314–350.
- Perronne C., 1999.-** Tuberculosis, HIV infection, and malnutrition: an infernal trio in central Africa. *Nutrition*. **15**: 321–322.
- Pawar B. D., Suryakar A. N. & Khandelwal A. S., 2011.-** Effect of micronutrients supplementation on oxidative stress and antioxidant status in pulmonary tuberculosis. *Biomedical Research*; **22**: 455–459.
- Perronne C., 1999.-** Tuberculosis, HIV infection, and malnutrition: an infernal trio in central Africa. *Nutrition*. **15**: 321-322.
- Pietrangelo A., 2004.-** The ferroportin disease. *Blood Cells Molecules and Diseases*. **32**: 131–138.
- Pinta M., 1980.-** Spectrometry d'absorption atomique. Application à l'analyse chimique. 2nd Edition Masson. Paris, France. **696 P.**
- Pradyt Patnaik, 2004.-** Dean's Analytical Chemistry Handbook.. 2nd. Edition. McGraw-Hill Handbooks. New York, USA. **1114 p.**
- Ramachandran G, Santha T, Garg R, Baskaran D., Iliayas S. A., Venkatesan P., Fathima R. & Narayanan P. R., 2004.-** Vitamin A levels in sputum-positive pulmonary tuberculosis patients in comparison with household contacts and healthy 'normals.' *International Journal of Tuberculosis Lung Diseases*. **8**: 1130–1133
- Ramakrishnan U., Web A. L. & Ologoudou K., 2004.-** Infection, immunity, and vitamins. In Handbook of Nutrition and Immunity. Gershwin NE, Nestel P, Keen CL, editors. Totoja, NJ: *Humana Press*. **P** : 93–115.
- Rajendra P., Irfan A., Ram A. S. K., Wahid A., Mahendra K. G. & Mohd S., 2012.-** Vitamin A and Zinc Alter the Immune Function in Tuberculosis. *Kuwait Medicin Journal*. **44**: 183–189.
- Reinhard I., Maya R. & Peter E. B., 2010.-** Zinc – un oligoélément vital à grand potentiel. *Forum Médecine Suisse*. **10**: 764–768.

- Rougereau A., 1984.** Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires. Ed. Technique et documentation, France : **409 p.**
- Russell B. J., Chelton J. P. & Walsh A., 1957.-** An atomic-absorption spectrophotometer and its application to the analysis of solutions. *Spectrochimica Acta.* **8** : 317–318.
- Russell D. G., Cardona P. J., Kim M. J., Allain S. & Altare F., 2009.-** Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. *Nature Immunology.* **10**: 943–948.
- Schaaf H. S., Moll A. P. & Dheda K., 2009.-** Multidrug and extensively drug-resistant tuberculosis in Africa and South America: epidemiology, diagnosis and management in adults and children. *Clinics in Chest Medicine.* **30**: 667–683
- Schlegel P., 2010.-** Facteurs de variation de la biodisponibilité du zinc ajouté sous forme organique ou inorganique chez deux espèces monogastriques en croissance (Poulet et Porcelet). Thèse de Doctorat en nutrition animale. Institut des sciences et industries du vivant et l'environnement, Paris, France. **179 P.**
- Schön T., M. Lerm M. & Stendahl O., 2013.-** Shortening the 'short-course' therapy—insights into host immunity may contribute to new treatment strategies for tuberculosis. *Journal of Internal Medicine.* **273**: 368–382.
- Schuster I. 2011.-** Cytochromes P450 are essential players in the vitamin D signaling system. *Biochimica Biophysica Acta.* **1814**: 186–199.
- Scrimshaw N. S. & San Giovanni J. P., 1997.-** Synergism of nutrition, infection, and immunity: an overview. *American Journal of Clinical Nutrition.* **66**: 464–477.
- Semba R. D., 1998.-** The role of vitamin A and related retinoids in immune function. *Nutrition Review* **56**: S38–48.
- Seyedrezazadeh E., Ostadrahimi A. R., Mahboob S. A., Assadi Y., Ansarin K, Shakoori P. & Pourmoghaddam M., 2006.-** Vitamin E-Selenium Supplement and Clinical Responses of Active Pulmonary Tuberculosis. *Tanaffos.* **5**: 49–55.

Shah N. S., Moodley P., Babaria P., Moodley S., Ramtahal M., Richardson J., Heysell S., Li X., Moll A., Friedland G., Sturm A. W. & Gandhi N. R., 2011. Rapid diagnosis of tuberculosis and multidrug resistance by the microscopic-observation drug-susceptibility assay. *The American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **183**: 1427–1433.

Shahemabadi A. S., Hosseini A. Z., Shaghsempour S., M. R. Masjedi M. R., Rayani M. & Pouramiri M., 2007. Evaluation of T cell immune responses in multi-drug-resistant tuberculosis (MDR-TB) patients to *Mycobacterium tuberculosis* total lipid antigens. *Clinical and Experimental Immunology*, **149**: 285–294.

Sharma M, Thibert L, Chedore P, Shandro C, Jamieson F, Tyrrell G, Christianson S., Soualhine H., & Wolfe J., 2011. Canadian multicenter laboratory study for standardized second-line antimicrobial susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*. **49**: 4112–4116.

Shin S. S., Pasechnikov A. D., Gelmanova I. Y., Peremitin G. G., Strelis A. K., Mishustin S., Barnashov A., Karpeichik Y., Andreev Y. G., Golubchikova V. T., Tonkel T. P., Yanova G. V., Yedilbayev A., Rich M. L., Mukherjee J. S., Furin J. J., Atwood S., Farmer P. E. & Keshavjee S., 2007. Effets indésirables chez les patients traités pour TB-MDR à Tomsk, Russie. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. **11**: 1314–1320.

Small P. M. & Pai M., 2010. Tuberculosis diagnosis-time for a game change. *The New England Journal of Medicine*. **363**: 1070–1071.

Souberbielle J. C., Prié D., Courbebaisse M., Friedlander G., Houillier P., Maruani G., Cavalier E. & Cormier C., 2009.- Actualité sur les effets de la vitamine D et l'évaluation du statut vitaminique D. *Revue Francophone Des Laboratoires*. **414**: 31–39.

Steingart K. R., Ng V., Henry M., Hopewell P. C., Ramsay A., Cunningham J., Urbanczik R, Perkins M. D., Aziz M. A. & Pai M., 2006.- Sputum processing methods to improve the sensitivity of smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infectious Diseases*. **6**: 664–674.

Steingart K. R., Sohn H., Schiller I., Kloda L. A., Boehme C. C., Pai M. & Dendukuri N., 2013.- Xpert® MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. *Cochrane Database System Review* **1**: CD 009593.

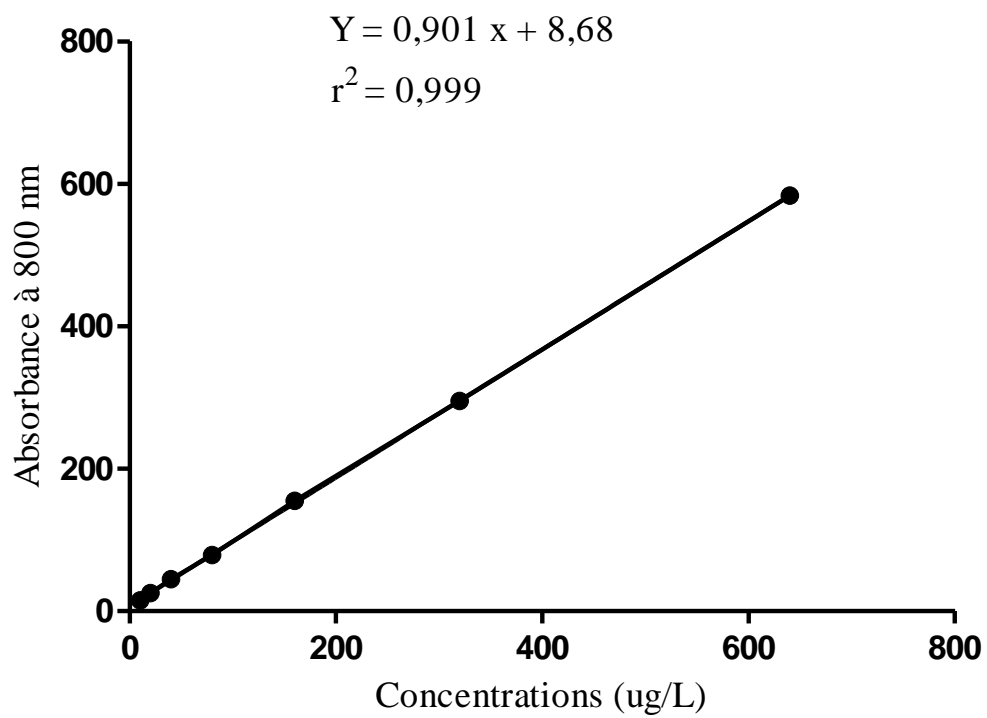
- Sugiuchi H., Uji Y., Okabe H. & Irie T., 1995.-** Direct Measurement of High-Density Lipoprotein Cholesterol in Serum with Polyethylene Glycol-Modified Enzymes and Sulfated α -Cyclodextrin. *Clinical Chemistry*. **41**: 717–723.
- Terada K., Aiba N., Yang, X. L., Iida M., Nakai M., Miura N. & Sugiyama, T., 1999.** Biliary excretion of copper in LEC rat after introduction of copper transporting p-type ATPase, ATP7B. *FEBS letters*. **448**: 53–56.
- Theron G., Peter J., Meldau R., Khalfey H., Gina P., Matinyena B., Lenders L., Gregory Calligaro G., Allwood B., Symons G., Govender U., Setshedi M. & Dheda K., 2013.-** Accuracy and impact of Xpert MTB/RIF for the diagnosis of smear-negative or sputum-scarce tuberculosis using bronchoalveolar lavage fluid. *Thorax*. **68**: 1043–1051.
- Thurnham D. I., 2005.-** An overview of interactions between micronutrients and of micronutrients with drugs, genes and immune mechanisms. *Nutrition Research Review*. **17**: 211 – 240.
- Traber M. G. & Kayden H. J., 1987.-** Tocopherol distribution and intracellular localization in human adipose tissue. *American Journal of Clinical Nutrition*. **46**: 488–495.
- Tritar F., Kahloul O., Abouda M., Dridi A., Belhaoui N., Cheikh Rouhou S., Merai S., Benmrada S., Zili M., Djenayah F., 2005.-** Troubles hématologiques observés au cours de la tuberculose active. *Revue des maladies respiratoires*, **22**. P 20.
- Turchenko L. V., Voloshchuk O. E., Ivanov V., Kalinovsky T., Niedzwiecki, A. & Rath M., 2008.-** L'amélioration clinique des patients atteints de tuberculose active avec un traitement complexe et des suppléments nutritionnels. *The Open natural Products Journal*. **1**: 20–26.
- Urbanczik R., 1985.-** Present position of microscopy and of culture in diagnostic mycobacteriology. *Zentralblatt Für Bakteriologie Mikrobiologie Hygiene Ser Med Microbiol Infectious Diseases of Virology and Parasitology*. **260**: 81–87.
- Van Lettow M., Fawzi W.W. & Semba R.D., 2003.-** Triple trouble: the role of malnutrition in tuberculosis and human immunodeficiency virus co-infection. *Nutrition Review*. **6**: 81–90.

- Van Lettow M., Harries A. D., Kumwenda J. J., Zijlstra E. E., Clark T. D., Taha T. E. & Semba R. D., 2004.-** Micronutrient malnutrition and wasting in adults with pulmonary tuberculosis with and HIV coinfection in Malawi. *BMC Infectious Diseases*. **4**: 1–8.
- Van Lettow M., Kumwenda J. J. & Harries A. D., 2004.-** Malnutrition and the severity of lung disease in adults with pulmonary tuberculosis in Malawi. *International Journal of Tuberculosis and Lung Diseases*. **8**: 211–217.
- Van Zyl-Smit R. N., Binder A., Meldau R., Mishra H., Semple P. L., Theron G., Peter J. Whitelaw A., Suren K. Sharma S. K., Robin Warren R., Eric D. Bateman E. D. & Dheda K., 2011.-** Comparison of quantitative techniques including Xpert MTB/RIF to evaluate mycobacterial burden. *Plos one*. **6**: e28815.
- Viard J. P., 2012.-** Vitamine D et pathologie infectieuse : un rôle dans les infections de la mère et de l'enfant ? *La Lettre du Gynécologue*. **375**: 35–38.
- Vidaihlet M, Mallet E & Bocquet A., 2012.-** La vitamine D : une vitamine toujours d'actualité chez l'enfant et l'adolescent. Mise au point par le comité de nutrition de la Société Française de Pédiatrie. *Archive Pédiatrique*. **19**: 316–328.
- Vijayamalini M. & Manoharan S., 2004.-** Lipid peroxidation, vitamins C, E and reduced glutathione levels in patients with pulmonary tuberculosis. *Cell Biochemistry and Function*, **22**: 192–202.
- Walker C. F. & Black R. E., 2004.-** Zinc and the risk for infectious disease. *Annual Review of Nutrition*, **24**: 255–275.
- Walsh R. J., Kooptzoff O., Dunn D. & Sohn K. S., 1955.-** Blood Groups of Koreans. *Oceania*. **25**: 194–197.
- Wan K-L., 2012.-** Evaluation of BACTEC MGIT 960 system for the second-line drugs susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis in China. *Journal of Microbiological Methods*, **91**: 212–214.
- Wang D., Grieve C. M. & Suarez D. L., 2005.-** Composition of irrigation water salinity affects growth characteristics and uptake of selenium and salt ions by soybean. *Journal of Plant Nutrition*. **28**: 1073–1088.
- Wanger A., 2000.-** Le rôle du laboratoire dans l'exploration du métabolisme du fer. *Revue de l'Acomen*, **6**: 23–27.

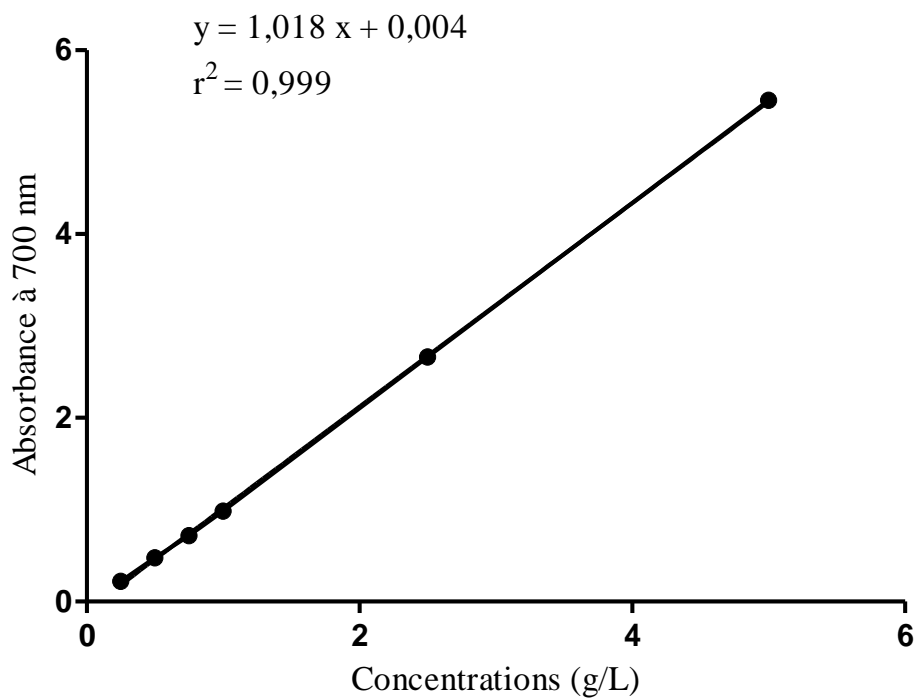
- Wanger D., Maser J., Lai B., Cai Z., Barry C. E. III, Honer Zu Bentrup K., Russell D. G. & Bermudez L. E., 2005.-** Elemental analysis of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium tuberculosis*, and *Mycobacterium smegmatis* containing phagosomes indicates pathogen-induced microenvironments within the host cell's endosomal system. *The Journal of Immunology*, **174**: 1491–1500.
- Wendel M., Paul R. & Heller A. R. 2007.-** Lipoproteins in inflammation and sepsis. II. Clinical aspects. *Intensive Care Medicine*. **33**: 25–35.
- Whalen C. & Semba R. D., 2001.-** Tuberculosis. In : Semba RD, Bloem MV, editors. Nutrition and health in developing countries. Totowa, NJ: *Human Press*. P 209-235
- White C., Lee J., Kambe T., Fritsche K. & Petris M. J., 2009.-** A role for the ATP7A copper-transporting ATPase in macrophage bactericidal activity. *Journal of Biological Chemistry*, **284**: 33949–33956.
- WHO: World Health Organization, 2011.-** Policy statement: Automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF system”, WHO, Geneva, Suisse, **22 P**.
- Wilkinson R. J., Llwelyn M., Toossi Z., Patel P., Pavsol G., Lalvani A., et al., 2000.-** Influence of vitamin D deficiency and Vitamin D receptor polymorphisms on tuberculosis among Gujarati Asians in west London: a case-control study. *Lancet*, **355**: 618–621.
- Wintergerst E. S., Maggini S. & Hornig D. H., 2007.-** Contribution of selected vitamins and trace elements to immune function. *Annals of Nutrition & Metabolism*, **51**: 301–323.
- Woimant F. & Trocello J-M., 2014.-** Disorders of heavy metals. *Handb. Clinical Neurology*, **120**: 851–864.
- Yamshchikov A.V., Desai N. S., Blumberg H. M., Ziegler T. R. Tangpricha V., 2009.-** Vitamin D for treatment and prevention of infectious diseases: A systematic review of randomized controlled trials. *Endocrine Practice*, **15**: 438–449.
- Zandecki G. Genevieve F., Gerard J. Godon A., 2007.-** Spurious counts and spurious results on heamatology analysers : a review. Part II: white blood cells red blood cells, heamoglobin, redcell indices and reticulocytes. *International Journal of Laboratory Hematology*, **29**: 21–41.

Zhao L, Xia Q, Lin N, Liu B, Zhao X, Liu Z, Gao M., Wei S. Chen Z., Wu J., Jiang Y. & Halevy O, Arazi Y., Melamed D., Friedman A. & Sklan D., 1994.- Retinoic acid receptor-alpha gene expression is modulated by dietary vitamin A and by retinoic acid in chicken T lymphocytes. *Journal of Nutrition*, **124**: 2139–2146.

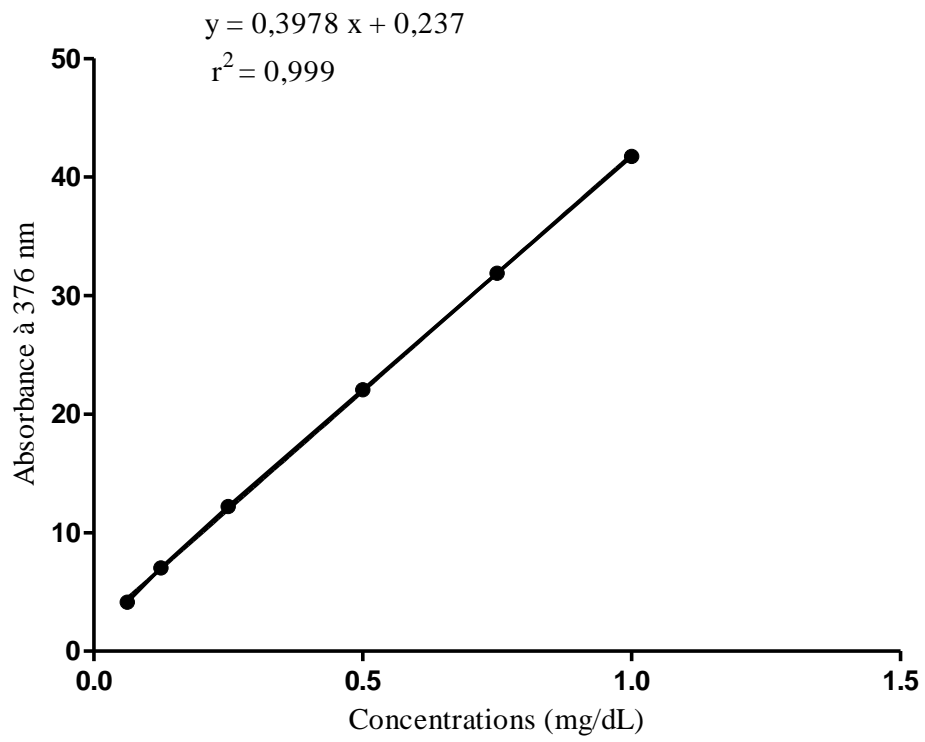
ANNEXE I : COURBES DE CALIBRATION



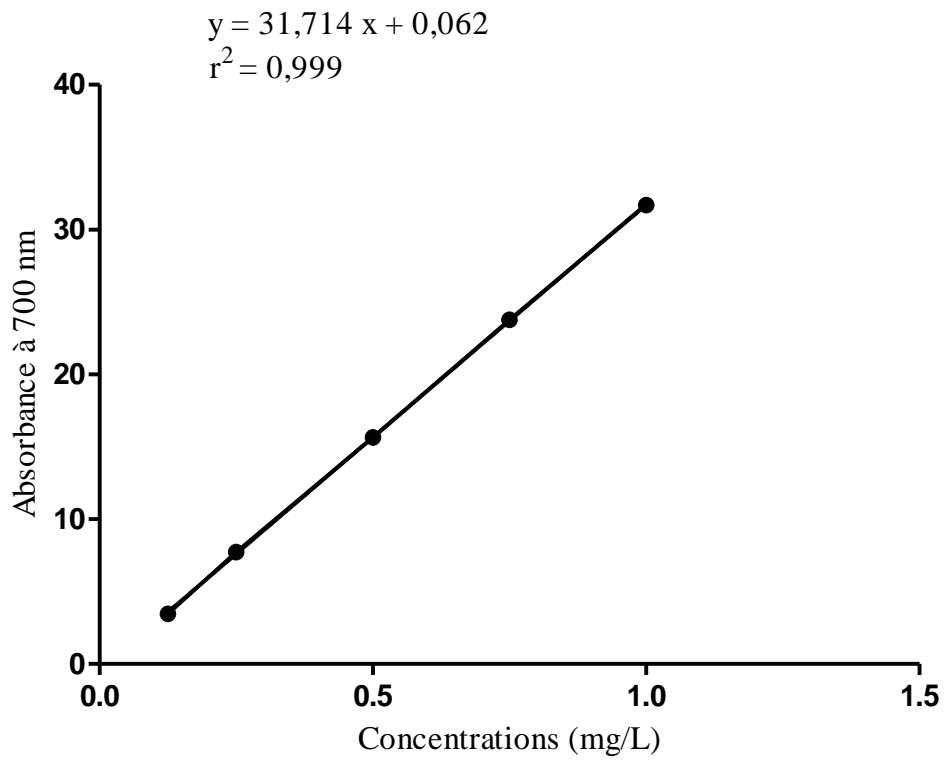
Courbe d'étalonnage de la ferritine sérique



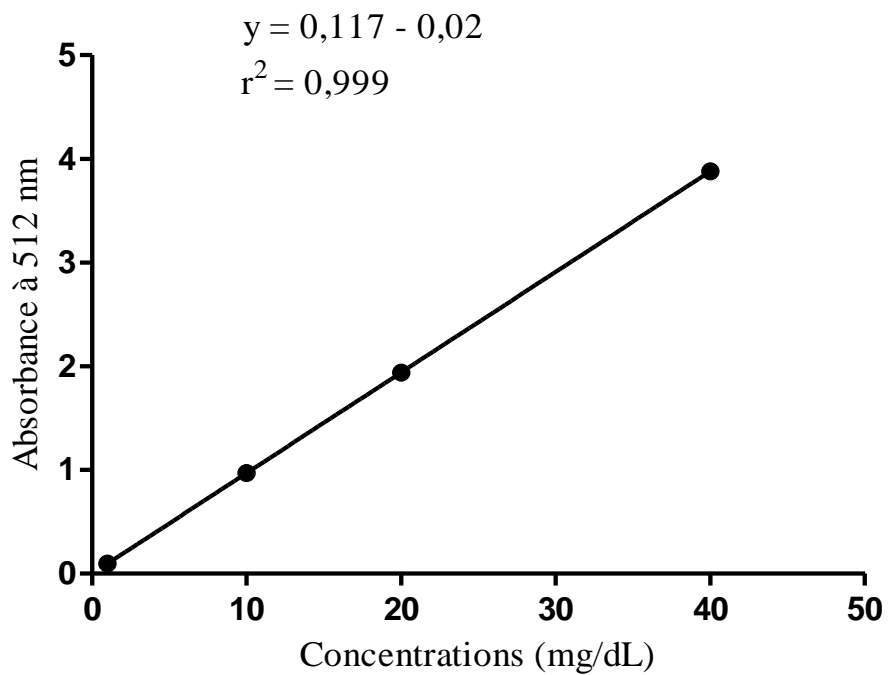
Courbe d'étalonnage de la transferrine sérique



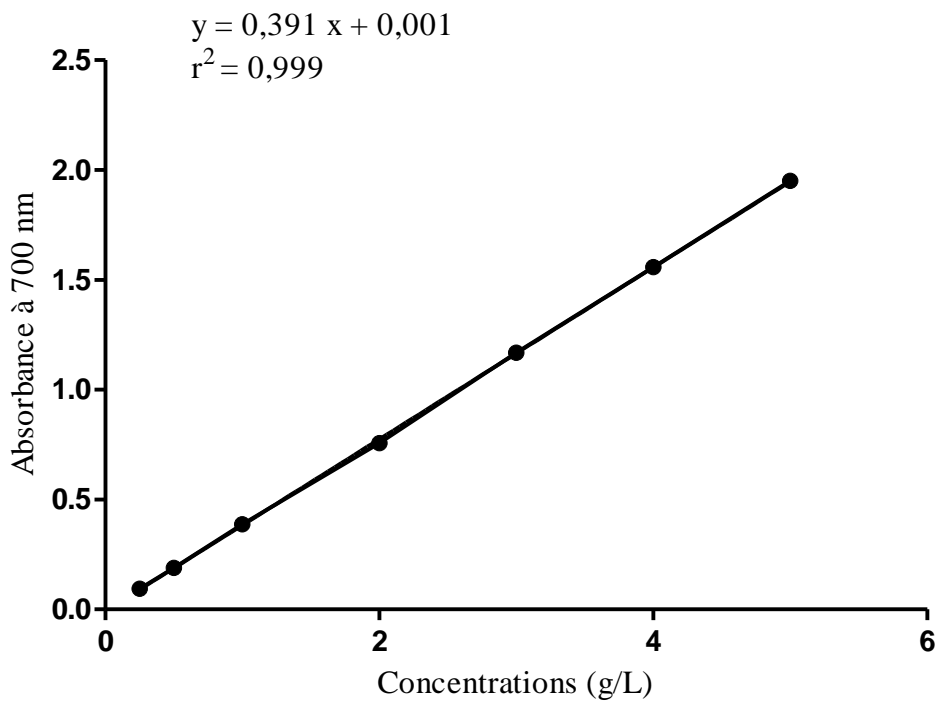
Courbe d'étalonnage du calcium



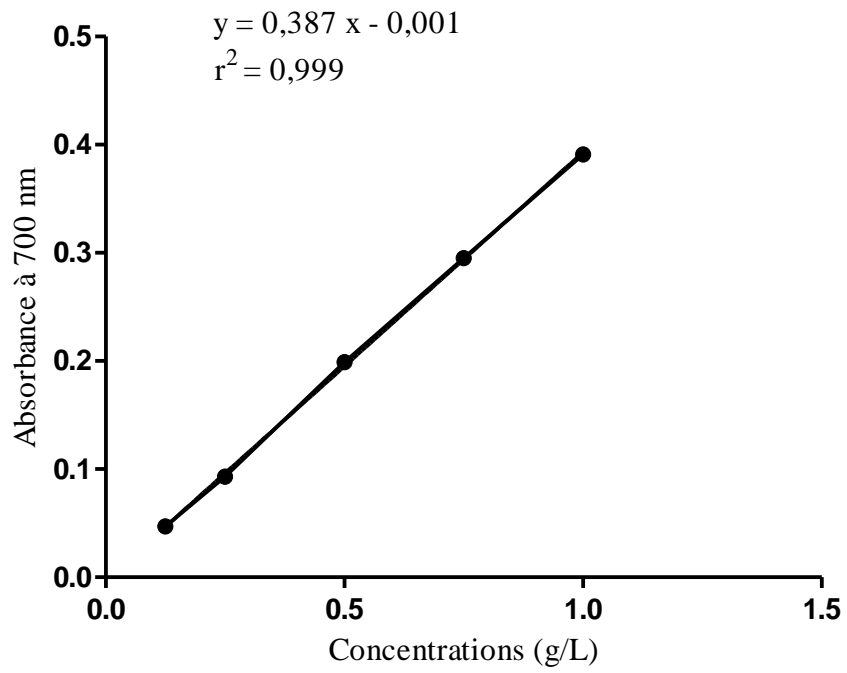
Courbe d'étalonnage du phosphore



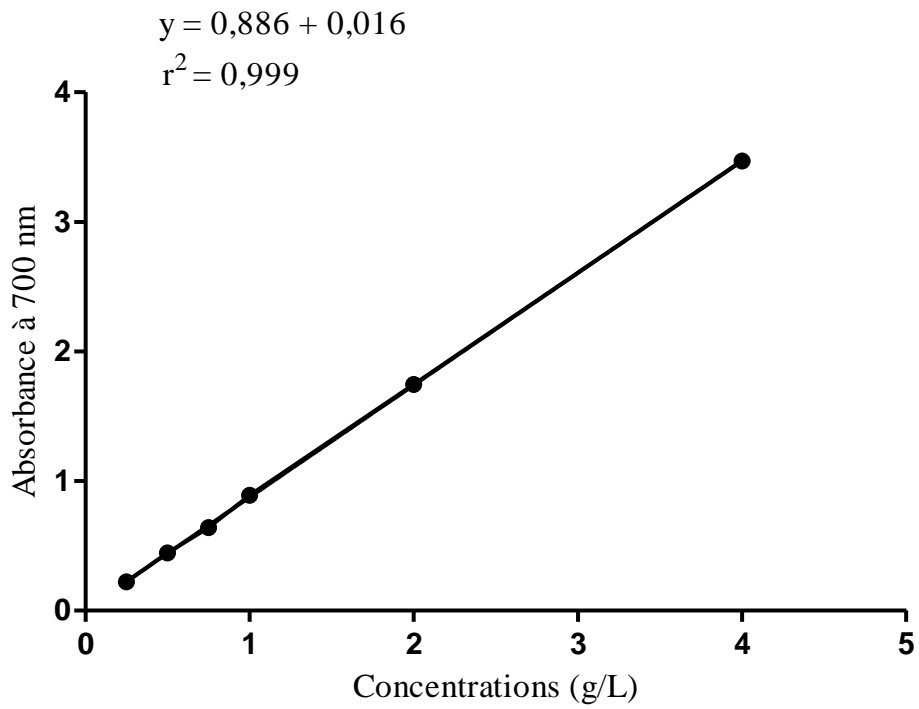
Courbe d'étalonnage de la créatinine



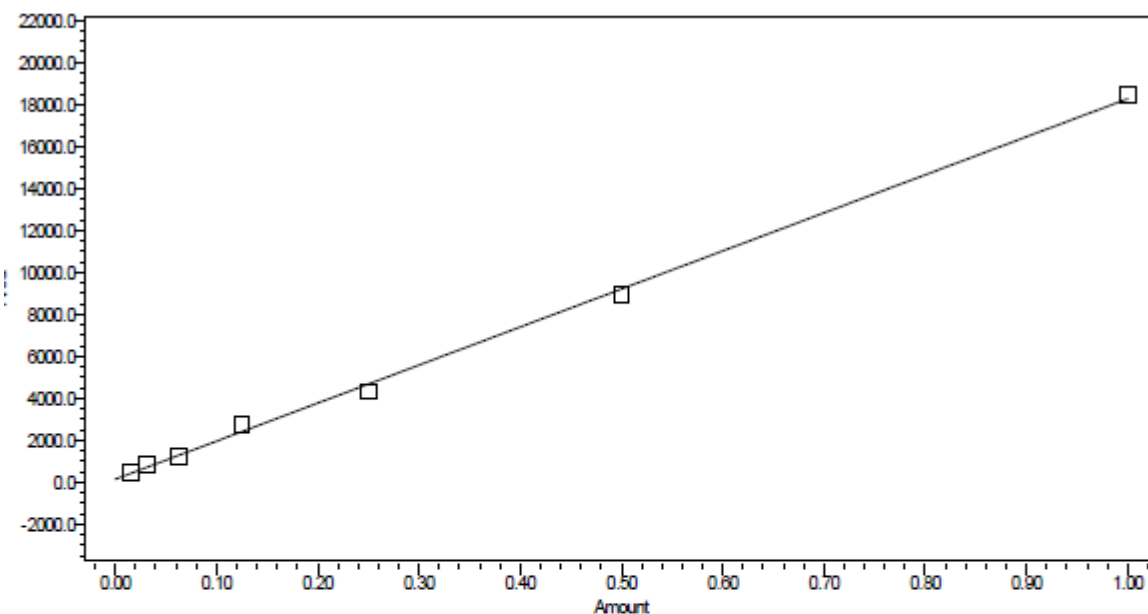
Courbe d'étalonnage du cholestérol total



Courbe d'étalonnage du HDL-cholestérol



Courbe d'étalonnage des triglycérides

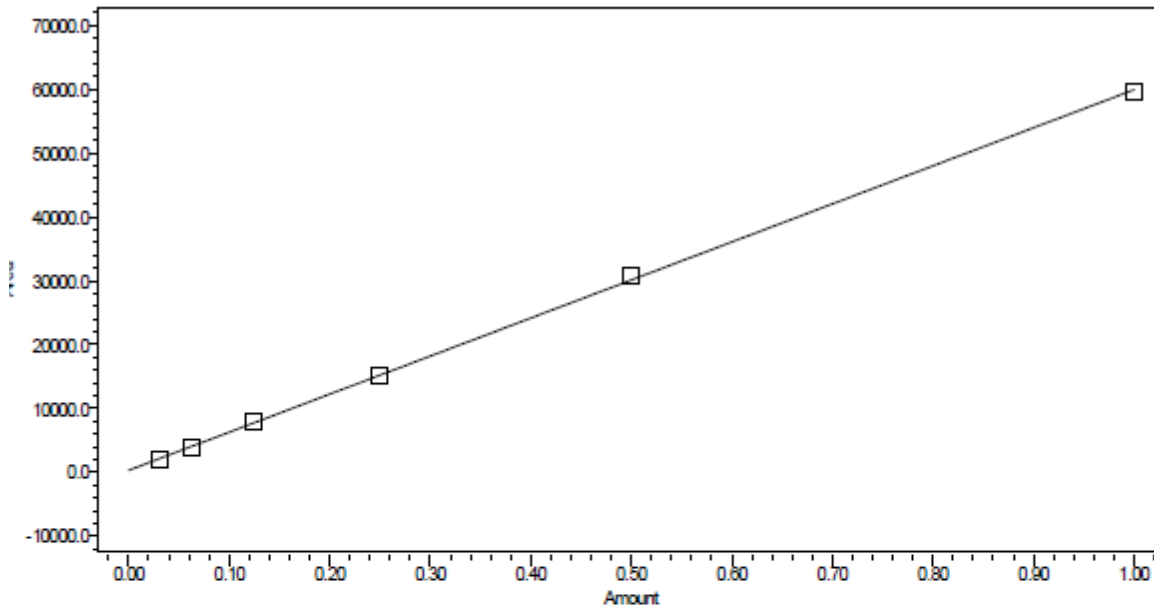


Name: Retinol; Time: 3.837; Fit Type: Linear (1st Order); R: 0.999223; R²: 0.998446; Equation: Y = 1.81e+004 X + 1.48e+002; Date Calibrated: 13/07/2016 16:19:39 WET

Peak: Retinol

	Sample Name	Peak Name	Level	Amount	Response	Calc. Amount	% Deviation	Manual Point	Ignore Point
1	Rétinol 0,01525mg/L	Retinol		0.015	4.884e+002	0.018766	23.058	Yes	No
2	Rétinol 0,03125mg/L	Retinol		0.031	8.016e+002	0.036055	15.375	Yes	No
3	Rétinol 0,0625 mg/L	Retinol		0.063	1.217e+003	0.058988	-5.619	Yes	No
4	Rétinol 0,125 mg/L	Retinol		0.125	2.781e+003	0.145290	16.232	Yes	No
5	Rétinol 0,25 mg/L	Retinol		0.250	4.325e+003	0.230537	-7.785	Yes	No
6	Rétinol 0,5 mg/L	Retinol		0.500	8.917e+003	0.484036	-3.193	Yes	No
7	Rétinol 1 mg/L	Retinol		1.000	1.845e+004	1.010327	1.033	Yes	No

Courbe d'étalonnage du rétinol



Name: Cholecalciferol; Time: 7.266; Fit Type: Linear (1st Order); R: 0.999826; R²: 0.999651; Equation: Y = 5.96e+004 X + 3.39e+002; Date Calibrated: 13/07/2016 18:24:12 WET

Peak: Cholecalciferol

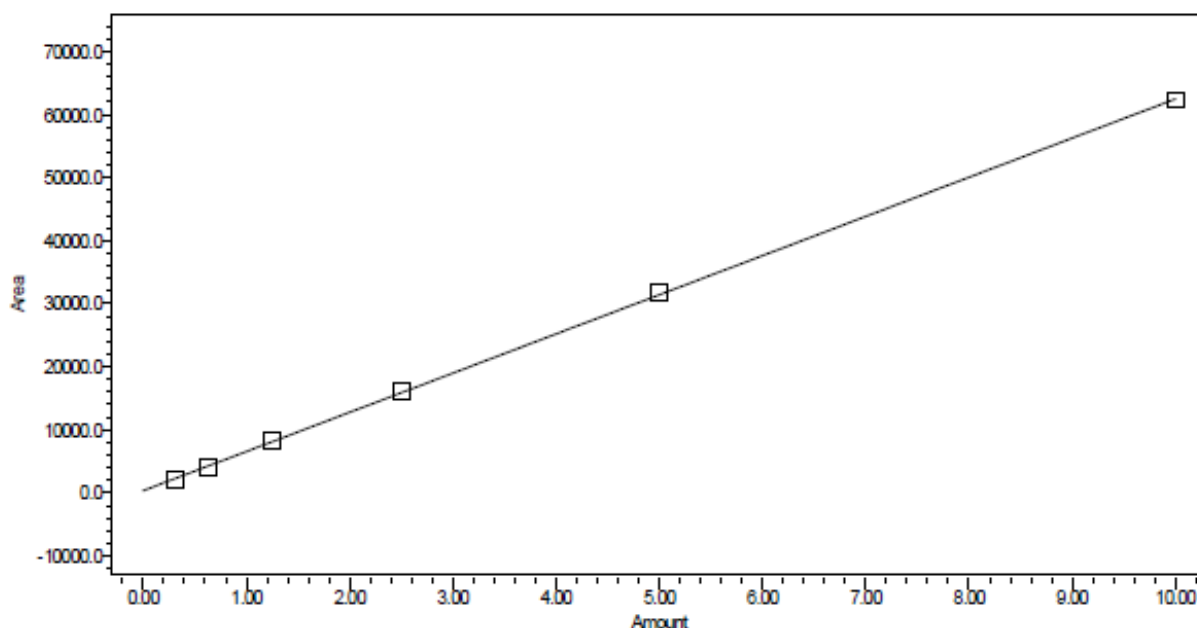
	Sample Name	Peak Name	Level	Amount	Response	Calc. Amount	% Deviation
1	Cholecalciferol 0,03125 mg/L	Cholecalciferol		0.031	2.076e+003	0.029157	-6.698
2	Cholecalciferol 0,0625 mg/L	Cholecalciferol		0.063	3.805e+003	0.058174	-6.922
3	Cholecalciferol 0,125 mg/L	Cholecalciferol		0.125	7.862e+003	0.126277	1.022
4	Cholecalciferol 0,25 mg/L	Cholecalciferol		0.250	1.510e+004	0.247795	-0.882
5	Cholecalciferol 0,5 mg/L	Cholecalciferol		0.500	3.091e+004	0.513239	2.648
6	Cholecalciferol 1 mg/L	Cholecalciferol		1.000	5.956e+004	0.994108	-0.589

Peak: Cholecalciferol

	Manual Point	Ignore Point
1	Yes	No
2	Yes	No
3	Yes	No
4	Yes	No

	Manual Point	Ignore Point
5	Yes	No
6	Yes	No

Courbe d'étalonnage du cholécalciférol



Name: Tocophérol; Time: 8.081; Fit Type: Linear (1st Order); R: 0.999964; R²: 0.999929; Equation: Y = 6.21e+003 X + 3.40e+002; Date Calibrated: 13/07/2016 16:54:29 WET

Peak: Tocophérol

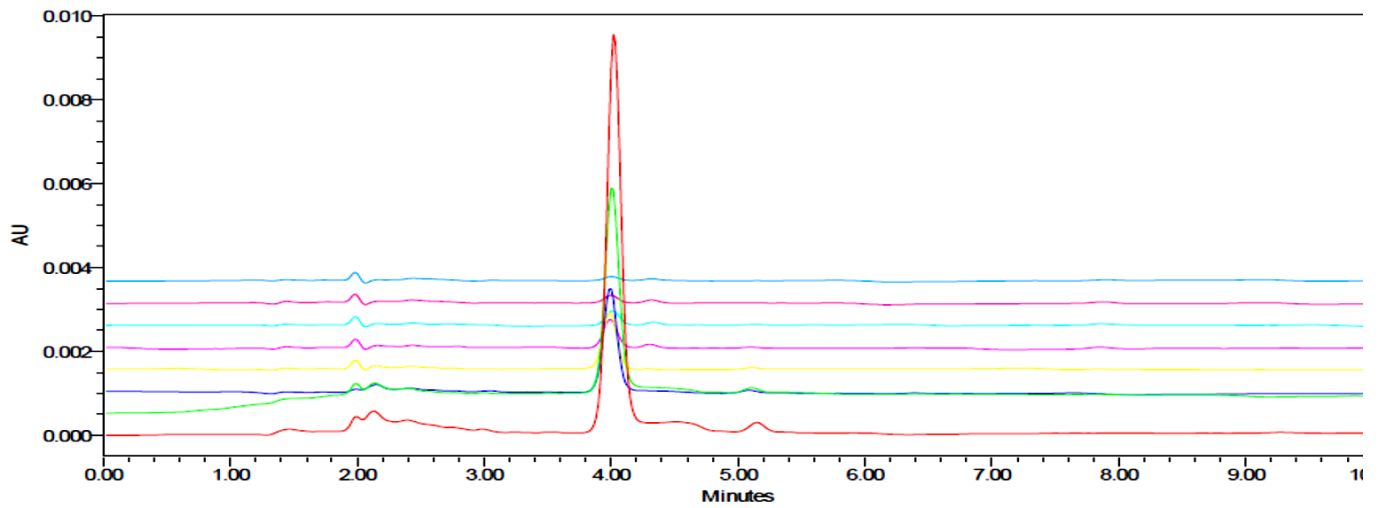
	Sample Name	Peak Name	Level	Amount	Response	Calc. Amount	% Deviation	Manual Point
1	Tocophérol 0,3125 mg/L	Tocophérol		0.313	2.065e+003	0.277675	-11.144	Yes
2	Tocophérol 0,625 mg/L	Tocophérol		0.625	4.111e+003	0.607214	-2.846	Yes
3	Tocophérol 1,25 mg/L	Tocophérol		1.250	8.142e+003	1.256205	0.496	Yes
4	Tocophérol 2,5 mg/L	Tocophérol		2.500	1.608e+004	2.534673	1.387	Yes
5	Tocophérol 5 mg/L	Tocophérol		5.000	3.163e+004	5.037953	0.759	Yes
6	Tocophérol 10 mg/L	Tocophérol		10.000	6.229e+004	9.973780	-0.262	Yes

Peak: Tocophérol

	Ignore Point		Ignore Point
1	No	5	No
2	No	6	No
3	No		
4	No		

Courbe d'étalonnage de α-Tocophérol

ANNEXE II : PROFILS CHROMATOGRAPHIQUES

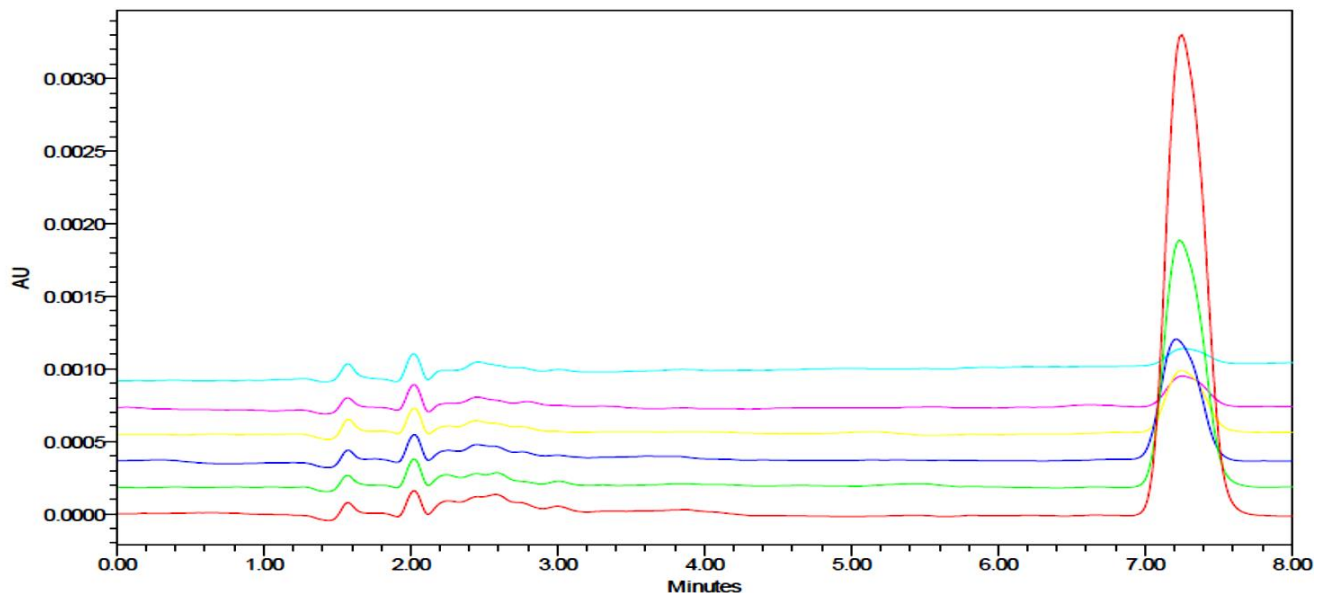


- Sample Name: Retinol 10 mg/L; Date Acquired: 04/06/2016 10:59:01 WET; Vial: 1:A,1; Injection: 1
- Sample Name: Retinol 5 mg/L; Date Acquired: 04/06/2016 11:09:26 WET; Vial: 1:A,2; Injection: 1
- Sample Name: Retinol 2.5 mg/L; Date Acquired: 04/06/2016 11:43:42 WET; Vial: 1:A,3; Injection: 1
- Sample Name: Retinol 1.25 mg/L; Date Acquired: 04/06/2016 11:54:07 WET; Vial: 1:A,4; Injection: 1
- Sample Name: Retinol 0.625 mg/L; Date Acquired: 04/06/2016 12:04:32 WET; Vial: 1:A,5; Injection: 1
- Sample Name: Retinol 0.315 mg/L; Date Acquired: 04/06/2016 12:14:57 WET; Vial: 1:A,6; Injection: 1
- Sample Name: Retinol 0.15 mg/L; Date Acquired: 04/06/2016 12:25:22 WET; Vial: 1:A,7; Injection: 1
- Sample Name: Retinol 0.078 mg/L; Date Acquired: 04/06/2016 12:51:50 WET; Vial: 1:A,8; Injection: 1

Profils chromatographiques des différentes concentrations de rétinol ou vitamine A

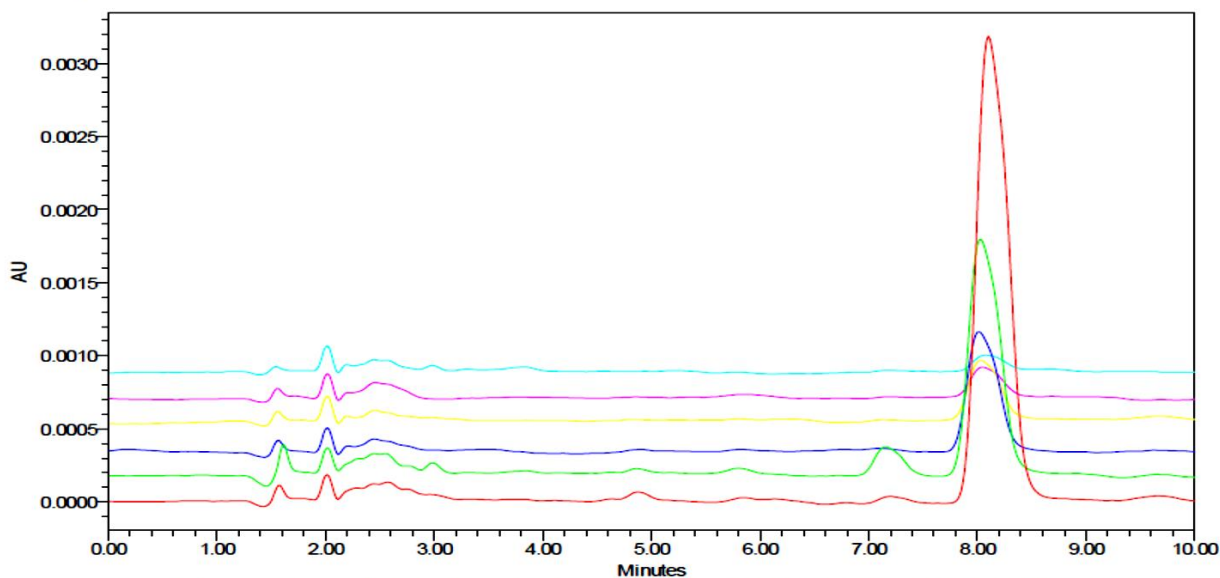
IPCI

Project Name VITAMINES -HPLC-UV
Reported by User: KADJOWELY



- Sample Name: Cholecalciferol 1 mg/L; Date Acquired: 02/07/2016 15:09:40 WET; Vial: 1:A,1; Injection: 1
- Sample Name: Cholecalciferol 0,5 mg/L; Date Acquired: 02/07/2016 15:18:06 WET; Vial: 1:A,2; Injection: 1
- Sample Name: Cholecalciferol 0,25 mg/L; Date Acquired: 02/07/2016 15:26:31 WET; Vial: 1:A,3; Injection: 1
- Sample Name: Cholecalciferol 0,125 mg/L; Date Acquired: 02/07/2016 15:34:58 WET; Vial: 1:A,4; Injection: 1
- Sample Name: Cholecalciferol 0,0625 mg/L; Date Acquired: 02/07/2016 15:43:26 WET; Vial: 1:A,5; Injection: 1
- Sample Name: Cholecalciferol 0,03125 mg/L; Date Acquired: 02/07/2016 15:51:54 WET; Vial: 1:A,6; Injection: 1

Profils chromatographiques des différentes concentrations de cholécalciférol ou vitamine D

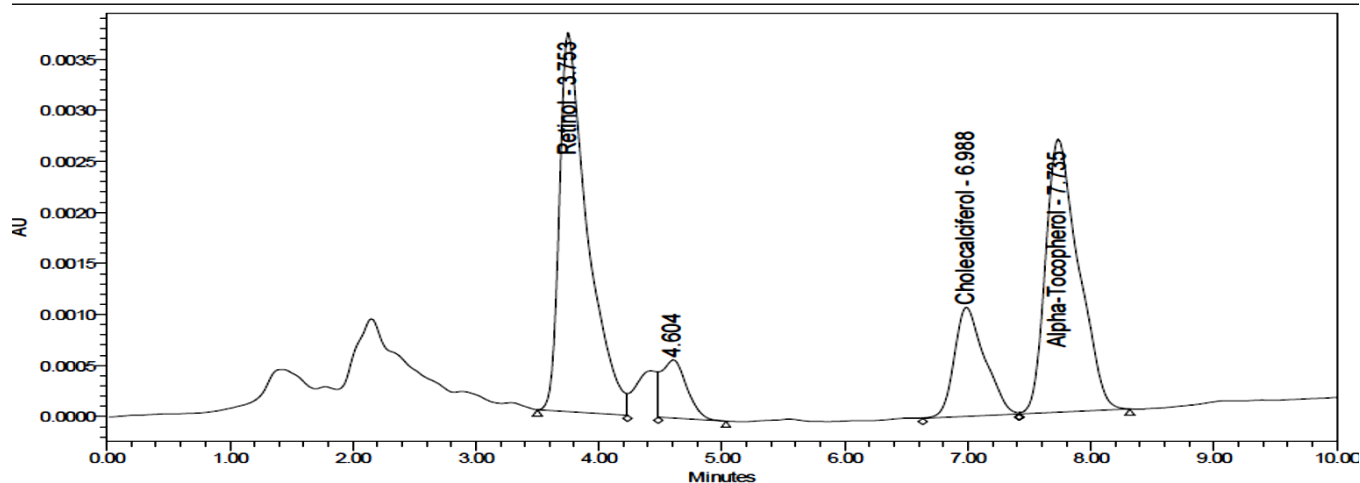


- Sample Name: Tocophérol 10 mg/L; Date Acquired: 03/07/2016 09:46:07 WET; Vial: 1:A,2; Injection: 1
- Sample Name: Tocophérol 5 mg/L; Date Acquired: 03/07/2016 09:56:33 WET; Vial: 1:A,3; Injection: 1
- Sample Name: Tocophérol 2,5 mg/L; Date Acquired: 03/07/2016 10:21:56 WET; Vial: 1:A,4; Injection: 1
- Sample Name: Tocophérol 1,25 mg/L; Date Acquired: 03/07/2016 10:32:23 WET; Vial: 1:A,5; Injection: 1
- Sample Name: Tocophérol 0,625 mg/L; Date Acquired: 03/07/2016 10:42:48 WET; Vial: 1:A,6; Injection: 1
- Sample Name: Tocophérol 0,3125 mg/L; Date Acquired: 03/07/2016 10:53:16 WET; Vial: 1:A,7; Injection: 1

Profils chromatographiques des différentes concentrations de tocophérol ou vitamine E

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	MELANGE (A,D,E)	Acquired By:	KADJOWELY
Sample Type:	Standard	Date Acquired:	15/09/2016 10:39:44 WET
Vial:	1:A,1	Acq. Method:	VITAMINES LIPOSOLUBLES
Injection #:	1	Date Processed:	21/09/2016 07:50:29 WET
Injection Volume:	10.00 ul	Channel Name:	W2489 ChA
Run Time:	10.00 Minutes	Sample Set Name:	VIT LIPO 15 SEPT 16



	Peak Name	RT (min)	Area (μV*sec)	% Area	Height (μV)	% Height	Amount
1	Retinol	3.753	58815	43.56	3716	46.27	10.000
2		4.604	8081	5.99	569	7.09	
3	Cholecalciferol	6.988	18304	13.56	1070	13.32	1.000
4	Alpha-Tocopherol	7.735	49806	36.89	2676	33.32	20.000

	Units		Units
1	mg/L	3	mg/L
2		4	mg/L

Profils chromatographiques d'un mix de standards de vitamines

ANNEXE III : PUBLICATION I

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Assessments of serum copper and zinc concentration, and the Cu/Zn ratio determination in patients with multidrug resistant pulmonary tuberculosis (MDR-TB) in Côte d'Ivoire

Gnogbo Alexis Bahi^{1,2}, Lydie Boyvin¹, Souleymane Méité^{1*}, Gervais Melaine M'Boh¹, Kadjowely Yeo^{1,2}, Kouassi Raymond N'Guessan¹, Alain Dit Philippe Bidié² and Allico Joseph Djaman^{1,2}

Abstract

Background: In Côte d'Ivoire, multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) is a serious public health problem with a prevalence estimated at 2.5% in 2006. Zinc and copper are essential Trace element needed to strengthen the immune system and also useful in the fight against tuberculosis. The Cu / Zn ratio is a good indicator of oxidative stress.

The principal aim of this study was to evaluate the serum concentration of some trace element and determine the Cu / Zn ratio in patients with multidrug resistant pulmonary tuberculosis (MDR-TB) before and after second line treatment of TB.

Methods: Blood samples were obtained from 100 MDR-TB patients after confirmation of their status through the microscopic and molecular diagnosis of resistance to Isoniazid and Rifampicin by GeneXpert. The concentration level of zinc and copper were determined using flame air / acetylene atomic absorption spectrometer (AAS) Type Varian Spectr AA-20 Victoria, Australia.

Results: A significant decrease in zinc levels ($P < 0.05$) and an increased Cu / Zn ratio ($P < 0.05$) was observed in MDR-TB patients compared to controls TB free. During treatment a significant reduction in Cu / Zn ratio ($P < 0.05$) was observed compared to the initial result.

Conclusions: The decrease in serum zinc level and the high Cu / Zn ratio could explain the immune system dysfunction and the high level of oxidative stress in patients with MDR-TB. Therefore the evaluation of the zinc and copper status could represent essential parameters in monitoring of TB second line treatment for better treatment management.

Keywords: Abidjan, Trace elements, Cu/Zn Ratio, MDR-TB, Second-line anti-TB drugs

* Correspondence: Souley_ci@yahoo.fr

¹Department of clinical and Fondamental Biochemistry, Pasteur Institute of Cote d'Ivoire (PCI), 01 BP 490, Abidjan 01, Côte d'Ivoire
Full list of author information is available at the end of the article



Background

The fight against multidrug-resistant TB (MDR-TB) is a big challenge. In 2014, the World Health Organization (WHO) estimated 480,000 the number of people who contracted MDR-TB and about 190,000 deaths attributed to this form of TB [1]. The WHO report, showed an overall net increase of cases of MDR-TB from 42% in 2012, 3.6% of new TB cases and 20.6% of previously treated cases are MDR-TB [1]. According to the report, less than 50% of patients with MDR-TB detected in 2010 were successfully treated. These figures reflect the high mortality rate associated with this form of TB.

In Côte d'Ivoire, the national tuberculosis control program (NTBC) reported that the recent socio-political crisis in Côte d'Ivoire has encouraged the emergence of the multidrug resistance pulmonary TB form of which prevalence is estimated to 2.5% in 2006 [2]. The outbreak of this disease and its spread are due to malnutrition and deterioration of the immune system [3, 4]. Other studies have reported that some TB drugs could affect the nutritional profile of the TB patient receiving treatment [5, 6].

The existence of a close relationship between micronutrients and immune system modification has been reported in many studies, in Indonesia [7] and Ethiopia [8]. Among these micronutrients, zinc and copper play an important role in the proliferation and differentiation of cells of innate and acquired immunity [9]. Moreover, the Cu / Zn ratio is an indicator for assessing the level of oxidative stress in the case of infectious diseases in general [10, 11]. These two micronutrients play an essential role in resistance to certain infectious diseases like tuberculosis [12]. However, little study has been carried out on the micronutrient status of patients with MDR-TB.

The aim of our study is to evaluate serum copper and zinc level and determine the Cu / Zn ratio in MDR-TB patients before treatment, after 3 months treatment and then after 6 months second line TB treatment, respectively.

Methods

Study population and environment

This is a prospective and experimental study that was conducted from January 2014 to December 2015 at the Institut Pasteur of Côte d'Ivoire (IPCI). Microscopy and molecular analyzes were performed at the national laboratory for tuberculosis chosen patients from the five antituberculosis centers (ATC) of Abidjan. It involved blood samples from 100 MDR-TB patients (50 women and 50 men aged between 18 and 55 years).

The blood samples used in our study were from MDR-TB patients who received second-line treatment

after failure of first-line treatment with positive microscopy and after Gene Xpert [13] confirmation of resistance to at least two TB drugs (Isoniazid and Rifampicin).

Sampling and blood collection

The sampling was carried out at various stages of the patient's treatment follow up as outlined below:

M0 stage (100 samples) the initial stage after confirmation of the multidrug resistance test as mentioned above and before any treatment commences.

M3 stage (100 samples) and M6 stage (100 samples) were followed up stages after 3 and 6 months of second-line anti-TB drugs treatment respectively.

A total of 300 blood samples from 100 MDR-TB patients and 100 samples from volunteers' non-tuberculosis to serve as control, living in the same environment age between 18 and 55 years were selected for this study.

Fasting blood was collected in anticoagulant-free tubes (red top tubes). The samples were then centrifuged at 3000 rounds / minute for 5 min using a centrifuge horizon 642 VES THE DRUCKER CO., USA and the serum collected in Ependorf® tubes were stored at -20°C .

Serum zinc and copper measurement

The serum copper and zinc measurement was performed using an air / acetylene flame atomic absorption spectrometer (AAS) Varian model Spectr AA - 20 Victoria, Australia [14].

The blood tubes used were immersed in a nitric acid solution (HNO_3) at 10% (v/v), following a previous day (12 h) washing in a solution of hydrochloric acid (HCl) at 10% (v/v). They were then rinsed twice with distilled water and dried. Protein precipitation was made by diluting 1 mL of serum in 4 mL of a solution of hydrochloric acid (2 M). After homogenization according to the method of Banjoko et al. [15], each sample was allowed to settle. The clear supernatant obtained was sucked directly into the flame atomic absorption spectrophotometer at the wavelength of 324.8 nm; 213.9 nm for the copper and zinc, respectively. A multi element-standard solution 1000 ppm (Merck, USA) previously diluted at 1/500 with nitric acid-deionized water (0.03 M) was used to prepare the calibration range (0; 0.5; 1.5; 2.0; 4 ppm). The concentration measurements were performed in triplicate and adjusted against the white (HCl solution 2 M).

The normal reference values for serum copper, zinc were respectively 11.0–22.0 $\mu\text{mol/L}$, 11.5–18.5 $\mu\text{mol/L}$ [9].

Statistical analysis

The mean values followed by the standard error of the mean (mean \pm SEM) of data were performed using the

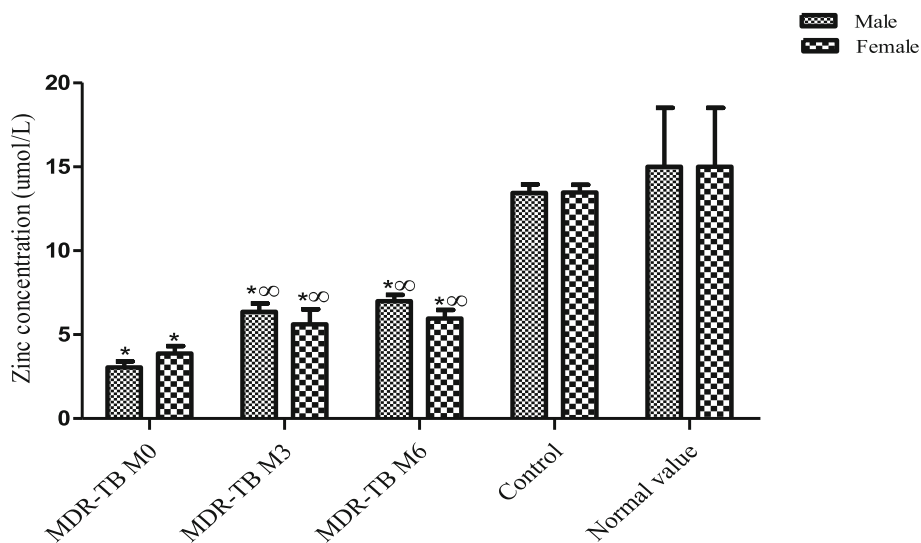


Fig. 1 Zinc concentration in MDR-TB and control. *: Significant difference between MDR-TB and the control population. ∞: Significant difference between the stage M0 and M3 § M6 stages

Graph Pad Prism 5.0 software (Microsoft, USA). Statistical analysis of results was performed using analysis of variance (ANOVA) followed by a multiple comparison Tukey test. The difference is significant when the *p*-value < 0.05.

Results

The results obtained from the blood assessment showed a reduced serum Zn concentration level at the initial stage of TB treatment compared to control, (*P* < 0.05) in men (3.049 ± 0.35 μmol/L) and in women (3.866 ± 0.45 μmol/L). After 3 and 6 months of

treatment (M3 & M6), it was noted a significant increase in the serum Zn level (*P* < 0.05) compared to M0 stage. The values of zinc obtained during treatment were: men M3 (6.35 ± 0.50 μmol/L), M6 (6.99 ± 0.37 μmol/L); M3 women (5.61 ± 0.90 μmol/L), M6 (5.95 ± 0.52 μmol/L) respectively.

All the same the Zn concentration level still remained inferior to the normal values and to those of control population (Figure 1).

The serum copper concentrations were normal before and after 6 months of treatment, in both sexes, compared to controls (Figure 2).

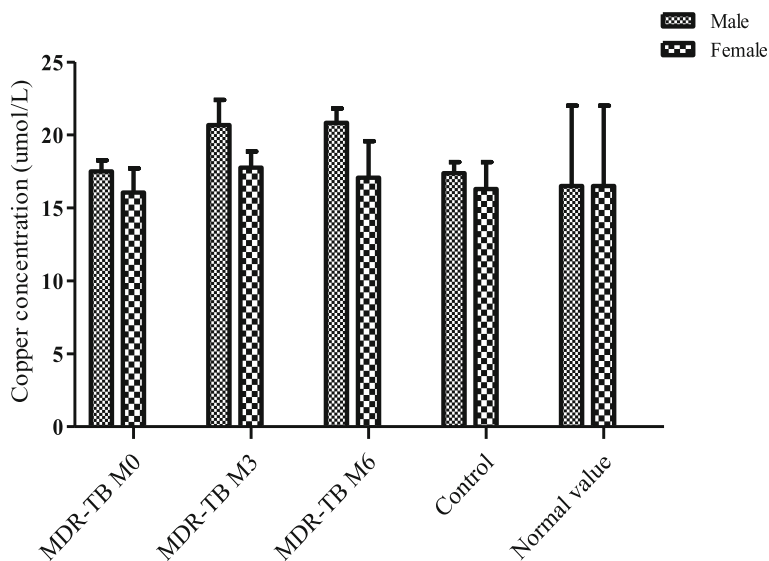


Fig. 2 Copper concentration in MDR-TB and control

Table 1 Values of the Cu / Zn ratio in patients with MDR-TB at different monitoring stages

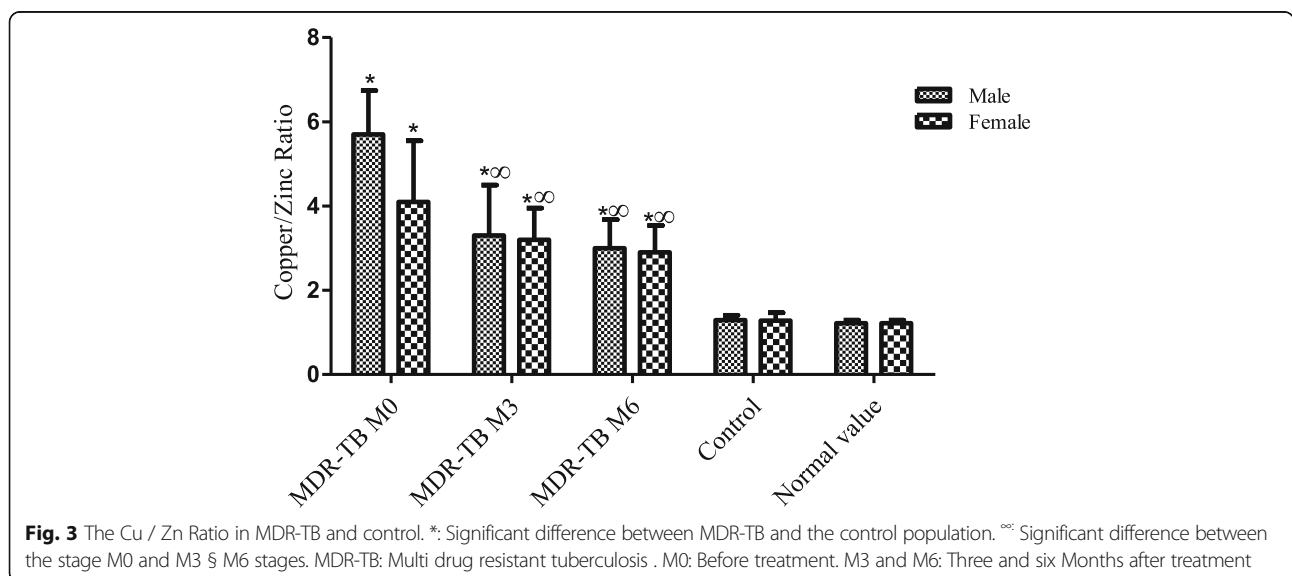
MDR-TB Patients	Cu / Zn ratio during the treatment follow up stages			Control	Normal Value
	M0	M3	M6		
Male	5.71 ± 2.0 ^a	3.34 ± 3.2 ^{ab}	3.08 ± 0.7 ^{ab}	1.29 ± 0.1	1.14–1.29
Female	4.13 ± 2.5 ^a	3.26 ± 0.7 ^{ab}	2.93 ± 0.6 ^{ab}	1.21 ± 0.1	

However, the Cu / Zn ratio, which was very high at the initial stage (M0) dropped significantly ($P < 0.05$) during TB second-line treatment (M3 & M6). Nevertheless, compared to non-tuberculosis control population the ratio value remained high ($P < 0.05$) (Table 1 and Figure 3).

Discussion

We noted in this study, a significant decrease in zinc concentrations in MDR-TB patients compared to the non-tuberculosis control population ($P < 0.05$). These zinc concentration values remained lower despite a significant increase in value ($P < 0.05$) during TB treatment comparable to the initial stage before treatment. These results are consistent with those of Edem et al. [6, 16] who reported, reduced zinc concentration during tuberculosis with an increase in these concentrations after 4 and 6 months of treatment respectively. These authors indicated that the lower zinc concentration observed compared to normal values was due to a redistribution of zinc flowing in other tissues including the liver tissue; this could be explained due to a reduced liver’s production of α -2-macroglobulin (a protein carrier of zinc in the blood) for the benefit of high production of metallothionein, a protein carrying zinc to the liver [6]. Zinc insufficiencies among MDR-TB patients have a negative impact on the immune system. In effect, zinc deficiency

is responsible for an alteration in the macrophage function and a reduction of production of tumor necrosis factor (TNF- α) and interferon- γ (INF- γ). These lower zinc concentrations would also be responsible for the decrease in the proliferation and differentiation of T and B lymphocytes [17, 18]. The immunity factors would be at the forefront in the performance of immune system defenses and protect against active tuberculosis [19]. In addition, it was reported that zinc and vitamin A supplementation in adult patients with active TB would allow elimination of *Mycobacterium*, thus leading to quick cure of these patients [7]. The zinc deficiency could thus explain the longer second-line TB treatment period among MDR-TB. While normal copper concentration values were observed in MDR-TB with or without treatment compared to the control population and normal values. These normal copper concentrations could be explained by the non-specificity of the synthesis of copper transport proteins including ceruloplasmin [8]. However, a very high Cu / Zn ratio was observed in MDR-TB compared to non-tuberculosis control. However, during treatment, the Cu / Zn ratio experienced a significant reduction compared to the initial assessment; but comparing to non-tuberculosis control population, it has increased significantly. High values of the ratio Cu / Zn in patients with active TB were reported by the work of Cefci et al. [20]. These high



values of the Cu / Zn ratio were due to the drop in the zinc concentrations; that means a high level of oxidative stress in these MDR-TB patients and negatively affect the immune system [21]. Moreover, the Cu/Zn ratio is an indicator of the nutritional status of zinc in patients. A Cu / Zn ratio greater than 2 means severe bacterial infection.

Conclusion

This study highlighted a significant reduction in serum zinc concentrations among multidrug-resistant tuberculosis in Côte d'Ivoire. This deficiency in zinc with a Cu / Zn ratio values well above normal value is responsible for the dysfunction in the immune system and raising the level of oxidative stress. The persistence deficiency in zinc despite 6 months of second-line TB treatment require zinc supplement intake in these MDR-TB in addition to anti-tuberculosis molecules. This supplementation would boost the immune system and restore the balance between the production of free radicals and anti-oxidants in this MDR-TB. This will enhance the effectiveness of the TB treatment and prevent new resistance to second-line TB drugs.

Additional file

Additional file 1: Analysis results. Results of copper, zinc and the Zn / Cu ratio of MDR-TB and controls with enrollment centers (ATC), sex, and follow-up stage for TBMR. (XLSX 30 kb)

Abbreviations

AAS: Atomic absorption spectrometer; ATC: Anti-tuberculosis centers; Cu: Copper; INF- γ : Interferon- γ ; IPCI: Institute Pasteur of Côte d'Ivoire; MDR-TB: Multidrug resistant tuberculosis; TB: Tuberculosis; TNF- α : Tumor necrosis factor alpha; Zn: Zinc

Acknowledgements

We want to thank the national tuberculosis program for allowing us to be in touch with MDR-TB patients and even speak to them at the Institut Pasteur of Côte d'Ivoire. We thank all of the participants and healthy volunteers who consented to take part in this present study. We do not forget to thank the head of Institut Pasteur of Côte d'Ivoire, Prof. DOSSO Mireille, who provided us with the Atomic Absorption Spectrometer machine she gave her support to the project. We also would like to thank the National Ethics Commity and Research for their valuable inputs that has improved the ethical considerations of the project proposal. We also want to thank AKO Bérenger, PhD for his help in the english version of the current manuscrit.

Funding

The Pasteur Institute of Cote d'Ivoire financed this research project.

Availability of data and materials

All data generated or analyzed during this study are included in this published article [and Additional file 1 in Excel spreadsheet].

Authors' contributions

BGA blood collection, designed and carried out the technical aspect, BL directed the technical aspect, MS did the statistical analysis, MGM and NR contributed to the drafting of the manuscript, YK contributed to the technical aspect, BADP monitored the implementation of the project, DAJ The brain behind the project. Each author participated sufficiently in the

work to take public responsibility for appropriate portions of the content. All authors read and gave a final approval of the version to be published.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Consent for publication

This consent was also given for the publication of the results obtained.

Ethics approval and consent to participate

This study was approved by the National Committee on Ethics and Research of Côte d'Ivoire (NCER). The approval and informed consent were obtained from MDR-TB patients and control participants for the use of their blood for research purpose.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Department of clinical and Fondamental Biochemistry, Pasteur Institute of Cote d'Ivoire (IPCI), 01 BP 490, Abidjan 01, Côte d'Ivoire. ²Pharmacodynamics Laboratory of Biochemical, University FélixHouphouët- Boigny (UFHB), Abidjan 01 BP V34, Abidjan 01, Côte d'Ivoire.

Received: 15 October 2016 Accepted: 25 March 2017

Published online: 11 April 2017

References

- World Health Organization. Global tuberculosis report. Geneva, Switzerland. 2015; 20th ed. 192 p.
- Anonyme. Programme National de Lutte Contre la Tuberculose (PNLT), plan stratégique national 2012–2015 de lutte contre la Tuberculose; 2012. p. 65.
- Gupta A, Kaul A, Tsolaki AG, Kishore U, Bhakta S. Mycobacterium tuberculosis: immune evasion, latency and reactivation. *Immunobiology*. 2012;217:363–74.
- Chan T. Differences in vitamin D status and calcium intak: Possible explanation for the regional variation in the prevalence of hypocalcaemia in tuberculosis. *Calc Tiss Int*. 1997;60:91–3.
- Aouam K, Chaabane A, Loussaïef C, Romdhane FB, Boughattas N-A, Chakroun M. Les effets indésirables des antituberculeux: épidémiologie, mécanismes et conduite à tenir. *Méd et Maladies Infect*. 2007;37:253–61.
- Edem V.F, Ige O, Arinola, OG. Plasma vitamins and essential trace elements in newly diagnosed pulmonary tuberculosis patients and at different durations of anti-tuberculosis chemotherapy. *Egypt J Chest Dis Tuberc*. 2015; 64: 675–679.
- Karyadi E, West CE, Schultink W, Nelwan RH, Gross R, Amin Z. A double-blind, placebo-controlled study of vitamin A and zinc supplementation in persons with tuberculosis in Indonesia: effects on clinical response and nutritional status. *Am J Clin Nutr*. 2002;75:720–7.
- Kassu A, Yabutani T, Mahmud ZH, Mohammad A, Nguyen N, Huong BTM, Hailemariam G, Diro E, Ayele B, Wondmikun Y, Motonaka J, Ota F. Alterations in serum levels of trace elements in tuberculosis and HIV infections. *Euro J Clinic Nutr*. 2006;60:580–6.
- Mobaien A, Hajiabdolbaghi M, Jafari S, Alipouran A, Ahmadi M, Eini P, Smits HL. Serum zinc and copper concentrations in brucellosis patient. *Iran. J. Clin. Infect. Dis*. 2012;5:96–100.
- M'boh GM, Boyvin L, Beourou S, Djaman AJ. Blood Cu/Zn Ratio in children of School Age, Living in Malaria Endemic Area in Abidjan (Côte d'Ivoire). *Inter J Child Health Nutri*. 2012;2:29–33.
- Kolia KI, M'boh GM, Bagré I, Djaman AJ. Assessment of Serum Iron, Manganese and Cu/Zn Ratio in the Course of *falciparum* Malaria among Ivorian Patients (Côte d'Ivoire) Inter. *J of Biochem Res Rev*. 2014;4:527–35.
- Munoz C, Rios E, Olivos J, Brunser O, Olivares M. Iron, copper and immunocompetence. *Br J Nutr*. 2007;98:24–8.
- WHO (2011). Policy statement: Automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF system[®], WHO, Geneva, 2011
- Pinta M. Spectrometry d'absorption atomique. Application à l'analyse chimique. Paris, Masson, 1980; 2 nded, P 696.

15. Banjoko SO, Oseni FA, Togun RA, Onayemi O, Emma-Okon BO, Fakunle JB. Iron status in HIV-1 infection: implications in disease pathology. *BMC Clin Pathology*. 2012;12:26–32.
16. Edem VF, Ige O, Arinola OG. Plasma vitamins and essential trace elements in multi-drug resistant tuberculosis patients before and during chemotherapy. *Egypt J Chest Dis Tuberc*. 2016;65:441–5.
17. Rajendra P, Irfan A, Ram ASK, Wahid A, Mahendra KG, Mohd S. Vitamin A and Zinc Alter the Immune Function in Tuberculosis. *Kuwait Med J*. 2012;44:183–9.
18. Anuraj HS, Ananda SP. Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. *Am J Clin Nutr*. 1998;68:447–63.
19. Wintergerst ES, Maggini S, Hornig DH. Contribution of selected vitamins and trace elements to immune function. *Ann Nutr Metab*. 2007;51:301–23.
20. Ciftci TU, Ciftci B, Yis Ö, Guney Y, Bilgihan A, Ogretensoy M. Changes in serum selenium, copper, zinc levels and Cu/Zn ratio in patients with pulmonary tuberculosis during therapy. *Biol Trace Elem Res*. 2003;95:65–71.
21. Ananda SP. Zinc: role in immunity, oxidative stress and chronic inflammation. *Clinic Nutr and Metabolic Care*. 2009;12:646–52.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



ANNEXE IV : PUBLICATION II



Exploring the iron metabolism in multidrug resistant tuberculosis (MDR-TB) patients in treatment

G.A. BAH^{1,2}, A. P. BIDIE^{1,*}, S. MEITE² and A.J. DJAMAN^{1,2}

¹ *Department of Clinical Biochemistry and Fondamental, Pasteur Institute (IPCI) 01 BP 490 Abidjan 01, Côte d'Ivoire.*

² *Pharmacodynamics Laboratory of Biochemical, University Félix Houphouët - Boigny (UFHB), Abidjan 01 BP V34 Abidjan 01, Côte d'Ivoire.*

* *Corresponding author; E-mail: alphbidie@yahoo.fr*

ABSTRACT

The iron metabolism plays a key role in the progression of active Tuberculosis. Several studies have shown a link between iron metabolism disorders and active tuberculosis. The aim of this study was to explore the iron metabolism of 100 patients with multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) treated with second generation anti-tuberculosis drugs. The levels of iron in serum were assessed using atomic absorption spectrometry (AAS) while ferritin and transferrin were determined by immunoturbidimetry methods. The total iron binding capacity and transferrin saturation coefficient were determined from the values of transferrin and iron in the serum. The data showed a significant decrease in values of serum iron and total iron binding capacity (TIBC), in contrast to ferritin and the coefficient of transferrin saturation (CTS) which were in normal range before or after 6 months of treatment. These results are characteristic of inflammatory anemia. The persistence of this anemia despite treatment requires effective management of the inflammatory process in parallel with the use of second line anti-TB drugs.

© 2017 International Formulae Group. All rights reserved.

Keywords: Iron Metabolism, serum iron, transferrin, ferritin, MDR-TB.

INTRODUCTION:

Iron is the first and the most important trace element in cellular metabolism. It occurs at many metabolic mechanisms including the modulation of the immune system and more particularly in the production of hemoglobin by the process of erythropoiesis. Iron metabolism control occurs at the level of the body to maintain the stock of iron and its distribution to adequate levels, but also at the cellular level, thereby ensuring

optimal biological functions (Loreal et al., 2012). Iron deficiency is the cause of various metabolic disorders whose final stage is anemia. While an iron overload could increase 3 to 5 times the risk of developing active tuberculosis (Edem et al., 2015).

Several studies have shown an association disorder of iron metabolism with patients with active tuberculosis (Mc Dermid et al., 2013; Gribel et al., 2014). Other studies reported that the anemia observed in

tuberculosis is due to chronic inflammation caused by the bacillus *Mycobacterium tuberculosis* (Chen et al., 2010). Moreover, to according Aouam et al. (2007), some anti-TB drugs would be responsible for hemolytic anemia. Thus, to improve the program of the fight against TB in all its forms in Côte d'Ivoire, the present study aimed at assessing the impact of *Mycobacterium tuberculosis* and the second generation anti-TB on the iron metabolism of MDR -TB patients in current treatment.

MATERIALS AND METHODS

Sampling and sample pretreatment

The biological material consists of serum of MDR-TB in current treatment. In total, 100 MDR-TB patients were selected for this study. The sampling was carried out in deferent stages: M₀ stage for the initial assessment before starting treatment and M₃ and M₆ stages for monitoring assessment after 3 and 6 months of treatment. At the end, 300 MDR-TB samples and 100 samples of non-tuberculous voluntary witnesses with as many women as men were selected. It should be noted that all the MDR-TB patients and TB voluntary witnesses are aged between 18 and 55 years.

Samples were taken after an overnight fast in dry tubes (Vacutainer[®]) and then centrifuged at 3000 rounds/min for 5 min. The serum collected in tubes Ependorf[®] was subsequently stored at -20 °C.

Methods for determination of markers of iron metabolism

This study consists of determining the concentrations of serum iron, serum ferritin, the Total Iron Binding Capacity (TIBC) and the Coefficient of Transferrin Saturation (CTS). The dosage of serum iron was performed using atomic absorption spectrometer (AAS) flame air / acetylene brand Varian AA 20[®] Pattern, France, after deproteinization of the serum by Chloridric acid CARLO ERBA Reagents 2 M (Yaméogo, 2009). The wavelength characteristic of the serum iron was 249 nm. The threshold of

detection was 0.001 mg/L. Ferritin and transferrin were determined by immonoturbidimetry methods with Cobas C311 Roche Diagnostic France, a method firstly described by Heidelberger (Heidelberger et al., 1935; Dubois et al., 1988). The dosage principle was based on the fact that human ferritin agglutinates the latex particles coated with anti-ferritin monoclonal antibodies while human transferrin forms a precipitate in the presence of a specific antiserum. Both of the complexes (ferritin with anti-ferritin monoclonal antibodies and the precipitates) obtained were measured by turbidimetry at 340 nm and 552 nm for transferrin and ferritin, respectively. The total iron binding capacity (TIBC) and the coefficient of transferrin saturation (CTS) are calculated from both the values of serum transferrin and serum iron by the following formulas (Wanger, 2000):

$$\text{TIBC } (\mu\text{mol} / \text{L}) = \text{transferrin } (\text{g} / \text{L}) \times 25.$$

$$\text{CTS } (\%) = (\text{Iron} / \text{TIBC}) \times 100.$$

Statistical analysis

The data of iron metabolism were expressed as average values accompanied by the standard error of the mean (mean ± SEM). Statistical analysis of results was performed using analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey multiple comparison test. The difference was significant when p-value < 0.05.

RESULTS

Serum iron and total iron binding capacity (TIBC) in MDR-TB was very low at the initial stage (M₀) and after 3 and 6 months treatment (M₃ and M₆) for both men and women compared with controls and normal values, P < 0.05. However, a slight increase in values of these parameters was found during the treatment, P < 0.05. The concentration of iron was in mean: 10.7 ± 0.5 μmol/L; 11.7 ± 0.5 μmol/L and 12.5 ± 0.6 μmol/L at M₀, M₃ and M₆ stages respectively against 17.7 ± 1.3 μmol/L in men witnesses and in women: 8.26 ± 0.48 μmol/L; 9.28 ± 0.5 μmol/L and 10.43 ±

0.9 $\mu\text{mol/L}$ at M_0 , M_3 and M_6 stages respectively against $17.50 \pm 1.1 \mu\text{mol/L}$ in women witnesses. The values of total iron binding capacity in mean was $41.4 \pm 1.1 \mu\text{mol/L}$; $47.1 \pm 0.8 \mu\text{mol/L}$ and $47.5 \pm 1.2 \mu\text{mol/L}$ and in women $28.95 \pm 1.3 \mu\text{mol/L}$; $36.56 \pm 1.4 \mu\text{mol/L}$ and $42.62 \pm 2.0 \mu\text{mol/L}$ at M_0 , M_3 and M_6 stages respectively against $63.8 \pm 2.1 \mu\text{mol/L}$ and 63.84 ± 2.1 in men and

women witnesses respectively. Regarding ferritin and the coefficient of transferrin saturation (CTS), the values remained in the normal range either in men or in women but with a minimal increase with treatment. All these values, classified by sex, are given in Tables 1 and 2 and Figures 1, 2, 3 and 4 reported the comparative analyses by sex.

Table 1: Values of iron metabolism parameters in men.

	Men MDR-TB			Men witnesses	Normal values
	M_0	M_3	M_6		
Iron ($\mu\text{mol/L}$)	$10.7 \pm 0.5^*$	$11.7 \pm 0.5^*$	$12.5 \pm 0.6^*$	17.7 ± 1.3	14 - 32
FERR ($\mu\text{g/L}$)	201.3 ± 21.5	148.1 ± 11.9	152.7 ± 9.9	164.3 ± 18.4	30 - 300
TIBC ($\mu\text{mol/L}$)	$41.4 \pm 1.1^{*\circ}$	$47.1 \pm 0.8^*$	$47.5 \pm 1.2^*$	63.8 ± 2.1	60 - 95
CTS (%)	23.6 ± 1.2	24.3 ± 1.0	24.8 ± 1.2	28.6 ± 2.3	20 - 45

The values of iron metabolism parameters in mean. MDR-TB = Multidrug resistant tuberculosis. TIBC = total iron binding capacity. CTS = Coefficients of transferrin saturation. M_0 = Initial assessment before starting treatment. M_3 or M_6 = tracking sheet after 3 or 6 months of treatment. * Significant difference between MDR-TB and the Witnesses and normal values. $P < 0.05$. $^\circ$ Significant difference between M_0 (before treatment) and M_3 , M_6 (3 or 6 months after treatment). $P < 0.05$.

Table 2: Values of iron metabolism parameters in women.

	Women MDR-TB			Women witnesses	Normal values
	M_0	M_3	M_6		
Iron ($\mu\text{mol/L}$)	$8.26 \pm 0.48^*$	$9.28 \pm 0.5^*$	$10.43 \pm 0.9^*$	17.50 ± 1.1	11 - 28
FERR ($\mu\text{g/L}$)	$168.00 \pm 12.0^*$	$164.3 \pm 14.6^*$	115.6 ± 13.0	96.59 ± 13.1	20 - 200
TIBC ($\mu\text{mol/L}$)	$28.95 \pm 1.3^{*\circ}$	$36.56 \pm 1.4^*$	$42.62 \pm 2.0^*$	63.84 ± 2.1	60 - 95
CTS (%)	29.40 ± 1.7	25.52 ± 1.4	24.13 ± 2.2	28.01 ± 1.8	20 - 45

The values of iron metabolism parameters in women. MDR-TB = Multidrug resistant tuberculosis. TIBC = total iron binding capacity. CTS = Coefficients of transferrin saturation. M_0 = Initial assessment before starting treatment. M_3 or M_6 = tracking sheet after 3 or 6 months of treatment. * Significant difference between MDR-TB and the Witnesses and normal values. $P < 0.05$. $^\circ$ Significant difference between M_0 (before treatment) and M_3 , M_6 (3 or 6 months after treatment). $P < 0.05$.

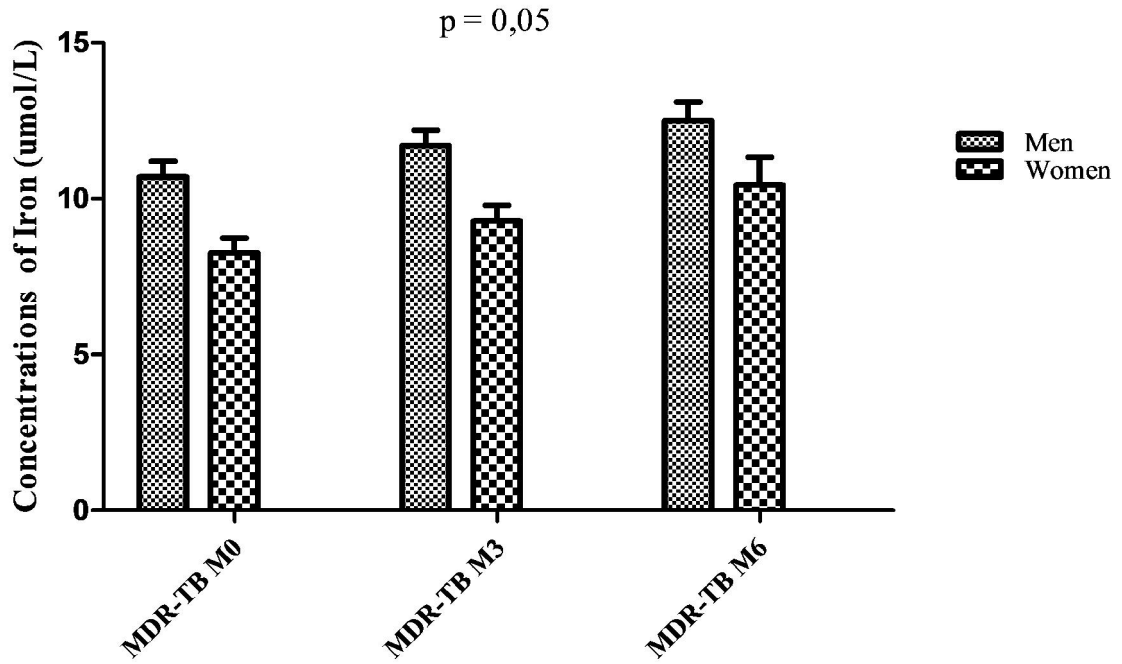


Figure 1: Concentrations of Iron by sex. The iron concentrations by sex. MDR-TB = Multidrug resistant tuberculosis. M₀ = Initial assessment before starting treatment. M₃ or M₆ = tracking sheet after 3 or 6 months of treatment.

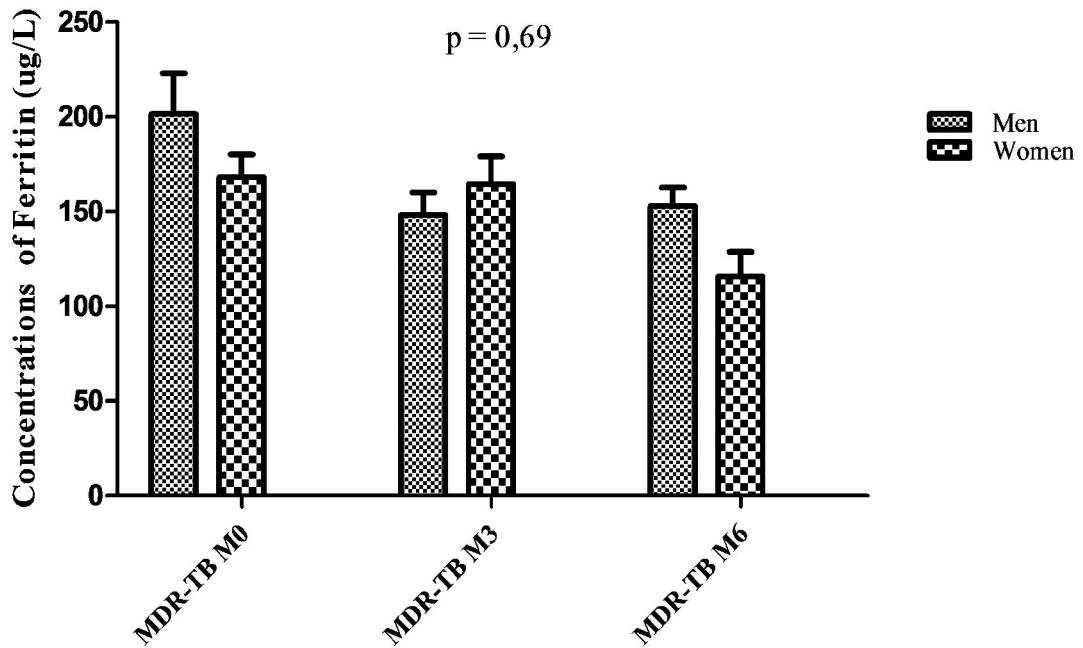


Figure 2: Concentrations of Ferritin by sex. The ferritin concentrations by sex. MDR-TB = Multidrug resistant tuberculosis. M₀ = Initial assessment before starting treatment. M₃ or M₆ = tracking sheet after 3 or 6 months of treatment.

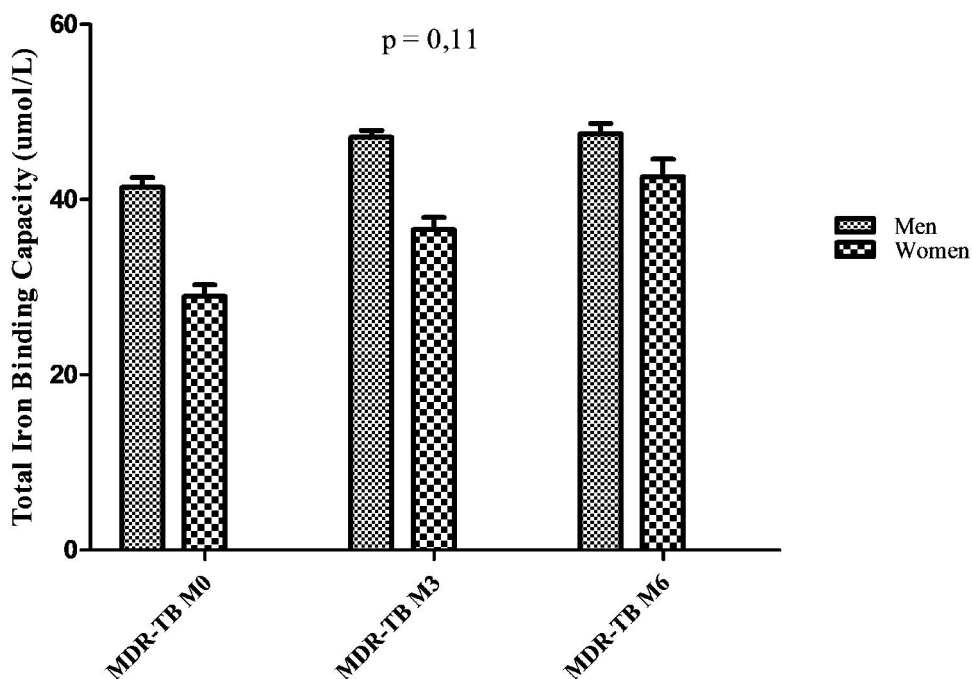


Figure 3: Total Iron Binding Capacity by sex. The values of total iron binding capacity by sex. MDR-TB = Multidrug resistant tuberculosis. M₀ = Initial assessment before starting treatment. M₃ or M₆ = tracking sheet after 3 or 6 months of treatment.

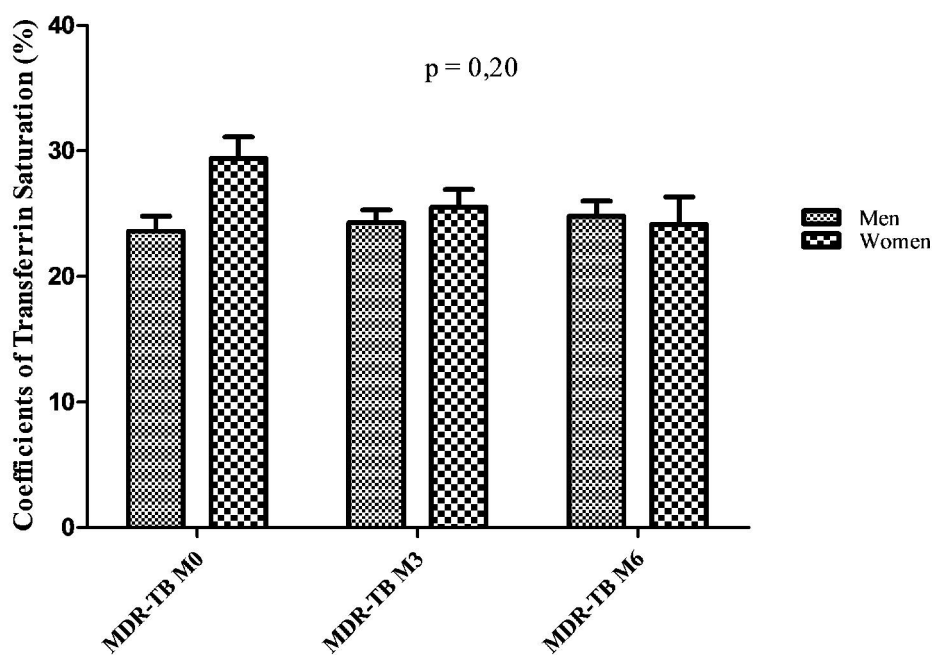


Figure 4: Coefficients of Transferrin Saturation by sex. The values of coefficients of transferrin saturation by sex. MDR-TB = Multidrug resistant tuberculosis. M₀ = Initial assessment before starting treatment. M₃ or M₆ = tracking sheet after 3 or 6 months of treatment.

DISCUSSION

Iron status plays an important role in the progression of active TB (Kassu et al., 2006). Exploration of iron metabolism comprises the determination of serum iron that represents the pool of exchanges, ferritin reflects the reserve pool and finally transferrin and total capacity of iron binding to transferrin that represents the pool of functional iron (Mario, 2012). The present study showed that serum iron and total iron binding capacity (TIBC) were significantly lower in highly multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) compared with non-tuberculous witnesses and normal values while the serum ferritin rate and coefficient of transferrin saturation (CTS) remained in the normal range. These results are characteristic of inflammatory anemia or anemia of chronic diseases as previously reported (Celi et al., 2011; Gavazzi, 2014). This type of anemia is not due to an iron deficiency but rather a functional deficiency of iron. Our results are in accordance with those of Lovey et al. (2010) that have shown that serum ferritin, greater than 100 mg/L, excludes the hypothesis of iron deficiency and that the coefficient of transferrin saturation (CTS) only decreases when iron stores are completely exhausted. However, low serum iron concentrations and the decrease in iron total binding capacity are explained by a strong iron retention in macrophages and the decrease of the supply of iron to erythropoiesis during chronic inflammation induced by mycobacterial infection (Beaumont and Karim, 2013). The mechanisms leading to the introduction of this type of anemia are set through the production of various cytokines including interferon- γ , TNF- α and interleukins 1 and 10 that cause the iron sequestration by macrophages and repress the erythropoietin synthesis. This process is amplified by excessive synthesis of hepcidin. A pro-inflammatory protein produced mainly by hepatocytes and secreted into the blood stream interacts with ferroportin which is the exporter of the iron present in enterocytes and macrophages causing the degradation there of. This leads to a decrease in intestinal iron

absorption and to a retention of iron in macrophages and hepatocytes (Celi et al., 2011). This set of mechanisms helps to reduce the concentration of serum iron and iron total binding capacity of transferrin (Mario, 2012). However, there was a slight increase in these values during processing. These results are contrary to the work of Edem et al. (2015) which showed a progressive decrease in iron concentrations in TB patients currently treated. Because tuberculosis molecules of second generation anti-TB drugs have no hemolytic activity in MDR-TB unlike those of the first generation such as Rifampicin (Aouam et al., 2007). There is no significant difference between men and women in MDR-TB. This indicates that the disorder in iron metabolism is not linked with sex.

Conclusion

It appears from this study that MDR-TB patients have an inflammatory type of anemia characterized by lower concentrations of serum iron and total iron binding capacity. The persistence of this anemia despite the treatment provided to these MDR-TB requires effective management of the inflammatory process in parallel with the use of second generation anti-TB. However, other studies such as the dosage of hepcidine and soluble transferrin receptor (STfR) are seen in order to confirm the inflammatory origin of the anemia.

COMPETING INTERESTS

The authors declare that they have no competing interests.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

This work was carried out in collaboration between all the authors. APB carried out the study, the statistical analysis and prepared the manuscript; GAB carried out the technical analysis and prepared various parts of the manuscript; SM corrected the English version of the manuscript; AJD co-directed the study; All the authors read and approved the final manuscript.

ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge the national tuberculosis program for allowing us to be in touch with MDR-TB patients and addressed them to us at Institut Pasteur Côte d'Ivoire. We thank all of the participants and healthy volunteers who consented to take part into the present study. We do not forget about the head of Institut Pasteur Côte d'Ivoire, Prof. DOSSO Mireille, who provided us with the Atomic Absorption Spectrometer machine. She exclusively dedicated to the project.

REFERENCES

- Loréal O, Bardou-Jacquet E, ouanolle A-M, Gandon Y, Deugnier Y, Brissot P, Ropert M. 2012. Métabolisme du fer et outils diagnostiques pour le clinicien. *Rev. Med. Interne*, **33**: 3–9. doi:10.1016/j.revmed.2012.03.005.
- Edem VF, Ige O, Arinola OG. 2015. Plasma vitamins and essential trace elements in newly diagnosed pulmonary tuberculosis patients and at different durations of anti-tuberculosis chemotherapy. *Egypt. J. Chest Dis. Tuberc.*, **64**: 675–679. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejcdt.2015.03.031>.
- McDermid JM, Hennig BJ, van der Sande M, Hill AVS, Whittle HC, Jaye A, Prentice AM. 2013. Host iron redistribution as a risk factor for incident tuberculosis in HIV infection: an 11-year retrospective cohort study. *BMC Infect. Dis.*, **13**: 48 – 57.
- Gribel OM, Neves DK, Marinho de Melo Gomes OK, Ruffino-Netto A, Kritski L, Maria OM. 2014. Anemia in hospitalized patients with pulmonary tuberculosis. *J Bras Pneumol.*, **40**: 403 – 410. <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-37132014000400008>
- Chen H-C, Huang I-T, Wang H-C. 2010. Severe Hemolytic Anemia due to Active Pulmonary Tuberculosis. *Fooyin J. Health Sci.*, **2**: 113 – 116.
- Aouam K, Chaabane A, Loussaïef C, Romdhane FB, Boughattas N-A, Chakroun M. 2007. Les effets indésirables des antituberculeux: épidémiologie, mécanismes et conduite à tenir. *Méd. et Maladies Infect.*, **37** : 253 – 261. doi:10.1016/j.medmal.2006.12.006
- Yameogo Pourié. 2009. Contribution à l'étude des paramètres hématologiques chez les femmes enceintes atteintes d'une α -alpha thalassémie au centre médical saint camille de ouagadougou. Université de Ouagadougou Burkina Faso, 57 P.
- Dubois S, McGovern M, Ehrhardt V. 1988. Eisenstoffwechsel-Diagnostik mit Boehringer Mannheim/Hitachi-Analysensystemen: Ferritin, Transferrin und Eisen. *GIT Labor-Medizin.*, **9**: 468 – 471.
- Heidelberger M, Kendall FE. 1935. A quantitative theory of the precipitin reaction. *J Exp Med.*, **62**: 697 – 720.
- Kassu A, Yabutani T, Mahmud ZH, Mohammad A, Nguyen N, Huong BTM, Hailemariam G, Diro E, Ayele B, Wondmikun Y, Motonaka J, Ota F. 2006. Alterations in serum levels of trace elements in tuberculosis and HIV infections. *Euro. J. Clin. Nutr.*, **60**: 580 – 586.
- Marioa N. 2012. Marqueurs biologiques pour le diagnostic des troubles du métabolisme du fer. *Rev. Franco. Labo.* **442**: 39 – 48.
- Celi J, Samii K, Perrier A, Remi J-L. 2011. Anémie ferriprive, inflammatoire ou mixte : comment orienter le diagnostic? *Rev. Med. Suisse*, **7**: 2018 – 2023.
- Gavazzi G. 2014. Métabolisme du fer : physiopathologie et biomarqueurs chez le sujet âgé. *Geriatr Psychol Neuropsychiatr Vieil.*, **12**: 5 – 10.
- Lovey P-Y, Stalder M, Zenhäusern R, Donzé N, 2010. Paramètres biochimiques du métabolisme du fer. *Caduceus Exp.*, **12**(11).
- Beaumont C, Karim Z. 2013. Actualité du métabolisme du fer. *Rev. Med. Interne*, **34**: 17 – 25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.revmed.2012.04.006>
- WAGNER A. 2000. Le rôle du laboratoire dans l'exploration du métabolisme du fer. *Revue de l'ACOMEN*, **6**: 23–27.

Résumé :

La prise en charge de la tuberculose multirésistante est devenue un problème majeur de santé publique. Le développement de cette forme de tuberculose est essentiellement dû au déficit immunitaire et à l'anémie chez ces personnes atteintes d'une TB-MDR. En vue d'améliorer la prise en charge médicale de ces patients, le statut micronutritionnel représente un volet essentiel d'évaluation de la performance des défenses immunitaires de ces TB-MDRs et partant du succès des traitements antituberculeux. L'objectif général est d'étudier l'impact de l'infection à *Mycobacterium tuberculosis* et du traitement antituberculeux de seconde ligne sur le statut micronutritionnel des patients.

Le dosage des vitamines A, D et E a été réalisé à l'aide d'une chaîne de chromatographie liquide à haute performance à l'unité de recherche, évaluation et identification (RIEM) du département de biochimie médical et fondamental de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire. En ce qui concerne les concentrations en oligoéléments tels que le fer, le cuivre et le zinc, elles ont été déterminées à l'aide d'un spectromètre d'absorption atomique au laboratoire des procédés industriels de synthèse, de l'environnement et des énergies nouvelles (LAPISEN) de l'Institut Polytechnique Houphouët-Boigny de Yamoussoukro.

Les résultats ont montré une baisse significative des concentrations en vitamines A D E, en fer, zinc et un ratio cuivre/zinc très élevé tant au bilan initial qu'au bilan de suivi pendant 6 mois de traitement. Ce déficit en ces micronutriments pourrait justifier le déficit du système immunitaire et le niveau élevé de stress oxydant qui caractérisent l'infection mycobactérienne. Aussi la baisse des teneurs en fer sérique et certains marqueurs hématologiques et biochimiques du métabolisme du fer ont également montré l'origine inflammatoire de l'anémie observée chez ces TB-MDRs. La persistance de ce désordre métabolique après 6 mois de traitement apporte la preuve que le traitement antituberculeux seul ne suffit pas pour une prise en charge efficace de cette forme de tuberculose. D'où la nécessité des mesures additives telles que la supplémentation en certains micronutriments notamment les vitamines A D E et le zinc et une prise en charge efficace de l'inflammation.

Mots clés : Abidjan, Tuberculose multirésistante, Micronutriments

Abstract :

The management of multidrug-resistant tuberculosis has become a major public health problem. The development of this form of TB is due to immune deficiency and anemia in these people with TB-MDR. In order to improve the medical management of these patients, the micronutrient status is a critical component of performance assessment of immune defenses of these TB-MDR and thus the success of TB treatment. The objective of this work is to study the impact of *Mycobacterium tuberculosis* infection and second-line anti-tuberculosis treatment on the micronutrients status of patients.

The vitamins A, D and E were assayed using a high-performance liquid chromatography (HPLC) in the Department of Medical and Fundamental Biochemistry of the Institute Pasteur of Ivory Coast. Regarding the concentrations of trace elements such as iron, copper and zinc, they were determined using an atomic absorption spectrometer in the laboratory of the Houphouët-Boigny Polytechnic Institute of Yamoussoukro.

The results showed a significant decrease in vitamin A D E, iron, zinc and a high Copper / zinc ratio before and after 6 months of second line anti-TB treatment. This deficiency in these micronutrients could justify the deficit of the immune system and the high level of oxidative stress that characterize mycobacterial infection. Also the decrease in serum iron levels and some haematological and biochemical markers of iron metabolism also showed the inflammatory origin of the anemia observed in these TB-MDR. The persistence of this metabolic disorder after 6 months of treatment provides evidence that TB treatment alone is not sufficient to effectively manage this form of tuberculosis. Hence the need for additive measures such as supplementation with some micronutrients including vitamins A D E and zinc and effective management of inflammation.

Keywords : Abidjan, Multi-Drug resistant TB, Micronutrients