

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid Ibn
Badis-Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة والحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenter par

AZZOUZ SARA

MESSAOUDENE AHLEM

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité : Génétique Fondamentale et Appliquée

THÈME

**Etude génétique et épidémiologique de la
tuberculose**

Soutenue le 29/06/2020

DEVANT LE JURY

Président :	DJIBAOUI R.	Prof	U. Mostaganem
Encadreur :	CHIBANI A.	Prof	U. Mostaganem
Examineur :	BENALI S.	MAA	U. Mostaganem

2019/2020

Sommaire

Remerciement

Dédicace

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction..... 1

Etude bibliographique

Chapitre01:Générlité sur la tuberculose

1. Histoire de la tuberculose 4

2. Epidémiologie 5

2.1. Epidémiologie de la tuberculose dans le monde.....5

2.2. Epidémiologie de la tuberculose en Algérie6

3. Facteurs de risque 8

3.1. Facteurs sociaux et comportementaux8

3.2. Facteurs physiologiques et génétiques9

3.3. Facteurs liés à une immunosuppression9

4. Aspect clinique de la tuberculose: 10

4.1 .Primo-infection tuberculeuse :.....11

4.2. Tuberculose pulmonaire (TBP) :11

4.3. Tuberculose extra-pulmonaire (TBEP) :11

4.3.1. Tuberculose ganglionnaire :12

4.3.2. Tuberculose osseuse :12

4.3.3. Atteinte tuberculeuse des séreuses :12

4.3.4. Tuberculose neuroméningée :	13
4.3.5. Tuberculose urogénitale :	13
4.3.6. Tuberculose digestive :	14
4.3.7. Formes rares de tuberculose :	14
4.4. Tuberculose disséminée ou miliaire :	14

Chapitre02 :*Mycobacterium tuberculosis* :Epidémiologie et génétique

1.Agent responsable <i>Mycobacteriumtubr culosis</i> :	17
1.1.Le genre <i>Mycobacterium</i> :	17
1.2. Les critères de <i>Mycobacterium</i> :	17
1.3. Classification :	17
1.4. Habitat :	19
2. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> :	19
3. Epidémiologie génétique :	20
3.1. Génome des souches du complexe <i>M. tuberculosis</i> :	20
3.2. Caractéristiques génétiques :	22
3.2.1. Nombre de copies du gène codant pour l'ARN 16S ribosomal :	22
3.3 .Identification génotypique :	22
3.3.1. Génotypage :	23
4. Les méthodes de génotypage de <i>mycobactérium tubrculosis</i> :	23
4.1. La technique RFLP :	23
4.2. Spoligotyping: Spacer Oligotyping :	24
4.3. Les MIRU-VNTR	25

Chapitre03 :Diagnostic et traitement

1. Diagnostic de la tuberculose :	27
1-1 Diagnostic clinique :	27
1.1.1. L'intradermo-réaction (IDR) :	27

1.1.2. La radiographie pulmonaire	28
1.2. Le diagnostic Bactériologique	28
1.3. Amplification génique :	29
1.3. Radiographie du thorax :	30
2. Traitement de la tuberculose.....	30
2.1. Isolement des patients contagieux :.....	30
2.2. Principes :	30
2.3. Traitement standard :.....	31
2.4. Médicaments antituberculeux :.....	31
2.4.1. Isoniazide :	31
2.4.2. Rifampicine :	31
2.4.3. Ethambutol :	31
2.4.4. Pyrazinamide :.....	31
2.4.5. Streptomycine :.....	32
2.5. Traitement Préventif :.....	32
2.5.1. Vaccination par le BCG	32

Partie pratique

matériels et methodes

1. Cadre d'étude.....	37
2. Objectif d'étude :	37
3. Matériels et méthode :.....	37
3.1. Matériel :.....	37
3.1 .1. Les réactifs :	37
3.2. Méthodes :	38
3.2.1. Examen microscopique des crachats :	38
3.2.1.1. Prélèvement d'échantillons :	38

3.2.1.2. Préparation des frottis à partir d'un crachat :	38
3.2.1.3. Coloration de Ziehl-Neelsen :	39
3.2.1.4. La coloration par la Fuschine phénique :	39
3.2.1.5. Décoloration :	40
3.2.1.6. Contre-coloration :	41
3.2.1.7. Lecture sur microscope :	42

Résultats et discussion

1. Résultats microscopique « bacilloscopie » :	45
2. Paramètres épidémiologique de la population étudiée :	46
2.1. Répartition des cas positifs selon le mois:	46
2.1.1. Discussion :	47
2.2. Répartition des cas positifs selon le sexe :	47
2.2.1. Discussion :	48
Conclusion :	49
Résumer :	50
Références bibliographiques	54

Remerciement

Au terme de ce travail, nous remercions ALLAH tout puissant pour le courage, la patience, et surtout la santé qui nous a été utile pour réaliser ce mémoire.

Nous remercions l'encadreur Mr. CHIBANI de qui ont a grandement bénéficié de son aide et tous ceux qui ont fourni une assistance et nous souhaitent de succès et pour tous les étudiants du parcours GFA et nous remercions aussi Mr. JIBAOUI et Mr. BINALI pour accepter de juger ce travail

Nous remercions aussi nos familles pour le soutien inconditionnel qu'elles nous ont apporté tout au long de notre parcours

Nous remercions tous les amis avec qu'on a passé les moments les plus mémorables et nous leur souhaitons beaucoup de succès

Enfin, nous remercions toute personne ayant contribué de près au de loin à l'élaboration de ce mémoire



Dédicace

Au nom du Dieu clément et miséricordieux et que le salut du Dieu soit sur son prophète MOHAMMED

Je dédie ce Modest travail A tout qui sont les plus chères au monde :

Ma chère maman

Tu représentes pour moi la source de tendresse et l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager. Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études. Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

A mon père et mon petit frère, surtout ma grand-mère

A mes chères sœurs

A toute la famille Azzouz et messaoudéne

Sans oublier mes très chère amis : Atika, Soumaya,

Ahlem ,Houria et Wassila

A tous mes collègues de la promotion

SARA



Dédicace

*Au nom du Dieu clément et miséricordieux et que le
salut du Dieu soit sur son prophète MOHAMMED*

Ma très chère mère

*Votre patience, votre bienveillance, votre dévouement et
votre courage sont admirables. Vous étiez toujours présente
pour nous écouter, nous reconforter et nous montrer le droit
chemin. Vous avez déployé énormément d'efforts pour que
nous ne manquions de rien. Vous êtes une mère formidable.
Je t'aime et je te souhaite longue vie dans la bonne santé et
le bonheur*

A mon très cher père

A ma très chère sœur

*À mes frères, Bachir Ayman Al-Eid et mes amis Houria
Sara Soumaya Atika Al-Khansaa*

A mes chers oncles et tantes ainsi que leurs époux et épouses

A mes chers cousins et cousines

A toute ma grande famille

AHLEM



Liste des figures

Figure 01 : répartition de l'incidence mondiale de la tuberculose par 100 000 habitants	6
Figure 02 : Evolution du taux de la tuberculose en Algérie	7
Figure 03 : Schéma général des facteurs modulant le risque de passage de l'exposition L'infection et le développement d'une tuberculose active.....	8
Figure04 : Localisations anatomiques les plus fréquentes du bacille tuberculeux après Dissémination	10
Figure 05 : Structure d'une mycobactérie tuberculeuse au microscope électronique	19
Figure 06 : Représentation du génome de M. tuberculosis H37Rv.....	21
Figure 07 : la procédure et les étapes de la technique spoligotyping	24
Figure 08 : Inoculation de la tuberculine par voie intradermique a la face antérieure de l'avant bras	27
Figure 09 : Récipient de prélèvement des expectorations bronchiques	38
Figure 10 : étalement de la lame.....	39
Figure 11 : Coloration par la fuchsine phéniquée	40
Figure 12 : flambages des lames.....	40
Figure 13 : la décoloration a l'acide sulfurique.....	41
Figure 14 : la contre coloration a bleu de méthylène a 0.3%	41
Figure 15 : La lecture en créneau de la lame après coloration de Ziehl-Neelsen.	42
Figure 16 : Observation microscopique de bacilles acido-alcool-résistants (BAAR) après la coloration de Ziehl Neelsen.	45
Figure 17 : Répartition des patients à BAAR positif par mois à l'année 2019.	46
Figure18 : Répartition des patients à BAAR positif en fonction de sexe par mois à l'année 2019.....	47

Liste des tableaux

Tableau 01: Interprétation du test à la tuberculine.....	27
Tableau 02: Notation des résultats	45
Tableau 03: Résultats de l'examen microscopique après coloration de Z-N des échantillons pulmonaires obtenus par mois l'année 2019.	46
Tableau 04: Résultats de l'examen microscopique après coloration de Z-N des échantillons pulmonaires obtenus selon le sexe.	47

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique.

ARN : Acide ribonucléique.

BAAR : Bacille acido-alcool- résistants.

BCG : Bacilles de Calmette et Guérin.

BK: Bacilles de Koch.

DOTS: Directly Observed Therapy Short-Course.

IDR : Intradermo-réaction.

IFN γ : Interferon gamma.

Kb : Kilobase

LCR : liquide céphalorachidien

OMD : Objectifs du Millénaire pour le développement.

OMS : Organisation mondiale de la santé.

NRAMP1: Natural Resistance-Associated Macrophage Protein1.

Pb: Pair de base.

PCR : Polymérase Chain Réaction.

PPF : Proline-Proline-Glutamate-n.

RFLP : Polymorphisme de longueur de fragments de restriction

SIDA : Syndrome d'Immunodéficience Acquise.

TB:Tuberculose.

TEP: Tuberculoses Extra-pulmonaire.

TLR8: Toll-Like Receptor 8.

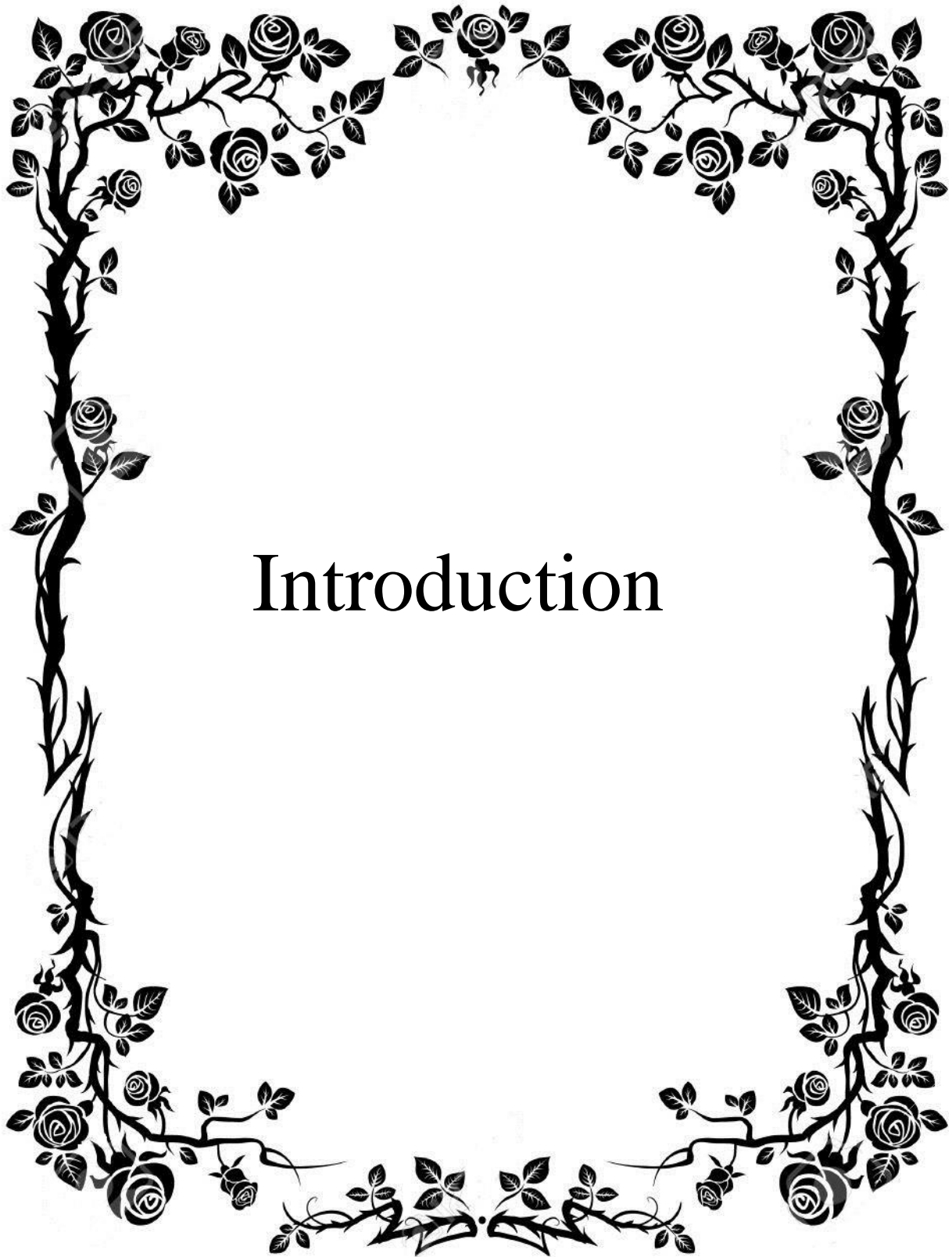
TNF α : Facteur de Nécrose des Tumeur alpha.

TP : Tuberculose pulmonaire.

UV: ultraviolet

VIH: Virus d'immunodéficience humaine.

WHO: World health organisation.



Introduction

Introduction :

La tuberculose a été décrite depuis Hippocrate. Cependant, elle n'a été reconnue comme problème majeur de santé publique qu'à partir de la révolution industrielle. Appelée autrefois phtisie (terme désuet), est une maladie infectieuse contagieuse due à une bactérie dit *Mycobacterium tuberculosis*, plus connu sous le nom de bacille de Koch.

La tuberculose est une maladie infectieuse endémo-épidémique transmissible et non immunisante provoquée par une mycobactérie du complexe *tuberculosis* dont le réservoir est humain et à transmission essentiellement interhumaine ; l'atteinte pulmonaire est la plus fréquente des localisations être présente la source habituelle de transmission.

Cette maladie reste à nos jours un problème de santé publique dans les pays en voie de développement notamment en Algérie, les mouvements migratoires, l'utilisation de plus en plus fréquente de thérapeutiques immunosuppressives et l'infection par le virus d'immunodéficience humaine (VIH) sont responsables de la recrudescence de la TB dans les pays industrialisés.

La symptomatologie clinique est polymorphe et peut mimer plusieurs pathologies respiratoires et/ou générale ; les signes généraux sont en premiers plans ainsi que les signes respiratoires non spécifiques que les malades négligent le plus souvent ce qui retarde le diagnostic de cette maladie qu'est traitable et guérissable donc savoir y penser le traitement est bien codifiée bien qu'astreignant mais efficaces s'étend sur six mois et comprend en général la prise de quatre antibiotiques. Il est important de prendre ces antibiotiques tous les jours pour empêcher la maladie de s'aggraver et prévenir la bactérie de se renforcer et de devenir résistante aux médicaments.

Donc notre travail s'est basé sur l'étude épidémiologique et génétique de la tuberculose à partir de l'étude de génome de *Mycobacterium tuberculosis* le diagnostic bactériologique de la tuberculose pulmonaire par la recherche des bacilles acido-alcoolorésistants (BAAR) dans les crachats en faisant appel à l'examen microscopique des échantillons après coloration de Ziehl-Neelsen.



Etude bibliographique



Chapitre01 :

Généralité sur la tuberculose



1. Histoire de la tuberculose

La tuberculose est une maladie infectieuse très ancienne. Les origines de son agent étiologique, la bactérie *Mycobacterium tuberculosis*, remonteraient à plusieurs millions d'années. *M. tuberculosis* aurait infecté les premiers Hominidés et co-évolué avec eux.

La tuberculose toucha très fortement l'Europe et l'Amérique du Nord au cours des 17^{ème} et 18^{ème} siècle. A la fin du 19^{ème} siècle, le contrôle de la maladie commença grâce à l'identification de *M. tuberculosis* par Robert Koch, et au développement d'outils de détection, les rayons X et le test à la tuberculine. Au 20^{ème} siècle, les progrès dans la lutte contre la tuberculose continuèrent avec la mise en place, par Albert Calmette et Camille Guérin, du vaccin BCG (pour Bacille Calmette et Guérin) et avec l'apparition des antibiotiques à partir des années 1940. La mise en place de la première antibiothérapie spécifiquement dirigée contre *M. tuberculosis* permit une forte diminution de l'incidence de la maladie dans les pays industrialisés pendant la seconde moitié du 20^{ème} siècle permettant ainsi d'atteindre 50 cas pour 100 000 habitants. L'épidémie de tuberculose qui sévissait depuis plusieurs siècles semblait alors sous contrôle.

L'ère de déclin de la tuberculose prit vers 1985 lorsque, pour la première fois de plus de 30 ans, l'incidence de la tuberculose augmenta aux Etats Unis rapidement, d'autres pays subirent une résurgence de la tuberculose plus ou moins marquée selon les régions du monde liée, pour une bonne part, à l'émergence de l'épidémie de SIDA. Dans les pays développés, le retour de la tuberculose est aussi la conséquence de l'immigration, de l'accroissement du nombre de « points chauds » où la tuberculose foisonne tels que les prisons, les hôpitaux et les refuges pour SDF, et de l'arrêt des programmes de surveillance de la maladie.

C'est dans ce contexte qu'en 1993, l'OMS reconnut la tuberculose comme une urgence de santé publique au niveau mondial et élaborait une politique de lutte contre la tuberculose appelée stratégie « DOTS » pour Directly Observed Therapy Short-Course ayant pour objectif d'améliorer la détection, le traitement et le suivi des cas de tuberculose. Malgré la mise en place de cette stratégie, le nombre de cas n'a cessé d'augmenter notamment en Afrique sub-saharienne, en Méditerranée orientale et en Asie du Sud-est. Ce phénomène s'explique notamment par la co-infection *M. tuberculosis*/VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine), en particulier en Afrique, et par l'apparition de tuberculoses résistantes aux antituberculeux, surtout en Europe de l'Est. Pour répondre à ces difficultés, l'OMS a mis en

place, en 2006, une nouvelle stratégie appelée « Halte à la tuberculose » afin de renforcer le DOTS et d'apporter des réponses aux problèmes d'accès aux traitements de qualité dans les différentes régions du monde. Les objectifs sont d'atteindre, en 2015, une diminution de 50% de la prévalence et du nombre de morts par rapport à la situation de 1990 (incidence de 1 cas/million d'habitants) en 2050. Entre 1995 et 2009, 41 millions de patients souffrant de tuberculose ont pu être soignés grâce aux stratégies DOTS et Halte à la tuberculose. Un nouveau plan intitulé « Transformer la lutte pour parvenir à l'élimination » a été instauré par l'OMS en 2010 pour aider à la modernisation des laboratoires de diagnostic et assister la Recherche dans la mise au point de tests de dépistage rapides, de schémas thérapeutiques moins longs et d'un vaccin efficace (Cécile ; 2012).

2. Epidémiologie

L'étude épidémiologique de la tuberculose permet de mesurer l'ampleur et l'évolution dans le temps du problème posé par la tuberculose. Elle contribue à décider des meilleures mesures collectives à mettre en place dans les pays selon les différents contextes épidémiologiques et à évaluer les résultats de leur mise en œuvre. Différents indices plus ou moins faciles à obtenir sont utilisés.

2.1. Epidémiologie de la tuberculose dans le monde

La tuberculose reste un problème de santé publique majeur. Pour l'année 2012, on estime que 8,6 millions de personnes ont contracté cette maladie et que 1,3 million en sont morts (y compris 320 000 décès parmi les personnes séropositives pour le VIH). Le nombre de décès par tuberculose est inacceptable, trop élevé sachant que la plupart d'entre eux sont évitables. Près de 20 ans après que l'OMS a déclaré « la tuberculose urgence de santé publique mondiale », des progrès très importants ont été enregistrés en direction des cibles mondiales fixées pour 2015 dans le contexte des objectifs du Millénaire pour le développement (OMD). La plupart des cas de tuberculose et des décès dus à cette maladie concernent des hommes, mais la tuberculose demeure l'une des principales causes de décès chez la femme dans le monde (Benbetka ; 2016).

En 2016, 6,3 millions de nouveaux cas de tuberculose ont été signalés (contre 6,1 millions en 2015), soit 61 % de l'incidence estimée (10,4 millions), dont 90 % sont des adultes, 65 % des personnes de sexe masculin, et 10 % des personnes vivants (Figure01) avec

le VIH (dont 74 % d'Africains). Parmi ces cas, 56 % venaient de cinq pays : l'Inde, l'Indonésie, la Chine, les Philippines et le Pakistan (OMS ; 2017).

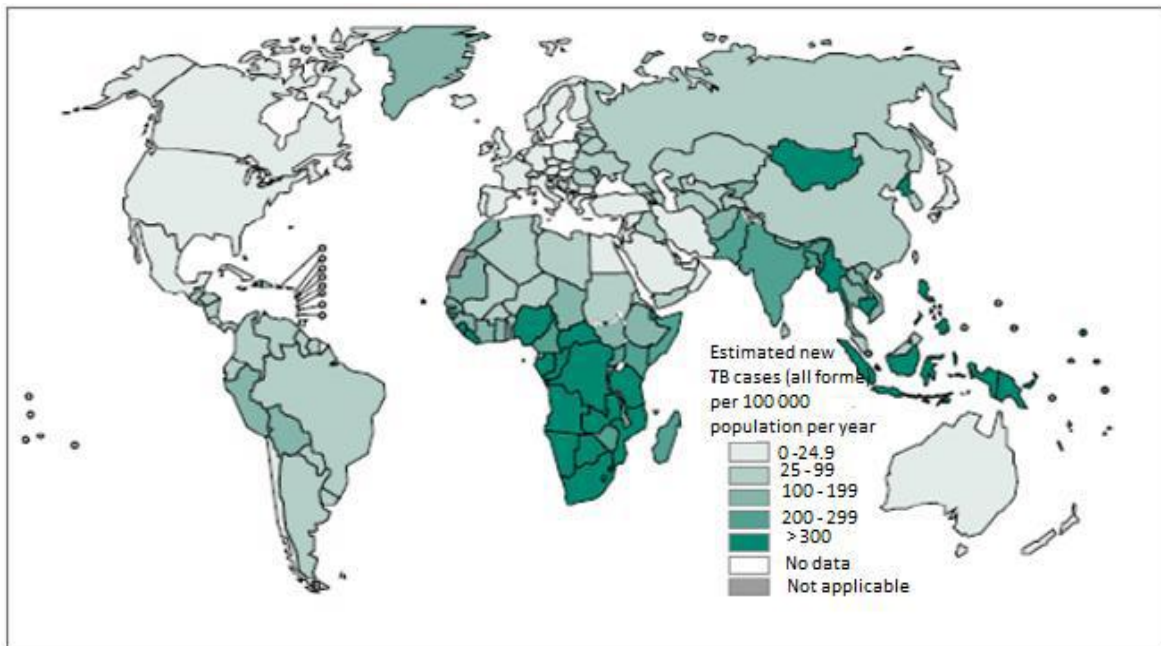


Figure 01 : répartition de l'incidence mondiale de la tuberculose par 100 000 habitants (WHO ; 2016).

2.2. Epidémiologie de la tuberculose en Algérie

Au cours de la période 1962-2010, l'Algérie, jadis pays à haute prévalence de tuberculose, a rejoint depuis le début des années 1980 le groupe des pays à prévalence. L'on dénombre environ chaque année 20 000 cas de tuberculose toutes formes confondues où l'incidence annuelle de cette tuberculose se situe entre 20 et 99 cas pour 100.000 habitants.

Parmi les nouveaux cas de tuberculose toutes formes confondues, on observe une légère prédominance des cas de tuberculose pulmonaire. Pour les années récentes, 83% des nouveaux cas de tuberculose pulmonaire sont à microscopie positive, tandis que plus de 15% sont à microscopie négative ou non faite ; la proportion des cas de tuberculose pulmonaire à culture positive seulement est très faible en raison du développement insuffisant du réseau des laboratoires de culture (Ministère de la santé ; 2011).

En Algérie, plusieurs périodes de l'évolution de situation épidémiologique de la tuberculose ont été identifiées (**figure 2**) et qui correspondent à des changements socioéconomiques ou à la prise en charge de la maladie (**Alihalassa ; 2018**).

Avant l'indépendance, l'incidence de la tuberculose tournait autour de 300 cas pour 100 000 habitants. Au lendemain de l'indépendance et jusqu'à la fin des années quatre-vingts, il y a eu une réduction considérable du risque annuel de l'infection, de la morbidité liée à la maladie et la régression spectaculaire de la tuberculose de l'enfant.

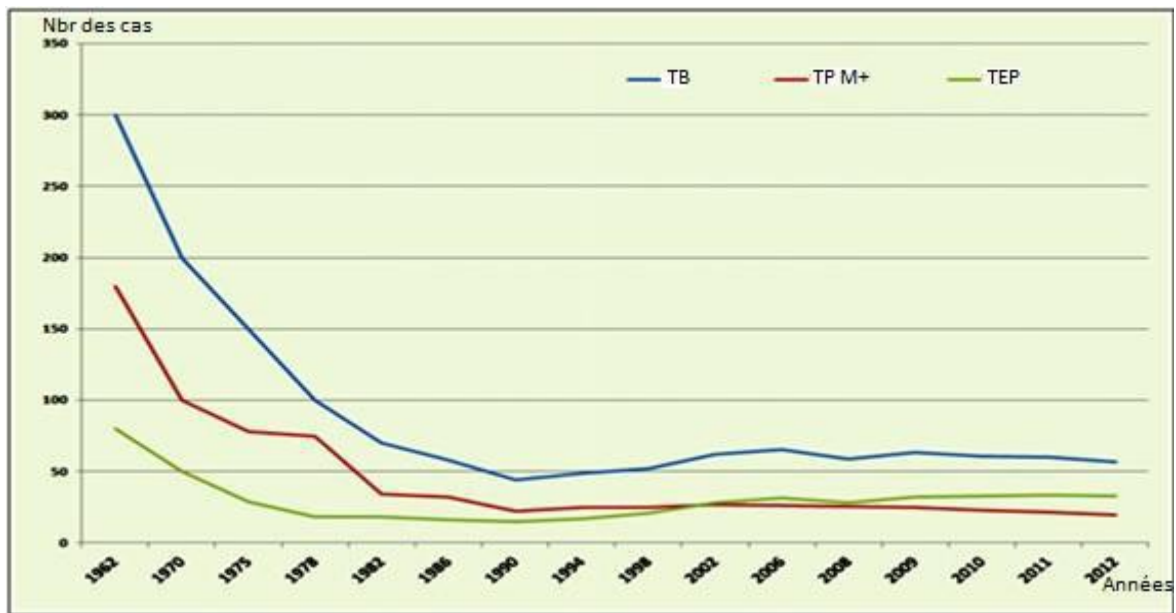


Figure 2 : Evolution du taux de la tuberculose en Algérie (**Alihalassa ; 2018**).

À partir de 1990, la courbe de l'évolution de la tuberculose connaît une stagnation puis une élévation de l'incidence de la tuberculose à cause de nombreux problèmes.

À partir de l'année 2000, la relance des activités du programme antituberculeux a permis de constater une régression de l'incidence des cas de tuberculose pulmonaire contagieuse qui décline au-dessous du seuil de 17 cas pour 100 000 habitants en 2016. Durant cette période, l'incidence de la tuberculose extra pulmonaire (TEP) déclarée augmente rapidement dépassant de loin celle de la source de la maladie (TP) ces dernières années. En 2018, le nombre de cas de tuberculose enregistrés est 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 et 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 (Alihalassa, 2018).

3. Facteurs de risque

Les facteurs expliquant la disparité de la distribution des cas de tuberculose sont multiples. Plusieurs ont été identifiés et peuvent être classés en trois catégories : les facteurs sociaux et comportementaux, les facteurs physiologiques et génétiques et les facteurs liés à une immunosuppression (figure03) (Cécile ; 2012).

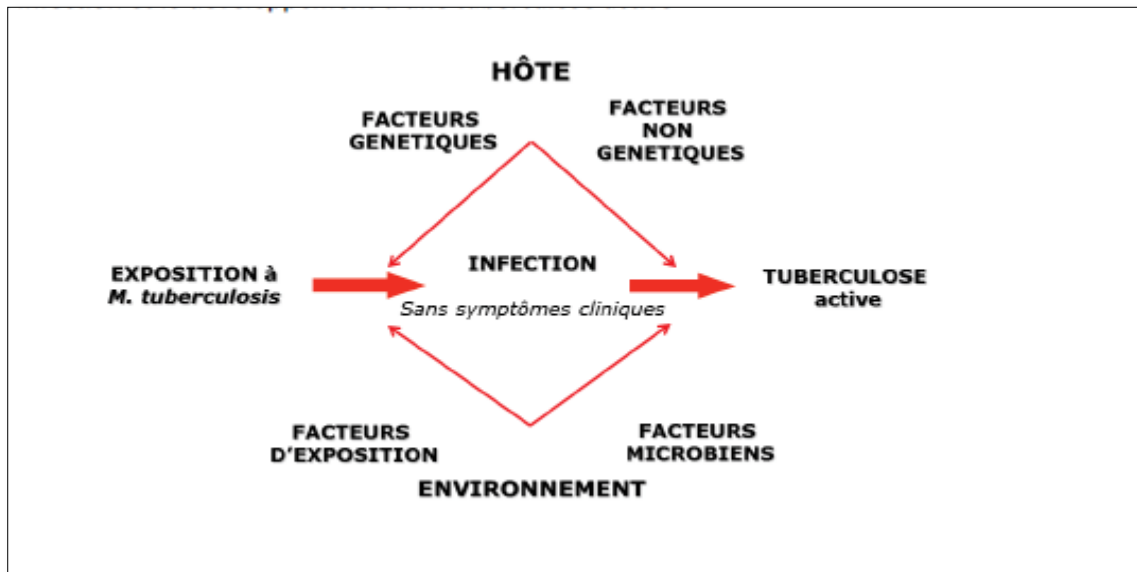


Figure 03 : Schéma général des facteurs modulant le risque de passage de l'exposition à L'infection et le développement d'une tuberculose active (Fabienne ; 2017).

3.1. Facteurs sociaux et comportementaux

La pauvreté et la surpopulation font partie des principaux facteurs de risque. En effet, la malnutrition et des conditions de vie insalubres qui leur sont liées sont propices au développement de la maladie. En effet, la malnutrition cause une diminution de l'efficacité des défenses immunitaires et il a été observé une forte prévalence de maladies infectieuses chez les personnes souffrant de malnutrition. Cependant, il faut tenir compte du fait que la tuberculose provoque une perte de poids, une déficience du système immunitaire et autres signes s'apparentant à une malnutrition, et lors des études, il est impossible de déterminer l'état nutritionnel dans lequel se trouvait le patient avant le développement de la maladie.

D'autres facteurs émergents, comme le tabac, l'alcool et la consommation de drogues, sont également liés à une susceptibilité accrue à la tuberculose. Ainsi fumer, être fumeur passif ou être exposé à la pollution de l'air, altère les fonctions immunitaires au niveau des poumons, en inhibant les fonctions des macrophages et des lymphocytes, mais provoque aussi un stress oxydatif qui diminue la capacité à contrôler une infection et détruit des tissus importants pour la clairance des pathogènes (**Bottela ; 2011**).

3.2. Facteurs physiologiques et génétiques

Au niveau mondial, il y a deux fois plus d'hommes adultes atteints de tuberculose que de femmes. Cette disparité aurait des origines hormonales, génétiques et métaboliques. L'épidémie de tuberculose est également variable en fonction de l'âge. A l'échelle mondiale, 75 % des cas sont des adultes ayant entre 15 et 59 ans. Deux populations sont particulièrement touchées : les moins de 4 ans et les 20-30 ans. La forte incidence de la maladie chez les jeunes enfants semble liée à l'immaturation de leur système immunitaire. Des facteurs génétiques humains semblent également être impliqués dans la sensibilité ou la résistance à la tuberculose. Par exemple, le polymorphisme des gènes NRAMP1 (Natural Resistance-Associated Macrophage Protein) ou TLR8 (Toll-Like Receptor 8) a été associé à une variation de la sensibilité face à tuberculose. Enfin, le diabète insulino-dépendant favorise le développement de la tuberculose, le décès des suites de la maladie et le risque de rechute (**Cécile ; 2012**).

3.3. Facteurs liés à une immunosuppression

La co-infection avec le VIH est le facteur le plus influent de l'épidémie de tuberculose. La suppression du système immunitaire causée par le VIH augmente le risque de réactivation d'une infection tuberculeuse latente et favorise la progression rapide vers une tuberculose Active. D'après l'OMS, le risque de développer une tuberculose est 27 fois plus élevé chez les personnes infectées par le VIH que chez les individus séronégatifs. L'affaiblissement local ou systémique du système immunitaire causé par le cancer et par les chimiothérapies anticancéreuses augmente également le risque de développer une tuberculose.

Le traitement des maladies inflammatoires chroniques telles que la polyarthrite rhumatoïde fait appel à l'utilisation d'inhibiteurs du TNF α (Tumor Necrosis Factor alpha), un régulateur crucial de la prolifération, de la survie, de la différenciation et de l'apoptose des cellules du système immunitaire.

Dans le cadre de la tuberculose, le TNF α permet l'activation des macrophages, le recrutement des cellules immunitaires, la formation et le maintien du granulome, structure cellulaire caractéristique de la maladie. La prise d'antagonistes du TNF α accroît les risques de développer une tuberculose active suite à une infection récente ou ancienne. La prise en compte de ces différents facteurs de risque est primordiale pour l'apport de traitements adaptés. Cependant, pour lutter efficacement contre la maladie, la compréhension de la physiologie et des mécanismes de virulence du bacille tuberculeux est également essentielle (Cécile ; 2012).

4. Aspect clinique de la tuberculose :

L'infection tuberculeuse résulte de la première pénétration du bacille tuberculeux dans un organisme indemne de tout contact antérieur. Le seul signe de l'infection tuberculeuse est la réaction tuberculinique ou la sensibilisation des lymphocytes. L'atteinte pulmonaire est la plus fréquente et représente 80 % des localisations tuberculeuses, c'est pratiquement la seule localisation qui représente la source habituelle de transmission de la tuberculose (**figure04**). À partir de la localisation pulmonaire initiale, le bacille tuberculeux se multiplie et gagne d'autres parties du corps via le système sanguin, le système lymphatique, les voies aériennes, ou par propagation directe à d'autres organes (**Aït-Khaled et al ; 2010**).

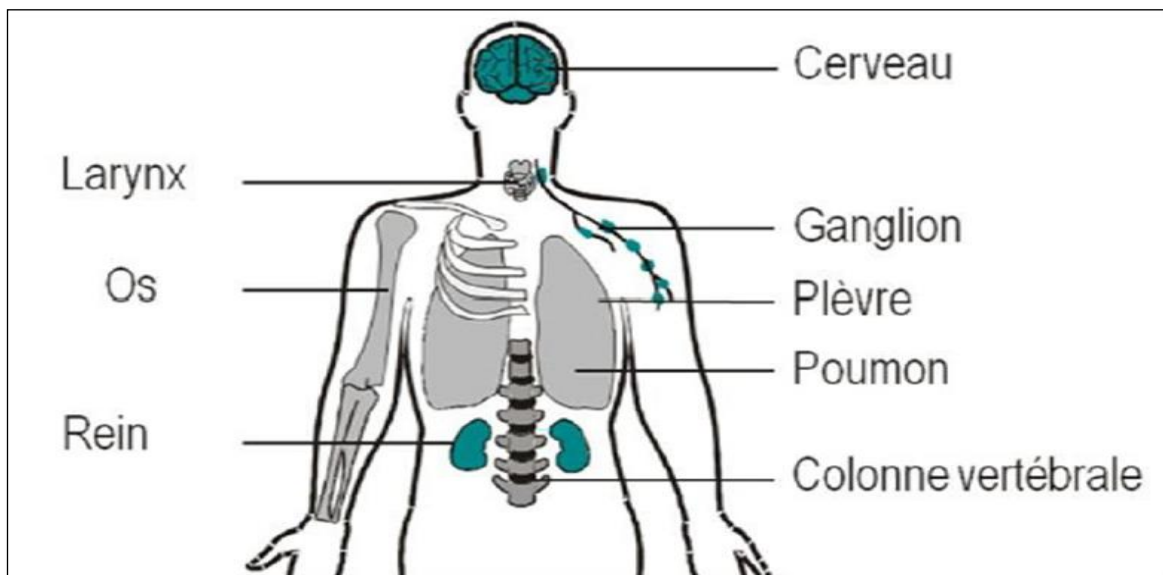


Figure04 : Localisations anatomiques les plus fréquentes du bacille tuberculeux après dissémination (**Mazza ; 2012**).

4.1. Primo-infection tuberculeuse :

La primo-infection tuberculeuse est souvent asymptomatique. Elle peut aussi conduire à une discrète altération de l'état général avec fièvre modérée et asthénie. Une pleurésie séro-fibrineuse, un érythème noueux ou une kérato-conjonctivite phlycténulaire sont plus rarement observés. Le diagnostic de la tuberculose latente, persistance de *M. tuberculosis* complexe après la primo-infection, repose sur l'élimination du diagnostic de tuberculose active par un interrogatoire précis, un examen clinique rigoureux et une radiographie du thorax. Si le premier contact avec l'agent infectieux se fait sur un terrain débilité (immunodépression liée à l'infection par le VIH par exemple), ou chez un sujet âgé, l'évolution peut se faire d'emblée vers une pneumonie avec lésion excavée et dissémination par voie bronchogène la dissémination par voie sanguine et lymphatique est aussi possible. Elle conduit à la miliaire tuberculeuse (**Billy et Perronne ; 2014**).

4.2. Tuberculose pulmonaire (TBP) :

Il s'agit de la forme la plus fréquente de tuberculose maladie et l'apparition des symptômes de tuberculose pulmonaire est progressive. Les patients atteints présentent souvent des signes généraux non spécifiques, tels qu'une asthénie, un amaigrissement, une dyspnée, une toux prolongée. D'autres signes peuvent être plus évocateurs, tels qu'une fièvre vespérale, généralement modérée, associée de façon fréquente à des sueurs nocturnes. La toux peut être accompagnée d'hémoptysies, permettant alors un diagnostic plus rapide car inquiétant le patient, on peut aussi observer dans certains cas une expectoration muco-purulente, fortement évocatrice. Il est parfois décrit des tableaux de douleurs thoraciques, lors des cas d'atteinte avec épanchement pleural ou pneumothorax. Les signes généraux non spécifiques peuvent conduire à un retard de diagnostic, préjudiciable pour le patient comme pour son entourage car le risque de contamination est élevé (**Olivia ; 2017**).

4.3. Tuberculose extra-pulmonaire (TBEP) :

Elle représente environ 25 % des cas déclarés. Elles peuvent être associées ou non aux formes pulmonaires. L'infection des différents organes par voie hématogène, lymphatique ou aérienne, peut se traduire par une localisation prédominante alors que le foyer initial a déjà disparu. Le diagnostic repose sur l'isolement de *M. tuberculosis* complexe sur les prélèvements, ou sur l'anatomie pathologique (**Bouheraoua, 2013**).

4.3.1. Tuberculose ganglionnaire :

Cette forme est la plus fréquente des tuberculoses extra-pulmonaires. Les localisations ganglionnaires représentent entre 30 et 60 % de l'ensemble des TEP. Les ganglions cervicaux sont, de loin, les plus fréquemment atteints à un stade précoce, les adénopathies tuberculeuses sont indolores, fermes et mobiles par rapport aux plans profond et superficiel. Au bout de quelques semaines, elles se ramollissent puis se fistulisent parfois à la peau, fistulisation qui cicatrise difficilement. La tuberculose ganglionnaire chez les patients séropositifs pour le VIH est caractérisée par des formes plus disséminées avec atteintes ganglionnaires profondes, abdominales en particulier. L'aspiration du ganglion à l'aiguille fine est peu rentable pour le diagnostic. La biopsie exérèse permet mieux d'isoler le BK et d'objectiver une histologie évocatrice. (Billy et Perronne ; 2014).

4.3.2. Tuberculose osseuse :

La plus fréquente des localisations ostéoarticulaires est la spondylodiscite tuberculeuse, ou mal de Pott. Elle se manifeste par une atteinte vertébrale et discale avec formation d'abcès froids para-vertébraux. Ils peuvent entraîner des déformations rachidiennes, des tassements, ainsi que des compressions médullaires. Des ostéoarthrites peuvent aussi toucher les structures périphériques. Dans la majorité des cas, la présentation sera celle d'une mono-arthrite chronique. Elle atteint la hanche ou le genou. Des abcès froids peuvent se développer au contact de l'articulation et se fistuliser. Des formes avec coïnfection par des germes banals existent. Elles permettent parfois de révéler l'infection tuberculeuse. L'infection tuberculeuse d'une articulation sur une pathologie préexistante (arthropathie microcristalline, arthrite inflammatoire, etc.) peut rendre le diagnostic difficile et le traitement, principalement médical, est toujours prolongé (Billy et Perronne ; 2014).

4.3.3. Atteinte tuberculeuse des séreuses :

L'atteinte pleurale ou péricardique se fait par suffusion de contiguïté. Les péricardites et pleurésies tuberculeuses sont classiquement décrites dans les semaines ou mois suivant la primo-infection. Ces atteintes séreuses peuvent accompagner une tuberculose pulmonaire active voire une miliaire. L'épanchement pleural est en général de faible abondance. Il se caractérise par un exsudat lymphocytaire, parfois hématique. *M. tuberculosis* complexe est isolé dans 30 % des analyses pleurales. Une biopsie pleurale peut mettre en évidence des granulomes. Elle permet alors l'isolement de l'agent infectieux. La péritonite tuberculeuse résulte soit de la contiguïté avec un organe infecté (ganglion, intestin, trompe), soit de la dissémination

d'une forme miliaire. Le liquide d'ascite est un exsudat le plus souvent lymphocytaire (**Billy et Perronne ; 2014**).

4.3.4. Tuberculose neuroméningée :

La méningite tuberculeuse se présente sous la forme d'une méningite isolée. L'installation est en général progressive sur quelques semaines ou associée à des signes neurologiques focaux, évocateurs de rhombencéphalite. Le début est souvent insidieux, avec anorexie, fièvre, amaigrissement, vomissements et céphalées. Des troubles du comportement (irritabilité, apathie) peuvent aussi s'observer. Ils sont parfois les seules manifestations cliniques identifiables. À un stade plus tardif apparaissent les troubles neurologiques, à type de convulsions, troubles de conscience, ou encore paralysies oculomotrices. Une sécrétion inappropriée de l'hormone antidiurétique à l'origine d'une hyponatrémie est souvent observée. L'orientation diagnostique est principalement donnée par l'analyse du liquide céphalorachidien (LCR). Le LCR est souvent lymphocytaire, avec hypoglycorachie et hyperprotéinorachie franche. L'isolement de *M. tuberculosis* complexe sur la ponction est rare. Il est nécessaire de prélever un volume de LCR plus important que lors des ponctions usuelles. Une imagerie cérébrale par tomodensitométrie ou résonance magnétique doit être systématique des tuberculomes intra-parenchymateux peuvent majorer les troubles neurologiques ou psychiatriques. Ils peuvent se manifester par des crises comitiales (**Billy et Perronne ; 2014**).

4.3.5. Tuberculose urogénitale :

Une tuberculose rénale peut survenir dans n'importe quel type de tuberculose. Il est souvent retrouvé une localisation pulmonaire associée. Elle peut être latente. Une leucocyturie aseptique est évocatrice. L'urographie objective des lésions d'importance croissante selon l'ancienneté de l'infection. La recherche de *M. tuberculosis* complexe dans les urines mises en culture trois matins consécutifs, permet en général le diagnostic. Une corticothérapie associée au traitement antibiotique peut s'avérer nécessaire en cas d'obstruction. En cas d'échec ou de complication, le traitement sera éventuellement complété par une chirurgie. Chez l'homme, une atteinte génitale est fréquemment associée à l'atteinte rénale. La prostate, les vésicules séminales, les épидидymes et les testicules peuvent être atteints et chez la femme, une salpingite est en général inaugurale de la tuberculose génitale. Elle peut s'étendre aux autres organes génitaux et occasionner une stérilité (**Billy et Perronne ; 2014**).

4.3.6. Tuberculose digestive :

La contamination du tube digestif se fait par déglutition de sécrétions contaminées. L'ensemble du tube digestif peut être atteint de la bouche à l'anus, avec des lésions pouvant aller de l'ulcération à la masse pseudotumorale. La maladie peut évoluer vers l'hémorragie, l'obstruction, la fistulisation, la perforation et causer des troubles sévères de mal absorption (**Bouheraoua ; 2013**).

4.3.7. Formes rares de tuberculose :

La tuberculose laryngée est une forme rare et hautement contagieuse. Elle peut se présenter sous toutes les formes, du simple érythème jusqu'à l'ulcération, voire sous un aspect de masse bourgeonnante pseudotumorale. L'otite tuberculeuse est rare son diagnostic est souvent manqué devant l'absence de manifestation spécifique (otorrhée indolore, perforation tympanique). L'infection évolue souvent vers une hypoacousie sévère, une nécrose de l'os mastoïde et une paralysie faciale.

Une atteinte des glandes surrénales peut provoquer une hypertrophie des glandes avec ou sans calcifications. Elle est responsable d'une insuffisance surrénale d'aggravation lente. Différentes atteintes tuberculeuses oculaires ont été décrites. Un examen ophtalmologique devrait être systématique devant toute tuberculose à la recherche de tubercules de bouchut rétinien. Ils sont parfois retrouvés lors d'une épisclérite, d'une uvéite, ou d'une miliaire. Des lésions tuberculeuses cutanées ont été décrites, surtout par le passé. Elles peuvent être causées par une inoculation exogène, l'extension d'une lésion adjacente (ganglionnaire, osseuse), ou une dissémination par voie hématogène. La variabilité de ces lésions, nodulaires ou ulcérées, doit inciter à rechercher une mycobactérie, en particulier en cas d'absence d'étiologie claire ou d'infection par le VIH (**Bouheraoua ; 2013**).

4.4. Tuberculose disséminée ou miliaire :

La tuberculose miliaire est une forme particulièrement grave de tuberculose, mortelle en l'absence de traitement. Elle est liée à une dissémination du BK par voie lymphatique ou hématogène, et peut survenir lors de la primo infection tuberculeuse, ou lors d'une tuberculose chronique. Son diagnostic est difficile, avec une symptomatologie non spécifique et trompeuse. Elle survient surtout chez des patients affaiblis (âges extrêmes, co-infection par le VIH, immunodépression...). La radiographie pulmonaire est typique et retrouve de multiples micronodules diffus, bilatéraux, d'aspect décrit « en grain de mil ».

Au niveau biologique, il est très fréquent de rencontrer une pancytopenie liée à l'infiltration médullaire du BK. Cette pancytopenie et l'immunodépression qui en résulte causent une anergie tuberculinique. La recherche de BAAR en examen direct n'est positive que dans 30% des cas, et les mises en culture dans 50 à 80% des cas.

Une dissémination doit systématiquement être recherchée, permettant de confirmer le diagnostic, mais aussi dans un objectif pronostic. Les atteintes hépatiques et ophtalmologiques (tubercule de Bouchut) sont fréquentes, mais les reins, la rate, les méninges, les os et le péricarde peuvent aussi être touchés, avec l'apparition de granulomes miliaires (**Olivia, 2017**).



Chapitre02 :

Mycobacterium tuberculosis

Épidémiologie et génétique



1. Agent responsable *Mycobacterium tuberculosis* :

1.1. Le genre *Mycobacterium* :

Sur le plan taxonomique, les mycobactéries appartiennent à l'ordre des Actinomycétales et en Particulier à la famille des *Mycobacteriaceae* qui ne comprend qu'un seul genre : le genre *Mycobacterium*. Celui-ci regroupe plus de 70 espèces parmi lesquelles *Mycobacterium tuberculosis*, agent de la tuberculose. Le genre *Mycobacterium* présente une propriété tinctoriale essentielle : l'acido-alcool-résistance. Toutefois, cette propriété peut concerner également d'autres bactéries comme certaines Corynebactéries et quelques Actinomycètes, parmi lesquels les Nocardia.

1.2. Les critères de *Mycobacterium* :

Le genre *Mycobacterium* est défini par 3 critères : **(Vincent et Portaels ; 1992)**

- L'acido-alcool-résistance :

Cette propriété est liée à la richesse de la paroi bactérienne en lipides et entraîne une imperméabilité aux colorants usuels ainsi qu'une résistance à la décoloration par un traitement acide/alcool. En revanche, la paroi fixe de façon intense les colorants alcalins tels que la fuchsine basique. La coloration de Ziehl-Neelsen, basée sur cette propriété, est utilisée pour la réalisation de l'examen microscopique.

- La composition en acides mycoliques :

Ces acides gras insaturés à longue chaîne carbonée (C₆₀ à C₉₀) sont le support de l'acido-alcool-résistance et constituent un critère taxonomique de choix car leur structure varie selon les espèces bactériennes.

- Le contenu de l'ADN en Guanine et Cytosine :

Le GC% des mycobactéries est compris entre 61 et 71%, à l'exception de *Mycobacterium leprae* dont le GC% est compris entre 54 et 57%. Ce pourcentage élevé explique que les 2 brins d'ADN soient fortement liés et impose des conditions techniques particulières lorsqu'il faut rompre les 3 liaisons hydrogènes **(Deschaseaux. ; 2005)**

1.3. Classification :

Le genre *Mycobacterium* rassemble plus de 80 espèces qui sont réparties en 3 groupes classés en fonction de leur pouvoir pathogène :

- Le complexe *tuberculosis* regroupe les espèces *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium canetti* et *Mycobacterium microti*.
- *Mycobacterium tuberculosis* : est responsable de la tuberculose humaine et son pouvoir pathogène sera détaillé plus tard.
- *Mycobacterium bovis* : provoque chez les bovins des lésions tuberculeuses pulmonaires des lésions des glandes mammaires. Il peut être pathogène pour tous les mammifères et également pour l'homme qui se contamine à partir du réservoir animal par inhalation de particules infectées, notamment dans les étables.
- *Mycobacterium africanum* : est responsable de tuberculoses humaines en Afrique, est plus rare en Europe.
- *Mycobacterium microti* : est une espèce très peu pathogène pour l'homme qui infecte les rongeurs et les bovins (**Frota et al ; 2004**).
- *Mycobacterium canetti* : est rarement responsable de tuberculose, ces cas ont été décrits en Afrique.
- *Les mycobactéries atypiques*. Cultivables *in vitro*, elles n'ont pas de pouvoir pathogène par injection sous-cutanée chez le cobaye. La plupart sont des espèces saprophytes. Certaines, considérées comme des bactéries opportunistes, peuvent occasionnellement être à l'origine d'infections humaines appelées mycobactérioses. Elles ne manifestent un pouvoir pathogène qu'à la faveur d'une défaillance des défenses de l'hôte (immunodépression, VIH). C'est notamment le cas de *Mycobacterium avium* intracellulaire, *Mycobacterium kansasii* ou *Mycobacterium xenopi*.

Certaines mycobactéries atypiques sont des espèces pathogènes: *Mycobacterium ulcerans* est la seule mycobactérie à posséder une toxine et *Mycobacterium marinum* présente un pouvoir pathogène cutané.

Les mycobactéries atypiques ont été classées en 4 groupes par Runyon en 1959 en fonction de leur délai de croissance et de l'aspect des colonies en culture.

- Les mycobactéries responsables de la lèpre de l'homme et du rat, *Mycobacterium leprae* et *Mycobacterium lepraemurium* sont des espèces non cultivables (**Deschaseaux., 2005**).

1.4. Habitat :

Les mycobactéries du groupe tuberculeux se rencontrent chez des hôtes animaux tandis que le réservoir de *Mycobacterium leprae* est uniquement humain. Le réservoir de *Mycobacterium tuberculosis* est représenté par l'homme atteint de tuberculose qui peut contaminer son entourage par les crachats, l'émission de gouttelettes de Pflügge. Les mycobactéries atypiques quant à elles se trouvent dans l'environnement hydro-tellurique et contaminent l'homme de façon indirecte (Deschaseaux ; 2005).

2. *Mycobacterium tuberculosis* :

M.tuberculosis est un parasite strict de l'espèce humaine. La transmission interhumaine est habituellement directe et se fait par voie aérienne. Les animaux familiers de l'homme peuvent occasionnellement être contaminés. (Pierre et Curie ; 2003). *M. tuberculosis* est un bacille fin, légèrement incurvé, de 2 à 5µm de longueur sur 0,2 à 0,3µm de largeur. Ses extrémités sont arrondies. Il est immobile, capsulé, sporulé et se présente en petits amas ou sous forme isolée, aérobie intra et extracellulaire (Figure05). Il est très sensible à certains agents physiques : chaleur, lumière solaire, rayons X ou UV. Il résiste bien au froid et à la dessiccation et peut demeurer vivant plusieurs jours dans des produits contaminés tels que des produits d'expectoration. Il est peu sensible à des nombreux agents tels que les acides et bases dilués, en revanche, il est tué rapidement par l'alcool dilué. IL n'est pas colorable par les colorants usuels, mais est coloré par la fuchsine phéniquée à chaud selon la méthode de Ziehl-neelsen. Il retient le colorant malgré l'action combinée des acides dilués et de l'alcool (Acido-alcool-résistance) et apparaît alors comme un fin bâtonnet rouge. Coloré par l'auramine phéniquée, il devient fluorescent sous l'influence de la lumière UV.

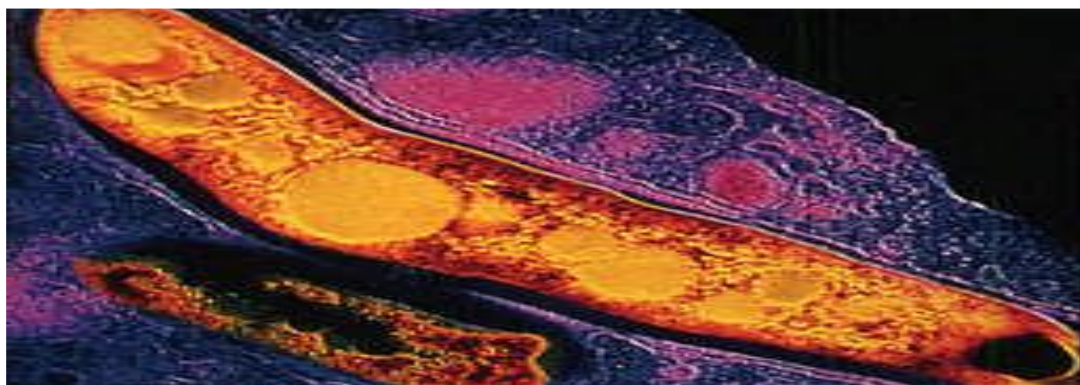


Figure 05 : Structure d'une mycobactérie tuberculeuse au microscope électronique (Koumba, 2010).

3. Epidémiologie génétique :

Le typage moléculaire, c'est à dire l'analyse génétique des souches bactériennes isolées chez les patients, permet de mettre en évidence les patients porteurs de la même souche clonale, cette information est importante puisque la mise en évidence de nombreux clones identiques (donc partiellement issus d'une même bactérie mère) chez des patients, peut être le reflet d'une épidémie.

3.1. Génome des souches du complexe *M. tuberculosis* :

Le génome de la souche de référence *M. tuberculosis* H37Rv, premier génome mycobactérien à avoir été séquencé, est constitué de 4 411 529 pb, dont 3989 gènes, et se caractérise par un contenu en guanine et cytosine (G+C) élevé estimé à 65.6%. La relative homogénéité du pourcentage de G+C sur l'ensemble du génome de la souche de référence H37Rv laisse supposer que le phénomène de transfert horizontal de matériel génétique est quasi-absent chez *M. tuberculosis*. Par ailleurs, le transfert horizontal de gène n'a probablement pas été à l'origine des propriétés de pathogénicité développées par le bacille tuberculeux puisqu'aucun des gènes localisés dans les régions du génome présentant des variations significatives de densité de G+C n'a été identifié comme gène de virulence. Parmi les régions présentant une variation significative de la teneur en G+C, un groupe de gènes spécifique aux mycobactéries, à très fort pourcentage de G+C (>80%), et codant pour les protéines PE ou PPE a été identifié. A l'inverse quelques gènes à relativement faible pourcentage de G+C (<50%) ont été identifiés codant pour des protéines transmembranaires ou des polykétide synthèses. La distribution des gènes sur les 2 brins constitutifs de l'ADN chez *M. tuberculosis*, 59% des gènes sont transcrits avec la même polarité ce qui correspond à une distribution relativement homogène des gènes codants sur les 2 brins d'ADN et pourrait être un facteur contribuant au faible taux de croissance des bacilles tuberculeux Par ailleurs, il n'a été détecté qu'un seul opéron codant pour l'ARN ribosomal lequel est situé à 1,5Mpb du locus initiant la réplication ou locus *oriC* ce qui est plus élevé que la distance observée chez les autres eubactéries et pourrait là encore être un facteur intervenant dans le faible taux de réplication des bacilles tuberculeux (Cole ; 1999).

Deux prophages ont été détectés dans le génome de la souche de référence H37Rv identiques en taille et en structure, PhiRv1 et PhiRv2, bien que PhiRv1, avec 7 sites potentiels

d'insertion identifiés chez H37Rv et une séquence tronquée ou réarrangée chez les autres souches de *M. tuberculosis*, présente une plus grande variabilité que PhiRv2 (Cole ; 1999). Chaque séquence codante identifiée est numérotée par ordre d'apparition sur le génome et se voit attribuer un numéro Rv. En 2002, une mise à jour des annotations du génome de la souche de référence H37Rv a permis l'identification de 82 nouveaux gènes sans pour autant modifier les numéros de Rv préalablement attribués. En effet, des lettres ont été attribuées aux numéros préalablement existants (par exemple Rv3724a, Rv3724b, et Rv3724d) afin d'intégrer les nouveaux gènes identifiés à la nomenclature en place. (Figure06) (<http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>)

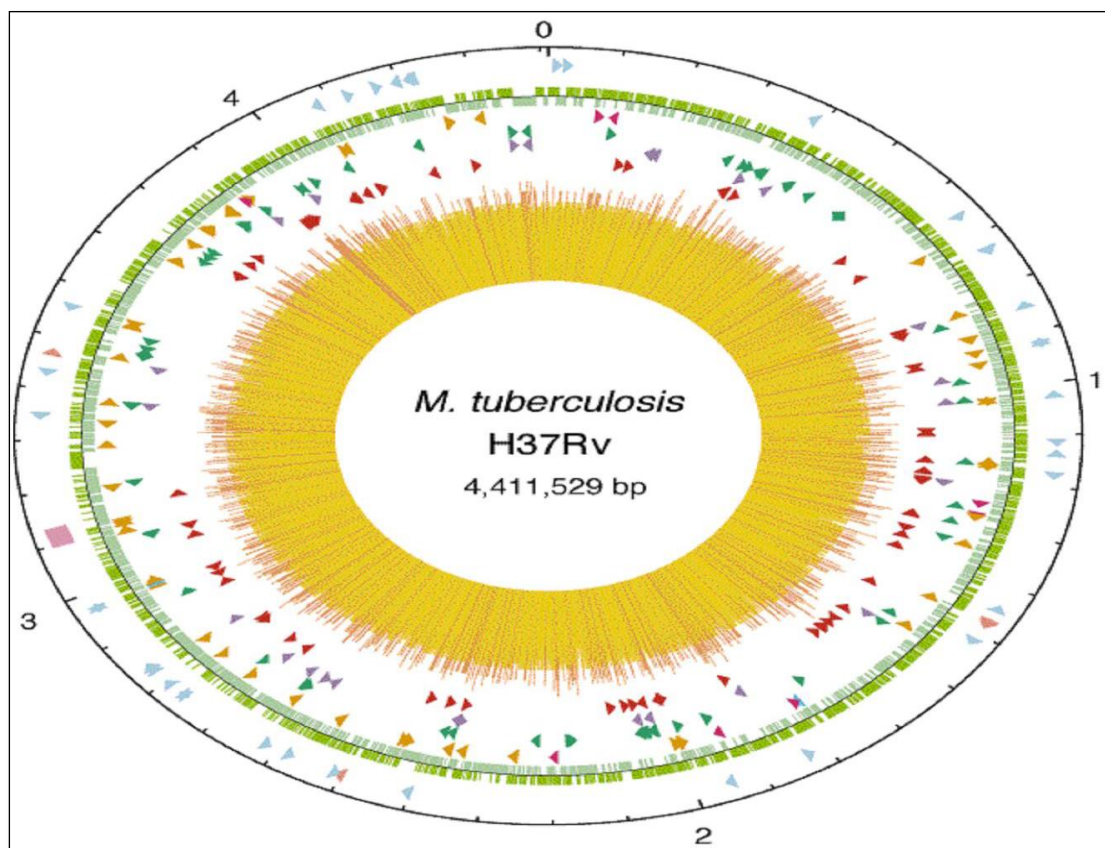


Figure 06 : Représentation du génome de *M. tuberculosis* H37Rv (Noël ; 2017).

Le cercle extérieur indique l'échelle de Mb, 0 représentant l'origine de réplication. Le premier anneau de l'extérieur indique les positions des gènes de l'ARN stables (les ARNt sont bleus, et les autres sont de couleur rose) et la région de répétition directe (cube rose); les entrailles du second anneau montrent la séquence codante par brin (sens horaire, vert foncé; antihoraire, vert clair), le troisième anneau représente l'ADN répétitif (séquences d'insertion,

orange, famille REP13E12, rose foncé; prophage, bleu), le quatrième anneau montre les positions des membres de la famille PPE (vert), le cinquième anneau montre la famille PE les membres (violet, à l'exclusion PGRS), et le sixième cycle montre les positions de l' PGRS séquences (rouge foncé). L'histogramme (au centre) représente G + C, avec <65% G + C en jaune, et> 65% G + C en rouge. Elle a été produite avec le logiciel de DNASTAR.

3.2. Caractéristiques génétiques :

Le génome de *Mycobacterium tuberculosis* a été entièrement séquencé en 1998. Elle possède un chromosome circulaire de 4 411 529 paires de bases pour 3 924 gènes. Un gène particulier semble essentiel au pouvoir pathogène chez l'homme, gène absent chez le BCG et *Mycobacterium microti*. Il s'agit d'un gène codant une protéine *ESAT-63*, sécrétée par la bactérie et déclenchant une forte production d'IFN-Gamma (une cytokine).

Le génome de *M.tuberculosis* est riche en séquences répétées d'ADN, en particulier en séquence d'insertion IS6110, spécifiques du complexe *M. tuberculosis*. La position et le nombre de ces séquences sur le génome sont stables pour une souche donnée, mais variables d'une souche à l'autre. Cette particularité a été mise à profit pour développer l'analyse RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) du génome des souches de bacilles tuberculeux, utile dans le cadre d'enquêtes épidémiologiques nécessitant la comparaison des souches (**Meyssonier ; 2012**). Les mycobactéries possèdent un CG % très élevé comme tous les actinomycétales. Il est compris entre 61 et 71%, sauf pour *M. leprae* (54 à 57 %) (**Panteix ; 2007**)

3.2.1. Nombre de copies du gène codant pour l'ARN 16S ribosomal :

Les mycobactéries ont peu de copies du gène codant pour l'ARN ribosomal appelé ADNr. Le nombre de copies varie d'un à deux selon qu'il s'agisse de mycobactéries dites à croissance lente d'une part et de mycobactéries à croissance rapide d'autre part (**Bercovier et al ; 1986**). Les mycobactéries à croissance lente possèdent de plus un branchement majeur en hélice mis en évidence par séquençage de l'ADN r (**Stahl et Urbance ; 1990**)

3.3. Identification génotypique :

Des séquences d'ADN spécifiques sont répétées en plusieurs endroits du chromosome (IS6110...) ont été isolées. Leur hybridation avec des sondes d'ADN permet de caractériser les souches isolées et fournit ainsi un outil précieux à l'étude épidémiologique de la tuberculose (empreinte digitale génomique) (**Panteix ; 2007**).

3.3.1. Génotypage :

Le génotypage des souches de *M. tuberculosis* s'est appuyé sur trois marqueurs moléculaires principaux :

✓ L'élément d'insertion IS6110 présent en nombre et en position variable selon les souches de *M. tuberculosis*,

✓ Le locus DR et notamment la détection de la présence ou de l'absence de séquences inter-DR uniques et séparées les unes des autres par des séquences DR répétées et invariables.

✓ Les minisatellites, séquences répétées en tandem, dispersées dans les régions inter géniques et dont le nombre de séquences répétées par locus est variable d'une souche à l'autre (Julie; 2011).

4. Les méthodes de génotypage de *Mycobactérium tubrculosis* :

L'analyse du génome de *Mycobacterium tuberculosis* a parmi la mise au point de différentes techniques de typage moléculaire, celle-ci permettent de comparer les souches de *Mycobacterium tuberculosis* ,elles sont plus ou moins rapide ,simples d'exécution ,et discriminantes .d'un point de vue de santé publique, l'objectif des analyses moléculaires est d'étudier les relation entre les différents cas de tuberculose , afin de mieux connaitre la transmission de la maladie et d'identifier des facteurs de risque de transmission active non détectés par les méthodes épidémiologiques conventionnelles. Ces méthodes sont utilisées en complément des enquêtes épidémiologique classique qui conservent tout leur intérêt (Deschaseaux ; 2005).

4.1. La technique RFLP :

Cette technique utilise des enzymes de restriction pour découper l'ADN chromosomal en un certain nombre de fragments de restriction, la technique d'amplification PCR de certaines régions cibles de l'ADN ou de l'ARN de *M. tuberculosis*. La technique repose sur l'analyse du nombre et de la position des copies d'IS6110, variables d'un isolat a l'autre et reflété par un polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) après clivage de l'ADN génomique au moyen de l'enzyme *PvuII*. La technique IS6110RFLP standardisée est actuellement la méthode de référence pour le typage des isolats du complexe *M.tuberculosis* (Guernier ; 2006).

4.2. Spoligotyping: Spacer Oligotyping :

Cette méthode de typage rapide repose sur la détection du polymorphisme des séquences situées entre les éléments répétés identiques de la région DR (Direct Repeat). Cette région DR est une région unique qui contient des répétitions directes de 36 paires de bases séparées par des séquences variables de 35 à 41 paires de bases. Elle n'est présente que chez les *Mycobactéries tuberculeuses*. Ces séquences inter-DR varient d'une souche à l'autre par leur longueur, leur séquence et leur nombre. La technique consiste à amplifier la région DR Puis à l'hybrider à une membrane sur laquelle sont fixées de façon covalente les 43 séquences inter-DR les plus fréquents. Le spoligotyping est une technique facile, rapide et comprend une amplification, cette technique ne nécessite donc pas une culture abondante, contrairement à la RFLP. De plus, elle est reproductible et la membrane peut être réutilisée. En revanche, certaines séquences peuvent manquer et perturber la phase de révélation. Par ailleurs, le résultat obtenu n'est pas toujours de très bonne qualité et dépend des conditions techniques (Lavages, témoin à vérifier, région mal amplifiée, phase de révélation tributaire du fabricant...) (**Figure04**). Le spoligotyping a un pouvoir discriminant plus élevé que la RFLP IS6110 pour les souches à faible nombre de copies d'IS6110, mais la méthode de référence RFLPIS6110 est plus performante pour les souches à plus de 5 copies, ce qui représente la majorité des cas (**Deschaseaux ; 2005**).

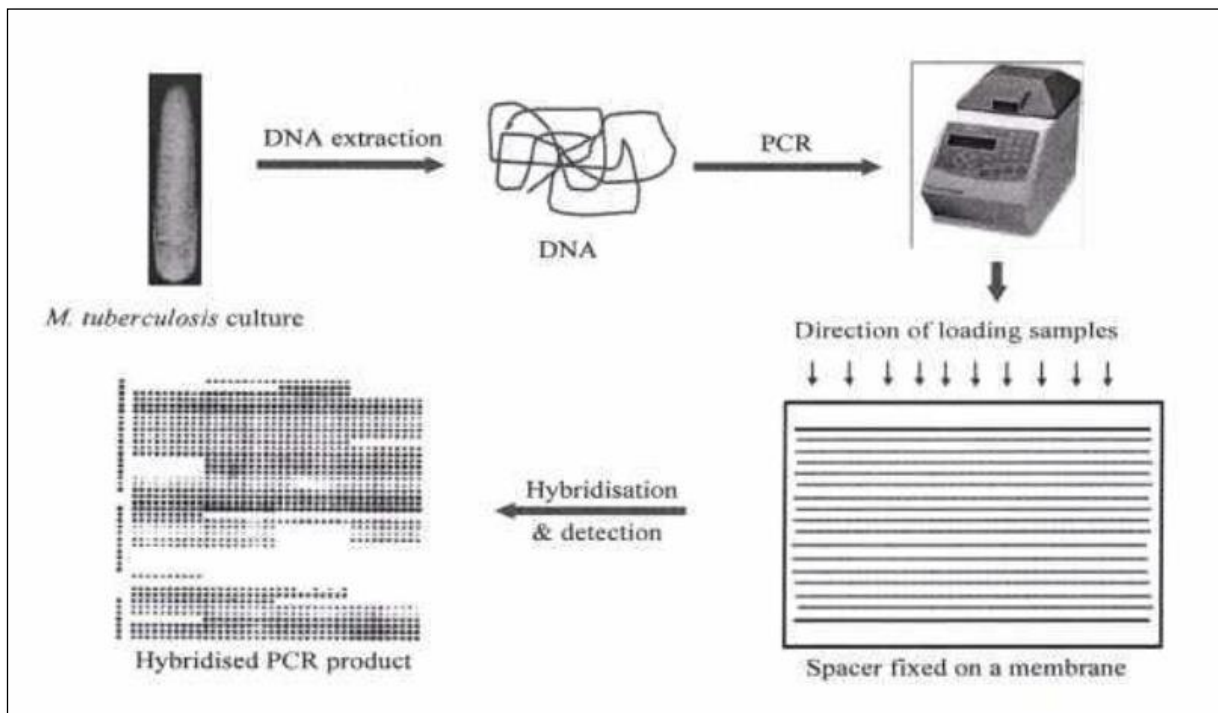


Figure 07 : la procédure et les étapes de la technique spoligotyping (**Guernier ;2006**).

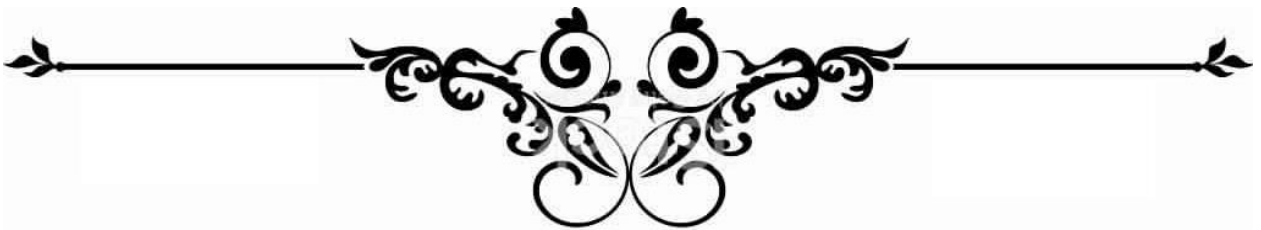
4.3. Les MIRU-VNTR

La méthode du MIRU-VNTR repose sur l'identification du nombre de copies des unités répétées en tandem des locus VNTR. Pour cela, chaque locus MIRU est amplifié par des amorces flanquantes. 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. Les profils MIRU obtenus sont formés de la suite des chiffres concaténés correspondant chacun aux nombres de copies des unités répétées de chaque locus étudié (Noël ; 2017).



Chapitre03 :

Diagnostic et traitement



1. Diagnostic de la tuberculose :

1-1 Diagnostic clinique :

Le diagnostic clinique de la TB consiste à observer les manifestations de la maladie tuberculeuse chez le malade. Certaines comme la toux persistante de plus de 14 jours consécutifs au moins associée à une perte de poids sont des signes évocateurs tandis que, d'autres symptômes tels que la fatigue généralisée, les sueurs nocturnes et les douleurs thoraciques viennent renforcer encore plus la présomption d'une TBP active. Cependant les personnes ayant une TB latente ne présentent pas ces manifestations cliniques et restent à risque de développer une tuberculose maladie au cours de leur vie (**Kevin et Alame ; 2016**).

1.1.1. L'intradermo-réaction (IDR) :

Le test de Mantoux, ou intradermoréaction à la tuberculine, est un examen cutané. Il explore la réaction d'hypersensibilité retardée induite par les antigènes mycobactériens (*M. tuberculosis* complex, BCG et certaines *mycobactéries atypiques*). C'est le seul test réellement quantitatif il consiste en l'injection intradermique de 0,1 ml de la solution de tuberculine à 10 unités au niveau de la face antérieure de l'avant-bras ou préférentiellement à la face externe du deltoïde. L'injection doit être strictement intradermique et exsangue. La réalisation d'une papule "en peau d'orange" affirme le caractère intradermique de l'injection. La lecture se fait à partir de la 72^{ème} heure avec mesure de la zone d'induration, bien qu'elle puisse être différée jusqu'au 5^{ème} jour chez les sujets âgés pour lesquels la réaction peut se développer plus lentement (**figure 08**) (**Majdaoui, 2016**).



Figure 08: Inoculation de la tuberculine par voie intradermique à la face antérieure de l'avant-bras (**Gopi ; 2007**).

L'interprétation des résultats doit être réalisée en fonction des antécédents vaccinaux (**tableau 01**)

Tableau 1: Interprétation du test à la tuberculine (**Bouklata, 2016**).

Diamètre (mm)	Signification clinique de l'infection tuberculeuse
< 5	Négative
5 à 10	Possible mais peu probable aux mycobactéries atypiques ou <i>M.bovis-BCG</i> à répéter le test 2 mois plus tard
>10	Positive : infection tuberculeuse probable

1.1.2. La radiographie pulmonaire

L'examen d'imagerie est souvent suffisant pour le diagnostic de la tuberculose. Les images les plus typiques sont : opacités nodulaires plus ou moins confluentes, infiltrations péri-broncho vasculaires et cavitations. Les localisations classiques sont le segment postérieur du lobe supérieur ou segment apical du lobe inférieur

1.2. Le diagnostic Bactériologique

La preuve de la maladie tuberculeuse est apportée par la mise en évidence des mycobactéries. La mise en évidence peut être directe, par examen microscopique de matériel coloré (ex pectorations, matériel de ponction), et culture (méthodes traditionnelles ou rapides), ou indirecte, par la détection de la présence d'ADN ou d'ARN mycobactérien (techniques d'amplification). L'examen des expectorations colorées parla méthode de Ziehl-Neelsen ou par l'auramine constitue encore actuellement l'étape fondamentale du diagnostic de la tuberculose. La découverte de bacilles acido-alcoolo-résistants dans un prélèvement signe pratiquement le diagnostic. Chez les malades atteints de tuberculose pulmonaire, l'examen se pratique le plus souvent à partir des expectorations. La positivité de l'examen microscopique direct indique en outre que le malade est potentiellement contagieux pour son entourage. Chez les malades suspects de tuberculose pulmonaire mais incapables de produire une expectoration ou chez lesquels l'examen direct dès l'expectoration est négatif, une

expectoration induite par un aérosol d'eau salée hypertonique ou une bronchoscopie permettent d'augmenter le rendement de l'examen bactériologique.

Plusieurs études ont montré que l'expectora-plus rentable. Chez un malade en traitement, la surveillance régulière des expectorations jusqu'à la disparition totale des mycobactéries est un indice de l'efficacité des médicaments prescrits. Que l'examen microscopique soit positif ou négatif, les échantillons seront ensuite mis en culture, soit sur un milieu traditionnel à based'œuf ou à base d'agar, soit en milieu liquide, soit encore dans un milieu spécifique permettant le dépistage de la croissance bactérienne par la libération d'un marqueur radioactif ou coloré (**Brändli et al ; 2003**).

1.3. Amplification génique :

Elle permet de déceler en 24 heures la présence de *Mycobacterium tuberculosis* dans les prélèvements d'origine pulmonaire ou extra-pulmonaire en amplifiant des séquences génomiques spécifiques. Cette méthode a la potentialité d'identifier spécifiquement les bacilles en quelques heures, directement dans les échantillons cliniques sans que le préalable d'une culture bactérienne soit nécessaire. On soumet les *Mycobacterium* présents dans le culot de centrifugation à la lyse par différents agents physico-chimiques (**Bodonirina ; 2012**). Plusieurs techniques ont été utilisées :

-Le test d'amplification par la PCR : qui utilise une amplification par une Taq Polymérase qui est une variété d'ADN polymérase thermostable nommée d'après *Thermus aquaticus*, une bactérie thermophile à partir de laquelle cette enzyme a été isolée pour la première fois en 1969, cette enzyme codant une partie spécifique d'ARN 16S (**Delarras ; 2007**).

-La détermination de la résistance aux médicaments par les méthodes de culture classiques est longue et exige beaucoup de travail. Certaines techniques moléculaires permettent d'établir plus rapidement s'il y a résistance à la rifampicine laquelle est presque toujours une indication de multirésistance. On s'intéresse aussi aux nouvelles épreuves en milieu liquide : Microscopic Observation Drug Susceptibility(MODS) qui vont de l'observation microscopique à des tests de sensibilité aux antibiotiques. La microscopie permet de déceler les arrangements funiformes (en forme de corde) caractéristiques de la bactérie pathogène et d'évaluer l'action de différents médicaments (**Perry et al ; 2004**).

1.3. Radiographie du thorax :

Un petit nodule calcifié périphérique associé à un ganglion hilair calcifié, constituant le complexe de Ghon, peut aussi être la conséquence d'une lésion primaire d'histoplasmosse cicatrisée. Si l'image radiologique classique d'infiltrat ou de cavitation lobaire supérieure sur une radiographie du thorax chez un patient présentant des signes respiratoires est très évocatrice, toutes les lésions sont possibles, d'une radiographie du thorax normale à un nodule ou à un infiltrat alvéolaire diffus avec détresse respiratoire. La répétition de la radiographie du thorax est utile pour évaluer l'activité de la tuberculose : il n'est jamais prudent de juger une tuberculose comme inactive sur la base d'un seul examen radiologique (**Bendadda ; 2003**).

2. Traitement de la tuberculose

2.1. Isolement des patients contagieux :

En cas de tuberculose bacillifère (tuberculose pulmonaire avec présence de BAAR à l'examen direct), le patient doit être isolé, avec ou sans hospitalisation, durant la phase de contagiosité maximale. Elle persiste 1 à 3 semaines après l'initiation du traitement. Les critères permettant la levée de l'isolement sont l'amélioration clinique (disparition de la fièvre, diminution de la toux), et/ou la négativation de l'examen direct des expectorations en microscopie. La probabilité d'une résistance aux antituberculeux de 1^{ère} ligne doit être évoquée sur un antécédent de tuberculose traitée, une forte prévalence de tuberculoses résistantes dans le pays d'origine du patient, un échappement clinique au traitement ou en cas d'infection par le VIH. L'isolement doit alors être prolongé (**Zumlaet al, 2013**).

2.2. Principes :

Le traitement dépend de plusieurs facteurs : localisation, bactériologie, antécédents de traitements antituberculeux, statut sérologique vis-à-vis du VIH, et suit des protocoles standardisés. La lésion tuberculeuse est constituée de deux types de populations de BK :

- Au sein des cavernes, on trouve une population riche en bacilles, se multipliant rapidement et pouvant donc générer des colonies résistantes, cette population justifie l'intensité de la première phase de traitement.

- Au sein des foyers de nécrose caséuse ou dans les macrophages, moins accessibles aux antibiotiques, on trouve une population à multiplication plus lente, pouvant provoquer des rechutes, et justifiant donc un traitement prolongé (**Oliva ; 2017**).

2.3. Traitement standard :

Il repose sur l'administration quotidienne d'une seule prise orale à jeun d'antibiotiques, de préférence le matin. Le traitement d'attaque dure 2 mois, suivi d'une phase d'entretien pendant les 4 mois suivants. L'objectif de la poly antibiothérapie est d'agir de manière complémentaire sur les différentes populations de *M. tuberculosis* complexe et de prévenir l'émergence de mutants résistants. Ces mutants sont à l'origine des rechutes à bacilles résistants (Zumlaet al ; 2013).

2.4. Médicaments antituberculeux :

Les principaux médicaments antituberculeux sont décrits ci- dessous (Mouton et al ; 1997) :

2.4.1. Isoniazide :

Cette hydrazide de l'acide nicotinique est un antituberculeux de première intention, il inhibe la synthèse des acides mycoliques, entraînant une déformation de la cellule bactérienne chez *Mycobacterium tuberculosis*. Par ailleurs, il se manifeste par des altérations du métabolisme des protéines, des acides nucléiques, des glucides et des lipides. Il favorise également la formation de radicaux libres oxygénés.

2.4.2. Rifampicine :

Cet antibiotique bactéricide, dérivé semi synthétique de la rifamycine B, a pour cible l'ARN polymérase ADN dépendante. Les résistances observées sont dues à des mutations à l'origine d'altérations de la cible.

2.4.3. Ethambutol :

Il inhibe d'une part le transfert des acides mycoliques dans la paroi et entraîne d'autre part l'accumulation de mono et di-mycolates de tréhalose, provoquant des changements du métabolisme lipidique. Il a une activité principalement bactériostatique et agit sur les bacilles intra et extracellulaires en phase de multiplication.

2.4.4. Pyrazinamide :

Son mécanisme d'action n'est pas connu. Il agit en milieu acide et donc sur les bacilles intracellulaires.

2.4.5. Streptomycine :

C'est le premier antibiotique antituberculeux utilisé, il a permis de lutter efficacement contre les méningites tuberculeuses. Cet antibiotique de la famille des aminoglycosides a une action bactériostatique et bactéricide par fixation sur les unités 30S des ribosomes bactériens, provoquant des erreurs de lecture du code génétique et l'élaboration de protéines non fonctionnelles. Il n'est plus très utilisé en première intention à cause de sa toxicité et du taux élevé de résistances primaires et secondaires ; il reste cependant très utile en tant qu'antibiotique relais. Les traitements injectables, Kanamycine, Amikacine, Capréomycine, sont utilisés en seconde ligne.

2.5. Traitement Préventif :

2.5.1. 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 glyciné. Le BCG confère une immunité cellulaire relative. De nombreuses études ont été réalisées afin de déterminer l'efficacité de cette vaccination :

- Le BCG protège surtout les enfants contre les méningites tuberculeuses. Deux méta-analyses ont repris l'essentiel des résultats publiés concernant les nourrissons et les enfants, 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. Par ailleurs, le vaccin semble également efficace contre les mycobactéries environnementales puisque des observations faites en Europe du Nord montrent qu'il y a eu, depuis l'arrêt de la vaccination par le BCG, davantage de mycobactérioses, notamment ganglionnaires chez l'enfant (**Deschaseaux ; 2005**).

- Chez l'adulte, la vaccination par le BCG réduit de 50% le risque de tuberculose pulmonaire et extra-pulmonaire, avec cependant des disparités 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

puisque'un arrêt de la vaccination se traduit par une augmentation des cas de tuberculose **(Deschaseaux ; 2005)**.

L'analyse des avantages et inconvénients de la vaccination par le BCG demande au préalable de disposer d'estimations fiables concernant l'incidence de la maladie tuberculeuse et des mycobactérioses non tuberculeuses, l'efficacité du vaccin, la durée de protection conférée par la vaccination, la fréquence et la gravité des effets indésirables du vaccin, le coût du vaccin ou encore le coût du traitement d'un cas de tuberculose. Par ailleurs, la vaccination des populations dites à risque suppose une identification correcte de ces populations : s'il est impossible d'identifier correctement des populations dont l'incidence est 30 à 50 fois plus élevée que celle du reste de la population, une stratégie de vaccination sélective risque d'être inefficace. L'OMS a défini ces 3 critères comme critères de décision de vaccination ou non **(Deschaseaux ; 2005)**

Dans les pays industrialisés, les politiques vaccinales diffèrent énormément d'un pays à l'autre. Aux Etats-Unis (incidence 6/10 la vaccination par le BCG n'a jamais été recommandée, la stratégie de lutte contre la tuberculose reposant sur la détection précoce et le traitement des cas contagieux, ainsi que sur la thérapie préventive des personnes infectées.

Au Japon (incidence 26/10 les tests tuberculiques après BCG et la revaccination BCG ont été récemment abandonnés ; la poursuite de la vaccination généralisée des enfants est en discussion, la politique de vaccination généralisée des adolescents a été remplacée ces dernières années par une approche sélective, c'est-à-dire une vaccination des nouveau-nés dans les régions à haut risque **(Deschaseaux ; 2005)**.)

En Europe occidentale, les politiques vaccinales restent très variables. Dans certains pays comme l'Allemagne et l'Autriche la vaccination n'est pas recommandée. Une dizaine de pays (Belgique, Danemark, Espagne, Italie, Suède...) recommandent une vaccination pour les groupes à risque. Quelques pays dont la France pratiquent encore une vaccination généralisée. Depuis les années 1970, on assiste, en Europe occidentale, à un abandon progressif de la vaccination généralisée des jeunes enfants décidé par les tendances épidémiologiques de la maladie tuberculeuse, les effets secondaires du BCG, la faible efficacité de la vaccination et des considérations de coût-bénéfice mais les études montrent que l'arrêt de la vaccination généralisée entraîne une augmentation de l'incidence de la tuberculose et des mycobactérioses pédiatriques **(Deschaseaux ; 2005)**.



Partie pratique



Matériel et méthodes



1. Cadre d'étude :

Nous avons réalisé notre travail au niveau de laboratoire de l'hôpital Chigivara de la wilaya de Mostaganem. Notre stage a été effectué durant la période du 4 mars 2020 au 4 avril 2020. Notre étude apportée sur examens bactériologiques direct de crachats.

2. Objectif d'étude :

Le diagnostic bactériologique de la tuberculose pulmonaire et l'identification des BAAR de la tuberculose chez l'homme par la technique de coloration Ziehl Neelsen

3. Matériels et méthodes :

3.1. Matériel :

- Crachat du patient,
- Microscope optique,
- Crachoir en plastique,
- Lames neuves et propres,
- L'alcool,
- Eau de robinet,
- Coton,
- Bec benzène,
- Huile à immersion,
- pince

3.1 .1. Les réactifs :

- Fuchsine phéniquée de Ziehl
- L'alcool-acide [ou acide sulfurique dilué à 20 %]
- Le bleu de méthylène

3.2. Méthodes :

3.2.1. Examen microscopique des crachats :

La méthodologie utilisée est celle de Ziehl- Neelsen. Un frottis sur lame est confectionné pour tout prélèvement reçu au laboratoire, Cette examen comprend :

1. Préparation des frottis pour examen direct,
2. La coloration par la méthode de Zielh-Neelsen

3.2.1.1. Prélèvement d'échantillons :

C'est un prélèvement d'origine pulmonaire, il s'agit de recueillir les crachats émis spontanément après un effort de toux profond, de préférence le matin au réveil, dans des flacons stériles, à fermeture étanche et à large ouverture afin d'éviter les contaminations des bords extérieurs.ces crachoirs doivent porter impérativement une étiquette bien collée sur le pot et non sur le couvercle avec le nom du patient (**Akhtar *et al* ; 2000**).



Figure 09: Récipient de prélèvement des expectorations bronchiques

3.2.1.2. Préparation des frottis à partir d'un crachat :

-Le frottis se fait obligatoirement sur une lame neuve, préalablement dégraissée et séchée.

-Ouvrir délicatement le crachoir pour éviter la formation d'aérosols

-A l'aide d'une anse de platine rigide, déjà stérilisée à la flamme et refroidie, un très petit échantillon de crachat purulent ou muqueux est prélevé puis étalé, en faisant des mouvements circulaires sur environ 2 cm de long et 1 cm de large(**Figure 10**).

- Le frottis doit être séché à l'air libre ou sur une plaque chauffante à température douce
- Fixation des frottis consiste à recouvrir les lames avec de l'alcool sur le support chauffant. L'alcool s'évapore en quelques minutes.



Figure 10: étalement de la lame.

3.2.1.3. Coloration de Ziehl-Neelsen :

Est une coloration assez spécifique pour les mycobactéries. Elle repose sur une caractéristique fondamentale des mycobactéries : leur alcoolo-acido-résistance liée à la présence importante de lipides au niveau de leur paroi.

3.2.1.4. La coloration par la Fuschine phénique :

Placer les lames fixées sur le support de coloration selon leur numéro d'ordre, la face d'étalement vers le haut. Les lames devraient être séparées par un intervalle d'1 cm et ne jamais se toucher l'une l'autre.

Placer la lame sur un support en verre ou en métal et la recouvrir de fuschine phéniquée de Ziehl filtrée (**figure 11**). A l'aide d'un coton monté sur une tige, trempé dans alcool et flambé, passer la flamme sous la lame recouverte de fuschine et Arrêter immédiatement de chauffer dès émission de vapeurs (**figure 12**). Laisser agir trois minutes. Chauffer une deuxième fois, puis une troisième fois, jusqu'à émission de vapeur en laissant agir à chaque fois pendant trois minutes.



Figure 11 : Coloration par la fuchsine phéniquée.

- Laisser les lames recouvertes d'une solution chaude et fumante de fuchsine phéniquée pendant 05 minutes en repassant la flamme si c'est nécessaire
- Rincer délicatement les lames délicatement à l'eau pour écarter l'excès de fuchsine phéniquée.



Figure 12: flambages des lames.

3.2.1.5. Décoloration :

Les lames sont recouvertes d'acide sulfurique dilué au quart pendant une durée de trois minutes puis le colorant est jeté et les lames sont rincées à l'eau du robinet. Les lames sont recouvertes avec de l'alcool à 95° pendant 5 minutes puis rincées à nouveau. Le frottis est alors légèrement teinté de rose ou incolore (**Figure 13**).



Figure 13 : la décoloration a l'acide sulfurique.

3.2.1.6. Contre-coloration :

- Recouvrir les lames l'une après l'autre avec la solution de contre coloration (bleu de méthylène à 0,3 %) et laisser agir pendant 2 minute (**figure 14**).
- Rincer les lames à l'eau individuellement.
- Laisser sécher à l'air libre (pas au soleil ce qui diminuerait l'intensité de la couleur rouge). Ne pas utiliser de papier pour sécher les lames (risque de transfert de bacilles d'une lame à l'autre).

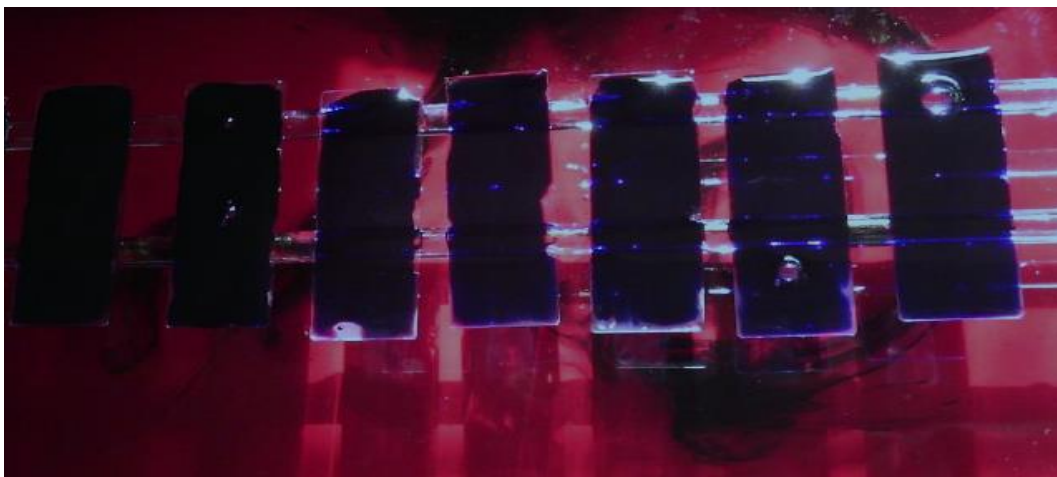


Figure 14: la contre coloration a bleu de méthylène a 0.3%.

3.2.1.7. Lecture sur microscope :

Une fois les lames séchées, elles sont examinées par le microscope optique à l'objectif d'immersion (x100). Après la mise au point, nous avons déplacé la lame d'une manière systématique du gauche vers la droite en examinant successivement les cent champs microscopiques (100 champs).

Lorsque les champs situés sur la première longueur de la lame sont examinés, on déplace d'avant en arrière le chariot de quelques millimètres et on recommence à parcourir une nouvelle longueur de la lame de droite à gauche (**figure15**) ; si le frottis est toujours négatif on lit une 3ème longueur (**Boulahbal *et al* ; 1990**).

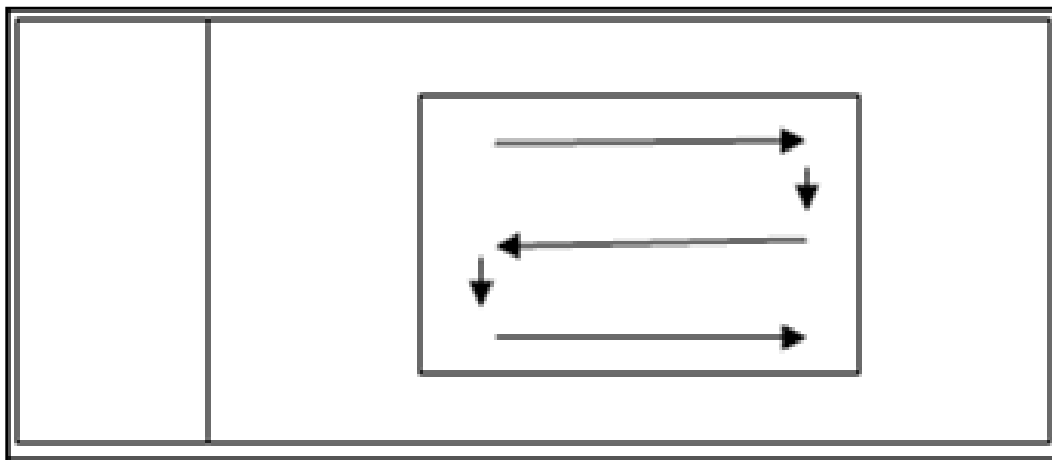


Figure 15: La lecture en créneau de la lame après coloration de Ziehl-Neelsen.

Si l'on ne trouve aucun BAAR dans les 300 champs de la lame, on déclare la négativité de la lame .Si la lame présente des BAAR, on compte tous les bacilles ainsi observés sur 10, 20 ou 100 champs selon que le frottis est très riche (fortement positif +++), moyennement riche (moyennement positif ++), pauvre (faiblement positif +) ou lame douteuse (\pm , et donc l'examen est à refaire). Ainsi nous avons suivi les recommandations du Ministère de la Santé Publique (**tableau 02**). En effet, le nombre de bacilles présents dans l'expectoration d'un malade est en relation directe avec son degré de contagiosité. Pour cette raison, le résultat est exprimé de façon quantitative (**Ait-Khaled et Enarson ; 1999**).

3.2.1.8. Destruction des lames négatives et stockage des lames positives

Une fois la lecture des lames est terminée, toutes les lames négatives sont rejetées dans un bidon en plastique approprié pour être incinérer.

Matériels et méthodes

Les lames positives sont recouvertes d'un papier sur lequel sont mentionnées les coordonnées du patient (nom et prénom), la date de l'examen microbiologique de l'échantillon et le nombre des BAAR retrouvés par champ ; puis on les stocke dans des boîtes spécifiques en tant que références.



Résultats et discussion



1. Résultats microscopique « bacilloscopie » :

L'aspect d'un frottis coloré correctement est bleu clair sous l'effet du bleu de méthylène. Si la couleur est bleu foncé, le frottis est trop épais, dans ces conditions il n'est pas possible de lire un texte au travers de la lame.

Les bacilles acido-résistants se présentent en rouge vif ou en rosé sur un fond contre coloré en bleu. Leur forme est très variable (filaments courts ressemblant à des coques ou filaments allongés). Ils peuvent être colorés de façon uniforme ou inégale et peuvent même paraître granuleux. Ils apparaissent isolément ou en amas de taille variable. Ils se présentent typiquement comme des bâtonnets incurvés, longs et effilés (**figure 16**).

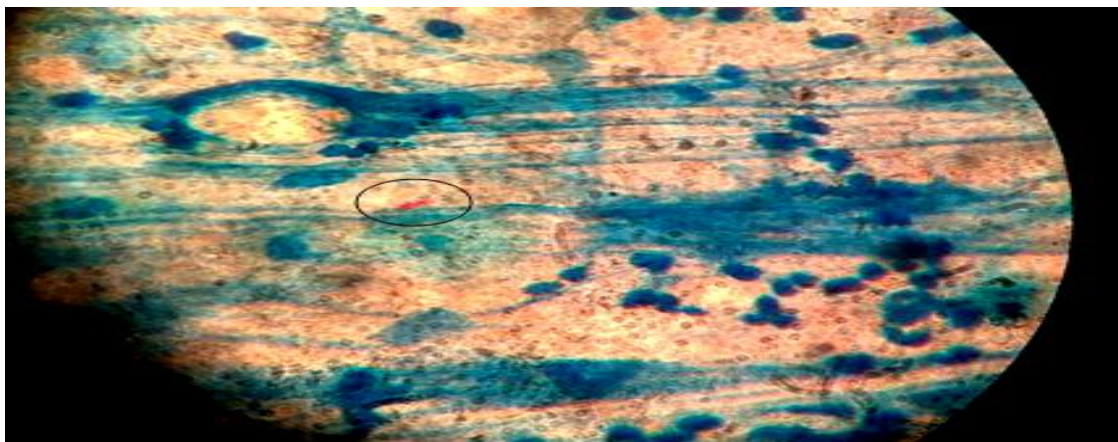


Figure 16 : Observation microscopique de bacilles acido-alcool-résistants (BAAR) après la coloration de Ziehl Neelsen.

Tableau 02 : Notation des résultats (Ministère de la santé publique ; 2001).

Nombre de BAAR	Réponse	Signification
Pas de BAAR au moins dans 100 champs	-	Lame négative
1 à 9 BAAR au moins dans 100 champs	+	Lame douteuse (refaire à l'examen)
10 à 99 BAAR pour 100 champs	++	Lame faiblement positive
1 à 9 BAAR par champ	+++	Lame moyennement positive
10 à 99 BAAR par champ	++++	Lame fortement positive
Plus de 100 BAAR par champ	+++++	Lame fortement positive

2. Paramètres épidémiologique de la population étudiée :

Lorsque l'examen microscopique direct est terminée, les résultats du patient sont enregistrés dans un fichier contenant le service le nome et l'âge de patient afin d'éviter tout problème avec le patient ou d'autres personnes, donc nous avons pris tous les cas positifs enregistrés à l'année 2019, c'est les 146 cas estimée (tableau03).

2.1. Répartition des cas positifs selon les mois :

Tableau 03 : Résultats de l'examen microscopique après coloration de Z-N des échantillons pulmonaires obtenus par mois l'année 2019.

Mois	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	total
Nbr des cas (+)	20	17	09	11	10	04	07	03	08	16	11	30	146

-Le graphique ci-dessous montre un graphique des cas positifs de la tuberculose pulmonaire par examen direct par moins à l'année 2019(**figure17**).

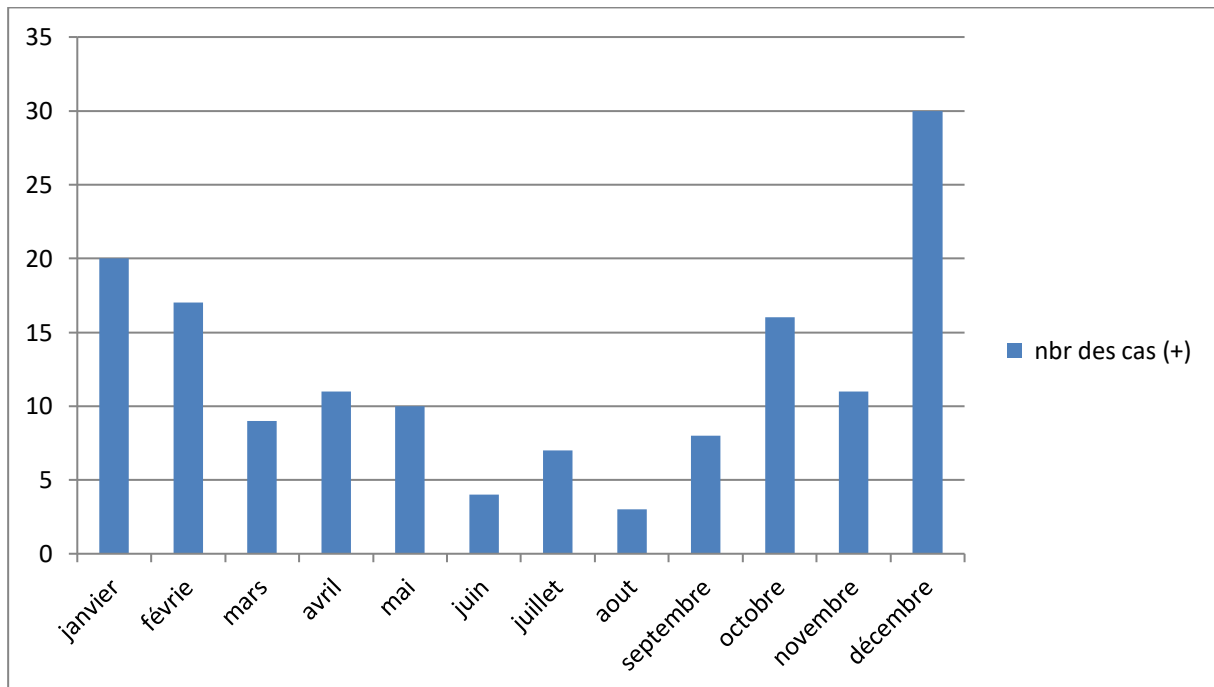


Figure 17 : Répartition des patients à BAAR positif par mois de l'année 2019.

2.1.1. Discussion :

Après avoir analysé les résultats nous avons observé un nombre de cas positif à tendance à augmenter du mois : janvier, février et avril, octobre et novembre surtout le mois de décembre du 30 cas positive. Cette maladie est plus fréquente durant les saisons hivernales qui sont plus humides et moins chaudes ceci confirme nos résultats qui montrent des cas importants de tuberculeux en particulier durant le mois décembre et janvier.

2.2. Répartition des cas positifs selon le sexe :

Tableau 04: Résultats de l'examen microscopique après coloration de Z-N des échantillons pulmonaires obtenus selon le sexe.

Mois	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Cas (+) sexe féminin	2	4	0	1	2	0	0	1	0	4	1	7
Cas (+) sexe masculin	18	13	9	10	8	4	7	2	8	12	10	23

Le graphique ci-dessous montre un graphique de nombre de cas positifs de la tuberculose pulmonaire par examen direct chez les deux sexes féminin et masculin à l'année 2019. (Figure18).

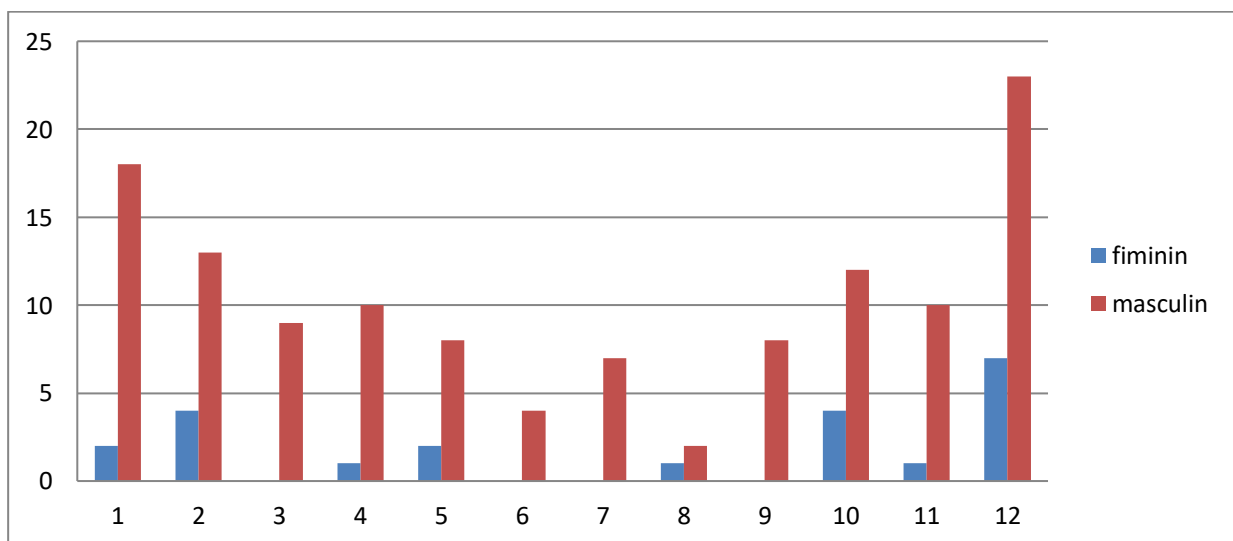


Figure18:Répartition des patients à BAAR positif en fonction de sexe par mois à l'année2019

2.2.1. Discussion :

Ces résultats montrent que 124 patients de sexe masculin ont été diagnostiqués positifs pour la tuberculose pulmonaire, après mise en évidence du bacille de Koch par examen direct alors que chez le sexe féminin, 22 cas ont été enregistrés par bacilloscopie positive. La répartition des cas positifs selon le sexe par mois a montré qu'il n'y a pas un effet significatif de saison.

Dans cette étude, nous avons constaté que la tuberculose pulmonaire touche plus les hommes par rapport au sexe féminin.

Le taux élevé de la tuberculose chez le sexe masculin peut être expliqué par l'exposition aux facteurs de risques tels que l'antécédent de tabagisme, la consommation de drogues et des maladies respiratoires professionnelles. Facteurs physiologiques et génétiques, facteurs liés à une immunosuppression...etc.

Conclusion

Malgré l'existence d'un programme de lutte antituberculeuse, la tuberculose constitue encore un sérieux problème de santé publique courant dans les pays en voie de développement et notamment en Algérie.

Plusieurs facteurs expliquant la disparité de la distribution des cas de tuberculose tels que les facteurs génétique et physiologique, liée à une immunodépression...etc. Le *Mycobacterium tuberculosis* est donc un agent pathogène redoutable, responsable chaque année d'un taux de morbidité et de mortalité élevée. Ses caractères bactériologiques et de résistance nécessitent des traitements longs. Il est donc important de pouvoir mieux connaître cette bactérie et l'étude de son génome par différentes techniques comme le séquençage ouvre de nouvelles perspectives en termes de compréhension de la maladie, de démarche diagnostique en particulier le diagnostic par amplification génique, PCR...etc. d'épidémiologie et de typage des souches.

Notre stage pratique de 20 jours (04 mars au 04 Avril 2020), réalisé au niveau du Laboratoire de l'hôpital Chigivara de la Wilaya de Mostaganem a porté pour suivre le diagnostic bactériologique de la tuberculose pulmonaire par bacilloscopie.

Résumer :

La tuberculose est une maladie infectieuse provoquée par une mycobactérie du complexe tuberculeux principalement *Mycobacterium tuberculosis* ou bacille de Koch, l'atteinte pulmonaire est la plus fréquente des localisations et représente la source habituelle de transmission. Elle demeure encore un problème de santé publique dans le monde et en particulier en Algérie, cette maladie dû à plusieurs facteurs impliqués comme : les facteurs sociaux et comportementaux, les facteurs physiologiques et génétiques et les facteurs liés à une immunosuppression...etc

L'étude d'épidémiologie génétique se fait grâce à l'étude de génome de *Mycobacterium tuberculosis* par différentes méthodes de génotypage.

Le diagnostic de la tuberculose repose sur la mise en évidence des mycobactéries. La mise en évidence peut être directe, par examen microscopique et culture ou indirecte, par la détection de la présence d'ADN ou d'ARN mycobactérien (techniques d'amplification). L'examen radiologique et les symptômes cliniques fournissent des indices mais ne constituent pas une preuve formelle de la tuberculose, notre travail réaliser au niveau de laboratoire de l'hôpital Chi Guevara de wilaya de Mostaganem basé sur l'examen microscopique direct par coloration de Ziehl-Neelsen et l'étude rétrospective descriptive ,a porté sur 146 cas positifs enregistré à l'année 2019 par mois et selon le sexe.

Most clés: tuberculose pulmonaire -*Mycobacterium tuberculosis*-génétique -Ziehl-Neelsen.

Abstract:

Tuberculosis is an infectious disease caused by a mycobacterium of the tuberculosis complex mainly *Mycobacterium tuberculosis* or bacillus of Koch, the pulmonary attack is the most frequent of the localizations and represents the usual source of transmission. It still remains a public health problem in the world and in particular in Algeria, this disease due to several factors involved such as: social and behavioural factors, physiological and genetic factors and factors related to immunosuppression...etc.

The study of genetic epidemiology is done thanks to the genome study of *Mycobacterium tuberculosis* by different genotyping method the diagnosis of tuberculosis is based on the demonstration of *Mycobacterium tuberculosis*. The demonstration can be direct, by microscopic examination and culture or indirect, by detecting the presence of mycobacterium DNA or RNA (amplification technique). the radiological examination and the clinical symptoms provide clues but do not constitute a formal proof of tuberculosis, our work is carried out at the levels of the hospital Chi Guevaralaboratory of the Wilaya of Mostaganem based on the direct microscopic examination by coloring of Ziehl-Neelsen and the descriptive retrospective study, focused on 146 positive cases recorded in the year 2019 per month and by gender

Keywords: Pulmonary tuberculosis -*Mycobacterium tuberculosis*- genetic – Ziehl-Neelsen

ملخص

السل مرض معدي تسببه بكتيريا المكورات وبشكل رئيسي المكورة السلية أو عصيات كوخ. كما يعد السل الرئوي الأكثر انتشارا بين أنواع مرض السل ويمثل المصدر المعتاد لانتقاله حيث لا زال يشكل معضلة صحية في العالم عامة والجزائر خاصة. هناك عدة عوامل مسببة لهذا المرض مثل العوامل الاجتماعية والسلوكية،العوامل الفسيولوجية والجينية الوراثية، بالإضافة إلى العوامل المتعلقة بتثبيط المناعة... الخ

إن دراسة علم الأوبئة الوراثي تتم بفضل دراسة جينوم الأنواع البكتيرية المسببة للسل بطرق التنميط الجيني المختلفة، ويستند تشخيص مرض السل إلى الكشف عن بكتيريا السل إما مباشرة عن طريق الفحص ألمجهري والاستزراع في المختبر و غير مباشرة من خلال الكشف عن وجود الحمض النووي الخاص بهذه البكتيريا أو الحمض النووي أربيي(تقنية التضخيم). يقدم الفحص الإشعاعي والأعراض السريرية أدلة ولكنها لا تشكل دليلا رسميا على مرض السل. إن العمل الذي قمنا به على خلال التربص الذي أجريناه على مستوى مختبر مستشفى شيغيفارا ولاية مستغانم استنادًا إلى الفحص المجهرى المباشر لصبغة Ziehl-Neelsen والدراسة الوصفية بأثر رجعي ، شمل 146 حالة إيجابية مسجلة في عام 2019 حسب الشهر والجنس.

الكلمات المفتاحية : السل الرئوي- المكورات الرئوية -Ziehl-Neelsen



Références bibliographiques



Ait-Khaled .N et Enarson D.A(1999) .Tuberculose. Manuel pour les étudiants en médecine. Union internationale contre la tuberculose et les maladies respiratoires : Organisation Mondiale de la Santé 1999.

Ait-Khaled N. ; Alarcón E ; Armengol R ; Bissell K ; Boillot F ; Caminero J.A ; Chiang C.Y ; Clevenbergh P; Dlodlo R; Enarson D.A ; Enarson P; Fujiwara P.I ; Harries A.D ; Heldal .E; Hinderaker S.G ; Lienhardt C; Monedero I; Rieder .H.L ; Rusen I.D ; Trébuq A; Vandeun A et Wilson N ; (2010) : Prise en charge de la tuberculose : guide des éléments essentiels pour une bonne pratique. Paris, France : Union International contre la Tuberculose et les Maladies Respiratoire. p 84.

Akhta M; Bretzel G; BoulahbalF et Laszlo A (2000) : Diagnostic de la tuberculose par examen microscopique direct des expectorations dans les pays à faibles revenu.5ème Ed. Paris.

Alihlassa S ;(2018) : Comprendre l'épidémiologie de la tuberculose en Algérie. Revue des Maladies Respiratoires, (N° 35), A234-A235.

Benbetka Y ;(2017) : Epidémiologie de la tuberculose dans le monde prédisposition génétique et tuberculose pulmonaire à propos de 250 cas, thèse pour l'obtention du diplôme de doctorat en sciences médicales, Université d'Alger 1 Benyoucef Benkhedda, 194p.

Bendadda O ; (2003) :Tuberculose humaine à *Mycobacterium bovis*: enquête bactériologique et application de la PCR à la détection et l'identification du complexe *Mycobacterium tuberculosis*. Thèse de Doctorat, National Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, Fès. 169p.

Bercovier et al (1986): Mycobacteria possess a surprin singly small number of ribosomal RNA genes in relation to the size of their genome .Biochem. Biophys. Res. Commun. 136:01136-114.

Bodonirina V.P. (2012) : Place de l'examen des crachats dans le diagnostic de tuberculose pulmonaire au CSBII Ekar Imady. Thèse de doctorat en médecine, Université d'Antananarivo, N°8359. 127 p.

Billy C, Perronne C ;(2004) : Aspects cliniques et thérapeutiques de la tuberculose chez l'enfant et l'adulte. *Encycl Méd Chir, Mal Inf.*;1(2):81-98.

Bouheraoua H ;(2013) : La tuberculose en 2011-2012 dans le service de médecine de l'établissement public de santé national de fresnes (EPSNF). Thèse pour obtenir le diplôme d'état de docteur en médecine : Médecine générale. Paris : Université de Diderot- Paris7, p 124.

Cécile L ;(2012) : Rôle de la 4'-Phosphopantéthéinyl transférase Pptt dans la multiplication et la persistance de *Mycobacterium tuberculosis* mise en place d'un test d'activité enzymatique pour la recherche de nouveaux antituberculeux, thèse de doctorat université de Toulouse, 199p.

Cole S.T; (1999): Learning from the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. FEBS Lett. 452 :7-1

Delarras C ;(2007) : Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. Ed. Tec et Doc. Lavoisier. p 110, 111, 113.

Deschaseaux C ;(2005) : Epidémiologie moléculaire de la tuberculose : Etude des souches de *Mycobacterium tuberculosis* par la technique IS611 O-RFLP. Université Henri Poincare, Nancy 1. 120 p.

Fabienne J.H ;(2017) : Recherche des facteurs génétiques contrôlant la réponse à l'infection par *Mycobacterium tuberculosis* et le développement d'une tuberculose maladie. Génétique humaine. Thèse de doctorat de Génétique Statistique .Université Sorbonne Paris Cité.213p.

Frota C.C ; Hunt D.M ; Buxtonrs ; Rickmanl ; Hinds J ; Kremer K ; Gilles P ; (2007) : Panteix, Précis de bactériologie clinique.

Gopi A; (2007): Diagnosis and treatment of tuberculosis pleural effusion. Chest; 131:880-889.

GuernierV ;(2006) : Combiner analyse spatiale et épidémiologie pour l'aide à la décision dans la lutte contre la tuberculose en Guyane française.Thèse de doctorat Université d'Orléans, France, 220p.

Julie M ;(2011) : Evaluation de marqueurs génétiques du complexe *Mycobacterium tuberculosis* combinée à l'utilisation d'outils bioinformatiques : apport en épidémiologie et phylogénie de la tuberculose, Thèse de doctorat, Université des Antilles et de la Guyane, 171p.

Kevin A ; Alame E ;(2016) : Les infections à mycobactéries du complexe *Mycobacterium tuberculosis* à Libreville : profil des résistances aux antibiotiques et diversité génétique. Thèse de doctorat : Université Sorbonne Paris, p 164.

Koumba Y.G ;(2010) : Synthèse d’analogues cinnamiques : inhibiteurs potentiels contre *Mycobacterium tuberculosis*. Thèse de doctorat, Université de Toulouse, 277p

Mazza-Staldera J, Nicoda L, Janssens J.P ;(2012) : La tuberculose extra pulmonaire. Revue des Maladies Respiratoires. 29: 566–578

Meyssonier V ;(2012) : Épidémiologie de la tuberculose et de la résistance aux antituberculeux. Thèse de doctorat Université Pierre et Marie Curie, p 161.

Ministère de la santé publique ;(2001) : Programme National de Lutte Contre la Tuberculose, Manuel de la lutte antituberculeuse à l’usage des personnels médicaux, Alger

Ministère de la sante publique ;(2011) : Manuel de la lutte antituberculeuse à l’usage des personnels médicaux.

Mouton Y ;Deboscker Y ; Dubreuil L ;ThabautA ;(1997) : Antibiotiques, antiviraux, anti-infectieux. Paris : John Libbey Eurotext, 261p.

Noël H.R ;(2017) : Etudes descriptive, épidémiologique, moléculaire et spatiale des souches *Mycobacterium tuberculosis* circulant à Antananarivo, Madagascar. Thèse de doctorat Université d’Antananarivo; Institut Pasteur (Tananarive).172p.

Olivia V ;(2017) : Médecin généraliste et tuberculose : enquête auprès des médecins généralistes de côte d’or sur les habitudes de prise en charge d’une suspicion de tuberculose pulmonaire. Thèse de doctorat, Université de Bourgogne l’UFR, Dijon, 85p.

Organisation Mondiale de la Santé ;(2017) : Rapport sur la lutte contre la tuberculose dans le monde.

Perry J.J ; Staley. J.T et Lory S ; (2004) : Microbiologie. Ed. Dunod. Paris. p 720,721.

Pierre et Marie C ; (2003) : Bactériologie, faculté médecin université Pierre et Marie Curie ; chapp 12- p : 103 :122.

Stahl et Urbance ;(1990): The division between fast and slow growing specises corresponds to natural relationship among the mycobacteria. J. Bacteriol. 172 : 297-308.

Timouyas Y ;(2017): Etude moléculaire de la résistance à la rifampicine des bacilles du complexe *Mycobacterium tuberculosis*, Thèse de doctorat en médecine, Université Kadi Ayyad Marrakach, 199 p.

VincentL.F et Portaels ;(1992) : Méthodes rapides de détection et de diagnostic des mycobactéries : actualités et perspectives. Méd. Mal. Infect. 22: 391-409.

Wayne L.G et Kubica G.P (1986): *Mycobacteriaceae chester*. In: NR Krieg and JD Holt eds Bergey’s manuel of systematic bacteriology, vol 2.

Référence bibliographique

WHO ;(2017): Global tuberculosis control.

Zumla A; Raviglione M; Hafner R; (2013): Tuberculosis, the new England journal of medicine 8(20), 745-55.

Site d'internet:

- <http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>