

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
Ministère de l'Enseignement supérieur et de la recherche scientifique  
Université SAAD DAHLAB – Blida 1



Faculté des sciences de la Nature et de la vie

Département de biologie

*Mémoire de fin d'études*

En vue de l'obtention du diplôme de master dans le domaine SNV

Filière sciences Biologique

**Option : Microbiologie**

**Thème :**

**L'étude de la multirésistance de *Mycobacterium tuberculosis*  
aux antituberculeux**

Présentée par :

Moreblessing Zengwa

Nkulu Kalobwe Martine

**Date de soutenance :**

**Devant le jury :**

**Nom**

**Grade / lieu**

**Qualité**

**Boudjema N**

**Présidente**

**Mohamed Mahmoud F**

**Examinatrice**

**Guetarni D**

**Promoteur**

**Promotion : 2020-2021**

# TABLE DE MATIERE

Liste des abréviations .....	VII
Remerciement.....	VIII
<b>Résumé .....</b>	<b>1</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>2</b>
<b>PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>4</b>
<b>Chapitre 1 : Mycobacterium tuberculosis.....</b>	<b>5</b>
<b>1. Définition.....</b>	<b>5</b>
<b>2. Taxonomie - classification.....</b>	<b>5</b>
<b>a. Le Complexe <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (CMT) :.....</b>	<b>7</b>
<b>b. <i>Mycobacterium leprae</i> .....</b>	<b>8</b>
<b>c. Les mycobactéries atypiques (non tuberculeuse) .....</b>	<b>8</b>
<b>3. Agent étiologique .....</b>	<b>9</b>
<b>4. Caractéristiques.....</b>	<b>10</b>
<b>Chapitre 2 La Tuberculose humaine .....</b>	<b>12</b>
<b>1. Mode de transmission .....</b>	<b>12</b>
<b>1.1. La voie respiratoire :.....</b>	<b>12</b>
<b>1.2. Voie digestive .....</b>	<b>12</b>
<b>1.3. Tuberculose d'inoculation et intraveineuse.....</b>	<b>13</b>
<b>2. Pathogénicité.....</b>	<b>13</b>
<b>a. Contamination par le bacille tuberculeux :.....</b>	<b>14</b>
<b>b. Infection de macrophage : .....</b>	<b>14</b>
<b>c. Lésions induites par le bacille (Granuloma) : .....</b>	<b>15</b>
<b>3. Personnes à risque .....</b>	<b>16</b>
<b>4. Répartition géographique de la tuberculose humaine dans le monde.....</b>	<b>17</b>
<b>5. Symptômes .....</b>	<b>19</b>
<b>5.1. TB latente :.....</b>	<b>19</b>
<b>5.2. TB active : .....</b>	<b>20</b>
<b>6. Prophylaxie .....</b>	<b>20</b>
<b>6.1. Vaccination par le BCG .....</b>	<b>20</b>
<b>6.2. Investigations autour d'un cas de tuberculose.....</b>	<b>21</b>
<b>6.3. Prévention de la transmission de la tuberculose dans les établissements de santé....</b>	<b>22</b>

<b>Chapitre 3 Diagnostic de la Tuberculose</b> .....	23
<b>1. Méthodes classiques</b> .....	23
<b>1.1. Diagnostic indirect</b> .....	23
<b>a. Intradermo-réaction (IDR) :</b> .....	23
<b>b. Dosage de gamma interféron/ test sanguin :</b> .....	24
<b>1.2. Diagnostic direct</b> .....	25
<b>a. Examen microscopique :</b> .....	25
<b>b. Traitement du prélèvement et mise en Culture :</b> .....	26
<b>c. Identification :</b> .....	29
<b>2. Méthodes de biologie moléculaire (Diagnostic moléculaire)</b> .....	32
<b>a. Le spoligotypage :</b> .....	32
<b>b. Les MIRU-VNTRs :</b> .....	34
<b>c. Les régions de délétion :</b> .....	35
<b>e. Xpert MTB/RIF</b> .....	38
<b>f. LINE PROBE ASSAY (LiPA</b> .....	39
<b>g. Autres techniques</b> .....	39
<b>Chapitre 4 Traitement et résistance aux antituberculeux</b> .....	41
<b>1. Traitement</b> .....	41
<b>1.1. Les antibiotiques de première ligne</b> .....	42
<b>1.2. Les antibiotiques de deuxième ligne</b> .....	44
<b>2. Résistance</b> .....	47
<b>a. Origine et types de résistance de MTB</b> .....	47
<b>b. Mécanisme de résistance</b> .....	48
<b>PARTIE EXPERIMENTALE</b> .....	51
<b>Cadre de l'étude :</b> .....	52
<b>Echantillons biologiques</b> .....	53
<b>Matériels :</b> .....	53
<b>Méthodes</b> .....	54
<b>RESULTATS :</b> .....	62
<b>DISCUSSION</b> .....	65
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	Erreur ! Signet non défini.

# Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Cliché de <i>M. tuberculosis</i> en microscopie .....	10
<b>Figure 2</b> : Représentation du génome de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv (Cole et al., 1998).....	11
<b>Figure 3</b> : A. Coupe histologique d'un granulome B. Aspect macroscopique du tissu pulmonaire (Source : <a href="http://campus.cerimes.fr/microbiologie/enseignement/microbiologie_3">http://campus.cerimes.fr/microbiologie/enseignement/microbiologie_3</a> ) .....	15
<b>Figure 4</b> : Nombre de cas estimés de tuberculose dans le monde en 2019 (source : OMS rapport 2020) .....	17
<b>Figure 5</b> : Nombre de cas estimés de tuberculose multirésistante parmi les cas de tuberculose notifiés en 2019 (OMS rapport 2020) .....	18
<b>Figure 6</b> : test cutané tuberculinique de Mantoux (source : Knobloch G.2004) et la lecture du résultat (CDC,2016).....	24
<b>Figure 7</b> : étuve pour culture des mycobacteries sur milieu en pente (sources : <a href="https://microbiologiemedicale.fr/securite-coloration-culture-mycobacteries/">https://microbiologiemedicale.fr/securite-coloration-culture-mycobacteries/</a> ) .....	28
<b>Figure 8</b> : Profils génomiques en spoligotypage des membres du complexe <i>M. tuberculosis</i> (Kamerbeek et al 1997) .....	33
<b>Figure 9</b> : Distribution des 41 locus MIRU sur le génome de H37rv. (Cole et al., 1998).....	35
<b>Figure 10</b> : Schéma proposé pour l'évolution des bacilles tuberculeux .....	37
<b>Figure 11</b> : appareil GeneXpert .....	39
<b>Figure 12</b> : Antibiotiques de première ligne utilisés pour le traitement de la tuberculose sensible et leur mode d'action (source : Timouyas Y., 2017).....	44
<b>Figure 13</b> : coloration à la fuchsine (source : hôpital CHU de Beni messous) .....	55
<b>Figure 14</b> : lecture de frottis par coloration de ziehl-Nelsen .....	62
<b>Figure 15</b> : coloration à l'Auramine (source : Hôpital CHU de Beni messous).....	56
<b>Figure 16</b> : lecture de frottis par coloration à l'auramine .....	62

<b>Figure 17 :</b> Homogénéisation et décontamination des échantillons (source : hôpital CHU Beni messous).....	57
<b>Figure 18:</b> Culture solide sur milieu Lowenstein Jensen (source : <a href="https://microbenotes.com/mycobacterium-tuberculosis/">https://microbenotes.com/mycobacterium-tuberculosis/</a> ) .....	58
<b>Figure 19:</b> Milieu de culture solide et liquide (source : hôpital CHU Beni messous).....	60
<b>Figure 20:</b> Système MGIT (source : hôpital CHU beni messous).....	60
<b>Figure 21:</b> Antibiogramme pour <i>M. tuberculosis</i> est faite pour Isoniazide, Rifampicine, éthambutol, Streptomycine. (source : hôpital CHU beni messous).....	61

# Liste des tableaux

<b>Tableau I:</b> Liste des espèces et sous-espèces du genre Mycobacterium. D'après LBSN List of bacterial names with standing in nomenclature ( <a href="http://www.bacterio.cict.fr/index.html">www.bacterio.cict.fr/index.html</a> ) et DSMZ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen and Zellkulturen GmbH ( <a href="http://www.dsmz.de/species/bacteria.htm">www.dsmz.de/species/bacteria.htm</a> ).....	6
<b>Tableau II:</b> Caractères cultureux et biochimiques des mycobactéries du complexe tuberculeux .....	31
<b>Tableau III:</b> Classifications existantes des médicaments antituberculeux (1 et 2) (source : Tiberi et al, 2017).....	46
<b>Tableau IV :</b> Résultats de la microscopie et de la culture pour les prélèvements autres que crachats.	63
<b>Tableau V :</b> Interpretation des résultats de la microscopie.....	67
<b>Tableau VI:</b> Interprétation des résultats de la culture : .....	67

## Liste des abréviations

ADN:	Acide Désoxyribo Nucleique
ARN:	Acide Ribo Nucléique
B.A.A.R :	Bacilles acido-alcool-résistants
BCG :	Bacille de Calmette et Guérin
CDC :	Centre of disease control
CMB:	Complexe mycobacterium tuberculosis
DR :	Direct Repeat
DST :	Drug susceptibility testing
DTB :	Tuberculose disséminée
EMB :	Ethambutol
EP:	Extra-pulmonaires
EPTB :	Tuberculose extrapulmonaire
GUTB :	Tuberculose génito-urinaire
IDR :	L'intradermo-réaction
INH :	Hydrazide d'acide isonicotinique
ITL :	Infection tuberculosis latente
KMnO <sub>4</sub> :	Permanganate de potassium
LCR :	Liquid cephalorachidienne
LED:	Light emitting diode
LiPA :	Line Probe Assay
LJ :	Löwenstein Jensen
LPA-SL:	Line Probe Assay second line
MDR-TB:	Tuberculose multirésistante
MGIT :	Mycobacteria Growth Indicator Tube
MLVA:	Multilocus Variable Number of Tandem Repeats Analysis
MNT :	Mycobactérie non tuberculose
MTB:	Mycobacterium tuberculosis
OMS :	Organisation mondiale de santé
PAS :	L'acide para-aminosalicylique (PAS).
PCR :	Polymerase chain reaction
PPD :	Purified Protein Derivative
PTB:	Tuberculose pulmonaire
PZA :	L'amide de l'acide pyrazinoïde
RD :	Régions de différence appelées
RFB :	Rifabutine
RFLP :	Restriction Fragment Length Polymorphism
RFP:	Rifapentine
RGM:	Rapide growth mycobacteria
RIF :	Rifamycine
RMP :	Rifampicine
RRDR:	Rifampin Resistance Determining Region
SM :	Streptomycine
SNP :	Polymorphismes mononucléotidiques
TBA :	Tuberculose ganglionnaire abdominale
TBG :	Tuberculose ganglionnaire
TBM :	Tuberculose miliaire
TCT :	Test cutané tuberculique de Mantoux
VIH :	Virus d'immuno déficience humaine
VNTR:	Variable number tandem repeat
XDR-TB :	La tuberculose ultrarésistante

## Remerciement

Nous tenons à remercier Dieu de nous avoir donné la vie, la force et le courage de pouvoir nous concentrer sur ce travail, de nous avoir assisté tout au long et nous permettre d'avoir ce diplôme.

Nous avons une profonde dette de gratitude envers notre université pour nous avoir donné l'occasion de terminer ce travail.

Nous sommes reconnaissantes à nos professeurs qui ont travaillé dur avec nous du début jusqu'à la fin, vos conseils avisés, ses critiques perspicaces et ses encouragements patients ont aidé à la rédaction de ce mémoire d'innombrables façons.

Nous voudrions dans un premier temps remercier, notre directeur de mémoire monsieur Djamel Guetarni, professeur à l'université Saad Dahleb Blida 1, pour sa patience, sa disponibilité. Qui nous a méticuleusement conseillé et motivé pour donner ce produit final. Sans encadrement de cette qualité, ce mémoire n'aurait jamais été réalisé de manière satisfaisante. Merci encore professeur Guetarni

Nous remercions tous les membres du jury d'avoir accepté de juger notre travail et assisté à la soutenance, madame Boudjema N. qui a accepté de présider le jury et madame Mohamed mahmoud F. qui nous a fait l'honneur d'examiner nos travaux. Merci de permettre aujourd'hui l'aboutissement de notre travail.

Nous tenons à témoigner toute notre reconnaissance aux personnes suivantes, pour leur aide dans la réalisation de ce mémoire :

A monsieur Yala Djamel et tous les laborantins pour leur patience, leur bienveillance, leur confiance et de nous avoir permis d'assister au diagnostic des malades tuberculeux au laboratoire central de l'Hôpital CHU de Beni Messous, car cela nous a aidé dans la réalisation de ce projet que dans notre construction professionnelle et personnelle.

Nous tenons également à remercier chaleureusement nos familles et plus particulièrement nos parents pour le soutien généreux qu'ils nous ont apporté tout au long de notre vie et en particulier tout au long du processus de poursuite du master. En raison de leur amour inconditionnel et de leurs prières, nous avons la chance de finir ce mémoire.

Nous adressons nos sincères remerciements à toutes les personnes qui par leurs paroles, leurs écrits, leurs conseils et leurs critiques ont guidé nos réflexions et ont accepté de nous rencontrer et de répondre à nos questions durant nos recherches.

A nos ami(e)s, nous ne pouvons pas tous vous citer ici mais nous aimerions profiter de cette occasion pour vous remercier de nous avoir soutenu tout au long de notre cursus.

## Dédicace

Avec l'expression de ma reconnaissance, je dédie ce modeste travail à ceux qui, quels que soient les termes embrassés, je n'arriverais jamais à leur exprimer mon amour sincère.

A la femme qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a jamais dit non à mes exigences et qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureuse : mon adorable mère Agnès Nkulu.

A mon père, mon précieux offre de Dieu à qui je dois ma vie et mon respect : mon chère père  
Louis Nkunda.

A mes chers oncles Franck Mbuyu et Jean Mbuyu qui m'ont prise en charge, n'ont pas cessée de me conseiller, encourager et soutenir tout au long de mes études. Que Dieu les protège et leurs offre une longue vie.

A madame Nadjat Belbachir, qui a accepté de me prendre sous son aile depuis mon arrivé en Algérie, qui a veillée sur moi et n'a cessé de m'encourager et me soutenir. Que Dieu la protège tout au long de sa vie.

A mes chères sœurs, mon frère et toute ma famille, qui croient en moi et savent toujours comment m'encourager et me procurer la joie et le bonheur.

A mes ami(e)s Nadine Sana, Rudel Gbadoe, Merveille Kakudji, Bobby Kalala, Kawel Mutombo, Merlin Basema qui ont toujours étaient là pour moi, m'ont soutenu et encouragé dans la rédaction de mon mémoire.

A vous tous

Merci !

## Dédicace

Un sentiment spécial de gratitude à mes parents bien aimé, Michael et Juliet qui ne cessent de se donner dans d'innombrables façons et de m'avoir donné la force d'atteindre les étoiles et de poursuivre mes rêves.

A mes sœurs Abigail et Rumbidzai et mes frères Munyaradzi et Munashe dont des mots d'encouragement ne m'ont jamais quitté et sont très spéciaux.

Je dédie également ce mémoire à mes amis qui m'ont soutenu tout au long du processus. J'apprécierai toujours tout ce qu'ils ont fait, en particulier Kudzaiishe et Peacemaker pour votre compréhension et vos encouragements dans mes nombreux moments de crise. Votre amitié fait de ma vie une expérience merveilleuse

Nous espérons que ce mémoire ajoutera des nouvelles connaissances sur les attributs uniques de cette bactérie super intelligente afin de permettre le développement de nouvelles interventions, notamment des médicaments et des vaccins. Dans nos pays d'origine, le Zimbabwe et le Congo (RDC) ainsi qu'à l'Algérie qui est devenu notre deuxième maison



# Résumé

La tuberculose (TB) constitue un problème majeur de santé publique mondial. Son contrôle est devenu de plus en plus compliqué suite à l'émergence de souches résistantes à la rifampicine, voire des souches multirésistantes et ultrarésistantes.

L'objectif de ce travail est d'identifier la source des cas de résistance du *Mycobacterium tuberculosis* aux antituberculeux, l'identification des principaux facteurs de risques associés à cette résistance, ainsi que d'évaluer la sensibilité des techniques d'analyse utilisées dans plusieurs centres et l'examen direct par rapport à la culture.

La tuberculose est due à une bactérie du genre *Mycobacterium*, comprend un grand nombre d'agent pathogène pour les animaux et les humains. Ce genre peut être subdivisé en trois groupes : les mycobactéries du « complexe tuberculosis », Le *M. leprae* et les mycobactéries atypiques ou mycobactérie non tuberculeuse (Carbonnelle et al., 2003). L'être humain est le seul réservoir connu de *M. tuberculosis* (Therchline,2020). Après contamination il peut y avoir une tuberculose latente et une tuberculose maladie affectant généralement les poumons mais aussi d'autres parties de l'organisme.

Les techniques traditionnelles de microscopie et de culture restent consubstantielles du diagnostic de certitude comme effectuer à l'hôpital CHU de Beni Messous la coloration à l'auramine et Ziehl-Neelsen, la culture sur milieu MGIT automatisé permettant d'avoir des résultats dans un délai minime et sur le milieu Löwenstein Jensen ; tout en réalisant un test de sensibilité aux antituberculeux de première ligne. Toutefois par faute des moyens la culture n'est faite que pour les prélèvements de tuberculose extra-pulmonaire suspectée.

Pour réduire l'infectiosité et améliorer la lutte contre la tuberculose en diminuant le délai de diagnostic, les nouveaux outils de diagnostic qui utilisent les techniques moléculaires doivent être largement utilisés pour détecter la tuberculose MDR le plus tôt possible avec un traitement efficace et précoce, tout en connaissant les procédures optimales de contrôle des infections.

Un sentiment d'urgence et des changements significatifs dans la politique et la pratique de la santé publique sont nécessaires si nous voulons atteindre les objectifs de la stratégie « **mettre fin à la tuberculose** ».

# Introduction

L'émergence et la propagation d'agents pathogènes résistants aux médicaments qui ont acquis et sont en train d'acquérir de nouveaux mécanismes de résistance, menant à une résistance aux antimicrobiens, continuent de menacer notre capacité à traiter les infections courantes, ce qui entraîne des décennies de progrès dans la santé et la médecine moderne (chimiothérapie, transplantations d'organes et chirurgie), ainsi que la réalisation des objectifs des Nations Unies de développement durable.

En 2020 l'Organisation Mondiale de la Santé a déclaré que la résistance aux antimicrobiens est l'une des 10 principales menaces mondiales pour la santé publique auxquelles l'humanité est confrontée (OMS, 2020)

Notre étude se concentre sur la Tuberculose qui est la maladie infectieuse la plus ancienne de l'histoire. Contrairement à des virus tels que le VIH, la grippe ou le récent nouveau coronavirus SARS-CoV-2, la tuberculose est causée par une bactérie (*Mycobacterium tuberculosis*). Elle représente une menace persistante pour la santé publique pour un certain nombre de raisons biologiques et sociologiques complexes.

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, la tuberculose est considérée comme la neuvième cause de décès dans le monde avec le taux d'infections et de mortalité les plus élevés dans les pays en développement (OMS ,2020).

Elle touche principalement les jeunes adultes dans les années les plus productives de leur vie, bien que toutes les tranches d'âge soient à risque. Toute personne peut développer une tuberculose, mais la maladie est particulièrement problématique chez les groupes « à haut risque » (Dlodlo et al,2019).

La tuberculose est une maladie anthrozoönose, l'infection est la présence persistante (toujours anormale) de bacilles tuberculeux dans l'organisme. Elle fait suite à la pénétration des bacilles tuberculeux, le plus souvent par voie aérienne, plus rarement digestive ou transtégumentaire (Fraisie et Veziris ;2015).

Dans la plupart des cas, la tuberculose est traitable et curable. La durée et les effets secondaires poussent certaines personnes à abandonner leur traitement ; ce qui peut mener à des mutations

génétiques qui protègent les bacilles contre l'action des médicaments et cela induit à une résistance aux médicaments.

En effet pour comprendre l'émergence des souches résistantes, il est nécessaire d'étudier l'histoire évolutive et la diversité génétique de ces bacilles tuberculeux et en particulier celle qui est liée au complexe d'espèce *M. tuberculosis* par une approche de génétique de population bactérienne. Ces nouvelles connaissances, notamment dues au progrès en génomique, devraient contribuer au développement de nouvelles immunothérapies (Ananya , 2019).

Nous apportons notre contribution dans :

- La recherche de *M tuberculosis* dans des prélèvements de crachats et autres provenant de malades suspects de tuberculose.
- L'étude de la sensibilité aux antituberculeux de première ligne.

# **PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE**

# Chapitre 1 : *Mycobacterium tuberculosis*

## 1. Définition

*Mycobacterium tuberculosis* appelé autrement bacille de Koch est défini par trois critères, sa propriété d'acido-alcool-résistante, sa composition en acides mycoliques et son contenu en Guanine et Cytosine au niveau de l'ADN.

*Mycobacterium tuberculosis* (MTB) est l'agent infectieux responsable d'une maladie contagieuse appelée tuberculose qui affecte généralement les poumons (tuberculose pulmonaire) mais peut également affecter d'autres sites (tuberculose extra pulmonaire). C'est une anthroponose majeure bien connue qui sévit dans le monde entier, elle occupe une place importante, en raison de graves problèmes de santé publique, Robert Koch l'a décrit pour la première fois en 1882 (Kazda , 2009)

**C'est une maladie à déclaration obligatoire** (Toma et Dufour, 2004).

## 2. Taxonomie - classification

Le genre *Mycobacterium* étant l'unique genre de l'Ordre d'Actinomycetales, de la famille de Mycobacteriaceae ; Le genre *Mycobacterium* comprend plus de 170 espèces, dont la plupart sont des organismes environnementaux (Fedrizzi et al. 2017).

Les mycobactéries sont des bactéries gram-positives immobiles, à croissance lente, en forme de bâtonnet, avec une teneur élevée en G + C génomique (61-71%). En raison de leurs caractéristiques de coloration spéciales au microscope, qui est médiée par l'acide mycolique dans la paroi cellulaire, ils sont appelés acido-résistants.

**Tableau I:** Liste des espèces et sous-espèces du genre *Mycobacterium*. D'après LBSN List of bacterial names with standing in nomenclature ( [www.bacterio.cict.fr/index.html](http://www.bacterio.cict.fr/index.html) ) et DSMZ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen and Zellkulturen GmbH ( [www.dsmz.de/species/bacteria.htm](http://www.dsmz.de/species/bacteria.htm) ).

N°	Espèce	Année*	n°	Espèce	Année*	n°	Espèce	Année*
1	<i>M. abscessus</i>	1992 (1953)	30	<i>M. fortuitum</i>	1980 (1938)	64	<i>M. murale</i>	1999
				subsp.		65	<i>M. neoaurum</i>	1980 (1972)
2	<i>M. africanum</i>	1980 (1969)		<i>acetamidolyticum</i>	1986	66	<i>M. nonchromogenicum</i>	1980 (1965)
				subsp. <i>fortuitum</i>	1990 (1938)	67	<i>M. novocastrense</i>	1997
3	<i>M. agri</i>	1981 (1972)	31	<i>M. frederiksbergense</i>	2001	68	<i>M. obuense</i>	1981(1971)
4	<i>M. aichiense</i>	1981 (1973)	32	<i>M. gadium</i>	1980 (1974)	69	<i>M. palustre</i>	2002
5	<i>M. alvei</i>	1992	33	<i>M. gastri</i>	1980 (1966)	70	<i>M. parafortuitum</i>	1984 (1965)
6	<i>M. asiaticum</i>	1980 (1971)	34	<i>M. genavense</i>	1993	71	<i>M. peregrinum</i>	1992 (1962)
7	<i>M. aurum</i>	1980 (1966)				72	<i>M. phlei</i>	1980 (1899)
8	<i>M. austroafricanum</i>	1983	35	<i>M. gilvum</i>	1980 (1971)	73	<i>M. porcinum</i>	1983
9	<i>M. avium</i>	1980 (1901)	36	<i>M. goodii</i>	1999	74	<i>M. poriferae</i>	1987
	subsp. <i>avium</i>	1990	37	<i>M. gordonae</i>	1980 (1962)	75	<i>M. pulveris</i>	1983
	subsp. <i>paratuberculosis</i>	1990	38	<i>M. haemophilum</i>	1980 (1978)	76	<i>M. rhodesiae</i>	1981 (1971)
	subsp. <i>silvaticum</i>	1990	39	<i>M. hassiacum</i>	1997	77	<i>M. scrofulaceum</i>	1980 (1956)
	<i>M. bohemicum</i>	1998	40	<i>M. heckeshornense</i>	2001 (2000)	78	<i>M. senegalense</i>	1980 (1973)
10	<i>M. botmiense</i>	2000	41	<i>M. heidelbergense</i>	1998 (1997)	79	<i>M. septicum</i>	2000
11	<i>M. bovis</i>		42	<i>M. hiberniae</i>	1993	80	<i>M. shimoidei</i>	1982 (1975)
12	subsp. <i>bovis</i>	1980 (1907)	43	<i>M. hodleri</i>	1996	81	<i>M. shottsii</i>	2003
	subsp. <i>caprae</i>	2002 (1970)	44	<i>M. holsaticum</i>	2002	82	<i>M. simiae</i>	1980 (1965)
	<i>M. branderi</i>	2002 (1999)	45	<i>M. immunogenum</i>	2001	83	<i>M. smegmatis</i>	1980 (1889)
13	<i>M. brumae</i>	1995	46	<i>M. interjectum</i>	1995 (1993)	84	<i>M. sphagni</i>	1980
14	<i>M. celatum</i>	1993	47	<i>M. intermedium</i>	1993	85	<i>M. szulgai</i>	1980 (1972)
15	<i>M. chelonae</i>	1993				86	<i>M. terrae</i>	1980 (1966)
16	subsp. <i>abscessus</i>	1980 (1923)	48	<i>M. intracellulare</i>	1980 (1949)	87	<i>M. thermoresistibile</i>	1980 (1966)
	subsp. <i>chelonae</i>	1992 (1953)	49	<i>M. kansasii</i>	1980 (1955)	88	<i>M. tokaiense</i>	1981 (1973)
	<i>M. chitae</i>	1980 (1972)	50	<i>M. komossense</i>	1980 (1979)	89	<i>M. triplex</i>	1997 (1996)
17	<i>M. chlorophenicum</i>	1980 (1967)	51	<i>M. kubicae</i>	2000	90	<i>M. triviale</i>	1980 (1970)
18	<i>M. chubuense</i>	1994 (1986)	52	<i>M. lacus</i>	2002	91	<i>M. tuberculosis</i>	1980 (1883)
19	<i>M. confluentis</i>	1981 (1973)	53	<i>M. lentiflavum</i>	1996	92	<i>M. tusciae</i>	1999
20	<i>M. conspicuum</i>	1992	54	<i>M. leprae</i>	1980 (1880)	93	<i>M. ulcerans</i>	1980 (1950)
21	<i>M. cookii</i>	1996 (1995)	55	<i>M. lepaemurium</i>	1980 (1912)	94	<i>M. vaccae</i>	1980 (1964)
22	<i>M. diernhoferi</i>	1990	56	<i>M. madagascariense</i>	1992	95	<i>M. vanbaalenii</i>	2002
23	<i>M. doricum</i>	1983 (1965)	57	<i>M. mageritense</i>	1997			
24	<i>M. duvalii</i>	2001	58	<i>M. malmoense</i>	1980 (1977)	96	<i>M. wolinskyi</i>	1999
25	<i>M. elephantis</i>	1980 (1971)	59	<i>M. marinum</i>	1980 (1926)			
26	<i>M. fallax</i>	2000	60	<i>M. microti</i>	1980 (1957)	97	<i>M. xenopi</i>	1980 (1959)
27	<i>M. farcinogenes</i>	1983	61	<i>M. montefiorensis</i>	2003			
28	<i>M. flavescens</i>	1980 (1973)	62	<i>M. morioakaense</i>	1986			
29		1980 (1962)	63	<i>M. mucogenicum</i>	1995			

\* Année de classification et de 1<sup>re</sup> description entre parenthèses. Les espèces les plus fréquemment retrouvées en médecine humaine sont indiquées en gras.

En ce qui concerne leur habitat, le genre *Mycobacterium* peut être subdivisé en trois groupes : les mycobactéries du « complexe tuberculosis » (*M. tuberculosis*, *M. bovis* et **BCG**, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. microti*, *M. caprae*). Ces derniers ne sont retrouvés que chez des hôtes animaux ; Le *M. leprae* et les mycobactéries atypiques ou non tuberculeuses (MNT) (Carbonnelle et al., 2003).

La plupart des MNT appartiennent aux mycobactéries à croissance rapide (RGM) (Brown-Elliott et Philley, 2017). De plus, plusieurs mycobactéries dites non tuberculeuses (MNT) peuvent provoquer des maladies chez les personnes immunodéprimées.

**a. Le Complexe *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) :**

Ce terme a été utilisé pour la première fois par **Tsukamura** pour désigner les quatre espèces pathogènes stricts de *Mycobacterium* (Hoffner et al., 1993). Ces espèces présentent une analogie ADN/ADN supérieure à 95% (Bradley, 1973), mais ils diffèrent largement en termes de tropismes d'hôte, de phénotypes et de pathogénicité (Brosch et al. al., 2002 ; Rastogi et Sola, 2007 ; Wirth et al., 2008) ; *M. canettii* a été admis comme cinquième espèce composant ce complexe (Van Soolingen et al., 1997).

- *M. tuberculosis* est le principal agent de la tuberculose humaine qui touche le plus souvent les poumons. Il s'agit d'une maladie qui peut être prévenue et guérie (OMS, 2020).
- *M. africanum* a été décrit pour la première fois en 1968 à partir d'un isolement réalisé au Sénégal chez un patient atteint de tuberculose pulmonaire (Castets et al., 1968). Elle est principalement retrouvée dans les pays d'Afrique de l'Ouest où elle est impliquée dans la moitié des cas de tuberculose humaine (Bocar Baya et al., 2020). *M. africanum* est subdivisée en 2 types : l'un est prévalent dans le golfe de Guinée et l'autre est prévalent en Afrique de l'Ouest Occidentale (Muller et al., 2009 ; Berg et al., 2011).
- *M. bovis* : c'est l'agent principal de la tuberculose des bovins. Maladie présente sur tous les continents. Les bovins constituent le réservoir naturel du bacille. La température, l'exposition aux UV, l'humidité et le pH sont des facteurs influençant la survie de *M. bovis* et ce quelle que soit la matrice (Barbier et al., 2017)

- *M. microti* : a été à l'origine isolé de campagnols, mais a également été plus récemment isolé d'autres hôtes mammifères sélectionnés, y compris occasionnellement des humains. (Mickael Orgeur et al, 2021)
- *M. canettii* est considérée comme étant la bactérie la plus proche génétiquement de l'ancêtre commun du MTBC (complexe *Mycobacterium tuberculosis*) (Blouin et al., 2012). Sont très rares et ont été principalement isolés des cas de tuberculose humaine dans les pays autour de l'Afrique (Supply et Brosch, 2017)
- *M. caprae* a été reconnu principalement en Europe centrale, où il a parfois été isolé de lésions tuberculeuses de bovins, de porcs et de sangliers (*Sus scrofa*). Son isolement des humains a également été noté (García-Rodríguez et al., 2011).

#### **b. *Mycobacterium leprae***

Elle est génétiquement et phénotypiquement distincte de toutes les autres espèces de mycobactéries identifiées en raison de sa réduction évolutive du génome, est souvent représentée dans un clade génétique distinct (Cole et al 2001). Elle est responsable de la lèpre (est une maladie infectieuse chronique) qui est acido-résistant et de forme allongée. La maladie touche principalement la peau, les nerfs périphériques, la muqueuse des voies respiratoires supérieures ainsi que les yeux (OMS, 2021).

#### **c. Les mycobactéries atypiques (non tuberculeuse)**

Elles représentent un groupe multi spécifique et extrêmement hétérogène de bactéries environnementales et comprennent de nombreuses espèces qui peuvent causer des maladies graves. Bien que les MNT aient attiré une attention croissante au cours des deux dernières décennies, elles sont encore considérées comme des agents pathogènes assez insignifiants. (Lewin A and Schäfer H 2004)

Sur le plan pouvoir pathogène :

- **Chez l'homme**, *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *M. ulcerans*, *M. marinum* provoquent des infections spécifiques : la tuberculose, la lèpre, l'ulcère de Buruli (ulcère nécrosant) et le granulome des piscines. Mais les mycobactéries atypiques ne manifestent un pouvoir pathogène qu'en profitant d'une défaillance locale ou généralisée des défenses de l'hôte (Carbonelle et al., 2003).

- **Chez les animaux**, *M bovis* est responsable de la tuberculose des bovins, *M. avium* de celle des oiseaux, *M. paratuberculosis* est à l'origine de la maladie de Johne (para- tuberculose) et l'entérite hypertrophiante des bovidés.

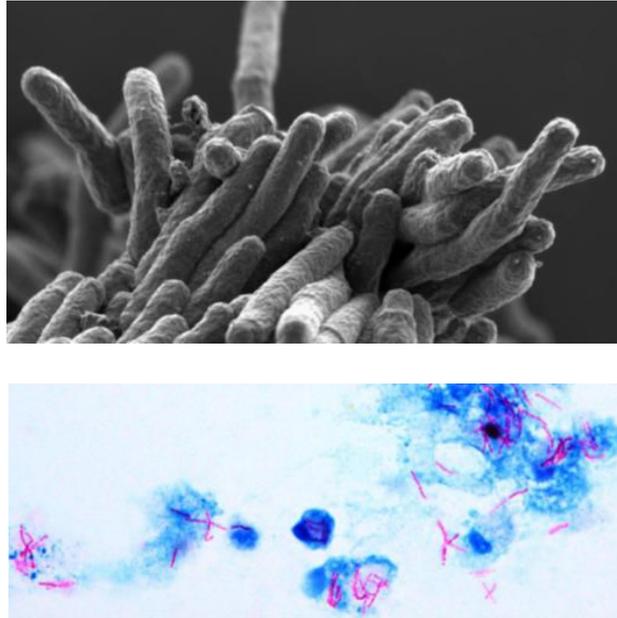
### **3. Agent étiologique**

La tuberculose est due à une bactérie du genre *Mycobacterium* (seul genre de la famille des Mycobactériaceae). Ce genre comprend un grand nombre d'agent pathogène pour les animaux et les humains (Benet, 2005) dont les plus importants sont ceux appartenant au complexe « *Mycobacterium tuberculosis* ».

*M. tuberculosis* et *M. africanum* (en Afrique tropicale) sont les agents principaux de la tuberculose humaine (Lavie et Calavas, 2007). *M. bovis* est l'agent étiologique de la tuberculose bovine (Benet, 2005).

Les bactéries du genre *Mycobacterium* sont à gram positif, aérobie strictes, non sporulées et immobiles, possédant une paroi composée de plusieurs couches lipidiques (acides mycoliques) qui leur confère la propriété d'être acido- alcool- résistant et une résistance à la phagocytose (Lavie et Calavas, 2007).

Morphologiquement, leur forme varie de la forme coccoïde à la forme bâtonnet de 0,3 à 0,6µm de large et 0,5 à 6µm de long (Good et Shinnick, 1998) (figure 1).



**Figure 1** : Cliché de *M. tuberculosis* en microscopie

En haut : Cliché de *M. tuberculosis* en microscopie électronique à balayage, extrait de l'article « The next anti-tuberculosis drug may already be in your local pharmacy » (Source : <https://actu.epfl.ch/news/the-next-anti-tuberculosis-drug-may-already-be-i-2/>)

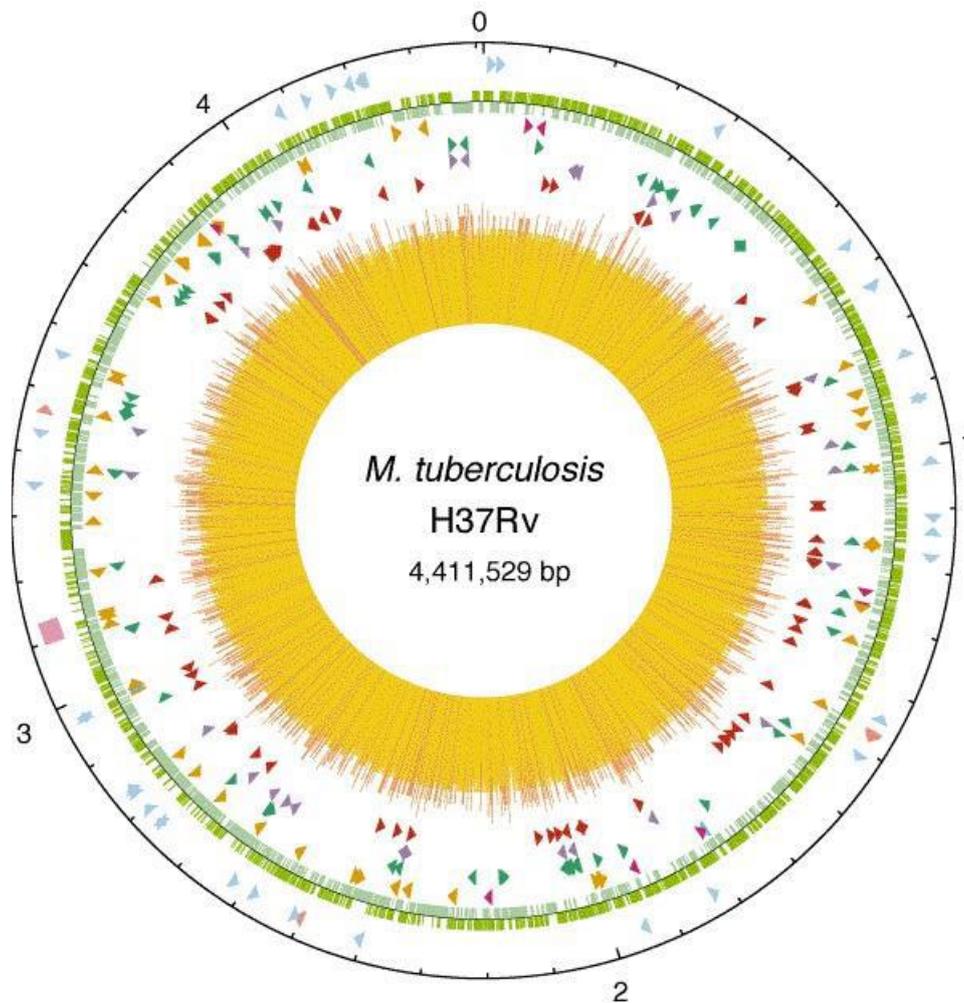
En bas : Cliché de microscopie confocale après coloration de Ziehl-Neelsen des bacilles. (Source : <http://veterinarymicrobiology.in/acidfast-staining/>).

#### **4. Caractéristiques**

*Mycobacterium tuberculosis* est strictement aérobie ; Elle se multiplie donc mieux dans les tissus pulmonaires (en particulier à l'apex, où la concentration en oxygène est plus élevée) que dans les organes plus profonds, elle est dite acido-alcool-résistante. Cette propriété constitue la base de la technique de coloration de Ziehl-Neelsen, mise au point par R. Koch et améliorée par F. Ziehl et F.C. Neelsen en 1885 et donne sur milieu de Löwenstein - Jensen des colonies en chou-fleur de couleur chamois, rugueuses et brillantes dans des conditions de laboratoire optimales à 37°C. Ces bactéries se caractérisent également par la composition en acides mycoliques (acides gras à longue chaîne) de leur paroi cellulaire conférant une haute imperméabilité de cette dernière et un faible niveau de fixation de la coloration de Gram qui leur donne la considération par défaut de bactéries Gram positives, ainsi que la résistance naturelle à certains antibiotiques usuels. (Traag et al., 2010).

Elles n'apparaissent jamais avant 15 jours. De forme bacillaire de 2 à 5 µm de long, légèrement incurvé, aux extrémités arrondies, non capsulé, immobile et la non-sporulation des mycobactéries est admise par la majorité des chercheurs (Traag et al., 2010).

*M. tuberculosis* se multiplie plus lentement que la majorité des bactéries ; c'est pourquoi la tuberculose a une évolution plus lente (provoque la maladie des semaines voire des mois, voire des années après l'infection) que la plupart des autres infections bactériennes.



**Figure 2 :** Représentation du génome de *M. tuberculosis* H37Rv (Cole et al., 1998).

Le cercle extérieur indique l'échelle en mégabases, 0 représente l'origine de réplication. Le premier cercle de l'extérieur représente les positions des gènes codant des ARN stables (ARNt en bleu, les autres en rose) et la région « Direct Repeat » (carré rose); le second cercle de l'intérieur montre les séquences codantes par brin (dans le sens horaire, vert foncé; antihoraire, vert clair); le troisième cercle représente les séquences répétées (les séquences d'insertion en orange; la famille REP13E12 en rose foncé; les prophages en bleu); le quatrième cercle montre les positions des membres de la famille des PPE (en vert); le cinquième cercle montre les membres de la famille des PE (en violets, à l'exclusion des PGRS); et le sixième cercle montre les positions des séquences PGRS (en rouge foncé). L'histogramme du centre représente le contenu en G+C, avec <65% G+C en jaune, et >65% G+C en rouge. La figure a été générée avec le logiciel DNASTAR.

# Chapitre 2 La Tuberculose humaine

## 1. Mode de transmission

La tuberculose est presque exclusivement aéroportée car, au départ, il s'agit généralement d'une infection du macrophage alvéolaire (Ordway et al.2006 ; Orme 2014). L'être humain est le seul réservoir connu de *M. tuberculosis* (Tomas,2020).

Il existe plusieurs voies de transmission :

### 1.1. La voie respiratoire :

La transmission airborne de la *M. tuberculosis* se produit soit par :

- Noyaux de gouttelettes en suspension dans l'air (petites particules de 5 mm ou moins), La source de l'infection est un patient atteint de tuberculose pulmonaire ou laryngée (TB) qui expectore les bacilles. En toussant, en parlant ou en éternuant, le patient produit de minuscules gouttelettes infectieuses. (Francis et Michael,2017).
- Particules de poussière contenant des agents infectieux. Les micro-organismes véhiculés restent longtemps en suspension dans l'air et peuvent être largement dispersées par les courants d'air. À cause de ça, il y a un risque que tout l'air d'une pièce soit contaminé.

### 1.2. Voie digestive

La transmission digestive de la tuberculose est connue en particulier pour la tuberculose zoonotique causée principalement par *M. bovis*. La tuberculose zoonotique est principalement une maladie d'origine alimentaire qui suit la consommation de lait ou de produits laitiers non pasteurisés. La viande d'animaux atteints de tuberculose n'est pas reconnue comme véhicule de transmission de *M. bovis*, au moins lorsqu'il est cuit, et *M. bovis* est rarement trouvé dans le muscle (Macedo et al 2019).

### **1.3. Tuberculose d'inoculation et intraveineuse**

L'inoculation cutanée est également une voie de transmission rare, rapportée dans certains cas accidentels chez les agents de santé (Huang et Yin, 2013), ou chez des patients suite à des injections de corticostéroïdes ou à un traumatisme cutané (Jong De et. Altena,2000) et à un tatouage (Horney et al 1985). Cette voie d'inoculation entraîne une tuberculose cutanée primitive. Dans de rares cas, la tuberculose peut être contractée après une transplantation d'organe solide d'un donneur d'organe infecté, et en raison de l'immunosuppression, les receveurs de transplantation développent fréquemment une tuberculose extra-pulmonaire ou disséminée ; cependant, la tuberculose après transplantation d'organe solide est le plus souvent causée par une primo-infection ou la réactivation d'une infection latente (Abad et Razonable 2018).

La probabilité de transmission du MTB est proportionnelle à la durée de l'exposition à une personne infectieuse et inversement proportionnelle au volume d'espace dans lequel les expositions se produisent (Michael , 2016).

Les patients infectés par *M. tuberculosis*, mais sans maladie active, ne peuvent pas transmettre la tuberculose. Les formes extra-pulmonaires (EP) de TB ne sont contagieuses que dans des circonstances exceptionnelles.

Les enfants sont généralement beaucoup moins contagieux que les adultes. (Ananya, 2019), Cela peut être dû à une mécanique de la toux plus faible, à une moindre production de crachats et à une charge bacillaire plus faible. (Francis et Michael 2017). Toutes les personnes exposées à un patient atteint de tuberculose infectieuse ne sont pas infectées par la tuberculose.

## **2. Pathogénicité**

### **Mechanise dinhibition**

Pour assure une colonisation efficace et survivre au sein de leur organisme hôte ; la plupart des agents pathogènes ont élaboré des stratégies permettant d'atténuer la réponse immunitaire développée lors de l'infection *mycobacterium tuberculosis* inhibe la fonction des macrophages ; cellules de system immunitaire innée dont le role est de reconnaitre et de tuer les microorganismes infectieux

La pathogénicité est la capacité d'un organisme à provoquer une maladie. Cette capacité représente une composante génétique du pathogène et les dommages manifestes causés à l'hôte sont une propriété des interactions hôte-pathogène. Elle permet de mieux comprendre quels sont les facteurs de risque et pourquoi certaines populations sont plus exposées au risque de tuberculose.

Afin de comprendre la pathogénèse de l'infection à MTB au niveau moléculaire, il est essentiel de comprendre le comportement clinique de ce pathogène dans son seul hôte naturel (Miggiano et al 2020).

La pathogénicité du MTB repose principalement sur :

**a. Contamination par le bacille tuberculeux :**

Une fois inhalées, les particules infectieuses sont déposées dans les voies respiratoires. La majorité des bacilles est piégée dans le mucus de la partie supérieure des voies aériennes ensuite évacuées par les mouvements ciliaires. Les bactéries qui échappent au système mucociliaire atteignent les bronchioles terminales et les alvéoles où elles sont phagocytées par les macrophages alvéolaires. La phagocytose initie une cascade d'événement qui aboutit soit à un contrôle efficace de l'infection, suivi par une infection tuberculeuse latente, soit à une progression vers la tuberculose maladie. Le résultat dépend essentiellement de la qualité des défenses de l'hôte et de l'équilibre entre les défenses de l'hôte et la mycobactérie qui se modulent réciproquement. (Veziris,2005)

**b. Infection de macrophage :**

MTB cible préférentiellement les vacuoles de macrophages où ils sont constamment exposés aux effecteurs antimicrobiens du macrophage qui incluent des espèces réactives d'oxygène plus l'azote ainsi qu'un pH bas qui pourrait compromettre l'infection primaire, la latence et la réinfection (Gorna et al, 2010).

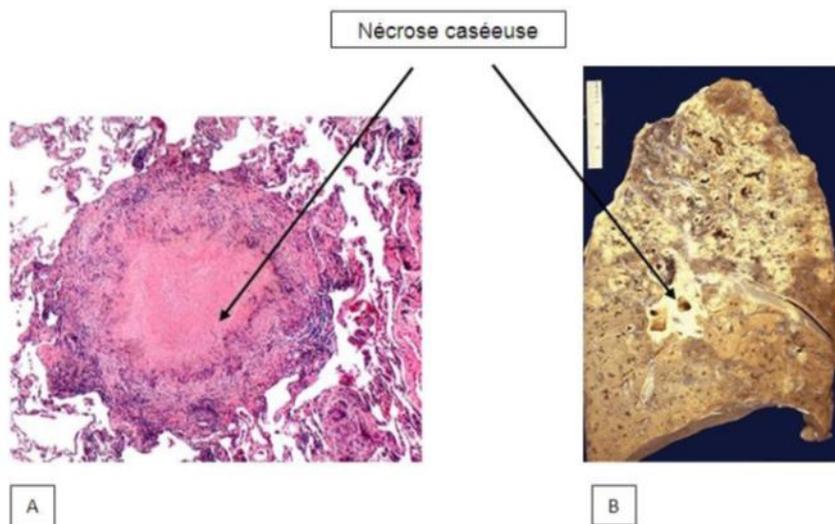
On constate une multiplication active des bacilles à ce stade, les bacilles peuvent potentiellement disséminer par voie lymphatique ou sanguine à partir du ganglion médiastinal pour atteindre divers organes : **poumon, ganglion périphérique, séreuses, appareil urogénital, os**. L'infection initiale ou primaire par MTB implique la réplication de l'organisme au site pulmonaire initial de l'infection, la propagation aux ganglions lymphatiques locaux dans

le poumon et la dissémination éventuelle de l'infection vers des sites éloignés du corps (Glickman et Jacobs ,2001)

**c. Lésions induites par le bacille (Granuloma) :**

Une fois la phase active de l'infection terminée, les mycobactéries persistent dans le poumon infecté et s'installent pour provoquer une infection chronique. La stimulation antigénique constante et l'accumulation de lymphocytes T conduit à la formation d'un Granulome, qui peut maintenir des bacilles viables pendant des décennies (Gorna et al.2010).

Le granulome, caractéristique de la maladie tuberculeuse, crée un microenvironnement immunitaire dans lequel l'infection peut être contrôlée. Cependant, il fournit également à la mycobactérie une niche dans laquelle elle peut survivre, en modulant la réponse immunitaire pour assurer sa survie sans dommage sur de longues périodes de temps. (Miranda et al,2012).



**Figure 3 :** A. Coupe histologique d'un granulome B. Aspect macroscopique du tissu pulmonaire (Source : [http://campus.cerimes.fr/microbiologie/enseignement/microbiologie\\_3](http://campus.cerimes.fr/microbiologie/enseignement/microbiologie_3))

A. Coupe histologique d'un granulome avec au centre un dépôt anhiste correspondant à la nécrose caséuse. B. Aspect macroscopique du tissu pulmonaire avec plusieurs foyers de nécrose Caséuse (lésions blanchâtres disséminées)

**Remarque :** Le risque d'infection dépend de plusieurs facteurs tels que le caractère infectieux du cas source, la proximité du contact, la charge bacillaire inhalée et le statut immunitaire de l'hôte potentiel (Ahmad, 2011). L'infection initiale ou primaire par MTB implique la réplication de l'organisme au site pulmonaire initial de l'infection, la propagation aux ganglions lymphatiques locaux dans le poumon et la dissémination éventuelle de l'infection vers des sites éloignés de corps (Glickman et Jacobs, 2001).

### **3. Personnes à risque**

Tout le monde peut contracter la tuberculose, mais certains facteurs peuvent augmenter le risque ; Tous les cas de tuberculose maladie doivent bénéficier d'un traitement adapté. La primo-infection tuberculeuse peut évoluer vers une tuberculose maladie dans 1 cas sur 10.

**Chez l'enfant et l'adolescent**, une primo-infection tuberculeuse quiescente est traitée pendant 6 mois par isoniazide afin de réduire le risque de tuberculose maladie.

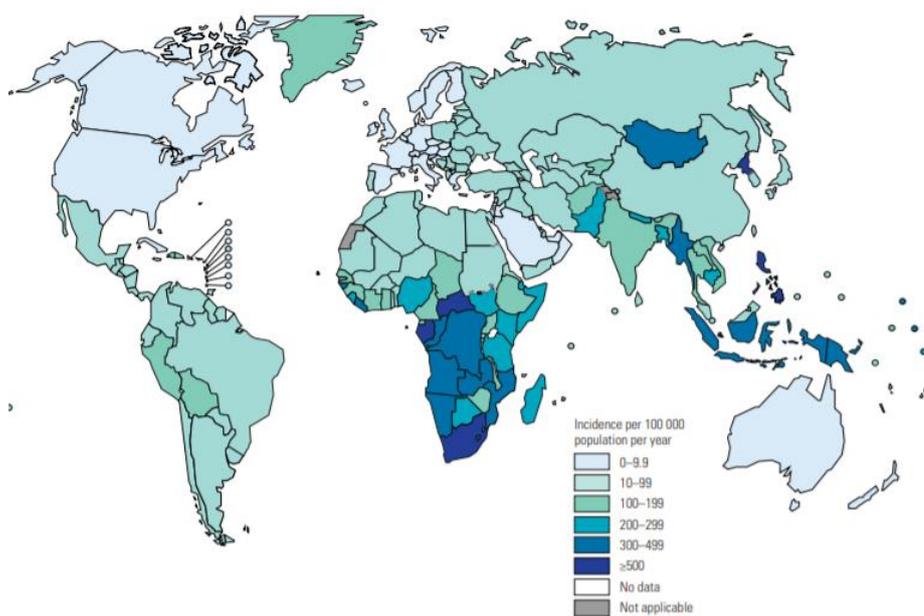
**Chez les sujets immunodéprimés**, la primo-infection se traite comme une tuberculose maladie contrairement au sujet immunocompétent le traitement n'est pas obligatoire.

En général, les personnes à haut risque de développer une tuberculose sont divisées en deux catégories :

- Toute personne ayant déjà eu précédemment une tuberculose, peut développer une tuberculose multirésistante.
- Parmi les sujets infectés par le bacille tuberculeux, le risque de développer la maladie à un moment quelconque de la vie se situe entre 5% et 15%. Ce risque augmente beaucoup plus chez les personnes qui ont un système immunitaire déficient, notamment celles qui ont le VIH, qui souffrent de malnutrition ou de diabète, ainsi que chez les consommateurs de tabac (OMS, 2020), maladie rénale sévère, certains cancers (traitement du cancer, comme la chimiothérapie, médicaments pour prévenir le rejet d'organes transplantés).

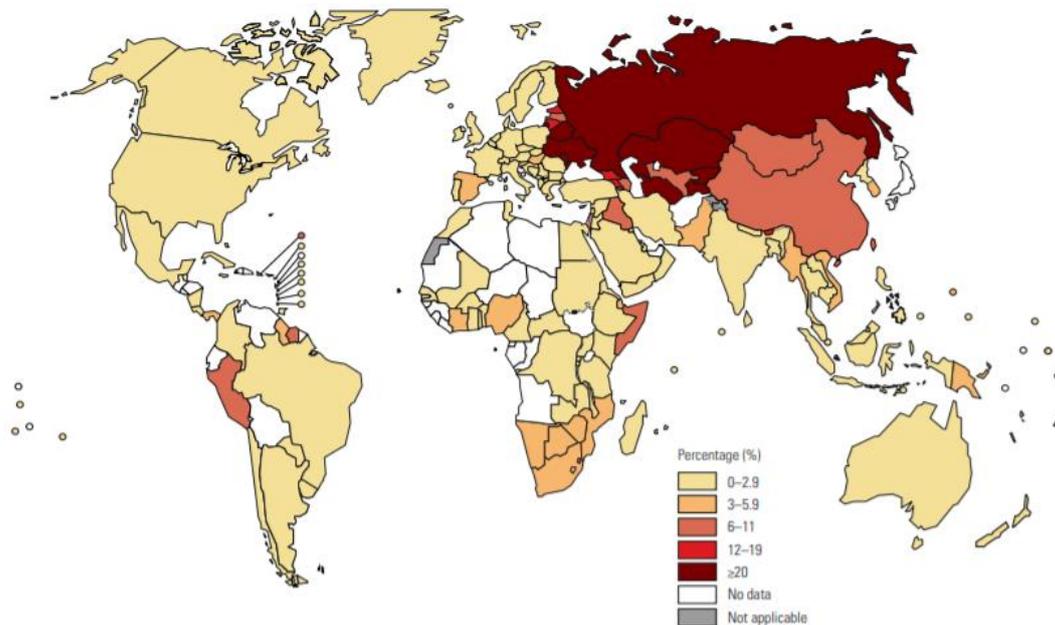
Dans l'ensemble, environ 5 à 10% des personnes infectées qui ne reçoivent pas de traitement pour une infection tuberculeuse latente développeront une tuberculose à un moment de leur vie. Pour les personnes dont le système immunitaire est faible, en particulier celles qui sont infectées par le VIH, le risque de développer une tuberculose est beaucoup plus élevé que pour les personnes dont le système immunitaire est normal. (CDC, 2016)

#### 4. Répartition géographique de la tuberculose humaine dans le monde



**Figure 4** : Nombre de cas estimés de tuberculose dans le monde en 2019 (source : OMS rapport 2020)

En Afrique, on retrouve plus des cas en Afrique du sud, centre- Afrique, Gabon ; l'Afrique subsaharienne est plus touchée par la tuberculose.



**Figure 5** : Nombre de cas estimés de tuberculose multirésistante parmi les cas de tuberculose notifiés en 2019 (OMS rapport 2020)

Selon l'OMS, les toutes premières enquêtes nationales sur la pharmacorésistance ont été menées entre 2018 et 2020, en Érythrée, en Indonésie et au Laos, Mali, Timor-Leste et Togo, et des enquêtes répétées ont été menées au Bangladesh, au Cambodge, à Eswatini, en Éthiopie, au Malawi, aux Philippines, au Sri Lanka, en Thaïlande, au Turkménistan et en Tanzanie (OMS rapport ,2020)

Entre 2019 et 2020, les enquêtes sur la pharmacorésistance ont été en cours de planification ou de mise en œuvre dans huit pays, avec les premières enquêtes nationales dans trois pays (Burundi, Tchad et Niger) et des enquêtes répétées dans cinq pays (Guinée, Mozambique, Myanmar, Népal et Zambie).

### **Dans le monde**

Selon l'OMS, la tuberculose est restée la cause la plus fréquente de décès par un seul agent pathogène infectieux. Dans le monde, on estime que 10,0 millions de personnes ont contracté la tuberculose en 2019, et on estime à 1,2 million le nombre de décès dus à la tuberculose parmi les personnes séronégatives et 208 000 décès supplémentaires parmi les personnes vivant avec le VIH. Les adultes représentaient plus de 80 et les enfants, âgés de moins

de 15 ans, moins de 15 de toutes les personnes atteintes de TB dans le monde (OMS rapport,2019)

Les régions OMS de l'Asie du Sud-Est, de l'Afrique et du Pacifique occidental ont enregistré le plus de cas de tuberculose.

La région africaine continue d'avoir la plus forte prévalence du VIH ; ainsi, une grande proportion des cas de tuberculose dans cette région était associée au VIH (CDC, 2018).

### **En Algérie**

Selon le rapport donné par INSP (institut national de santé publique) après la rencontre tenue le 24 mars 2019 sur le thème « IL EST TEMPS », le nombre de cas de tuberculose enregistrés en Algérie en 2018, était de 23078 cas répartis en :

- 7053 cas de Tuberculose pulmonaire (30.6%) dont 5750 cas sont des cas de tuberculose contagieuse avec une incidence de 13.8 cas pour 100 000 habitants.
- 16025 cas de Tuberculose Extra-Pulmonaire (69.4%) avec une incidence de 38.4 cas pour 100 000 habitants dont les trois quarts des cas sont répartis seulement entre deux localisations : ganglionnaire et pleurale.

## **5. Symptômes**

Après inoculation du bacille la tuberculose évolutive peut apparaître et les symptômes tels que la toux, la fièvre, les sueurs nocturnes ou la perte de poids, peuvent rester bénins pendant de nombreux mois (OMS, 2020).

Sans traitement, la tuberculose peut être mortelle. Une maladie active non traitée affecte généralement vos poumons, mais elle peut également affecter d'autres parties de votre corps.

### **5.1. TB latente :**

C'est une infection tuberculeuse asymptomatique, c'est à dire les bactéries présentes dans votre corps sont inactives et ne provoquent aucun symptôme. La tuberculose latente également appelée tuberculose inactive ou infection tuberculeuse, n'est pas contagieuse par contre elle peut se transformer en tuberculose active, le traitement est donc important.

## 5.2. TB active :

Aussi appelée maladie tuberculeuse, cette maladie vous rend malade et, dans la plupart des cas, peut se propager à d'autres. Elle peut survenir des semaines ou des années après l'infection par la bactérie TB.

La tuberculose active se caractérise en trois types de tuberculose :

### ➤ Tuberculose pulmonaire (PTB)

Certains signes de PTB sont assez typiques : toux prolongée (durant plus de 2 semaines) et production de crachats, tandis que d'autres le sont moins : perte de poids, anorexie, fatigue accompagnée d'essoufflement, douleurs thoraciques, fièvre modérée et sueurs nocturnes. L'hémoptysie (sang dans les expectorations) est un signe caractéristique présent chez environ un tiers des patients (Leung, 1999)

### ➤ Tuberculose extra-pulmonaire

À partir d'une localisation pulmonaire (primo-infection), *M. tuberculosis* peut se propager dans d'autres organes au cours d'une phase silencieuse, généralement au début de l'infection. La tuberculose active peut se développer dans de nombreuses autres parties du corps, en particulier les ganglions lymphatiques, les méninges, les reins, les organes génitaux les vertèbres, les articulations, et la cavité abdominale (Francis et Michael, 2017)

### ➤ Tuberculose associée au VIH

La tuberculose et le VIH forment ensemble une association meurtrière, chacun accélérant le développement de l'autre. Le risque que l'infection tuberculeuse se transforme en tuberculose évolutive est 18 (15-21) fois plus élevée chez les personnes infectées par le VIH que chez celles qui ne le sont pas (OMS, 2020).

**Remarque :** Chez les enfants et les adolescents, la maladie n'est souvent pas reconnue par les prestataires de soins et elle peut être difficile à diagnostiquer et à traiter (OMS, 2020).

## 6. Prophylaxie

### 6.1. Vaccination par le BCG

Les premiers essais de vaccination par le Bacille de Calmette et Guérin (BCG) datent de 1921. Le BCG est une souche de *Mycobacterium bovis* rendue avirulente par un grand nombre de repiquages sur milieu bilié et glycérolé (Nicole G, 2004).

Le BCG confère une immunité cellulaire relative. De nombreuses études ont été réalisées afin de déterminer l'efficacité de cette vaccination (BEH, 1997) :

- Le BCG apporte surtout une protection chez les enfants contre les méningites tuberculeuses. Il ressort que la protection apportée par le BCG est légèrement supérieure chez le nourrisson que chez l'enfant, de l'ordre de 80% pour les formes graves (miliaires et méningites) et de 55% pour les formes pulmonaires.
- Chez l'adulte, la vaccination par le BCG réduit de 50% le risque de tuberculose pulmonaire et extra-pulmonaire, avec cependant des disproportions puisque la protection conférée par le BCG varie énormément selon les études et les populations concernées par ces études. Globalement, le vaccin protège pendant au moins 10 à 15 ans avec une efficacité variant de 50 à 60% contre les formes pulmonaires.

Par ailleurs, ces études montrent que le BCG est un vaccin qui ne confère pas une immunité totale mais qui présente une spécificité certaine puisqu'un arrêt de la vaccination se traduit par une augmentation des cas de tuberculose (Nicole, 2004).

## **6.2. Investigations autour d'un cas de tuberculose**

Les personnes de l'entourage proche des malades contagieux présentent plus de risque d'exposition et, lorsqu'elles ont été infectées, c'est dans la période qui suit immédiatement l'infection qu'elles ont le plus grand risque de développer une tuberculose maladie. Il est donc impératif de dépister rapidement les cas de tuberculose.

Les investigations autour d'un cas sont menées selon la technique des cercles concentriques : d'abord la famille, puis l'environnement proche et de plus en plus éloigné, les résidences en collectivité, les études dans les établissements de santé et auprès du personnel soignant (Abiteboul et al, 2003).

Les investigations menées ont deux objectifs :

- Identifier puis traiter les personnes malades pouvant elles-mêmes contaminer leur entourage et donc arrêter le cycle de transmission de la tuberculose, d'une part.

- Dépister les cas de primo infection tuberculeuse et au besoin les traiter, et ainsi empêcher l'évolution vers une tuberculose maladie, d'autre part.

### **6.3. Prévention de la transmission de la tuberculose dans les établissements de santé**

Le regroupement dans les mêmes services hospitaliers de patients immunodéprimés et de patients tuberculeux crée les conditions favorables à la survenue d'infections nosocomiales, et le risque est accru lorsque le bacille est multi résistant car la période de contagiosité est alors plus longue (Abiteboul, 2003). Il est donc préférable, dans la mesure du possible, de séparer ces patients.

# Chapitre 3 Diagnostic de la Tuberculose

Le diagnostic est fait avec deux méthodes : la méthode classique et la méthode de biologie moléculaire

## 1. Méthodes classiques

### 1.1. Diagnostic indirect

Actuellement, deux méthodes sont mises en application pour déterminer si une personne a été infectée par la bactérie TB : le test sanguin TB et le test cutané TB (CDC, 2020).

#### a. **Intradermo-réaction (IDR) :**

L'intradermo-réaction (IDR) à la tuberculine ou test cutané tuberculinique de Mantoux (TCT) est réalisé en injectant 0,1 ml de dérivé protéique purifié de tuberculine (PPD) dans la surface interne de l'avant-bras. L'injection doit être faite avec une seringue à tuberculine, le biseau de l'aiguille orienté vers le haut. Le patient doit revenir dans les 48 à 72 heures pour qu'un agent de santé qualifié recherche une réaction sur le bras. Le résultat dépend de la taille de la zone surélevée, dure ou du gonflement (CDC, 2016).

Ce test de diagnostic de la TB basé sur l'observation d'une réaction cutanée d'hypersensibilité retardée après injection intradermique de tuberculine (antigènes mycobactériens composés de mélange de protéines extraites de culture de MTBC et purifiées appelé PPD / « Purified Protein Derivative »). Cette réaction témoigne chez le patient de l'existence d'une immunité à médiation cellulaire vis-à-vis des mycobactéries, réaction induite soit par une vaccination préalable par le BCG, soit par un contact antérieur avec le BK ou certaines mycobactéries atypiques. Le test IDR est utilisé aussi bien pour le diagnostic de la TB active que pour le diagnostic de la TB latente (Noël, 2017).



**Figure 6** : test cutané tuberculique de Mantoux (source : Knobloch G.2004) et la lecture du résultat (CDC,2016)

L'interprétation est basée sur l'observation et l'enregistrement de l'augmentation de l'épaississement du pli de la peau. La réaction est :

- **Positive** : en fonction du diamètre de l'induration en conjonction avec certains facteurs de risque spécifiques au patient. Chez une personne en bonne santé dont le système immunitaire est normal, une induration supérieure ou égale à 15 mm est considérée comme un test cutané positif.  
Dans certains groupes de personnes, par exemple, les immigrants récents de zones à forte prévalence, les enfants de moins de 4 ans, Les personnes qui travaillent avec des mycobactéries dans les laboratoires, etc., une zone d'induration de 10 mm (Stöppler, 2019)
- **Négative** : quand une induration est inférieure de 10. D'un autre côté, un test négatif ne signifie pas toujours qu'une personne est indemne de tuberculose.

#### **b. Dosage de gamma interféron/ test sanguin :**

Des tests immunologiques comme le test QuantiFERON-TB-Gold et le test T-SPOTTB ont été développés récemment pour le diagnostic de l'infection tuberculeuse latente (L'Hadj et al., 2006 ; Lalvani, 2007). Ces tests présentent comme avantage de ne pas être perturbés par une vaccination antérieure au BCG ou par une infection causée par une autre mycobactérie (Al-Orainey, 2009 ; Bocchino et al., 2009 ; Richeldi, 2006).

## **1.2. Diagnostic direct**

Au laboratoire, les examens bactériologiques peuvent comprendre la démonstration des bacilles acido-résistants par examen microscopique et l'isolement des mycobactéries sur milieux de culture sélectifs et leur identification postérieure par des tests culturaux et biochimiques (OIE, 2005).

### **a. Examen microscopique :**

L'examen microscopique d'un produit pathologique est l'étape initiale, et souvent la seule possibilité dans de nombreux pays en développement, pour effectuer le diagnostic bactériologique de la tuberculose. C'est pourquoi, il est mis en exergue dans les tests de l'OMS.

Pour mettre en évidence les mycobactéries, on utilise leur propriété d'acido-alcool- résistance. Deux méthodes de coloration sont applicables en routine, **la méthode de Ziehl-Neelsen et la méthode fluorescente.**

- **Coloration de Ziehl-Neelsen :**

La coloration Ziehl-Neelsen est un processus simple en 5 étapes qui prend environ 10 minutes à accomplir. Bien que hautement spécifique des mycobactéries, cette coloration est relativement insensible et sa détection nécessite au moins 10 000 bacilles par ml. La technique est basée sur la résistance acide-alcool, qui est la propriété que la paroi des mycobactéries doit lier la carbol-fuchsine et les tenir contre l'action des décolorants comme l'acide et l'alcool mélangé. Cette caractéristique est due à la quantité élevée des lipides, en particulier aux acides mycoliques que les mycobactéries ont à la paroi cellulaire, il est possible de reconnaître les bacilles acido-résistants (AFB) dans l'échantillon du patient sous forme de stick rouge

- **Coloration à l'auramine :**

La coloration fluorescente par Auramine est une autre méthode de technique de coloration.

Dans cette technique, le frottis est fait à partir de l'échantillon et coloré avec un colorant fluorescent appelé Auramine. L'auramine pénètre dans la paroi cellulaire bactérienne et le fait briller sur un fond sombre sous une lumière UV. L'examen microscopique sous un objectif de faible puissance révélera la mycobactérie sous la forme des bâtonnets jaunes verts brillants dans le frottis.

**b. Traitement du prélèvement et mise en Culture :**

Effectivement, une décontamination est indispensable pour éliminer la flore commensale ou les germes provenant d'une souillure lors des prélèvements. Grâce à l'imperméabilité de leur paroi, les mycobactéries résistent à ce traitement. Par exemple, il est nécessaire de décontaminer les expectorations et les urines.

En revanche, les prélèvements provenant de sites fermés (LCR, liquides de séreuses, biopsie ganglionnaire, moelle osseuse, sang, pus de collection fermée...) ne nécessitent pas de décontamination

La décontamination permet également de fluidifier (on dit aussi « homogénéiser ») les expectorations et ainsi de libérer les bactéries emprisonnées dans les mailles du mucus. on.

Plusieurs méthodes d'homogénéisation et de décontamination des expectorations en vue de leur mise en culture existent et chaque laboratoire doit faire le choix de la meilleure méthode pour optimiser l'isolement des mycobactéries.

- la technique à la soude à 4 % (méthode de Petroff)
- la technique au lauryl-sulfate de sodium (méthode de Tacquet-Tison).
- la technique avec un mélange N-acétyl L-cystéine et soude (méthode de Kubica).

Les produits étant généralement pauvres en mycobactéries, les prélèvements, décontaminés ou non, sont concentrés par centrifugation à 3000 tours/min pendant 20 à 30 minutes avec une centrifugeuse munie de nacelles étanches et réfrigérée.

## ❖ Culture sur milieu solide

Le milieu LJ, qui contient du vert malachite comme inhibiteur d'organismes non mycobactériens, du glycérol favorisant la croissance de *M. tuberculosis*, tandis que LJ sans glycérol mais contenant du pyruvate de sodium améliore la croissance de *M. bovis*.

Le milieu LJ estensemencé avec 0,2 ml de culot de centrifugation, les bouchons des tubes sont dans un premier temps dévissés pour permettre l'évaporation de l'inoculum (3 à 6 jours) et vissés ensuite. Les milieux sont incubés sur des portoirs spéciaux en position très inclinée, la surface du milieu étant, dans ce cas, horizontale.

*Mycobacterium tuberculosis* donne des colonies caractéristiques sur milieu Loewenstein-Jensen : les colonies rugueuses en « chou-fleur » à croissance lente. Cet aspect caractéristique est obtenu en 21 à 28 jours.

Un inconvénient des milieux à base d'œufs est que lorsque la contamination se produit, elle peut impliquer toute la surface inclinée, donc la culture est généralement perdue. Si les échantillons contiennent peu de bacilles, cela peut prendre de trois à huit semaines avant que les cultures deviennent positives.

### **Incubation des cultures**

Toutes les cultures doivent être incubées à 35-37°C jusqu'à ce que la croissance soit observée, ou rejetées comme négatives après 8 à 12 semaines (6 semaines si un milieu liquide est utilisé). Les cultures solides inoculées doivent être incubées avec les bouchons desserrés dans une position inclinée pendant au moins une semaine pour assurer une répartition uniforme de l'inoculum. Les bouchons doivent ensuite être serrés pour éviter le dessèchement du support.



**Figure 7** : étuve pour culture des mycobactéries sur milieu en pente (sources : <https://microbiologiemedicale.fr/securite-coloration-culture-mycobacteries/> )

### Examen des cultures

Toutes les cultures doivent être examinées 48 heures après l'inoculation afin de :

- Vérifier l'absorption du liquide inoculé ;
- Serrer les bouchons pour éviter le dessèchement du support ; et
- Détecter les contaminants précoces.

Les cultures doivent ensuite être examinées une fois par semaine ou, si cela n'est pas possible, au moins trois fois au cours de la période d'incubation de huit semaines

- Contrôle à sept jours : pour détecter les mycobactéries à croissance rapide.
- Contrôle de trois à quatre semaines pour détecter les cultures positives de *M. tuberculosis* ainsi que d'autres cultures à croissance lente mycobactéries.

Contrôle de fin de culture (après huit semaines) pour détecter les mycobactéries à croissance très lente, dont *M. tuberculosis*, avant de jeter et de déclarer la culture comme négative.

### ❖ **Culture liquide DST** (Drug susceptibility testing)

La mise en œuvre de cultures liquides a été recommandée par l'OMS car elles donnent des taux plus élevés d'isolement mycobactérien et le temps de détection est plus court qu'avec les milieux solides classiques.

La détection des colonies ou présence des MTB se fait par trois systèmes :

**Le système BACTEC-TB460** : est un système radiométrique qui mesure le CO<sub>2</sub> radioactif libéré lors de la décarboxylation de substrats marqués au <sup>14</sup>C. Si l'inoculum contient des bacilles TB vivants, ils utilisent le substrat marqué au <sup>14</sup>C (acide palmitique) et libèrent du <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>.

**Le Système MB/Bact** : Il s'agit d'un système de surveillance continue non radiométrique avec une base de données informatisée. Il est basé sur la détection colorimétrique du CO<sub>2</sub>. En comparant les performances du système MB / BacT avec celles du BACTEC-TB460, le temps moyen jusqu'à la détection du MTB par le système BACTEC était de 12 jours contre 14 jours par le système MB / BacT.

**Le Système MGIT** : Ce système utilise des tubes contenant du bouillon Middlebrook 7H9 enrichi avec un capteur de fluorescence sensible à l'oxygène noyé dans du silicone au fond du tube et qui, lors de la consommation de l'oxygène par les mycobactéries dans le milieu de culture, fluoresce de l'orange lorsqu'il est sondé avec une lumière UV.

### c. **Identification :**

L'identification des souches isolées en culture pure sur milieu solide repose classiquement sur l'étude des caractères cultureux (temps de croissance, morphologie et pigmentation des colonies) et des caractères biochimiques.

L'identification des mycobactéries s'effectue en plusieurs étapes : vérification de l'appartenance au genre *Mycobacterium*, identification des mycobactéries du groupe tuberculeux, identification des mycobactéries non tuberculeuses dites atypiques et différenciation des espèces.

Elle repose sur trois épreuves biochimiques simples qui permettent de faire la distinction entre bacilles du complexe tuberculosis et mycobactéries non tuberculeuses (Grosset et al., 1990 ; Nolte et Metchock, 1995) :

- La recherche de l'activité catalasique après chauffage pendant 20 minutes à 68°C,
- La niacine test,
- La réduction des nitrates.

Les différents paramètres biochimiques sont rapportés dans le tableau ci-dessous (Carbonnelle et al, 2003).

**Tableau II:** Caractères cultureux et biochimiques des mycobactéries du complexe tuberculeux

	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium africanum</i>	<i>Mycobacterium bovis</i>	BCG	<i>M. atypique</i>
Culture sur Loewenstein-Jensen. Aspect des colonies	Chou-fleur Grosses colonies Rugueuses	Plates Petites colonies Rugueuses	Bombées Petites colonies Lisses	Chou- fleur Grosses colonies Rugueuses	Rugueuse/ Lisse
Délai de culture	21 à 30 jours	30 à 60 jours	30 à 60 jours	10 à 20 jours	4 à 30 jours
Type respiratoire	Aérobie	Micro aérophile	Micro aérophile	Aérobie	Aérobie strict
Catalase thermolabile	+	+	+	+	+
Niacine	+	+/-	-	-	-
Nitrate	+	+/-	-	-	-/+
TCH 2 µg/ml	R	R/S	S	S	R/S
D-Cyclosérine 30µg/ml	S	S	S	R	

## 2. Méthodes de biologie moléculaire (Diagnostic moléculaire)

Les techniques moléculaires sont bien adaptées à l'identification de micro-organismes infectieux dans des échantillons humains puisque chaque micro-organisme contient des séquences d'ADN ou d'ARN spécifiques qui sont uniques à cet organisme. En détectant ces séquences uniques, le micro-organisme peut être spécifiquement identifié.

Aujourd'hui, les tests de diagnostic moléculaire offrent des performances supérieures et plus rapide que les tests traditionnels. Malgré ces progrès, la culture reste l'étalon-or pour l'identification microbienne et la différenciation phénotypique ultérieure du pathogène causal (Sharma et Mohan , 2013).

La distinction entre les mycobactéries du complexe Tuberculosis et les mycobactéries atypiques est essentielle. Anciennement, elle était basée sur les caractères phénotypiques. Actuellement, les techniques d'analyse de l'ADN peuvent s'avérer plus rapides et plus fiables que les méthodes biochimiques pour la différenciation des membres du complexe *M tuberculosis*. Les empreintes génétiques permettent aux laboratoires de distinguer les différentes souches de *M. tuberculosis* et de décrire les profils d'origine, la transmission et la propagation de ce bacille.

Deux méthodes de génotypage sont largement utilisées : le spoligotypage et le typage VNTR (variable number tandem repeat), qui permettent d'établir une différenciation entre souches en tenant compte d'une relative stabilité génétique. La combinaison de ces deux techniques permet une différenciation très fine des souches (Hauer et al., 2015).

Le typage des oligonucléotides d'espacement (spoligotypage) est la méthode PCR largement utilisée pour le génotypage d'organismes du complexe *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) (Pang et al 2012).

### a. Le spoligotypage :

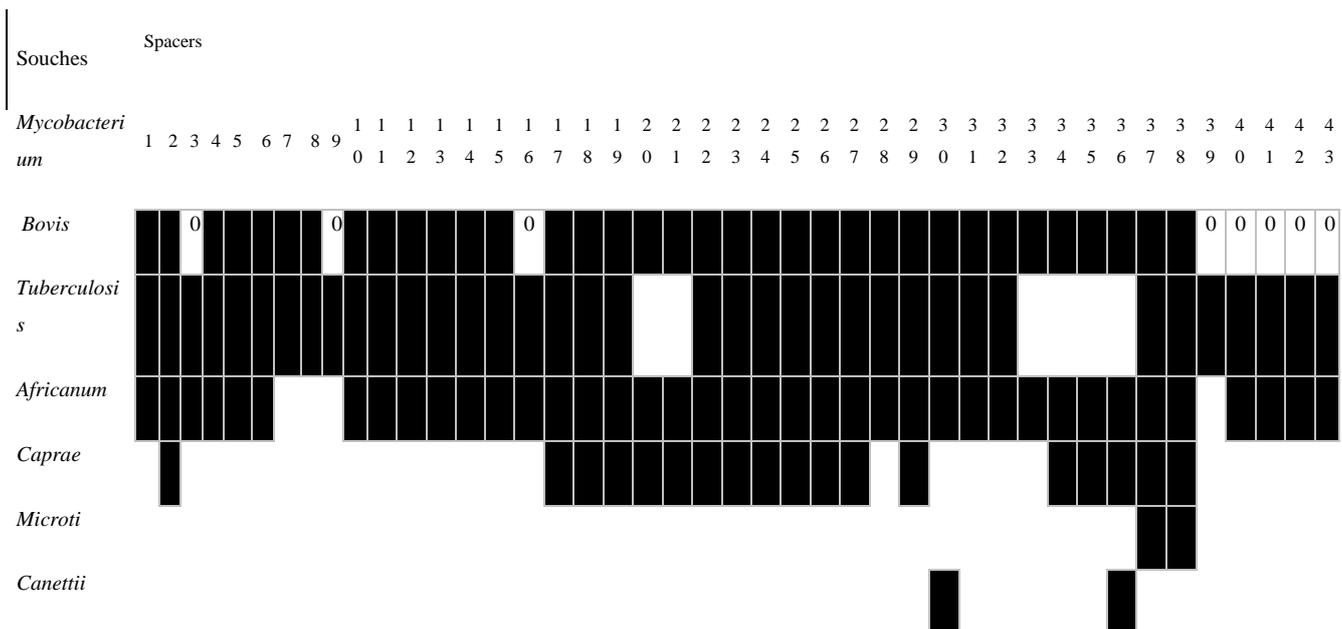
C'est une méthode de génotypage spécifique du MTBC qui repose sur le polymorphisme de la région DR. Le spoligotypage, ou typage oligonucléotidique des espaceurs du locus Direct Repeat (DR), est une méthode pré conceptualisée par Groenen et al. (1993) et développée par Kamerbeek et al. (1997).

La technique consiste à amplifier les espaceurs de la région DR et à les identifier par hybridation inverse à un set de 43 oligonucléotides complémentaires de 43 espaceurs de référence (les plus polymorphes) préalablement fixés sur une membrane ou sur microbille. Les spoligotypes obtenus sont sous la forme d'un code binaire de 43 caractères où les carrés blancs représentent les espaceurs absents et les carrés noirs représentent les espaceurs présents (figure14) (Ruetger et al., 2012).

Le modèle de spoligotypage est caractéristique d'une lignée évolutive particulière de souches et peut être utilisé pour le suivi épidémiologique (Stone et al 2012)

Elle est basée sur la spécificité de la région DR au complexe tuberculosis (Kemerbeek et al., 1997) et repose sur l'alternance régulière de deux types de séquences :

- Des séquences toutes identiques, appelées DR ;
- Des séquences toutes différentes les unes des autres, appelées « spacers ». Toutefois, un spacer donné peut être présent chez un isolat et absent dans un autre.



**Figure 8** : Profils génomiques en spoligotypage des membres du complexe *M. tuberculosis* (Kamerbeek et al 1997)

Grâce au spoligotypage, on peut déjà orienter l'identification de l'espèce du MTBC puisque contrairement à *M. bovis*, *M. tuberculosis* possède les spacers 3-9-16-et 39 à 43. Les

autres espèces possèdent encore moins de spacers : Ainsi *M. caprae* ne possède pas le spacer 1 et les spacers 3 à 16. *M. microti* est l'espèce qui possède le moins de spacers.

Cette méthode est spécifique au complexe *Mycobacterium tuberculosis*, et permet d'éliminer les autres sous-espèces de *Mycobacterium* ainsi que les mycobactéries atypiques (Burgos et Pym, 2002).

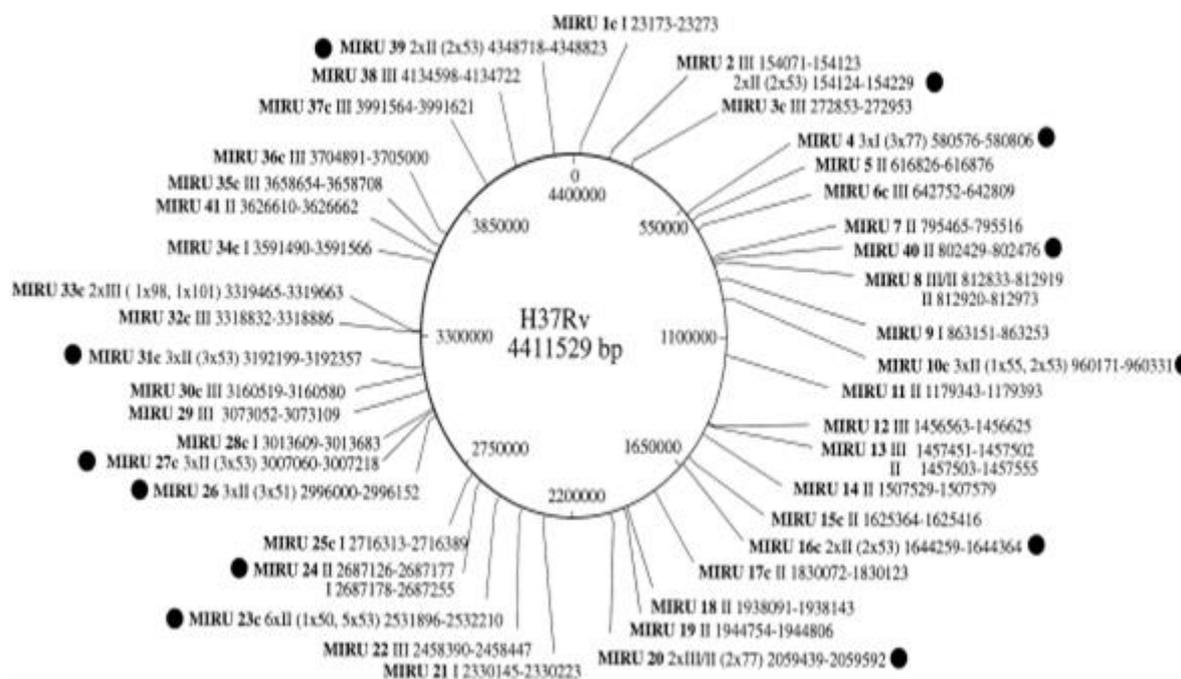
La technique nécessite une quantité moindre d'ADN que le typage par RFLP, car elle est basée sur une amplification de la région DR. Des études ont montré la faisabilité de la technique à partir de crachats de patients tuberculeux positifs à l'examen direct et même à partir d'extrait de lames de diagnostic microscopique positives de TB (Mallard et al., 2010 ; Suresh et al., 2007).

Cette méthode présente des inconvénients dont le pouvoir discriminant, assez faible, par rapport au RFLP (Burgos et Pym, 2002 ; Kanduma et al., 2003). Cependant, elle peut être appliquée en première intention avant d'appliquer une seconde technique ayant un pouvoir discriminant plus important, ce qui est de plus en plus conseillé (Burgos et Pym, 2002 ; Mostrom et al., 2002).

#### **b. Les MIRU-VNTRs :**

L'étude des VNTR (Variable Number of Tandem Repeats), ou Multilocus Variable Number of Tandem Repeats Analysis (MLVA) (Sola et al., 2003 ; Supply P. et al., 2011) ; est une méthode de typage fiable chez les mycobactéries. Il s'agit de l'analyse du nombre de répétitions d'un motif connu pour un locus donné par PCR et de la transcription de la taille de l'amplicon obtenu en nombre de motifs présents (Rodriguez-Campos et al., 2013 ; Hauer et al., 2016). Un fonctionnement facile, un coût économique, des résultats reproductibles et un pouvoir discriminant élevé le rendent pratique pour une utilisation de routine (Maes et al 2008). Le séquençage complet du génome de *M. tuberculosis H37Rv* a permis de mettre en évidence certaines régions d'ADN (ou locus) contenant un nombre variable de régions répétées en tandem ou Variable Number Tandem Repeat (VNTR).

Cette technique est basée sur l'association d'une PCR et d'une électrophorèse (Haddad et al., 2001). Les produits de PCR sont mis à migrer sur électrophorèse sur gel d'agarose pour déterminer la taille des amplicons. Le nombre de copies des éléments répétés est identifié à partir de références de tailles déjà connues (Supply et al., 2006)



**Figure 9** : Distribution des 41 locus MIRU sur le génome de H37rv. (Cole et al, 1998).

Le numéro du locus est indiqué en gras. « c » désigne les MIRU orientés en sens contraire défini par Cole *et al* I, II, III indique le type de MIRU. Les 12 locus utilisés par Supply *et al.* (2000) sont repérés par un rond noir.

Cette méthode, également basée sur une méthode PCR, présente l'avantage d'être pratiquée directement sur des isolats (Kanduma et al, 2003). Elle se caractérise par un bon pouvoir discriminant et peut constituer une alternative au spoligotypage comme technique de criblage. De plus, elle est simple et rapide (Frothingham et Meeker O'Connell, 1998 ; Supply et al, 2001). Les résultats numériques de cette méthode peuvent être comparés et échangés facilement entre différents laboratoires (Mears et al 2015)

Utilisée seule, cette méthode présente l'inconvénient d'être faiblement discriminante, mais utilisée en seconde intention, complémentaire à une première analyse, elle donne une très bonne différenciation (Filliol et al, 2000).

### c. Les régions de délétion :

La présence ou absence de larges séquences (souvent dites « séquences ou régions de délétion ») constitue des marqueurs spécifiques pour la caractérisation, la classification des souches de *M. tuberculosis* dans les lignées (Tsolaki et al 2005). Ces délétions dans les

mycobactéries sont des évènements irréversibles, car il n'y a pas de transfert horizontal de gènes chez *M. tuberculosis* (Gagneux, DeRiemer et al. 2006).

Le génome de *M. tuberculosis* H37Rv, souche de référence, montre la présence de seize (16) régions de différence appelées RD. Ces régions sont présentes chez *M. tuberculosis* alors qu'elles sont plus ou moins absentes chez les autres membres du complexe *M. tuberculosis*.

L'analyse de six (6) de ces régions est suffisante pour la différenciation des membres du CMT (RD1, RD3, RD5, RD9, RD10 et RD11).

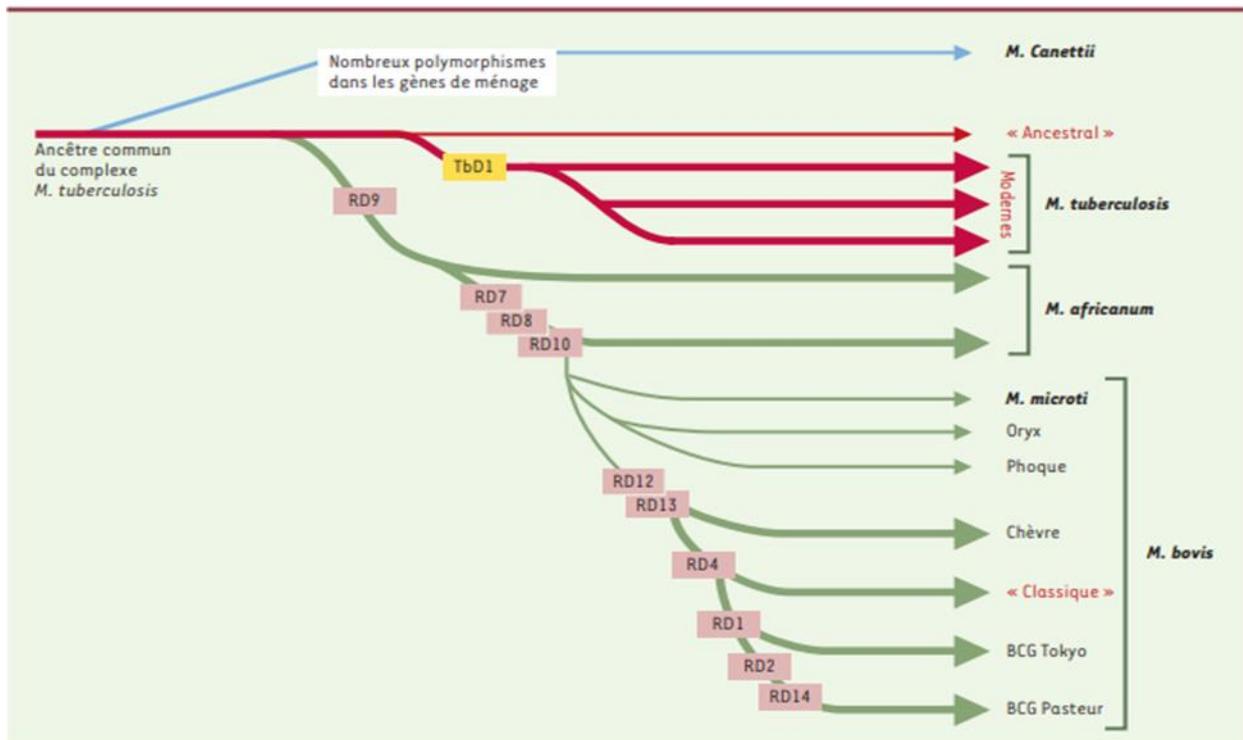
Les délétions se produisent du fait des recombinaisons de l'ADN selon deux mécanismes :

- Le premier concerne les régions RD3, RD5 et RD11. Les séquences flanquant ces régions sont peu conservées car elles contiennent des éléments génétiques mobiles, dont la distribution est variable chez les membres du CMT.
- Le second, les régions RD1, RD9 et RD10. Les séquences flanquant ces régions en sont dépourvues et les délétions se produisent donc dans les régions codantes et il en résulte la troncature de ces gènes.

La taille des produits PCR est par la suite utilisée pour déterminer la présence ou l'absence de ces régions RD (Parsons et al, 2002).

Les matrices d'hybridation différentielle ont identifié 14 régions de différence (RD1–14), dont la taille varie de 2 à 12,7 kb, absentes du bacille Calmette – Guérin par rapport à *M. tuberculosis* H37Rv (Behr et al, 1999).

En parallèle, six régions, les délétions liées à H37Rv (RvD) 1–5 et la délétion spécifique de *M. tuberculosis* 1 (TbD1), absentes du génome de *M. tuberculosis* H37Rv par rapport aux autres membres du complexe *M. tuberculosis* ont été révélées par approches génomiques comparatives employant des techniques d'électrophorèse sur gel en champ pulsé (Brosch et al, 1999).



**Figure 10** : Schéma proposé pour l'évolution des bacilles tuberculeux

Illustrant les pertes successives d'ADN dans certains lignages. La base du raisonnement est la présence ou l'absence de régions délétées, ainsi que les polymorphismes de certaines séquences (non indiqués) (Lapie, D. 2003).

#### d. Le séquençage :

Comme la résistance à *M. tuberculosis* émerge de changements dans le génome, tels que les polymorphismes mononucléotidiques (SNP), les insertions et les délétions dans les gènes codant pour des cibles médicamenteuses ou impliqués dans les voies métaboliques des médicaments, ou de la régulation à la hausse de la pompe d'efflux, les méthodes de détection des variations génomiques représentent un percée pour la prise en charge rapide, simple et standardisée des cas de tuberculose pharmacorésistance.

Le séquençage, qui consiste à déterminer l'enchaînement des nucléotides, est le moyen le plus adapté pour la détection des variations pouvant exister d'un génome à l'autre. La méthode est basée sur la synthèse enzymatique d'ADN complémentaire de l'échantillon à analyser.

L'étape d'amplification est réalisée en présence d'analogues des désoxyribonucléotides qui, quand ils sont incorporés, bloquent la polymérisation. On obtient des fragments de taille différente représentant la séquence complémentaire de la matrice. Des séquenceurs permettent l'automatisation de la migration des produits d'amplification et de la révélation de la séquence par fluorescence. Un logiciel fournit un pourcentage d'homologie entre la séquence étudiée et celles contenues dans les banques de données. Une homologie de 99 % à 100 % permet d'affirmer l'identification de la souche bactérienne. A défaut, la souche sera positionnée parmi l'ensemble des espèces connues sous forme d'un arbre phylogénétique (Balduş-Patel, 2001).

Parmi les gènes les plus utilisés pour le séquençage, on note le gène ADN<sub>r</sub> 16 S qui est un gène d'environ 1500 pb et qui code pour l'ARN ribosomal 16 S (Tortoli, 2003). Ce gène a des avantages par rapport aux autres stratégies d'identification moléculaire.

En effet, c'est une procédure universelle applicable à toutes les bactéries qui permet de classer et d'identifier des pathogènes non encore décrits. Le gène 16 S a en effet la particularité d'être présent chez toutes les bactéries ce qui en fait le marqueur « gold standard » d'identification bactérienne. Il existe aujourd'hui des bases de données de 2500 espèces bactériennes. Il ne permet cependant pas de différencier certaines espèces très proches telles que les mycobactéries à croissance rapide pour lesquelles il y a peu de variabilité génétique, ni les membres du complexe *M. tuberculosis*.

L'utilisation de ce gène pour l'identification des mycobactéries a notamment mis en évidence que les tests biochimiques sous-estimaient la complexité du genre *Mycobacterium*, car des espèces génétiquement différentes montraient en fait des profils biochimiques similaires conduisant à des identifications erronées (Springer et al, 1996).

L'analyse par séquençage de ce gène reste la méthode de référence pour l'identification, mais elle est longue et sujette à des difficultés d'interprétation (Dobner et al, 1996).

#### **e. Xpert MTB/RIF :**

Le GeneXpert est utilisé comme test diagnostic complémentaire en cas de présomption de tuberculose multi résistante ou de tuberculose associée au VIH (Sylvie A. et al, 2016). L'identification du *Mycobacterium tuberculosis* et la détection de la résistance à la rifampicine est réalisée par la version G4 Xpert, qui comprend des modifications à l'une des cinq sondes de test spécifiques de rpoB (sonde B) et aux paramètres du logiciel analytique dans le but de diminuer à la fois les résultats de résistance à la RIF faussement positifs et le taux de résultat de 5% non déterminé dans certains paramètres (Find,2011)

Le GeneXpert est un test rapide, simple et fiable. Un GeneXpert négatif n'élimine pas une suspicion de tuberculose. (Asri et al, 2018). **Le GeneXpert détecte les bactéries vivantes et mortes.**



**Figure 11:** appareil GeneXpert

**f. LINE PROBE ASSAY (LiPA) :**

Ces sont des méthodes moléculaires alternatives pour détecter la sensibilité aux médicaments (DST) comprennent des tests avec des sondes commerciales, **INNO-LiPA Rif.TB** (Innogenetics, le siège est à Gand, Belgique) et le test Genotype **MTBDRplus** (Hain LifeScience GmbH, le siège est à Nehren, Allemagne). L'OMS a approuvé cette technique disponible dans le commerce (OMS, 2008)

**g. Autres techniques :**

D'autres techniques peuvent aussi être utilisées, en l'occurrence :

- **RFLP ou Restriction Fragment Length Polymorphism :**

Elle consiste en l'analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction de l'ADN après hybridation avec une sonde spécifique. L'ADN génomique est digéré par une enzyme de restriction, les fragments sont séparés par électrophorèse en gel d'agar puis transférés sur membrane (Cf. figure 12). Cette membrane est alors hybridée avec une sonde constituée d'un élément répété dans le génome. On révèle par marquage chimioluminescent, les fragments d'ADN que la sonde a hybridé.

Depuis les années 90, Les méthodes de type RFLP sur IS6110 pour une différenciation intra complexe (Rezaee et al. 2016) ont permis les premières caractérisations du MTBC. Au sein du MTBC, les IS sont très souvent présents en multicopie dans le génome, leur nombre peut varier au sein d'une même espèce. Cette caractéristique permet de poser les bases d'un suivi épidémiologique et d'augmenter la sensibilité des méthodes de détection (Keller et al, 2002 ; Rindi and Garzelli, 2014).

La méthode de typage de la séquence d'insertion 6110 (IS6110) par RFLP est standardisée et constitue la méthode de référence largement utilisée dans le monde (Van Embden et al, 1993). C'est une technique de choix pour *M. tuberculosis* (nombreuses copies) mais moins performante que le spoligotypage pour *M. bovis* (faible nombre de copies) (Thierry et al, 1990)

- **PGRS ou Séquence riche en CG répétées dans le génome :**

Cette technique est très discriminante (nombreuses copies chez *M. bovis* et *M. tuberculosis*) Mais lourde et de faible reproductibilité (Ross et al, 1992).

Toutefois, l'association de plusieurs techniques est souhaitable et le plus souvent indispensable.

# Chapitre 4 Traitement et résistance aux antituberculeux

Le traitement de la tuberculose maladie (à différencier de la tuberculose infection latente) repose sur **l'association d'antituberculeux (au moins 3 initialement afin d'éviter la sélection de mutants résistants) pendant au moins 6 mois**. L'observance rigoureuse du traitement est nécessaire pour assurer son efficacité. Une durée insuffisante ou une prise irrégulière du traitement augmente les risques de rechutes et d'apparition de résistance ou de multirésistance aux antituberculeux.

## 1. Traitement

La Tuberculose est une maladie mortelle mais curable lorsqu'un traitement approprié est prescrit à temps et est scrupuleusement respecté par le malade (WHO, 2015).

Le but du traitement est :

- De guérir les malades en évitant les rechutes à bacilles sensibles, et pour ce faire, obtenir la stérilisation des lésions, c'est à dire éliminer les bacilles persistants,
- De prévenir les décès,
- D'arrêter la transmission, et
- D'empêcher la sélection de mutants résistants aux antibiotiques qui sont à l'origine d'échec thérapeutique précoce à bacilles résistants.

Un diagnostic rapide et précis et un traitement efficace de la tuberculose sont les éléments clés la réponse de santé publique à la tuberculose et sont les pierres angulaires de la lutte antituberculeuse (Hopewell et Pai, 2005).

Un traitement efficace rétablit non seulement la santé de l'individu atteint de la maladie mais, aussi, rend rapidement le patient non infectieux et n'est plus une menace pour la communauté. Ainsi, tous les prestataires qui entreprennent le traitement des patients atteints de tuberculose doivent reconnaître que non seulement ils traitent un individu, mais ils assument un public important fonction de santé qui implique également un niveau élevé de responsabilité envers la communauté quant au patient individuel (Hopewell et Pai, 2006)

Les médicaments antituberculeux sont regroupés en cinq groupes en fonction de l'efficacité, de la puissance, de l'expérience d'utilisation et de la classe des médicaments (tableau III) [WHO,

2010 ; Zumela et al, 2013). Les médicaments du groupe 1 « première ligne » sont ceux recommandés pour le traitement de la tuberculose susceptible d'être sensible. Les médicaments «de deuxième ligne » (groupes 2, 3, 4) sont généralement réservés à la tuberculose résistante aux médicaments. Les médicaments de troisième intention (Groupe 5) ont une efficacité peu claire et / ou un rôle peu clair dans le traitement de la tuberculose, bien que pour certains médicaments du groupe 5, cela reflète davantage une lacune dans notre connaissance que les insuffisances des médicaments eux-mêmes (Jacques et al, 2017).

### **1.1. Les antibiotiques de première ligne**

- **Rifamycine (RIF)**

Trois composées dérivées de la Rifamycine ont une activité antituberculeuse : **la rifampicine (RMP), la rifabutine (RFB) et la rifapentine (RFP)** (Huchon, 2012).

Ils sont bactéricides à la fois contre les bacilles tuberculeux croissant en phase log et contre ceux en phase stationnaire (dont l'activité métabolique est faible). (Donald et al 1997). La RMP est le seul antituberculeux actif sur toutes les populations de BK et notamment sur ceux contenus dans le caséum. Ils partagent un mécanisme d'action primaire commun. Ils se lient et inhibent l'action de l'ARN polymérase dépendante de l'ADN des mycobactéries (Campbell et al 2001).

- **L'isoniazide [hydrazide d'acide isonicotinique (INH)]**

L'INH a d'abord été synthétisé à partir d'isonicotinate d'éthyle et d'hydrazine en 1912, l'isoniazide est un antituberculeux majeur, bactéricide pour les mycobactéries intra-et extracellulaires, actif par voie orale. Il agit sur *M. tuberculosis*, *M. bovis* et *M. africanum* (Huchon, 2012). L'INH a une action sur l'enzyme catalase-peroxydase codée par le gène katG. L'oxydation de l'INH par cet enzyme abouti à la formation d'un métabolite actif entraînant la mort cellulaire. L'INH n'est actif que sur les bacilles tuberculeux en phase de multiplication et il n'est pas actif contre les bacilles qui ne se multiplient pas, ni non plus dans les conditions anaérobies. Il semble agir selon divers mécanismes dont l'inhibition de la synthèse de la protéine InhA codée par le gène InhA. Cette protéine joue un rôle important dans la synthèse des acides mycoliques est la plus connue (Zhang et Yew ,2009)

- **Streptomycine**

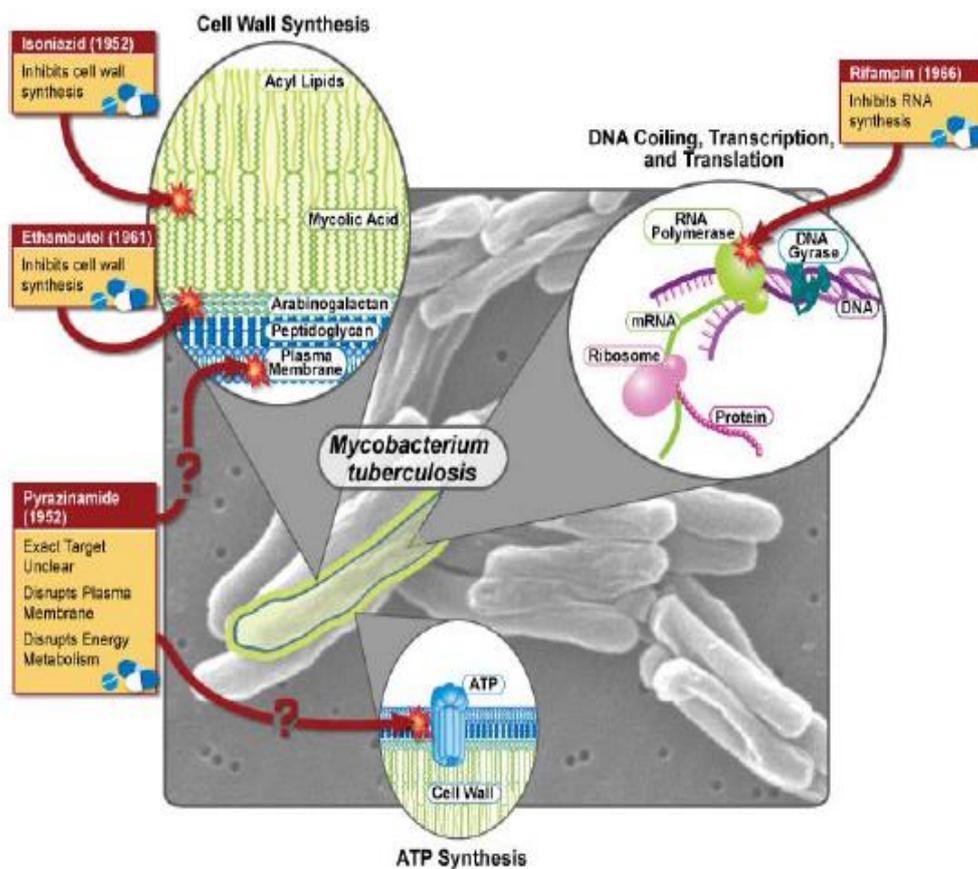
La streptomycine (SM) se fixe sur les ribosomes bactériens (ARNr 16S) inhibant ainsi l'initiation de la traduction.

- **Pyrazinamide**

Le PZA est l'amide de l'acide pyrazinoïde, analogue synthétique pyraziné du nicotinamide. Le PZA a un effet bactéricide sur le BK nécessitant un pH acide (PH 5.5) et la présence d'une pyrazinamidase (codée par le gène *pncA*) qui permet de transformer le pyrazinamide en acide pyrazinoïque, le composé actif, qui agirait en inhibant la synthèse des acides gras à chaînes courtes du BK. (Huchon, 2012).

- **Ethambutol**

L'EMB est le dérivé de l'éthylène diamine, bactériostatique sur *M. tuberculosis*, *M. bovis* et *M. africanum*. Il inhiberait l'incorporation des acides mycoliques dans la paroi cellulaire en agissant sur une arabinosyltransférase (cette enzyme transfère normalement l'arabinogalactane à l'intérieur de la cellule). Trois gènes organisés en opéron : *embA*, *embB* et *embC* codent pour cette enzyme (Takayama et Kilburn, 1989).



**Figure 12:** Antibiotiques de première ligne utilisés pour le traitement de la tuberculose sensible et leur mode d'action (source : Timouyas, 2017)

## 1.2. Les antibiotiques de deuxième ligne

Dans des cas de résistance ou de multirésistance aux antituberculeux, le traitement change et on a recours à des antituberculeux de seconde ligne qui sont moins efficaces et plus toxiques que les antituberculeux de première ligne. De plus, la durée du traitement est rallongée. Les antituberculeux de seconde ligne les plus utilisés sont : les aminoglycosides, les fluoroquinolones, l'acide p-aminosalicylique, les thioamides (Caminero et al, 2010 ; Zhang et al, 2006). Des schémas thérapeutiques normalisés spécialement conçus ou des schémas thérapeutiques personnalisés existent pour les patients avec une TB-MR (WHO, 2009).

Les antibiotiques de seconde ligne ne sont pas utilisés en première intention car ils présentent de nombreuses contraintes : ils ont des capacités stérilisantes limitées, ils sont plus chers et ont des effets secondaires majeurs. Leur utilisation nécessite une assistance médicale accrue car certains de ces antibiotiques doivent être injectés aux patients. Enfin, ils allongent la

durée du traitement à 18-24 mois (Dorman et Chaisson, 2007). Les antibiotiques de seconde ligne peuvent être classés en six familles : les aminoglycosides, les peptides cycliques, les fluoroquinolones, les thioamides, la cyclosérine et l'acide para-aminosalicylique (PAS). Ces antibiotiques ciblent la synthèse des acides (désoxy) ribonucléiques, la synthèse protéique ou la production d'éléments de l'enveloppe essentiels à la survie du bacille tuberculeux. Plusieurs mécanismes impliqués dans la résistance de *M. tuberculosis* à ces antibiotiques. Depuis 2006, des isolats cliniques de *M. tuberculosis* résistants aux antibiotiques de 2<sup>ème</sup> ligne les plus efficaces ont été isolés dans 58 pays (OMS, 2010).

**Tableau III:** Classifications existantes des médicaments antituberculeux (1 et 2) (source : Tiberi et al, 2017)

1) Classification des médicaments antituberculeux OMS 2011		2) Classification des médicaments antituberculeux OMS 2016		
<b>Groupe 1</b> Médicaments antituberculeux oraux de première intention	Isoniazide	<b>Groupe A</b> Fluoroquinolones	Levofloxacin	
	Rifampicine		Moxifloxacin	
	Ethambutol		Gatifloxacin	
	Pyrazinamide			
<b>Groupe 2</b> Médicaments antituberculeux injectables (Agents injectables ou parentéraux)	Amikacine	<b>Groupe B</b> Médicaments injectables de deuxième ligne	Amikacine	
	Streptomycine		Capreomycine	
	Capreomycine		Knamycine	
	KnamycinE		(Streptomycine)	
<b>Groupe 3</b> Fluoroquinolones	Levofloxacin	<b>Groupe C</b> Autres médicaments de base de deuxième ligne	Ethionamide/Prothionamide	
	Moxifloxacin		Cycloserine/ terizidone	
	Gatifloxacin		Linezolid	
	Ofloxacin		Clofazimine	
<b>Groupe 4</b> Médicaments anti-TB bactériostatiques oraux de deuxième intention	Ethionamide/Prothionamide	<b>Groupe D</b> Médicaments complémentaires (pas les composants principaux de la thérapie MDR-TB)	D1	Pyrazinamide
	Cycloserine/ terizidone		Ethambutol	
	p-Aminosalicylic acid		Isoniazide à forte dose	
<b>Groupe 5</b> Médicaments antituberculeux ayant des données limitées sur l'efficacité et la sécurité à long terme dans le traitement de la tuberculose résistante aux médicaments	Linezolid		D2	Bedaquiline
	Clofazimine			Delamanid
	Clarithromycine			p-Aminosalicylic acid
	Thioacetazone			(Thioacetazone)
	Isoniazide à forte dose			Imipenem-cilastatin
	Meropenem			Meropenem
	Amoxicilin-clavulanate			Amoxicilin-clavulanate

## 2. Resistance

Dans le monde, environ 10,4 millions de nouveaux cas de tuberculose sont survenus en 2016, dont un million d'enfants et près d'un demi-million (490 000) de cas de tuberculose multi-résistante (MDR) (WHO, 2016). Les bactéries pathogènes, y compris MTB, peuvent acquérir une résistance à un antibiotique particulier auquel elles étaient sensibles (Tasha et al, 2014).

L'émergence de la résistance aux médicaments chez MTB peut être divisée en deux facteurs principaux et leurs interactions : les facteurs extrinsèques, qui sont liés aux déterminants sociaux de la tuberculose dans les populations et la qualité des services de contrôle et de prévention de la tuberculose ; et les facteurs intrinsèques, tenant compte de ceux liés à l'acquisition de mutations génétiques dans les gènes associés à la résistance (Anna et al 2021).

On parle de **tuberculose multirésistante (MDR-TB)** lorsque le bacille responsable de la maladie n'est pas sensible à l'isoniazide et à la rifampicine, les deux médicaments antituberculeux de première ligne les plus efficaces. (OMS, 2020)

Au-delà de la tuberculose normale et la tuberculose multirésistante, selon Judith K. et al il existe la **tuberculose ultrarésistante (XDR-TB)**, qui est une MDR-TB résistant à toutes les fluoroquinolones et à au moins un des antituberculeux injectables de deuxième ligne (amikacine, kanamycine, capréomycine) (Judith et al, 2016).

### a. **Origine et types de résistance de MTB**

Une mauvaise utilisation des médicaments pour traiter la tuberculose pour des raisons liées au prescripteur ainsi qu'au patient peut entraîner une perte de sensibilité aux médicaments, donnant lieu à diverses formes de tuberculose pharmacorésistante. Les causes liées au prescripteur comprennent la prescription de régimes non standard inadéquats, un approvisionnement inapproprié en médicaments ou une administration de médicaments non supervisée, les raisons liées au patient incluent une mauvaise observance et / ou un abandon du traitement.

Cité et définit précédemment il existe la tuberculose multirésistante (MDR-TB) et ultrarésistante (XDR-TB) auquel s'ajoute la TB résistante aux mono drogues : TB causée par des organismes qui présentent une résistance à un seul médicament antituberculeux (ex : Isoniazide, rifampicine, éthambutol ou pyrazinamide (Sundari et Terrence, 2019).

Le premier médicament antituberculeux efficace, la streptomycine, a été découvert en 1944 (Schatz, Bugle et Waksman 1944). Le médicament nouvellement découvert a été immédiatement utilisé pour le traitement des patients tuberculeux. L'état de nombreux patients recevant de la streptomycine s'est amélioré au cours des premiers mois de traitement, pour ensuite se détériorer à nouveau au fur et à mesure que le traitement se poursuivait. On a compris que cela était dû à l'évolution des souches résistantes de MTB, rendant la streptomycine inefficace (Crofton et Mitchison 1948).

Dès la fin des années 1950 apparaissent des résistances à l'isoniazide et vers la fin des années 1960 celle à la rifampicine. Ces constats sont du reste à l'origine de traitements combinés dès la fin des années 1950, afin de diminuer l'apparition de résistances dues aux mutations spontanées de MTB (Judith et al, 2016).

**Remarque :** La transmission primaire est considérée comme le facteur prédominant à l'origine de l'émergence mondiale actuelle de la tuberculose MDR, (Manson et al 2017)

## **b. Mécanisme de résistance**

La résistance aux médicaments provient de la sélection de souches de MTB résistantes aux médicaments après une exposition sous-optimale aux antibiotiques de première ligne (Manson et al 2017). Les mutants génétiques émergent pour remplacer les souches d'origine, transformant ainsi une maladie initialement sensible aux médicaments en monothérapie. Les cycles suivants génèrent des souches poly résistantes, y compris la MDR-TB.

La vitesse d'apparition de la résistance diffère pour tous les agents antituberculeux, étant la plus élevée pour l'éthambutol et la plus faible pour la rifampicine et les quinolones. Les risques de mutation pour la plupart des antibiotiques utilisés dans le traitement de la tuberculose sont : pour **la rifampicine  $3,32 \cdot 10^{-9}$** , **l'isoniazide  $2,56 \cdot 10^{-8}$** , **la streptomycine  $2,29 \cdot 10^{-8}$**  et **l'éthambutol  $10^{-7}$**  mutations des bactéries par division cellulaire, respectivement. Le taux de mutation, plutôt que la fréquence de mutation est la mesure la plus fiable, car il enregistre le risque de mutation par division cellulaire plutôt que la proportion de cellules mutantes (Stephen, 2020).

Le transfert horizontal de gènes étant limité chez MTB, la résistance aux médicaments est acquise par étapes par des mutations spontanées qui confèrent un avantage de survie dans un environnement de croissance sélectif.

**Mutations observées face aux Rifamycine** : Les mutations ponctuelles, des délétions ont été observées chez 96% des isolats cliniques résistants à la RIF (RIFR) dans une région de 81 paires de bases du gène rpoB. Cette région encore appelée RRDR (Rifampin Resistance Determining Region) s'étend du codon 507 au codon 533 et code pour 27 acides aminés (Musser, 1995 ; Ramaswamy et Musser, 1998).

Les souches cliniques de MTB résistantes uniquement à la RIF (monorésistantes) sont rares. En effet, l'acquisition de la résistance à la RIF s'observe en général chez des souches déjà résistantes à l'INH. Ainsi, la résistance à la RIF est considérée comme un marqueur des souches MDR (Telenti et al, 2009 ; Sabouni et al, 2008).

**Mutations observées face à l'Isoniazide** : La résistance à l'INH est plus complexe que celle à la RIF, elle est contrôlée par plusieurs gènes à savoir : katG, inhA, ahpC, kasA et ndh. Elle est due principalement à des mutations au niveau du gène katG codant pour la catalase-peroxydase.

**Mutations observées face à la Streptomycine** : Les mutations associées à la résistance à la SM ont été identifiées au niveau de deux gènes rrs (ARNr 16S) et rpsL codant pour la protéine ribosomale S12. Contrairement aux autres bactéries, les membres du MTBC présentent une seule copie du gène ARNr. Par conséquent, un changement d'un seul nucléotide induit une résistance à la SM (Ramaswamy et Musser, 1998).

**Mutations observées face au Pyrazinamide** : Il a été démontré que la déficience d'activité de la pyrazinamidase due aux mutations du gène pncA est la cause principale de la résistance au PZA (Scorpio et Zhang, 1996 ; Jureen et al, 2008).

**Mutations observées face à l'Ethambutol** : Une mutation au niveau de l'opéron ABC induit une altération de l'enzyme et donc l'EMB ne peut plus agir induisant ainsi la résistance de MTB à cet ATB (Telenti et al, 1993 ; Takayama et Kilbum, 1989).

## Synthèse bibliographique

*Mycobacterium tuberculosis* (bacille de Koch) est responsable de la **tuberculose** ; défini par trois critères sa propriété d'acido-alcool-résistante, sa composition en acides mycoliques et son contenu en Guanine et Cytosine au niveau de l'ADN. Elle affecte généralement les poumons (tuberculose pulmonaire) mais aussi d'autres sites (TB extra pulmonaire).

*M. tuberculosis* se transmet d'homme à homme et se propage principalement par voie aérienne, les transmissions gastro-intestinales et par inoculation cutaneo- muqueuse sont rare mais quelques cas ont été observés. Il suffit qu'une autre personne inhale quelques-uns de ces bacilles pour qu'elle soit infectée. En général, les personnes à haut risque de développer une tuberculose sont les sujets immunodéprimés. La pathogénicité du MTB repose principalement sur (i) la capacité des bacilles à reprogrammer les macrophages de l'hôte après une primo-infection, empêchant sa propre élimination ; (ii) la formation des granulomes, dans lesquels le pathogène survit en équilibre avec la défense de l'hôte et (iii) le ralentissement du contrôle du métabolisme central bactérien et de la réplication, caractérisant l'état dit dormant dans lequel le MTB est résistant aux défenses de l'hôte et à la thérapie. La tuberculose active se caractérise en trois types de tuberculose : **Tuberculose pulmonaire (PTB)**, **Tuberculose extra-pulmonaire** et **la Tuberculose associée au VIH**. Suite à l'ampleur des cas identifiés dans le monde le dépistage est donc nécessaire et disponible dans plusieurs centres de santé. La mise en évidence de MTB est faite par des méthodes classiques et méthode de biologie moléculaire. La culture dans les conditions de croissance optimale reste la pierre angulaire de toutes ces méthodes. On parle de **tuberculose multirésistante** lorsque le bacille responsable de la maladie n'est pas sensible à l'isoniazide et à la rifampicine, les deux médicaments antituberculeux de première intention les plus efficaces. Au-delà de ces deux tuberculoses il existe la **tuberculose ultrarésistante**, selon Judith K. et al celle-ci est une MDR-TB résistante à toutes les fluoroquinolones et à au moins un des antituberculeux injectables de deuxième ligne (amikacine, kanamycine, capréomycine).

# **PARTIE EXPERIMENTALE**

**Cadre de l'étude :**

Dans le cadre de la réalisation de ce mémoire, nous avons réalisé un stage pratique de dix jours, du dimanche 04 au mardi 13 avril, au laboratoire central du CHU Beni Messous dans le but de nous familiariser avec les techniques utilisées pour le diagnostic et la prise en charge des malades.

Le laboratoire de la tuberculose de Beni Messous apporte une contribution essentielle à la lutte antituberculeuse en termes de diagnostic, de prévention, de contrôle et gestion de la maladie en Algérie.

La détection et l'isolement des mycobactéries, l'identification de l'espèce mycobactérienne ou du complexe isolé et la détermination de la sensibilité de l'organisme aux médicaments anti-mycobactériens sont des fonctions clés de ce laboratoire.

Le laboratoire clinique du CHU Beni Messous propose le service mycobactériologique suivant :

- Préparation et examen des frottis pour BAAR (bacilloscopie).
- Traitement et mise en culture des prélèvements.
- Isolement du genre *Mycobacterium*.
- Identification des espèces de mycobactéries, particulièrement le complexe *M. tuberculosis*.
- Déterminer la sensibilité aux médicaments pour toutes les espèces de *Mycobacterium*.

**Objectif de l'étude**

Le protocole expérimental que nous présentons dans ce travail est celui utilisé dans le laboratoire où nous avons réalisé notre stage.

Les étapes du diagnostic bactériologique et la caractérisation de la résistance du complexe *Mycobacterium tuberculosis* aux antituberculeux reposent sur les moyens utilisés dans ce laboratoire.

## **Echantillons biologiques**

- Crachats
- Liquide de ponction péritonéale
- Liquide de ponction pleurale,
- LCR,
- Liquide de ponction ganglionnaire
- Liquide de ponction articulaire
- Un fragment de biopsie

## **Matériels :**

### **❖ Produits chimiques et consommables**

#### **➤ Produit pour la coloration Ziehl-Neelsen**

- Fuchsine de Ziehl
- Bleu de méthylène
- Acide sulfurique dilué
- Alcool à 90°

#### **➤ Produit pour la coloration de Holst, Mitchison et Radhakrishna (à l'Auramine)**

- Auramine phénique
- Acide-alcool
- Permanganate de potassium ( $\text{KMnO}_4$ )

#### **➤ Produit de décontamination et culture**

- NaOH à 4%
- Eau distillée stérile
- Gélose Löwenstein Jensen
- Milieu liquide Middlebrook Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT)
- Tubes coniques en polypropylène de 50 ml avec bouchon à vis en plastique
- Tubes MGIT,
- Tubes à essai (16 mm de diamètre),
- Lames de microscope,

## ❖ Equipements

- Vortex
- Agitateur de Kahn
- Minuterie
- Pipette sérologique jetable de 2 ml,
- Bec bunsen
- Anse de platine
- Hôte à flux laminaire
- Incubateur MGIT
- Centrifugeuse

## Méthodes

### ❖ Prélèvement :

En plus des échantillons courants, tels que les expectorations (naturelles ou induites) et l'aspiration gastrique, d'autres comprennent l'urine, le liquide céphalo-rachidien, le liquide pleural etc...

Chaque prélèvement est accompagné systématiquement d'une fiche d'identification dûment renseignée.

### ❖ Examen direct :

A partir du prélèvement, une série de frottis est réalisée dans les conditions d'asepsie (sous hotte) puis soumise à la coloration à l'auramine pour une détection plus sensible et rapide grâce au microscope à épifluorescence LED (Light emitting diode), suivie d'une coloration de **Ziehl Neelsen** pour une confirmation du résultat.

Cet examen direct ne permet pas de distinguer les différentes espèces de mycobactéries, la réponse signalera la présence ou absence de BAAR.

Cet examen n'est pas très sensible puisqu'il faut au moins  $10^4$  bacilles/ml de prélèvement pour détecter au moins un BAAR ; néanmoins, il a une spécificité élevée et reste un examen indispensable dans la détection rapide des patients bacillifères atteints d'une tuberculose évolutive contagieuse. Son faible coût fait qu'il reste à la portée de tout programme national.

- **Coloration de Ziehl-Neelsen (Ziel et Neelsen 1882) :**

Les frottis sont colorés par la fuschine phéniquée à chaud, puis décolorés par l'acide et l'alcool. Ils sont ensuite contre colorés par le bleu de méthylène. Observés au microscope optique, les bacilles acido-alcool- résistants (BAAR) apparaissent comme des bâtonnets rouges sur fond bleu au grossissement x100 à l'huile d'immersion (figure 7).

✓ **Mode opératoire :**

**Coloration**

Après avoir fait un frottis, placer la lame sur un support en métal ou en verre, recouvrir en totalité de fuch sine de Ziehl filtrée sur papier. Chauffer doucement jusqu'à émission de la vapeur, au moyen de la flamme d'un coton monté, trempé dans l'alcool et flambé. Laisser agir 10 min tout en chauffant le bas de la lame 2 fois toutes les 3 min. Eviter l'ébullition et dessèchement du colorant.

**Décoloration**

Rejeter le colorant, laver immédiatement à l'eau ordinaire, autant que possible à l'aide d'un flacon et non sous le jet du robinet qui pourrait détacher le frottis. Recouvrir d'acide sulfurique dilué  $\frac{1}{4}$  pendant 3min. laver et recouvrir d'alcool à 90% pendant 5min puis laver jusqu'à ce que le frottis soit incolore ou légèrement teinté en rose.

**Contre coloration**

Recolorer pendant 30 secondes par la solution de bleu de méthylène filtrée sur papier. Laver à l'eau puis laisser sécher avant l'examen microscopique



**Figure 13:** coloration à la fuch sine (source : hôpital CHU de Beni messous)

- **Coloration à l'auramine :**

Contrairement à la méthode précédente, les frottis sont colorés par l'auramine. Observés au microscope à fluorescence, les BAAR apparaissent comme des bâtonnets jaunes verts brillants sur fond sombre (figure 8). Les frottis colorés sont examinés avec un objectif à sec au faible grossissement (x 25), ce qui fait que la surface de chaque champ microscopique observé est 16 fois plus grande qu'à l'objectif (x100), et que l'examen microscopique est plus rapide et plus sensible.

- ✓ **Mode opératoire :**

Après avoir fait les frottis et les fixer par la chaleur, recouvrir les lames de la solution d'auramine phéniquée, laisser agir 10min sans chauffer.

Laver puis décolorer avec l'acide alcool pendant 4min, laver et contre colorer avec le permanganate de K pendant 30 sec. Laisser sécher avant l'examen microscopique



**Figure 14:** coloration à l'Auramine (source : Hôpital CHU de Beni messous)

- ❖ **Traitement du prélèvement :**

La plupart des échantillons cliniques contiennent une abondance de microorganismes non mycobactériens. Sauf si une tentative est faite pour inhiber ces contaminants à croissance généralement rapide, ils peuvent rapidement envahir les mycobactéries se reproduisant

généralement plus lentement (temps de génération de 18 à 24 h en culture) sur le milieu de culture.

Tous les échantillons pulmonaires et extra-pulmonaire nécessitent une étape de traitement pré-analytique spéciale, avant de les cultiver, appelée décontamination et homogénéisation pour laisser les bacilles tuberculeux exempts de mucus, de cellules ou de tissus, ainsi que pour éviter le surcroît de l'organisme commensal qui peut être présent dans l'échantillon.

Cette étape peut être réalisée par la méthode de PETROFF (Petroff 1915) (à la soude) :

- Dans un tube à centrifuger conique contenant le produit pathologique 2cc on y ajoute un volume de 4cc de solution décontaminant NaOH 4%,
- Agiter à l'agitateur de Kahn pendant 15 min.
- Centrifuger 15 min à 3000 rpm
- Jeter le surnageant
- Laver à l'eau distillée stérile (10 à 15ml) avec l'agitateur pendant 15min
- Recentrifuger 3000 rpm pendant 15 min et
- Ensemencer le culot sur deux tubes de Löwenstein Jensen et sur milieu liquide Middlebrook Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) pour seulement les prélèvements de tuberculose extra-pulmonaire.



**Figure 15** : Homogénéisation et décontamination des échantillons (source : hôpital CHU Beni messous)

Le prétraitement et la décontamination des échantillons augmente la concentration des bacilles relativement acides et assure une détection plus sensible pendant la culture.

### ❖ Culture sur milieu solide :

Le milieu solide à l'œuf de **Löwenstein Jensen** est le milieu de culture le plus couramment employé dans le monde, en raison de sa grande sensibilité, et de son faible prix de revient. Le milieu de Löwenstein Jensen enrichi en glycérol favorise la croissance de *M. tuberculosis*.

#### Technique :

- **Écouvillons laryngé ou pus** : dans le tube contenant l'écouvillon on met 4ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 4% et on laisse agir 10min, on neutralise en ajoutant 305ml de NaOH à 6%, pour ensemencer on frotte délicatement l'écouvillon sur toutes ses faces à la surface du milieu LJ
- **L.C.R., liquide ganglionnaire, pleural, péritonéal et articulaire** : on fait couler quelques millilitres (pipettes) du prélèvement tout le long de la pente du milieu LJ.

La culture a été faite sur milieu solide de Löwenstein Jensen dans les conditions optimal 37°C, elle est lente et nécessite 3 à 6 semaines. Un contrôle des cultures est fait après chaque semaine pendant deux semaines, pour vérification de présence ou absence des mycobactéries atypiques.



**Figure 16:** Culture solide sur milieu Löwenstein Jensen (source : <https://microbenotes.com/mycobacterium-tuberculosis/> )

### ❖ **Culture sur milieu liquide**

La mise en œuvre de cultures liquides a été recommandée par l'OMS car elles donnent des taux plus élevés d'isolement mycobactérien et le temps de détection est plus court qu'avec les milieux solides classiques.

La détection des colonies ou présence des MTB se fait par **Le Système MGIT** :

#### **Technique** : Inoculation du milieu MGIT

- Étiqueter les tubes MGIT avec le numéro d'échantillon.
- Dévisser le bouchon et ajouter aseptiquement 0,8 ml de supplément de croissance MGIT à chaque tube MGIT. L'utilisation d'une pipette réglable est recommandée.
- À l'aide d'une pipette stérile ou d'une pipette de transfert, ajouter jusqu'à 0,5 ml d'un puits mélangé échantillon traité/concentré dans le tube MGIT étiqueté de manière appropriée. Utiliser pipette ou pointe de pipette séparée pour chaque échantillon
- Reboucher immédiatement le tube hermétiquement et mélanger en retournant le tube plusieurs fois.
- Essuyer les tubes et les bouchons avec un désinfectant mycobactéricide et laisser inoculer tubes à température ambiante pendant 30 minutes.
- Travailler sous l'enceinte de sécurité biologique pour l'inoculation de l'échantillon.

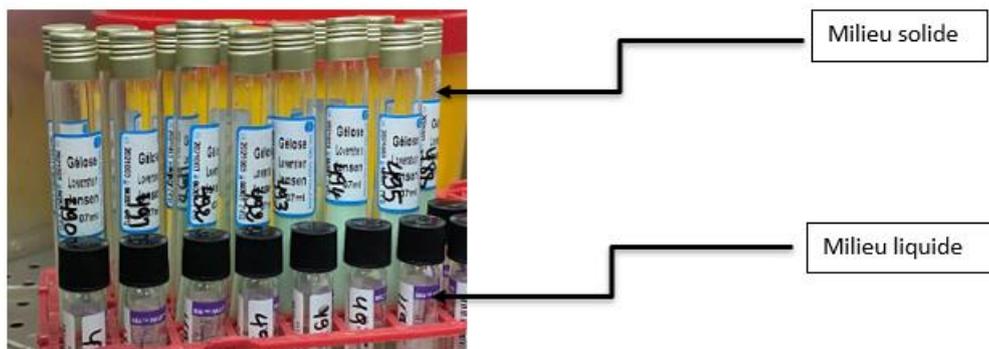
#### **Précautions** :

- L'une des principales sources de contamination dans le milieu MGIT est environnementale, contaminants introduits lors de l'ajout du supplément de croissance. N'ouvrez pas plusieurs tubes à la fois.
- Ouvrir le tube MGIT aussi brièvement que possible.
- Toujours bien refermer le tube. Si le capuchon n'est pas fixé, cela peut affecter la détection de fluorescence.

**Température d'incubation** : Tous les tubes MGIT (7 ml) inoculés doivent être introduits dans l'Instrument BACTEC MGIT 960 après avoir scanné chaque tube (veuillez-vous référer au BACTEC Manuel de l'instrument MGIT 960 pour plus de détails). Il est important de garder le bouchon bien fermé et ne pas agiter le tube pendant l'incubation. Cela aide à maintenir le gradient d'oxygène dans le moyen. L'instrument maintient une température de 37°C + 1°C. Étant

donné que l'optimum température de croissance de *M. tuberculosis* est de 37 °C, assurez-vous que la température est proche de 37°C.

Ce système utilise des tubes contenant du bouillon Middlebrook 7H9 enrichi avec un capteur de fluorescence sensible à l'oxygène noyé dans du silicone au fond du tube et qui, lors de la consommation de l'oxygène par les mycobactéries dans le milieu de culture, fluorescent de l'orange lorsqu'il est sondé avec une lumière UV.



**Figure 17:** Milieu de culture solide et liquide (source : hôpital CHU Beni messous)

**Lecture :**



**Figure 18:** Système MGIT (source : hôpital CHU Beni messous)

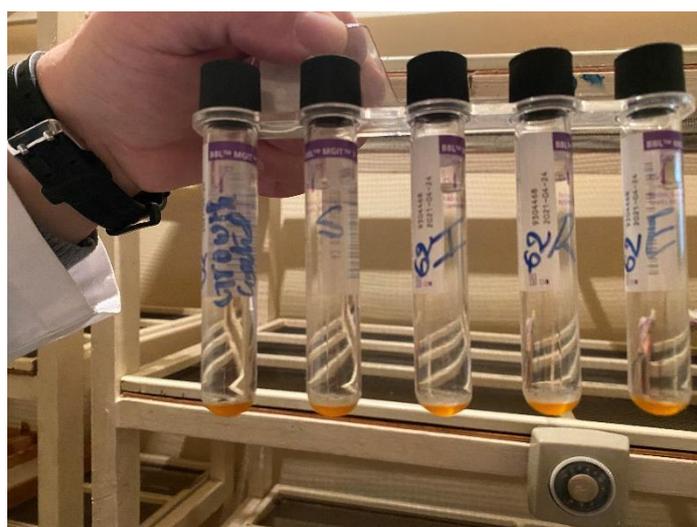
### ❖ Tests de sensibilité aux antituberculeux

La sensibilité aux antituberculeux de première ligne est réalisée en milieu solide selon la méthode des proportions ou en milieu liquide automatisé tel que le système Bactec Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT 960). Les résultats de ces antibiogrammes nécessitent 4 à 6 semaines pour les milieux solides et 10 à 15 jours pour les milieux liquides.

Les méthodes rapides de détection des souches MDR permettent de réduire considérablement ce délai et devraient donc être utilisées chaque fois que c'est possible. Pour toute souche résistante à la rifampicine ou multirésistante (Isoniazide et rifampicine), la sensibilité aux antibiotiques de 2ème ligne doit être rapidement évaluée en particulier les fluoroquinolones et les antibiotiques injectables.

La sensibilité aux médicaments de *M. tuberculosis* peut être déterminée par observation de la croissance ou de l'inhibition métabolique dans le milieu contenant un médicament antituberculeux. D'un point de vue technique, la sensibilité aux médicaments est déterminée sur la base de l'inhibition de la croissance (ou métabolique) induite par le médicament au moyen de :

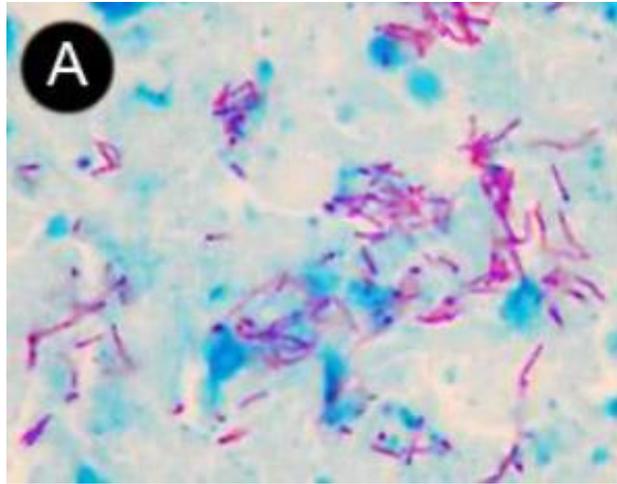
- observation macroscopique de croissance dans des milieux sans médicament et contenant du médicament
- détection ou la mesure de l'activité ou des produits métaboliques



**Figure 19:** Antibiogramme pour *M. tuberculosis* est faite pour Isoniazide, Rifampicine, éthambutol, Streptomycine. (source : hôpital CHU Beni messous)

## RESULTATS :

**Lecture :** coloration de ziehl-Nelsen



**Figure 20:** lecture de frottis par coloration de ziehl-Nelsen

Observation microscopique de frottis faisant apparaître des BAARs par la coloration de Ziehl-Nelsen Source : <http://ntcc.ucsd.edu> (Margaret Barlet, Ph. D, MT (ASCP) SM, Diplomat A.B.M.M., Medical Technology Program, University of Arkansas for Medical Sciences). Modification sur adobe Photoshop CS6

**Lecture :** coloration à l'auramine

Les frottis ainsi traités et séchés sont observés au microscope photonique.



**Figure 21:** lecture de frottis par coloration à l'auramine

Observation microscopique de frottis faisant apparaître des BAARs par la coloration à l'Auramine Source : <http://ntcc.ucsd.edu> (Margaret Barlet, Ph. D, MT (ASCP) SM, Diplomat A.B.M.M., Medical Technology Program, University of Arkansas for Medical Sciences). Modification sur adobe Photoshop CS6

Pendant la durée de notre stage, nous avons traité 77 échantillons (37 crachats et 40 autre type d'échantillons), qui ont été analysé minutieusement par des examens directs (Colorations à l'auramine et Ziehl Nelson) et la culture a été faite uniquement pour la suspicion de tuberculose extra-pulmonaire pour insuffisance de moyen.

Les résultats de la microscopie et de la culture pour les prélèvements autres que crachats sont rapportés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau IV** : Résultats de la microscopie et de la culture pour les prélèvements autres que crachats.

Journée	Type de prélèvement	Nombre	Microscopie		Culture	
			Positive	Négative	Positive	Négative
04/04	Crachats	07	01	06	ND	
	Autres	11	01	10	01	10
05/04	Crachats	07	02	05	ND	
	Autres	05	00	05	00	05
06/04	Crachats	11	03	08	ND	
	Autres	07	02	05	02	05
07/04	Crachats	06	02	04	ND	
	Autres	11	00	11	00	11
08/04	Crachats	05	02	03	ND	
	Autres	02	00	02	00	02
11/04	Crachats	01	Douteux		ND	
	Autres	04	00	04	00	04

**ND : Non déterminé**

Sur la base des résultats obtenus, il en ressort ce qui suit :

- Sur les 37 prélèvements de crachats analysés par examen direct, dix (10) se sont révélés positifs en microscopie et un (01) douteux avec vingt-six (26) négatifs. La culture n'a pas été faite par faute de moyens.
- Sur les 40 autres prélèvements que les crachats, seuls trois (03) se sont révélés positifs en microscopie avec trente-sept (37) négatifs.

- Les résultats de la culture (milieu solide et liquide) pour les quarante (40) prélèvements (autres que crachats) ont permis de confirmer la présence de *M. tuberculosis* dans trois prélèvements.
- La sensibilité aux antituberculeux de première ligne, c'est-à-dire l'isoniazide, la rifampicine, l'éthambutol et la streptomycine, a été réalisée en milieu liquide automatisé au moyen du système Bactec Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT 960) pour les trois souches isolées. Les résultats obtenus après quinze (15) jours n'ont montré aucune résistance.

**Tableau V** : interpretation des résultats de la microscopie

	Résultat	Interprétation
<b>Microscopie</b>	Positive	Tuberculose très probable, mais une infection à MAMT n'est pas exclue
	Négative	TB active possible

MAMT : Mycobactérie Autre que *Mycobacterium Tuberculosis*

**Tableau VI** :Interprétation des résultats de la culture :

<b>CULTURE</b>	+ à <i>M. tuberculosis</i>	TB
	- à 6 semaines	Si Xpert - : Pas de TB Si Xpert+ ou M+ : probable faux négatif (patient traité ?!)
	MAMT	Si Xpert - : Pas de TB Si Xpert + : contamination Confirmer l'infection à MAMT /mycobactériose
	Contaminé	Pas de conclusion possible : Demander un autre prélèvement

MAMT : Mycobactérie Autre que *Mycobacterium tuberculosis*

## **DISCUSSION**

Le diagnostic de la tuberculose reste un problème important bien qu'il existe un test de diagnostic avancé. L'inconvénient et l'avantage de chaque test de diagnostic sont évidents, et aucun test n'a atteint l'objectif en termes de précision et de fiabilité. Le coût et le temps de diagnostic doivent également être pris en compte car la tuberculose est plus courante dans les pays en développement.

### **Type de tuberculose**

Les prélèvements sont faits selon la localisation de la tuberculose (pulmonaire ou extra-pulmonaire) mais la démarche du diagnostic est la même

### **Les résultats de l'examen bactériologique basés sur la bacilloscopie**

La méthode la plus couramment utilisée est la microscopie des frottis d'expectoration et d'autres liquides. Cependant, malgré la précision du diagnostic microscopique des frottis, cette technique ne permet pas de détecter les souches résistantes aux médicaments. La lecture est faite tout le long de la lame en forme d'un S, minimum 100 champs et maximum 300 champs. il n'est positif que si le prélèvement contient plus de  $10^4$  /ml.

### **Culture bactérienne**

La culture sur milieux spécifiques reste la pierre angulaire sur laquelle repose le diagnostic définitif de la tuberculose et d'autres mycobactérioses. La culture améliore les résultats de l'examen direct, son seuil de détection est de 100 bacilles/ml alors que celui de la microscopie est de 10 000 BAAR/ml. L'utilisation des milieux liquides et des systèmes de lecture automatisés permet de raccourcir les délais de détection des cultures entre 7 et 12 jours. La culture sur milieu liquide de *M. tuberculosis* est plus sensible et rapide que la culture sur milieu solide mais est sujette à la contamination dans certains laboratoires, il est donc préférable d'utiliser les deux méthodes conjointement.

La culture permet l'isolement de la mycobactérie, son identification, ainsi que la détermination de sa sensibilité aux antituberculeux.

Les résultats de la culture sur milieu liquide (MGIT) étaient plus rapides dans la durée de 12 à 15 jours contrairement à celle de la culture sur milieu solide qui nécessite plus de 21 jours.

L'avantage du temps minimum que nécessite le milieu liquide MGIT est celle d'éviter une évolution de la souche comparativement au milieu solide qui nécessite plus de temps, Car au fur et à mesure que le temps passe les souches peuvent subir de mutation et donc évoluée vers les souches multirésistantes. Le teste de sensibilité est effectué par l'automate MGIT pour 4 antituberculeux Isoniazide, Rifampicine, Ethambutol et la Streptomycine et les résultats sont obtenus après 12 à 15jours.

### **L'Identification phénotypique**

Reposé sur les caractères cultureux (vitesse de croissance, pigmentation, forme des colonies et aspects) ainsi que les caractères biochimiques en utilisant trois tests biochimiques, à savoir : **l'activité catalasique, la réduction des nitrates et l'accumulation de la niacine.**

**Remarque :** Les systèmes de santé négligent souvent les enfants atteints de tuberculose car les enfants sont moins contagieux que les adultes et l'arrêt de la propagation de la tuberculose est une priorité. De plus, les outils standards utilisés pour diagnostiquer la TB fonctionnent moins bien chez les enfants parce que les échantillons tels que les expectorations sont plus difficiles à collecter chez les jeunes enfants. Même lorsque les crachats peuvent être collectés, ils peuvent contenir très peu de bactéries tuberculeuses (maladie paucibacillaire à frottis négatif).

L'ampleur de la tuberculose chez l'enfant est inconnue mais on estime qu'elle représente environ 6% de tous les cas incidents dans le monde. Le nombre d'enfants qui meurent de tuberculose peut être en fait plus élevé que celui enregistré. Les enfants qui ont la tuberculose et qui sont également séropositifs au moment de leur décès (c'est-à-dire qu'ils ont une co-infection tuberculose/VIH) sont internationalement classés comme étant décédés du VIH (Jenkins H, 2016)

La tuberculose pédiatrique et le VIH ont des manifestations cliniques qui se chevauchent, ce qui pourrait conduire à des diagnostics manqués ou tardifs. Les diagnostics microbiologiquement confirmés chez les enfants atteints de tuberculose ne sont obtenus que dans une minorité.

## **Conclusion**

Notre travail est porté sur le diagnostic de la tuberculose par la microscopie des frottis, la méthode de culture (liquide et solide) et accompagné d'un test de sensibilité.

Nous avons conclu que, la microscopie est rapide et moins chère que la méthode de culture, la sensibilité est gravement compromise lorsque la charge bactérienne est faible comme dans le cas de la tuberculose extra-pulmonaire, Bien que les autres prélèvements (diffèrent des crachats) aient donné un résultat positif aux examens microscopique et également pour la méthode de culture.

Cependant, dans les contextes où les ressources sont insuffisantes, la méthode de microscopie peut être utilisée pour le crachat et la méthode de culture peut être considérée comme complémentaire à la microscopie de frottis conventionnelle pour des types spécifiques de prélèvement. L'observation a montré que des ressources limitées et un grand nombre d'échantillons combinés peuvent réduire le temps d'observation par lame et donc donner un résultat douteux. La microscopie a montré des résultats douteux pour un nombre insignifiant d'échantillon ; En raison de l'exigence d'examens d'expectoration en série, certains patients qui ne reviennent pas pour un examen d'expectoration répété peuvent devenir des patients défaillants du diagnostic. La méthode de culture ne montre pas des résultats douteux ce qui est l'une des raisons pour lesquelles elle reste la pierre angulaire du diagnostic de la tuberculose.

Cette étude recommande la méthode de culture de préférence à l'examen microscopique des frottis pour le diagnostic de la tuberculose pulmonaire et extra pulmonaire afin d'éviter un diagnostic manqué/ douteux de tuberculose pulmonaire à frottis négatif. Ceux-ci peut contribuer à l'augmentation des transmissions et des décès parmi les adultes et enfants qui développent chaque année une tuberculose multirésistante (MDR-TB). Une mono-résistance face aux antituberculeux de première ligne (ex. : isoniazide) n'a pas d'effet sur l'intensité de la contagiosité. A contrario, la multirésistance (résistance à la fois à l'isoniazide et à la rifampicine) allonge la période de contagiosité et, de ce fait, la transmission.