



DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

N°...../SNV/2017

## MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

**MANSOURI Nacera**

Pour l'obtention du diplôme de

### **MASTER EN BIOLOGIE**

**Spécialité : Microbiologie Fondamentale et Appliquée**

#### THÈME

**Importance des méthodes  
phénotypiques classiques et génomiques  
modernes dans l'indentification de  
*Mycobacterium tuberculosis***

Soutenue publiquement le 19/ 06 / 2017

#### DEVANT LE JURY

Président	Mr CHADLI R	prof	U. Mostaganem
Encadreur	Mr AIT SAADA DJ	MCA	U. Mostaganem
Co encadreur	Mme CHERIF TOUIL S	M B	H. Paris
Examineurs	Mr BEKKADA	Prof	U. Mostaganem

## **Remerciements**

*Je tiens à remercier tout d'abord DIEU le tout Puissant pour la vie, l'intelligence, la persévérance, le courage et la force qu'il m'a procuré afin que je puis mener à bien ce modeste travail qui me permettra de conclure avec succès mes études universitaires.*

*Je remercie l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté de prendre le temps de participer à l'examen de mon travail de mémoire.*

*Un très grand merci à mon encadreur **Mr. Ait Saada**. Je salue son incroyable énergie contagieuse et bénéfique et sa motivation sans faille. Merci pour tout ce que j'ai pu apprendre de précieux durant ces années passées.*

*Mes remerciements s'adressent aussi à **M<sup>me</sup> Cherif Touil***

*Un très grand merci à mes 2<sup>ème</sup> parents, mon oncle **Ghaffour Med** et sa femme **Habib Zahmani Nadia** Pour l'accueil chaleureux que j'ai reçu lors de mon séjour chez eux, pour leurs conseils et leurs gentillesse. Je tien à vous dire que sans vous ce travail n'aurait pas été possible. Je vous présente mes plus sincères remerciements.*

*Je suis très reconnaissante à l'ensemble des membres de l'équipe du laboratoire de Cherif Touil pour tous les bons moments passés ensemble.*

*Merci beaucoup à M<sup>m</sup>, **Fatima M<sup>m</sup>, Amina et M<sup>m</sup>, Khayra**.*

*Je tiens à remercier l'ensemble des membres de l'équipe de laboratoire de l'hôpital militaire d'Oran, **Dr Louai, Dr Belmahdi, et Faysel**.*

*Mes remerciements s'adressent aussi à mes chers maitres :*

***M<sup>me</sup> Ait Chaabane, Mr Bahri, Mr Mikhaldi et Mr Chibani***

*Pour leurs disponibilités pour tous ces moments de partage, leurs humanités et leurs conseils*

*A **Benbouziid Hayet**, la plus importante à mon monde, et son amour infini.*

*A **M'bourou Fred** pour ces conseils si précieux, sa disponibilité et sa gentillesse*

# *Dédicace*

*J'ai le plaisir de dédier ce travail à mes 2 chères familles, **MANSOURI** et **GHAFFOUR**.*

*A mes parents, pour leur présence constante, leur soutien indéfectible et l'intérêt constant qu'ils ont porté à mes études ainsi qu'à ce travail.*

*A mes oncle **Benyebka, Mokhtar, Larbi, Abdelkader, Miloud et Noredine**  
Pour votre envie de mener les choses à bien, ton aide.*

*A mes frères **Djemel, Lakhder, et Abdelhak**, mes sœurs **Yamina Fayza Fatima et Khadidja**, et ma tante **Nbia** pour la beauté, la générosité de leur don.*

*A mes amis et collègues de l'université de **Mostaganem**, merci pour votre bonne humeur et pour tout ce que vous apportez de bon et de joyeux dans nos journées de travail passées ensemble. Je remercie tout spécialement*

***Hayet, Amina, Houda, Bakhta, Amel, Houria, Asma et Sara***

## Plan du travail

Remerciement	
Dédicace	
Liste de tableaux	
Liste de figures	
Introduction	01

### Partie 1 : Etude bibliographique

#### Chapitre I : la tuberculose

1. Tuberculose et l'agent responsable	03
1.1 Historique	03
1.2 Pouvoir pathogène expérimental. Le phénomène de Koch	03
1.3 Clinique	04
1.4 Physiopathologie	05
1.5 Symptôme et diagnostic	05
1.6 Traitement	06
1.7 Pharmaco-résistance aux médicaments antituberculeuse	07
1.8 Prévention	08
1.8.1 Vaccination par le BCG	08
2. La tuberculose dans le monde, un problème de santé publique	10
2.1 Histoire de la tuberculose	10
2.2 Epidémiologie globale de la tuberculose	10
2.3 Epidémiologie classique et épidémiologie moléculaire	11
2.3.1 Epidémiologie classique	12
2.3.1.1 Prévalence	12
2.3.1.2 Taux d'incidence	12
2.3.1.3 Mortalité / Morbidité	12
2.3.2 Epidémiologie moléculaire	13
2.3.2.1 Principe	13
2.4 Tuberculose dans le monde	13
2.5 Impact mondial de la tuberculose	14
2.6 Tuberculose en Algérie	15

#### Chapitre II : *Mycobacterium tuberculosis*

1. Le genre <i>Mycobacterium</i>	16
1.1 Les mycobactéries	16
1.2 Définition	16
1.3 Habitat	17
1.4 Taxonomie	17
1.5 Classification	19
2. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	19
2.1 Habitat	19
2.2 Identification phénotypique	19
2.2.1 Examen direct	19
2.2.2 Caractère cultureux	20
2.2.3 Caractères morphologique	20
2.2.4 Caractères chimiotaxonomiques	20

2.2.5 Constitution chimique et antigénique	20
2.2.6 Sensibilité aux agents physiques et chimiques	21
2.3 Tests biochimiques	21
2.3.1 Catalase thermosensible ou thermorésistante	21
2.3.2 Test à la niacine	22
2.3.3 Réduction des nitrates	23
2.3.4 Test de croissance sur milieu solide additionné d'acide thiophène 2 carboxylique ou TCH	24
2.4 Identification géotypique	24
2.4.1 Géotypage	24
2.4.2 Le génome des souches du <i>complexe mycobactérium tuberculosis</i>	24
2.4.3 Caractéristique génétique	26
2.4.4 Contenu en CG%	26
2.4.5 Nombre de copies du gène codant pour l'ARN 16 ribosomale	26
2.5 Les antituberculeux	26
2.5.1 Sensibilité au antibiotique	27
2.5.2 Mécanisme de résistance antituberculeuse	27
2.5.2.1 Isoniazide	28
2.5.2.2 Rifampicic	28
2.5.2.3 Ethambutol	

## **Partie 2 : Méthodologie**

	29
1. Objectifs	29
2. Lieu du stage	29
3. Souche étudié	29
4. Prélèvement	29
4.1 Mode de prélèvement des crachats	30
5. Examen microscopique	30
5.1 Préparation des frottis	30
5.2 Coloration de zihln nelseen	31
6. Mis en culture	31
6.1 Préparation d'échantillon	31
6.1.1 Décontamination	32
6.1.2 Neutralisation et centrifigation	32
6.2 Ensemencement	32
6.3 Incubation	32
7 Test de dépistage rapide de la résistance à la rifampicine : technique GeneXpert MTB/RIF :	32
7.1 Principe	33
7.2 Intérêt	34
7.3 Résumé des recommandations	34
7.4 Procédure pour les échantillons de crachats expectorés : protocole	35
7.5 Précautions	35
<b>8 Résultats et discussions</b>	<b>36</b>
<b>9 Conclusion</b>	<b>45</b>
<b>10 Annexe</b>	
<b>11 Référence bibliographique</b>	

## Liste des abréviations

<b>ADN</b>	: Acide Désoxyribonucléique
<b>ARN</b>	: Acide Ribonucléique
<b>BAAR</b>	: Bacilles Acido-Alcool Résistants
<b>BCG</b>	: Bacille de Calmette et Guérin
<b>BK</b>	: Bacille de Koch
<b>BEH</b>	: BULLETIN EPIDEMIOLOGIQUE HEBDOMADAIRE
<b>ED</b>	: examen direct
<b>EMB</b>	: Ethambutol
<b>IDR</b>	: Intradermo-réaction
<b>INH</b>	: Isoniazide
<b>KM</b>	: Kanamycine
<b>LJ</b>	: Lôwenstein-Jensen
<b>MDR</b>	: Multi-drug resistant
<b>MTB</b>	: Mycobacterium tuberculosis
<b>MTbC</b>	: complexe Mycobacterium tuberculosis
<b>OMS</b>	: Organisation Mondiale de la Santé
<b>PCR</b>	: Polymerase Chain Reaction
<b>PZA</b>	: Pyrazinamide
<b>RIF</b>	: Rifampicine
<b>SIDA</b>	: Syndrome d'Immunodéficience Acquise
<b>SM</b>	: Streptomycine
<b>TB</b>	: Tuberculose
<b>TSA</b>	: Trypticase de Soja Additionnée de 5 % de sang de mouton
<b>UV</b>	: Ultra-violet
<b>VIH</b>	: Virus d'Immunodéficience Humaine
<b>WHO</b>	: World Health Organization
<b>XDR</b>	: Extreme drug resistant

## Liste des figures

- Figure 01.** Incidence de la tuberculose estimée par pays en 2009 (WHO, 2010).
- Figure 02.** Incidence de la tuberculose toutes formes en 2009 selon les Wilayate (Manuel de la lutte antituberculeux., 2011).
- Figure 03.** Représentation du chromosome de *M. tuberculosis* avec la localisation de trois principaux marqueurs de génotypage : les séquences d'insertion IS6110, le locus DR, et les minisatellites MIRU-VNTR (Barnes et al., 2003).
- Figure 04.** Les 5 sonde du gène *rpoB* 81 pb RIF région de détermination à la résistance à la rifampicine. (OMS, 2011).
- Figure 05.** Résumé du principe du technique GeneXpert MTB/RIF. (OMS, 2011).
- Figure 06.** Les étapes du test Xpert MTB/RIF (Francis, 2011).
- Figure 07.** Observation microscopique du BAAR par la méthode de ZIEHL-NEESEN.
- Figure 08.** Identification de *Mycobacterium tuberculosis* par la technique GeneXpert MTB/RIF chez le 1<sup>ème</sup> patient.
- Figure 09.** Ré Identification de *Mycobacterium tuberculosis* par la technique GeneXpert MTB/RIF chez le 2<sup>ème</sup> patient.
- Figure 10.** Identification de *Mycobacterium tuberculosis* par la technique GeneXpert MTB/RIF chez le 3<sup>ème</sup> patient.
- Figure 11.** Identification de *Mycobacterium tuberculosis* par la technique GeneXpert MTB/RIF chez le 4<sup>ème</sup> patient.

## Liste de tableaux

**Tableau 01.** Estimations de l'incidence, de la prévalence et de la mortalité (OMS, 2008).

**Tableau 02.** Classification du genre *Mycobacterium* selon le manuel du Bergy.

**Tableau 03.** Identification biochimique du complexe *M. tuberculosis* (Marchal, 1987).

**Tableau 04.** Présentation quantitative du résultat d'examen direct ED.

**Tableau 05.** Test de culture confirmatif de la présence de *Mycobacterium tuberculosis*.

**Tableau 06.** Présentation de notre résultat par GeneXpert MTB/RIF.



# **Introduction**

## Introduction

Bien que la tuberculose soit une maladie connue depuis longtemps, elle reste un problème d'actualité dans le monde. En 2013, selon les estimations, 9 millions de personnes l'ont contractée et 1,5 million de personnes en sont décédées, dont 360 000 sujets VIH-positifs. IL s'agit de la maladie infectieuse la plus répandue chez l'espèce humaine. Le risque de contracter la tuberculose est encore présent en permanent, en raison des caractères propres aux bacilles tuberculeux, mais aussi du mode de transmission et de la physiopathologie bien particulière à cette maladie **(Yombi et Olinga., 2015)**.

Le traitement de la tuberculose et les mesures de prévention sont actuellement bien connus ; mais leurs mauvaises utilisations posent des problèmes importants car la tuberculose est beaucoup plus délicate à soigner, surtout en cas de résistances à plusieurs anti-tuberculeux (multi résistance). Dans le pire des cas, elle est dite *étendue* lorsqu'elle concerne des antibiotiques de première intention (isoniazide, rifampicine).

La tuberculose résistante à plusieurs médicaments (MDR) est définie comme la maladie tuberculose causée par une souche *de Mycobacterium tuberculosis* qui était résistante à au moins l'isoniazide et la rifampicine **(WHO., 2000)**. Actuellement, moins de 10% des cas de tuberculose multirésistante (MDR-TB) dans le Monde sont détectés **(WHO., 2010)**.

Face à ce problème il paraît nécessaire d'en établir rapidement le diagnostic. Pour la plupart des laboratoires, l'identification du complexe TB, sans détermination de l'espèce concernée suffit, car la probabilité que la souche isolée appartienne à une espèce autre que *Mycobacterium tuberculosis* est extrêmement faible **(WHO., 2010)**. Un certain nombre de tests biochimiques peuvent permettre d'identifier ensuite les sous-espaces du complexe

TB si une différenciation plus précise s'avère nécessaire. Les méthodes classiques d'identification des mycobactéries reposent sur la recherche des bacilles acidoalcoolo-resistants par coloration de Ziehl-Nielsen, suivie par la mise en culture et l'analyse biochimique. Deux mois peuvent être nécessaires pour identifier une souche par ces méthodes (**Kent et Kubica., 1985**).

Ces dernières années, les méthodes moléculaires ont été bien développées pour identifier la résistance aux médicaments causée par des mutations de gènes (**García., 2003 ; Neonakis et al., 2008**). L'une de ces dernières techniques est celle dite GeneXpert MTB /RIF, qui peut détecter uniquement des mutations dans le gène *rpoB*; dû à l'association de la résistance à la rifampicine (RIF) et de la tuberculose multi-résistante (TB-MR). Cette technique a été surtout utilisée pour détecter les cas de TB-MR (**WHO., 2011**). La technique a été évaluée à fond (**Marlowe et al., 2011**) et utilisée dans de nombreux pays (**Barnard et al., 2012**). Il a une sensibilité et une spécificité de 90,4 et 98,4%, respectivement (**Chang et al., 2012 ; Zakham et al., 2013**).

Cette étude consiste à mettre en avant l'importance des méthodes moléculaires modernes (tels la technique d'amplification d'acide nucléique par le GeneXpert MTB/RIF) par rapport aux méthodes classiques usuellement utilisées d'examen direct au microscope et de mise en culture sur milieux solides spécifiques dans le diagnostic rapide de *Mycobacterium tuberculosis* connu comme étant l'agent causale de la tuberculose.

# **Partie1 : Etude bibliographique**

### Chapitre I : Tuberculose

#### 1. Tuberculose et l'agent responsable

##### 1.1 Historique

L'ancienneté de la tuberculose est attestée par l'existence de lésions osseuses caractéristiques, découvertes sur des squelettes très anciens dont certains dataient du Néolithique ou chez des momies de l'Egypte ancienne. Cependant, certaines formes de la maladie n'ont été individualisées que tardivement : ainsi la description de la méningite tuberculeuse ne remonte qu'au milieu du XVIII<sup>ème</sup> siècle.

La transmissibilité de la tuberculose a été démontrée en 1866 par Villemin qui, par méthode expérimentale, a prouvé l'inoculabilité de produits tuberculeux à l'animal et donc la contagion de la tuberculose.

La découverte de l'agent bactérien de la tuberculose par Robert Koch date de 1882, d'où le nom de bacille de Koch ou BK donné au bacille tuberculeux.

En 1921, Calmette et Guérin mettent au point le BCG, un bacille rendu avirulent par repiquages successifs et qui est à la base de la vaccination.

En 1944, Waksman découvre la Streptomycine qui s'avère efficace contre les bacilles tuberculeux. D'autres antibiotiques apparaissent ensuite comme l'Isoniazide en 1952, le Pyrazinamide en 1954, l'Ethambutol en 1962 et surtout la Rifampicine en 1968.

Enfin, le séquençage complet du génome de *Mycobacterium tuberculosis* fut réalisé en 1998. (Deschaseaux., 2005)

##### 1.2 Pouvoir pathogène expérimental. (Le phénomène de Koch)

*Mycobacterium tuberculosis* est pathogène pour de nombreux animaux de laboratoire mais il n'est pas pathogène pour les bovidés. L'animal le plus sensible est le cobaye. Quelle que soit la voie d'inoculation et le nombre de bacilles inoculés, il fait une tuberculose progressivement mortelle.

15 jours à 3 semaines après l'inoculation d'un million de bacilles, un nodule se forme au point d'inoculation. Ce nodule s'ulcère et laisse sourdre un pus blanchâtre, homogène, que l'on appelle caséum, caractéristique des nécroses caséuses. L'ulcération va persister jusqu'à

la mort de l'animal. Celle-ci survient par essaimage lymphatique des bacilles et atteinte des principaux viscères (rate, foie, poumons).

En 1890, Robert KOCH constate que la ré-inoculation de bacilles à un cobaye déjà inoculé n'est pas suivie des mêmes lésions que la primo-inoculation. C'est le phénomène de KOCH qui se traduit de la manière suivante : d'abord une ulcération nécrotique se forme en 2 à 3 jours au point d'inoculation alors qu'elle se forme en 3 à 4 semaines après la primo-inoculation : ensuite, l'ulcération nécrotique guérit spontanément alors que l'ulcération de la primo-inoculation persiste jusqu'à la mort de l'animal.

Du phénomène de KOCH on peut tirer les déductions suivantes :

Parce qu'il réagit plus vite à la ré-inoculation qu'à la primo-inoculation, le cobaye déjà inoculé est hypersensible aux constituants du bacille de KOCH : c'est l'hypersensibilité ou l'allergie tuberculeuse qui signe la primo-infection. Pour mettre en évidence l'état d'hypersensibilité il n'est pas nécessaire d'injecter des bacilles entiers vivants ou morts.

Il suffit d'injecter un extrait protéinique de bacille, la *tuberculine*. Chez l'homme, l'hypersensibilité à la tuberculine se recherche par intradermoréaction de Mantoux, seule méthode satisfaisante, ou par cuti-réaction, timbre et bague tuberculinique.

Parce que la lésion de ré-inoculation guérit spontanément alors que la lésion de primo-infection persiste jusqu'à la mort, le cobaye déjà inoculé à une immunité de surinfection.

On peut reproduire artificiellement l'état d'immunité de surinfection en inoculant au cobaye et à l'homme une mycobactérie vivante et atténuée, le *B.C.G.* (UPMC., 2003)

### 1.3 Clinique

La pénétration du bacille dans l'organisme ne conduit à la maladie que dans 10 % des cas en moyenne. Dans 90 % des cas, la multiplication des bacilles s'arrête rapidement. C'est la primo-infection simple qui se traduit par le développement de l'hypersensibilité tuberculinique et de l'immunité de surinfection. Le sujet n'est pas malade, il est simplement infecté.

La maladie tuberculeuse est habituellement provoquée par la multiplication des bacilles de la primo-infection soit immédiatement soit après un temps de latence, les bacilles ayant survécu dans les lésions primaires (réinfection endogène). Plus rarement, elle l'est par de nouveaux bacilles inhalés d'une nouvelle source de contamination (réinfection exogène).

## Partie 1 : Etude bibliographique

---

Deux types de localisation peuvent s'observer. Les localisations pulmonaires sont les plus fréquentes (90 % des cas environ) et les plus dangereuses épidémiologiquement car ce sont elles (notamment les cavernes) qui permettent la transmission du bacille. Les localisations extra-pulmonaires sont généralement pauvres en bacilles mais invalidantes (ostéo-arthrite) ou gravissimes (méningite).

Le substratum anatomique des lésions est le même c'est le granulome et surtout la caséification. Chez les sujets infectés par le virus du SIDA (VIH), l'infection par le BK mène très fréquemment à la tuberculose qui est souvent généralisée et se traduit dans près de 50 % des cas par des localisations multiples, pulmonaires et extrapulmonaires. **(Pierre et Curie.,2003)**

### 1.4 Physiopathologie

Emis par une source d'infection, le plus souvent un tuberculeux pulmonaire, dans les gouttelettes de FLUGGE. *M.tuberculosis* est inhalé et atteint l'alvéole pulmonaire. La maladie résulte de la multiplication du bacille et de ses interactions avec l'hôte infecté (immunité à médiation cellulaire, activation des lymphocytes T et des macrophages). *M.tuberculosis* ne produit pas de toxine. **(Pierre et Curie., 2003)**

### 1.5 Symptôme et diagnostic

Les symptômes courants de la tuberculose pulmonaire évolutive sont une toux accompagnée d'expectorations parfois teintées de sang, des douleurs thoraciques, un état de faiblesse, une perte de poids, de la fièvre et des sueurs nocturnes.

Pour le diagnostic, de nombreux pays s'appuient toujours sur une méthode utilisée depuis longtemps, à savoir l'examen au microscope des expectorations. Des techniciens qualifiés recherchent au microscope la présence de bacilles tuberculeux dans des échantillons d'expectorations. Cette méthode permet de détecter la moitié des cas, mais pas les résistances aux médicaments.

Le recours au test rapide Xpert MTB/RIF® s'est beaucoup développé depuis 2010, date à laquelle l'OMS a recommandé son utilisation pour la première fois. Ce test permet de détecter à la fois la tuberculose et la résistance à la rifampicine, le médicament antituberculeux le plus important. Le diagnostic peut être posé en 2 heures et l'OMS

## Partie 1 : Etude bibliographique

---

recommande désormais cet essai comme test initial pour toute personne présentant des signes et symptômes de tuberculose. Plus d'une centaine de pays l'utilisent et 6,2 millions de cartouches ont été fournies dans le monde en 2015. Le diagnostic de la tuberculose multirésistante ou ultrarésistante de même que celui de la tuberculose associée au VIH peut être cher et compliqué. En 2016, l'OMS a recommandé 4 nouveaux tests de diagnostic, un test moléculaire rapide dans les centres de santé périphériques ne pouvant pas utiliser le Xpert MTB/RIF et 3 tests pour détecter les résistances aux médicaments antituberculeux de première et deuxième intention. La tuberculose est particulièrement difficile à diagnostiquer chez l'enfant et, pour l'instant, seul l'essai Xpert MTB/RIF est disponible en général pour aider au diagnostic de la tuberculose pédiatrique. (OMS., 2011)

### 1.6 Traitement

La tuberculose est une maladie que l'on peut soigner et guérir. Pour la tuberculose évolutive sensible aux médicaments, on administre un traitement standard de 6 mois associant 4 médicaments antituberculeux en l'accompagnant des informations, de la surveillance et d'une aide au patient assurées par un agent de santé ou un bénévole entraîné. Sans ce soutien, l'observance peut être difficile et la maladie peut se propager. On peut guérir l'immense majorité des cas si les médicaments sont fournis et pris correctement. (Meyssonier., 2012)

#### 1.6.1 Médicaments antituberculeux

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

- *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

- *Isoniazide*

Cet 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.



- *.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.

- *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.

Il existe d'autres antituberculeux de seconde intention comme par exemple les fluoroquinolones (Moxifloxacin), leur utilisation reste limitée notamment aux cas de tuberculose résistants aux principaux antituberculeux.

### 1.7 Pharmacorésistance aux médicaments antituberculeux

La pharmacorésistance aux médicaments antituberculeux est un problème majeur de santé publique qui compromet les succès remportés en matière de lutte contre la tuberculose. Les pharmacorésistances apparaissent quand les antibiotiques sont mal utilisés chez des patients dont la tuberculose est sensible. Ce mauvais usage est la conséquence d'un certain nombre d'erreurs, comme l'administration de schémas thérapeutiques inadaptés par les agents de santé ou le fait qu'ils n'ont pas contrôlé que le patient avait bien pris l'intégralité de son traitement. (OMS., 2017)

### 1.8 Prévention

#### 1.8.1. 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. (CECI., 2004).

## Partie 1 : Etude bibliographique

---

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

- Le BCG 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.
- 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 puisqu'un arrêt de la vaccination se traduit par une augmentation des cas de tuberculose. (**CECI., 2004**)

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.

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

## Partie 1 : Etude bibliographique

---

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. En Nouvelle-Zélande (incidence 9/105), la politique de vaccination généralisée des adolescents a été remplacée ces dernières années par une approche sélective, c'est-à-dire une vaccination des nouveaux-nés dans les régions à haut risque.

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.

La France est l'un des rares pays européens à maintenir la vaccination BCG généralisée avant l'âge de 6 ans (**BEH., 2003**). Un décret du 30 juin 2004 supprime les revaccinations des sujets, même ceux pour lesquels le résultat de l>IDR est négatif, et l'arrêté du 13 juillet 2004 a mis fin à la pratique des tests tuberculiques de contrôle après la vaccination. A 6 ans, 95% des enfants ont reçu le BCG.

On peut estimer le nombre de cas de tuberculose évités en France grâce à la vaccination : il varie selon les études entre 318 et 802 cas annuels. (**Deschaseaux., 2005**)

## 2. La tuberculose dans le monde, un problème de santé publique

### 2.1 Histoire de la tuberculose

L'histoire de la tuberculose est étroitement liée à celle de l'homme puisque la maladie est déjà mentionnée par les textes des médecines grecque, chinoise, égyptienne et indienne plus de 2000 ans auparavant (**Daniel., 2006**).

Trois formes principales de tuberculose ont été identifiées par les historiens : le « mal de Pott » dont les séquelles caractéristiques au niveau des vertèbres ont été retrouvées chez des momies en Egypte, les 19 scrofules correspondant à des ganglions infectés au niveau du cou avec écoulement de pus, mentionnés dans des textes du Moyen Âge, et la tuberculose pulmonaire dont l'épidémie commença au XVII<sup>ème</sup> siècle pour devenir la principale cause de décès chez les adultes au XVIII<sup>ème</sup>. La maladie actuellement appelée tuberculose pulmonaire portait au XVII<sup>ème</sup> et XVIII<sup>ème</sup> siècle les noms de phtisie pulmonaire ou de consommation, les deux appellations, d'origine grecque et latine respectivement, signifiant un amaigrissement excessif, un décharnement.

Ce n'est finalement qu'en 1882, que le microbiologiste allemand Hermann Heinrich Robert Koch mit en évidence le lien existant entre la tuberculose humaine et l'agent pathogène *Mycobacterium tuberculosis* qu'il nomme alors bacille de Koch (BK) (**Daniel., 2006**).

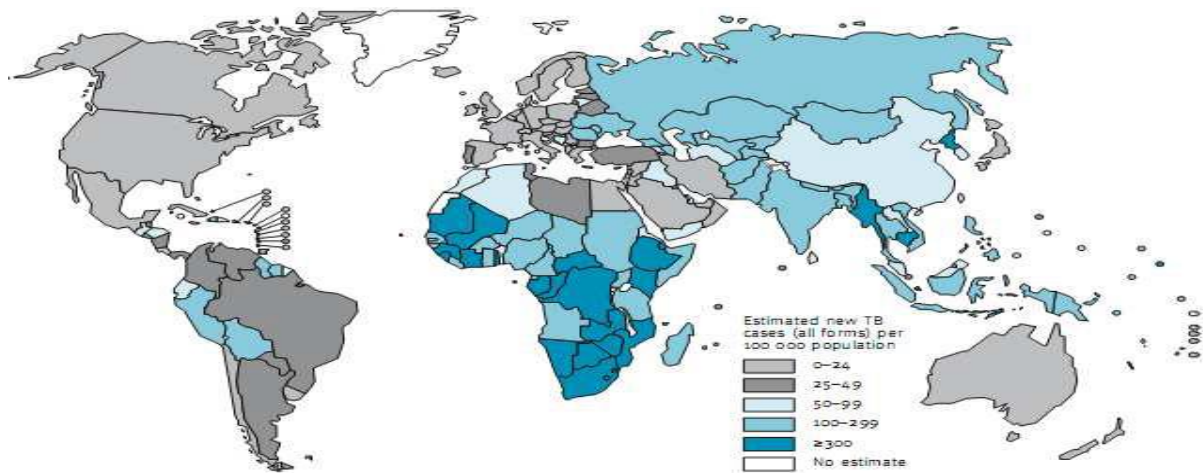
### 2.2 Epidémiologie globale de la maladie

Elevée par l'OMS en 1993 au rang d'urgence mondiale, la tuberculose est, avec le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et le paludisme, l'une des premières causes mondiales de mortalité par maladie infectieuse. En 2009, le bacille tuberculeux, *Mycobacterium tuberculosis*, a été responsable de la mort de plus de 1,7 millions de personnes, soit 4700 décès par jour (**WHO., 2010**). Cette même année, l'OMS a dénombré plus de 9,4 millions de nouveaux cas de tuberculose. La distribution mondiale des cas de tuberculose montre que la grande majorité d'entre eux survient en Asie (55%) et en Afrique (30%) ; l'Inde, la Chine, l'Afrique du Sud, le Nigéria, et l'Indonésie comptant à eux seuls près de la moitié des cas de tuberculose estimés en 2009 (4,7 millions ou 49,8% des cas ; Figure 1).

En 2009, les taux de tuberculoses résistantes aux traitements antituberculeux sont les plus importants jamais rapportés avec 3,3% de souches multirésistantes (MDR) parmi les

## Partie 1 : Etude bibliographique

nouveaux cas de tuberculose, soit 440 000 cas, et un taux record de 28,3% de souches MDR atteint en Russie (Musser et al., 2000), la tuberculose multirésistante se définissant comme une tuberculose résistant à l'isoniazide et à la rifampicine, les deux médicaments les plus importants utilisés pour le traitement de cette maladie. Quatre-vingt-six pourcents des souches MDR provenaient de 27 pays dont 15 pays européens (Musser et al., 2000) et l'OMS a par ailleurs estimé que 5,4% d'entre elles étaient extrêmement résistantes (XDR); la tuberculose XDR se définissant comme une tuberculose MDR résistant à une fluoroquinolone ainsi qu'à au moins un des trois antituberculeux de seconde intention injectables (capreomycine, kanamycine et amikacine). (Millet., 2011)



**Figure 1.** Incidence de la tuberculose estimée par pays en 2009 (WHO, 2010)

### 2.3 Epidémiologie classique et épidémiologie moléculaire

L'épidémiologie a beaucoup évolué depuis les années 50, date de publication des premières études épidémiologiques à proprement parler. On distingue actuellement l'épidémiologie descriptive qui répond à la définition de l'OMS suivante « Etude de la distribution des maladies dans les populations humaines, ainsi que des influences qui déterminent cette distribution », des enquêtes étiologiques qui recherchent les causes des maladies, et des enquêtes d'évaluation des actions de santé qui évaluent les mesures de santé prises pour une population donnée. On peut aussi intégrer à l'épidémiologie descriptive l'étude des facteurs de santé car ces dernières permettent de suivre les paramètres biologiques et l'état de santé général d'une population. Quels que soient les concepts utilisés, le but de l'épidémiologie est de comprendre l'apparition d'une maladie et sa persistance afin de pouvoir soigner au mieux les populations. (Millet., 2011)

### 2.3.1 Epidémiologie classique

Les études d'épidémiologie classique étudient donc « la fréquence et la répartition des paramètres de santé ou des facteurs de risque dans les populations » (**Bouyer., 1995**)

Ces enquêtes reposent sur l'étude des statistiques de santé au sein des populations étudiées telles que la prévalence, le taux d'incidence, la mortalité et la morbidité ainsi que de leur variations spatio-temporelles (ou selon d'autres facteurs tels que l'âge ou le sexratio de la population de malades).

#### 2.3.1.1 Prévalence

« La première façon de mesurer le risque de maladie dans une population est de calculer la proportion de malades présents dans la population à un instant donné » (**Bouyer., 1995**)

$$\text{Prévalence}(P) = N/M$$

M étant le nombre de malades à un instant donné

N étant le nombre de total de sujets (malades et non-malades) de la population.

#### 2.3.1.2 Taux d'incidence

« Le taux d'incidence quantifie la production de nouveaux cas de malades dans une population ». « Le taux d'incidence est la quantité de nouveaux cas produits par unité de temps dans une population » (**Bouyer., 1995**)

L'incidence introduit la notion de vitesse d'apparition de malades permettant de comparer des populations différentes.

$$\text{Taux d'incidence}(TI) = m/PA$$

m : étant le nombre de malades

PA : étant le nombre de personnes comprises dans la population étudiée par unité de temps.

### 2.3.1.3 Mortalité / Morbidité

Le taux de mortalité est le rapport du nombre de décès de l'année à la population totale moyenne de l'année, tandis que la morbidité correspond à la fréquence d'une maladie dans une population (<http://www.insee.fr/fr/methodes/>).

### 2.3.2 Epidémiologie moléculaire

L'épidémiologie moléculaire a évolué à partir des concepts de l'épidémiologie classique et consiste à intégrer les données de géotypage aux études épidémiologiques classique basées sur les enquêtes autour des cas.

#### 2.3.2.1 Principe

Elle repose sur la caractéristique qu'ont les bacilles tuberculeux à avoir un mode de reproduction clonal. De cette caractéristique il a été déduit que :

- ✓ Les patients porteurs de souches aux profils génétiques identiques sont probablement épidémiologiquement liés (si les enquêtes autour des cas confirment l'existence d'un lien épidémiologique ils constitueront alors des cas de transmission récente).
- ✓ Les patients porteurs de souches dont les profils génétiques sont uniques correspondent probablement à des cas de réactivation, à des contacts sporadiques ou à des cas d'importation.

Le but des études d'épidémiologie moléculaire est d'étudier la dynamique et les modalités de transmission de la tuberculose. Les différentes études menées visent ainsi à mettre en évidence et à caractériser les grappes ou agrégats de cas de tuberculose afin de formuler des hypothèses sur les risques de transmission de la maladie, et à identifier le plus rapidement possible une épidémie de tuberculose. (Millet., 2011)

## 2.4 Tuberculose dans le monde

La tuberculose est un fléau mondial particulièrement dans les pays en voie de développement (tableau 02). Dans les pays industrialisés, l'incidence de la tuberculose diminue régulièrement depuis longtemps grâce aux progrès de l'hygiène, à l'amélioration des conditions de vie, et depuis quelques dizaines d'années grâce à l'utilisations d'une

## Partie 1 : Etude bibliographique

antibiothérapie efficace. Cette diminution régulière s'est ralentie vers 1986 à cause notamment de la pandémie de l'infection à VIH (Grange et al., 2001 ; Raviglione et al., 1993, Sudre et al., 1992). Néanmoins d'autres phénomènes expliquent son augmentation dans des pays comme l'ex-URSS (Perelman., 2000 ; Netesov et Conrad., 2001). Enfin, le phénomène de la multirésistance prend de l'ampleur au niveau mondial.

L'importance de la pathologie tuberculeuse a amené au séquençage de l'ensemble du génome du bacille tuberculeux (Cole et al., 1998).

**Tableau 01.** Estimations de l'incidence, de la prévalence et de la mortalité (OMS, 2008).

Région OMS	Incidence : Toutes formes		Prévalence		Décès par tuberculose	
	Nombre (milliers) (% du total mondial)	Pour 100 000 habitants	Nombre (Milliers)	Pour 100 000 habitants	Nombre (Milliers)	Pour 100 000 habitants
Afrique	2828(30)	351	3809	473	385	
Amérique	282(3)	31	221	24	29	3
Asie du sud-est	3213(34)	183	3805	216	477	27
Europe	425(5)	48	322	36	55	6
Ensemble du monde	9369(100)	139	11093	164	1322	20

### 2.5 Impact mondial de la tuberculose

On l'observe dans toutes les régions du monde. En 2015, il y a eu le plus grand nombre de cas en Asie, avec 61% des nouveaux cas, suivie de l'Afrique, avec 26% des nouveaux cas.

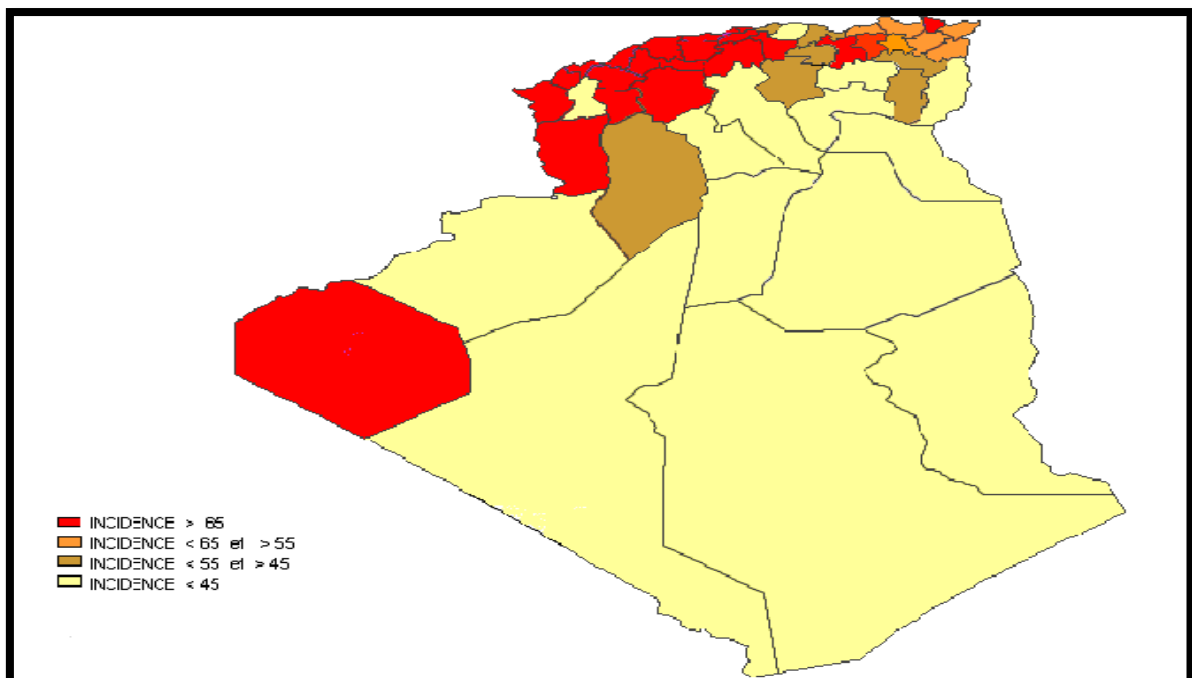
En 2015, 87% des nouveaux cas se sont produits dans les 30 pays à forte charge de la tuberculose. Six pays ont totalisé 60% des nouveaux cas : Inde, Indonésie, Chine, Nigéria, Pakistan et Afrique du Sud. Les progrès mondiaux dépendent de ceux qui seront faits dans ces pays pour la prévention et les soins de cette maladie (OMS., 2015)



### 2.6 Tuberculose en Algérie

**De 1991 à 1999 :** l'incidence déclarée de la tuberculose toutes formes, s'élève progressivement pour atteindre 60 cas pour 100 000 habitants. Pendant cette période, marquée par les déplacements de populations vivant dans les zones rurales reculées et l'insécurité empêchant les visites de supervision, on observe une stabilité relative de l'incidence annuelle des cas de tuberculose pulmonaire à microscopie positive déclarés, qui reflète la persistance d'une proportion non négligeable de la population vivant au-dessous du seuil de pauvreté. Dans le même temps, l'incidence annuelle des cas de tuberculose extra-pulmonaire déclarés augmente, rejoignant la courbe d'incidence des cas de tuberculose pulmonaire à microscopie positive.

**De 2000 à 2010 :** après la relance des activités du programme antituberculeux et grâce aux séminaires d'information qui ont eu lieu en 2001 et 2002, les données concernant la déclaration des cas sont exhaustives et concordantes. La tendance observée au cours de la décennie 1991-2001 se confirme : stabilisation de l'incidence des cas de tuberculose pulmonaire contagieuse autour de 26 cas pour 100 000 habitants et persistance d'un niveau élevé de l'incidence déclarée des cas de tuberculose extra pulmonaire. (**Manuel de la lutte antituberculeux., 2011**)



**Figure 02.** Incidence de la tuberculose toutes formes en 2009 selon les Wilayate. (**Manuel de la lutte antituberculeux., 2011**)

### Chapitre II : *Mycobacterium tuberculosis*

#### 1. Le genre *Mycobacterium*

##### 1.1 Les mycobactéries

Les bactéries du genre *Mycobacterium* sont des bacilles qui ne se colorent pas facilement mais qui, une fois colorés, résistent à la décoloration par l'acide et l'alcool et sont de ce fait dits « acido-alcool- résistants ». Les mycobactéries par ces caractéristiques bactériennes et ces conséquences en pathologie humaine comprend de nombreuses espèces saprophytes ou commensales et des espèces pathogènes dont les deux principales sont : *Mycobacterium tuberculosis*, agent de la tuberculose, et *Mycobacterium leprae*, agent de la lèpre. (Pierre et Curie., 2003)

##### 1.2 Définition

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'acidoalcool-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 29 brins d'ADN soient fortement liés et impose des conditions techniques particulières lorsqu'il faut rompre les 3 liaisons Hydrogènes. ( Deschaseaux., 2005)

### 1.3 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)

### 1.4 Taxonomie

Le genre *Mycobacterium* fait partie de l'ordre des *actinomycétales* dans lequel sont regroupées des bactéries filamenteuses capables de se ramifier ou étant plus pléiomorphes et de s'assembler en mycélium avec ou sans hyphes aériens. C'est le seul genre de la famille des *Mycobacteriaceae*, (tableau : 02). Le genre *Mycobacterium* d'abord défini par des caractères morphologiques et tinctoriaux (Wayne et Kubica., 1986)

**Tableau 02.** Classification du genre *mycobacterium* selon le manuel du Bergy.

<b>Règne</b>	<i>Bacteria</i>
<b>Embranchement</b>	<i>Actinobacteria</i>
<b>Ordre</b>	<i>Actinomycetales</i>
<b>Sous-ordre</b>	<i>Corynebacterineae</i>
<b>Famille</b>	<i>Mycobacteriaceae</i>
<b>Genre</b>	<i>Mycobacterium</i>

### 1.5 Classification

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

**1.5.1 Le complexe *tuberculosis* :** regroupe les espèces *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* et le BCG, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium canetti* et *Mycobacterium microti*.

## Partie 1 : Etude bibliographique

---

- *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, il 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.

**1.5.2 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 intracellulare*, *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.

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

### 2. *Mycobacterium tuberculosis*

#### 2.1 Habitat

*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)

#### 2.2 Identification phénotypique

Le diagnostic de certitude de la tuberculose repose sur la mise en évidence de *Mycobacterium tuberculosis* dans les prélèvements pathologiques : crachats et tubages gastriques pour la tuberculose pulmonaire ; urines, liquides de ponction des séreuses, etc... pour les autres localisations tuberculeuses.

##### 2.2.1 Examen direct

L'examen microscopique des frottis colorés par la méthode de ZIEHL-NEELSEN permet de mettre en évidence des bacilles acido-alcool-résistants (BAAR). Lorsqu'il est positif il permet un diagnostic de forte présomption de tuberculose. Bien qu'elles ne soient pas perméables à la coloration Gram (à cause d'une couche cireuse externe), ces bactéries sont toutefois considérées comme appartenant au type Gram positif étant donné leur absence de membrane externe. Les mycobactéries sont colorées par la Fuschine phéniquée à chaud (colorant énergétique) selon la méthode de Ziehl-Neelsen ils sont capables de conserver leur coloration par certaines molécules fuchsine, (retient le colorant malgré l'action combinée des acides et de l'alcool) les bacilles apparaissent roses sur fond bleu au Ziehl-Neelsen aussi Colorés par l'auramine phéniquée (Bacille devient fluorescent sous l'influence de la lumière UV). Ils sont BAAR (acido-alcool-résistantes) c'est dû à la présence d'acides mycoliques dans la paroi. (Freney et al., 2007)

##### 2.2.2 Caractère culturaux

*Mycobacterium tuberculosis* est un bacille à croissance très lente (2 à 6 semaines) et exigeant des milieux spéciaux. Aérobie stricte, Se dissocient très mal dans l'eau Pas de croissance sur les milieux ordinaires mais, sur milieux contenant du sérum, de la glycérine, de la pomme de terre glycinée, de l'oeuf ou de l'albumine bovine (milieux de Lowenstein Jensen). Le temps de génération est de 20h, les cultures ne seront positives qu'après une ou

## Partie 1 : Etude bibliographique

---

plusieurs semaines à 37°C. La culture est aussi possible en milieu liquide (Middlebrook, Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) par exemple) et en système automatisé. Les colonies apparaissent après 2 à 4 semaines et sont blanc-ivoire, rugueuses et adhérentes au milieu. Elles grossissent lentement pour atteindre 3-4 mm après 2-3 mois. Elles ont alors un aspect en chou-fleur la surface est franchement rugueuse et leur teinte vire au crème beige. (Marchal., 1987)

### 2.2.3 Caractère morphologique

*M. Tuberculosis* se présente sous forme de bacilles droits ou légèrement incurvés de 1 à 10 µm de long sur 0.2 à 0.6 µm de large, non mobiles ne formant pas de spores, conisies, hyphes aériens ni des capsules. Sa paroi est épaisse de 10 à 20 nm et il est formée, de l'intérieur vers l'extérieur, d'une bicouche lipidique (membrane plasmique), d'une couche formée de polymères et d'acides mycoliques et d'une seconde bicouche lipidique. (Freney et al., 2007)

### 2.2.4 Caractères chimiotaxonomiques

*Mycobacterium Tuberculosis* se caractérise par la présence d'arabinogalactane et d'acides mycoliques spécifiques. Les acides mycoliques sont des acides organiques gras alpha ramifiés et beta hydroxylés trouvés dans un certain nombre de genres de l'ordre des Actinomycétales. Les genres se différencient par leur nombre respectif d'atomes de carbone. Les mycobactéries possèdent les acides mycoliques les plus longs avec 60-90atomes de carbone. Leurs acides mycoliques sont les seuls à porter des groupement méthoxyliques, des fonctions cétones et carboxyliques, des ponts époxydes (Vincent et Portaels., 1992).

### 2.2.5 Constitution chimique et antigénique

*M.tuberculosis* est très riche en lipides. Ceux-ci représentent 20 à 45 % de l'ensemble de la bactérie. Surtout concentrés dans la paroi qu'ils rendent peu perméable aux substances hydrophiles, ce sont des acides gras complexes. Parmi ceux-ci les acides mycoliques jouent un rôle important dans l'acido-alcool-résistance et dans la structure très particulière de la paroi des mycobactéries, caractérisée par trois couches successives de constituants liés par des liaisons covalentes : le peptidoglycane, l'arabinogalactane et les acides mycoliques. Les constituants protéiniques sont les éléments importants de l'activité de la tuberculine qui est

## Partie 1 : Etude bibliographique

---

un mélange complexe. Les techniques de génie génétique ont permis d'obtenir plusieurs protéines purifiées à partir de la paroi. Les constituants de *M.tuberculosis* provoquent la formation de nombreux anticorps qui n'ont pas de rôle protecteur et sont de médiocres outils diagnostiques de la tuberculose.. Dans la tuberculose, l'immunité est à médiation cellulaire et non humorale. **(Pierre et Curie., 2003)**

### 2.2.6 Sensibilité aux agents physiques et chimiques

*Mycobacterium tuberculosis* peut survivre au froid et à la dessiccation, ce qui explique que l'on puisse l'isoler de façon transitoire dans l'environnement.

*Mycobacterium tuberculosis* est sensible aux agents physiques tels que les rayonnements ionisants, les rayons X, les UV dans certaines conditions, la lumière et la chaleur.

Sa sensibilité aux agents chimiques est variable : détruit par l'alcool à 70°, il résiste à de nombreux antiseptiques, aux bases et aux acides dilués. **(Deschaseaux., 2005)**

### 2.3 Les tests biochimiques

*M.tuberculosis* est aérobic strict. Il est catalase positive, nitrate positif. Au cours de sa croissance il synthétise une quantité importante d'acide nicotinique ou niacine qui peut être mise en évidence par une épreuve biochimique, le test de KONNO ou *niacine-test*. La positivité de cette épreuve est spécifique de *M.tuberculosis*. **(Pierre et Curie., 2003)**

#### 2.3.1 Catalase thermosensible ou thermorésistante

Les mycobactéries sont toutes catalase positives à 22°C, à l'exception de certaines souches tuberculeuses isoniazide résistantes. Les souches tuberculeuses voient l'activité de leur catalase, mesurée de façon semi-quantitative, détruite par chauffage à 68°C.

Quelques colonies de la souche sont mises en suspension dans un tampon phosphate 67 mmol /L (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 61/39 V/V) dans deux tubes. Un volume de 0.5 ml d'un mélange extemporané eau oxygénée/ Tween 80 à 10 % est rajouté dans le premier tube, puis dans le deuxième après un chauffage à 68°C 20 minutes et son retour à température du laboratoire. L'activité catalase est révélées par une émission rapide de bulles et évaluée par la mesure de leur hauteur. L'activité catalase est absente lorsque aucune bulle n'est obtenue après 20 minutes. Des contrôles de qualité interne catalase thermorésistante et

## Partie 1 : Etude bibliographique

---

thermosensible, respectivement une souche de *M. Kansasii*, et une souche de *M. tuberculosis* sont joints à la série de souches à identifier. (Panteix., 2007)

### 2.3.2 Test à la niacine

La niacine ou acide nicotinique est synthétisé et excrétée dans le milieu par certaines espèces de mycobactéries. Sa mise en évidence nécessite des cultures anciennes sur milieu solide et suffisamment abondantes.

Deux méthodes sont disponibles, la réaction classique en milieu liquide utilise des réactifs à manipuler avec précautions, l'autre en chimie sèche utilise une bandelette papier Difco. La chimie sèche exige de bonnes conditions de conservation.

Les colonies sur milieux à l'œuf sont mises en contact avec 1 ml d'eau distillée une quinzaine de minutes et peuvent être détachées avec une oese stérile. A un volume de 0.5 ml de la suspension obtenue est rajouté dans un tube à hémolyse 0.5 ml de solution d'aniline (ou de benzidine) à 4 % dans l'éthanol 95° puis 0.5 ml de solution de bromure de cyanogène 10% dans l'eau distillé. Ces deux solutions préparées sous hotte chimie sont conservées à +4°C à l'abri de la lumière. Le test est positif lorsqu'une coloration jaune pour l'aniline et rose pour la benzidine apparait. Une souche de *M. tuberculosis* et une souche de *M. gastri* sont utilisées comme contrôle de qualité interne positif et négatif respectivement. Ce test différencie à l'intérieur de *M. tuberculosis Complex*, les souches de *M. tuberculosis* qui produisent de la niacine de celles de *M. bovis* qui n'en produisent jamais. Les souches de *M. africanum* peuvent produire de la niacine ou ne pas en produire. Parmi les mycobactéries non tuberculeuses, certaines souches de *M. simiae* produisent de la niacine, ainsi que de rares souches de *M. marinum*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*. (Panteix., 2007)

### 2.3.3 Réduction des nitrates

Quelques colonies sont mises en suspension dans de l'eau distillée. Un volume de 2 ml de nitrate de sodium 10 mmol/L en tampon phosphate 22 mmol/L p H 7 est ajouté et le tube incubé bouché 2 heures à 37 °C. une goutte d'acide chlorhydrique concentré dilué au demi, deux gouttes de solution de sulfanilide 0.2%, deux gouttes de solution de N(1-Naphtyl) éthylène diamine dihydrochlorique 0.1 % sont successivement ajoutées et mélangées.

L'apparition d'une coloration rouge ou rose signe la positivité. La coloration obtenue pour la souche sera comparée à celle obtenue dans un témoin réactif sans colonies.



## Partie 1 : Etude bibliographique

Un réactif nitrites I et II est disponible (bioMérieux). Deux gouttes de chaque réactif sont ajoutées comme précédemment.

La grande majorité des souches de *M. tuberculosis* réduisent les nitrates. Il existe de rares souches de *M. tuberculosis* ne les réduisant pas. Les souches de *M. bovis* et *M. africanum* ne réduisant pas les nitrates. (Panteix., 2007)

### 2.3.4 Test de croissance sur milieu solide additionné d'acide thiophène 2 carboxylique ou TCH

Quelques colonies sont mises en suspension dans de l'eau distillée de façon à obtenir un trouble léger. La suspension obtenue est diluée une première fois au 1/100. Un volume de 0.1 ml de cette suspension est ensemencé sur un milieu avec TCH : soit un milieu fabriqué et supplémenté 7H10 ou 7H11 avec 2 mg/l de TCH, soit un milieu Lowenstein-Jensen à 5 mg/l (BioMérieux). Un milieu identique sans TCH est ensemencé avec un inoculum obtenu par dilution au 1/100 de la suspension inoculée sur le milieu avec TCH (1/100 000). Des contrôles de qualité internes positif (souche de *M. tuberculosis*) et négatif (souche de *M. bovis*) sont ensemencés dans la même série que les souches à identifier. La croissance des souches de *M. bovis* est inhibée en présence de TCH, les souches de *M. africanum* sont, soit sensibles, soit résistantes au TCH. Une résistance à l'isoniazide entraîne celle au TCH. *M. tuberculosis* et les autres espèces de mycobactéries sont résistantes au TCH. (Panteix., 2007)

**Tableau 03** : identification biochimique du complexe *M. tuberculosis* (Marchal., 1987)

	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. Bovis</i>	<i>M. africanum</i>
Groupe de runyon	Bacilles tuberculeux	Bacilles tuberculeux	Bacilles tuberculeux
Vitesse de croissance	12-30 jour	25-90 jour	14-90 jour
Niacine	+	-	+/-
Réduction des nitrates en nitrites	+	-	+/-
Catalase	+	+	+
Uréase	+	+	+/-
Hydrolyse tween 80	+/-	-	+/-
B-glucosidase TCH	+	-	-
Signification	PS (Pathogène strict )	PS(Pathogène strict )	PS(Pathogène strict )

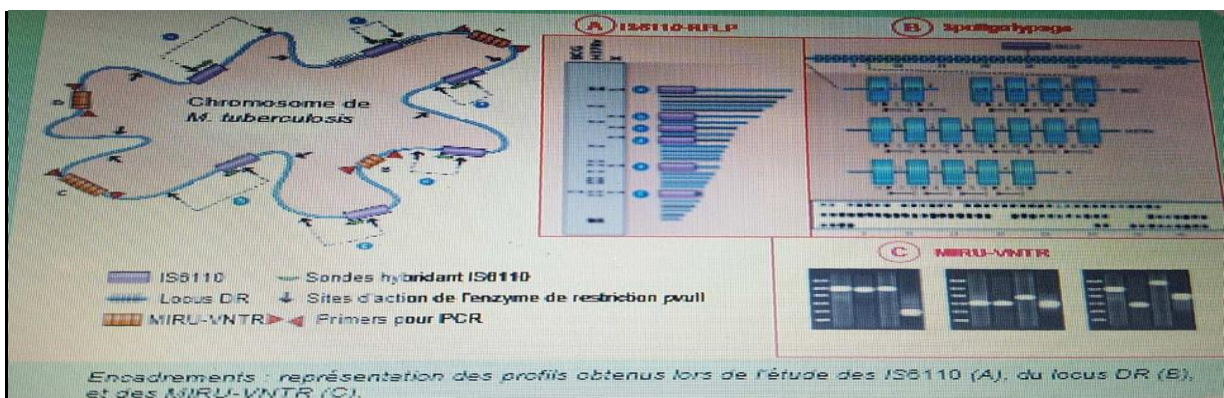
### 2.4 Identification génotypique

Des séquences d'ADN spécifiques est 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)

#### 2.4.1 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 intergéniques et dont le nombre de séquences répétées par locus est variable d'une souche à l'autre. (Millet., 2011)



**Figure 03 :** Représentation du chromosome de *M. tuberculosis* avec la localisation de trois principaux marqueurs de génotypage : les séquences d'insertion IS6110, le locus DR, et les minisatellites MIRU-VNTR (Barnes et al., 2003)

#### 2.4.2 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% (Cole et al., 1998). 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

## Partie 1 : Etude bibliographique

---

matériel génétique est quasi-absent chez *M. tuberculosis* (Sreevatsan, 1997). 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 (Brosch et al., 2000). 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 synthases. 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 (cole., 1999). Par ailleurs, il n'a été détecté qu'un seul opéron codant pour l'ARN ribosomal (opéron *rrn*) 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 et Fleischmann., 2002).

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.

(<http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>)

### 2.4.3 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-6*<sup>3</sup>, 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. (Meyssonnier., 2013)

### 2.4.4 Contenu en CG %

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)

### 2.4.5 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).

## 2.5 Les antituberculeux

### 2.5.1 Sensibilité aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des souches aux antituberculeux majeurs nécessite qu'un antibiogramme soit systématiquement entrepris dès l'isolement et l'identification de la

## Partie 1 : Etude bibliographique

---

souche. Les cinq antituberculeux majeurs seront toujours testés : Isoniazide, Rifampicine, Ethambutol, Streptomycine et Pyrazinamide.

Quand il existe des résistances aux antituberculeux, elles sont dues à des mutations chromosomiques, la résistance à la Rifampicine étant la plus fréquente et souvent associée à une résistance à l'Isoniazide.

L'antibiogramme s'effectue selon la méthode des proportions et consiste à détecter le pourcentage de mutants résistants dans la population de bacilles isolés chez le patient par comparaison à une culture témoin sans antibiotique. Si on observe plus de 1% de mutants résistants, on considère qu'il existe un risque d'échec du traitement. Cette méthode est classiquement pratiquée en milieu solide, sur des milieux de Loewenstein-Jensen, mais elle a également été adaptée aux milieux liquides.

### 2.5.2 Mécanismes de résistance aux antibiotiques

#### 2.5.2.1 Isoniazide

L'isoniazide (INH) est l'antibiotique le plus largement utilisé pour le traitement de la tuberculose maladie aussi bien que de la tuberculose latente, les souches de *M. tuberculosis* étant naturellement sensibles à l'INH (Zhang, 2009). L'INH nécessite d'être activée par une catalase peroxydase (codée par le gène *katG*) pour être efficace. Une fois activée, elle inhibe alors la synthèse des acides mycoliques de la paroi en interagissant avec l'enzyme enoyl-ACP réductase codée par le gène *inhA*, et favorise ainsi l'accumulation de radicaux libres par la bactérie. Les mutations ponctuelles du gène *katG*, en empêchant l'activation de l'INH, sont un mécanisme principal de résistance à cet antibiotique et concernent de 50 à 95% des souches résistantes à INH (Zhang, 2009). Bien que de nombreuses mutations aient été décrites pour le gène *katG* (Sreevatsan, 1997 ; Hazbon et al., 2006), c'est la mutation du codon 315 qui prédomine avec une occurrence comprise entre 60 et plus de 90% des souches résistantes à l'INH (Musser et al., 1996 ; Mokrousov, 2002 ; Marttila et al., 1996 ; Marttila et al., 1998). Certains autres gènes de résistance ont été identifiés, tels que *inhA*, *ahpC*, *kasA*, *ndh*, *efpA* ou encore la région promotrice de l'opéron *mabA/inhA*, notamment la mutation -15C/T, et la région promotrice du gène *ahpC* (Vilcheze et Jacobs, 2007 ; Sreevatsan et al., 1997 ; Sherman et al., 1996 ; Ramaswamy et al., 2003 ; Ramaswamy, 1998 ; Musser et al., 1996 ; Hazbon et al., 2006 ; Basso et al., 1998).

### 2.5.2.2. Rifampicine

Utilisée depuis 1966, la rifampicine (RIF) est avec l'isoniazide un des antibiotiques majeurs du traitement de première intention de la tuberculose. L'essentiel de la résistance à RIF est associé à des mutations ponctuelles intervenant dans une région cible de 81 paires de bases (pb) ou région RRD (RIF Resistance Determining) du gène *rpoB* codant pour la sous-unité  $\beta$  de l'ARN polymérase (**Zhang et Telenti., 2000**). En effet, plus de 95% des souches résistantes à RIF montrent une mutation dans cette région RRD. Les mutations les plus fréquentes interviennent au niveau des codons 531, 526 et 516 et sont généralement associées à de hauts niveaux de résistance tandis que celles intervenant au niveau des codons 511, 516, 518, et 522, ont été associées à de faibles niveaux de résistance (**Zhang., 2009**).

### 2.5.2.3 Éthambutol

L'éthambutol (EMB) inhibe la croissance bactérienne en interrompant la synthèse d'arabinogalactane, composant indispensable de la paroi bactérienne (**Takayama et Kilburn., 1989**). Les mutations de l'opéron *embCAB*, codant pour une arabinosyl transférase impliquée dans la synthèse d'arabinogalactane, sont les principaux mécanismes actuellement identifiés de résistance à EMB, notamment la mutation du codon 306 d'*embB* (**Sreevatsan., 1997 ; Telenti et al., 1997**). Cette mutation a en effet été retrouvée chez 47 à 68% des souches de *M. tuberculosis* présentant de forts taux de résistance à EMB (**Sreevatsan., 1997 ; Telenti et al., 1997 ; Zhang et Telenti., 2000**). Cependant chez 25 à 35% des souches présentant une faible résistance à EMB aucune résistance n'a pu être détectée au sein de l'opéron *embCAB*, ce qui suggère l'existence d'autres mécanismes de résistance (**Alcaide., 1997 ; Telenti et al., 1997**).

## **Partie 2 : Etude méthodologique**

## Partie 2 : Méthodologie

### 1. Objectifs

Cette étude consiste à identifier le germe responsable de la tuberculose à savoir le *Mycobacterium tuberculosis* et détecter sa résistance vis-à-vis d'un antituberculeux le plus utilisé pour le traitement de la maladie dont la rifampicine en appliquant deux approches de diagnostic bactériologique :

- ✓ Les méthodes classiques basées sur l'examen microscopique et de mise en culture ;
- ✓ Les méthodes moléculaires modernes en appliquant celle du Gène-Xpert MTB/RIF pour la détection du gène de MTB /RIF.

### 2. Lieu du stage

L'étude a été réalisée durant la période allant du mois de mars au mois d'avril 2017, au niveau de deux laboratoires d'analyses médicales ; l'un relevant de l'hôpital militaire d'Oran et l'autre privé nommé CHERIF Touil situé à SIG- Wilaya de Mascara.

### 3. Prélèvements d'échantillons

La qualité des prélèvements est primordiale pour optimiser le diagnostic. L'émission des bacilles étant souvent discontinue, les examens bactériologiques sont réalisés 3 jours consécutifs avant la mise en route d'un traitement antituberculeux, ou après un arrêt de 3 jours de traitement. Par ailleurs, les prélèvements seront répétés s'ils se révèlent négatifs ; alors que la symptomatologie est évocatrice de tuberculose. Les prélèvements ne nécessitent pas de conditions particulières notamment de transport ou de température car les bacilles tuberculeux sont des germes résistants (**Deschaseaux., 2005**).

Les prélèvements de crachats ont été effectués chez cinq patients tuberculeux orienté par les médecins soignant au niveau du laboratoire de bactériologie de CHERIF TOUIL sise à Sig-Mascara.

#### 3.1. Mode de prélèvement du crachat

Les crachats émis spontanément sont recueillis directement dans des flacons stériles noir car les mycobactéries sont sensibles à la lumière, de préférence le matin au réveil, 3 jours de suite. Il est important d'obtenir des crachats d'origine bronchique et non salivaire.



Il est possible au besoin de faire recours à l'expectoration provoquée par un aérosol de solutés salins ou à une séance de kinésithérapie. (Deschaseaux., 2005)

### 4. Examen microscopique

#### 4.1 Préparation du frottis

Les étalements sont réalisés directement à partir d'une fraction purulente (expectoration) sur une lame mince lame le N° du prélèvement correspondant. Faire un frottis fin sur les 2/3 de la lame (un frottis fin permet de voir à travers les lettres noires d'une page imprimée); trop épais le frottis se décolle. Laisser sécher le frottis (à l'air ou sur une plaque chauffante à température moyenne).

#### 4.2 Coloration de Ziehl-Neelsen

La coloration de Ziehl-Neelsen est une coloration assez spécifique pour les mycobactéries. Elle repose sur une caractéristique fondamentale d'alcool-acido résistance, liée à la présence importante de lipides au niveau de leur paroi.

La méthode utilisant la fuchsine s'effectue en trois temps :

1<sup>er</sup> temps : coloration par la fuchsine à chaud

- On recouvre le frottis d'un papier filtre imprégné de fuchsine de Ziehl.
- Chauffage à émission de vapeur 3 fois pendant dix minutes au moins, en veillant à ne pas laisser sécher le papier. Rinçage à l'eau distillée stérile.

2<sup>e</sup> temps : décoloration

- Trempage de la lame deux minutes dans une solution d'acide, suivi d'un rinçage.
- Trempage de la lame cinq minutes dans l'alcool à 90°, suivi d'un rinçage.

3<sup>e</sup> temps : recoloration

- On recouvre la lame pendant deux minutes d'une solution de bleu de méthylène, puis on rince. (Freney et al., 2007)

Cette première étape du diagnostic est primordiale. Simple et rapide, c'est parfois la seule méthode de diagnostic disponible dans les pays en voie de développement.

*Le Mycobacterium tuberculosis* se présente sous forme de bacilles de 5 µm de long souvent disposé en cordes.

Très utile, l'examen microscopique permet un diagnostic d'orientation, il est généralement bien corrélé aux résultats de la culture mais manque de sensibilité (40-50%). Il faut au moins 10<sup>4</sup> bacilles par millilitre de prélèvement pour que l'examen microscopique soit positif. Il est donc complété par d'autres examens, techniques de biologie moléculaire et mise en culture.

## 5. Culture

### 5.1 Préparation d'échantillon

Il faut distinguer deux catégories de prélèvement :

- les prélèvements réalisés au niveau de sites stériles tels que les liquides d'épanchement sont supposés ne pas renfermer d'autres germes, ils sont ensemencés directement ou après une étape de centrifugation pour concentrer les bacilles.
- les prélèvements susceptibles d'être contaminés par d'autres germes, c'est-à-dire effectués au niveau de sites non stériles, nécessitent une étape préalable de décontamination afin d'éliminer la flore tout en respectant les mycobactéries (**Deschaseaux., 2005**)

### 5.2 Décontamination

On utilise pour cela les propriétés de résistance des mycobactéries à certains agents antiseptiques, aux bases et aux acides.

La méthode utilisée est celle de Kubica (N-acétyl- cystéine) : qui consiste à transférer 2 ml maximum de prélèvement dans un pot conique, puis ajouter 2ml de la solution contenant soude/citrate et N-Acétyl- L-Cystéine à 0,5% (NAACL), suivie pendant 20 minutes d'une agitation à température ambiante. Cette étape s'accompagne d'une fluidification des prélèvements destinée à optimiser l'action des décontaminant (**Deschaseaux., 2005**)

### 5.3 Une neutralisation et centrifugation

Après action d'un agent fluidifiant et décontaminant, le milieu est neutralisé puis le prélèvement est centrifugé. 18 ml de tampon phosphate sont additionnés, poursuivis d'une centrifugation pendant 20 minutes à 3500 tours /minute (**Deschaseaux., 2005**)

### 5.4 Ensemencement

Le culot de centrifugation est ensemencé dans au moins deux tubes contenant le milieu de Loewenstein-Jensen.

### 5.5. Incubation

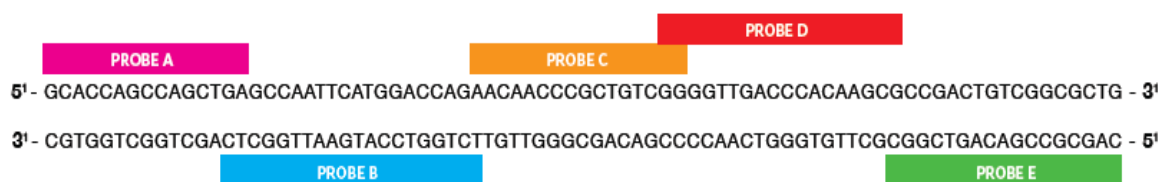
Les tubes ensemencés sont incubés à 37°C pendant 4 à 12 semaines.

## 6. Identification génotypique par Technique GeneXpert MTB/RIF

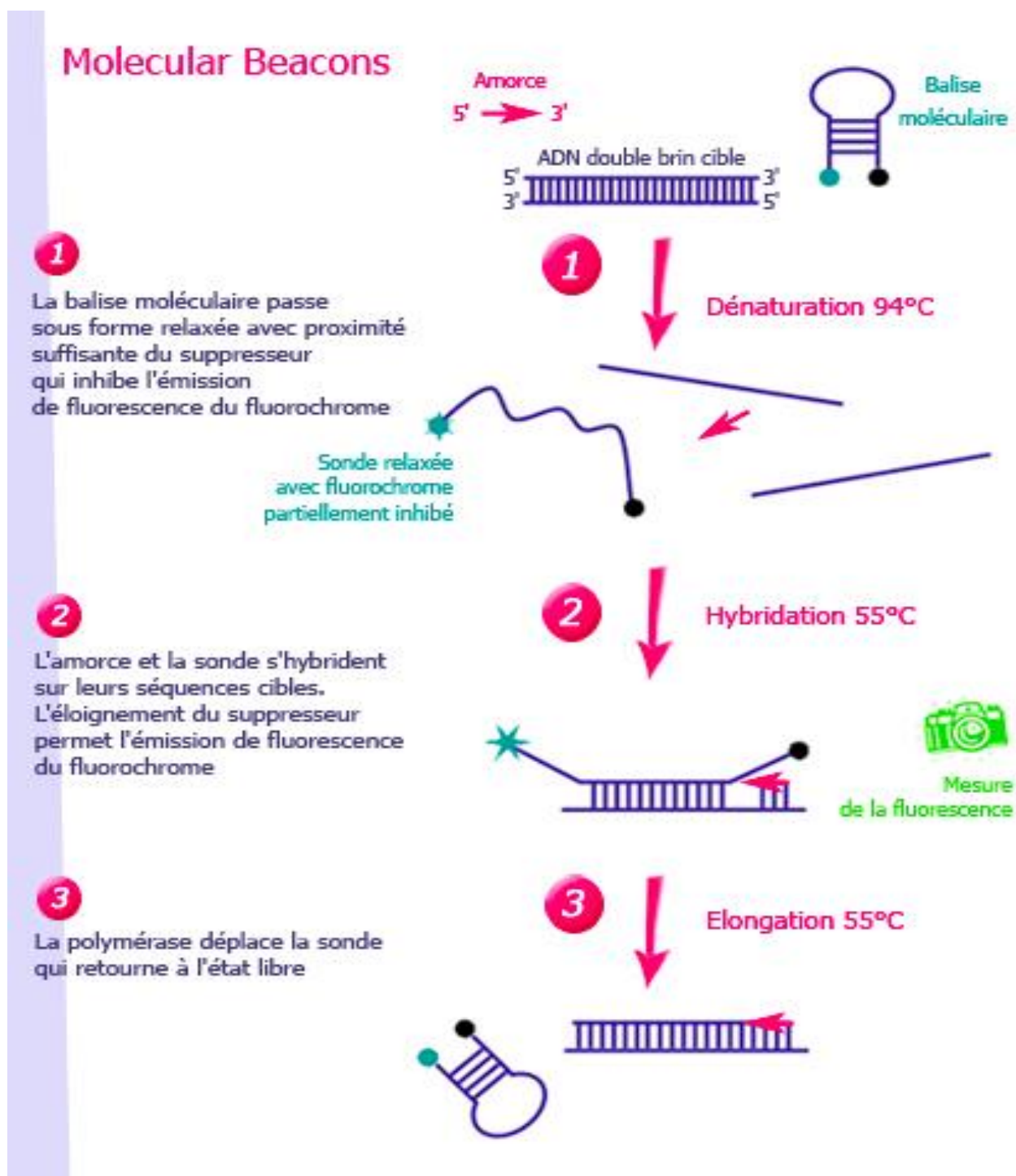
### 6.1 Principe

Amplification en temps réel. Détection ADN de complexe *M. tuberculosis*. Détection résistance à la Rifampicine. L'essai Xpert MTB/RIF a une sensibilité analytique de cinq copies du génome d'ADN purifié (figure 4) et de 131 ufc/ml de *M. tuberculosis* ajoutées aux expectorations. Les balises moléculaires ciblent le gène *rpoB* couvrent toutes les mutations retrouvées dans plus de 99,5 % de toutes les souches résistantes à la rifampicine (81pb du gène *rpoB* région déterminant la résistance à la rifampicine. Il n'y a pas de réactions croisées avec les mycobactéries non tuberculeuses, et la tuberculose comme la résistance à la rifampicine ont été correctement décelées en présence d'ADN non tuberculeux ou d'un mélange de souches sensibles et résistantes. On a montré que le réactif ajouté à l'échantillon d'expectorations dans un rapport de 2/1 tuait plus de 6 log10 ufc/ml de *M. tuberculosis* en 15 minutes d'exposition et négativait plus de 97 % des échantillons à frottis positif en culture. La procédure d'inoculation et l'analyse de l'échantillon avec le système Xpert MTB/RIF n'ont produit aucun aérosol infectieux détectable (OMS.,2011)

#### *rpoB* GENE 81 bp RIF RESISTANCE DETERMINING REGION



**Figure 04.** Les 5 sonde du gène *rpoB* 81 pb RIF région de détermination à la résistance à la rifampicine. (OMS, 2011)



**Figure 05** : résumé du principe du technique GeneXpert MTB/RIF (OMS, 2011).

## 6.2 Intérêt

La mise au point de l'essai Xpert MTB/RIF pour la plate-forme GeneXpert s'est achevée en 2009 et l'on considère que c'est une percée importante dans la lutte contre la tuberculose. Pour la première fois, on dispose d'un test moléculaire suffisamment simple et robuste pour pouvoir l'introduire en dehors du cadre classique des laboratoires. Il permet

de détecter *M. tuberculosis*, ainsi que les mutations conférant la résistance à la rifampicine, à l'aide de trois amorces spécifiques et de cinq sondes moléculaires uniques garantissant un haut degré de spécificité. L'essai fournit directement les résultats à partir des expectorations en moins de deux heures. Il est important de souligner ici que la plate-forme GeneXpert et l'essai Xpert MTB/RIF sont actuellement la seule technique parvenue à maturité, mais qu'ils représentent une nouvelle génération de plates-formes de diagnostics moléculaires. Les autres en sont au stade du prototype et devraient être disponibles en temps voulu (OMS,2011).

### 6.3 Résumé des recommandations

La procédure de synthèse des données par l'OMS a confirmé une base factuelle solide étayant un usage généralisé du système Xpert MTB/RIF pour la détection de la tuberculose et de la résistance à la rifampicine et a abouti aux principales recommandations suivantes :

1. Le système Xpert MTB/RIF devrait être utilisé comme test diagnostique initial en cas de présomption de tuberculose MR ou de tuberculose associée au VIH. (Forte recommandation)
2. On peut envisager le système Xpert MTB/RIF comme test complémentaire à la microscopie dans les situations où la tuberculose MR ou le VIH sont moins préoccupants, en particulier en cas d'échantillons à frottis négatif. (Recommandation avec réserve, reconnaissant les conséquences majeures au niveau des ressources) (OMS,2011).

### 6.4 Protocole de la technique

L'analyse comporte trois étapes manuelles (Figure 6) :

- L'addition du réactif (isopropanol / soude) à l'échantillon pour liquéfier les expectorations et inactiver les bacilles. On Verse 2 volumes pour 1 volume échantillon (crachat direct) puis on agite le mélange et on lèsele reposer 10 min.
- Le transfert de 2 ml d'expectorations liquéfiées dans la cartouche et
- Le chargement de la cartouche dans l'appareil pour le test. Toutes les étapes ultérieures sont automatisées. Le test peut être fait directement

sur un échantillon clinique d'expectorations ou sur un pellet concentré et décontaminé.



**Figure 06.** Les étapes du test Xpert MTB/RIF (Francis, 2011).

### 6.5. Précautions

Les précautions suivantes doivent être prises en considération lors du test :

- ❖ Ne pas ouvrir la cartouche à l'avance ;
- ❖ N'ouvrir le couvercle de la cartouche que pour ajouter un échantillon ;

Ne pas utiliser une cartouche qui est tombée ou qui a été

- ❖ agitée après avoir ajouté l'échantillon ;
- ❖ Ne pas utiliser une cartouche humide ou cassée ;
- ❖ Ne pas réutiliser les cartouches.

## **Partie 3 : Résultats et Discussion**

### Partie 1 : Résultats et Discussion

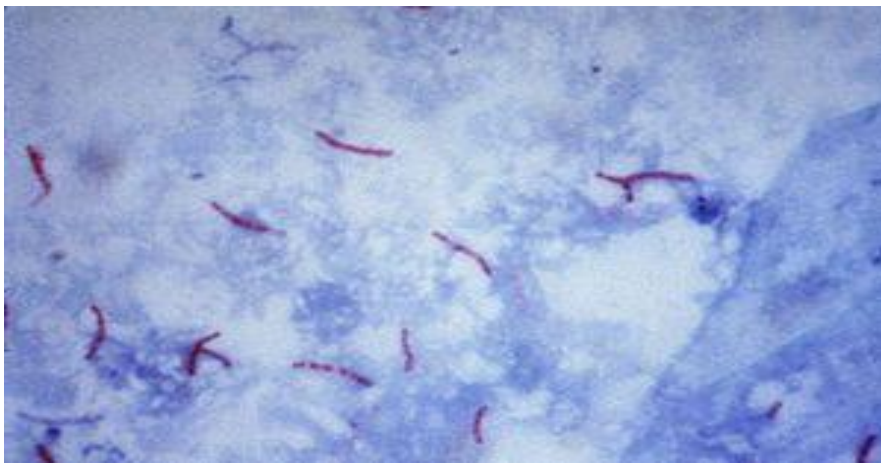
Plusieurs outils efficaces sont mis en avant pour détecter le germe le *Mycobacterium tuberculosis* responsable de la tuberculose et ce pour réaliser un diagnostic bactériologique correct dont : l'examen du prélèvement au microscope (3x pour les crachats), la culture dont la réalisation prend notamment du temps (6 semaines en moyenne), les méthodes moléculaires qui sont en plein essor et l'histologie.

#### 1. Examen Direct au microscope

La lecture des étalements des 5 échantillons de crachats ayant été prélevés chez 5 patients atteints de tuberculose, après coloration de Ziehl-Neelsen est effectuée au microscope à transmission optique, avec objectif de 100 sous immersion avec de l'huile minérale.

Cet examen direct (ED) a un double rôle. Il permet d'une part d'avoir des résultats de type qualitatif en indiquant seulement après observation au microscope soit une présence ou une absence de bacilles acido-alcool-résistants (BAAR) dans les crachats des patients. Il permet en d'autre part de récolter des résultats de type quantitatif en évaluant le nombre des bacilles acido-alcool-résistants (BAAR) présents dans l'échantillon analysé (**Freney., 2007**).

La vue au microscope après coloration de Ziehl-Neelsen, montre que les bacilles acido-alcool-résistants (BAAR) suspectant une présence de *Mycobacterium tuberculosis* se présentent sous forme de bâtonnets de 5 µm de long et souvent disposés en cordes (**Figure 7**).



**Figure 07.** Observation microscopique des Bacilles Acido-Alcool-Résistants (BAAR) par la méthode de Ziehl-Neelsen (X100).



### Partie 3 : Résultats et Discussion

L'examen direct a été également effectuée par lecture de 300 champs des lames au microscope et les résultats ont été exprimés comme suit :

- ❖ Si le dénombrement est de 50 bacilles pour 300 champs ; ceci suppose que le nombre des Bacilles Acido-Alcool-Résistants (BAAR) est rare dans les prélèvements,
- ❖ Si le nombre est de 100 bacilles pour 300 champs ; ceci indique que le prélèvement d'échantillon analysé renferme quelques BAAR,
- ❖ Si le nombre est de plus de 200 bacilles par 300 champ ; ceci confirme que le prélèvement analysé renferme de nombreux Bacilles Acido-Alcool-Résistants (BAAR) (Freney., 2007)

Apparemment, deux patients ont présenté un nombre de Bacilles Acido-Alcool-Résistants (BAAR) très élevé ; supérieur à 200 bacilles pour 300 champs. Par ailleurs, un patient seulement a accusé un faible nombre de BAAR d'environ 99 bacilles pour 300 champs. En outre, l'analyse des crachats effectués chez deux patients n'ont pas présenté aucune présence de BAAR (**Tableau 4**).

**Tableau 4.** Examen direct (ED) du nombre des Bacilles Acido-Alcool-Résistants (BAAR) par la méthode de coloration de Ziehl-Neelsen.

Analyse quantitative des prélèvements de crachats	Patients Concernés				
	1 <sup>er</sup> Patient	2 <sup>ème</sup> Patient	3 <sup>ème</sup> Patient	4 <sup>ème</sup> Patient	5 <sup>ème</sup> Patient
Nombre des BAAR sur 300 champs	99	220	140	00	00

**BAAR : Bacilles Acido-Alcool-Résistants.**

En général cet examen direct n'est pas toujours positif. Dans notre étude, seuls 3/5 des cas de tuberculoses pulmonaires avaient un examen direct positif. Cette technique directe et rapide de diagnostic ne permet pas réellement de séparer d'une manière exhaustive les bactéries responsables de la tuberculose de ceux non tuberculeuse (**Freney, 2007**). Au fait, l'examen microscopique est peu spécifique, les BAAR vus à l'examen direct n'étant pas forcément des mycobactéries tuberculeuses (mycobactéries atypiques chez les immunodéprimés ou les insuffisants respiratoires chroniques). Il est également peu sensible (la sensibilité de la recherche des BAAR dans les crachats est de 50 à 70 % et s'effondre même à 20-50 % chez les sujets VIH +) (**Ferrand., 2012**). Par ailleurs, en se basant sur l'examen microscopique comme seul outil de diagnostic on peut être confronté à des retards voire absence de diagnostic pouvant entraîner même à un risque de contagion non seulement au sein de la famille mais également au sein des professionnels de la santé (**Mase et al., 2007**). C'est pour cela que le recours à d'autres techniques plus élaborées d'identification et de confirmation de l'agent causal de la maladie sont plus que nécessaires dont : tests biochimiques (mise en évidence de l'équipement enzymatique du Bacille de Koch), tests culturels (Aspect, vitesse, croissance en présence d'inhibiteurs), et techniques moléculaires (sondes d'hybridation).

### 2. Mise en culture sur milieu Loewenstein-Jensen :

La mise en culture des différents prélèvements est réalisée sur milieu de Loewenstein-Jensen, suivi d'une incubation à une température de 37°C avec un délai moyen de poussée de plus de 21 jours voir 30 jours. Les colonies de *Mycobacterium tuberculosis* apparaissent de teinte crème-beige, sèches, à surfaces rugueuses et d'un aspect de chou-fleur.

D'autres aspects des colonies peuvent apparaître après culture signifiant la présence d'autres espèces de *Mycobacterium* comme les *Mycobacterium bovis* qui se présentent sous forme de colonies petites, bombées et lisses (**Deschaseaux., 2005**).

Les résultats de mise en évidence de *Mycobacterium tuberculosis* après culture sur milieu spécifique de Loewenstein-Jensen sont mentionnés dans le (**Tableau 5**).

Trois prélèvements d'échantillons effectués chez trois patients tuberculeux ont présenté un résultat de culture positif indiquant une présence certaine de colonies de *Mycobacterium sp.* Par ailleurs, deux des prélèvements positifs ont marqué une poussée de *Mycobacterium* sur milieu LJ (Loewenstein-Jensen) après seulement 15 jours d'incubation ;

### Partie 3 : Résultats et Discussion

alors qu'un autre prélèvement positif est décelé après un délai de 30 jours d'incubation. La culture était donc positive dans 3/5 de tous les cas de tuberculose pulmonaire recensés.

**Tableaux 5.** Test confirmatif de *Mycobacterium tuberculosis* de mise en culture sur milieu de Loewenstein-Jensen.

Résultats des prélèvements	Patients Concernés par les prélèvements d'échantillons de crachats				
	1 <sup>er</sup> Patient	2 <sup>ème</sup> Patient	3 <sup>ème</sup> Patient	4 <sup>ème</sup> Patient	5 <sup>ème</sup> Patient
Résultat de culture sur milieu spécifique.	Positif	Positif	Positif	Négatif	Négatif
Aspect des colonies	Grosses colonies rugueuses ayant un aspect de Chouf-leur	Grosses colonies rugueuses ayant un aspect de Chouf-leur	Colonies bombées, petites et lisses	–	–
Délai de culture	15 jours	15 jours	30 jours	–	–

Concernant cette technique dite classiques de culture à côté de celle d'antibiogramme, outre la lenteur des résultats, l'obligation d'avoir un laboratoire de niveau 3 et des techniciens nombreux et qualifiés (de nombreux pays pauvres n'ont pas accès à la culture) constituent des facteurs limitants (Freney et al., 2007)

### 3. Identification génomique par Xpert MTB/RIF

Devant le manque de fiabilité des examens classiques, les techniques moléculaires dont notamment celle de GeneXpert se sont développées en vue d'améliorer la qualité du diagnostic permettant ainsi au médecin soignant d'agir à temps pour vaincre la maladie. (Steingart., 2014)

En effet, le test Xpert MTB/RIF réduit le délai de mise en route des traitements antituberculeux particulièrement pour les tuberculoses à microscopie négative. De très nombreuses études ont montré que la sensibilité de ce test est excellente (99 % quand la microscopie est positive et baisse à 75% quand la microscopie est négative) (Ferrand., 2012).

### Partie 3 : Résultats et Discussion

Ces nouvelles techniques beaucoup plus performantes permettent non seulement d'avoir une réponse rapide sur le diagnostic ; mais détectent également rapidement la résistance du microorganisme responsable de la tuberculose à savoir le *Mycobacterium tuberculosis* à certains antibiotiques tels la rifampicine et l'isoniazide (OMS., 2011). La mono-résistance à la rifampicine est un phénomène rare faisant de cet antibiotique un très bon marqueur de multi-résistance (Ferrand., 2012). La réalisation de ce test, qui nécessite une décontamination obligatoire du prélèvement respiratoire, est très simple (insertion du prélèvement dans une cartouche qui contient tous les réactifs nécessaires à la lyse des bactéries, puis à l'amplification et à la détection de l'ADN mycobactérie) et le résultat imprimable est obtenu en 2 heures de temps, ce qui réduit considérablement le délai diagnostique (Ferrand., 2012).

Les résultats d'identification moléculaire de *Mycobacterium tuberculosis* par La technique GeneXpert MTB/RIF effectués chez les patients inclus dans l'étude et supposés atteints de tuberculose sont mentionnés dans le (Tableau 6).

**Tableau 6.** Résultat d'identification des *Mycobacterium tuberculosis* par la technique GeneXpert MTB/RIF.

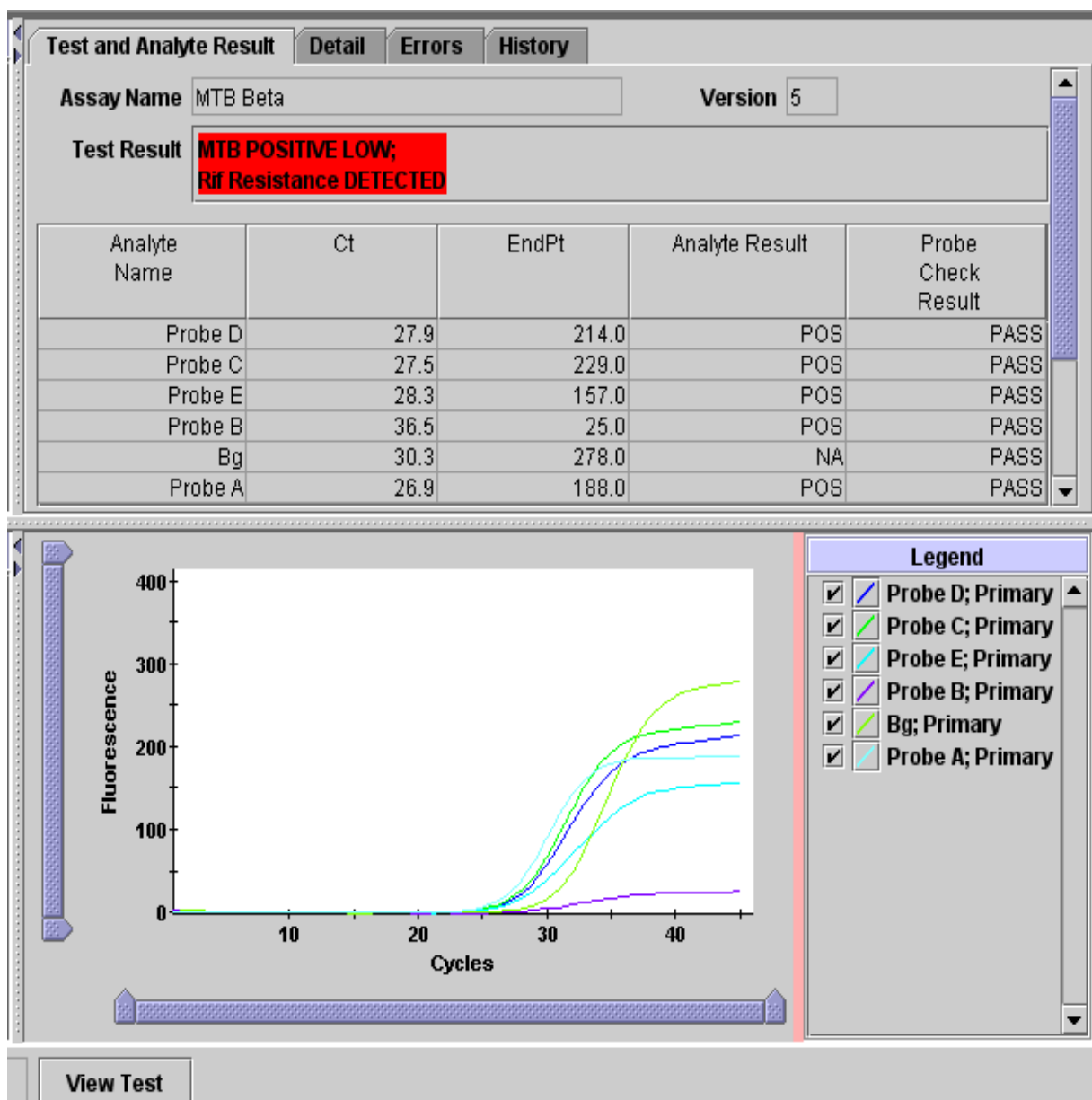
Résultats des prélèvements analysés	Prélèvements d'échantillons de crachats				
	1 <sup>er</sup> Patient	2 <sup>ème</sup> Patient	3 <sup>ème</sup> Patient	4 <sup>ème</sup> Patient	5 <sup>ème</sup> Patient
<b>Résultat de l'identification moléculaire par GeneXpert MTB/RIF</b>	- Positif pour la tuberculose.  -Positif pour la résistance à la rifampicine.	-Positif pour la tuberculose  -Négatif pour la résistance à la rifampicine.	-Positif pour la tuberculose.  -Négatif pour la résistance à la rifampicine.	-Négatif	-Résultat invalide.

Le premier échantillon relatif au premier patient suspect et analysé par la technique GeneXpert MTB/RIF identifie bien une présence de *Mycobacterium tuberculosis* très résistante à la rifampicine (figure 8). En effet, il a été détecté une faible quantité d'ADN de complexe *Mycobacterium tuberculosis*. Aussi, il a été observé une mutation sur le gène de structure de la bactérie associé à une résistance à la rifampicine.

### Partie 3 : Résultats et Discussion

Concernant la détection de la résistance à la rifampicine, peu d'études ont été réalisées mais elles montrent que la sensibilité du test et la spécificité sont bonnes à 94 % et 97 %.

4 études portées sur 5851 prélèvements effectués chez des sujets VIH+ ont montré également que dans ce groupe de population la spécificité reste excellente (98 %) et que la sensibilité est pour les prélèvements à microscopie+ la même que chez les sujets VIH-. Une réduction de la sensibilité est observée néanmoins pour les prélèvements à microscopie négative (Ferrand., 2012).

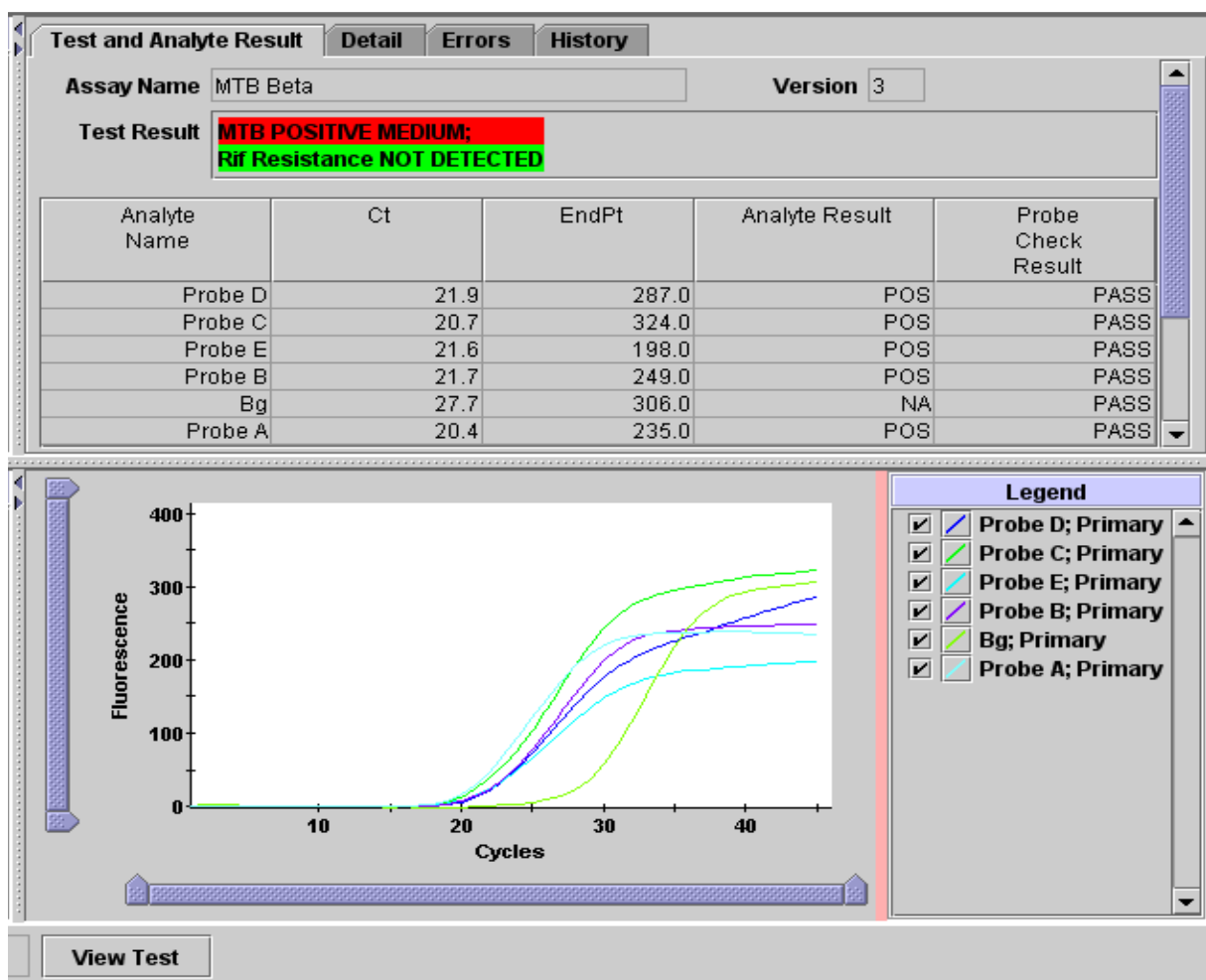


**Figure 8.** Identification de *Mycobacterium tuberculosis* par la technique GeneXpert MTB/RIF chez le premier patient.

### Partie 3 : Résultats et Discussion

L'identification par GèneXpertMTB/RIF effectué sur le prélèvement de crachat du second patient montre aussi l'existence d'ADN complexe de *Mycobacterium tuberculosis* qui n'est toutefois pas associée à une résistance à la rifampicine (**Figure 9**).

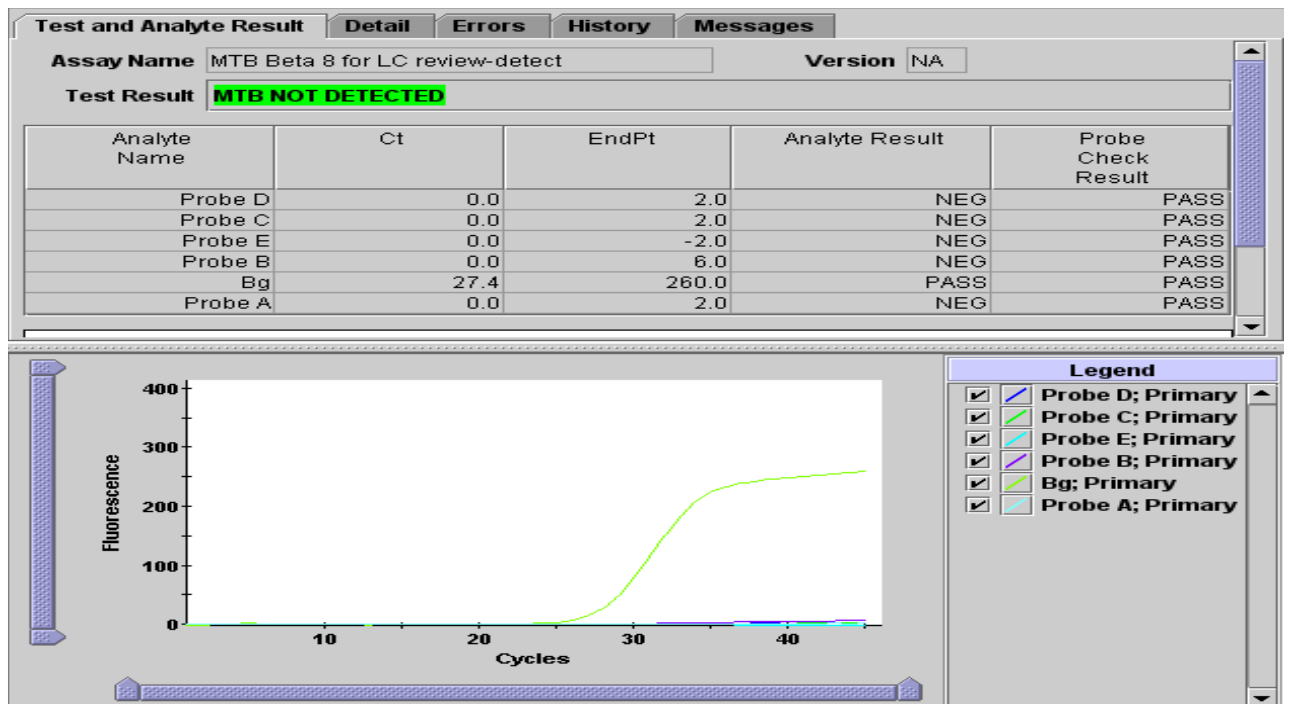
Apparemment, pour le diagnostic de résistance à la rifampicine, la valeur prédictive négative est supérieure à 99 % que ce soit dans les pays à forte ou à faible prévalence. La valeur prédictive positive dépend au fait fortement de la prévalence. Dans les pays de forte prévalence, et chez les patients déjà traités, elle est de 99 % ; alors que dans les pays de faible prévalence, elle est inférieure à 70 % d'où la possibilité de réaliser un second GeneXpert (OMS., 2012).



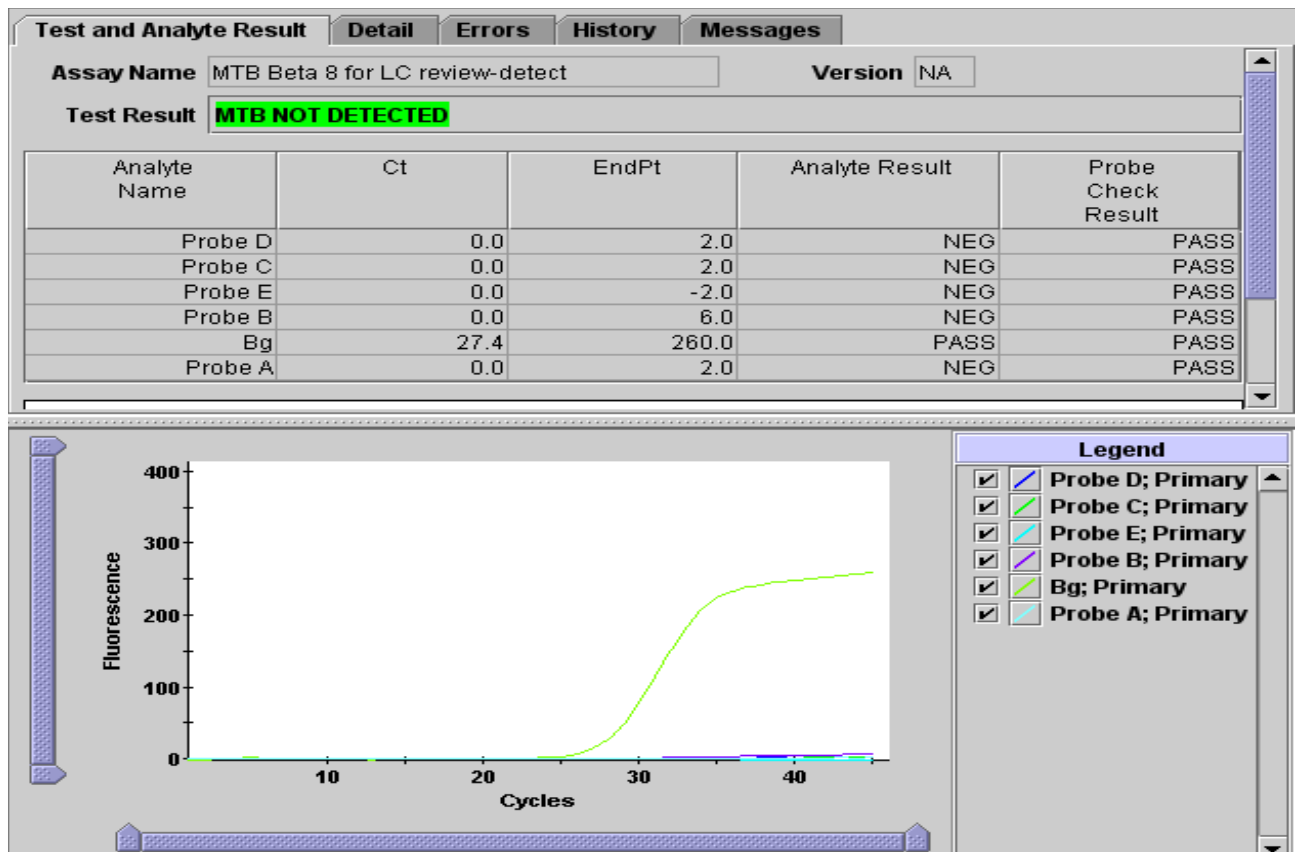
**Figure 9.** Identification de *Mycobacterium tuberculosis* par la technique GeneXpert MTB/RIF chez le douzième patient.

Le test d'identification par la technique GeneXpert MTB/RIF appliqué sur les prélèvements de crachat effectués chez le 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> patient ne révèle aucunement de présence de *Mycobacterium tuberculosis* (**Figure 10 et 11**).

### Partie 3 : Résultats et Discussion



**Figure 10:** Identification de *Mycobacterium tuberculosis* par la technique GeneXpert MTB/RIF chez le 3<sup>ème</sup> patient.



**Figure 11.** Identification de *Mycobacterium tuberculosis* par la technique GeneXpert MTB/RIF chez le 4<sup>ème</sup> patient.

### Partie 3 : Résultats et Discussion

---

Le résultat effectué sur le prélèvement de crachat chez le 5<sup>ème</sup> patient par la méthode GeneXpert MTB/RIF s'avère invalide en raison particulier d'un mauvais contrôle de la sonde, à une prise incorrecte de volume d'échantillon, en raison d'une mauvaise viscosité d'échantillon et/ou à une présence d'un inhibiteur dans l'échantillon. Dans une telle situation, pour une meilleure fiabilité des résultats, le test doit être refait chez le patient **(OMS., 2011)**.

Il est important de signaler que l'OMS recommande, en première intention, le GeneXpert pour les formes pulmonaires chez les adultes et les enfants suspectes de tuberculose multi-résistante ou de tuberculose associée au VIH (recommandations fortes) et lorsque l'examen direct est négatif dans les populations à faible risque de tuberculose multi-résistante ou de VIH (recommandation faible). Dans les formes extra-pulmonaires, l'OMS recommande son utilisation dans le diagnostic des formes méningées, l'inter-étêtant un diagnostic beaucoup plus rapide (recommandation forte). La recommandation est intermédiaire pour les formes ganglionnaires **(Ferrand., 2012)**

Enfin, il apparait que le développement des techniques moléculaires, dont particulièrement celle attrait au GeneXpert ayant fait l'objet de notre étude, permet non seulement de faire un diagnostic beaucoup plus rapide, avec une sensibilité et une spécificité relativement bonnes, et dépendant du type de prélèvement mais aussi de détecter rapidement des éventuelles résistances a la rifampicine et a d'autres antibiotique comme l'isoniazide **(Steingart., 2014 ; WHO., 2013)**.



# **Conclusion**

## Conclusion

Au terme de cette étude, à travers les résultats obtenus, l'examen direct (ED) au microscope après coloration de Ziehl-Neelsen, montre que les bacilles acido-alcoolorésistants (BAAR) sont disposés en cordes et se présentent en bâtonnets de 5 µm de long. Par ailleurs, seuls 3/5 des cas de tuberculoses pulmonaires avaient un examen direct positif ; alors que 2/5 ont enregistré un résultat plutôt négatif.

Concernant les techniques classiques de culture sur milieu spécifique de Loewenstein-Jensen, les colonies de *Mycobacterium tuberculosis* apparaissent après un délai de 15 à 30 jours de couleur crème-beige, sèches, à surfaces rugueuses et d'un aspect de chou-fleur.

2/5 des cultures positives ont marqué une poussée de *Mycobacterium* sur milieu LJ après seulement 15 jours d'incubation ; alors qu'1/5 des cultures ont poussé après un délai de 30 jours d'incubation. La culture était donc positive dans 3/5 de tous les cas de tuberculose pulmonaire recensés.

Le test Gène-Xpert MTB/RIF est un test moléculaire permettant la détection simultanée de *M. tuberculosis* et de la résistance à la rifampicine. Les résultats de ce test sont obtenus en moins de 2 heures ; ce qui réduit considérablement le délai du diagnostic par rapport aux techniques classiques. Les résultats ont montré que 1/5 des cas positifs est résistant à la rifampicine ; alors que 2/5 des cas positifs ne s'avèrent pas résistants à la rifampicine.

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 le séquençage de son génome ouvre de nouvelles perspectives en termes de compréhension de la maladie, de démarche diagnostique, d'épidémiologie et de typage des souches.

# **Références Bibliographiques**

## Références Bibliographiques

- **Alcaide F., G.E. Pfyffer, A. Telenti., 1997.** Role of embB in natural and acquired resistance to ethambutol in mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 41: 2270-2273.
- **Barnard M, Warren R, Gey Van Pittius N, et al., 2012.** Genotype MTBDRsl line probe assay shortens time to diagnosis of extensively drug-resistant tuberculosis in a high throughput diagnostic laboratory. *Am J Respir Crit Care Med* :186:1298-305.
- **Basso L.A., R. Zheng, J.M. Musser, W.R. Jacobs Jr, J.S. Blanchard., 1998.** Mechanisms of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: enzymatic characterization of enoyl reductase mutants identified in isoniazid-resistant clinical isolates. *J Infect Dis.* 178:769-775.
- **Bercovier et al., 1986.** *Mycobacteria* possess a surprisingly small number of ribosomal RNA genes in relation to the size of their genome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 136 :01136-114.
- **Bivigou Mboumba B., Onanga R., 2012.** *Mycobacterium tuberculosis* Approved protocol. Centre International de Recherches Médicales de Franceville. Franceville. 63 pages.
- **Bouyer J., D. Hemon, S. Cordier, F. Derriennic, I. Stücker, B. Stengel, J. Clavel., 1995.** *Epidémiologie - Principes et méthodes quantitatives.* Paris: éd. INSERM. 498 p.
- **Brosch R., S.V. Gordon, A. Pym, K. Eiglmeier, T. Garnier, S.T. Cole. 2000.** Comparative genomics of the mycobacteria. *Int J Med Microbiol.* 290:143-152.
- **Centre D'expertise Collective de l'inserm., 2004.** *Tuberculose.* Place de la vaccination dans la maîtrise de la maladie. Paris: Inserm- 282p
- **Chang K, Lu W, Wang J, et al., 2012.** Rapid and effective diagnosis of tuberculosis and rifampicin resistance with Xpert MTB/ RIF assay: a meta-analysis. *J Infect;*64:580-8.
- **Cole S.T., 1999.** Learning from the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *FEBS Lett.* 452:7-10.

- **Cole S.T., R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S.V. Gordon, K.Eiglmeier, S. Gas, C.E. BaryIII, F. Tekaiia, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, S. Gentles, N. Hamlin, S.Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, A. Krogh, J McLean, S. Moule, L. Murphy, K. Oliver, J.Osborne, M.A. Quail, M.A. Rajandream, J. Rogers, S. Rutter, K. Seeger, J. Skelton, R.Squares, S. Squares, J.E. Sulston, K. Taylor, S. Whitehead, B.G. Barrell., 1998.** Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the completegenome sequence. Nature.393:537-544.
- **Daniel T.M., 2005.** Robert Koch and the pathogenesis of tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis.9:1181-1182.
- **Daniel T.M., 2006.** The history of tuberculosis. Respir Med. 100:1862-1870.
- **Deschaseaux C., 2005.** Epidémiologie moléculaire de la tuberculose : Etude des souches de Mycobacterium tuberculosis par la technique IS611 O-RFLP. UNIVERSITE HENRI POINCARÉ, NANCY 1. 120 pages.
- **Ferrand., 2012.** Tests de diagnostic rapide de la tuberculose : D'après une communication de H. Ferrand (Paris) 55e Journée de l'Hôpital Claude-Bernard – Paris – novembre 2012
- **Fleischmann R.D., D. Alland, J.A. Eisen, L. Carpenter, O. White, J. Peterson, R. DeBoy, R.Dodson, M. Gwinn, D. Haft, E. Hickey, J.F. Kolonay, W.C. Nelson, L.A. Umayam, M. Ermolaeva, S.L. Salzberg, A. Delcher, T. Utterback, J. Weidman, H. Khouri, J. Gill, A. Mikula, W. Bishai, W.R. Jacobs Jr, J.C. Venter, C.M. Fraser. 2002.** Whole-genome comparison of Mycobacterium tuberculosis clinical and laboratorystrains. J Bacteriol. 184:5479-5490.
- **Frota C.C., Hunt D.M., BUuxtonrs., Rickmanl., Hinds J., Kremer K., Gilles p., 2007.**Panteix, 2007 Précis de bactériologie clinique :.
- **García de Viedma D., 2003.** Rapid detection of resistance in Mycobacterium tuberculosis: areviewdiscussingmolecularapproaches. Clin Microbiol Infect;9:349-59.
- **Graviss., 2003.** Single nucleotidepolymorphisms in genesassociated with isoniazidresistance in Mycobacterium tuberculosis. Antimicrob Agents Chemother. 47:1241-1250.

- **Hazbon M.H., M. Brimacombe, M. Bobadilla del Valle, M. Cavatore, M.I. Guerrero, M. Varma-Basil, H. Billman-Jacobe, C. Lavender, J. Fyfe, L. Garcia-Garcia, C.I. Leon, M. Bose, F. Chaves, M. Murray, K.D. Eisenach, J. Sifuentes-Osornio, M.D. Cave, A. Ponce de Leon, D. Alland., 2006.** Population genetics study of isoniazid resistance mutations and evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 50:2640-2649.
- **Julie MILLET., 2011.** Evaluation de marqueurs génétiques du complexe *Mycobacterium tuberculosis* combinée à l'utilisation d'outils bioinformatiques : apport en épidémiologie et phylogénie de la tuberculose
- **Kent, P.T., and G. P. Kubica, 1985.** Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. U.S. Department of Public Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Atlanta.
- **Levy-Bruhl D., Barrault Y., Decludt B., Schwoebel V.BCG., 2003.** et tests tuberculiques: évolutions de la politique vaccinale française *BEH*, 2003, 10-11, 61-63
- **Marchal N ; Bourdon JL ; Richard CL., 1987.** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. *France* 507 :2487
- **Marlowe EM, Novak-Weekley SM, Cumpio J, et al., 2011.** Evaluation of the Cepheid Xpert MTB/RIF assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens. *J Clin Microbiol*;49:1621-3.
- **Marttila H.J., H. Soini, E. Eerola, E. Vyshnevskaya, B.I. Vyshnevskiy, T.F. Otten, A.V. Vasilyef, M.K. Viljanen., 1998.** A Ser315Thr substitution in KatG is predominant in genetically heterogeneous multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates originating from the St. Petersburg area in Russia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2443-2445.
- **Marttila H.J., H. Soini, P. Huovinen, M.K. Viljanen. 1996.,** katG mutations in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates recovered from Finnish patients. *Antimicrob. Agents Chemother* 40:2187-2189.
- **Mokrousov I., O. Narvskaya, T. Otten, E. Limeschenko, L. Steklova, B. Vyshnevskiy., 2002.** High prevalence of KatG Ser315Thr substitution among isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*

clinical isolates from northwestern Russia, 1996 to 2001. *Antimicrob Agents Chemother.* 46:1417-1424.

- **Musser J.M., A. Amin, S. Ramaswamy., 2000.** Negligible genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* host immune system protein targets: evidence of limited selective pressure. *Genetics.* 155: 7-16
- **Musser J.M., V. Kapur, D.L. Williams, B.N. Kreiswirth, D. van Soolingen, J.D. van Embden. 1996.** Characterization of the catalase-peroxidase gene (*katG*) and *inhA* locus in isoniazid-resistant and -susceptible strains of *Mycobacterium tuberculosis* by automated DNA sequencing: restricted array of mutations associated with drug resistance. *J Infect Dis.* 173:196-202.
- **MSPRH (Ministère de la santé, de la population et de la réforme hospitalière), 2011.** Manuel de la lutte antituberculeuse République Algérienne Démocratique et Populaire : 256
- **Neonakis IK, Gitti Z, Krambovitis E, et al., 2008.** Molecular diagnostic tools in mycobacteriology. *J Microbiol Methods* ;75 :1-11.
- **OMS., 2011.** Mise en oeuvre rapide du test diagnostique Xpert MTB/RIF. Guide technique et opérationnel Considérations pratiques. WHO/HTM/TB/2011.2 : ISBN 978 92 4 250156 8
- **Pierre et Marie Curie., 2003.** Bactériologie, fac médecin univ PIERRE ET MARIE CURIE ; chapp 12- p :103 :122
- **Ramaswamy S., J.M. Musser., 1998.** Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tuber Lung Dis.* 79:3-29.
- **Ramaswamy S.V., R. Reich, S.J. Dou, L. Jasperse, X. Pan, A. Wanger, T. Quitugua, E.A. Sherman D.R., K. Mdluli, M.J. Hickey, T.M. Arain, S.L. Morris, C.E. Barry 3rd, C.K. Sola C., Horgen L., Maisetti J., Devallois A., Goh K.S., Rastogi N., 1998.** Spoligotyping followed by double-repetitive-element PCR as rapid alternative to IS611 *O* fingerprinting for epidemiological studies of tuberculosis. *Clin. Microbiol.*, 1998, 36,4,1122-1124
- **Sreevatsan S., X. Pan, Y. Zhang, V. Deretic, J.M. Musser., 1997.** Analysis of the *oxyR-ahpC* region in isoniazid-resistant and -susceptible *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms recovered from diseased humans and animals in diverse localities. *Antimicrob Agents Chemother.* 41:600-606.

- **Sreevatsan S., K.E. Stockbauer, X. Pan, B.N. Kreiswirth, S.L. Moghazeh, W.R. Jacobs, Jr., A. Telenti, J.M. Musser., 1997.** Ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: critical role of embB mutations. *Antimicrob Agents Chemother.* 41:1677-1681.
- **Sreevatsan S., X. Pan, K.E. Stockbauer, N.D. Connell, B.N. Kreiswirth, T.S. Whittam, J.M. Musser., 1997.** Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94:9869-9874.
- **Sreevatsan S., X. Pan, Y. Zhang, V. Deretic, J.M. Musser., 1997.** Analysis of the oxyR-ahpC region in isoniazid-resistant and -susceptible *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms recovered from diseased humans and animals in diverse localities. *Antimicrob Agents Chemother.* 41:600-606.
- **Stahl et Urbance., 1990.** The division between fast and slow growing species corresponds to natural relationships among the mycobacteria. *J. Bacteriol.* 172 : 297-308.
- **Steingart KR, Schiller I, Horne DJ, Pai M, Boehme CC, Dendukuri N., 2014.** Xpert MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. *Cochrane Database Syst Rev* Jan 21;1:CD009593. doi: 10.1002/14651858.CD009593.pub3.
- **Stover., 1996.** Compensatory ahpC gene expression in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Science.* 272:1641-1643.
- **Takayama K., J.O. Kilburn., 1989.** Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 33:1493-1499.
- **Telenti A., W.J. Philipp, S. Sreevatsan, C. Bernasconi, K.E. Stockbauer, B. Wiele, J.M. Musser, W.R. Jacobs, Jr., 1997.** The emb operon, a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol. *Nat Med.* 3:567-570.
- **Van Söllingen D., Colston M.J., 2004.** Genome structure in the vole bacillus, *Mycobacterium microti*, a member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex with a low virulence for humans *Microbiology*, 150, 5, 1519-1527



- **Vanina Meyssonier., 2012.** Epidémiologie de la tuberculose et de la résistance aux antituberculeux . HAL id paris :161
- **Vanina Meyssonier., 2013.** Epidémiologie de la tuberculose et de la résistance aux antituberculeux. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI,-153
- **Vilcheze C., W.R. Jacobs Jr., 2007.** The mechanism of isoniazidkilling: claritythrough the scope of genetics. *AnnuRevMicrobiol.* 61:35-50.
- **Vincent\_LevyFrebault et Portaels., 1992.**Méthodes rapides de détection et de diagnostic des mycobactéries : actualités et perspectives. *Méd. Mal. Infect.* 22 : 391-409.
- **Wayne LG et Kubica GP., 1986.** Mycobacteriaceae chester. In : NR Krieg and JD Holt edsBergey's manuel of systematicbacteriology, vol 2.
- **World Health Organisation (WHO),, 2010.** Global Tuberculosis Control: WHO report 2010 [en ligne]. Genève: World Health Organisation. 204 p. [Consulté en janvier 2011]. <http://www.who.int/tb/country/en/index.html> 297
- **World Health Organisation Tuberculose, 2017,** Aide mémoire
- **World HealthOrganization (WHO), 2009.** Global Tuberculosis Control – epidemiology, strategy, financing [en ligne]. Genève : World HealthOrganization. 303 p. [Consulté en juillet 2016]. [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/2009/en/](http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/en/)
- **World HealthOrganization(WHO), 2010.** Multidrug and extensivelydrug-resistant TB (M/XDR-TB): Global Report on Surveillance and Response; 2010. Available online: [http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241599191\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241599191_eng.pdf)
- **World HealthOrganization(WHO),2000.** Anti-Tuberculosis drugresistance in the world: the WHO/IUATLD Global Project on Antituberculosisdrug Resistance Surveillance (Fourth global report) (WHO/HTM/TB/2008.394).
- **World HealthOrganization, 2011.** Rapid implementation of the Xpert MTB/RIF diagnostic test (technical and operational‘how-to’ practicalcon-siderations): WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. Geneva, Switzerland: World HealthOrganization;. Available online:

[http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241501569\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241501569_eng.pdf), accessed August 23, 2013.

- **Yombi J.C et Olinga U.N, 2015.**La tuberculose :épidémiologie, aspect clinique et traitement : médecin interne générale ; *louvainmed*; 134 (10): 549-559
- **ZakhamF, Chaoui I, Echchaoui AH, et al, 2013.** Direct sequencing for rapid detection of multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains in Morocco. *Infect Drug Resist*;6:207-13.
- **Zhang Y., A. Telenti. 2000.** Genetics of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. In G.F.Hatfull (éd.), W.R. Jacobs, Jr. (éd.). *Molecular genetics of mycobacteria*. Washington, D.C.:ASM Press. p. 235-253.
- **Zhang Y., B. Heym, B. Allen, D. Young, S. Cole. 1992.** The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature*. 358:591-593.
- **Zhang Y., W.W. Yew. 2009.** Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis*. 13:1320-1330.

*Site Web :*

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

# **Annexe**

## Annexe

### 1. Coloration de ziehl nelsen (Freney et al, 2007)

#### 1.1 Réactifs

Fuchsine de Ziehl (RAL)

Acide nitrique au 1/5

Alcool à 95°

Bleu de méthylène

#### 1.2 Fuschine de Ziehl

Fuchsine basique RAL pour Bactériologie .....10 g

Phénol 55 g .....55 g

Alcool à 90° .....100 ml

Eau distillée .....1000 ml

Verser les 100 ml d'alcool dans un mortier de 2 litres. Ajouter la totalité du colorant en broyant au fur et à mesure, puis peu à peu, l'acide phénique en triturant. Verser le mélange dans un flacon de verre teinté. Rincer le mortier avec de l'eau distillée, plusieurs fois dans le flacon jusqu'à concurrence de 1 litre. Laisser reposer 24 heures à l'étuve à 37°C. Filtrer sur papier.

#### 1.3 Décolorant

Acide sulfurique.....100 ml

Eau distillée..... 300 ml

Verser toujours l'acide très lentement dans l'eau.

#### 1.4 Bleu de méthylène

Bleu de méthylène ..... 1 g

Alcool à 95°..... 10 ml

Phénol..... 1 g

Eau distillée..... 100 m

## **2. Composition de milieu de culture de Loewenstein-Jensen (Marchal et al, 1987)**

Formule approximative\* par 600 mL d'eau purifiée

Phosphate monopotassique .....2,5g  
Sulfate de magnésium .....0,24g  
Citrate de sodium .....0,6g  
L-asparagine .....3,6g  
Fécule de pomme de terre .....30,0g  
Vert malachite .....0,4g  
Glycérol.....12,0mL  
Œuf entier .....1000,0mL

Ajustée et/ou complémentée en fonction des critères de performances imposés.

Le Lowenstein-Jensen milieu à 5% Sodium Chloride contient les ingrédients répertoriés ci-dessous ainsi que 80 g de chlorure de sodium pour 600 mL.

### **2.1 Avertissements et précautions Réserve au diagnostic in vitro.**

Ouvrir avec précaution les tubes et les flacons étroitement bouchés pour ne pas risquer d'être blessé par un bris de verre.

Des microorganismes pathogènes, notamment les virus de l'hépatite et de l'immunodéficience humaine, sont susceptibles d'être présents dans les échantillons cliniques. Respecter les Précautions standard et les consignes en vigueur dans l'établissement pour manipuler tout objet contaminé avec du sang ou d'autres liquides organiques. Après utilisation, stériliser à l'autoclave les tubes préparés, les récipients ayant contenu des échantillons et tout autre matériel contaminé avant de les éliminer.

Les manipulations non susceptibles de produire des aérosols d'échantillons cliniques, comme la préparation de frottis acido-résistants, nécessitent des pratiques et des méthodes de sécurité biologique de niveau 2, ainsi que les installations et le matériel de confinement correspondants. Toutes les manipulations susceptibles de produire des aérosols doivent être effectuées sous hotte biologique de sécurité de classe I ou II.

Les activités de laboratoire impliquant la propagation et la manipulation de cultures de

M. tuberculosis et M. bovis nécessitent des pratiques de sécurité biologique de niveau 3, ainsi que les installations et le matériel de confinement correspondants. Les études chez l'animal nécessitent également des procédures particulières.

### Instructions pour la conservation

Dès réception, conserver les tubes et les flacons dans l'obscurité, à une température comprise entre 2 et 8 °C. Ne pas les congeler ni les surchauffer.

Maintenir à l'abri de la lumière. Ne pas ouvrir prématurément. Conservés comme indiqué sur l'étiquette, les milieux peuvent être ensemencés jusqu'à la date de péremption et incubés pendant les durées d'incubation recommandées.

Laisser le milieu s'équilibrer à température ambiante avant de l'ensemencer.

Détérioration du produit. Ne pas utiliser les tubes ou les flacons s'ils présentent des signes de contamination microbienne, décoloration ou dessiccation, ou d'autres signes de détérioration.

### Procédure pour les échantillons de crachats expectorés par GeneXpert MTB/RIF

L'analyse comporte trois étapes manuelles :

1. L'addition du réactif (isopropanol / soude) à l'échantillon pour liquéfier les expectorations et inactiver les bacilles,



Verser 2 volumes pour 1 volume      agiter le mélange      laisser reposer 10 min  
échantillon (crachat direct.

2. Le transfert de 2 ml d'expectorations liquéfiées dans la cartouche

Sur la paillasse, pendant les 5mn d'attente, déballer la cartouche en faisant attention à la partie PCR



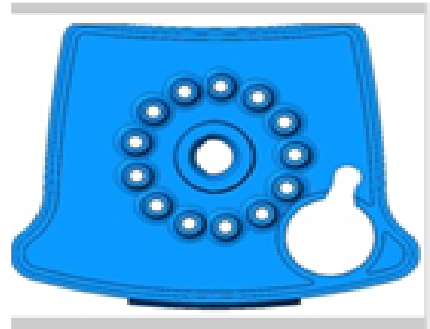
Marquer le nom sur le côté de la cartouche  
Ouvrir son couvercle



Retirer de son emballage la pipette  
plastique fournie  
Prélever 2mL d'échantillon  
liquéfié ou 2mL de culot  
décontaminé - avec le réactif



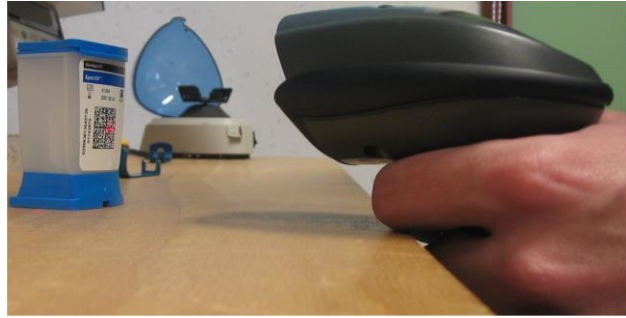
Déposer 2 mL dans la  
cartouche



Démarrer le test dans les 30 mn

The screenshot shows the GeneXpert Dx System software interface. The title bar reads 'GeneXpert® Dx System'. The menu bar includes 'User', 'Data Management', 'Trending', 'Setup', 'Advanced Setup', and 'About'. The main window is divided into two panes. The left pane is titled 'Modules' and has columns for 'Module Name', 'Assay', 'Sample ID', 'Progress', 'Status', and 'Remaining Test Time'. The right pane is titled 'Tests Since Launch' and has columns for 'Sample ID', 'Mod Name', 'User', 'Result', 'Assay', 'Status', 'Error Status', and 'Start Date'. At the bottom, there is a 'Messages' section with the following text: 'Launched GeneXpert® Dx System at 6/10/2009 17:27:30', 'Version 2.1', and 'Modules not detected. Check power switch and computer/GeneXpert cable connections.'

Scanner le code barres de la cartouche



« Entrer le nom du patient »

«Module sélectionné»

«Cliquez ici pour démarrer»

A screenshot of a software window titled 'Create Test'. The window contains several input fields and buttons. At the top is a 'Sample ID' field. Below it is a table with columns 'Name' and 'Version', containing one row: 'Xpert vanA vanB' and '1'. Below the table is a 'Select Assay' dropdown menu. Underneath is a 'Select module' dropdown menu showing 'A 1'. There are three text input fields: 'Reagent Lot ID' (01625), 'Expiration Date' (2010/05/10), and 'Cartridge S/N' (1234556). Below these is a 'Test Type' dropdown menu showing 'Specimen'. At the bottom is a 'Notes' text area. At the very bottom are three buttons: 'Start Test', 'Scan Cartridge Barcode', and 'Cancel'. Red arrows point from the text boxes on the left to the 'Sample ID' field, the 'Select module' dropdown, and the 'Start Test' button.

3. Le chargement de la cartouche dans l'appareil pour le test.

Poser la cartouche dans le module dont le voyant vert clignote et pousser la porte.  
Le test démarre et le voyant vert cesse de clignoter.  
Durée : 1h52  
Le voyant s'éteint quand le test est terminé.



Toutes les étapes ultérieures sont automatisées.

Après 1h52, le test est terminé

Sortir la cartouche usager

Le test peut être fait directement sur un échantillon clinique d'expectorations ou sur un pellet concentré et décontaminé.(OMS,2011)



## **Résumé :**

La tuberculose est une maladie infectieuse contagieuse provoquée par une mycobactérie du complexe tuberculosis principalement le *Mycobacterium tuberculosis* ou bacille de Koch.

Cette étude consiste à mettre en évidence l'importance des méthodes classiques basées sur l'examen direct de coloration de Ziehlneelsen et la mise en culture sur milieux spécifiques et les méthodes génomiques en appliquant le test Gène-Xpert MTB/RIF pour le diagnostic rapide de la tuberculose.

Le test Gène-Xpert MTB/RIF de diagnostic moléculaire rapide de *Mycobacterium tuberculosis* responsable de la tuberculose est plus performant et plus fiable que l'examen microscopique et de mise en culture qui sont simples à utiliser. Il permet d'obtenir un délai diagnostique de la tuberculose pulmonaire et de tuberculose résistante aux antibiotiques très nettement raccourci ; en moins de 2 heures.

**Mots clés :** *Mycobacterium tuberculosis* ; tuberculoses, Gène-Xpert MTB/RIF, résistance ; antibiotiques.

## **Abstract :**

Tuberculosis is a contagious infectious disease caused by mycobacteria of the tuberculosis complex mainly *Mycobacterium tuberculosis* or Koch bacillus.

This study consists in highlighting the importance of the traditional methods based on the direct examination of Ziehlneelsen staining and the culturing on specific media and genomic methods by applying the Gene-Xpert MTB / RIF test for the rapid diagnosis of tuberculosis.

The gene-Xpert MTB / RIF is a rapid molecular diagnosis test of *Mycobacterium tuberculosis* responsible for tuberculosis is more efficient and more reliable than microscopic examination and cultivation which are simple to use. It makes it possible to obtain a diagnostic delay for pulmonary tuberculosis and antibiotic-resistant tuberculosis, which is clearly shortened; In less than 2 hours.

**Key words:** *Mycobacterium tuberculosis*; Tuberculosis, Gene-Xpert MTB / RIF, resistance; antibiotics.