

Université
Sidi Mohamed Ben Abdellah
Faculté des Sciences Dhar Mehraz
-Fès-

UFR: Biologie cellulaire et moléculaire appliquée à l'environnement et la santé

Thèse

Présentée en vue de l'obtention du
Doctorat National

Par

Ouafae BENDADDA

Sujet de thèse

Tuberculose humaine à *Mycobacterium bovis*:
Enquête bactériologique
et
Application de la PCR à la détection et
l'identification du complexe *Mycobacterium*
tuberculosis

Soutenue le 31 mai 2003 devant la commission d'examen :

Président:	<i>Pr. BENJELLOUNE M.C.</i>	Faculté de Médecine - Fès
Rapporteurs:	<i>Pr. IRAQUI M.</i>	Institut Pasteur - Casablanca
	<i>Pr. EL ASSOUNI M.</i>	Faculté des Sciences - Fès
	<i>Dr. ZIZI M.</i>	Hôpital Moulay Youssef – Rabat
Encadrants:	<i>Pr. BERRADA J.</i>	I.A.V. Hassan II - Rabat
	<i>Pr. REMMAL A.</i>	Faculté des Sciences - Fès

Résumé

Le présent travail consiste à développer des techniques de diagnostic des mycobactéries pathogènes impliquées dans les infections tuberculeuses au Maroc. Pour ce faire, un total de 200 expectorations humaines, récoltées auprès de deux hôpitaux du CHU Ibn Sina (Rabat), soit, l'hôpital Ibn Sina et l'hôpital Moulay Youssef, ont été mises en culture sur milieux glycélinés et non glycélinés et ont fait l'objet ensuite d'une identification par des tests biochimiques discriminatoires. *Mycobacterium tuberculosis* a été isolé dans 59,4% des cas, *M. bovis* dans 17,8% et les mycobactéries atypiques dans 22,7% des cas. Ces résultats montrent une implication non négligeable de la tuberculose d'origine bovine et des mycobactéries atypiques dans la tuberculose humaine. Le contrôle de cette maladie humaine au Maroc passe en partie par son contrôle chez l'animal et par la révision du régime thérapeutique appliqué actuellement au Maroc.

Dans un deuxième temps, nous avons développé un outil de biologie moléculaire (la PCR), pour la détection rapide des mycobactéries du complexe *Mycobacterium tuberculosis*. Les résultats obtenus permettent d'écourter le temps de détection et d'identification au minimum de 15 jours. La combinaison de la PCR à quelques tests simples d'identification biochimique nous a permis de différencier *M. tuberculosis* de *M. bovis*

Les résultats de ce travail constituent un apport substantiel à la compréhension du problème de la tuberculose au Maroc.

Mots-clés: Tuberculose, PCR, complexe *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, Mycobactéries atypiques.

Abstract

Tuberculosis is a major public health concern in Morocco. Bacteriology remains the method of choice for experimental diagnosis of tuberculosis. However, the combined use of glycerined and non glycerined culture media allowed us to recover *Mycobacterium tuberculosis* in 59,4% case, *Mycobacterium bovis* in 17,8% case and atypical mycobacteria in 22,7% case from 200 samples of sputum. These results show the importance of tuberculosis of bovine origin and atypical mycobacteria in human tuberculosis. The control of this disease in Morocco can be partly achieved through its control in animals and by the re-examination of the therapeutic regimen presently applied in Morocco.

As a second step, we developed a molecular biology tool - the PCR - for the detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex. The results obtained in this study allowed us to reduce identification time by at least 15 days. The combination of the PCR results with some basic biochemical identification tests (Niacin and Nitrate), allowed us to differentiate between *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* strains.

Keywords: Tuberculosis, PCR, *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Mycobacterium bovis*, atypical mycobacteria,

Dédicaces

À mes très chers parents

En hommage à tous les sacrifices que vous avez consenti pour moi durant mes longues années d'études. Je n'aurais jamais espéré avoir de meilleurs parents. Je vous remercie d'avoir fait de moi ce que je suis maintenant et de m'avoir appris de vivre dans l'honneur et dans la dignité. Aucune dédicace, aucun mot, ne saurait exprimer réellement mon profond amour, mon respect et ma vive gratitude. Veuillez trouver dans ce travail le fruit de toutes vos peines et vos sacrifices.

À mon mari

En témoignage de mon affection et ma gratitude pour m'avoir soutenu dans les moments les plus difficiles.

À ma sœur et mes frères: Hanane, Zakaria et Youness

En témoignage de mon profond amour : Je vous souhaite une belle vie

À Mon grand-père: Basidi

Que Dieu vous accorde santé et longue vie

À la mémoire de mes grands-parents

À toute ma famille

À ma belle-famille

À mes amis (es)

À tous mes professeurs

À tous ceux qui me sont chers.

Remerciements

- Pr. Jaouad Berrada

C'est un grand honneur et une extrême fierté de vous voir me confier ce travail et veiller à son élaboration, en sacrifiant votre temps précieux et vos efforts. Je garderai toujours les meilleurs souvenirs de votre immense savoir et de votre sens du devoir. Qu'il me soit permis de vous exprimer ici mon profond respect et mon intense admiration pour vos qualités humaines exceptionnelles.

- Pr. Adnane Remmal

Vous avez eu la gentillesse de m'inscrire en Doctorat sous votre responsabilité. Je vous remercie pour vos conseils, votre disponibilité, votre encouragement et votre soutien. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect et de ma haute considération.

- Dr. Maria Zizi

Vous m'avez reçu dans votre service avec beaucoup de gentillesse et de bienveillance. Vous m'avez impressionné par votre rigueur scientifique, votre personnalité et vos qualités humaines. Veuillez trouver ici le témoignage de ma respectueuse gratitude, mon grand respect et ma très haute considération.

- Pr. Benjelloun M.C.

Vous m'avez porté honneur en acceptant de présider le jury de cette thèse et d'y apporter l'éclairage de scientifique et de clinicien. Qu'il me soit permis de vous exprimer mon estime et ma sincère reconnaissance.

- Pr. Iraqui M.

Je vous suis reconnaissante d'avoir accepté d'agir comme rapporteur et de partager vos connaissances en génétique dans la critique de ce travail.

- Pr. El Assouni

Je vous remercie de votre disponibilité à participer à la critique de ce travail. Votre présence parmi les membres de jury témoigne de l'assistance que m'a apportée la Faculté des Sciences dans son ensemble.

- Pr. Bouchriti N., Pr. Bouslikhane M. et Pr. Karib H.

Pour leur aide scientifique et leur soutien moral

- Pr. Iraqui, Médecin Chef de l'Hôpital Moulay Youssef, Rabat

Pour m'avoir donné accès à votre établissement.

Je tiens aussi à adresser mes remerciements les plus sincères à:

Pr. Fassi Fehri O.

Dr. Kadiri A.

Pr. Fassi Fihri M.

Pr. El Idrissi Hamzi A.

Pr. Benkirane A.

Pr. Alaoui M.A.

Pour leur disponibilité, encouragement et soutien.

Je tiens enfin à remercier:

- Le personnel du département de Microbiologie, Immunologie et Maladies Contagieuses, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat.
- Le personnel du laboratoire de Biologie, Hôpital Moulay Youssef, Rabat.
- Mme Isabelle Cousineau, pour son aide précieuse dans la mise en forme des figures
- Mme Bouchra Oumokhtar et sa famille, pour leur soutien moral et leur amitié très précieuse.

- Tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE.....	1
----------------------------	---

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

HISTORIQUE.....	3
-----------------	---

CHAPITRE I: GENERALITES SUR LES MYCOBACTERIES

1. TAXONOMIE.....	5
2. CLASSIFICATION.....	6
3. CARACTERES CULTURAUX.....	8
4. RESISTANCE AUX AGENTS PHYSIQUES ET CHIMIQUES	11
4.1. Agents physiques.....	11
4.2. Agents chimiques.....	11
5. CARACTERES BIOCHIMIQUES.....	11
6. PHYSIOPATHOLOGIE.....	13
6.1. Pouvoir pathogène.....	13
6.1.1. Complexe <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	13
6.1.2. Mycobactéries atypiques.....	14
6.1.3. Mycobactéries des lèpres humaine et animale.....	14

CHAPITRE II: TUBERCULOSE HUMAINE

1. PRIMO-INFECTION.....	15
2. LA TUBERCULOSE MALADIE.....	15
3. TRANSMISSION.....	16
4. EPIDEMIOLOGIE DE LA TB DANS LE MONDE.....	17
4.1. Risque annuel d'infection ou RAI.....	17
4.2. Incidence.....	18
4.3. Prévalence.....	18
4.4. Taux de mortalité.....	19
5. EPIDEMIOLOGIE DE LA TUBERCULOSE AU MAROC.....	19
5.1. Analyse des principaux indicateurs épidémiologiques.....	19
6. PATHOGENIE.....	22
7. INTERACTION TUBERCULOSE-VIH.....	23
8. TRAITEMENT.....	25

9. RESISTANCE AUX ANTIBACILLAIRES.....	26
10. PREVENTION.....	28
10.1. Prévention et lutte au Maroc.....	28

CHAPITRE III: TUBERCULOSE BOVINE

1.PATHOGENIE.....	30
2. EPIDEMIOLOGIE.....	32
2.1. Réservoirs animaux.....	32
2.2. Symptômes.....	33
2.3. Transmission de la maladie.....	33
2.4. Réceptivité.....	34
2.4.1. Facteurs intrinsèques.....	34
2.4.2. Facteurs extrinsèques.....	35
3. TB BOVINE DANS LES PAYS EN VOIE DE DEVELOPPEMENT.....	35
3.1. Mesures et programmes de contrôle.....	35
4. SITUATION DE LA TB BOVINE AU MAROC.....	38
4.1. Prévalence.....	39
4.1.1. Au niveau des élevages.....	39
4.1.2. Au niveau des abattoirs.....	39
4.2. Importance économique.....	40
4.3. Contrôle et lutte contre la TB bovine.....	41

CHAPITRE IV: TUBERCULOSE ZONOTIQUE CHEZ LES HUMAINS

1. TB ZONOTIQUE DANS LES PAYS INDUSTRIALISES.....	42
2. TUBERCULOSE ZONOTIQUE DANS LES PAYS EN DEVELOPPEMENT.....	43
2.1. Amérique latine et Asie.....	43
2.2. Afrique.....	44
3. LOCALISATION DE LA TB A <i>M. bovis</i>	44
4. EXPOSITION AU RISQUE D'INFECTION PAR <i>M. bovis</i>	45
4.1. Contacts physiques proches.....	45
4.2. Pratiques d'hygiène alimentaire.....	45
5. VIH ET TB A <i>M. bovis</i>	46
6. SURVEILLANCE DE LA TB A <i>M. bovis</i>	47

CHAPITRE V: DIAGNOSTIC RAPIDE DES INFECTIONS MYCOBACTERIENNES

1. BACTERIOSCOPIE.....	49
2. METHODES D'ISOLEMENT.....	49
2.1. Le système BACTEC.....	49
2.2. Le système MB CHECK.....	50
3. IDENTIFICATION PAR LES METHODES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE.....	50
3.1. Identification par hybridation directe avec une sonde spécifique.....	50
3.2. Identification et détection par amplification génique en chaîne (PCR).....	51
3.2.1. Principe de la technique de PCR.....	51
3.2.2. Limitations de la PCR.....	53
4. APPLICATION DE LA PCR POUR LA DETECTION DES MYCOBACTERIES.....	54
4.1. Tests de PCR spécifiques au Genre <i>Mycobacterium</i>	54
65 K-Da Heat Shock Protein.....	54
L'ARN ribosomal 16S.....	55
32 K-Da Protein Gene.....	55
MPTR (Major Polymorphic Tandem Repeat).....	55
PGRS (Polymorphic G+C Rich Sequences).....	55
IS1081.....	56
4.2. Tests de PCR spécifiques au complexe <i>M. tuberculosis</i>	56
38 K-Da protein gene.....	56
MPB64 protein.....	56
pMTb4.....	57
La séquence mtp40.....	57
DRS (Direct Repeats).....	57
IS6110.....	58
5. CONCLUSION.....	61

PARTIE PRATIQUE

PREMIERE PARTIE: TUBERCULOSE HUMAINE A *MYCOBACTERIUM BOVIS* AU MAROC: ENQUETE BACTERIOLOGIQUE

I. INTRODUCTION.....	63
II. MATERIEL ET METHODES.....	65
1. MESURES GENERALES DE PRECAUTION.....	65

2. ORIGINE ET TRANSPORT DES PRELEVEMENTS.....	65
2.1. Prélèvements d'origine humaine.....	65
2.2. Prélèvements d'origine animale.....	66
3. EXAMEN MICROSCOPIQUE DIRECT.....	67
4. TRAITEMENT ET MISE EN CULTURE.....	68
4.1. Expectations.....	68
4.2. Tissus.....	68
5. IDENTIFICATION.....	69
5.1. Vérification de la pureté des colonies.....	69
5.2. Détermination de l'aspect des colonies.....	70
5.3. Détermination de la vitesse de croissance.....	70
5.4. Tests biochimiques.....	70
5.4.1. Recherche de la Niacine.....	70
5.4.2. Recherche de la Nitratase.....	71
5.4.3. Sensibilité au T.C.H (Hydrazide de l'acide thiophène 2 carboxilique).....	71
III. RESULTATS.....	72
1. CAS DES TISSUS.....	72
1.1. Bactérioscopie.....	72
1.2. Isolement et identification.....	72
2. CAS DES EXPECTORATIONS.....	74
2.1. Bactérioscopie.....	74
2.2. Isolement.....	74
2.2.1. Résultats quantitatifs.....	74
2.2.2. Résultats qualitatifs.....	75
2.3. Identification par les tests biochimiques.....	75
2.3.1. Mycobactéries tuberculeuses.....	75
2.3.2. Mycobactéries non tuberculeuses.....	76
IV. DISCUSSIONS.....	77
V. CONCLUSION.....	82

**DEUXIEME PARTIE: APPLICATION DE LA PCR A LA DETECTION ET
L'IDENTIFICATION DES MYCOBACTERIES**

I. INTRODUCTION.....	83
II. MATERIEL ET METHODES.....	85
1. LES SOUCHES BACTERIENNES.....	85

2. EXTRACTION DE L'ADN GENOMIQUE TOTAL.....	85
2.1. Protocole d'extraction.....	85
2.1.1. Lyse des bactéries.....	85
2.1.2. Extraction de l'ADN.....	86
3. REACTION DE PCR.....	87
3.1. Précautions de travail.....	87
3.2. Choix des amorces.....	87
3.3. Protocole de PCR.....	90
3.3.1. Mélange réactionnel.....	90
3.3.2. Amplification.....	90
3.3.3. Amplification interne T4/T5.....	91
4. ÉLECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE.....	91
4.1. Préparation du gel (moulage).....	91
4.2. Dépôt des échantillons.....	92
4.3. Migration.....	92
4.4. Visualisation.....	92
III. RESULTATS.....	93
1. EXTRACTION DE L'ADN GENOMIQUE TOTALE.....	93
2. REACTION PCR.....	94
2.1. Standardisation.....	94
2.2. Spécificité.....	102
2.3. Application.....	103
IV. DISCUSSIONS.....	106
V. CONCLUSION.....	111
CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS.....	112
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	115
ANNEXES	

Liste des tableaux

Tableau N°1: Quelques espèces du genre <i>Mycobacterium</i>	6
Tableau N°2 : Classification des mycobactéries selon la vitesse de croissance.....	8
Tableau N°3: Caractères culturaux et morphologie des colonies de quelques mycobactéries.....	10
Tableau N°4: Principaux caractères d'identification des mycobactéries.....	12
Tableau N°5: Incidence cumulée des cas de TB toutes formes confondues.....	21
Tableau N°6: Incidence cumulée des cas de TB pulmonaire à microscopie positive.....	21
Tableau N°7: Incidence cumulée des TPM par région pendant l'année 1994.....	21
Tableau N°8 : Nombre de cas estimés de TB humaine et de cas de TB attribuables au VIH en 1990, 1995 et 2000.....	24
Tableau N°9: Infections dues à <i>M. bovis</i> chez certaines espèces animales sauvages.....	33
Tableau N°10 : Taux d'infection tuberculeuse chez les bovins.....	39
Tableau N°11: Evolution annuelle de la tuberculose bovine au niveau de 9 abattoirs (1998-2000).....	39
Tableau N°12: Evolution des saisies globales au niveau de 9 abattoirs (1998-2000).....	40
Tableau N°13 : Répartition des saisies pour cause de tuberculose.....	40
Tableau N°14: Estimation des pertes occasionnées par la tuberculose.....	40
Tableau N°15: La tuberculose humaine causée par <i>M. bovis</i> dans certains pays industrialisés.....	43
Tableau N°16: Quelques séquences répétées chez quelques espèces de mycobactéries.....	62
Tableau N°17: Nombre de prélèvements récoltés au niveau des 2 hôpitaux du CHU Ibn Sina.....	66
Tableau N°18: Nombre de carcasses prélevées au niveau de chaque abattoir.....	67
Tableau N°19: Échelle d'observation du nombre de bacilles observés par champs examinés (cas d'expectorations).....	67

Tableau N°20: Résultats de la bactérioscopie en fonction de l'origine des prélèvements d'origine animale.....	72
Tableau N°21: Résultats de l'isolement du genre <i>Mycobacterium</i> selon l'abattoir d'origine.....	72
Tableau N°22: Pourcentage des cultures positives à partir des Ziehl négatifs et positifs.....	73
Tableau N°23: Résultats de l'isolement et de l'identification des mycobactéries d'origine animale en fonction de leur origine géographique.....	73
Tableau N°24: Résultats de la bactérioscopie sur expectorations humaines en fonction de l'origine des prélèvements.....	74
Tableau N°25: Résultat de l'isolement du genre <i>Mycobacterium</i> à partir des expectorations.....	75
Tableau N°26: Distribution et pourcentages des espèces identifiées selon l'origine du prélèvement.....	76
Tableau N°27: Pourcentage des résultats du Ziehl en fonction des résultats des cultures.....	78
Tableau N°28: Séquences et positions des amorces utilisées.....	89
Tableau N°29: Mélange réactionnel pour la PCR.....	90

Liste des Figures

Figure N°1: Incidence de la tuberculose bovine en Afrique.....	36
Figure N°2: Mesures de contrôle pour la tuberculose bovine fondées sur une politique de dépistage et d'abattage et de déclaration obligatoire, Afrique.....	36
Figure N°3: Incidence de la tuberculose bovine en Asie.....	36
Figure N°4: Mesures de contrôle pour la tuberculose bovine fondées sur une politique de dépistage et d'abattage et de déclaration obligatoire de la maladie, Asie.....	37
Figure N°5: Incidence de la tuberculose bovine, Amérique Latine et Antilles.....	37
Figure N°6: Mesures de contrôle pour la tuberculose bovine fondées sur une politique de dépistage et d'abattage et de déclaration obligatoire de la maladie, Amérique Latine et Antilles.....	37
Figure N°7: Schéma des étapes d'amplification par PCR.....	52
Figure N°8: Bases nucléotidiques de la séquence d'insertion IS6110 et des amorces INS1/INS2- T4/T5.....	60
Figure N°9: Extraction de l'ADN génomique totale des mycobactéries: protocole de base.....	93
Figure N°10: Extraction de l'ADN génomique totale des mycobactéries après modification du protocole de base.....	94
Figure N°11: Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% des produits de PCR après amplification par le couple d'amorces INS1/INS2: Premier essai.....	95
Figure N°12: Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% des produits de PCR après amplification par le couple d'amorces INS1/INS2: Deuxième essai.....	96
Figure N°13: Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% des produits de PCR après amplification par le couple d'amorces INS1/INS2: Concentration de départ pour les amorces: 1µM.....	97
Figure N°14: Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% des produits de PCR après amplification par le couple d'amorces INS1/INS2: Dilution de la concentration des amorces: 0,5 µM.....	98
Figure N°15: Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% des produits de PCR après amplification par le couple d'amorces INS1/INS2 et après dilution de la concentration des amorces à 0,25 µM.....	99
Figure N°16: Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% des produits de PCR après amplification par le couple d'amorces INS1/INS2: Souches de référence.....	99

Figure N°17: Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% des produits de PCR après amplification par le couple d'amorces INS1/INS2: Souches de référence, suite.....	100
Figure N°18: Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% des produits de PCR après amplification par le couple d'amorces INS1/INS2: Souches de référence, suite.....	101
Figure N°19: Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% des produits de PCR après la deuxième amplification (Nested-PCR) par le couple d'amorces T4/T5.....	102
Figure N°20: Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% des produits de PCR après amplification par le couple d'amorces INS1/INS2 des cultures d'expectorations.....	103
Figure N°21: Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% des produits de PCR (<i>M. bovis</i> isolé à partir des cultures d'expectorations), après amplification par le couple d'amorces INS1/INS2.....	104
Figure N°22: Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% des produits de PCR après amplification par le couple d'amorces INS1/INS2: Souches de référence, témoins positifs et négatifs.....	105

Liste des abréviations

ADN: Acide Désoxyribonucléique

ARN: Acide Ribonucléique

CDC: Center For Disease Control and Prevention

DOTS: Directly Observed Treatment Short Course

EDTA: Ethylene-Diamine-Tetra-acetic-Acid

FAO: Food and Agriculture Organization

IS: Insertion Sequence

Kb: Kilobase

K-Da: Kilodalton

L-J: Löweinstein-Jensen

M.: *Mycobacterium*

OIE : Office International des Épizooties

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

PCR : Polymerase Chain Reaction

Pb : Paires de bases

P&B: Prauskauer and Beck

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate

SIDA: Syndrome d'immuno-déficience acquise

Taq: *Thermus aquaticus*

TE: Tris EDTA

TB: Tuberculose

TPM: Tuberculose pulmonaire à microscopie positive

UICTMR: Union Internationale Contre la Tuberculose et les Maladies Respiratoires

UV: Ultraviolets

VIH: Virus d'immunodéficience humain

WHO: World Health Organization

INTRODUCTION GENERALE

Maladie contagieuse, et réputée comme étant la maladie des pauvres par excellence, la tuberculose a fait et continue à faire des dégâts considérables dans le monde entier. Elle est responsable chaque année du plus grand nombre de décès dans le monde (près de 3 millions), plus que le paludisme, le choléra, la diphtérie...et tant d'autres maladies infectieuses réunies (Poulet, 1994; Dolin *et al.*, 1994). Considérée comme presque éradiquée dans les pays développés, l'épidémie du Syndrome d'Immunodéficience Acquis (SIDA) apparue depuis le début des années 80 l'a remise au devant de l'actualité et des préoccupations des autorités sanitaires mondiales comme facteur aggravant (Raviglione *et al.*, 1995; Mohle-Boetani *et al.*, 2002; Hopewell & Chaisson, 2000).

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime que le tiers de l'humanité (entre 1,7 à 2 milliards de personnes), est infecté par le bacille de Koch (*Mycobacterium tuberculosis*) et que, 22 pays comptent à eux seuls 80% des cas de tuberculose frappant la tranche d'âge 15-50 ans (Billo, 1996; Chantal, 2001a), c'est-à-dire la période la plus productive de la vie des individus, ce qui explique l'incidence de la maladie de point de vue économique (WHO, 1997a; Dolin *et al.*, 1994).

La tuberculose bovine causée par *Mycobacterium bovis* est aussi une des maladies infectieuses les plus répandues chez l'animal. Elle fait partie de la liste B de l'Office International des Epizooties (OIE) et de l'organisation mondiale de l'alimentation (FAO) (Benkirane, 1997; Cousins, 2001) qui regroupe les maladies animales transmissibles, importantes sur le plan socio-économique et/ou hygiénique et qui peuvent avoir des conséquences sérieuses sur le commerce des animaux et les produits d'origine animale. En l'absence de thérapeutique économiquement efficace, les programmes basés sur le dépistage et l'abattage des animaux infectés ainsi que la pasteurisation du lait ont considérablement réduit l'incidence de la tuberculose chez le bétail et l'homme dans les pays développés. Néanmoins, cette maladie reste largement répandue dans les pays en voie de développement. Sa nature insidieuse (longue incubation, évolution

chronique) associée aux conditions socio-économiques prévalentes dans ces pays ont fait qu'elle demeure négligée des programmes de contrôle. On estime que 5% de la population bovine mondiale réagit à la tuberculine: 50 millions de bovins seraient infectés (Chantal, 2001a).

S'agissant aussi d'une zoonose majeure, la corrélation directe entre l'infection à *Mycobacterium bovis* chez le bétail et la maladie chez la population humaine a été bien documentée dans les pays industrialisés et rapportée dans plusieurs régions du monde (Damsker *et al.*, 1974; Dreesen & Wood, 1979; Karlson & Carr, 1970; Schmiedel, 1968a). Bien que peu d'informations soient disponibles en provenance des pays en développement (Collins & Grange, 1983; Cosivi *et al.*, 1995), les facteurs de risque pour *Mycobacterium bovis* sont bien présents dans ces régions, autant chez les animaux que chez les humains (Cosivi *et al.*, 1998).

Au Maroc, la tuberculose, qu'elle soit humaine, bovine ou zoonotique, continue à poser un grand problème de santé publique malgré l'existence de programmes nationaux de lutte antituberculeuse depuis plusieurs années. En dépit de ces programmes, on enregistre une moyenne de 100 nouveaux cas humains par 100000 habitants chaque année (Anonyme, 2001; Guide de la lutte antituberculeuse, 1996).

Les objectifs du présent travail sont:

- 1- d'évaluer l'importance de la tuberculose à *Mycobacterium bovis* chez l'homme à travers une étude réalisée sur 200 patients admis aux hôpitaux du CHU de Rabat. Cette étude a fait appel à des méthodes de culture non utilisées par les laboratoires des hôpitaux concernés;
- 2- de développer une technique rapide de détection et d'identification des mycobactéries pathogènes (*Mycobacterium tuberculosis* et *Mycobacterium bovis*) en utilisant l'amplification génique en chaîne (PCR) comme outil de diagnostic.

HISTORIQUE

La Tuberculose (TB) humaine est une maladie qui a été reconnue depuis la haute antiquité (Cosivi *et al.*, 1995). Elle a été décrite par Hippocrate sous le nom de «phtisie» et ses lésions ont été diagnostiquées sur des momies égyptiennes (Merchant & Barner, 1981; Zink *et al.*, 2003).

L'association entre la TB bovine et humaine a été suspectée plusieurs siècles avant la découverte du bacille tuberculeux (Giuliani, 1978). En 1831, Gurlt a mis en évidence des similitudes entre la TB humaine et bovine (Basset, 1953). En 1846, Klencke a incriminé le lait des vaches comme source des adénites cervicales des enfants (Collins & Grange, 1983). Dès 1865, Villemin a soupçonné le caractère microbien de la TB (Grange, 1980). En 1873, Hansen découvre que la lèpre est causée par un fin bacille (Hansen, 1874), qui a beaucoup de ressemblances avec celui qui sera découvert 9 ans plus tard par R. Koch. C'est en 1882 que ce dernier colore et fait pousser sur un sérum coagulé, le bacille responsable de la TB (Koch, 1882). En montrant peu après que le bacille coloré par la fuchsine anilinée n'est pas décoloré par l'acide nitrique au tiers, Ehrlich met en évidence l'acido-résistance des mycobactéries. Ziehl remplace bientôt la fuchsine anilinée par la fuchsine phéniquée et Neelson publie la méthode de coloration dite de Ziehl-Neelson, qui est couramment employée depuis lors (Grange, 1980). Dès la fin des années 1880, Nocard et Roux montrent que l'addition de la glycérine stimule la croissance du bacille.

Les travaux de Rivolta en 1889, puis de Maffucci en 1890 conduisent à différencier le bacille aviaire du bacille humain. En 1890 aussi, la tuberculine est mise au point par Koch (Parriaud, 1985) et Guttman propose de l'utiliser pour le diagnostic allergique de la tuberculose dès 1891. En 1892, Bang préconise d'éliminer les animaux réagissant positivement à la tuberculine. A partir de 1902 et suite aux travaux de Smith (1896-1898), le bacille bovin est à son tour distingué du bacille humain. Les trois grandes variétés de bacilles pathogènes (humain, bovin et aviaire) sont dès lors connues, mais à côté de ces variétés, de nombreuses mycobactéries commensales ou saprophytes sont également décrites (Collins & Grange, 1983; Grange, 1980; Thoen & Himes, 1984). Dès

1920, la pasteurisation du lait permet de réduire la mortalité infantile due à *Mycobacterium bovis*, et l'année suivante, Calmette et Guérin proposent leur vaccin vivant atténué, le BCG, obtenu par passages répétés sur un milieu bilié à base de pomme de terre (Grange, 1980; Lowell, 1984).

En 1944, Waksman découvre la streptomycine, premier antibiotique actif sur le bacille tuberculeux. Puis viennent, en 1949, l'acide para-amino-salicylique (PAS), en 1952, l'isoniazide, et après de nombreux autres antibiotiques, la rifampicine en 1967.

En 1953, d'autres mycobactéries acido-alcool-résistantes, les bacilles «paratuberculeux» ont été mis en évidence dans les milieux les plus divers (eau, terre, fumier, beurre...). Pollak et Buhler confirment le pouvoir pathogène occasionnel de certaines espèces de mycobactéries et isolent *Mycobacterium kansasii* sur des cadavres humains, ce qui relance les recherches sur les mycobactéries atypiques responsables de diverses mycobactérioses humaines et animales (Buhler & Pollak, 1955).

En 1968, Castets, Boisvert, Grumbach, Brunel et Rist décrivent une variété africaine du bacille tuberculeux, qui a été rapidement relevée au titre d'espèce et appelée «*Mycobacterium africanum*» (Castets *et al.*, 1968).

On compte aujourd'hui plus de 100 espèces de mycobactéries, la plupart non pathogènes (Hale *et al.*, 2001; Rastogi *et al.*, 2001).

Chapitre I:

GENERALITES SUR LES MYCOBACTERIES

1. Taxonomie

Les mycobactéries appartiennent à la famille des *Mycobacteriaceae*, ordre des *Actinomycetales*, classe des *Schizomycètes* (Nolte & Metchock, 1995). Cette famille contient un seul genre: *Mycobacterium* (Wayne & Kubica, 1986; Stackebrandt *et al.*, 1997). Les propriétés essentielles des mycobactéries sont les suivantes:

- Bacilles immobiles non sporulés, aérobies strictes, rectilignes ou incurvés, de 0,2 à 0,6 μm de large sur 1 à 10 μm de long (Goodfellow & Minnikin, 1984; Sommers & Good, 1985; Wilson & Miles, 1975a; Wayne & Kubica, 1986).
- Elles se colorent difficilement à la fuchsine, mais elles sont capables de conserver cette coloration malgré l'action combinée de l'acide et de l'alcool. Elles sont donc acido-alcool-résistantes (Tison & Carbonnelles, 1972; Barksdale & Kim, 1977). Cette propriété essentielle est liée à la présence dans leur paroi de lipides particuliers qui représentent 40% du poids sec contre seulement 5% chez les bactéries Gram+ et 20% chez les Gram- (Wayne, 1982). Cette propriété qui peut être partiellement ou complètement perdue selon le stade de croissance de la bactérie (Nolte & Metchock, 1995) est mise à profit dans la coloration de Ziehl & Neelson: coloration différentielle des mycobactéries (Pilet *et al.*, 1979).
- Elles ont un temps de génération lent; une division toutes les 20 heures en moyenne, soit 60 fois moins que le Staphylocoque (Abramson, 1952). Pour les mycobactéries à croissance rapide, la moyenne égale à une division chaque 3 heures.
- Leur ADN est très riche en Guanine et Cytosine: 62 à 70 mol% (Haagsma, 1993; Wayne & Kubica, 1986; Wolinsky, 1980; Cole *et al.*, 1998).

Le genre *Mycobacterium* compte actuellement plus de 100 espèces (Hale *et al.*, 2001; Rastogi *et al.*, 2001) contre seulement 71 en 1994 (Van Soolingen *et al.*,

1994). L'espèce type est *Mycobacterium tuberculosis*, souche H₃₇R_V déposée à l'American Type Culture Collection, ATCC 27299 et dont la séquence entière du génome est maintenant complètement décryptée (Cole *et al.*, 1998).

2. Classification

Le genre *Mycobacterium* renferme des espèces réputées pathogènes aussi bien pour l'homme que pour l'animal (Howard *et al.*, 1949), ainsi que des espèces opportunistes et saprophytes généralement qualifiées d'atypiques, anonymes ou encore, espèces non tuberculeuses (American Thoracic Society, 1997). Le tableau N°1 présente quelques espèces du genre *Mycobacterium*.

Tableau N°1: Quelques espèces du genre *Mycobacterium*
(Hermon-Taylor, 1990)

Mycobactéries pathogènes obligatoires	Mycobactéries pathogènes facultatives		Mycobactéries non pathogènes	
<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. smegmatis</i>
<i>M. bovis</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. gastri</i>	<i>M. vaccae-M. aurum</i>
<i>M. africanum</i>	<i>M. ulcerans</i>		<i>M. terrae</i>	<i>M. parafortuitum</i>
<i>M. leprae</i>	<i>M. marinum</i>		<i>M. flavescens</i>	
<i>M. paratuberculosis</i>	<i>M. xenopi</i>			
<i>M. avium-intracellulare</i>	<i>M. szulgai</i>			
	<i>M. simiae</i>			

Chez l'homme, les mycobactéries pathogènes spécifiques listées ci-dessous sont responsables de la tuberculose et de la lèpre:

- *M. tuberculosis* ou bacille de Koch (BK), responsable de la tuberculose chez l'homme (Lehmann & Neumann, 1896).
- *M. africanum* fréquemment isolé chez les tuberculeux en Afrique de l'ouest et du centre (Castets *et al.*, 1968). Il est très proche du précédent.
- *M. bovis*, agent de la tuberculose bovine, peut infecter l'homme et d'autres animaux (Karlson & Lessel, 1970). Un mutant de *M. bovis*, le bacille de Calmette et Guérin (BCG) est utilisé comme vaccin chez l'homme.
- *M. leprae* ou bacille de Hansen (Hansen, 1874), responsable de la lèpre. Cette dernière espèce n'est pas actuellement cultivable *in vitro*.

L'hybridation ADN/ADN, méthode de référence pour la phylogénie des espèces (Lévy-Frèbault & Portaels, 1992) a montré que *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* et *M. microti* appartiennent à la même espèce génomique, et ont été

classés au sein du complexe *Mycobacterium tuberculosis* (Grange, 1996). Récemment, deux nouveaux taxons ont été identifiés au sein du complexe *M. tuberculosis* et assignés au rang de sous-espèces:

* En 1997, Van Soolingen *et al.*, proposent l'appellation de «*Mycobacterium tuberculosis subsp. canetti*» pour classer deux souches isolées chez l'homme. Ce taxon n'a pas été décrit selon les règles du Code de la Nomenclature et n'a pas de statut dans la nomenclature (Van Soolingen *et al.*, 1997; Pfyffer *et al.*, 1998).

* En 1999, L'étude de 119 souches isolées de chèvres, d'une souche isolée d'un mouton et d'une souche isolée d'un porc permet à Aranaz et son équipe de décrire *Mycobacterium tuberculosis subsp. caprae* (Aranaz *et al.*, 1999).

De nombreuses espèces de mycobactéries atypiques ou pathogènes pour les animaux sont à l'origine d'infections humaines opportunistes. L'une d'elles; *M. avium* est responsable de la tuberculose aviaire et d'infections systémiques chez les sujets immunodéprimés ou atteints du SIDA (Low *et al.*, 1997; Brettle, 1997). Cette espèce est rangée dans le complexe M-A-I-S qui comprend *M. avium*, *M. intracellulare* et *M. scrofulaceum*. Ces mycobactéries sont responsables d'affections pulmonaires, d'adénites, de lésions cutanées mais aussi d'affections généralisées dont la fréquence augmente avec la multiplication des cas de SIDA (Kiehn *et al.*, 1985; Damsker & Bottone, 1985).

Les difficultés d'identification des mycobactéries atypiques ont justifié plusieurs tentatives de classification. Runyon (1959) a proposé une classification fondée sur la pigmentation et la vitesse de croissance. Quatre groupes ont été ainsi définis (Tableau N°2) :

- Groupe I : Mycobactéries photochromogènes dont les colonies sont non pigmentées mais deviennent jaune-orange après 2 à 6 heures d'exposition à la lumière.
- Groupe II: Mycobactéries schotochromogènes: colonies pigmentées en jaune ou en rouge en présence comme en absence de la lumière.
- Groupe III: Mycobactéries non chromogènes: colonies non pigmentées.
- Groupe IV: Mycobactéries à croissance rapide.

Toutefois, cette classification est remise en question car elle se fonde uniquement sur les caractères de pigmentation des colonies. Or, chez une même espèce, des souches non pigmentées, d'autres pigmentées ou photochromogènes ont été

décrites (Pilet *et al.*, 1979). C'est pourquoi les laboratoires ont abandonné cette classification en faveur de l'identification des espèces par la caractérisation du profil biochimique (Nolte & Metchock, 1995).

Tableau N°2 : Classification des mycobactéries selon la vitesse de croissance et la pigmentation des colonies (Kanai, 1990)

Croissance	Groupe	Pathogénicité pour l'homme	
		Oui	Non
Croissance lente	Bacilles tuberculeux	<i>M. tuberculosis</i> <i>M. bovis</i> <i>M. africanum</i>	<i>M. microti</i>
	I	<i>M. kansasii</i> <i>M. marinum</i> <i>M. simiae</i> <i>M. asiaticum</i>	
	II	<i>M. scrofulaceum</i> <i>M. szulgai</i>	<i>M. gordonae</i> <i>M. farcinogenes</i>
Croissance rapide	III	<i>M. avium</i> <i>M. intracellulare</i> <i>M. xenopi</i> <i>M. malmoense</i> <i>M. haemophilum</i> <i>M. ulcerans</i>	<i>M. gastri</i> <i>M. nonchromogenicum</i> <i>M. terrae</i> <i>M. triviale</i> <i>M. paratuberculosis</i> <i>M. lepraemurium</i>
	IV	<i>M. fortuitum</i> <i>M. chelonae subsp. chelonae</i> <i>M. chelonae subsp. abscessus</i>	<i>M. smegmatis</i> <i>M. phlei</i> <i>M. chitae</i> <i>M. flavescens</i> <i>M. parafortuitum</i> <i>M. thermoresistible</i> <i>M. aurum</i> <i>M. duvalii</i> <i>M. neoaurum</i> <i>M. glivum</i> <i>M. vaccae</i> <i>M. komossense</i> <i>M. senegalense</i>

3. Caractères cultureux

Les mycobactéries se différencient de la plupart des autres germes par leurs exigences métaboliques. Elles se caractérisent par une croissance lente, avec un temps de génération de 2 à 20 heures selon les espèces (Abramson, 1952). Lors de l'isolement, les bacilles tuberculeux se développent très lentement, en quelques semaines à quelques mois. Lors de leur repiquage, la culture est plus rapide: elle apparaît en une dizaine de jours.

In vitro, la nutrition carbonée est assurée par la glycérine pour le bacille tuberculeux humain (Youmans & Youmans, 1953) ou le glucose pour le bacille

tuberculeux bovin (Gutiérrez & Juste, 1996). La nutrition azotée étant assurée par l'asparagine (Youmans, 1979a; Ramakrishnan *et al.*, 1972).

La température optimale de croissance est de 35 à 37°C, mais certaines espèces comme *M. marinum* et *M. ulcerans* poussent mieux à 32°C (Youmans & Youmans, 1950). Les températures maximales de culture étant de 30 et 41°C (Pilet *et al.*, 1979).

Les variations de pH supportées sont faibles, elles sont comprises entre 6 et 8. Le pH optimal est de 6,7 à 6,9 (Pilet *et al.*, 1979; Wilson & Miles, 1975a).

Le tableau N°3 illustre les caractères cultureux et morphologiques de quelques espèces de mycobactéries.

Tableau N°3: Caractères cultureux et morphologie des colonies de quelques mycobactéries (Tison & Carbonnelles, 1972)

Espèces	Morphologie	Caractères cultureux en isolement
<i>M. tuberculosis</i>	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Bacilles fins, immobiles, grêles, rectilignes parfois légèrement incurvés ➤ 1 à 4 µm de longueur pour 0,3 µm de largeur ➤ Présence de granulations acidophores et de granules parfois libre, prenant le Gram ➤ Parfois disposés en groupements dits «cordes» ou en «moustaches» 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Culture en 10 à 30 jours ➤ Colonies R « rough » pigmentées (crème beige), eugoniques, atteignant jusqu'à 5 à 10 mm de diamètre difficilement dissociables dans l'eau ➤ Aspect caractéristique en «Choux-fleurs»
<i>M. bovis</i>	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Bacilles courts trapus, moins granuleux que <i>M. tuberculosis</i> ➤ Aspect variable selon les souches 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Culture lente (25 jours) ➤ Colonies S (smooth), petites et humides, blanches et nacrées, non pigmentées, disgoniques
<i>M. africanum</i>	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Bacilles fins, granuleux ➤ Formation en «cordes–moustaches» 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Culture lente ➤ Colonies R, plates, beiges non pigmentées, disgoniques
<i>M. bovis</i> BCG	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Bacilles longs «10 µm» 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Culture lente ➤ Colonies R, beiges non pigmentées, disgoniques
<i>M. kansasii</i>	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Bacilles longs « 10 µm » ➤ Groupement en «cordes» cassées ➤ Aspect strié en barreaux d'échelle 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Culture lente ➤ Colonies S/R, blanches à l'obscurité se pigmentant en jaune-orange après exposition à la lumière (photo-induction)
<i>M. marinum</i>	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Bacilles petits et épais ➤ Groupement en amas 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Culture rapide (5 à 7 jours) ➤ Colonies S jaunes-oranges, photochromogène ➤ Pousse à 30°C, ne pousse pas à 37°C (ou difficilement)
<i>M. xenopi</i>	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Bacilles très longs (10 µm) ➤ Très fins 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Culture lente ➤ Colonies S, petites, dysgoniques ➤ Schotochromogènes
<i>M. goodii</i>	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Bacilles longs, polymorphes ➤ Groupement en palissade 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Culture en 10 à 15 jours, à 30°C et 37°C ➤ Colonies S, d'aspect parfois muqueux ➤ Pigmentation jaune-orange ➤ Schotochromogène
<i>M. avium-intracellulare</i>	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Similaires à <i>M. bovis</i> mais plus polymorphes (coccobacilles à forme bacillaire) 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Culture lente ➤ Colonies S, petites et dissociées, achromogènes mais pouvant se pigmenter en vieillissant (photo-induction tardive)
<i>M. fortuitum</i>	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Bacilles courts (2 à 3 µm), parfois longs, sa morphologie varie avec les conditions de culture 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Croissance rapide (3 à 4 jours) ➤ Colonies souvent mélangées S et R ➤ Concentre le vert malachite des milieux de Lowenstein-Jensen

4. Résistance aux agents physiques et chimiques

4.1. Agents physiques

Les mycobactéries sont classées parmi les bactéries pathogènes non sporulées les plus thermorésistantes. Elles sont détruites à la chaleur humide en 30 minutes à 65°C, 10 minutes à 72°C ou 2 minutes à 100°C (Wilson & Miles, 1975a).

Les bacilles tuberculeux sont sensibles à la lumière solaire, aux rayons Ultra-Violet (UV) et aux radiations ionisantes (Blood *et al.*, 1981). Le sang, le sérum et autres protéines protègent les bacilles contre les rayons UV (Wilson & Miles, 1975a). Par contre, ils sont moyennement résistants au froid et à la dessiccation (Wilson & Miles, 1975a).

4.2. Agents chimiques

Les mycobactéries sont résistantes à la plupart des désinfectants usuels, aux alcools et aux acides. Cependant, elles sont généralement sensibles aux désinfectants chlorés, iodés, formolés et crésolés (Blood *et al.*, 1981). En effet, le bacille tuberculeux peut être détruit par le phénol à 2%, le crésol à 3% pendant 4 heures, alors qu'il est détruit par la teinture d'iode en 5 minutes (Blood *et al.*, 1981). Certaines mycobactéries telles que *M. chelonae* et *M. fortuitum* résistent aux désinfectants hypochlorés et formolés (Tison & Carbonnelles, 1972).

5. Caractères biochimiques

L'isolement et l'identification des mycobactéries sont réalisés en deux étapes, la première consiste à obtenir une primo-culture à partir de prélèvements, la seconde (réalisée sur une culture pure) se base sur l'étude des caractères physiologiques et biochimiques (Bartley & Scolnik, 1989). Le tableau N°4 représente les principaux caractères d'identification des mycobactéries.

Tableau N°4: Principaux caractères d'identification des mycobactéries (Vestal, 1975)

Espèce	Croissance en moins de 7 jours	Pigmentation		Niacine	Nitrate	Catalase		Hydrolyse du Tween (j)	Réduction Tellurite 3j	Croissance à 5% NaCl		Croissance Sur Mc Conkey	Signification clinique		
		obscurité	lumière			Après 1h d'exposition	T° ambiante			Sq mm	pH 7 68°C			3j	15j
<i>M. tuberculosis</i>	-	-	-	-	+	3/5+	S	<45	-	>5	-	-	-	-	
<i>M. bovis</i>	-	-	-	-	-	-	S	<45	-	>5	-	-	-	-	
<i>M. kansasii</i>	-	-	+	+	-	3/5+	R		+	<5	-	-	-1+	-	
<i>M. marinum</i>	-/+	-	+	+	V	-	S	<45	-/+	<5	-	-	-2+	4+	-
<i>M. simiae</i>	-	-	+	+	+	-/+	R	>45	+	>5					
<i>M. scrofulaceum</i>	-	+	+	-	-	-	R	>45	+	-	-	-	-	-	-
<i>M. gordonae</i>	-	+	+	-	-	-	R	>45	+	5-10	-	-	+/-	-	-
<i>M. szulgai</i>	-	+/-	+	**	-	+	R	>45	+	>5	-	-	-/+	+	-
<i>M. flavescens</i>	-/+	+	++	-	-	+	R	>45	+	5-10	-	+/-	-	-4+	-
<i>complex M. avium</i>	-	-	-	-	-	-	S	<45	+	-	+/-	-	-	-1+	+/-
<i>M. ulcerans</i>	-	-	-	-	-	-	R	>45	+	-					
<i>M. xenopi</i>	-	+	+	-	-	-	S	<45	+	-	-	-	+/-	2/5+	-
<i>M. gastri</i>	-	-	-	-	-	-	S	<45	-	5-10	-	-	-	-	-
<i>complex M. terrae</i>	-	-	-	-	-	1/5+	R	>45	+	5-10	-	-	-	-2+	-
<i>M. triviale</i>	-	-	-	-	-	1/5+	R	>45	+	5-10	-	+	-/+	3/5+	-
<i>M. fortuitum</i>	+	-	-	-	-	3/5+	R	>45	+	+/-	V	+	±/2+	3/5+	+
<i>M. chelonae</i>	+	-	-	-	V	-	R	>45	+	-	V	V	2/3+	4/5+	+
<i>M. smegmatis</i>	+	-	-	-	-	1/3+	R	>45	+	<5	+	+	-	3+	-
<i>M. phlei</i>	+	+	+	-	-	1/3+	R	>45	+	<5	+	+	-	-3+	-
<i>M. vaccae</i>	+	-	+	+	-	1/3+	R	>45	+	<5	V	+	-	3+	-

- : souvent négatif. +: souvent positif. +/-: positif, rarement négatif. -/+ : négatif, rarement positif.

V: variable. R: rapide. S: slow. Espace: indéterminé

6. Physiopathologie

6.1. Pouvoir pathogène

6.1.1. Complexe *Mycobacterium tuberculosis*

Ne libérant au cours de sa multiplication aucune substance toxique, la virulence de *M. tuberculosis* est liée à sa capacité de survie et de multiplication à l'intérieur des macrophages de l'organisme hôte. Il est considéré comme un parasite intracellulaire facultatif. *Mycobacterium tuberculosis* est toujours pathogène et ne se comporte jamais en saprophyte, il est responsable:

- D'infections pulmonaires le plus souvent avec possibilités de dissémination des bacilles dans l'organisme à partir de la lésion primitive, notamment par voie lymphatique ou hématogène.
- D'infections extrapulmonaires, plus rares, représentant 10 à 15% des cas (Romand *et al.*, 1997). Les formes abdominales constituent 5-10% des localisations extrapulmonaires (Benchekroun *et al.*, 2001). Les BK peuvent aussi s'attaquer à d'autres organes tels les méninges, les reins, les articulations...

Mycobacterium bovis entraîne chez les bovins des lésions pulmonaires ganglionnaires et aussi mammaires, avec le passage du bacille dans le lait.

L'homme s'infecte surtout par consommation de viandes et produits laitiers crus (Acha & Szyfres, 1987). La porte d'entrée des bacilles est principalement digestive, ce qui pourrait expliquer la prédilection apparente de *M. bovis* à donner des localisations extrapulmonaires: adénites notamment (Grosset *et al.*, 1990)

M. africanum, désigné comme bacille tuberculeux africain, présente des caractères intermédiaires entre ceux de *M. tuberculosis* et *M. bovis* (Castets *et al.*, 1968; Grange & Yates, 1989). C'est un parasite strict de l'homme en Afrique occidentale et centrale (Collins & Grange, 1987); il est pathogène pour le cobaye mais non pour le lapin (Castets *et al.*, 1968).

M. microti, décrit pour la première fois en 1937 (Wells, 1937), n'est pas pathogène pour l'homme mais provoque la TB chez les rongeurs (Wayne & Kubica, 1986).

M. tuberculosis subsp. caprae, cette espèce a été isolée en Espagne à partir de nœuds lymphatiques et de poumons de chèvres atteintes de tuberculose. Comme

c'est le cas pour les autres représentants du complexe *M. tuberculosis*, la spécificité pour un hôte particulier n'est pas totale. Ainsi, deux souches de *M. tuberculosis subsp. caprae* ont été isolées d'un porc et d'un mouton élevés avec des chèvres. Trois souches de mycobactéries, présentant un spoligovar identique à celui de *M. tuberculosis subsp. caprae*, ont été isolées chez l'homme. En revanche, aucune souche de cette sous-espèce n'a pu être isolée chez les bovins (Aranaz *et al.*, 1999).

6.1.2. Mycobactéries atypiques

Les mycobactérioses humaines ne se distinguent ni par la clinique ni par l'anatomo-pathologie des tuberculoses à *M. tuberculosis* ou à *M. bovis*. Dans la majorité des cas, elles s'installent chez des patients présentant un déficit localisé ou généralisé de l'immunité (Grosset & Sors, 1984).

- Mycobactérioses pulmonaires: Elles frappent habituellement des sujets masculins, âgés de plus de 40 ans. Les germes en cause sont *M. avium-intracellulare*, *M. xenopi*, *M. kansasii*, très rarement, *M. szulgai*, *M. malmoense*, *M. fortuitum* et *M. chelonae*.
- Mycobactérioses ganglionnaires: Elles affectent les enfants au dessous de 8 ans chez qui elles provoquent des adénites froides dont le tout premier agent est *M. scrofulaceum*. Les adénites à *M. avium-intracellulare* sont moins fréquentes et touchent des enfants plus âgés.
- Autres mycobactérioses: *M. fortuitum* et *M. chelonae* sont responsables d'abcès et de certaines infections ostéo-articulaires. Les infections cutanées sont dues dans les pays tempérés à *M. marinum*, et dans les pays tropicaux à *M. ulcerans*. La fréquence des infections généralisées, habituellement à *M. avium-intracellulare*, augmente régulièrement en même temps que se multiplient les cas de SIDA (Brettle, 1997; Low *et al.*, 1997).

6.1.3. Mycobactéries des lèpres humaine et animale

M. leprae est l'agent étiologique de la lèpre qui se traduit chez l'homme par une affection cutané-nerveuse. Chez la souris, *M. lepraemurium* est responsable de la destruction progressive des extrémités nerveuses et de lésions cutanées importantes (Wayne & Kubica, 1986).

CHAPITRE II:

TUBERCULOSE HUMAINE

1. Primo-infection

La primo-infection tuberculeuse correspond au premier contact de l'organisme avec la bactérie. La contamination se fait par voie aérienne (inhalation de micro-gouttelettes contenant les bactéries présentes dans les sécrétions respiratoires des patients infectés) entraînant des lésions pulmonaires (Dannenbergh, 1989). La multiplication de la bactérie entraîne une réponse immunitaire et une nécrose caséuse (défense de l'organisme destinée à empêcher le développement des bactéries et à favoriser leur destruction). Dans 9 cas sur 10, la primo-infection tuberculeuse évolue spontanément vers la guérison définitive (El Baghdadi, 1999).

2. La tuberculose maladie

Le risque de l'apparition de la maladie, en dehors de toute immunodépression, est estimé entre 5 et 10% dans les années qui suivent l'infection, puis à 5% pour le reste de la vie.

Il est souvent impossible de dire si une TB est le fait d'une nouvelle infection ou d'une exacerbation endogène des bacilles anciens. Il semblerait cependant, que le risque d'évolution vers une maladie après réinfection soit cinq fois moins grand que lors d'une première infection, ce qui correspond aussi aux 80% de protection habituellement accordés au BCG (Graham & Golditz, 1995). Il est actuellement bien établi que le risque de passage à la maladie est totalement modifié dans le cas d'une infection à VIH (Virus de l'Immunodéficience Humain): Il semblerait qu'il soit de l'ordre de 30% (Styblo, 1991; Styblo, 1990; Sudre, 1993). L'épidémiologie de la TB s'en trouve considérablement modifiée.

En l'absence de tout traitement, l'évolution des sujets atteints de TB pulmonaire à microscopie positive, se fait vers (Auregan, 1997):

- le décès en 2 à 4 ans dans 50% des cas,
- La guérison spontanée dans 20 à 25% des cas,
- La diffusion chronique des bacilles dans 25 à 30% des cas.

Ainsi, peut se comprendre la perpétuation de la tuberculose: un malade contamine en moyenne une nouvelle personne par mois. Non traité (condition de bien des pays en voie de développement), il propage l'infection pendant en moyenne 2 ans, soit de 20 à 30 contaminations, ce qui signifie deux malades, dont un contagieux. Ainsi, un cas contagieux produit au moins un nouveau cas contagieux. Inversement, on comprend ici très bien l'utilité et l'efficacité d'un plan anti-tuberculeux bien conduit: dès l'instant qu'un cas n'est plus capable de donner un autre cas contagieux, la fréquence de la maladie diminue et, par suite, la transmission du bacille (Auregan, 1997).

3. Transmission

La transmission des BK est essentiellement le fait de patients porteurs de tuberculose pulmonaire à microscopie positive: ils infectent 10 à 20 fois plus de personnes de leur entourage que ceux porteurs d'autres formes de TB (van Genus *et al.*, 1975; Grzybowski *et al.*, 1975). Le mode de contamination est le plus souvent aérien : inhalation de gouttelettes de salive projetées dans l'atmosphère ou des poussières produites par leur dessiccation. Le risque de la transmission d'un réservoir de germes à un hôte jusque là sain, dépend surtout de:

- La promiscuité ou l'étroitesse de contact: 50% des enfants de moins de 15 ans d'un foyer de tuberculeux sont infectés contre 5% des enfants du même âge n'ayant eu que des contacts occasionnels (Grzybowski *et al.*, 1975; Seijeoung, 2001).
- La durée de l'exposition et la densité des particules de l'air respiré.

Ces deux facteurs sont liés entre eux par la formule suivante (Auregan, 1997):

(Nombre de particules/Volume pièce) X Temps d'exposition

- L'intensité et la fréquence des émissions des bacilles (expectorations et toux).
- L'âge: au contact d'un porteur de TB pulmonaire à microscopie positive, 20,2% des sujets tout âge confondu sont infectés tandis que les enfants de moins de 15 ans le sont à 50% (van Genus *et al.*, 1975).
- Le sexe : les hommes ont un taux d'infection régulièrement plus élevé que les femmes (Rouillon *et al.*, 1996; Murray *et al.*, 1990; Rieder *et al.*, 1990). Dans les pays en voie de développement, on observe souvent, pour les formes

pulmonaires, 65% d'hommes et 35% de femmes. En revanche, pour les formes extrapulmonaires; il y a presque égalité entre les deux sexes (Auregan *et al.*, 1995).

4. Epidémiologie de la TB dans le monde

La recrudescence de la TB dans les pays en voie de développement et industrialisés est devenue un sujet d'inquiétude pour les spécialistes, les politiciens et le public (Billo, 1996).

Les causes évoquées pour expliquer cette recrudescence sont l'épidémie d'infection par le VIH, la migration importante des populations et l'augmentation de la résistance à plusieurs antibiotiques antituberculeux (Bloch *et al.*, 1994; CDC, 1983; Freiden *et al.*, 1993; Grosset, 1993; Grosset & Truffot-Pernot, 1988; Kapanoff *et al.*, 1978; Sudre *et al.*, 1992).

L'OMS estime qu'entre 1,7 à 2 milliards d'êtres humains (Billo, 1996), sont infectés par *M. tuberculosis*, et que chaque année, 7 à 8 millions d'entre eux font une TB maladie et presque 3 millions d'entre eux en meurent (Dolin *et al.*, 1994). 75% des tuberculeux ont un âge compris entre 15 et 50 ans, la tranche de population la plus productive, ce qui explique l'incidence de la maladie de point de vue économique (WHO, 1997a; Dolin *et al.*, 1994).

L'analyse des principaux indicateurs épidémiologiques de la TB dans différents types de population se base sur les éléments suivants (Sudre, 1993):

4.1. Risque annuel d'infection ou RAI

Mis au point en 1969 par les travaux de Styblo de l'Union Internationale Contre la Tuberculose et les Maladies Respiratoires (UICTMR), il indique la probabilité qu'un individu sera infecté ou réinfecté par *M. tuberculosis* au cours d'une année (Styblo *et al.*, 1969). Cet indicateur permet d'apprécier l'importance de la transmission bacillaire dans une population, chaînon le plus important dans l'épidémiologie de la TB (Styblo *et al.*, 1969; Styblo, 1980; Sutherland, 1976). Cette mesure est devenue l'indicateur fondamental de la TB dans une communauté (Sutherland, 1976). Après avoir diminué depuis le début du 20^{ème} siècle, le RAI est devenu stationnaire ou en augmentation dans de nombreux pays

en voie de développement et même dans certaines villes des États-Unis depuis quelques années (Hurtel, 1994); deux facteurs sont responsables:

- Un relâchement des structures sociales et médicales lié, dans les pays développés, à une méconnaissance progressive du danger que représente la TB, et dans les pays en voie de développement à un manque de moyens financiers et/ou une instabilité politique.
- L'émergence de l'épidémie de SIDA; en l'an 2000, on estime à 10 millions le nombre de personnes doublement infectées.

4.2. Incidence

C'est un indice servant à l'évaluation de la situation globale de la TB et définit la fréquence annuelle de nouveaux cas. Dans la plupart des pays industrialisés, le taux d'incidence annuel diminuait régulièrement depuis plusieurs décennies, de 5 à 7% en moyenne par an, lorsqu'aux États-Unis, en 1985, ce déclin s'est ralenti pour faire face l'année suivante à une augmentation significative (Sudre *et al.*, 1992). En France, l'incidence des cas déclarés, qui avait régulièrement diminué de 4% par an entre 1970 et 1988, s'est stabilisée à un taux de 16 pour 100000 habitants avant d'augmenter en 1992 (Hubert *et al.*, 1995).

En Irlande, 424 cas ont été déclarés en 1998, soit un taux de 11,7/100000 habitants (Smith *et al.*, 2000), un taux très élevé par rapport aux faibles taux de déclaration rapportés dans d'autres pays tels que la Norvège (4,6/100000) et la Suède (5,1/100000). Cependant, il reste moins élevé que ceux observés en Autriche (17/100000), en République Tchèque (17,7/100000) et en Allemagne (13,6/100000), de même que dans les autres pays européens dont les taux de déclaration sont inférieurs à 20/100000 (Anonyme, 1999a).

En Afrique, cette incidence est dans plusieurs pays de 250 pour 100000 (Grosset *et al.*, 1990). Les indices les plus faibles (<15000) ne sont observés que dans quelques pays: Australie, Canada, Danemark, Pays-Bas... (Grosset *et al.*, 1990).

4.3. Prévalence

C'est l'ensemble de cas ou de foyers en évolution (en traitement ou non) à un moment donné, dans une population donnée, généralement rapportée à 100000 personnes (Sudre *et al.*, 1992). Elle exprime la probabilité qu'un individu, parmi

ceux qui sont observés, soit malade ou infecté au moment de l'observation (Dehbi, 2000). Elle varie de 19,4% au niveau de la méditerranée à 43,8% dans la région ouest du Pacifique. L'Europe et les autres pays industrialisés (USA, Canada, Japon, Australie) ont une prévalence de 31,6% (Sudre *et al.*, 1992).

4.4. Taux de mortalité

Il décrit le nombre de décès par million d'habitants pendant une période donnée. La mortalité est due à un échec ou un retard de diagnostic, ou encore, à un traitement inefficace (Sudre *et al.*, 1992). C'est un indice épidémiologique peu intéressant pour trois raisons (Rouillon *et al.*, 1996; Murray *et al.*, 1990):

- Causes de décès très mal fournies dans les pays en voie de développement.
- La prévalence et la mortalité par la TB n'ont plus l'importance dramatique que l'Occident a connue.
- L'efficacité des antibiotiques a totalement modifié l'évolution de la maladie.

L'OMS estime la mortalité annuelle due à la TB à 3 millions de personnes à travers le monde (Dolin *et al.*, 1994) dont 40000 cas en Occident, 500000 cas en Afrique, 750000 cas en Chine et 1 million de cas dans les pays du Sud Est Asiatique (Auregan, 1997).

5. Epidémiologie de la tuberculose au Maroc

Au Maroc, la TB est l'un des problèmes majeurs de santé publique. Une grande proportion de la population est infectée par le bacille tuberculeux avec une prédominance chez les personnes âgées de plus de 20 ans (Guide de la Lutte Anti-Tuberculeuse, 1996).

5.1. Analyse des principaux indicateurs épidémiologiques

- Le RAI: La dernière estimation du risque annuel d'infection a montré un taux de 1,2% par an (Othmani, 1999).
- La prévalence: elle était de 114,5/100000 habitants en 1994 (Othmani, 1999).
- L'incidence: Elle est liée à la fréquence de la TB et aux activités de dépistage. Elle varie selon les régions, la densité, le niveau de vie de la

population et l'accessibilité aux services de santé. Jusqu'à 1986, l'incidence cumulée de la TB toutes formes confondues, était de l'ordre de 120 nouveaux cas pour 100000 habitants, ce qui représentait 26000 à 28000 nouveaux cas chaque année. En 1994, le nombre de nouveaux cas enregistrés était de 30316, en augmentation de 10% par rapport aux années précédentes, avec 19% approximativement enregistrés à Casablanca (Ministère de la Santé, 1994). L'incidence des cas déclarés se situait aux environs de 100 nouveaux cas pour 100000 habitants en 1996 (Guide de la Lutte Anti-Tuberculeuse, 1996; Anonyme, 2001). Grâce aux efforts du Ministère de la santé publique qui a restructuré le Plan National de Lutte contre la Tuberculose, ces chiffres sont en baisse depuis cette dernière date. Toutefois, la TB reste particulièrement accrue dans les régions les plus urbanisées et les plus peuplées du Maroc. Les populations des plaines à l'Ouest de la chaîne montagneuse de l'Atlas sont les plus touchées. L'incidence dans les plaines du Gharb et du Saïs est de 150 nouveaux cas pour 100000 habitants par an. Dans les grandes villes, 20% des nouveaux cas sont localisés à Casablanca qui connaît une forte incidence pouvant dépasser 180 nouveaux cas par 100000 habitants dans quelques unes de ses préfectures. Par contre, d'autres régions dans le Tensift, le Souss et la Chaouia ont connu une régression des taux de TB, entre autres, à Doukkala-Abda, Rabat-Zaërs, Al Hoceima-Taza, Meknès-Tafilalet et Tadla-Azilal. Par contre, les régions sahariennes, l'oriental et celles de Tanger-Tétouan et Fès-Boulemane, ont connu une recrudescence de la maladie (Anonyme, 2001).

Les tableaux N°5, 6 et 7 illustrent l'incidence cumulée des cas de TB toutes formes confondues, l'incidence cumulée des cas de TB pulmonaire à microscopie positive (TPM) (El Baghdadi, 1999) et l'incidence cumulée des TPM par région pendant l'année 1994 (Guide de la Lutte Anti-Tuberculeuse, 1996), respectivement.

- La mortalité: Bien que la mortalité due à la TB ne soit pas un bon indicateur pour juger de l'ampleur du problème lié à cette maladie (Rouillon *et al.*, 1996; Murray *et al.*, 1990), elle permet néanmoins d'apporter un éclaircissement sur les problèmes inhérents au diagnostic et à la conduite

du traitement. Ce taux est estimé à 4 décès pour 100000 habitants par an (Guide de la Lutte Anti-Tuberculeuse, 1996).

Tableau N°5: Incidence cumulée des cas de TB toutes formes confondues
(El Baghdadi, 1999)

Année	1994	1995	1997
Population X 1000	26668	27760	27311
Nouveaux cas	30316	29829	29829
Taux / 100 000	114	108	110,7

Tableau N°6: Incidence cumulée des cas de TB pulmonaire à microscopie positive
(El Baghdadi, 1999)

Année	1994	1997
Population X 1000	26668	27311
Nouveaux cas	14650	14134
Taux / 100 000	54,9	51,8

Tableau N°7: Incidence cumulée des TPM par région pendant l'année 1994
(Guide de la Lutte Anti-Tuberculeuse, 1996)

Région	Incidence TPM+/100000 habitants/an
Sud	43,3
Tensift	46,2
Centre	58,7
Nord-Ouest	75,1
Centre-Nord	52,4
Oriental	31,4
Centre-Sud	45,0
National	55,0

6. Pathogénie

L'infection pulmonaire par le BK se fait par l'intermédiaire des gouttelettes infectées, de taille minuscule qui sèchent rapidement et persistent dans l'atmosphère sous forme d'aérosols pendant plusieurs heures. Les particules de taille supérieure à 5 microns de diamètre sont arrêtées au niveau des voies respiratoires supérieures et évacuées par le tapis mucociliaires (Dannenbergh, 1989). Seules les particules de 5 microns de diamètre contenant un ou deux bacilles sont capables d'atteindre les alvéoles pulmonaires. A ce niveau les BK sont phagocytés par les macrophages alvéolaires (Youmans, 1979b). A ce stade, il n'y a ni expression clinique, ni expression radiologique: c'est le stade de la primo-infection qui se traduit par des phénomènes immunitaires de type hypersensibilité retardée. Ainsi, une nécrose centrale et un caséum entourés de macrophages et de lymphocytes commencent à apparaître probablement dus à la libération de produits toxiques cellulaires et bactériens dans le milieu. L'immunité qui en résulte s'oppose à une réinfection et à la dissémination de l'infection en cours. En aucun cas cependant, elle n'est définitive ni même absolue (El Baghdadi, 1999). Dans 90% des cas, il y a régression des lésions ou incubation pendant plusieurs années des bacilles vivant à métabolisme réduit. Les 10% restants développent une tuberculose maladie, dans la moitié des cas de façon précoce en moins de 5 ans, dans l'autre moitié plus tardivement, parfois après plusieurs décennies: il y a alors multiplication intense des bacilles, réactions immunitaires importantes et par suite caséification des lésions qui entraîne la nécrose totale des cellules. Les lésions caséuses (nodules) peuvent évoluer vers la liquéfaction et se vider dans les bronches avec formation de cavernes. Celles-ci sont les lésions les plus riches en bacilles, donc des sources de contamination pour l'entourage des malades.

Dans les TB extrapulmonaires, les lésions sont presque toujours fermées et peu riches en bacilles. En cas de co-infection par le VIH, la progression vers le stade maladie est souvent accélérée (Murray, 1996), et les localisations extrapulmonaires qui témoignent d'une dissémination hématogène des bacilles, sont plus fréquentes.

Des études ont tenté cependant d'élucider la susceptibilité particulière de certains sujets à développer, après l'étape de primo-infection, une tuberculose maladie ou

à faire des formes particulièrement graves de la maladie. Ainsi, certains individus possèdent des gènes qui les prédisposent aux infections microbiennes, ou au contraire, les protègent par rapport à ces infections. A titre d'exemple, le gène NRAMP1 (Natural Resistance Associated Macrophage Protein 1) qui code pour une protéine intégrale des cellules phagocytaires, macrophages et granulocytes, localisée dans la membrane de leurs phagosomes (Bellamy *et al.*, 1998), participe à la résistance naturelle aux infections : en son absence, ou lorsqu' il subit une mutation, la croissance des parasites intracellulaires, tels *Mycobacterium tuberculosis*, n'est plus contrôlée (Cellier & Gros, 1997).

7. Interaction Tuberculose-VIH

L'épidémie d'infection au VIH a indéniablement contribué à la recrudescence de la TB ces dernières années. Dans plusieurs pays en voie de développement, la TB est la maladie opportuniste la plus fréquemment associée à l'infection au VIH (Mohle-Boetani *et al.*, 2002 ; Hopewell & Chaisson, 2000). Il est estimé que l'incidence mondiale des cas de TB attribuables au VIH a évolué de 315000 cas (4,2% du total des cas de TB) en 1990 à 1,4 millions (14% de tous les cas de TB) en 2000 (Tableau N°8). Approximativement, 40% des cas de co-infection TB-VIH surviennent en Asie du Sud-Est et 40% en Afrique sub-saharienne (Dolin *et al.*, 1994). En 1992, l'épidémie de l'infection au VIH en France expliquerait à elle seule 30% de l'excès des cas observés (Hubert *et al.*, 1995).

En Afrique, le VIH est le déterminant le plus important de l'incidence de la TB ces 10 dernières années. D'après les estimations de l'OMS, 70% des cas infectés simultanément par le VIH et la TB en 1996 à travers le monde, soit 6,6 millions de personnes, vivaient en Afrique sub-saharienne (Raviglione *et al.*, 1995).

La conséquence dramatique et directe en Afrique sub-saharienne de l'épidémie du VIH est l'augmentation du taux d'incidence de la TB de 191 cas en 1990 à 293 cas par 100000 habitants en 2000. Bien que les facteurs démographiques comme la croissance démographique et le changement de la structure de la population sont largement responsables de l'augmentation de la TB à l'échelle mondiale, l'épidémie du VIH en Afrique sub-saharienne joue un rôle plus déterminant que les facteurs démographiques (Cosivi *et al.*, 1998).

Au Maroc, pour l'ensemble des sidéens, dont le nombre est estimé en 1996 à 434, la majorité a développé une TB au cours de sa maladie (Lazraq, 1999).

Tableau N°8 : Nombre de cas estimés de TB humaine et de cas de TB attribuables au VIH en 1990, 1995 et 2000 (Dolin *et al.*, 1994)

Région	1990			1995			2000		
	Cas de TB	Taux (1)	Cas attribués au VIH	Cas de TB	Taux	Cas attribués au VIH	Cas de TB	Taux	Cas attribués au VIH
Asie du Sud-est	3 106 000	237	66 000	3 499 000	241	251 000	3 952 000	247	571 000
Pacifique occ. (2)	1 839 000	136	19 000	2 045 000	140	31 000	2 255 000	144	68 000
Afrique	992 000	191	194 000	1 467 000	242	380 000	2 079 000	293	604 000
Med. Orientale	641 000	165	9 000	745 000	168	16 000	870 000	168	38 000
Amériques (3)	569 000	127	20 000	606 000	123	45 000	645 000	120	97 000
Europe de l'est (4)	194 000	47	1 000	202 000	47	2 000	210 000	48	6 000
Pays industrialisés (5)	196 000	23	6 000	204 000	23	13 000	211 000	24	26 000
Total des cas de TB	7 537 000	143	315 000	8 768 000	152	738 000	10 222 000	163	1 410 000
Total des cas de TB attribués au VIH			4,2%			8,4%			13,8%
Augmentation depuis 1990				16,3%			35,6%		

1 : Taux = incidence de nouveaux cas par 100 000 habitants

2 : Régions du Pacifique occidental de l'OMS, sauf le Japon, l'Australie et la Nouvelle-Zélande

3 : Régions des Amériques de l'OMS, sauf les Etats Unis et le Canada

4 : Pays de l'Europe de l'Est et Etats indépendants de l'ex-URSS

5 : Europe de l'ouest, Etats-Unis, Canada, Japon, Australie et Nouvelle-Zélande

Mycobacterium tuberculosis et les mycobactéries du groupe *Mycobacterium avium-intracellulare-scrofulaceum* sont les espèces majeures rencontrées chez les patients atteints du SIDA (Brettle, 1997; Low *et al.*, 1997). Cependant, *Mycobacterium bovis* a été isolé chez des personnes infectées par le VIH dans les pays industrialisés (Cosivi *et al.*, 1998). Les cas de TB dus à *M. bovis* chez les personnes atteintes de SIDA ressemblent également aux maladies causées par *M. tuberculosis*. Ainsi, ils se manifestent sous la forme de maladies pulmonaires, de lymphadénopathies, ou chez les personnes dont le système immunitaire a été le plus déprimé, par des maladies multiples.

En France, l'infection par *M. bovis* représentait 1,6% des cas de TB chez les patients atteints de SIDA, toutes les souches étaient résistantes à l'isoniazide (Dupon & Ragnaud, 1992).

La co-infection par le VIH et la TB est particulièrement mortelle, car la TB est beaucoup plus susceptible de devenir active chez les personnes dont le système immunitaire est affaibli. Et plus il y a de cas de TB active, infectieuse, plus la maladie risque de se propager dans les populations saines.

8. Traitement

Pour lutter contre la maladie, tous les cas de TB active doivent être identifiés, aussi faut-il suivre jusqu'à terme un programme de traitement complet et adapté d'une durée de 6 à 9 mois.

Les six médicaments recommandés par l'OMS et l'UICMR et qui sont les plus couramment utilisés dans les pays en développement sont l'isoniazide, la Streptomycine, le Thiacétazone, l'Ethambutol, la Rifampicine et le Pyrazinamide. Ces médicaments sont utilisés sous forme de différentes combinaisons pendant diverses durées ce qui permet surtout d'éviter le risque d'apparition d'une résistance aux antibacillaires (Guide de la Lutte Anti-Tuberculeuse, 1996).

Actuellement, le traitement de la TB pour toute personne nouvellement infectée par *M. tuberculosis* se compose de 2 phases: une phase d'attaque pendant 2 mois et une phase de stérilisation pendant 4 mois supplémentaires. En cas de retraitement, les choix thérapeutiques sont essentiellement guidés par l'antibiogramme, c'est à dire la sensibilité des BK isolés, et par la composition du traitement initial. Cependant, au Maroc, en raison de contraintes financières et

logistiques, les antibiogrammes ne peuvent être utilisés que dans des cas exceptionnels.

Cependant, lors d'un traitement aussi long, le problème du non-respect des règles du traitement (arrêts répétés, erreurs dans les prises des médicaments) a deux conséquences épidémiologiques importantes:

- le retard de l'élimination de la TB malgré l'existence de médicaments actifs,
- la propagation de souches résistantes à ces médicaments (Tonnel, 1995).

Pour essayer de contrôler ce problème, et après avoir déterminé les zones les plus sensibles, l'OMS et ses partenaires internationaux ont créé une stratégie de traitement de brève durée sous surveillance directe: le DOTS (Directly Observed Treatment Short Course). Cette stratégie comprend cinq éléments: l'engagement politique, l'examen microscopique, la fourniture de médicaments, les systèmes de surveillance et la surveillance directe du traitement (WHO, 1994a).

Les objectifs épidémiologiques de l'OMS consistent à dépister 70% de nouveaux cas et d'en guérir 85%. Initialement prévus pour être atteints en l'an 2000, ces objectifs, trop ambitieux si l'on considère l'état réel des services de santé dans les pays les plus peuplés et les plus démunis, ne seront probablement atteints qu'entre 2010 et 2020 au niveau mondial (WHO, 1997c). Cependant, dans certains pays, dont le Maroc, ces objectifs ont été atteints et même dépassés. En effet, depuis l'introduction de cette stratégie au niveau mondial, des millions de cas infectieux ont bénéficié d'un traitement DOTS efficace. A la fin de 1998, les 22 pays les plus touchés qui, selon les estimations de l'OMS, enregistrent 80% de cas incidents, avaient tous adopté la stratégie. 43% de la population mondiale avait accès au DOTS, soit le double par rapport à 1995 et 21% des cas estimés étaient traités dans le cadre de cette stratégie, soit également le double par rapport à 1995 (Auregan, 1997; WHO, 1999).

9. Résistance aux antibacillaires

La résistance aux médicaments antituberculeux est un phénomène qui prend de l'ampleur partout dans le monde. Une étude récente menée par l'OMS et l'UICMR a permis de conclure à l'émergence de souches résistantes aux antituberculeux dans tous les pays étudiés (WHO, 1997a).

Les souches multirésistantes sont insensibles au moins à l'isoniazide et à la rifampicine, mais leur résistance peut également s'étendre à d'autres antibiotiques. En 1947, dès les premiers mois qui ont suivi l'introduction de la streptomycine dans le traitement de la tuberculose, la majorité des patients atteint de TB pulmonaire excavée, traités par la streptomycine seule, ont vu leurs bacilles devenir résistants à cet antibiotique (Howard *et al.*, 1949; Grosset, 1993). Le même phénomène s'est reproduit avec les antibiotiques découverts ultérieurement, chaque fois qu'ils ont été prescrits seuls (souvent successivement) pour le traitement de la TB pulmonaire excavée.

La TB multirésistante peut toucher des patients infectés par le VIH (Herrera *et al.*, 1996; Samper *et al.*, 1997) ainsi que des patients non infectés ou ne présentant aucune autre cause de déficit immunitaire (Herrera *et al.*, 1996; Samper *et al.*, 1997; Palenque *et al.*, 1998; Anonyme, 1999b). Elle est la conséquence du traitement inefficace de cas actifs. Des lacunes dans les programmes de traitement (ex: approvisionnement irrégulier en médicaments) ou dans les pratiques des médecins (ex: erreur dans la prescription d'antibiotiques) et le non-respect du traitement par les patients sont des facteurs qui exacerbent le problème (Wood, 1993; Snider *et al.*, 1994).

Une résistance qui se développe après un traitement antituberculeux est désignée comme étant une résistance acquise (secondaire). Si le bacille résistant est transmis à une autre personne, on dit qu'il présente chez celle-ci une résistance primaire (transmise), d'où l'intérêt d'étudier la sensibilité aux antibacillaires avant tout retraitement.

L'OMS estime que 50 millions de personnes sont infectées par des souches de bacilles tuberculeux résistants (WHO, 1997b). En effet; des "points chauds" de TB multirésistante ont été trouvés partout dans le monde: au Canada (Santé Canada, 1999; Hersi *et al.*, 1999), en Lettonie (WHO, 1997a), en Russie (CDC, 1998), aux USA (Sepkowitz *et al.*, 1994; Bifani *et al.*, 1996; CDC, 1999), en Espagne (Samper *et al.*, 2000), en Irlande (Smith *et al.*, 2000), en France (Schowobel *et al.*, 1994). Selon une étude réalisée à Casablanca (Maroc) entre 1992 et 1994, la résistance primaire aux antibacillaires a atteint un taux global de 23,9% avec un taux faible de multi-résistance de 1,49% (El Baghdadi *et al.*, 1997a). Dans une autre étude réalisée ultérieurement, sur 40 isolats résistants de *M. tuberculosis*, 5% des souches se sont révélées résistantes à un antibiotique majeur, 15% à deux

antibiotiques majeurs, 16% à trois antibiotiques majeurs et 30% à quatre antibiotiques majeurs (El Baghdadi, 1999).

10. Prévention

La prévention de la TB s'articule autour de plusieurs éléments dont:

- Améliorer le niveau et la qualité de vie du moment que la tuberculose est, avant tout, une maladie socio-économique.
- Un diagnostic et un traitement les plus précoces possibles de la maladie et aussi une meilleure connaissance «des groupes à risque élevé» de TB.
- Une prévention individuelle grâce au dépistage des cas contacts, les personnes au contact de tuberculeux contagieux sont exposées au risque de TB infection, avec un risque d'évolution vers la TB maladie, d'autant plus élevé que le contaminateur est proche.
- Une vaccination par le BCG qui a été mis au point en 1921 et devenu depuis le vaccin le plus utilisé (Graham & Colditz, 1995; Kimble, 2001).
- Les mesures d'hygiène en milieu hospitalier, protection du personnel, aération et ventilation.

En conclusion, la mise en place rigoureuse des mesures préventives individuelles et collectives doit permettre de réduire l'épidémie actuelle de la TB. De plus, l'amélioration des pratiques des soins et la qualité de la prise en charge des patients, le développement du système de surveillance de la maladie au niveau national et international, éviteront l'éclosion de souches multirésistantes qui demeure à terme, une préoccupation essentielle de l'épidémiologiste et du thérapeute (WHO, 1998; WHO, 1999; Behr *et al.*, 1999; Dye *et al.*, 1999; Pablo-Mendéz *et al.*, 1998).

10.1. Prévention et lutte au Maroc

Que la TB mette en moyenne une dizaine d'années à se déclarer, explique qu'il y ait un pourcentage plus faible de petits enfants malades. Voilà d'excellentes raisons pour que le Maroc ait choisi de participer à l'effort mondial de lutte lancé par l'OMS, et à intégrer la stratégie DOTS (Directly Observed Treatment Short Course). C'est une volonté politique, celle du Ministère de la Santé Publique qui a restructuré en 1990, un Plan National de Lutte Anti-Tuberculeuse doté d'un budget

4 fois plus important pour permettre à tous les Marocains atteints d'accéder aux soins (Othmani, 1995).

Le dépistage de la maladie est réalisé au niveau de tous les centres de santé et des centres de diagnostic spécialisés de la TB à travers le royaume où les vaccinations, les examens et les traitements sont dispensés sans discrimination, gratuitement. Une fois la maladie dépistée, une enquête familiale est mise en œuvre pour déterminer le nombre de personnes contaminées. Les personnes atteintes sont convoquées dans les centres de santé où elles doivent se présenter chaque jour pour prendre leur dose de médicament pendant les deux premiers mois, ensuite, elles seront invitées à venir récupérer chaque semaine le nombre de comprimés qui leur a été prescrit. Tous les nouveaux nés sont impérativement vaccinés au BCG (Benchekroun *et al.*, 2001).

Par l'adoption de ce programme, le Maroc compte parvenir à dépister 80% des cas de TB pulmonaires et à en guérir 85%. Avec beaucoup de satisfaction, on constate que le Maroc fait partie des pays qui montrent une réelle avancée dans l'élimination de la maladie; 90% des traitements sont suivis jusqu'au bout alors que le taux cumulé des malades perdus de vue est de 4 à 5% (El Baghdadi, 1999).

CHAPITRE III:

TUBERCULOSE BOVINE

La tuberculose bovine causée par *Mycobacterium bovis* constitue une préoccupation majeure aussi bien pour les pays industrialisés que pour les pays en développement. Elle fait partie de la liste B de l'OIE et de la FAO (Benkirane, 1997; Cousins, 2001) qui regroupe les maladies animales transmissibles, importantes sur le plan socio-économique et/ou hygiénique et qui peuvent avoir des conséquences sérieuses sur le commerce des animaux et les produits d'origine animale.

1. Pathogénie

Les bovins peuvent contracter la tuberculose par plusieurs voies. Les plus communes sont la voie respiratoire et la voie digestive. Lorsque l'infection se fait par voie respiratoire, le foyer d'infection primaire se développe au niveau des poumons et des nœuds lymphatiques du thorax. Chez les bovins infectés par voie digestive, le foyer d'infection primaire se développe au niveau des nœuds lymphatiques du tractus intestinal (Thoen, 1992).

Suite à sa pénétration par voie respiratoire, *Mycobacterium bovis* arrive au niveau des petites voies respiratoires où il est capté par des phagocytes. Ensuite, les phagocytes traversent la membrane des bronchioles, entrent dans la circulation et sont transportés vers les nœuds lymphatiques, le parenchyme pulmonaire ou d'autres sites (Thorel 1997; Thoen & Bloom, 1995; Thoen, 1997). Après l'ingestion du bacille tuberculeux, les macrophages mononucléaires tentent de le tuer. Certains bacilles tuberculeux virulents arrivent à résister à toutes les actions bactéricides de la phagocytose, se multiplient à l'intérieur des phagocytes et entraînent leur éclatement. D'autres phagocytes arrivent sur place et ingèrent les nombres croissants des bacilles tuberculeux. Un petit amas de ces cellules se développe. Ce phénomène représente une tentative par l'hôte de restreindre le processus de la maladie à un lieu précis et de permettre aux mécanismes inflammatoires et immunitaires de détruire les bacilles. Quelques lésions peuvent sembler régresser et être encerclées par des tissus connectifs bien organisés.

Des lésions de ce type peuvent contenir des bacilles viables. Les réponses cellulaires qui cherchent à contrôler la maladie entraînent l'accumulation d'un grand nombre de phagocytes et la formation d'une lésion macroscopique appelée tubercule (Thorel, 1997).

Après 10 à 14 jours, des réponses immunitaires à médiation cellulaire se développent et la capacité des macrophages à tuer les bacilles intracellulaires augmente. Une hypersensibilité cellulaire s'installe et aboutit à la mort cellulaire et la destruction tissulaire (Thoen & Bloom, 1995; Thoen, 1997).

Le développement de la tuberculose chez un animal dépend de la capacité du bacille à se multiplier à l'intérieur des tissus et à résister aux mécanismes de défense de l'hôte (Laneelle & Daffe, 1991; Thoen & Himes, 1986a). Le bacille tuberculeux est un parasite intracellulaire facultatif, capable de croître à l'intérieur des macrophages. Il ne produit pas d'endotoxine et doit sa virulence aux composantes de sa paroi (Collins, 1990; Crowle, 1990; Laneelle & Daffe, 1991; Rastogi, 1990). En effet, le ``Cord factor``, qui est une composante glycolipidique de la paroi bactérienne, induit la désintégration du réticulum endoplasmique rugueux et le détachement des ribosomes au niveau des cellules hépatiques et possède des propriétés leucotoxiques (Lepper *et al.*, 1977; Thoen, 1979; Thoen & Himes, 1986a; Grange, 1995). D'autre part, les sulfolipides ou sulfatides semblent favoriser la survie des bacilles à l'intérieur des macrophages en inhibant la formation des phagolysosomes et en évitant l'exposition aux enzymes hydrolytiques présentes dans les lysosomes (Pabst *et al.*, 1988; Thoen, 1979; Thoen & Himes, 1986a; Thoen & Himes, 1986b). Il a été, aussi rapporté que les sulfatides induisent des changements de la fonction des cellules phagocytaires et diminuent leur capacité de phagocyter le bacille tuberculeux (Grange, 1995; Laneelle & Daffe, 1991).

Plusieurs mécanismes de défense de l'hôte déterminent la susceptibilité et le développement de la tuberculose chez les animaux exposés au bacille tuberculeux virulent. Bien que l'immunité humorale soit la première qui intervient dans la réponse du système immunitaire à l'infection par le bacille tuberculeux, l'immunité cellulaire est considérée être beaucoup plus importante dans la protection de l'hôte contre *Mycobacterium bovis* (Grange, 1995). Les macrophages sont impliqués dans le traitement des antigènes des mycobactéries et leur présentation aux lymphocytes T qui constitue l'unité clé dans la réponse

immunitaire aux mycobactéries (Grange, 1995). L'interaction ultérieure des lymphocytes et macrophages avec des antigènes spécifiques stimule la libération de substances solubles (cytokines) qui attirent, activent et augmentent le nombre des cellules mononucléaires au niveau du site de l'infection (Dungworth, 1985; Thoen & Himes, 1986a; Grange, 1995).

Les macrophages activés présentent des changements importants dans leurs activités biochimiques et produisent des intermédiaires de Nitrogène réactif qui contribuent à la destruction du bacille tuberculeux (Dannenbergh, 1968; Laneelle & Daffe, 1991).

2. Epidémiologie

2.1. Réservoirs animaux

De nombreuses espèces animales sont sensibles aux mycobactéries en général (Fowler, 1986; Thoen & Himes, 1981), et à *M. bovis* en particulier (Cousins, 2001; Daborne & Grange, 1993). Les bovins constituent le réservoir principal de *Mycobacterium bovis* (Francis 1947; Konhya *et al.*, 1980). Toutefois, la distribution étendue de *M. bovis* dans les populations d'animaux de ferme et d'animaux sauvages représente aussi un vaste réservoir pour ce micro-organisme (Konhya *et al.*, 1980; Thoen & Himes, 1984). Des exemples bien documentés incluent l'infection de blaireaux (*Meles meles*) au Royaume-Uni (van Embden *et al.*, 1995; Hughes *et al.*, 1996; Hutchings & Harris, 1999; White & Harris, 1995) et des opossums (*Trichosurus vulpecula*) en Nouvelle-Zélande (Cowan, 1990). D'autres exemples sont rapportés au Canada par les cas de bison (*Bison bison*) et de wapiti (*Cervus canadensis*) (Tessarò, 1986). Le cerf européen (*Cervus elephus*) constitue aussi un risque non négligeable de la propagation de la tuberculose au cheptel bovin (Thorel & Moutou, 1994). Le tableau N°9 donne quelques exemples de lésions causées par *Mycobacterium bovis* chez certaines espèces animales.

Tableau N°9: Infections dues à *M. bovis* chez certaines espèces animales sauvages

	Espèces	Lésions	Références
Primates non humains	Rhésus (<i>Macaca mulatta</i>)	Poumons	West <i>et al.</i> , (1981)
	Singe araignée (<i>Ateles geoffroyi</i>)	Poumons	West <i>et al.</i> , (1981)
Mammifères	Babouin jaune (<i>Papio cynocephalus anubis</i>)	Pulmonaires généralisées	Sapolsky & Else (1987) Tarara <i>et al.</i> , (1985)
	Buffle africain (<i>Syncerus caffer</i>)	Généralisées	Woodford (1982)
	Daim (<i>Dama dama</i>)	Foie, ganglions	Thorel (1980)
	Chameau (<i>Camelus bactrianus</i>)	Maladie progressive	Bush <i>et al.</i> , (1986)
	Otarie	Pulmonaires	Thorel & Moutou (1994)
Oiseaux	Tigre (<i>Panthera tigris</i>)	Poumons, foie, os	Lumeij <i>et al.</i> , (1987)
	Perroquets	Variables, perte de poids	Fowler (1986)

2.2. Symptômes

La Tuberculose bovine est observée chez tous les groupes d'âge et peut atteindre tous les organes. Sa durée d'incubation est longue (2 mois au minimum) (Wilson & Miles, 1975b). En général, la découverte d'une tuméfaction au niveau des ganglions lymphatiques ou d'autres tissus lors de l'examen post-mortem est une indication de la présence de la maladie. Dans certains cas, cette dernière ne se manifeste qu'aux stades avancés de l'infection (Konhya *et al.*, 1980; Thoen & Himes, 1984). En outre, les organismes pathogènes peuvent rester en état latent chez l'hôte pendant toute sa vie, sans causer de maladie évolutive. Néanmoins, si la maladie est de type évolutif, les symptômes généraux sont la faiblesse, la perte de l'appétit et de poids ainsi qu'une fièvre variable et une toux quinteuse intermittente (Collins & Grange, 1983; Konhya *et al.*, 1980).

2.3. Transmission de la maladie

Lorsqu'ils toussent, les bovins tuberculeux dont les poumons portent des lésions ouvertes projettent dans l'air des micro-gouttelettes contenant l'agent pathogène. L'infection se fait par inhalation de particules de poussière aéroportées, auxquelles l'agent pathogène s'attache, ainsi que par l'intermédiaire d'eau d'abreuvement et d'aliments contaminés. En effet, plusieurs facteurs de risque contribuent à cette propagation (Bénet, 2001):

- Certaines espèces animales réservoirs telles les blaireaux (van Embden *et al.*, 1995), les opossums (Cowan, 1990) et les cerfs européens constituent un risque non négligeable de la propagation de la TB au cheptel bovin (Thorel & Moutou, 1994). Cette propagation a de plus grandes chances de se produire lorsque les animaux infectés et ceux susceptibles partagent des pâturages ou le même territoire (O'Reilly & Daborne, 1995).
- Les systèmes d'élevage (intensifs ou extensifs) jouent aussi un rôle majeur dans la propagation de la maladie (Cosivi *et al.*, 1998). Dans les régions où l'élevage extensif est la norme, le regroupement des animaux (près des points d'eau, aux abreuvoirs, aux marchés et dans les enclos), joue aussi un rôle majeur dans la propagation de la maladie (Cosivi *et al.*, 1995; Cosivi *et al.*, 1998).
- La production laitière intensive peut avoir une conséquence directe sur l'incidence de la maladie. En effet, la plus forte incidence est d'habitude observée là où il y'a une forte production laitière et un contact fréquent avec l'homme, deux facteurs qui exposent les vaches laitières à l'infection par voie aérogène (Acha & Szyfres, 1987, Cosivi *et al.*, 1995).

2.4. Réceptivité

2.4.1. Facteurs intrinsèques

- Espèces: Presque toutes les espèces de mammifères sont sensibles à l'infection par *Mycobacterium bovis*. Mais, les bovins, caprins et porcins sont plus réceptifs que les équins et les ovins (Blood *et al.*, 1981).
- Sexe: Le mode d'élevage appliqué aux femelles (stabulation et confinement prolongés) ainsi que le stress de lactation et de gestation les rendent plus vulnérables à l'infection par *Mycobacterium bovis* que les mâles (Amaqdouf, 1976; Andriantsarafara, 1972; Blood *et al.*, 1981).
- Age: Tous les groupes d'âge sont sensibles à *Mycobacterium bovis*. Cependant, les jeunes sont moins résistants que les adultes (Amaqdouf, 1976; Andriantsarafara, 1972).

2.4.2. Facteurs extrinsèques

Les mauvaises conditions d'hygiène et d'alimentation, le stress, l'utilisation d'immunodépresseurs, la stabulation prolongée, le confinement et la non aération et l'ensoleillement des locaux sont tous des facteurs favorisant l'apparition et la propagation de la tuberculose (Blood *et al.*, 1981).

3. TB bovine dans les pays en voie de développement

Bien que les données sur la prévalence de la TB bovine dans les pays en voie de développement soient rares en règle générale, il existe certaines informations sur la prévalence de la TB animale (Figures N°1, 3 et 5) et les mesures de contrôle (Figures N°2, 4 et 6) (FAO, 1994).

En Afrique, presque 15% du bétail se trouvent dans les pays où la déclaration de la TB bovine est obligatoire et où une politique de dépistage et d'abattage est en vigueur. Ainsi, approximativement, 85% du bétail et 82% de la population africaine se trouvent dans des zones où la TB est pas ou partiellement contrôlée (FAO, 1994).

En Amérique latine, 76% du cheptel total de l'Amérique Latine et des Antilles se trouve dans des pays où la TB bovine fait objet à une déclaration obligatoire et à une politique de dépistage et d'abattage. Il est estimé que 60% de la population humaine vit dans des pays où le bétail ne subit aucun contrôle ou seulement un contrôle limité de la TB bovine (FAO, 1994).

3.1. Mesures et programmes de contrôle

A la suite d'accords entre gouvernements et associations d'éleveurs de bétail, plusieurs pays latino-américains ont pris la décision de contrôler et d'éliminer la TB bovine par la mise en œuvre d'une politique de dépistage et d'abattage (Cosivi *et al.*, 1998). En France, la lutte contre cette maladie commence à porter ses fruits, puisque le taux de prévalence a chuté (<0,01%) (Anonyme 2000). La réussite d'une politique de lutte demande la coopération soutenue des services vétérinaires nationaux et privés, des inspecteurs des viandes, des agriculteurs et des autorités locales.

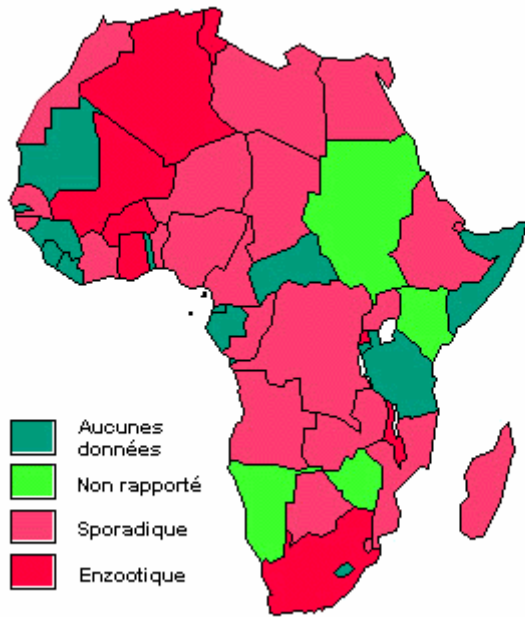


Figure N°1: Incidence de la tuberculose bovine en Afrique (FAO, 1994)



Figure N°2: Mesures de contrôle pour la tuberculose bovine fondées sur une politique de dépistage et d'abattage et de déclaration obligatoire, Afrique (FAO, 1994)

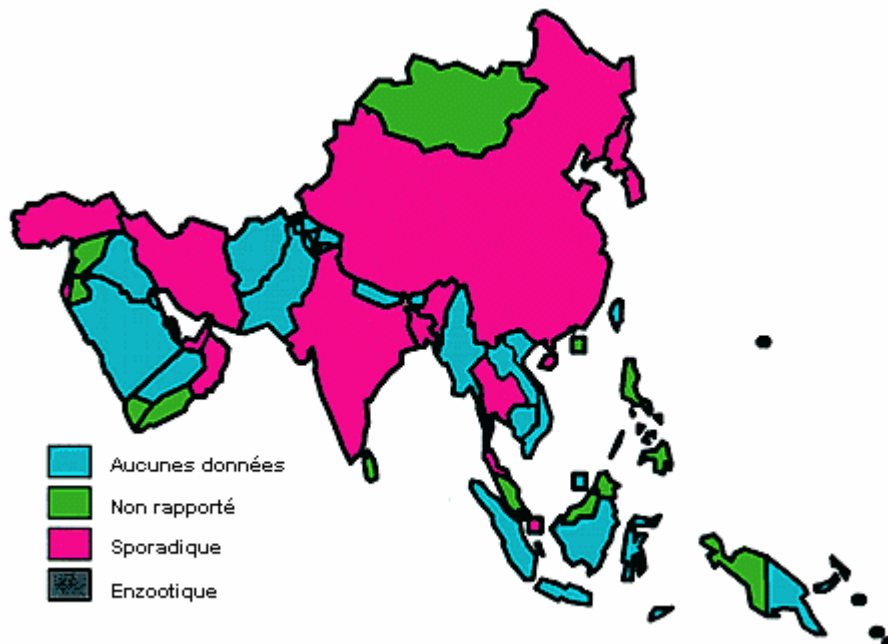


Figure N°3: Incidence de la tuberculose bovine en Asie (FAO, 1994)



Figure N°4: Mesures de contrôle pour la tuberculose bovine fondées sur une politique de dépistage et d'abattage et de déclaration obligatoire de la maladie, Asie (FAO, 1994)

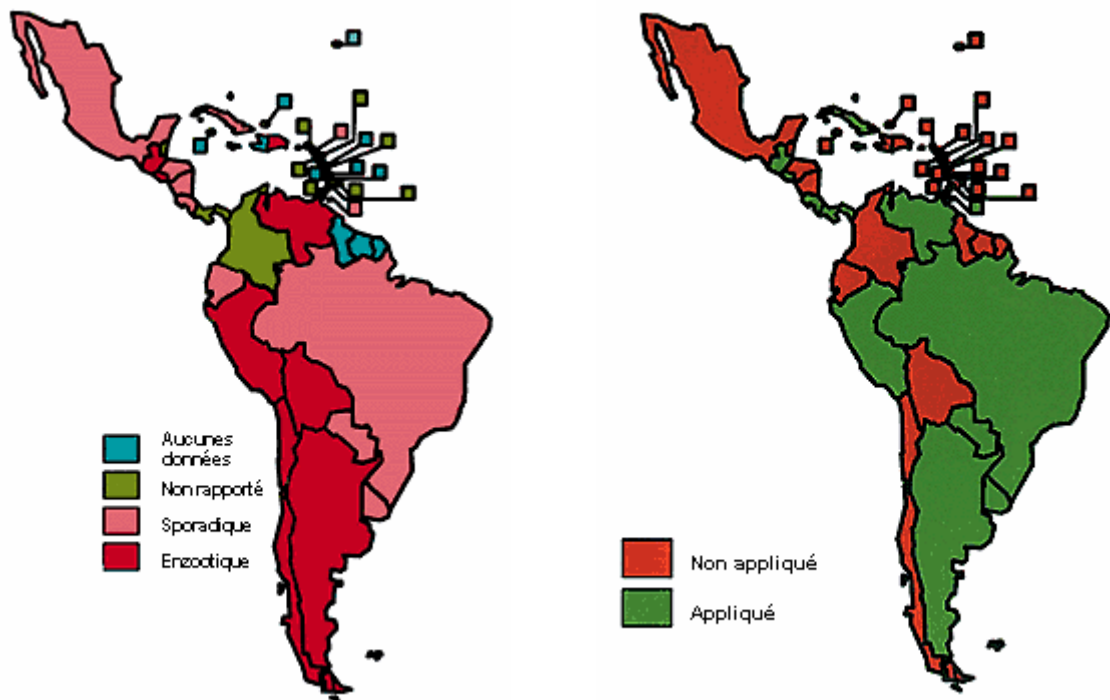


Figure N°5: Incidence de la tuberculose bovine, Amérique Latine et Antilles (FAO, 1994)

Figure N°6: Mesures de contrôle pour la tuberculose bovine fondées sur une politique de dépistage et d'abattage et de déclaration obligatoire de la maladie, Amérique Latine et Antilles (FAO, 1994)

Seule une minorité de pays en voie de développement peut répondre à ces critères (Cosivi *et al.*, 1998; Tisdell *et al.*, 1999), en raisons de:

- contraintes financières;
- rareté des professionnels formés;
- manque de volonté politique;
- sous-estimation par les gouvernements et les agences de coopération de l'importance de la TB bovine autant dans les secteurs de la santé animale qu'humaine;
- d'autres priorités.

Selon une estimation récente, les pertes économiques annuelles causées par la TB bovine en Argentine s'élèvent approximativement à 63 millions de dollars américains (Maggi *et al.*, 1998). Une autre étude menée en Turquie estime l'impact socio-économique de la TB bovine sur le secteur agricole et celui de la santé publique dans une fourchette approximative de 15 à 59 millions de dollars américains par année (Barwinek & Taylor, 1996).

4. Situation de la TB bovine au Maroc

Considérée depuis plusieurs décennies comme étant une maladie réputée légalement contagieuse et à déclaration obligatoire au Maroc (Dahir du 19 septembre 1977), donnant lieu à l'application de mesures de police sanitaire vétérinaire, la tuberculose bovine a fait l'objet d'une préoccupation permanente des services vétérinaires en raison de son impact:

- Économique, eu égard aux pertes qu'elle entraîne au niveau des productions animales (perte de poids, diminution de la production laitière, saisies aux abattoirs, perturbation des échanges commerciaux...)
- Hygiénique, en raison de sa transmissibilité à l'homme, engendrant des pertes générées par les frais de traitement et d'hospitalisation et parfois, en vies humaines, faisant d'elle une zoonose majeure (Fikri, 1997; El Abrak *et al.*, 2001).

4.1. Prévalence

4.1.1. Au niveau des élevages

Toutes les données sont tirées des campagnes annuelles de tuberculination des bovins que réalisent régulièrement les services vétérinaires du ministère de tutelle. Ainsi, le bilan de treize de ces campagnes réalisées dans la moitié des étables délivrant le lait aux laiteries, a permis de calculer un taux d'infection moyen des bovins laitiers de race pure et croisée de l'ordre de 1,82%, contre 0,49% seulement chez la race locale (Tableau N°10).

Tableau N°10 : Taux d'infection tuberculeuse chez les bovins (Fikri, 1997; El Abrak *et al.*, 2001)

Nombre moyen annuel de bovins laitiers tuberculés	110636	
Nombre moyen annuel de bovins réagissants	2018	
Taux d'infection moyen		1,82%
Nombre moyen annuel d'animaux abattus	435	21,5%
Taux d'infection moyen chez la race locale		0,49%

4.1.2. Au niveau des abattoirs

Dans une étude réalisée au niveau des abattoirs nationaux, entre 1995 et 2000, la situation épidémiologique de la tuberculose bovine a montré que la maladie demeure toujours enzootique dans notre pays, avec une incidence de 3400 cas découverts par an. Durant l'année 2000, une augmentation de +14% a été constatée par rapport à 1995. Dans une autre étude réalisée au niveau de 9 abattoirs durant la période 1998-2000 (El Abrak *et al.*, 2001), la prévalence de la tuberculose bovine est passée de 1,33% en 1998 à 2,12% en 2000 (Tableau N°11).

Tableau N°11: Evolution annuelle de la tuberculose bovine au niveau de 9 abattoirs (1998-2000)

	1998	1999	2000
Cas de tuberculose bovine	1447	2044	3012
Effectif bovin abattu	108667	122256	141874
Prévalence (%)	1,33	1,67	2,12

La saisie pour motif de tuberculose représente en moyenne environ 20% du total des saisies tous motifs confondus durant la période 1998-2000 (El Abrak *et al.*, 2001) (Tableau N°12). Un pourcentage de 99,6% des saisies pour cause de tuberculose au niveau des principaux abattoirs est rencontré chez les bovins (Fikri, 1997) (Tableau N°13).

Tableau N°12: Evolution des saisies globales au niveau de 9 abattoirs (1998-2000)

	Saisies globales (viandes et abats) (Kg)		Total
	Abats	Viandes	
1998	16 459	7 719	24 178
1999	36 012	11 542	47 554
2000	46 890	19 597	66 487
Moyenne/an	33 120	12 953	46 073

Tableau N°13 : Répartition des saisies pour cause de tuberculose (Fikri, 1997)

Espèces	Saisies totales en Kg (1)		Saisies pour cause de TB en Kg (2)		Fréquence en % (2/1)
	Abats	Viandes	Abats	Viandes	
Bovins	390 791 (74,7%)	132 281 (25,3%)			
Sous total	523 072		136 800 (99,6%)		26,15
Ovins et caprins	93 165 (94,6%)	5267 (5,4%)			
Sous total	98 432		512 (0,4%)		0,47
Autres espèces	8744 (79%)	2326 (21%)			
Sous total	11 070				
Total général	492 700 (77,9%)	139 874 (22,1%)	77 032 (56,1%)	60 280 (43%)	
	632 574		137 312		21,71

4.2. Importance économique

La TB bovine est à l'origine de pertes économiques considérables. L'évaluation des pertes occasionnées par la TB est illustrée au niveau du tableau N°14.

Tableau N°14: Estimation des pertes occasionnées par la tuberculose (Kouadir, 2001)

Nature des pertes	Evaluation des pertes en DH par vache infectée par an
Pertes en animaux (mortalité à la naissance)	40
Pertes dues à la diminution de la durée de vie	320
Pertes dues au retard de croissance	900
Pertes dues à la saisie au niveau des abattoirs	420

4.3. Contrôle et lutte contre la TB bovine

Dans l'objectif de diminuer l'incidence de la tuberculose à court et à moyen terme, et de parvenir à l'éradiquer à long terme, Une stratégie de lutte contre cette maladie est menée par les services vétérinaires nationaux (Benkirane, 1997). Elle est axée, conformément à l'arrêté ministériel du 4 mai 1957, sur (El Abrak *et al.*, 2001):

- Le dépistage systématique suivi d'abattage (au moins une fois par année) de la tuberculose bovine au niveau des élevages dont le lait est destiné à la consommation publique. Le dépistage est réalisé à l'aide du test de tuberculination et les réagissants sont systématiquement abattus.
- La désinfection des étables et du matériel ayant abrité les animaux atteints.
- Parallèlement, une recherche systématique de la maladie est opérée au niveau des abattoirs lors de l'inspection sanitaire et hygiénique des viandes et fait l'objet d'un suivi épidémiologique régulier.

CHAPITRE IV:

TUBERCULOSE ZONOTIQUE CHEZ LES HUMAINS

La tuberculose causée par *M. bovis* est cliniquement impossible à distinguer de la tuberculose causée par *M. tuberculosis* (Cosivi *et al.*, 1998; Hedvall, 1942). L'infection humaine à *M. bovis* a été rapportée dans plusieurs régions du monde (Damsker *et al.*, 1974; Dreesen & Wood, 1979; Karlson & Carr, 1970; Schmiedel, 1968a). La pathogénicité de *M. bovis* vis à vis de l'homme a été reconnue comme un sérieux problème de santé publique dans tous les pays où le lait était source d'alimentation (Myers & Steele, 1969). Dans les pays où la TB n'est pas contrôlée, la plupart des cas de tuberculose zoonotique surviennent chez les jeunes personnes: les lymphadénopathies cervicales prédominent chez les enfants, les formes pulmonaires, et particulièrement les formes extrapulmonaires, chez les adultes (Schliesser, 1992).

Les données disponibles sur la fréquence des formes extrapulmonaires de tuberculose à *M. bovis* dans les pays en voie de développement sont rares, en raison notamment de l'insuffisance de laboratoires spécialisés (Cosivi *et al.*, 1998).

Après une revue de plusieurs études sur la TB zoonotique publiées entre 1954 et 1970 effectuées dans plusieurs pays, il a été estimé que la proportion des cas humains causés par *M. bovis* représente 3,1% de toutes les formes de TB: 2,1% des formes pulmonaires et 9,4% des formes extrapulmonaires (Gervois *et al.*, 1972).

1. TB zoonotique dans les pays industrialisés

En France, et durant l'année 1995, 0,5% (38) des 7075 cas déclarés de tuberculose humaine étaient dus à *M. bovis* (Boulahbal *et al.*, 1998). Dans une étude récente menée en Irlande, la proportion des cas humains de tuberculose à *M. bovis* représentait 2,5% (Smith *et al.*, 2000).

Le tableau N°15 résume les résultats de quelques rapports sur la TB causée par *M. bovis* dans certains pays industrialisés (Gervois *et al.*, 1972).

Tableau N°15: La tuberculose humaine causée par *M. bovis* dans certains pays industrialisés

Pays (Référence)	Années	Nombre	% du total de TB	Pulmonaire (% du total <i>M. bovis</i>)
Australie (Cousins & Williams, 1995)	1970-94	240	0.43-3.1	71.6 ^a
Angleterre (Grange & Yates, 1994)	1977-90	232	1.2	40.0
Allemagne (Krebs & Koppler, 1982)	1975-80	236	4.5	73.7
Irlande rurale (Cormican & Flunn, 1992)	1986-90	17	6.4	70.6
Irlande urbaine (Collins <i>et al.</i> , 1987)	1982-85	9	0.9	88.8
Nouvelle Zélande (Brett & Humble, 1991)	1983-90	22	7.2	31.8
Espagne (Sauret <i>et al.</i> , 1992)	1986-90	10	0.9	50.0
Suède (WHO, 1994b)	1983-92	96	2.0	-
Suisse (Bull. Suisse, 1994)	1994	18	2.6	-
U.S.A (Karlson & Carr, 1970)	1954-68	6	0.3	33.3
U.S.A (Dankner <i>et al.</i> , 1993)	1980-91	73	3.0	52.0 ^b 12.0 ^c

a: le pourcentage totale inclue 80,6% d'hommes et 51,2% de femmes, b: Adultes, c: Enfants

2. Tuberculose zoonotique dans les pays en développement

2.1. Amérique latine et Asie

Une estimation conservatrice voudrait que 2% du total des cas de TB pulmonaire et 8% des cas extrapulmonaires soient causés par *M. bovis*. Ces cas représenteraient ainsi 7000 nouveaux cas par année, soit un taux près de 2 pour 100000 habitants (Cosivi *et al.*, 1998).

Dans une étude effectuée en Argentine entre 1982 et 1984, il découle que 36 (0,74%) des 7642 mycobactéries cultivées à partir d'échantillons de crachats, étaient de type *M. bovis* (Barrera & de Kantor, 1987). Cependant, une autre étude menée entre 1984 et 1989 dans la province de Santa Fe (où se retrouve la plupart du bétail de l'industrie laitière), *M. bovis* avait causé entre 0,7% et 6,2% des cas de TB (Sequeira *et al.*, 1990).

Des données très limitées sur les aspects zoonotiques de *M. bovis* sont disponibles pour certains pays d'Asie. Cependant, en 1969, et lors d'enquêtes préliminaires effectuées en Inde, aucun cas de TB causée par *M. bovis* n'a été rapporté (Lall, 1969).

2.2. Afrique

L'isolement de *M. bovis* à partir de crachats de patients atteints de TB pulmonaire a été rapporté au Nigeria (Idigbe *et al.*, 1986), au Zaïre (Mposhy *et al.*, 1983), en Tanzanie (Daborne *et al.*, 1997) et en Égypte (El Sabban *et al.*, 1992; Nafeh *et al.*, 1992).

Au Maroc et durant la période 1968-1972, 30% des mycobactéries isolées d'enfants souffrant de TB extrapulmonaire étaient de type *M. bovis* (Amaqdouf, 1976). Lors d'une étude plus récente, en 1998, sur 214 isolats humains, *M. bovis* représentait 11,21% (L'Kassmi *et al.*, 1998).

Les pays en voie de développement ont depuis toujours souffert des taux les plus élevés d'infection (Cosivi *et al.*, 1998). De ces chiffres donc découle l'importance et surtout, l'urgence d'effectuer des travaux sérieux, visant le dépistage des tuberculoses causées par *M. bovis* chez la population humaine.

3. Localisation de la TB à *M. bovis*

Dans les régions où la TB a été largement éliminée, quelques cas résiduels surviennent chez les personnes âgées en raison de la réactivation des lésions dormantes. Des recensements effectués aux États Unis, en Scandinavie et dans le sud de l'Angleterre ont montré qu'à peu près la moitié de ces cas est de nature pulmonaire, un quart touche le circuit uro-génital, et les autres impliquent des zones non pulmonaires, notamment les nodules lymphatiques cervicaux (Grange & Yates, 1994). Dans une étude menée en France durant l'année 1995 sur 38 cas de TB à *M. bovis*, les localisations pulmonaires, extrapulmonaires et mixtes représentaient 53%, 44% et 3%, respectivement. D'une façon générale, les TB extrapulmonaires ont été observées chez des sujets plus âgés que les TB pulmonaires (Boulahbal *et al.*, 1998). Dans une autre étude effectuée sur 85 souches de *M. bovis* (une souche par malade) isolées au centre de Référence de L'Institut Pasteur (France) de 1988 à 1993, 68% provenaient de prélèvements

broncho-pulmonaires. Les atteintes ganglionnaires dominaient les formes extrapulmonaires (Vincent, 1994).

4. Exposition au risque d'infection par *M. bovis*

4.1. Contacts physiques proches

Les contacts étroits entre humains et animaux infectés seraient à l'origine de l'infection de l'homme, surtout dans les pays en voie de développement. Dans certains pays africains, le bétail fait partie intégrante de la vie sociale des humains, il représente la richesse et est au cœur de nombreux événements. De plus, avec 65% de la population africaine, 70% de celle d'Asie et, 26% de celle de L'Amérique Latine qui travaillent dans l'agriculture, une proportion importante de la population de ces régions pourrait être exposée au risque de la TB bovine (Cosivi *et al.*, 1998).

4.2. Pratiques d'hygiène alimentaire

La consommation de lait contaminé par *M. bovis* est considérée depuis longtemps comme le principal vecteur de la transmission de la TB des animaux vers les humains (Acha & Szyfres, 1987). Dans les régions où la TB bovine est fréquente et non contrôlée, l'infection par le lait est la cause principale de lymphadénopathies cervicales et abdominales, et autres formes de TB non pulmonaire (Acha & Szyfres, 1987).

Bien que de bonnes habitudes d'hygiène alimentaire pourraient jouer un rôle majeur dans le contrôle de ces formes de TB, des habitudes de ce type se révèlent souvent difficiles à instituer dans les pays en développement. Dans tous les pays d'Afrique sub-Saharienne, il existe une concurrence active entre les entreprises de transformation et commercialisation du lait, et le secteur informel. Ce dernier peut ne pas tenir compte des normes d'hygiène et de qualité, et les producteurs vendent souvent directement aux consommateurs en bout de ligne. De plus, il est estimé que plus de 90% de la production laitière totale est consommée à l'état frais (Walshe *et al.*, 1991).

Mycobacterium bovis a été isolé dans 7 (2,9%) des 241 échantillons de lait cru en Ethiopie (WHO, 1994b). Ainsi, les conséquences sérieuses, pour la santé

publique, du lait et des produits laitiers potentiellement contaminés ne devraient pas être sous estimées.

Pour essayer de déterminer les expositions possibles aux risques de contamination par *M. bovis*, une étude a été menée en France durant l'année 1995 (Boulahbal *et al.*, 1998), trois niveaux de risque ont été pris en considération:

- Risque probable: quand les malades ont une profession exposée comme les agriculteurs, les éleveurs et les vétérinaires ou, des habitudes alimentaires comme la consommation de lait cru ou de dérivés non pasteurisés du lait.
- Risque possible : quand le pays d'origine du malade ne met pas en œuvre des mesures d'éradication de la TB bovine ou que le malade a des antécédents de TB datant de plus de 50 ans.
- Risque absent: quand aucun facteur de risque n'est identifié.

Ainsi, sur 38 cas, 42% avaient un risque probable d'exposition à *M. bovis*, 29% un risque possible, 13% n'avaient pas de risque identifié et aucune information n'était disponible pour les 13% restants.

En France, depuis l'instauration de la pasteurisation systématique du lait qui a supprimé la contamination digestive par *M. bovis*, la voie aérienne est le seul mode de contamination possible. L'abattage systématique des animaux infectés ayant également réduit les risques de contamination par voie aérienne à partir du bétail, la transmission inter humaine de *M. bovis* est maintenant la voie la plus vraisemblable (Boulahbal *et al.*, 1998).

5. VIH et TB à *M. bovis*

La TB constitue une infection opportuniste très fréquente chez les personnes infectées par le VIH (Raviglione *et al.*, 1995). La grande majorité des personnes porteuses de cette double infection vit dans les pays en développement, toutefois, des cas de double infection au VIH et à *M. bovis* ont aussi été rapportés dans les pays industrialisés (Raviglione *et al.*, 1995; Anonyme, 1995).

L'épidémie de VIH dans les pays en développement, et en particulier, dans les pays où l'infection à *M. bovis* est présente chez les animaux et où les conditions favorisent la transmission zoonotique, pourrait faire de la TB une menace sérieuse pour la santé publique et pour les personnes à risque (Daborne *et al.*, 1997; Cosivi *et al.*, 1995; Grange *et al.*, 1994).

Dans une étude menée à San Diego (Californie), un des 24 adultes souffrant de TB pulmonaire, et 11 des 24 souffrant de TB non pulmonaire causée par *M. bovis*, étaient infectés par le virus du SIDA. (Danker *et al.*, 1993).

6. Surveillance de la TB à *M. bovis*

Bien qu'elle constitue une exigence essentielle de tout programme de lutte contre la TB, la bactérioscopie, souvent utilisée comme seule méthode de diagnostic ne permet pas de discriminer entre les différentes infections mycobactériennes. Ceci explique en partie le taux de déclaration relativement faible des TBs à *M. bovis* dans les pays en développement. L'isolement de l'espèce mycobactérienne, rarement effectué, est mis en œuvre sur le milieu standard de Löwenstein-Jensen glycérolé où *M. bovis* croît difficilement (Grange *et al.*, 1996). Dans certains pays, les maladies humaines causées par *M. bovis* sont simplement rapportées comme des cas de TB afin d'éviter les enquêtes des agences de contrôle de la maladie, qui pourraient créer des problèmes au niveau de la confidentialité des patients (Collins & Grange, 1983).

Dans la plupart des pays en développement, la collecte de données représentatives sur l'incidence de la TB causée par *M. bovis* à partir des laboratoires, comporte des problèmes supplémentaires. Par exemple: les prélèvements de crachats pourraient prédominer, avec relativement peu de prélèvements provenant de lésions extra-pulmonaires en particulier chez les enfants en raison des difficultés rencontrées lors de la réalisation des biopsies (Cosivi *et al.*, 1998).

L'épidémie récente de TB résistante à une multitude de médicaments dans certains pays du monde est l'une des conséquences directes de la détérioration des programmes de lutte anti-tuberculeuse (Pablo-Méndez *et al.*, 1998), d'où la nécessité d'une surveillance fondée sur une pratique plus large de tests fiables de culture et de susceptibilité aux médicaments. Les mesures pour empêcher la transmission de l'infection devraient constituer l'objectif premier à atteindre. Celles-ci doivent associer l'éducation publique à des pratiques d'hygiène appropriées et des programmes de dépistage de la maladie et d'abattage des animaux réagissants.

CHAPITRE V:

DIAGNOSTIC RAPIDE DES INFECTIONS MYCOBACTERIENNES

Le nombre et l'importance des infections causées par *Mycobacterium tuberculosis* et autres espèces de mycobactéries ne cessent d'augmenter (Bloom & Murray, 1992). La détection et l'identification des mycobactéries par les méthodes conventionnelles de laboratoire (coloration, culture et tests biochimiques) sont complexes et exigent du temps. L'identification correcte des espèces appartenant au complexe *M. tuberculosis* est importante en raison du choix d'un traitement et des implications zoonotiques dans la TB bovine, surtout dans les pays en voie de développement (Liebana *et al.*, 1996; American Thoracic Society, 1997).

Pour être efficace, la lutte contre la TB et les Mycobactérioses exige d'une part, l'existence de laboratoires de qualité coopérant étroitement entre eux et d'autre part, une standardisation des techniques de mise en évidence des bactéries en cause (Thorel, 1994).

L'isolement en culture du germe responsable et son identification par l'étude de ses caractéristiques biochimiques et physiologiques (David *et al.*, 1989) est le moyen le plus rigoureux de faire le diagnostic de certitude de la TB. C'est aussi un moyen dont la sensibilité atteint 92% (Warren *et al.*, 2000), mais dont les résultats ne sont disponibles qu'après un délai de 3 à 4 semaines. La lenteur de croissance des mycobactéries constitue un handicap majeur pour le diagnostic rapide des maladies dues à ces germes. En pratique courante, l'identification des mycobactéries s'effectue en deux étapes: la première consiste à obtenir une primoculture du germe à partir du prélèvement pathologique, la seconde permet d'identifier ce germe par l'étude de ses caractères physiologiques et biochimiques. Chaque étape souffre de la lenteur de croissance des mycobactéries. On se limitera dans ce chapitre de décrire quelques techniques récentes de détection et d'identification des mycobactéries qui ont été développées afin de circonvenir l'une ou l'autre étape, ou même les deux, et de réduire le délai de l'isolement et de l'identification (Burguiere & Poveda, 1994 ; Lévy-Frébault, 1992).

1. Bactérioscopie

Chez l'homme, la méthode la plus ancienne de détection rapide de mycobactéries dans un prélèvement (expectoration) est la bactérioscopie après coloration par la méthode de Ziehl-Neelsen. La sensibilité de cette technique varie entre 20 et 80% et peut atteindre 92% si un minimum de 5ml de crachat est examiné et si le malade est gravement atteint avec multiplication des prélèvements (Warren *et al.*, 2000; Metchock *et al.*, 1999). Chez l'animal, la quantité de bacilles observés dans un prélèvement (organe) est très faible, l'examen bactérioscopique n'est effectué qu'à titre indicatif. De ce fait, la coloration n'est pas assez sensible (Nolte & Metchock, 1995).

2. Méthodes d'isolement

Deux systèmes sont commercialisés: l'appareil radiométrique BACTEC 460 (Becton-Dickinson) (Peterson *et al.*, 1989, Sewell *et al.*, 1993) et le milieu biphasique MB CHECK (Becton-Dickinson) (Thorel, 1993). Ils permettent d'obtenir une culture plus rapide par rapport aux tests conventionnels d'isolement sur milieux en tubes (Thorel, 1993; Sewell *et al.*, 1993).

2.1. Le système BACTEC

L'appareil Bactec 460 réalise le dosage du $^{14}\text{CO}_2$ libéré au cours du métabolisme des mycobactéries et le traduit sous forme numérique (index de croissance) proportionnelle au nombre de bactéries et à leur taux de croissance (Thorel, 1997).

Pour le complexe *Mycobacterium tuberculosis*, il est conseillé de faire en parallèle une culture sur milieu solide afin d'accroître la sensibilité de la méthode, d'observer l'aspect des colonies et de pouvoir mettre en évidence une culture mixte des mycobactéries.

Ce système permet un gain de temps considérable. Une culture est considérée négative en 6 semaines, ceci correspond à une réduction de 50% par rapport au temps nécessaire aux cultures en milieu gélosé (Sewell *et al.*, 1993). Mais encore, pour le faire, un minimum de 2 semaines est exigé. La sensibilité du système est

comparable à celle du test conventionnel utilisant le milieu de Lowenstein-Jensen (Thorel, 1993; Agy *et al.*, 1989).

2.2. Le système MB CHECK

Il permet un gain en moyenne de 3 jours pour l'isolement de *M. tuberculosis* et de 9 jours pour celui de *M. avium* par rapport au test conventionnel utilisant le milieu de Lowenstein-Jensen (Thorel, 1997). L'utilisation combinée des méthodes conventionnelles et du système MB CHECK a permis d'augmenter la sensibilité de l'isolement de *M. paratuberculosis* à partir de bovins présentant une infection subclinique (Thorel, 1997). Ce système s'avère pratique pour réduire les délais de culture sans utilisation de radio-isotopes, mais apparaît moins performant que le système BACTEC (Thorel, 1997).

Bien que des systèmes de culture, plus rapides et plus spécifiques que les milieux classiques, aient été développés et commercialisés, tels que les deux systèmes décrits en haut, le délai entre le prélèvement et le diagnostic reste encore très long (Sewell *et al.*, 1993). Le développement de nouvelles techniques de détection et d'identification est devenu urgent afin d'écourter le temps de diagnostic et de traitement des infections aux mycobactéries pathogènes en particulier et des mycobactérioses en général.

3. Identification par les méthodes de biologie moléculaire

3.1. Identification par hybridation directe avec une sonde spécifique

Les séquences nucléotidiques des ARNs ribosomiaux, à la fois distinctes entre différentes espèces, et très conservées au sein d'une même espèce, ont permis le développement de sondes complémentaires aux régions les plus spécifiques d'une espèce donnée (Poulet, 1994). Des kits d'identification, tels que AccuprobeTM et GenProbe, sont actuellement commercialisés et permettent une identification fiable à 99% (González & Hanna, 1987; Goto *et al.*, 1991). Différentes espèces mycobactériennes sont concernées, telles que celles du complexe *M. tuberculosis*, de *M. avium*, de *M. intracellularae*, du complexe *M. avium-M. intracellularae*, de *M. kansasii* et de *M. gordonae* (McFadden *et al.*, 1990). La mise en évidence des mycobactéries par cette méthode demande moins de deux heures. Des défauts de sensibilité ont été notés avec les sondes

M. kansasii et *M. gordonae*, ainsi qu'avec les sondes *M. avium* et *M. intracellulare*. La sensibilité de la sonde *M. tuberculosis* est excellente, seules quelques rares souches de *M. terrae* et de *M. scrofulaceum* ont été faussement identifiées comme appartenant au complexe *M. tuberculosis* (Thierry *et al.*, 1990a). Toutefois, cette approche ne peut se faire qu'à partir de culture bactérienne, et non sur des prélèvements biologiques, trop pauvres en bacilles.

3.2. Identification et détection par amplification génique en chaîne (PCR)

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une méthode d'amplification de l'ADN *in vitro* (Mullis & Falooma, 1987; Saiki *et al.*, 1988). Cette technique a servi à la détection de nombreux organismes qui étaient difficilement détectables par les méthodes conventionnelles (Erich *et al.*, 1991).

La technique a été décrite pour la première fois par Saiki *et al.*, (1985), et a été appliquée par cette même équipe pour amplifier l'ADN codant pour la β -globuline humaine et pour le diagnostic prénatal des anémies (Saiki *et al.*, 1985).

3.2.1. Principe de la technique de PCR

La PCR permet la production en grande quantité, et seulement en quelques heures, de fragments d'ADN cible et de séquences déterminées à partir d'une faible quantité de matrice complexe.

Le principe de la PCR se base sur l'amplification d'une séquence d'ADN particulière en un nombre de copies suffisant pour en assurer la détection. Pour cela sont utilisées des amorces nucléotidiques sélectionnées pour leur spécificité vis à vis de l'ADN à détecter. Chaque brin d'ADN est copié grâce aux amorces et à une polymérase thermostable (Taq). Puis, chaque copie est utilisée comme une nouvelle matrice. La PCR se déroule en plusieurs cycles dont chacun est constitué de 3 étapes définissant ainsi un cycle thermique (Thiele 1990; Smyth 1992) (Figure N°7):

- Dénaturation de l'ADN cible permettant la séparation des 2 brins d'ADN. Elle est réalisée à des températures supérieures à 90°C.
- Hybridation des amorces aux brins complémentaires. Cet appariement s'effectue à une température spécifique à chaque couple d'amorces.

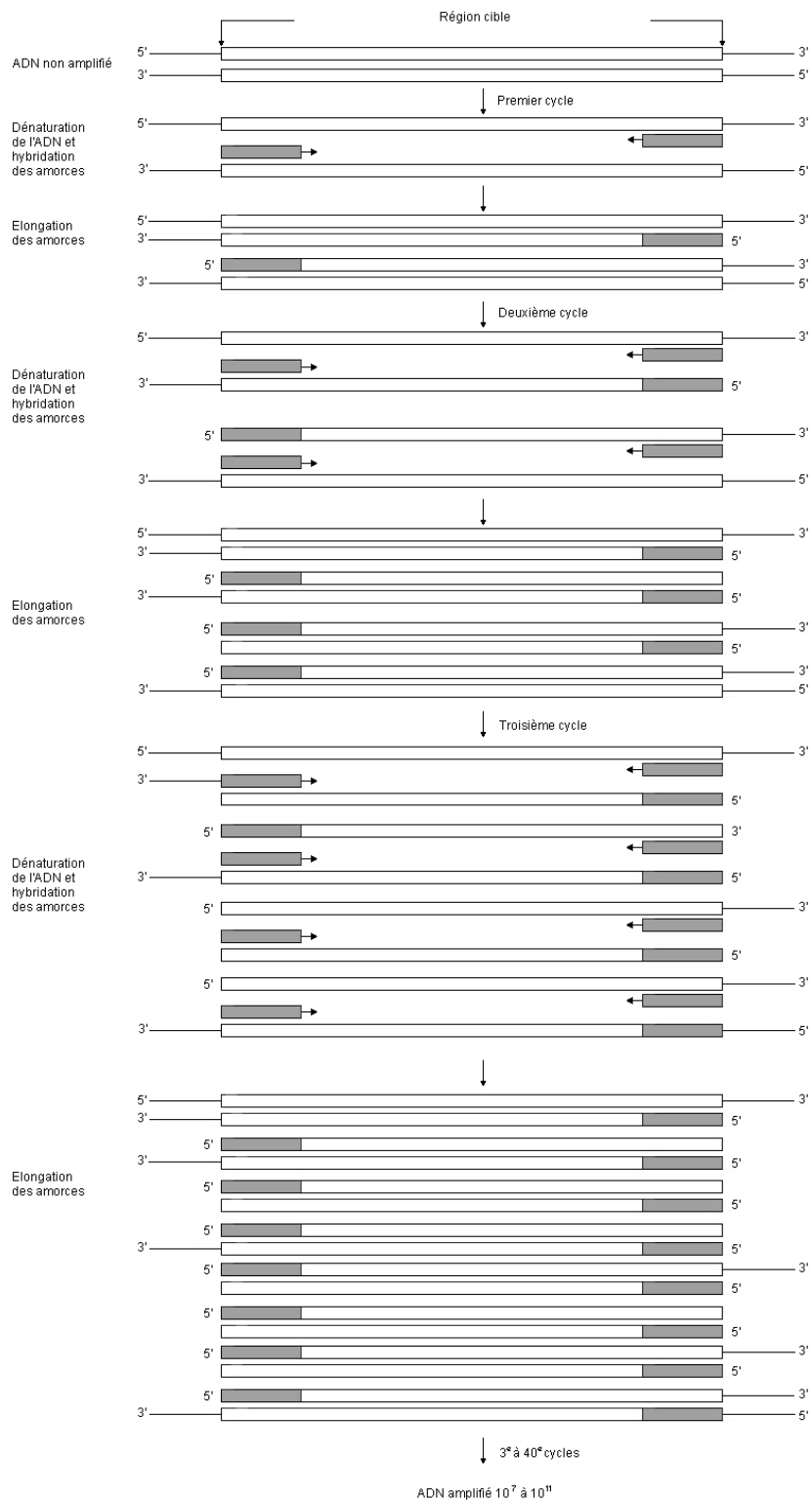


Figure N°7: Schéma des étapes d'amplification par PCR (Thiele, 1990; Smyth, 1992).

- Extension des amorces par la Taq polymérase favorisant l'élongation des amorces le long des brins d'ADN. La température d'extension est généralement comprise entre 70 et 75°C.

La répétition des différentes étapes permet la reproduction de l'ADN cible en plusieurs millions de copies. Le dernier cycle est suivi d'une phase d'extension terminale de 10 minutes permettant l'élongation des amorces restantes dans le milieu réactionnel.

Il existe actuellement différentes variantes de la PCR. Selon le but recherché, on peut utiliser une «RT-PCR: reverse transcription PCR» pour la détection des virus à ARN (Triglia *et al.*, 1988), une «PCR multiple» pour la détection en une seule réaction de plusieurs agents infectieux ou de plusieurs sérotypes du même agent (Chamberlain *et al.*, 1988), une «Nested-PCR» pour l'amplification interne d'un produit de PCR (Kaneko *et al.*, 1989) qui est très utilisée pour les Rotavirus, ou encore, la «RAPD» - Random Amplified Polymorphic DNA, pour la détection du polymorphisme génétique des isolats cliniques sans connaître au préalable la séquence génomique à amplifier (van Bekum, 1994; Linton *et al.*, 1995).

3.2.2. Limitations de la PCR

Malgré sa spécificité et sa sensibilité raisonnables, la PCR souffre de quelques problèmes limitant son utilisation à large échelle. Ainsi, les contaminations constituent de sérieux handicaps pour l'application de la PCR comme technique de routine, d'où l'intérêt de procéder délicatement à la réalisation de l'amplification et d'y inclure des témoins positifs et négatifs.

Afin de minimiser les risques d'obtention de résultats faussement positifs (Small *et al.*, 1993; Burman & Reves, 2000), des précautions rigoureuses doivent être prises (White *et al.*, 1989 ; Lo *et al.*, 1988). Les salles d'extraction des acides nucléiques et celles où s'effectuent les préparations des «Mix» pour la PCR doivent être séparées. Les échanges de matériel entre les deux salles sont à éviter, de même que le port d'une blouse et de gants pour chaque manipulation est obligatoire (Newton & Graham, 1997).

4. Application de la PCR à la détection des mycobactéries

La technique de la PCR a été largement appliquée au diagnostic rapide de la tuberculose (Akcan *et al.*, 1997; Ichiyama *et al.*, 1997; Jou *et al.*, 1997; Lazraq *et al.*, 1990; Lebrun *et al.*, 1997; Neimark *et al.*, 1996; Tortoli *et al.*, 1997; Soini & Musser, 2001). Le gain de temps par rapport aux techniques d'identification traditionnelles est considérable : quelques heures au lieu de 6 semaines. La spécificité de la réaction étant fonction du choix des amorces, plusieurs solutions sont utilisables:

- Amplification d'une séquence d'ADN conservée, présente chez toutes les espèces de mycobactéries, comme la séquence 65 K-D, avec une variabilité suffisante pour permettre une hybridation secondaire spécifique d'espèces (Soini & Viljanen, 1997a).
- Amplification d'une séquence spécifique à une espèce mycobactérienne ou un groupe bactérien.

Nous citerons ci-après quelques exemples des tests de PCR spécifiques au genre *Mycobacterium* et d'autres spécifiques au complexe *M. tuberculosis*.

4.1. Tests de PCR spécifiques au Genre *Mycobacterium*

65 K-Da Heat Shock Protein

La première méthode publiée concernant la détection des mycobactéries était basée sur le gène codant pour l'antigène 65 K-Da Heat Shock Protein (Protéine de choc thermique) (Soini & Viljanen, 1997a; Pao *et al.*, 1990; Pierre *et al.*, 1991; Kapur *et al.*, 1995). Le test consistait à l'amplification spécifique au genre et l'hybridation avec des sondes spécifiques pour le complexe *M. tuberculosis*, *M. avium*/*M. paratuberculosis* et *M. fortuitum*. Le seuil de détection de ce test est de 50 fg d'ADN correspondant approximativement à 10 bactéries quand la PCR est complétée par une hybridation (Hance *et al.*, 1989). Appliquée à la détection des mycobactéries dans 35 échantillons cliniques, cette méthode s'est révélée positive pour 15 échantillons contre 13 par culture (Brisson-Nôel *et al.*, 1989).

Le gène codant pour l'antigène 65 K-Da Heat Shock Protein est présent chez toutes les espèces de mycobactéries (Thierry *et al.*, 1990b ; Lévy-Frébault, 1992).

Toutefois, les produits de PCR obtenus à partir de mycobactéries non tuberculeuses étaient écourtés de 20 à 40 paires de base par rapport à ceux obtenus à partir des espèces du complexe *M. tuberculosis*. Cette méthode peut donc différencier le complexe *M. tuberculosis* des autres mycobactéries sans avoir recours à l'hybridation (Soini & Viljanen, 1997a). La sensibilité et la spécificité étaient étudiées sur 284 échantillons, elles étaient de 100% et 62,6%, respectivement (Pao *et al.*, 1990).

L'ARN ribosomal 16S

Le test basé sur l'ARN ribosomal 16S a été développé par Böddinghaus *et al.* (1990). Après amplification spécifique du genre, plusieurs régions du gène sont séquencées, les sondes sont développées à partir du complexe *M. tuberculosis*, *M. avium* et *M. intracellulare*. Moins de 10 bactéries peuvent être détectées par cette méthode quand la PCR est complétée par une hybridation (Böddinghaus *et al.*, 1990). Pour 279 échantillons cliniques, la sensibilité et la spécificité du test étaient de 84,5% et 99,5%, respectivement (Kirschner *et al.*, 1996).

32 K-Da Protein Gene

Le gène codant pour le 32 K-Da Protein Gene était présent chez toutes les espèces mycobactériennes mais chez aucune autre bactérie testée (Soini & Viljanen, 1997a). La sensibilité de ce test varie de 55,9% à 88,9%, et la spécificité de 93,9% à 100% (Soini *et al.*, 1996; Soini *et al.*, 1992).

MPTR (Major Polymorphic Tandem Repeat)

Détectée pour la première fois en 1992 (Hermans *et al.*, 1992) chez *M. kansasii* et *M. goodnae*, elle consiste en 10 pb séparées par un spacer d'ADN de 5 pb. Le nombre de copies a été estimé à 8 par génome (Dur *et al.*, 2000).

PGRS (Polymorphic G+C Rich Sequences)

Consiste en une courte séquence répétée, polymorphe de 24 pb, séparées par un spacer unique de longueur variable. Cette séquence, riche en GC (80%) (Ross *et al.*, 1992), se trouve chez le complexe *M. tuberculosis* et aussi chez les

mycobactéries atypiques (Cousins *et al.* 1993).

MPTR et PGRS montrent un grand polymorphisme, une grande stabilité et aussi une grande similarité dans leurs séquences nucléotidiques (Poulet, 1994).

IS1081

Découverte dans le but de cloner des séquences d'ADN spécifiques à *M. bovis*, la séquence d'insertion IS1081 est proche de l'IS256 obtenue à partir de *Staphylococcus aureus* (Collins & Stephens, 1991). C'est une séquence de 1324 pb, répétée 5 à 7 fois dans le génome du complexe *M. tuberculosis* (Collins & Stephens, 1991), et présente aussi chez quelques mycobactéries non tuberculeuses (Collins *et al.*, 1993; van Soolingen *et al.*, 1992). Au niveau du complexe *M. tuberculosis*, cette séquence a montré une très grande stabilité génétique et un faible polymorphisme (Collins & Stephens, 1991). De ce fait, l'IS1081 n'est pas un bon marqueur génétique pour l'épidémiologie de la TB. Toutefois, il faut noter que les souches de *M. bovis* BCG possèdent une seule copie de l'IS1081, ce qui pourrait être utilisé pour la différenciation entre *M. bovis* BCG et les autres souches de *M. bovis* (van Soolingen *et al.*, 1991a).

4.2. Tests de PCR spécifiques au complexe *M. tuberculosis*

38 K-Da protein gene

le gène codant pour la protéine 38 K-Da montre une variabilité entre les espèces (Soini & Viljanen, 1997b). Cette technique peut détecter des quantités d'ADN correspondant à 10 mycobactéries quand la PCR est appuyée par une hybridation (Sjöbring *et al.*, 1990). Parmi 519 expectorations étudiées, la sensibilité du test était de 92%. Il a été aussi noté que, après 4 semaines de traitement avec des antibacillaires, 70% des échantillons avaient toujours une PCR positive, tandis que seulement 30% avaient une culture positive (Yuen *et al.* 1993).

MPB64 protein

Le gène codant pour la protéine MPB64 a une sensibilité analytique de 10 mycobactéries quand la PCR est suivie d'une hybridation. Il a été trouvé que ce test est plus sensible que la culture pour la détection de *M. tuberculosis* dans 143

échantillons cliniques (Manjunath *et al.*, 1991).

pMTb4

La séquence répétitive pMTb4 a été trouvée chez plusieurs espèces mycobactériennes, mais la taille des produits de la PCR pour le complexe *M. tuberculosis* différait de celle des autres mycobactéries non tuberculeuses. La PCR était extrêmement sensible, elle a pu détecter 1 fg d'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose, correspondant à une mycobactérie (Patel *et al.*, 1990). Cette méthode a été aussi appliquée à 96 échantillons cliniques, elle s'est révélée plus sensible que la culture pour la détection de *M. tuberculosis* (Sritharan & Barker, 1991).

La séquence mtp40

La séquence mtp40 est spécifique à *M. tuberculosis* à l'exclusion de toutes les autres espèces du complexe *M. tuberculosis* (Del Portillo *et al.*, 1991). C'est le seul protocole se basant sur la PCR et pouvant différencier *M. tuberculosis* de *M. bovis*. La sensibilité analytique de ce test a atteint 10 fg d'ADN (2 bactéries), quand la PCR était complétée d'une hybridation (Soini & Viljanen, 1997a). Parmi 172 échantillons cliniques, la sensibilité et la spécificité du test étaient de 98,8% et 98,9%, respectivement (Del Portillo *et al.*, 1991 ; Herrera & Segovia, 1996; Sritharan *et al.*, 1994).

DRs (Direct Repeats)

Cette séquence a été découverte chez *M. bovis* BCG durant le séquençage de son ADN possédant une seule copie de l'IS6110. Constituées de 36pb directement répétées, interrompues par un unique spacer de 36-41 pb de longueur (Hermans *et al.*, 1991), les DRs sont spécifiques au complexe *M. tuberculosis* (Kamerbeek *et al.*, 1997) et le nombre varie selon les espèces du complexe *M. tuberculosis* (Hermans *et al.*, 1991 ; Groenen *et al.*, 1993; van Embden *et al.*, 2000).

IS6110

La cible la plus couramment utilisée pour la détection des mycobactéries du complexe *M. tuberculosis*, est le gène correspondant pour la séquence d'insertion IS6110, identifiée à partir d'une banque de cosmide PHC₇₉ par hybridation avec l'ADN total marqué de *M. tuberculosis* (Thierry *et al.*, 1990a; Thierry *et al.*, 1990b). Aussi connue sous le nom de IS986 chez *M. tuberculosis* et IS987 chez *M. bovis* (Poulet & Cole, 1995), l'IS6110 est la première séquence répétée isolée et caractérisée uniquement chez les mycobactéries appartenant au complexe *M. tuberculosis* (Eisenach *et al.*, 1990; Eisenach *et al.*, 1988; Hermans *et al.*, 1990; Thierry *et al.*, 1990a; Thierry *et al.*, 1990b; Zainuddin & Dale, 1990; Soini *et al.*, 1997a; Folgueira *et al.*, 1993), elle appartient à la famille des IS3 (McAdam *et al.*, 1990), de taille de 1360 pb (Figure N°8) avec des séquences répétées de 28 pb différant par 3 nucléotides et 2 séquences DR de 3 pb aux extrémités (Thierry *et al.*, 1990a; Ishiguro & Sato, 1988; Prère *et al.*, 1990; Timmerman & Yu, 1985). Généralement, plusieurs copies de cet élément sont présentes chez les espèces du complexe *M. tuberculosis*: 10 à 25 chez *M. tuberculosis* (Devallois *et al.*, 1998) et *M. microti*, tandis que la majorité des isolats de *M. bovis* n'ont possèdent le plus souvent qu'une seule (Aranaz *et al.*, 1996; Aranaz, 1998; Cousins *et al.*, 1999; Kamerbeek *et al.*, 1997; Kremer *et al.*, 1999; Serraino *et al.*, 1999; Poulet, 1994; Gutierrez *et al.*, 1995). Ce nombre restreint d'espèces hôtes fait de l'IS6110 un précieux outil de diagnostic et/ou épidémiologique et rend le test de la PCR utilisant cette séquence d'insertion théoriquement plus sensible pour *M. tuberculosis* (Eisenach *et al.*, 1990; Thierry *et al.*, 1990b). La sensibilité et la spécificité cliniques de la réaction ont été testées sur un grand nombre d'échantillons: crachats, urines, liquides d'abcès, liquides sénoviaux, fluides cérébro-spinaux, autopsies... (Soini & Viljanen, 1997a). Dans différentes études, la sensibilité de la méthode variait de 86 à 100%, et la spécificité de 98 à 100% (Brisson-Nôel *et al.*, 1991; Clarridge *et al.*, 1993; Eisenach *et al.*, 1991; Folgueira *et al.*, 1993; Forbes & Hicks, 1993; Nolte *et al.*, 1993 ;Thierry *et al.*, 1990b). Ce test s'est avéré aussi utile dans la détection de *M. tuberculosis* à partir de fluides pleuraux (De Lassence *et al.*, 1992) et d'aspirats gastriques chez les enfants (Pierre *et al.*, 1993). Toutefois, certaines souches de *M. tuberculosis* isolées en Malaisie, en Tanzanie et à Oman ne présentaient qu'une seule copie de l'IS6110

(van Soolingen *et al.*, 1993; Yeun *et al.*, 1993; Soini *et al.*, 2001; Bauer *et al.*, 1999; Goyal *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2000). D'autre part, aucune copie n'a été détectée chez quelques souches de *M. tuberculosis* isolées au Vietnam (Thierry *et al.*, 1995; Yeun *et al.*, 1993), au Burkina-Faso (Thierry *et al.*, 1995), au Canada (Howard *et al.*, 1998) et au Maroc (EL Baghdadi, 1997b). Des protocoles alternatifs doivent donc être développés. Ils peuvent reposer sur d'autres éléments répétés du complexe *M. tuberculosis*.

1 CGATGAACCG CCCCGGCATG TCCGGAGACT CCAGTTCTTG GAAAGGATGG
 51 GGTTCATGTCA GGTGGTTCAT CGAGGAGGTA CCCGCCGGAG CTGCGTGAGC
 101 GGGCGGTGCG GATGGTCGCA GAGATCCGCG GTCAGCACGA TTCGGAGTGG
 151 GCAGCGATCA GTGAGGTCGC CCGTCTACTT GGTGTTGGCT GCGCGGAGAC
 201 GGTGCGTAAG TGGGTGCGCC AGGCGCAGGT CGATGCCGGC GCACGGCCCG
 251 GGACCACGAC CGAAGAATCC GCTGAGCTGA AGCGCTTAGC GGCGGGACAA
 301 CGCCGAATTG CGAAGGGCGA ACGCGATTTT AAAGACCGCG TCGGCTTTCT
 351 TCGCGGCCGA GCTCGACCGG CCAGCACGCT AATTAACGGT TCATCGCCGA
 401 TCATCAGGGC CACCGCGAGG GCCCCGATGG TTTGCGGTGG GGTGTCGAGT
 451 CGATCTGCAC ACAGCTGACC GAGCTGGGTG TGCCGATCGC CCCATCGACC
 501 TACTACGACC ACATCAACCG GGAGCCCAGC CGCCGCGAGC TGCGCGATGG
 551 CGAACTCAAG GAGCACATCA GCCGCGTCCA CGCCGCCAAC TACGGTGTTC
 601 ACGGTGCCCG CAAAGTGTGG CTAACCCTGA ACCGTGAGGG CATCGAGGTG
 651 GCCAGATGCA CCGTCGAACG GCTGATGACC AA^{INS1}ACTCGGCC TGTCGGGAC
 701 CACCCGCGGC AAAGCCCGCA GGACCACGAT CGCTGATCCG GCCACAGCCC
 751 GTCCCGCCGA TCTCGTCCAG CGCCGCTTCG G^{T4}ACCACCAGC ACCTAACCGG
 801 CTGTGGGTAG CAGACCTCAC CTATGTGTCG ACCTGGGCAG GGTTGCCTA
 851 CGTGGCCTTT GTCACCGACG CCTACGTCGC AGGATCCTGG GCTGGCGGGT
 901 CGCTTCCACG ATGGCCACCT CCATGGTCCT CGACGCGATC GAGCAAGCCA
 951 TCTGGACCCG CCAACAAGAA GGCGTACTCG ACCTGAAAGA CGTTATCCAC
 1001 CATA CGGATA GGGGATCTCA GTACACATCG ATCCGGTTCA GCGAGCGGCT
 1051 CGCCGAGGCA GGCATCCAAC CGTCGGTCGG AGCGGTCGGA AGCTCCTATG
 1101 ACAATGCACT AGCCGAGACG ATCAACGGCC TATACAAGAC CGAGCTGATC
 1151 AAACCCGGCA AGCCCTGGCG GTCCATCGAG GATGTGAGT TGGCCACCGC
 1201 GCGCTGGGTC GACTGGTTCA ACCATCGCCG CCTCTACCAG TACTGCGGCG
 1251 ACGTCCCGCC GGTGGA^{INS2}ACTC GAGGCTGCCT ACTACGCTCA ACGCCAGAGA
 1301 CCAGCGCCG GCTGAGGTCT CAGATCAGAG AGTCTCCGA CTCACCGGGG
 1351 CGGTTACGA

Figure N°8: Séquences nucléotidiques de l'IS6110 et des amorces INS1/INS2- T4/T5
 (Chandler & Fayet, 1993, Thierry *et al.*, 1990a).

5. Conclusion

La biologie moléculaire a fait connaître un essor considérable à la caractérisation et au typage des isolats agents de tuberculose (Haddad & Durand, 2001).

De nombreux couples d'amorces nucléotidiques sont maintenant disponibles et permettent l'amplification de régions d'ADN ou d'ARN spécifiques des mycobactéries en général et du complexe *Mycobacterium tuberculosis* en particulier (Tableau N°16). L'amplification est alors suivie d'une seconde amplification, plus spécifique, d'une hybridation (Böddinghaus *et al.*, 1990; Hance *et al.*, 1989), d'un séquençage nucléotidique (Kirschner *et al.*, 1993), ou d'une analyse de la longueur des fragments de restriction (RFLP) (Plikaytis *et al.*, 1992a; Plikaytis *et al.*, 1992b), afin de mettre en évidence le polymorphisme interspécifique lié à la région cible (Poulet, 1994). Mais ces techniques en deux étapes sont encore fastidieuses et ne peuvent donc pas être appliquées aux laboratoires de routine.

Le principal avantage de l'amplification est l'abaissement considérable du seuil de sensibilité, permettant la détection de 10 à 100 bactéries, rendant ainsi possible son utilisation directe sur des échantillons biologiques (Poulet, 1994). Ce seuil peut être abaissé davantage, jusqu'à 1 à 10 bactéries en utilisant la séquence d'insertion IS6110. En effet, la découverte de cette séquence a représenté une percée importante dans le monde des recherches sur la tuberculose, puisque, pour la première fois, elle a permis de procéder à des études épidémiologiques moléculaires détaillées (Thierry *et al.*, 1990a; Thierry *et al.*, 1990b). Spécifique, stable, polymorphe, abondante, la séquence IS6110 possède toutes les qualités requises pour le développement de tests rapides de diagnostic et de typage moléculaire. Elle constitue un bon candidat (et a prouvé son efficacité) pour un diagnostic direct et rapide par PCR à partir de prélèvements biologiques en laboratoire de routine (Abe *et al.*, 1993; Brisson-Noël *et al.*, 1991; El Baghdadi, 1999; Lazraq, 1999).

Tableau N°16: Quelques séquences répétées chez quelques espèces de mycobactéries
(McAdam *et al.*, 1994)

Séquences répétées	Espèces hôtes	Nombre de copies	Applications potentielles
<i>IS6110</i>	<i>M. tuberculosis</i>	0-20	Epidémiologie, identification et diagnostic
	<i>M. africanum</i>	0-20	
	<i>M.bovis</i>	1-5	
	<i>M.bovis BCG</i>	1	
<i>DRs</i>	<i>M. tuberculosis</i>	1	Typage, particulièrement des espèces avec peu/pas d' <i>IS6110</i>
	<i>M. africanum</i>	1	
	<i>M.bovis</i>	1	
	<i>M.bovis BCG</i>	1	
<i>IS1081</i>	<i>M. tuberculosis</i>	5-6	Différenciation de <i>M. bovis BCG</i> des autres espèces du complexe <i>M. tuberculosis</i>
	<i>M. africanum</i>	5-6	
	<i>M.bovis</i>	5-6	
	<i>M.bovis BCG</i>	1	
<i>MPTR</i>	complexe <i>M. tuberculosis</i> <i>M. kansasii</i> <i>M. gordonae</i>	Environ 8	Typage et épidémiologie de <i>M. kansasii</i> et <i>M. gordonae</i>
<i>PGRS</i>	complexe <i>M. tuberculosis</i> <i>M. kansasii</i> <i>M. gordonae</i> <i>M. marinum</i> <i>M. microti</i> <i>M. gastri</i> <i>M. szulgai</i>	26-30	Investigations épidémiologiques des infections tuberculeuses. Typage possible de <i>M. kansasii</i> et <i>M. gordonae</i>

I. Introduction

La tuberculose demeure l'un des problèmes majeurs de l'humanité et de l'élevage dans le monde. S'agissant d'une zoonose majeure, son éradication constitue en médecine vétérinaire à la fois un enjeu économique et un enjeu de santé publique (Haddad & Durand, 2001). Le diagnostic de certitude de cette maladie est basé sur l'identification de l'agent causal, *Mycobacterium tuberculosis* chez l'homme et *Mycobacterium bovis* chez les bovins. En parallèle, des cas d'infection humaine par *Mycobacterium bovis* ont aussi été rapportés dans plusieurs régions à travers le monde (Cosivi *et al.*, 1998).

Au Maroc, la tuberculose animale continue à sévir à l'état enzootique dans la plupart des régions malgré les efforts déployés par les autorités compétentes (El Abrak *et al.*, 2001, Anonyme, 2001) Son importance zoonotique n'est pas clairement évaluée. En 1966, deux expectorations sur 6000 provenant de personnes tuberculeuses ont révélé la présence de *M. bovis* (Bennis, 1968). Dans la région de Casablanca, en 1968-1969, la tuberculose d'origine bovine représentait 0,6% de l'ensemble des tuberculoses humaines (Fassi-Fehri & Hejny, 1972). Au cours de la période 1968-1972 à l'hôpital Moulay Youssef, Rabat, 30% des mycobactéries isolées d'enfants souffrant de TB extrapulmonaire étaient de type *M. bovis* (Bouazza, 1974). Une étude plus récente menée en 1998 sur 214 isolats humains a démontré que *M. bovis* représentait 11,21% des mycobactéries isolées (L'Kassmi *et al.*, 1998).

Vu le nombre réduit des études réalisées au Maroc et le caractère restrictif des populations étudiées, le présent travail veut actualiser et compléter celles-ci. L'objectif principal est d'évaluer la proportion d'infections tuberculeuses d'origine bovine par le biais de méthodes non utilisées d'une manière routinière aux laboratoires humains, notamment par l'utilisation de milieux conventionnels non additionnés de glycérol réputé inhiber la croissance de *M. bovis* (L'Kassmi *et al.*, 1998) et par conséquent, démontrer l'important rôle que joue le laboratoire dans l'identification des sources de l'infection et dans leur contrôle. Pour ce faire, un nombre total de 200 expectorations a été concerné par ce travail. En parallèle,

quelques prélèvements d'origine animale (tissus provenant de carcasses de bovins) ont fait l'objet d'isolement et d'identification dans le but de servir comme standard à l'étude et de disposer de mycobactéries fraîchement isolées devant enrichir la collection de souches et isolats utilisés dans le deuxième volet de la présente étude intitulé: «Application de la PCR à la détection et l'identification du complexe *Mycobacterium tuberculosis*».

II. Matériel et Méthodes

1. Mesures générales de précaution

Des mesures particulières de protection ont été appliquées lors de la manipulation des produits pathologiques et des cultures susceptibles de contenir des bacilles tuberculeux.

Ainsi, toutes les manipulations ont été effectuées sous hotte à flux laminaire de classe I au dessus d'un plateau facile à désinfecter, contenant une couche de liquide désinfectant (Phénol à 5%, eau de javel...) en portant des gants et un masque. Les liquides ne sont rejetés qu'après séjour prolongé dans un récipient contenant un liquide antiseptique ou après stérilisation par autoclavage. Les mêmes précautions ont été prises pour les pipettes.

En dehors des heures de travail, la stérilisation des hottes et plans de travail, est assurée par des lampes germicides (U.V).

2. Origine et transport des prélèvements

Tous les isolements et identifications des isolats ont été réalisés au niveau du département de Microbiologie, Immunologie et Maladies Contagieuses de l'Institut Agronomique et Vétérinaire (IAV) Hassan II, Rabat. Des prélèvements d'origine humaine (expectorations) (Tableau A, annexe I) et animale (carcasses de bovins) ont été inclus dans ce travail. En plus, des souches de référence internationale (ATCC: American Type Culture Collection) et de collection marocaine, ont été utilisées comme témoins positifs et négatifs (cf. Tableaux B et C, annexe I).

2.1. Prélèvements d'origine humaine

Un nombre total de 200 expectorations a été récolté au hasard à partir de patients hospitalisés au niveau de deux hôpitaux appartenant au Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Ibn Sina à Rabat: Hôpital Moulay Youssef et Hôpital Ibn Sina. La récolte des expectorations a été réalisée entre le 10 mai 2000 et le 02 mars 2001, sur des patients tout venants suspectés d'être atteints de tuberculose sans distinction d'origine urbaine ou rurale.

Le prélèvement des expectorations, réalisé sous le contrôle du service concerné, a été effectué dans des flacons en plastique stériles. Les prélèvements ont été acheminés sous régime de froid au laboratoire de Mycobactériologie du Département de Microbiologie, Immunologie et Maladies Contagieuses, de l'I.A.V. Hassan II où ils étaient immédiatement conservés à – 20°C jusqu'à leur analyse. Le tableau A (annexe I) résume le nombre, les dates et les origines des prélèvements des 200 expectorations en question et le Tableau N°17 donne le nombre de prélèvements récoltés de chaque hôpital.

Tableau N°17: Nombre de prélèvements récoltés au niveau des 2 hôpitaux du CHU Ibn Sina.

	Hôpitaux		Total
	Ibn Sina	Moulay Youssef	
Nombre de prélèvements	73	127	200

2.2. Prélèvements d'origine animale

Les prélèvements d'origine animale ont concerné 78 carcasses de bovins suspects d'héberger des lésions tuberculeuses et provenant de 4 abattoirs marocains: Casablanca, Rabat, Meknès et Fès (Tableau N°18). Le transport des échantillons s'est fait sous régime de froid et l'analyse est réalisée le jour même de leur réception. Les prélèvements ont concerné des organes lésés tels que les poumons, les ganglions lymphatiques, le foie, etc.

Tableau N°18: Nombre de carcasses prélevées au niveau de chaque abattoir

Abattoir d'origine des prélèvements	Nombre de prélèvements
Casablanca	15
Rabat	13
Meknès	27
Fès	23
Total	78

3. Examen microscopique direct

Les frottis sont préparés par étalage sur lames des différents échantillons (expectorations, broyats de tissus). Ils sont ensuite colorés par la méthode de Ziehl-Neelsen. Les lames sont observées à l'immersion au microscope optique (X100). Selon Collins *et al.*, 1989, l'échelle d'observation à cet examen microscopique en fonction du nombre de bacilles observés par champs examinés (cas d'expectorations) est établie comme présenté sur le Tableau N°19.

Tableau N°19: Échelle d'observation du nombre de bacilles observés par champs examinés (cas d'expectorations)

Nombre de bacilles observés	Résultats
0 par 300 champs	-
1-2 par 300 champs	-/+ : répéter le test
1-10 par 100 champs	+
1-10 par 10 champs	++
1-10 par champs	+++
> 10 par champs	++++

* Noter que c'est une échelle logarithmique

Il faut noter que le résultat de l'examen optique ne peut jamais conclure à la présence de bacilles «tuberculeux», mais simplement à la présence de bacilles acido-alcool-résistants (Tison & Carbonnelles, 1972).

4. Traitement et mise en culture

L'isolement des mycobactéries à partir de produits pathologiques souillés nécessite la mise en œuvre de procédés de décontamination susceptibles de concilier une action énergique vis-à-vis de la flore banale et une agressivité très faible vis-à-vis des bacilles acido-alcool-résistants. Le choix du traitement des produits pathologiques en vue de l'isolement des mycobactéries est fonction de la nature même de ces produits.

4.1. Expectations

La méthode utilisée pour la décontamination des échantillons d'expectations est celle de Pétroff à la soude: L'expectation est mise dans un tube de centrifugation, auquel sont ajoutés deux volumes d'hydroxyde de Sodium à 4%.(Sigma) Après 15 minutes d'agitation (agitateur de Kahn), le tube est centrifugé à 3000 tr/min pendant 15 minutes. Le surnagent est éliminé et le culot est lavé à l'eau distillée stérile. Le tube est centrifugé une seconde fois pendant 15 minutes à 3000 tr/min, le culot est ensuite mis en suspension dans 2ml d'eau distillée stérile. Un frottis est réalisé et coloré par la méthode de Ziehl-Neelsen afin de vérifier que l'on est bien en présence de mycobactéries. Les préparations sontensemencées sur milieux de Herrold et Lowenstein-Jensen (L-J) (Difco) avec et sans glycérol (Tison & Carbonnelles, 1972).

Les cultures sont incubées dans une étuve à 37°C et examinées quotidiennement durant la première semaine pour vérifier d'éventuelles contaminations puis hebdomadairement pour le reste de la période d'incubation (16 semaines). L'apparition des colonies est lente. Le délai peut atteindre plusieurs mois pour les souches dites dysgoniques.

4.2. Tissus

Le procédé suivi est celui décrit dans le manuel ``Laboratory Methods in Veterinary Mycobacteriology`` (Anonyme, 1985). Ce procédé comporte les étapes suivantes:

- À l'aide d'une pince et de ciseaux stériles, on dégage l'excès de graisse et on découpe les tissus en petits morceaux tout en faisant attention à ne pas inciser les lésions visibles.
- Dans un mortier stérile contenant du sable de mer stérile, on macère les tissus pendant deux minutes, on y ajoute 50 ml d'un bouillon glucosé au rouge de phénol (Gibco BRL) en fin de macération.
- À l'aide d'une pipette à ouverture large (pour laisser passer les morceaux de tissus), on prélève 7 ml de la suspension du tissu macéré dans des tubes à vis stériles (20x125mm), auxquelles on ajoute 5 ml d'une solution de NaOH à 0,5N (Sigma).
- Après 10 minutes d'action de la soude, on ajoute quelques gouttes d'une solution de HCl 6 N (Aldrich), jusqu'au virage au jaune. Le pH neutre est ramené par l'addition de quelques gouttes de NaOH 1N jusqu'à l'apparition d'une teinte rose pâle.
- On désinfecte les tubes par une éponge imbibée par une solution de phénol à 5 % (Sigma), et on laisse reposer pendant 15 minutes.
- Après centrifugation à 3000tr/min pendant 15 minutes, les surnageants sont éliminés et les culots sont inoculés au moyen d'un écouvillon stérile dans le milieu de L-J dépourvu de glycérol. L'incubation des cultures se fait à 37°C pendant 16 semaines.

5. Identification

5.1. Vérification de la pureté des colonies

Dès l'apparition de colonies acido-alcool-résistantes sur les milieux de culture, celles-ci sont repiquées sur le milieu liquide de Prauskauer et Beck (P&B).

Après une semaine d'incubation, la pureté des cultures sur le milieu P&B est vérifiée par coloration de Ziehl-Neelsen. Les cultures contaminées sont ensuite traitées par une solution de Chlorure de Benzalkonium à 2% (Sigma) pendant 2 heures et ensuite réensemencées sur milieu de L-J. Cette étape est très importante car les contaminants peuvent interférer avec les résultats des tests d'identification.

5.2. Détermination de l'aspect des colonies

Le caractère rugueux (Rough) ou lisse (Smooth) des colonies (type R ou S) a été déterminé sur le milieu de P&B. Une culture S donne lieu à une suspension homogène turbide, alors qu'une culture de type R apparaît grumeleuse; le milieu reste limpide.

5.3. Détermination de la vitesse de croissance

Elle est déterminée sur des subcultures réalisées sur le milieu de middlebrook 7H10 (Difco) selon la technique décrite par Vestal (1975). Les dates d'apparition des colonies sont notées. Les cultures sont classées en cultures rapides (croissance positive en moins de 4 jours) ou en cultures lentes (délai dépassant 9 jours).

5.4. Tests biochimiques

5.4.1. Recherche de la Niacine

En synthétisant des vitamines du groupe B, les mycobactéries produisent de la Niacine (précurseur des enzymes respiratoires NAD et NAD-P) à partir de l'acide nicotinique ou l'acide quinoléique endogène. Contrairement à *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis* produit la niacine (Pope & Smith, 1946). Pour mettre en évidence ce caractère spécifique, on soumet l'extrait aqueux de la culture à l'action du bromure de cyanogène en présence d'une amine aromatique (l'aniline). Une quantité suffisante de niacine entraîne l'apparition d'un composé coloré en jaune.

Le test est exécuté en ajoutant 1ml d'eau distillée à la surface de la culture sur milieu de Middlebrook 7H10, le tube étant maintenu incliné pour un contact de 20 minutes. L'eau est ensuite récupérée dans un tube à hémolyse, auquel on ajoute 0,5ml d'aniline incolore à 4% (Sigma) dans l'alcool éthylique à 95% (Sigma) puis 0,5ml d'une solution de bromure de cyanogène à 10% (Sigma) dans l'eau distillée. La lecture est effectuée après 15 minutes. Une réaction positive se manifeste par l'apparition d'une teinte jaune. Si la solution reste incolore, la réaction est

négative. A chaque série de tubes, on inclut un témoin positif (*M.tuberculosis H₃₇Rv*) et un témoin négatif (*M.bovis AN₅*).

5.4.2. Recherche de la Nitratase

La technique utilisée est celle décrite par Virtanen (Virtanen, 1960).

Dans un tube à hémolyse, on place 0,5 ml d'eau distillée, on y ajoute 2 anses pleines de colonies, prélevées à partir d'une culture fraîche, abondante sur milieu L-J. On ajoute 2 ml de la solution stérile de nitrate de sodium (substrat). Après incubation pendant 2 heures à 37°C, on y ajoute une goutte du réactif A (Acide chlorhydrique) puis 2 gouttes de chacun des réactifs B (Sulfanilamide) et C (Bichlorhydrate de n (α -naphtyl) étylène-diamine), successivement (Sigma, annexe II).

La présence d'une teinte rose-rouge traduit une réaction positive. Un résultat négatif (pas de coloration) est confirmé par une pincée de poudre de Zinc. Dans ce cas, l'apparition d'une coloration rouge traduit bel et bien une réaction négative. *Mycobacterium tuberculosis H₃₇Rv* est utilisé comme témoin positif tandis que *Mycobacterium bovis AN₅* est inclut comme témoin négatif.

5.4.3. Sensibilité au T.C.H (Hydrazide de l'acide thiophène 2 carboxilique)

Ce test met en évidence les différences de sensibilité au T.C.H des souches de *M. bovis* et de *M. tuberculosis*. Dès 1958, Bonicke a montré qu'une concentration de 1 μ g/ml de T.C.H inhibe la croissance de *Mycobacterium bovis* alors que les souches de *Mycobacterium tuberculosis* cultivent en présence de concentration de 100 μ g/ml (Bonicke, 1958).

On prépare des tubes de milieu L-J contenant 5 μ g/ml de T.C.H (Aldrich) et des tubes témoins (sans T.C.H). La lecture est faite après 3 semaines d'étuve à 37°C. *Mycobacterium tuberculosis H₃₇Rv* cultivant sur T.C.H est utilisé comme témoin positif alors que *Mycobacterium bovis AN₅* est utilisé comme témoin négatif.

III. Résultats

1. Cas des tissus

1.1. Bactérioscopie

La mise en évidence des bacilles acido-alcoolo-résistants sur frottis colorés à l'état frais par la méthode de Ziehl-Neelsen, s'est révélée positive pour 35 carcasses, soit dans 45% des cas, dont 3 provenant de Casablanca, 6 de Rabat, 14 de Meknès et 12 de Fès (Tableau N°20).

Tableau N°20: Résultats de la bactérioscopie en fonction de l'origine des prélèvements d'origine animale

	Ziehl positif	Ziehl négatif	Total
Casablanca	3	12	15
Rabat	6	7	13
Meknès	14	13	27
Fès	12	11	23
Total	35	43	78
% de Ziehl	44,8	55,2	100

1.2. Isolement et identification

Sur les 78 carcasses examinées, le genre *Mycobacterium* a été isolé à partir de 40 (51,3%), dont 5 isolats provenant de Casablanca, 7 de Rabat, 19 de Meknès et 9 de Fès (Tableaux N°21).

Tableau N°21: Résultats de l'isolement du genre *Mycobacterium* selon l'abattoir d'origine

Abattoirs	Nombre de carcasses examinées	Total de cultures positives	Taux d'isolement (%)
Casablanca	15	5	33,3
Rabat	13	7	53,4
Meknès	27	19	70,4
Fès	23	9	39,1
Total	78	40	51,3

Douze carcasses révélées négatives à la coloration de Ziehl ont donné lieu à des isollements positifs alors que 7 positives à la bactérioscopie, se sont révélées négatives en culture (Tableau N°22).

Tableau N°22: Pourcentage des cultures positives à partir des Ziehl négatifs et positifs

	Culture négative	culture positive	total	%
Ziehl négatif	31	12	43	28
Ziehl positif	7	28	35	80
Total	38	40	78	100
%	48,7	51,3	100	-

L'identification biochimique des isolats positifs a permis de caractériser une seule espèce : *M. bovis* à partir de tous les isolats (Tableau N°23).

Tableau N°23: Résultats de l'isolement et de l'identification des mycobactéries d'origine animale en fonction de leur origine géographique

Abattoirs	Nombre d'échantillons	Ziehl (+)	Ziehl (-)	Culture (+) (Ziehl -)	Culture (-) (Ziehl +)	Total <i>M. bovis</i>
Casablanca	15	3	12	5 (2)	10 (0)	5
Rabat	13	6	7	7 (1)	6 (0)	7
Meknès	27	14	13	19 (8)	8 (3)	19
Fès	23	12	11	9 (1)	14 (4)	9
Total	78	35	43	40 (12)	38 (7)	40

2. Cas des expectorations

2.1. Bactérioscopie

Sur les 200 échantillons examinés, la mise en évidence des bacilles acido-alcoolo-résistants sur frottis colorés à l'état frais par la méthode de Ziehl-Neelsen, s'est révélée positive pour 6 expectorations provenant de l'hôpital Ibn Sina et 92 expectorations provenant de l'hôpital Moulay Youssef, soit un total de 49% des échantillons étudiés (Tableau N°24).

Tableau N°24: Résultats de la bactérioscopie sur expectorations humaines en fonction de l'origine des prélèvements

Hôpital	Nombre d'échantillons	Ziehl (+)	Ziehl (-)	Culture (+) (Ziehl -)	Culture (-) (Ziehl +)
Ibn Sina	73	6	67	8 (2)	65 (0)
M.Youssef	127	92	35	93 (4)	34 (3)
Total	200	98	102	101 (6)	99 (3)

2.2. Isolement

2.2.1. Résultats quantitatifs

Sur les 200 échantillons examinés, le genre *Mycobacterium* a été isolé à partir de 101 expectorations (50,5%), dont 8 provenant de l'hôpital Ibn Sina et 93 de l'hôpital Moulay Youssef (Tableau N°25). Il est à noter que 6 échantillons négatifs à la coloration de Ziehl ont donné lieu à des isollements positifs alors que 3, positifs à la coloration, se sont révélés négatifs en culture.

Tableau N°25: Résultat de l'isolement du genre *Mycobacterium* à partir des expectorations

Hôpital	Positifs	Négatifs	Total
Ibn Sina	8 (11%)	65 (89%)	73
M.Youssef	93 (73,3%)	34 (26,7%)	127
Total	101 (50,5%)	99 (49,5%)	200

2.2.2. Résultats qualitatifs

Les premières colonies de mycobactéries ont été obtenues dans un délai variant entre 1 et 9 semaines. L'aspect des colonies a été observé sur le milieu L-J puis confirmé sur P&B (milieux troubles ou limpides). Ainsi, plusieurs types de colonies ont été observés rappelant celles de *M. tuberculosis*: colonies eugoniques: rugueuses crème-beige, végétant en chou-fleur et pouvant atteindre jusqu'à 5 à 10 mm de diamètre, et d'autres rappelant celles de *M. bovis* de petites tailles, bombées, lisses, opaques et non pigmentées (dysgoniques). D'autres types de colonies ont été également observés: rugueuses, plates beiges non pigmentées, dysgoniques, ou encore lisses, pigmentées et d'aspect parfois muqueux.

2.3. Identification par les tests biochimiques

Cette identification s'est basée sur certains tests biochimiques discriminatoires et rapides choisis en fonction du but attendu de cette étude. Ainsi, ce travail nous a permis de séparer les espèces identifiées en deux catégories:

2.3.1. Mycobactéries tuberculeuses

La distribution et pourcentages des espèces identifiées selon l'origine des prélèvements sont représentés sur le Tableau N°26. *M. tuberculosis* a été isolé dans 59,4% des cas alors que *M.bovis* a été identifié à partir de 17,8% des échantillons analysés. Aucun isolat de *M.africanum* n'a été identifié.

2.3.2. Mycobactéries non tuberculeuses

La distribution et pourcentages des mycobactéries atypiques isolées selon l'origine des prélèvements sont présentés sur le Tableau N°26. Un total de 23 mycobactéries atypiques a été isolé (22,7%). Ne constituant pas l'objectif du présent travail, l'identité de ces mycobactéries atypiques reste à établir.

Tableau N°26: Distribution et pourcentages des espèces identifiées selon l'origine des prélèvements

Hôpital	Mycobactéries atypiques	<i>M. bovis</i>	<i>M. tuberculosis</i>	Total Positifs
Ibn Sina	3 (37,5%)	0 (0%)	5 (62,5%)	8
M.Youssef	20 (21,5%)	18 (19,3%)	55 (59,1%)	93
Total	23 (22,7%)	18 (17,8%)	60 (59,4%)	101

IV. Discussions

L'objectif principal de cette étude est d'évaluer l'importance de la tuberculose à *M. bovis* chez des patients marocains sans distinction de leur origine urbaine ou rurale. A cette fin, on s'est intéressé à l'isolement de *M. bovis* à partir de ces patients par des techniques non utilisées dans les laboratoires des hôpitaux concernés par cette étude. Les résultats obtenus diffèrent en fonction de l'origine hospitalière des prélèvements (Hôpital Ibn Sina et Hôpital Moulay Youssef à Rabat). La majorité des échantillons positifs provient de l'hôpital Moulay Youssef, qui est un centre national spécialisé de diagnostic et de traitement de la tuberculose. L'introduction d'échantillons animaux a servi de standard à l'étude et nous a permis de disposer de mycobactéries fraîchement isolées devant enrichir la collection de souches et isolats utilisés dans le deuxième volet de la présente étude.

La coloration de Ziehl-Neelsen a permis la mise en évidence de bacilles acido-alcool-résistants à partir de 35 carcasses bovines suspectes (soit dans 45% des cas). Cette technique s'est révélée insuffisante pour le diagnostic présomptif, elle a donné des résultats négatifs même pour certains prélèvements dont les lésions étaient vraiment évidentes. Ceci pourrait avoir une relation avec la nature des lésions tuberculeuses et leur caractère paucibacillaire ainsi que le stade d'évolution: formes évolutives ou en stade de stabilisation (Vestal, 1975; Thoen & Himes, 1986a). La confirmation par culture a permis d'isoler le genre *Mycobacterium* à partir de 12 prélèvements dont la coloration de Ziehl-Neelsen était négative (28%). En parallèle, 28 (80%) parmi les 35 échantillons à Ziehl positif, ont donné une culture positive et on a permis d'isoler le genre *Mycobacterium*. L'identification par les tests biochimiques décrits antérieurement a permis la caractérisation de la totalité des isolats de *Mycobacterium* (40) comme étant des *M. bovis*. (Tableau D, annexe I).

Le choix de la bactérioscopie comme méthode de diagnostic présomptif de la tuberculose est dicté par sa rapidité, sa simplicité, son coût et sa valeur d'orientation. (Thorel, 1994; Stone *et al.*, 1997). Parmi les 98 échantillons à Ziehl positif, 95 étaient positifs en culture (96,9%) (Tableau N°27). Ceci peut être expliqué par l'inactivation éventuelle des mycobactéries lors de la décontamination des échantillons (Lan *et al.*, 1999; Fitzpatrick *et al.*, 1999). En effet, la longue liste des traitements utilisés depuis 1900 (vapeurs de formol, Acide sulfurique à 15 ou 10% avec ou sans neutralisation, Acide chlorhydrique à 3%, Laurylsulfate de sodium, Chlorure de Benzalkonium, etc) montre bien qu'aucun de ces traitements ne répond parfaitement au double impératif exigé par la technique idéale: détruire complètement la flore saprophyte sans altérer la viabilité des mycobactéries (Thorel, 1997). Par contre, 6 des échantillons négatifs à la coloration de Ziehl ont donné lieu à des cultures positives avec 3 isolats de *M. tuberculosis*, 1 de *M. bovis* et 2 mycobactéries atypiques, ce qui illustre la sensibilité de cette technique. Ceci pourrait être du à des prélèvements paucibacillaires, une observation microscopique insuffisante (le nombre de champs examinés insuffisant), ou encore à l'hétérogénéité de la distribution des mycobactéries dans le prélèvement (Thorel, 1994; Nivin *et al.*, 1998).

Tableau N°27: Pourcentage des résultats du Ziehl en fonction des résultats des cultures

		Nombre	Pourcentage Ziehl
Ziehl Négatif	Culture Négative	96	94,11
	Culture Positive	6	5,88
total Ziehl Négatif		102	100
Ziehl Positif	Culture Négative	3	3,06
	Culture Positive	95	96,94
total Ziehl Positif		98	100
Total		200	100

Parmi les isolats, *Mycobacterium tuberculosis* représentait 59,4% des mycobactéries isolées en culture. Ce pourcentage est relativement faible par rapport aux résultats d'autres études similaires (Grosset *et al.*, 1982; Grosset & Truffot-Pernot, 1984), notamment celle réalisée au Maroc en 1998 par L'Kassmi et son équipe, qui ont rapporté une proportion de 74,3%. Toutefois, étant donné l'utilisation de milieux de culture glycélinés par ces auteurs (voir plus loin), la croissance de *Mycobacterium bovis* est inhibée et sa part dans l'infection tuberculeuse est attribuée à *Mycobacterium tuberculosis*.

La deuxième espèce isolée correspond à *Mycobacterium bovis*. Elle représente 17,8% des isolats identifiés; proportion plus importante que celle décrite par L'Kassmi en 1998 (11,2%). Ce résultat lourd de conséquences, d'autant plus que notre échantillonnage couvre une bonne partie de tuberculeux provenant d'un peu partout à travers le Maroc, nécessite que lui soit accordé une réflexion particulière. En effet, l'hôpital Moulay Youssef, d'où proviennent la majorité des expectorations (127), est un centre de référence pour le diagnostic et le traitement de la tuberculose, il est reconnu pour la réception de cas tuberculeux chroniques les plus compliqués et provenant de toutes les régions du Maroc. L'infection humaine à *M. bovis* a été rapportée dans plusieurs régions du monde (Damsker *et al.*, 1974; Dreesen & Wood, 1979; Karlson & Carr, 1970; Schmiedel, 1968a), à des fréquences d'isolement variables d'un pays à l'autre. Dans les pays où la tuberculose bovine est répandue chez les bovins, cette proportion est estimée à 10% (O'reilly & Daborne, 1995; Schliesser, 1992). Dans les pays industrialisés où les programmes de contrôle de la tuberculose animale et la pasteurisation du lait ont été introduits, l'incidence de l'infection par *M.bovis* a été toujours faible (Acha & Szyfres, 1989): 0,5% en France (Boulahbal *et al.*, 1998), 1 à 1,2% en Angleterre entre 1992 et 1994 (Hardie & Watson, 1992; Grange & Yates, 1994) et 2,5% en Irlande (Smith *et al.*, 2000). Ce résultat dénote d'une manière indirecte l'importance de la maladie chez l'espèce bovine hôte et interpelle les autorités compétentes quant aux sources de contamination.

La croissance de *M.bovis* est inhibée par le glycérol à 4% usuellement incorporé dans les milieux de culture destinés à l'isolement du BK humain (Grange *et al.*, 1996), ceci explique le taux de déclaration relativement faible des TB à *M.bovis*

dans les pays en développement d'une part, et le taux élevé de l'infection à *M. bovis* obtenu dans la présente étude d'autre part. Dans certains pays, la tuberculose humaine causée par *M. bovis* est simplement rapportée comme une tuberculose classique afin d'éviter les enquêtes des agences de contrôle de la maladie, qui pourraient créer des problèmes au niveau de la confidentialité des patients (Collins & Grange, 1983). Les formes de tuberculose zoonotique varient selon l'âge: les lymphadénopathies cervicales prédominent chez les enfants, les formes pulmonaires, et particulièrement les formes extrapulmonaires, chez les adultes (Schliesser, 1992; Barwinek & Taylor, 1996). Les données disponibles sur la fréquence des formes extrapulmonaires dans les pays en voie de développement sont rares, en raison notamment de l'insuffisance de laboratoires spécialisés (Cosivi *et al.*, 1998).

La détermination des sources d'infection requiert des enquêtes épidémiologiques poussées. Les principales sources d'infection pour l'homme sont constituées par:

- ❑ Les contacts étroits entre humains et animaux, le bétail fait partie intégrante de la vie sociale de la population rurale dans la majorité des pays en voie de développement; une proportion importante de cette population pourrait être exposée au risque de la TB bovine (Cosivi *et al.*, 1998).
- ❑ La consommation de lait et ses dérivés contaminés par *M. bovis* dans les régions où la TB bovine est prévalente et non contrôlée (Acha & Szyfres, 1987). La production laitière est consommée à l'état frais ou non pasteurisée dans plusieurs pays, notamment au Maroc (Castets *et al.*, 1968). Bien que de bonnes habitudes d'hygiène alimentaire pourraient jouer un rôle majeur dans le contrôle de ces formes de TB, des habitudes de ce type se révèlent souvent difficiles à instituer dans les pays en développement.
- ❑ La transmission interhumaine de la tuberculose bovine est possible par voie respiratoire, cependant peu de cas ont pu être confirmés (Francis, 1950). Les travaux de Schmiedal et Sigurdsson ont conclu que si la transmission interhumaine de *M. bovis* est prouvée, elle reste moins fréquente que celle de *M. tuberculosis* (Schmiedal, 1968b; Sigurdsson, 1945). Dans notre étude, l'isolement de *M. bovis* à partir d'expectorations

dans des proportions élevées (17,8%) suggère une fréquence de transmission inter-humaine élevée.

Parmi les mycobactéries isolées, 22,7% ont été classées comme atypiques. Cette proportion est plus élevée que celle de 2,34% rapportée par L'Kassmi et son équipe (1998) et 10% rapportée par Le Pennec *et al.*, (1996) en France. Ce pourcentage certes élevé, pourrait partiellement être attribué à un phénomène de compétition bactérienne; la croissance des mycobactéries tuberculeuses (*M. tuberculosis* et *M. bovis*) pourrait avoir été masquée, voir même inhibée lors de l'isolement, par les mycobactéries atypiques qui sont moins exigeantes et par conséquent plus faciles à cultiver (Parriaud, 1985; Wolinsky, 1984). Ce sont en fait des bactéries saprophytes ou opportunistes de l'homme et des animaux, responsables d'infections chez les sujets faibles ou immunodéprimés. Certaines d'entre elles jouent un rôle important dans les infections associées au SIDA (complexe *M. avium-intracellulare*). Elles sont largement présentes dans l'environnement (Joubert, 1975; Joubert & Oudar, 1966; Joubert & Prave, 1975; Kubin, 1984); source commune de l'infection de l'homme et des animaux (Thorel, 1994).

Cette proportion élevée mérite que lui soit consacrée des études plus poussées pour déterminer les espèces. En outre, les mycobactéries atypiques seraient responsables de certains problèmes de résistance rencontrés au Maroc dans le traitement de certains patients. En effet, les symptômes d'une infection atypique ressemblent parfois à ceux de la tuberculose. Ne pouvant attendre les résultats du laboratoire, les médecins décident souvent de commencer un traitement en l'absence d'un diagnostic de certitude.

V. Conclusion

Au fur et à mesure que la prévalence de la tuberculose diminue, la confirmation bactériologique devient un élément essentiel pour le contrôle de la maladie. Durant ce travail, le taux d'isolement de *M. bovis* est très élevé (17,8%) et nécessite que lui soit accordé une importante et réflexion particulières. Il a été démontré dans ce travail que l'utilisation correcte et adéquate de milieux de culture appropriés, donne une grande satisfaction et permet d'isoler et d'identifier correctement les espèces impliquées dans les infections tuberculeuses. Ce résultat doit impérativement déclencher une réflexion sérieuse au niveau des hôpitaux, services sanitaires et autorités concernés. L'utilisation de milieux de culture spécifiques dépourvus de glycérol est impérative.

Par ailleurs, l'isolement d'autres mycobactéries (mycobactéries atypiques) devient également plus fréquent. Cela pose des problèmes de diagnostic différentiel parfois difficiles parce que, si la plupart des mycobactéries ne causent pas de maladies, certaines sont potentiellement pathogènes (Thorel, 1994). Il devient de plus en plus impératif d'identifier correctement les espèces impliquées pour un dépistage précis de la maladie et par la suite, un traitement parfaitement ciblé.

I. Introduction

La croissance lente des mycobactéries, notamment des mycobactéries pathogènes, constitue un obstacle majeur pour le diagnostic rapide de la tuberculose ou d'autre mycobactérioses (Thorel, 1994; Thorel, 1997).

Bien que des systèmes de culture, plus rapides et plus spécifiques que les milieux classiques, aient été développés et commercialisés, tels que le système BACTEC (Becton-Dickinson), qui permet de réduire le temps de croissance de *M.tuberculosis* de 27 jours en milieu classique Lowenstein-Jensen, à 15 jours (Sewell *et al.*, 1993), le délai entre le prélèvement et le diagnostic reste encore très long.

Le développement des techniques de biologie moléculaire a permis d'accélérer et d'affiner considérablement les processus d'identification classiques, en shuntant la culture et en faisant directement appel au génotype mycobactérien, plutôt qu'à son phénotype. Parmi ces techniques, La PCR semble être performante en raison des avantages pratiques qu'elle offre à savoir la rapidité d'exécution, la sensibilité et la spécificité. Elle a été appliquée avec succès pour le diagnostic rapide de la tuberculose (Akcan *et al.*, 1997; Ichiyama *et al.*, 1997; Jou *et al.*, 1997; Lazraq *et al.*, 1990; Lebrun *et al.*, 1997; Tortoli *et al.*, 1997). Le gain de temps par rapport aux techniques d'identification traditionnelles est considérable: quelques heures au lieu de 6 semaines.

Dans cette optique, nous avons développé une PCR simple basée sur l'utilisation de la séquence d'insertion l'IS6110 (Figure N°8) comme cible d'amplification en utilisant le couple d'amorces INS1/INS2 (Tableau N°28), pour la détection du complexe *Mycobacterium tuberculosis* à partir des cultures. Le choix de cette séquence en particulier est expliqué ultérieurement.

Pour ce faire, nous avons, dans un premier temps, procédé à standardiser cette technique et à l'appliquer sur des souches de référence internationales (Tableau B) et de collection marocaines (Tableau C) ainsi que des souches de *Mycobacterium bovis* isolées et identifiées au laboratoire des mycobactéries (IAV) (Tableau D) et ce dans le but de tester sa fiabilité. La spécificité de cette amplification a été ensuite testée par une deuxième amplification (interne), en utilisant le couple d'amorces T4/T5 (Tableau N°28).

Dans un deuxième temps, nous avons appliqué cette technique pour la détection des espèces appartenant au complexe *Mycobacterium tuberculosis* à partir de culture de expectorations, et enfin, nous avons combiné les résultats de la PCR à ceux de l'identification par les tests biochimiques classiques pour différencier *Mycobacterium tuberculosis* de *Mycobacterium bovis*.

II. Matériel et Méthodes

1. Les souches bactériennes

Un total de 101 souches et isolats de mycobactéries (*Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* et des mycobactéries atypiques) d'origine humaine isolés et identifiés au laboratoire (Tableau E et F, annexe I), ainsi que d'autres mycobactéries atypiques et des *Mycobacterium bovis* d'origine animale ont été concernés par cette étude (Tableaux B et D, annexe I).

Une série de souches de mycobactéries de collection marocaines (Tableau C) et internationales ATCC (Tableau B) a été utilisée comme témoins positifs et négatifs et aussi afin de standardiser les techniques de détection. En parallèle, des bactéries comme *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Bacillus sp.*, *Staphylococcus sp.* et autres bactéries ont été introduit à la collection des témoins négatifs.

2. Extraction de l'ADN génomique total

Le protocole de l'extraction de l'ADN génomique total est celui décrit par van Soolingen et ses collaborateurs (1991b) avec quelques modifications.

2.1. Protocole d'extraction

2.1.1. Lyse des bactéries

- À partir d'une culture jeune (10 jours) sur le milieu liquide: Le milieu de P&B. Un volume de 500 µl est transféré dans un tube eppendorf de 1,5 ml. Le tube est ensuite mis dans un bain-marie (Kotterman) pré-chauffé à 80°C pendant 20 minutes dans le but de tuer les cellules bactériennes, puis centrifugé à 15000tr/min (Sigma Bioblock Scientific) pendant une durée de 5 minutes. Le surnageant est ensuite éliminé et le culot est repris dans 500 µl de TE pH8 (Sigma).

- ❑ À partir d'une culture sur milieu solide: (L-J) ou Herrold. Les colonies raclées à l'aide d'une pipette Pasteur bouclée stérile sont suspendues dans un tube eppendorf contenant un volume de 500µl de TE pH8. Ce dernier est ensuite chauffé au bain-marie à 80°C pendant 20 minutes.

La suite du protocole est la même pour les deux types de milieux d'origine des cellules bactériennes.

- ❑ Traitement par les Lysozymes et la Protéinase K (PK) (Sigma) :
 - Un volume de 50µl d'une solution de Lysozyme à 20mg/ml (Sigma) est ajouté au tube eppendorf puis incubé dans un bain-marie à 37°C pendant 2 heures.
 - Une solution SDS/PK (75µl) (10%, 10mg/ml successivement) est ajoutée. Le tube est ensuite incubé à 65°C pendant 15 minutes (toujours dans un bain-marie).
 - Afin de dissocier les protéines des acides nucléiques, deux solutions: Cétyl-Triméthyl Ammonium Bromide/ NaCl: (CTAB/NaCl) (100µl) et NaCl 5M (100µl) (Sigma) sont ajoutées successivement puis le tube est ré-incubé dans un bain-marie à 65°C pendant 15 minutes.

2.1.2. Extraction de l'ADN

- Un volume de 750µl de Chloroforme-Isoamyl-alcool (23:1) (Sigma) est ajouté puis le tube est centrifugé à 15000tr/min pendant 5 minutes. Cette étape est réalisée dans le but d'éliminer les protéines et les lipides.
- Le surnagent est transféré dans un nouveau tube eppendorf étiqueté, auquel est ajouté 0,6 volume d'une solution d'isopropanol (Sigma) puis le tube est placé à -20°C pendant au moins 30 minutes.
- Le précipité est centrifugé à 0°C pendant 15 minutes à 15000tr/min.

- Après élimination du surnagent, le culot est suspendu dans un volume de 1ml d'Ethanol à 70% (Merck) préalablement porté à -20°C (lavage de l'ADN).
- le tube est centrifugé à 15000tr/min pendant 5 minutes à 0°C, ensuite, le surnagent est éliminé et le culot est recentrifugé à la même vitesse pendant une minute.
- Le surnagent est éliminé et le culot est asséché puis resuspendu dans un volume de 20 µl de TE (pH8) et stocké à -20°C en vue d'une utilisation ultérieure.

3. Réaction de PCR

3.1. Précautions de travail

En raison de la grande sensibilité de la technique de PCR, des précautions très rigoureuses ont été prises durant la manipulation afin d'éviter les problèmes de contamination (faux positifs) (Burman & Reves, 2000). La préparation du mélange réactionnel ``Mix`` est effectuée dans une station propre (non contaminée par les acides nucléiques). Les réactions post-PCR se sont déroulées dans une autre station isolée. Le port de gants neufs, d'une blouse propre et l'utilisation de matériel stérilisé (micropipettes, embouts, tubes eppendorf, vortex...) destinés à la salle de PCR, ont été respectés. Toutes les manipulations ont été réalisées dans la glace.

3.2. Choix des amorces

La cible de l'amplification est un fragment appartenant à la séquence d'insertion l'IS6110 qui est une séquence spécifique au complexe *Mycobacterium tuberculosis* (Thierry *et al.*, 1990a).

En se basant sur la séquence IS6110 (Figure N°8) établie par Thierry et son équipe (Thierry *et al.*, 1990b), deux couples d'amorces ont été choisis: INS1/INS2 et T4/T5 (Eurogentec Bel. S.A.). Le choix a été établi de manière:

- ❑ à avoir le moins d'homologie possible au sein de la même amorce, évitant ainsi toute hybridation possible entre les deux amorces.

- ❑ à avoir une séquence riche en GC, évitant des hybridations non spécifiques.
- ❑ Le deuxième couple d'amorce T4/T5 a été choisit à l'intérieur de la région amplifiée par le premier couple d'amorces INS1/INS2 (Mullis & Falooma, 1987; Engelk *et al.*, 1988; Kaneko *et al.*, 1989).

Le premier couple d'amorces (INS1/INS2) donne un fragment de 245pb tandis que le deuxième (T4/T5) produit un fragment de 123 pb (Thierry *et al.*, 1990b) (Tableau N°28).

3.3. Protocole de PCR:

Le protocole suivi est celui décrit par Ross & Dwyer en 1993. Cependant, quelques modifications ont été opérées afin d'optimiser ce protocole et de l'adapter aux conditions de notre laboratoire. Le Kit de PCR utilisé dans toutes les manipulations est celui produit par Boehringer Mannheim, Cat n°1578553.

3.3.1. Mélange réactionnel

Dans un tube eppendorf de 1,5ml, le mélange réactionnel est réalisé tel que présenté dans le tableau N°29.

Tableau N°29: Mélange réactionnel pour la PCR

Réactifs	Volume (μ l)	Concentration finale
Tampons de PCR 10X	2	1X
MgCl ₂ 25mM	2,4	3mM
dNTPs 10mM	1,6	800 μ M
INS1 (20pmole/ μ l)	1 (0,5)	1 μ M (0,5)
INS2 (20pmole/ μ l)	1 (0,5)	1 μ M (0,5)
Taq-polymérase (5U)	0,4	0,1U
H ₂ O pure	10,6	-
ADN	1	-
Volume final	20	-

Le contenu du tube est couvert de 500 μ l d'huile minérale (Sigma M-5904) afin d'éviter l'évaporation.

3.3.2. Amplification

Après avoir placé les tubes dans un thermocycleur (PCT-100, M.J.Rsearch.Inc), le programme d'amplification est exécuté selon trois étapes pendant 35 cycles:

- Dénaturation à 94°C pendant une minute
- Hybridation à 54°C pendant une minute
- Élongation à 72°C pendant une minute

Le dernier cycle est suivi d'une élongation terminale à 72°C pendant 10 minutes avant une étape terminale de conservation à +4°C pendant 24 heures. Les produits amplifiés font l'objet ensuite d'une électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5%.

3.3.3. Amplification interne T4/T5

Encore appelée ``Nested PCR``, elle consiste à réaliser à l'aide d'un nouveau couple d'amorces, une amplification interne sur le produit d'une PCR simple. Le but de cette deuxième amplification est de démontrer la spécificité des produits amplifiés lors de la première amplification (Mullis & Falooma, 1987). Le second couple d'amorces est choisi à l'intérieur de la région amplifiée (Mullis & Falooma, 1987; Engelk *et al.*, 1988; Kaneko *et al.*, 1989) (tableau N°28). Le couple d'amorces qu'on a utilisé est le T4/T5, qui donne un fragment de 123 pb, situé à l'intérieur du premier fragment (245pb) (Thierry *et al.*, 1990b) .

4. Électrophorèse sur gel d'agarose

4.1. Préparation du gel (moulage)

Une solution d'agarose à 1,5% (Agarose Ultra-pure, Gibco BRL) est préparée dans du TBE 1X (Sigma), chauffée jusqu'à dissolution complète puis refroidie à 60°C. L'agarose est ensuite coulée dans un moule monté sur cassette munie d'un peigne à 8 ou 14 cupules. Après polymérisation, le gel est immergé dans une solution de TBE 1X.

4.2. Dépôt des échantillons

Un volume de 1 µl du tampon de chargement (bleu de bromophénol, glycérol et H₂O; Sigma) est additionné à 9 µl de chaque produit d'amplification. Ensuite, les marqueurs de poids moléculaire (λDNA-HindIII, 0.12-23.1 Kbp, le Ladder 100pb et 50 pb; Boehringer-Mannheïm) sont déposés dans les puits du gel.

4.3. Migration

La migration est réalisée au moyen d'un générateur de courant (Hoefer Scientific Instruments) sous un voltage de 85 Volts pendant 5 minutes puis à 70 Volts durant le reste de l'électrophorèse. Celle-ci est arrêtée lorsque le témoin de migration atteint les trois-quarts de la longueur du gel, soit une heure environ.

4.4. Visualisation

Le gel est immergé dans une solution de Bromure d'éthidium à 0,5 µg/ml (Sigma) pendant 15 minutes. Après lavage à l'eau distillée pendant 15 minutes, le gel est visualisé à l'aide d'un transilluminateur (Spectroline) à UV et photographié à l'aide d'un appareil Polaroid (Film 667).

III. Résultats

1. Extraction de l'ADN génomique total

L'extraction a été faite à partir de toutes les cultures de mycobactéries disponibles au laboratoire. Les premiers essais ont donné des bandes d'ADN très digérés (avec smear). La modification de certains paramètres du protocole de base a donné des bandes génomiques assez claires et denses pour permettre une bonne amplification (Figures N°9 et 10, respectivement).

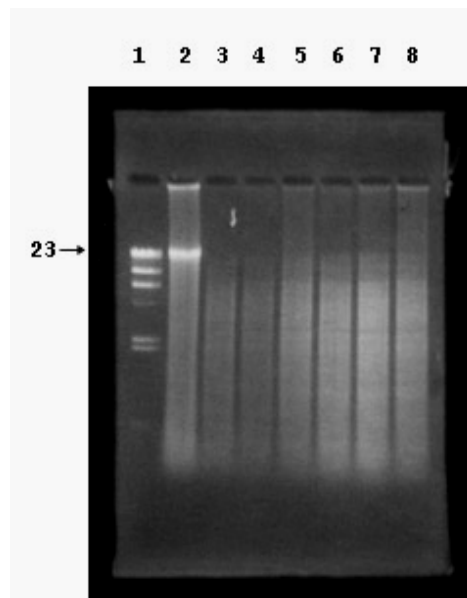


Figure N°9: Extraction de l'ADN génomique totale des mycobactéries: protocole de base.

1: Marqueur de poids moléculaire en paires de bases (II); 2: Souche de référence: *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇ Rv (A₃) ; 3-8: premiers essais d'extraction. 23: Taille en Kilo-bases de la première bande du marqueur génétique.

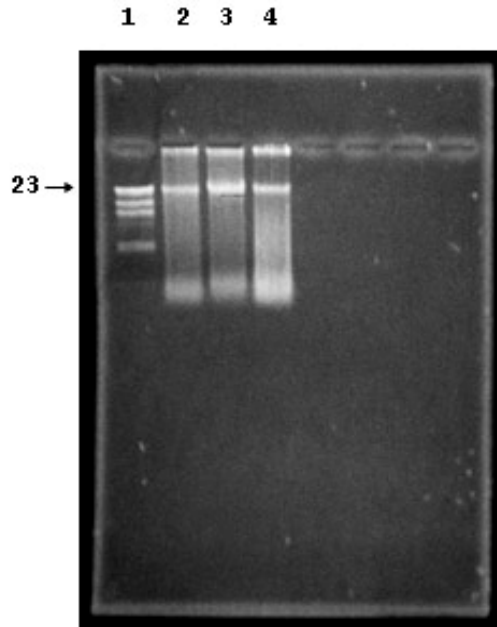


Figure N°10: Extraction de l'ADN génomique totale des mycobactéries après modification du protocole de base.

1: Marqueur de poids moléculaire en paires de bases (II); 2: *M. bovis* AN₅ ; 3-4: *M. tuberculosis* (A₃). 23: Taille en Kilo-bases de la première bande du marqueur génétique.

2. Réaction PCR

2.1. Standardisation

La standardisation de la technique a été réalisée sur les souches de référence ATCC. Les premiers essais ont donné plusieurs bandes de tailles différentes mais avec la même bande majeure ayant une taille de 245pb (Figures N°11 et 12).

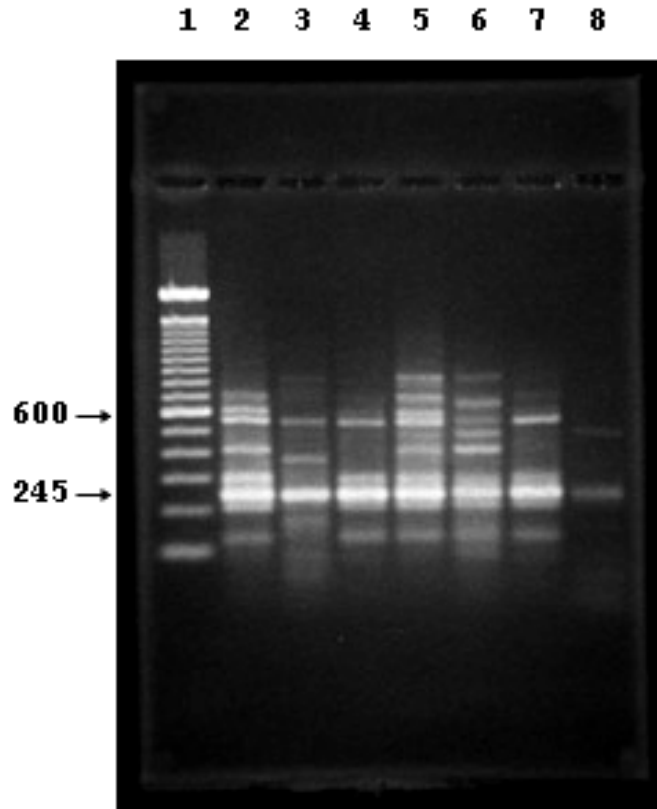


Figure N°11: Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% des produits de PCR après amplification par le couple d'amorces INS1/INS2: Premier essai.

1: Marqueur de poids moléculaire (100pb ladder); 2: *M. tuberculosis* *H₃₇Rv* (*A₃*); 3: *M. bovis* Pasteur (*A₁₀*); 4: *M. bovis* Tice (*A₉*); 5: *M. tuberculosis* *Neotype* (*A₂*); 6: *M. bovis* (*B₁BM₁*, Maroc); 7: *M. bovis* (*B₄BM₄*, Maroc); 8: Témoin négatif. 245: taille en paires de bases de la bande recherchée.

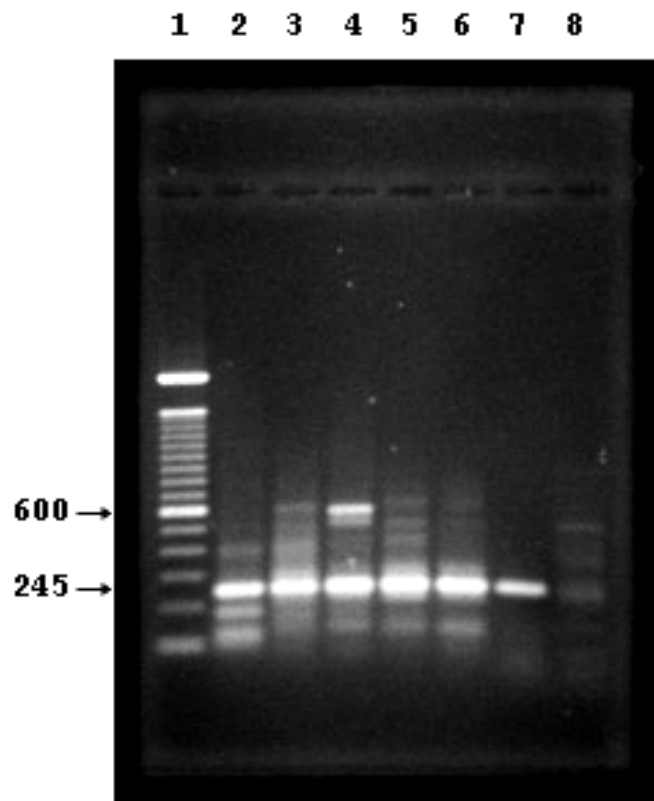


Figure N°12: Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% des produits de PCR après amplification par le couple d'amorces INS1/INS2: Deuxième essai.

1: Marqueur de poids moléculaire (100pb ladder); 2: *M. bovis* Tice (A_9); 3: *M. bovis* Pasteur (A_{10}); 4: *M. tuberculosis* $H_{37}Rv$ (A_3); 5: *M. bovis* (B_3BM_3 , Maroc); 6: *M. bovis* (B_5BM_5 , Maroc); 7: *M. bovis* Neotype ATCC 19210(A_1); 8: Témoin négatif. 245: taille en paires de bases de la bande recherchée.

La modification de quelques paramètres de la réaction de PCR (Figures N°13, 14 et 15 respectivement) a donné des résultats reproductibles et de ce fait, nous a permis de maîtriser et de standardiser la technique dans nos conditions de travail.

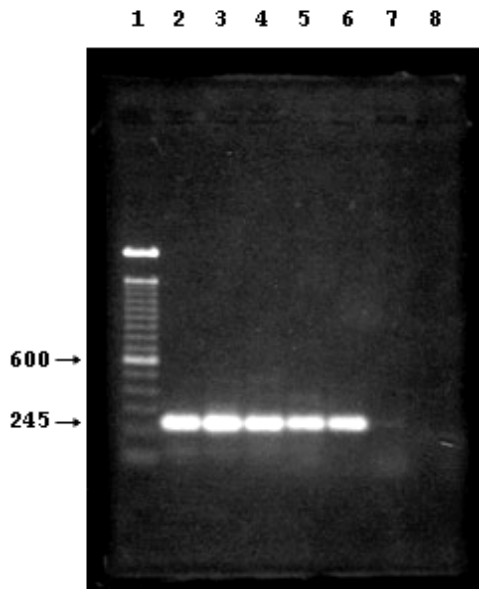


Figure N°13

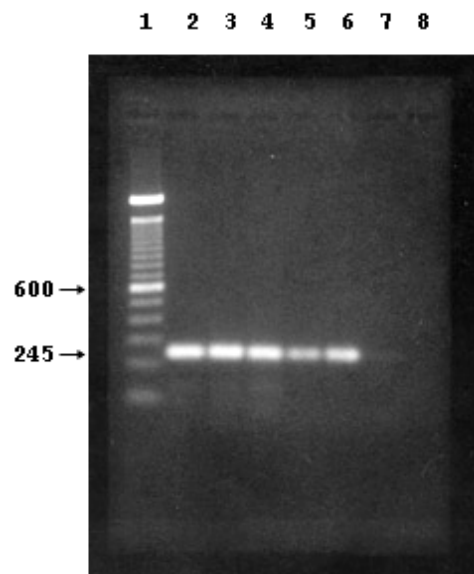


Figure N°14

Figures N°13-14: Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% des produits de PCR après amplification par le couple d'amorces INS1/INS2.

Figure N°13: Concentration de départ pour les amorces: 1 μ M

Figure N°14: Dilution de la concentration des amorces: 0,5 μ M

1: Marqueur de poids moléculaire (100pb ladder); 2: *M. bovis* Neotype ATCC 19210 (A₁); 3: *M. tuberculosis* Neotype (A₂); 4: *M. tuberculosis* H₃₇Rv (A₃); 5: *M. bovis* Tice (A₉); 6: *M. bovis* Pasteur (A₁₀); 7: Témoin négatif. 245: taille en paires de bases de la bande recherchée.

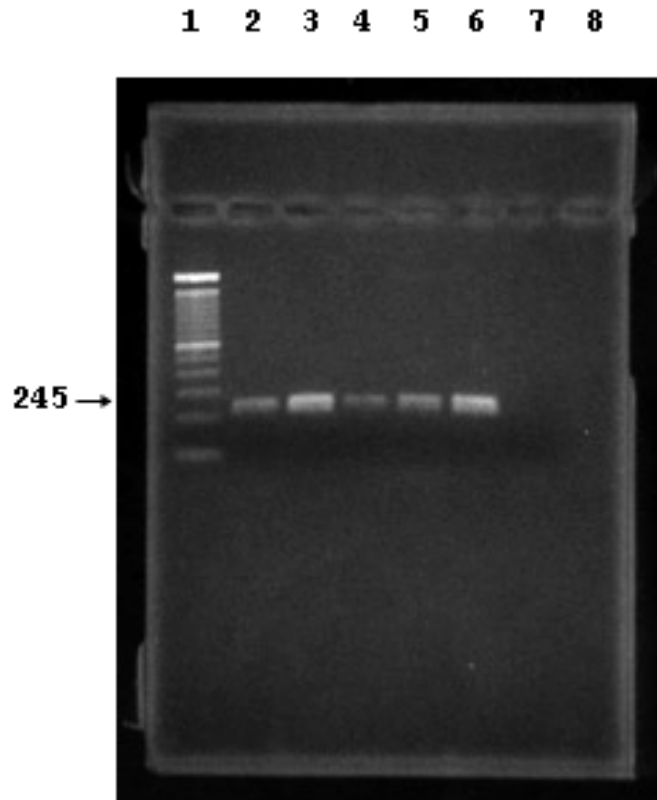


Figure N°15: Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% des produits de PCR après amplification par le couple d'amorces INS1/INS2 et après dilution de la concentration des amorces à 0,25 μ M.

1: Marqueur de poids moléculaire (100pb ladder); 2: *M. bovis* Neotype ATCC 19210 (A_1); 3: *M. tuberculosis* Neotype (A_2); 4: *M. tuberculosis* $H_{37}Rv$ (A_3); 5: *M. bovis* Tice (A_9); 6: *M. bovis* Pasteur (A_{10}); 7: Témoin négatif. 245: taille en paires de bases de la bande recherchée.

Les figures N°16, 17 et 18 illustrent quelques profils d'amplification de quelques souches de référence. Cette amplification a révélé chez toutes les souches positives (*M. tuberculosis* H₃₇Rv et *M. bovis* AN₅) la présence d'une bande unique de 245pb, taille de notre cible d'amplification. Aucun signal d'amplification correspondant au fragment cible (245pb) n'a été détecté pour les témoins négatifs.

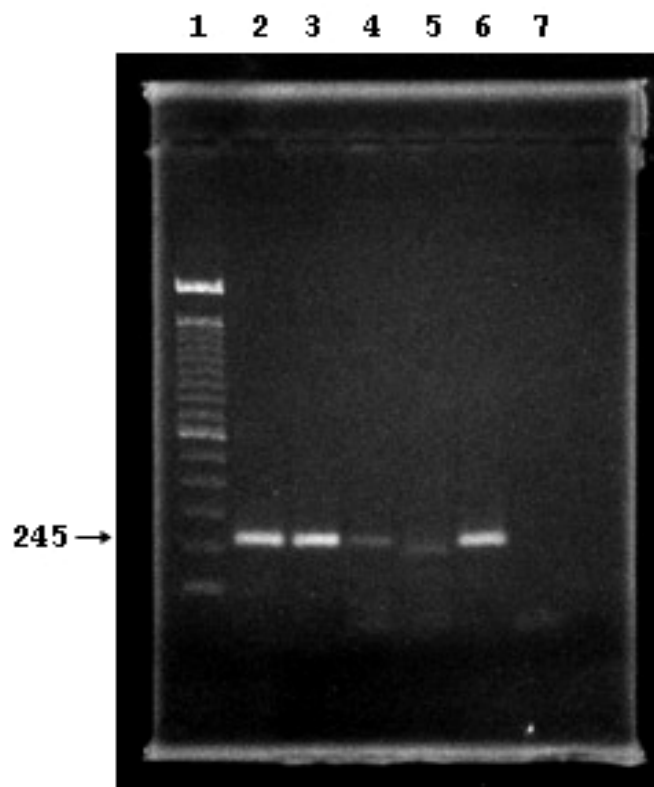


Figure N°16: Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% des produits de PCR après amplification par le couple d'amorces INS1/INS2: souches de référence.

1: Marqueur de poids moléculaire (100pb ladder); 2: *M. bovis* Neotype ATCC 19210 (A₁); 3: *M. tuberculosis* Neotype (A₂); 4: *M. paratuberculosis* Neotype ATCC (A₄); 5: *M. chelonae* (A₅); 6: *M. bovis* Glasgow BCG (A₈); 7: Témoin négatif sans ADN. 245: taille en paires de bases de la bande recherchée.

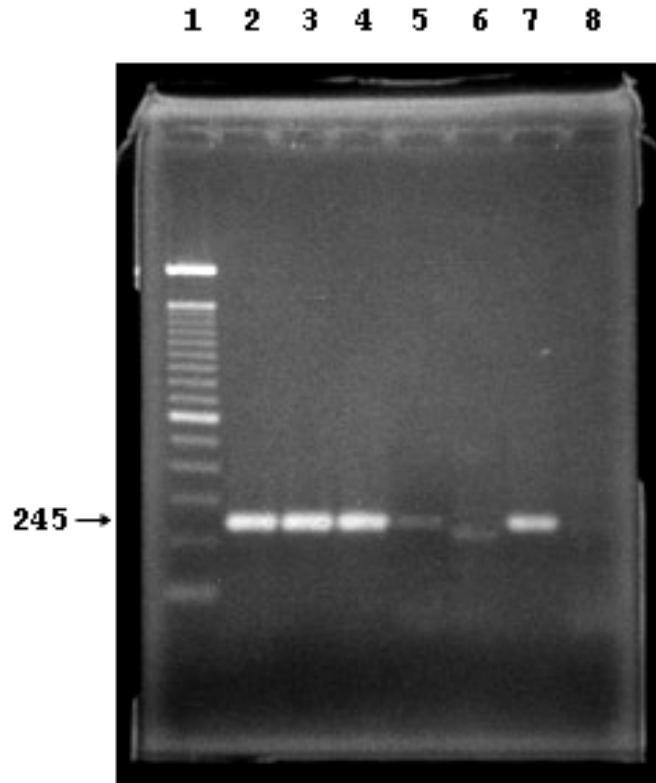


Figure N°17: Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% des produits de PCR après amplification par le couple d'amorces INS1/INS2: souches de référence, suite.

1: Marqueur de poids moléculaire (100pb ladder); 2: *M. bovis* (B₂BM₂, Maroc); 3: *M. bovis* (B₃BM₃, Maroc); 4: *M. tuberculosis* H₃₇Rv (A₃); 5: *M. paratuberculosis* Neotype ATCC (A₄); 6: *M. chelonii* NADC (A₂₁); 7: *M. bovis* Pasteur (A₁₀); 7: Témoin négatif sans ADN. 245: taille en paires de bases de la bande recherchée.

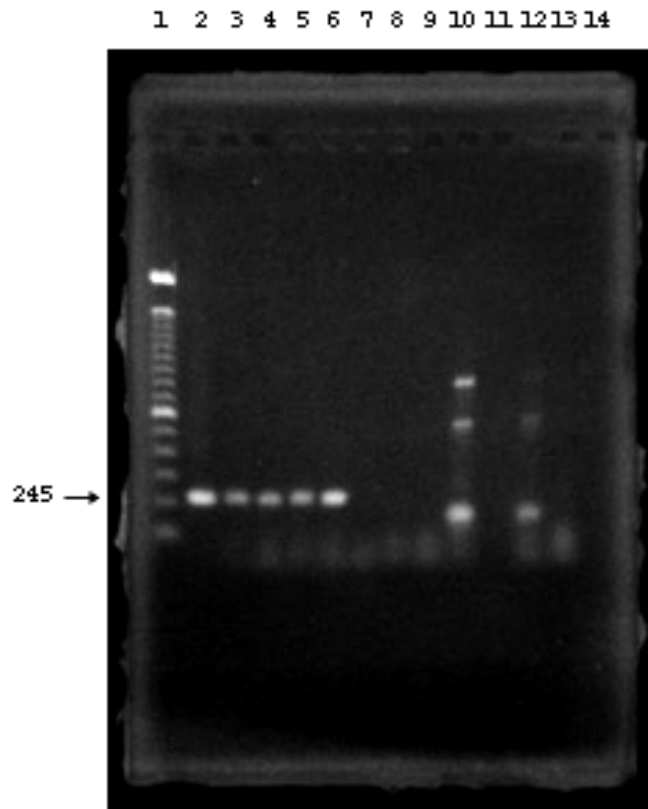


Figure N°18: Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% des produits de PCR après amplification par le couple d'amorces INS1/INS2: souches de référence, suite.

1: Marqueur de poids moléculaire (100pb ladder); 2: *M. tuberculosis* H₃₇Rv (A₃); 3: *M. bovis* AN₅; 4: *M. bovis* Neotype ATCC 19210 (A₁); 5: *M. bovis* (B₁BM₁, Maroc); 6: *M. bovis* (B₂BM₂, Maroc); 7: *M. chelonii* (A₅); 8: *M. smegmatis* 607B (A₂₆); 9: *M. smegmatis* lab (A₂₇); 10: *M. scrofulaceum* 963 (A₂₄); 11: *M. phlei* 3198 (A₂₀); 12: *M. scrofulaceum* 730 (A₂₅); 13: *M. avium* ser1 (B₁₁BM₁₁, Maroc); 15: Témoin négatif sans ADN. 245: taille en paires de bases de la bande recherchée.

2.2. Spécificité

La figure N°19 représente le résultat de l'amplification interne par le deuxième couple d'amorces T4/T5. Les bandes majeures ont une taille de 123pb, correspondant à la taille de la bande attendue.

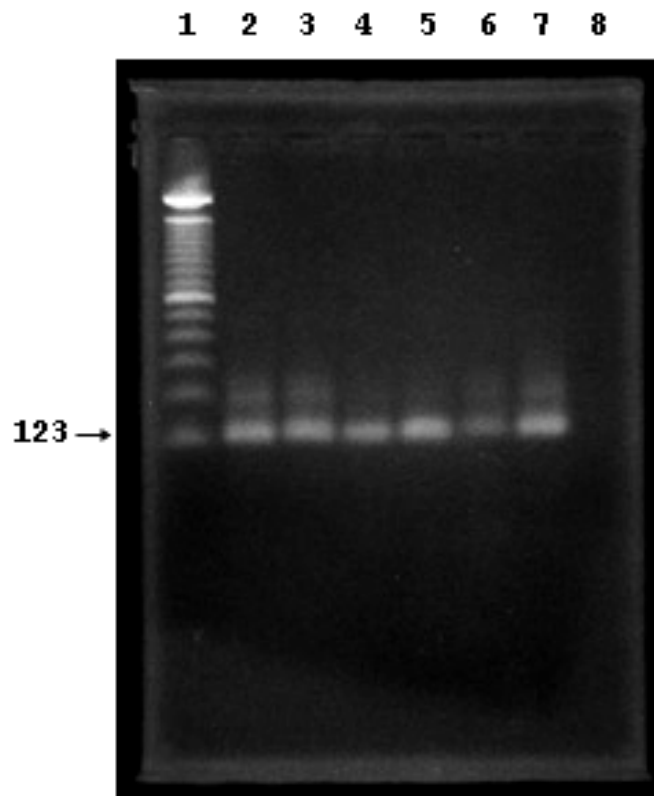


Figure N°19: Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% des produits de PCR après la deuxième amplification (Nested-PCR) par le couple d'amorces T4/T5.

1: Marqueur de poids moléculaire (100pb ladder); 2: *M. tuberculosis* H₃₇Rv; 3: *M. bovis* AN₅; 4: *M. bovis* (R₂₇); 5: *M. bovis* (M₉); 6: *M. tuberculosis* (A₃); 7: *M. tuberculosis* Neotype(A₂); 8: Témoin négatif sans ADN. 123: taille en paires de bases de la bande recherchée.

2.3. Application

Une fois la technique maîtrisée, nous l'avons appliqué à notre collection d'isolats et de souches isolées au laboratoire (cultures à partir de expectorations et de tissus).

Les figures N°20, 21 et 22 représentent respectivement les profils des produits d'amplification de *Mycobacterium tuberculosis* et *M. bovis* d'origine humaine (expectorations), et de différentes souches de bactéries utilisées comme témoins négatifs (*Salmonella enteritidis*; *Bacillus sp.*; ...).

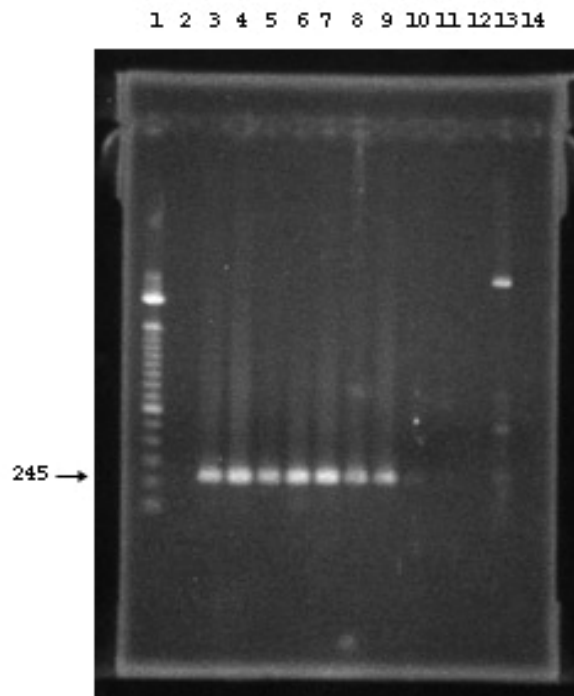


Figure N°20: Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% des produits de PCR après amplification par le couple d'amorces INS1/INS2 des cultures de expectorations.

1: Marqueur de poids moléculaire (100pb ladder); 3-4-6-7: *M. tuberculosis* (C₉; C₃₁ C₃₃; C₃₅); 5-8-9: *M. bovis* (C₃₄; C₆₅; C₆₆); 10: *M. phlei* (A₂₀); 11-12: Témoins négatifs sans ADN; 13: Marqueur de poids moléculaire (50pb ladder). 245: taille en paires de bases de la bande recherchée.

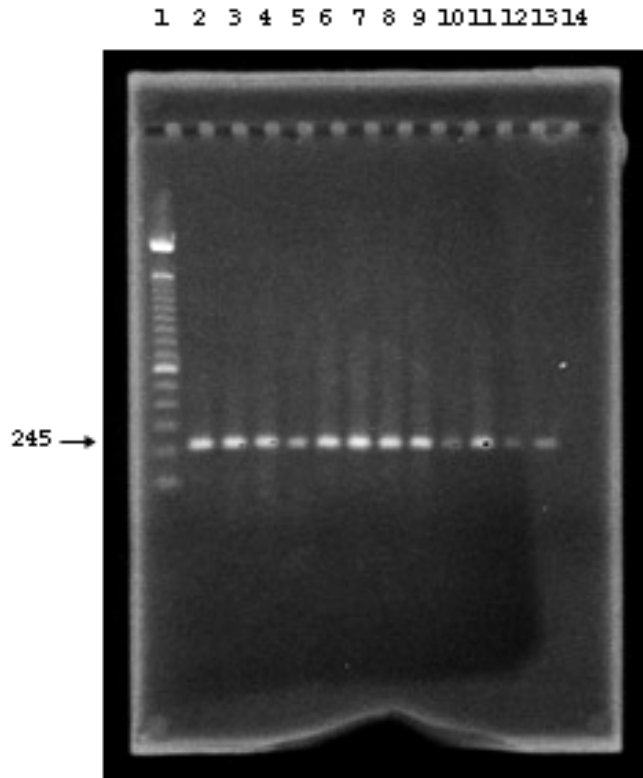


Figure N°21: Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% des produits de PCR (*M. bovis* isolé à partir des cultures d'expectorations), après amplification par le couple d'amorces INS1/INS2.

1: Marqueur de poids moléculaire (100pb ladder); 2: *M. bovis* AN₅; 3: *M. bovis* C₃₄; 4: *M. bovis* C₁₁₈; 5: *M. bovis* C₁₇₄; 6: *M. bovis* C₁₉₆; 7: *M. bovis* C₁₇₀; 8: *M. bovis* C₁₈₆; 9: *M. bovis* C₆₆; 10: *M. bovis* C₆₅; 11: *M. bovis* C₁₃₅; 12: *M. bovis* C₁₉₄; 13: *M. bovis* C₁₁₇; 14: Témoin négatif sans ADN. 245: taille en paires de bases de la bande recherchée.

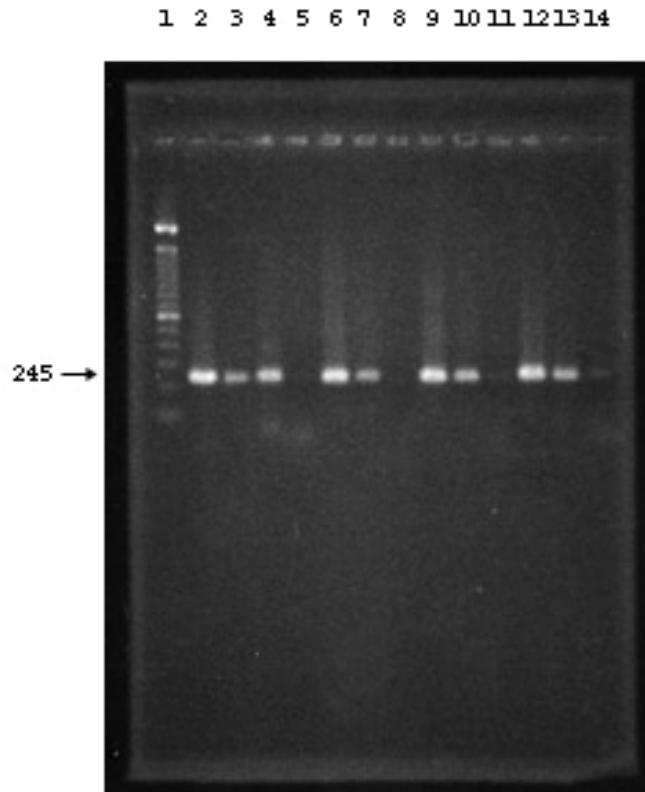


Figure N°22: Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% des produits de PCR après amplification par le couple d'amorces INS1/INS2: Souches de référence, témoins positifs et négatifs.

1: Marqueur de poids moléculaire (100pb ladder); 2: *M. tuberculosis* *H₃₇Rv* (*A₃*); 3: *M. bovis* (*C₁₁₇*); 4: *M. bovis* *Neotype* ATCC 19210 (*A₁*); 5: *Bacillus* sp.; 6: *M. bovis* (*C₃₄*); 7: *M. bovis* (*C₁₉₄*); 8: *Staphylococcus*; 9: *M. bovis* (*C₁₇₀*); 10: *M. bovis*(*C₆₆*); 11: *E. coli*; 12: *M. tuberculosis* (*C₉*); 13: *M. bovis*(*C₁₇₄*); 14: Témoin négatif sans ADN. 245: taille en paires de bases de la bande recherchée.

IV. Discussions

Grand fléau de l'histoire de l'humanité. La tuberculose fait à elle seule aujourd'hui, plus de victimes que le paludisme et le sida réunis (Poulet, 1994; Chantal, 2001a). Malheureusement, la lenteur de croissance des mycobactéries a longtemps entravé les études concernant cette maladie et son développement. L'identification des espèces responsables est indispensable pour savoir si les mycobactéries isolées sont pathogènes ou sans signification clinique. Le diagnostic de la tuberculose et autres mycobactérioses repose principalement sur l'isolement en culture et l'identification du germe responsable par l'étude de ses caractéristiques biochimiques et physiologiques (David *et al.*, 1989). Cette procédure utilisée en routine est simple, facile à mettre en œuvre et peu coûteuse mais demande un minimum de 4 semaines après obtention des premières colonies sur les milieux de culture (Chantal, 2001b).

L'avènement de la biologie moléculaire a donné place aux premières analyses génétiques des bacilles tuberculeux. Actuellement, plusieurs travaux rapportent l'utilisation de la PCR dans le diagnostic rapide de la tuberculose (Akcan *et al.*, 1997; Ichiyama *et al.*, 1997; Jou *et al.*, 1997; Lazraq *et al.*, 1990; Lebrun *et al.*, 1997; Toroli *et al.*, 1997) avec une sensibilité et une spécificité variables, entre 80 et 100%.

Dans notre travail, nous nous sommes intéressés à développer une technique de PCR simple pour la détection rapide des bacilles tuberculeux à partir de cultures de mycobactéries d'origine humaine et animale au Maroc. Et aussi à combiner les résultats des tests biochimiques à ceux de la PCR afin de pouvoir différencier les souches de *Mycobacterium tuberculosis* de ceux de *Mycobacterium bovis*.

La lyse des cellules mycobactériennes est difficile vu la complexité de la paroi des mycobactéries. Une simple et rapide procédure de lyse et d'extraction de l'ADN est essentielle si la PCR est utilisée comme test de diagnostic de routine (Sjöbring *et al.*, 1990). Après essai de plusieurs protocoles d'extraction, nous avons retenu celui de van Soolingen *et al.*, (1991b) avec modification du temps d'incubation pour l'étape des lysozymes (2 heures plutôt que 24 heures). Les bandes d'ADN obtenues après extraction sont claires et assez denses pour l'étape suivante, la PCR.

Les premiers essais concernant la standardisation de la PCR simple sur les souches de collection ont donné plusieurs bandes de tailles et intensités différentes mais tous les profils avaient la même bande de 245pb à une intensité importante, ce qui correspond parfaitement à notre cible attendue et confirme les résultats rapportés par plusieurs auteurs même s'ils ont utilisé des amorces différentes de celles qu'on a utilisé dans notre travail (Hermans *et al.*, 1990a).

Les modifications apportées au protocole de Ross & Dwyer (1993), soit au niveau de la température d'hybridation des amorces et la dilution de la concentration des amorces, ont donné des résultats plus fiables. En effet, le nombre de bandes de l'ADN amplifié semblait dépendre de la température d'hybridation et de la concentration de l'ADN à amplifier (De Wit *et al.*, 1990). Lors de nos premiers essais, le maximum de bandes était visible mais toujours avec une seule bande majeure: notre bande cible, soit le fragment d'ADN appartenant à la séquence d'insertion l'IS6110 et ayant la taille de 245pb (van Soolingen *et al.*, 1991b). De ce fait, pour toutes les manipulations ultérieures, nous avons travaillé avec la température moyenne à 54°C pour assurer un maximum de spécificité.

L'application de la technique de PCR après les modifications effectuées a permis de détecter la bande cible chez toutes les espèces testées du complexe *Mycobacterium tuberculosis* (*Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv "A₃", *Mycobacterium bovis* Neotype ATCC 19210 "A₁", *M. bovis* Tice "A₉", *M. bovis* "B₁ BM₁"). Aucun signal de présence de cette même bande n'a été détecté chez les mycobactéries non tuberculeuses (*Mycobacterium fortuitum* 3191 "A₆", *Mycobacterium avium* 1T ser1 "A₁₁", *Mycobacterium phlei* 3198 "A₂₀", *Mycobacterium avium* ser1 "B₉ BM₉"...). Ceci confirme parfaitement la spécificité de la séquence d'insertion l'IS6110 au complexe *Mycobacterium tuberculosis* (McAdam *et al.*, 1990; Sritharan *et al.*, 1994; Thierry *et al.*, 1990a).

La figure N°19 illustre les résultats de la deuxième amplification à l'aide du couple d'amorces T4/T5 sur les produits de la première PCR réalisée avec le premier couple d'amorces INS1/INS2. Les bandes ayant la taille de 123pb et caractérisant la détection des espèces du complexe *Mycobacterium tuberculosis* ont été présentes chez toutes les souches testées appartenant à ce complexe. Ce résultat confirme la spécificité de la première PCR et l'identité de toutes les souches analysées en tant qu'espèces appartenant au complexe *M. tuberculosis*.

Cette étape a été réalisée dans le seul but de vérifier l'identité du fragment amplifié et ne semblait pas être nécessaire comme procédure de routine du moment qu'aucune bande de la taille recherchée (245pb) n'a été détectée ni chez des souches de contrôle négatif (*Salmonella enteritidis*, *Bacillus sp.*, *Staphylococcus sp.*, *E. coli*), ni chez des mycobactéries non tuberculeuses (*Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium avium* ou encore *Mycobacterium phlei*) (Miller *et al.*, 1997; Hermans *et al.*, 1990b).

La détection des mycobactéries du complexe *Mycobacterium tuberculosis* (*Mycobacterium bovis* et *Mycobacterium tuberculosis*) à partir des cultures d'expectorations, préalablement identifiées par les tests biochimiques classiques, confirme encore la spécificité de la séquence IS6110 (Martin *et al.*, 1990). Initialement identifié comme étant d'origine Africaine et Sub-Saharienne (Castets *et al.*, 1968), aucun *Mycobacterium africanum* n'a été isolé dans le cadre de notre travail. Cependant, L'Kassmi et son équipe ont pu identifier cette espèce à partir de cultures d'expectorations dans une proportion de 9,81% (L'Kassmi *et al.*, 1998). Ce taux élevé de *M. africanum* peut être dû à la population d'échantillonnage du départ. L'Kassmi a travaillé sur une collection de mycobactéries prélevées sur des sujets militaires datant d'avant 1992. Ces sujets ont peut-être fait des séjours plus ou moins prolongés dans certains des pays de L'Afrique sub-saharienne et de ce fait, on pu contracter cette forme spéciale de tuberculose à *Mycobacterium africanum*. Depuis cette étude, aucune autre étude sur le territoire marocain n'a pu mettre en évidence l'implication de *Mycobacterium africanum* dans la tuberculose au Maroc.

Les souches de *Mycobacterium bovis* identifiées par les tests biochimiques sur cultures d'expectorations ont fait l'objet d'une détection rapide par PCR. La sensibilité de la PCR était de 100% puisque la totalité des *M. bovis* a été détectée (Van Embden *et al.*, 1993).

L'absence de la bande 245pb chez toutes les autres bactéries (*Salmonella*, *Bacillus*,...) et les mycobactéries non tuberculeuses (mycobactéries atypiques) testées confirme bien la spécificité de L'IS6110 comme outil de détection rapide des mycobactéries du complexe *Mycobacterium tuberculosis* (Thierry *et al.*, 1990a).

La combinaison des résultats des tests biochimiques et ceux de la PCR, nous a permis d'écarter la présence de *M. africanum*. Aussi, se basant sur les seuls tests de Niacine et de Nitrate, qui sont des tests biochimiques rapides utilisés en routine pour l'identification des mycobactéries en général, *M. tuberculosis* a pu être différencié de *M. bovis*.

La lenteur de croissance des mycobactéries constitue un véritable obstacle au diagnostic rapide des infections tuberculeuses. Après coloration de Ziehl et la mise en évidence des bacilles acido-alcoolo-résistants, la détermination de la vitesse de croissance et l'aspect des colonies, sont les deux premières étapes nécessaires à toute identification du genre et par la suite de l'espèce. Cependant, cette étape nécessite un minimum de deux semaines. Or, la PCR peut être effectuée immédiatement après la coloration de Ziehl-Neelsen et détermination de bacilles acido-alcoolo-résistants, permettant ainsi un gain de temps non négligeable. La PCR, telle qu'elle a été développée dans ce travail, a permis de détecter les mycobactéries du complexe *Mycobacterium tuberculosis*. En appliquant ensuite deux tests rapides et simples, soit la recherche de la Nitratase et la production de la Niacine (tests réalisés en l'intervalle de deux heures), *M. tuberculosis* peut être différencié de *M. bovis*. L'identification correcte et exacte des espèces impliquées dans les infections tuberculeuses est très importante du moment que le traitement envisagé est un facteur déterminant dans la guérison des sujets. En plus de la possibilité d'améliorer la qualité de prise en charge des malades, les services concernés économisent beaucoup de temps, d'énergie et de moyens techniques. De plus, l'isolement de *M. bovis* chez les humains doit immédiatement entraîner une enquête épidémiologique afin de définir les sources exactes de l'infection et de réagir rapidement.

V. Conclusion

Notre technique d'amplification, qui est simple et adaptée aux conditions de notre laboratoire, a permis d'amener un apport concret de reconnaissance des espèces majeures du complexe *Mycobacterium tuberculosis*/*Mycobacterium bovis*. Cette technique a permis d'identifier correctement le complexe ciblé. La combinaison de la PCR à certains tests simples de l'identification biochimique, soit le Nitrate et la Niacine, a pu différencier *M. tuberculosis* de *M. bovis*. et a permis un gain de temps considérable. Cette technique pourrait cependant être adoptée par les services concernés et incluse par la suite à plus grande échelle, à des programmes spécialisés de traitement et de lutte contre la tuberculose.

Une des perspectives de ce travail, serait de développer cette même technique directement sur les expectorations, sans passer par l'étape de la culture. Dans notre travail, nous avons essayé de développer ce volet et de détecter directement des espèces du complexe *Mycobacterium tuberculosis* à partir d'expectorations, malheureusement, nous avons rencontré des inhibiteurs de la réaction de PCR. Ce travail devrait donc être poursuivi dans ce sens.

Associée au développement de l'humanité depuis la préhistoire, la tuberculose continue à faire ses ravages parmi les populations les plus développées. Dans notre pays, malgré un programme de lutte élaboré par les services concernés, les dégâts restent encore très importants. Des efforts réels et intensifs doivent être déployés afin de contrôler au maximum son expansion.

Notre travail a voulu contribuer et supporter le peu de travaux qui ont été réalisés au Maroc sur ce sujet.

Dans un premier temps, on a essayé d'estimer la part de l'implication des souches de *Mycobacterium bovis* dans les infections tuberculeuses chez l'homme. Ceci par l'utilisation de milieux de culture usuels. Toutefois, une petite différence dans la composition des milieux (milieux sans glycérol) a fait une grande différence au niveau des résultats. Ainsi, parmi les 200 expectorations incluses à ce travail, 50% de cas positifs à la culture des germes responsables, étaient répartis entre 59,4% de *M. tuberculosis*, 17,8% de *M. bovis* et 22,7% de mycobactéries atypiques. Le taux élevé de *M. bovis* ainsi que celui des mycobactéries atypiques démontre un réel problème de tuberculose au Maroc. La détermination des sources d'infection et l'utilisation de milieux de culture appropriés pour l'isolement et l'identification des mycobactéries pathogènes sont deux facteurs déterminants pour cibler un plan sérieux de contrôle et de lutte contre cette maladie.

Dans un deuxième temps, on a voulu écourter le temps de détection de ces mycobactéries, et ce, en faisant appel à un outil de biologie moléculaire, la PCR qui est une technique très sensible permettant la détection de quantités infimes de bactéries dans les échantillons testés. En se basant sur la séquence d'insertion l'IS6110, spécifique aux mycobactéries du complexe *Mycobacterium tuberculosis*, on a pu développer une technique de PCR simple, rapide et surtout sensible. On a ainsi

pu confirmer avec précision tous les isolats de *Mycobacterium bovis* identifiés dans la première partie de ce travail par les tests biochimiques classiques. Elle nous a

aussi permis d'amener un apport concret de reconnaissance des espèces majeures du complexe *Mycobacterium tuberculosis/Mycobacterium bovis*, tout en économisant un minimum de deux semaines, temps nécessaire à déterminer la vitesse de croissance et l'aspect des colonies avant de démarrer la batterie des tests d'identification.

Si nous n'avons pu avancer jusqu'au stade espèce lors de l'identification par la PCR, l'application de deux tests rapides et simples, soit la recherche de la Nitratase et la production de la Niacine, aux produits de la PCR, nous ont permis d'atteindre notre but et différencier les souches de *Mycobacterium tuberculosis* de ceux de *Mycobacterium bovis*. De plus, les tests bactériologiques nous ont permis d'écarter la probabilité de présence de *Mycobacterium africanum* parmi nos isolats.

Au terme de ce travail, il ressort que:

- ❑ La bactérioscopie est très utile pour l'orientation du travail. Elle permet de mettre en évidence la présence des bacilles acido-alcool-résistants. Toutefois, elle ne permet pas de discriminer entre les différentes infections mycobactériennes mais reste tout de même un outil de base pour l'orientation du biologiste.
- ❑ La bactériologie constitue la méthode de choix pour le diagnostic expérimental de certitude de la tuberculose. Elle a permis l'identification d'espèces pathogènes communes à l'homme et l'animal.
- ❑ L'utilisation de milieux de culture appropriés est un facteur déterminant dans l'identification correcte des espèces impliquées.
- ❑ La PCR comme elle a été développée dans ce travail, offre un moyen rapide, sensible et sûr pour la confirmation de présence de mycobactéries pathogènes.

- ❑ L'interprétation des résultats de PCR doit toujours se faire en corrélation avec ceux de la bactériologie, qui restera pour toujours la technique de base.

En conclusion, pour mieux appréhender l'importance des infections dues à *M. tuberculosis*, *M. bovis* et aux mycobactéries atypiques chez l'homme, il conviendrait de mettre en place des collaborations rapprochées entre médecins traitants, services de lutte antituberculeuse (LAT) départementaux et services vétérinaires (Hale *et al.*, 2000), de manière à ce que:

- ❑ Lors d'un diagnostic de tuberculose chez l'animal, les services vétérinaires alertent les services de LAT pour entreprendre le dépistage des personnes en contact.
- ❑ Lors d'un diagnostic bactériologique de *M. bovis* isolé chez l'homme, le laboratoire informe les services locaux de LAT qui entreprendront l'investigation autour de ce cas et informeront les services vétérinaires en cas de contact animal avéré.

Références bibliographiques

- Abe C., Hirano K., Wada M., Kazumi Y., Takahashi O., Fukasawa Y., Yoshimura T., Miyagi C. and Goto S. (1993): Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by polymerase chain reaction and Gen-Probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test. *J. Clin. Microbiol.* 31: 3270-3274
- Abramson S. (1952): The failure of chick embryo extract to accelerate the growth of tubercle bacilli. *Am. Rev. Tuber.* 65: 783
- Acha P.N. and Szyfres B. (1987): Zoonotic Tuberculosis. In: Zoonoses and communicable diseases common to man and animals. 2nd edition. Washington: Pan American Health Organization/ World Health Organization. (Scientific Publication 503). 963p.
- Acha P.N. and Szyfres B. (1989): Zoonoses et maladies communes à l'homme et aux animaux, 2^{ème} éd. OIE
- Agy M.B., Wallis C.K., Plorde J.J., Carlson L.C. and Coyle M.B. (1989): Evaluation of four mycobacterial blood culture media: Bactec 13A, Isolator/Bactec 12B, Isolator/Middlebrook Agar, and a Biphasic Medium. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 12: 303-308
- Akcan Y., Tuncer S., Hayran M., Sungur A. and Unal S. (1997): PCR on disseminated tuberculosis in bone marrow and liver biopsy specimens: correlation to histopathological and clinical diagnosis. *Scand. J. Infect. Dis.* 29: 271-274
- Amaqdouf A. (1976): Contribution à l'étude de la tuberculose bovine au Maroc: importance et évolution. Thèse de Doctorat Vétérinaire. IAV Hassan II. Rabat. Maroc
- American Thoracic Society, (1997): Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 156 (suppl): S1
- Andriantsarafara J. (1972): Importance de la tuberculose animale à Madagascar. Thèse de Doctorat Vétérinaire. E.N.V. Toulouse, France
- Anonyme, (2001): Tuberculose au Maroc: Chaque année, 100 nouveaux cas pour 100.000 habitants. Libération. 12 janvier 2001. p: 5
- Anonyme, (2000): Enquête statistique annuelle 1998. Direction Générale de l'Alimentation, Ed. Ministère de l'Agriculture et de la Pêche. Paris, France
- Anonyme, (1999a): Euro TB and the National Coordinators for Tuberculosis Surveillance in the WHO European Region. Surveillance of tuberculosis in Europe: report of tuberculosis cases notified in 1997. St Maurice, France. Euro TB, 1999
- Anonyme, (1999b): Grupo de trabajo del PMIT. In: La tuberculosis en España: Resultados del proyecto Multicéntrico de investigación sobre tuberculosis (PMIT). Madrid 1999. Ed. Instituto de Salud Carlos III
- Anonyme, (1995): Vigilancia de la tuberculosis zoonotica por *Mycobacterium bovis*: sistema de enfermedades de declaracion obligatoria 1982-1995. Red. Nacional de Vigilancia Epidemiologica de Espana. Centro Nacional de Epidemiologia. Boletin Epidemiologico Semanal. 3: 183-184
- Anonyme, (1985): Laboratory Methods in Veterinary Mycobacteriology for the Isolation and Identification of Mycobacteria. US Department of Agriculture. Animal and Plant Health Inspection Service. Veterinary Services. National Veterinary Services Laboratories. Ames, Iowa
- Aranaz A., Liébana E., Gómez-Mampaso E., Galán J.C., Cousins D., Ortega A., Blázquez J., Baquero F., Mateos A., Suárez G. and Dominguez L. (1999): *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 1263-1273
- Aranaz A., Liébana E., Mateos A., Dominguez L. and Cousins D. (1998): Restriction Fragment Length Polymorphism and spacer oligonucleotide typing: a comparative analysis of fingerprinting strategies for *Mycobacterium bovis*. *Vet. Microbiol.* 61: 311-324

- Aranaz A., Liébana E., Mateos A., Dominguez L., Vidal D., Domingo M., Gonzalez O., Rodriguez-Ferri E.F., Bunschoten A.E., van Embden J.D.A. and Cousins D. (1996): Spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals: a tool for studying epidemiology of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 34: 2734-2740
- Auregan G. (1997): Les indicateurs épidémiologiques de la tuberculose : Etude Originale. *Cahier Santé.* 7: 97-102
- Auregan G., Rabarijoana L., Rabemanajara O., Ramaroson F., Razafindrazaka N. and Boisier P. (1995): Prise en charge des tuberculeux à l'hôpital militaire d'Antananarivo de 1989 à 1993. *Arch. Inst. Pasteur Madagascar.* 62: 26-30
- Barksdale L. and Kim K.S. (1977): *Mycobacterium*. *Bacteriol. Rev.* 41:217
- Barrera L. and de Kantor I.N. (1987): Nontuberculous mycobacteria and *Mycobacterium bovis* as a cause of human disease in Argentina. *Tropical and Geographical Medicine.* 39: 222-227
- Bartley G.E. and Scolnik P.A. (1989): Carotenoid biosynthesis in photosynthetic bacteria. *J. Biol. Chem.* 264: 13109-13113
- Barwinek F. and Taylor N.M. (1996): Assessment of the socio-economic importance of bovine tuberculosis in Turkey and possible strategies for control or eradication. Division 424, Forest Resources Management, Livestock Farming, Fisheries, Nature Conservation, GTZ, Germany
- Basset J. (1953): Notions préliminaires. Chapitre premier dans: *Immunologie et prophylaxie de la tuberculose.* P: 1-3. Vigot frères. Paris, France
- Bauer J., Andersen A.B., Kremer K. and Miorner H. (1999): Usefulness of spoligotyping to discriminate IS6110 low-copy-number *Mycobacterium tuberculosis* complex strains cultured in Denmark. *J. Clin. Microbiol.* 37: 2602-2606
- Behr M.A., Wilson M.A., Gill W.P. *et al.*, (1999): Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science* 284: 1520-3
- Bellamy R., Ruwende C., Corrah T., McAdam K.P.W.J., Whittle H.C. and Hill A.V.S. (1998): Variations in the NRAMP1 gene and susceptibility to tuberculosis in West Africans. *New Engl. J. Med.* 338: 640-644
- Benchekroun T.S., Kili A., Taybi F., Jorio Benkhraba M., El Malki Tazi A. and Benhammou M. (2001): Tuberculose abdominale chez l'enfant : à propos de 12 cas. *Rev. Mar. Biol. Infectiol.* 1: 47-57
- Bénet J.J. (2001): Pour en finir avec la tuberculose. *Bull. des Groupements Techniques Vétérinaires.* Sous press. Cité par: N. Haddad and B. Durand. (2001): Intérêt et limites des différentes techniques de caractérisation des isolats. Exemple de la tuberculose. *Epidémiol. et Santé Anim.* 39: 43-57
- Benkirane A. (1997): Etat actuel de la tuberculose bovine en Afrique et au Moyen Orient. In: *Proceedings of the Second International Conference on Animal Tuberculosis in Africa and the Middle-East*, pp. 11-18, Rabat, Morocco, October 4-6, 1995. Edited by: J. Berrada. M. Bouslikhane and N. Bouchriti. Actes Editions. Morocco
- Bennis M. (1968): Contribution à l'étude de la tuberculose bovine au Maroc. Thèse de Doctorat Vétérinaire. Toulouse, France
- Bifani P.J., Plikaytis B.B., Kapur V. *et al.* (1996): Origin and Interstate spread of a New York City multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clone family. *JAMA.* 275: 452-457
- Billo N.E. (1996): Tendances épidémiologiques de la tuberculose. *Rev. Prat.* 46: 1332-1335
- Bloch A.B., Cauthen G.M., Onorao I.M., Dansburg K.G., Kelly G.D., Driver C.R. and Snider D.E. (1994): Nationwide survey of drug-resistant tuberculosis in the United States. *JAMA.* 271: 665-671
- Blood D.C., Henderson J.A. and Radostitis O.M. (1981): Diseases caused by bacteria. IV in: *Veterinary medicine. A text book of the disease of cattle, sheep, pigs and horses*, Fifth ed. Baillière. Tindall, London

- Bloom B.R. and Murray C. J. L. (1992): Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. *Science*. 257: 1055-1064
- Böddinghaus B., Rogall T., Flohr T., Blöcker H. and Böttger E.C. (1990): Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. *J. Clin. Microbiol.* 28: 1751-1759
- Bonicke R. (1958): Die Differenzierung humaner und boviner Tuberkel bakterien mit Hilfe von Thiophen-2-Carbonsäurehydrazid. *Naturwissenschaften*. 45:392-393
- Bouazza A. (1974): Les tuberculoses péritonéales et iléocoécales chez l'enfant en milieu marocain. Th. Doc. Méd. Rabat, Maroc
- Boualahbal F., Robert J., Trystran D., De Benoist A.C., Vincent V., Jarlier V., Grosset J. *et al.*, (1998): La tuberculose humaine à *Mycobacterium bovis* en France durant l'année 1995. *Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire*. 48: 207-208
- Brett J.L. and Humble M.W. (1991): Incidence of human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*. *N. Z. Med. J.* 104: 13-14
- Brette R.P. (1997): *Mycobacterium avium intracellulare* infection in patients with HIV or AIDS. *J. Antimicrob. Chemother.* 40: 156-160
- Brisson-Nôel A., Aznar C., Chureau C., Nguyen S., Pierre C., Bartoli M., Bonete R., Pialoux G., Gicquel B. and Garrigue G. (1991): Diagnosis of tuberculosis by DNA amplification in clinical practice evaluation *Lancet*. 338: 364-366
- Brisson-Nôel A., Gicquel B., Lecossier D., Lévy-Frébault V., Nassif X. and Hance A.J. (1989): Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples. *Lancet*. 2: 1069-1071
- Buhler V.B. and Pollak A. (1955): The cultural characteristics and animal pathogenicity of an atypical acid fast organism which causes human diseases. *Amer. Rev. Tub.* 71: 74-87
- Bulletin Suisse (1994): La tuberculose en Suisse en 1994. Bern, Switzerland: Bulletin 37, office fédéral de la santé publique. 10-11
- Burguiere A.M. and Poveda J.D. (1994): Techniques rapides d'isolement et d'identification des mycobactéries. *La tuberculose et l'infection aux mycobactéries*. Editions Institut Pasteur. Paris
- Burman W.J. and Reves R.R. (2000): Review of false-positive cultures for *Mycobacterium tuberculosis* and recommendations for avoiding unnecessary treatment. *Clin. Infect. Dis.* 31: 1390-1395
- Bush M., Montali R.J., Phillips L.G, Nicholas D.K. and Holobaugh P.A. (1986): Tuberculosis in bacterian camels. *Proceedings of the Annual Meeting, American Association of Zoo Veterinarians*, 22-23
- Castets M., Boisvert H., Grumbach F., Brunel H. and Rist N. (1968): Les bacilles tuberculeux de type africain. *Rev. Tub. Pneum.* 32: 179-184
- CDC, (1999): Center for Disease Control and Prevention: progress towards the elimination of tuberculosis. United States, 1998. *MMWR*. 48: 732-736
- CDC, (1998): Center For Disease Control and Prevention: primary multidrug-resistant tuberculosis. Ivano Oblast, Russia. *MMWR*.40: 661-663
- CDC, (1983): Center for Disease Control and Prevention: Primary resistance to anti tuberculosis drugs. United States. *MMWR* 32: 521-523
- Cellier C. and Gros P. (1997): The NRAMP1 gene: resistance to intracellular infections and antimicrobial activity of phagocytes. *Médecine/Sciences*.13: 501-508
- Chamberlain J., Gibbs R.A., Rainer J.E., Nguyen P.N., and Caskey C.T. (1988): Deletion screening of the Duchenne muscle dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nuc. Ac. Res.* 16: 141-156

- Chandler M. and Fayet O. (1993): Translational frameshifting in the control of transposition in bacteria. *J. Mol. Microbiol.* 7 : 497-503
- Chantal J. (2001a): A propos de la tuberculose. *Environnement et Santé Publique Vétérinaire*. Numéro spécial: Tuberculose. Bulletin de liaison de l'association Francophone pour l'étude des relations Environnement-Santé Publique Vétérinaire. 16p.
- Chantal J. (2001b): Le laboratoire dans le diagnostic et la surveillance épidémiologique de la tuberculose. *Environnement et Santé Publique Vétérinaire*. Numéro spécial : Tuberculose. Bulletin de liaison de l'association Francophone pour l'étude des relations Environnement-Santé Publique Vétérinaire. 16p.
- Clarridge J.E., Shwarz B.M., Shinnick T.M. and Plikaytis B.B. (1993): Large-scale use of polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in a routine mycobacteriology laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 31: 2049-2056
- Cole S.T., Brosch R., Parkhill J., Garnier T., Chucher C., Harris D., Gordon S.V., Eigler K., Gas S., Barry C.E., Tekai F., Bedcock K., Brachoum D., Brown D., Chillingworth T., Connor R., Davies R., Devlin K., Feltwell T., Gentles S., Hamlin N., Holroyd S., Hronsby T., Togels K., Krogh A., McLean J., Moule S., Murphy L., Oliver K., Osborne J., Quail M.A., Rajandream M.A., Rogers J., Rutter S., Seeger K., Skelton J., Squares R., Squares S., Sulston J.E., Taylor K., Whitehead S. and Barrell B.G. (1998): Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 393: 537-544
- Collins C., Kelly P., Bryne C., Denham F. and Clancy L. (1987): Is bovine, atypical or resistant tuberculosis a problem? *Ir. Med. J.* 80: 66-67
- Collins C.H. and Grange J.M. (1983): The bovine tubercle bacilli: a review. *J. App. Bacteriol.* 55:13-29
- Collins C.H. and Grange J.M. (1987): Zoonotic implications of *Mycobacterium bovis* infection. *Ir. Vet. J.* 41: 363-366
- Collins C.H., Lyne P.M. and Grange J.M. (1989): *Mycobacterium*. In: *Microbiological Methods*. Butterworth & Co (publishers) Ltd. 1989. Sixth edition
- Collins D.M. and Stephens D.M. (1991): Identification of insertion sequence, IS1081, in *Mycobacterium bovis*. *FEMS Lett.* 83: 11-16
- Collins D.M., Erasmuson S.K., Stephens D.M., Yates G.F. and de Lisle G.W. (1993): DNA fingerprinting of *Mycobacterium* strains by restriction fragment analysis and hybridization with insertion elements IS1081 and IS6110. *J. Clin. Microbiol.* 31: 1143-1147
- Collins F.M. (1990): *In vivo* vs. *In vitro* killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Res. Microbiol.* 141: 212-217
- Cormican M.G. and Flunn J. (1992): Tuberculosis in the West of Ireland 1986-1990. *Ir. J. Med. Sci.* 161: 70-72
- Cosivi O., Grange J.M., Daborne C.J., Raviglione M.C., Fujikura T., Cousins D., Robinson R.A., Huchzermeyer H.F.A.K., de Kantor I. and Meslin F.X. (1998): Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerg. Inf. Dis.* 4: 59-70
- Cosivi O., Meslin F.X., Daborne C.J. and Grange J.M. (1995): Epidemiology of *Mycobacterium bovis* in animals and humans, with particular reference to Africa. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 14: 733-746
- Cousins D. (2001): *Mycobacterium bovis* infection and control in domestic livestock. In: *Mycobacterial infections in domestic and wild animals*. E.J.B. Manning and M.T. Collins (eds.). *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 20: 71-85
- Cousins D.V. and Williams S.N. (1995): A study of *Mycobacterium* infection in Australian patients 1970-1994. In: F. Giffit and G. de Lisle (eds.). *Tuberculosis in wildlife and domestic animals*. Otago, New Zealand: University of Otago. Press; p:260-263

- Cousins D.V., Williams S.N. and Dawson D.J. (1999): Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in the Australian population: DNA typing of isolates, 1970-1994. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 3: 722-731
- Cousins D.V., Williams S.N., Ross B.C. and Ellis T.M. (1993): Use of a repetitive element isolated from *Mycobacterium tuberculosis* in hybridization studies with *Mycobacterium bovis*: a new tool for epidemiological studies of bovine tuberculosis. *Vet. Microbiol.* 37: 1-17
- Cowan P.E. (1990): Brushtail possum. In: *The handbook of New Zealand Mammals*. Auckland. Oxford University Press; 68-98
- Crowle A.J. (1990): Intracellular killing of mycobacteria. *Res. Microbiol.* 141: 231-236
- Daborne C.J. and Grange J.M. (1993): HIV/AIDS and its implication for the control of animal tuberculosis. *Brit. Vet. J.* 149: 405-413
- Daborne C.J., Grange J.M. and Kazwala R.R. (1997): The bovine tuberculosis. *Cycle Africa Perspective J. App. Bacteriol.* [Symposium supplement]; 81: 27S-32S
- Damsker B. and Bottone E.J. (1985): *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* from the intestinal tracts of patients with acquired immunodeficiency syndrome: concepts regarding acquisition and pathogenesis. *J. Infct. Dis.* 151: 179-181
- Damsker B., Bottone E.J. and Schneierson S.S. (1974): Human infections with *Mycobacterium bovis*. *Am. Rev. Resp. Dis.* 110: 446-449
- Dankner W.M., Weaker N.J., Essey M.A., Moser K., Thompson M. and Davis C.H. (1993): *Mycobacterium bovis* infection in San Diego: a clinico-epidemiologic study of 73 patients and a historical review of a forgotten pathogen medicine (Baltimore). 72: 11-37
- Dannenber A.M. (1968): Cellular hypersensitivity and cellular immunity in the pathogenesis of tuberculosis: specificity, systemic and local nature, and associated macrophage enzymes. *Bacteriol. Rev.* 32: 85-102
- Dannenber A.M. (1989): Immune mechanism in the pathogenesis of pulmonary tuberculosis. *Rev. Infect. Dis.* 52: 369
- David H.L., Lévy-Frébault V. and Thorel M.F. (1989): Méthodes de laboratoire pour mycobactériologie clinique. *Unité de la Tuberculose et des Mycobactéries*, Ed. Commission des laboratoires de Référence et d'Expertise de l'institut Pasteur, Paris. pp: 1-88
- De Lassence A., Lecossier D., Pierre C., Cadranel J., Stern M. and Hance A.J. (1992): Detection of mycobacterial DNA in pleural fluid from patients with tuberculosis pleurisy by means of the polymerase chain reaction: comparison of two protocols. *Thorax.* 47: 265-269
- De Wit D., Steyn L., Shoemaker S. and Sogin M. (1990): Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by DNA amplification. *J. Clin. Microbiol.* 28: 2437-2441
- Dehbi M. (2000): Contribution à l'élaboration d'un lexique d'épidémiologie vétérinaire (Français-Anglais-Arabe). Thèse de Doctorat Vétérinaire. IAV Hasan II. Rabat. Maroc
- Del Portillo P., Murillo L.A. and Patarroyo M.A. (1991): Amplification of a species-specific DNA fragment of *Mycobacterium tuberculosis* and its possible use in diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 29: 2163-2168
- Devallois A., Horgen L., Sola C. and Rastogi N. (1998): Le typage moléculaire des Mycobactéries. *Path. Biol.* 46: 625-636
- Dolin P.J., Raviglione M.C., and Kochi A. (1994): Global Tuberculosis incidence and mortality during 1990-2000. *Bull. World Health Org.* 72: 213-220
- Dreesen D.W. and Wood A.R. (1979): A human case of *Mycobacterium bovis* infection in Georgia. *Amer. Rev. Resp. Dis.* 101: 289-292
- Dungworth D.L. (1985): The respiratory system. Pp: 413-582. In: K.V.F Jubb, P.C. Kennedy and N. Palmer, eds. *Pathology of domestic animals*, 3rd ed., Vol.2. Academic press, H.B. Jovanovich, New York, U.S.A

- Dupon M. and Ragnaud J.M. (1992): Tuberculosis in patients infected with human immunodeficiency virus. 1. A retrospective multicentre study of 123 cases in France. *Quarterly Journal of Medicine [New Series 85]*. 306: 719-730
- Dur P.A., Hewinson R.G. and Clifton-Hadley R.S. (2000): Molecular epidemiology of bovine tuberculosis. I: *Mycobacterium bovis* genotyping. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 19: 675-688
- Dye C., Scheele S., Dolin P. *et al.*, (1999): Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. *JAMA*. 282: 677-86
- Eisenach K.D., Cave M.D., Bates J.H. and Crawford J.T. (1990): Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Inf. Dis.* 161: 977-981
- Eisenach K.D., Crawford J.T. and Bates J.H. (1988): Repetitive DNA sequences as probes for *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 26: 2240-2245
- Eisenach K.D., Sifford M.D., Cave M.D., Bates J.H. and Crawford J.T. (1991): Detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in sputum samples using a polymerase chain reaction. *Am. Rev. Respir. Dis.* 144: 1160-1163
- El Abrak A., Lhor Y. and Zrira A. (2001): Tuberculose bovine au Maroc: Situation épidémiologique et perspectives de lutte. *Bull. Epidémiol. Vét.* 7: 1-2
- El Baghdadi J. (1999): Epidémiologie et immuno-génétique de la tuberculose au Maroc. Thèse de Doctorat d'Université. Univ. Sidi Med Ben Abdellah, Fac. des Sciences Dhar Mehrez. Fès. Maroc
- El Baghdadi J., Lazraq R., Ibrahimy S., Bouayad Z., Guinet R. and Benslimane A. (1997a): Survey of primary drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Casablanca, Morocco. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 1: 309-313
- El Baghdadi J., Lazraq R., Benani A., Naciri N., Ibrahimy S. and Benslimane A. (1997b): Détection par PCR de *Mycobacterium tuberculosis* sans IS6110. *Bull. Soc. Path. Ex.* 90: 303-306
- El Sabban M.S., Lotfi O., Awad W.M., Soufi H.S., Mikhail D.G., Hamman H.M. *et al.* (1992): Bovine tuberculosis and its spread as a source of infection to man and animals in Arab Republic of Egypt. In: *Proceedings of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. Conference on Animal Tuberculosis in Africa and Middle East, Avril 28-30; Cairo, Egypt. Paris: The Union.* 198-211
- Engelk D.R., Hoener P.A. and Collins F.S. (1988): Direct sequencing of enzymatically amplified human genomic DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 544-548
- Erlich H.A., Gelfand D. and Sninsky J.J. (1991): Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science.* 252: 1643-1650
- Fassi-Fehri M. and Hejny J. (1972): Tuberculose à *Mycobacterium bovis* à Casablanca. *J. Med. Maroc.* 8: 321-325
- FAO, (1994): In: W.R. Welte. Ed. *FAO/OIE/WHO Animal Health Yearbook 1993.* Washington: The Organization; 1994: *FAO Animal Production and Health Series N°33*
- Fikri A. (1997): Situation de la tuberculose bovine au Maroc. In: *Proceedings of the Second International Conference on Animal tuberculosis in Africa and the Middle-East, pp. 11-18, Rabat, Morocco, October 4-6, 1995.* Edited by. J. Berrada. M. Bouslikhane and N. Bouchriti. Actes Editions. Morocco
- Fitzpatrick L.K. (1999): Investigation of laboratory cross-contamination of *Mycobacterium tuberculosis* cultures in a hospital laboratory [abstract]. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 159: A4-94
- Folgueira L. Delgado R., Palenque E. and Noriega A.R. (1993): Detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in clinical samples by using a simple lysis method and polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 31: 1019-1021
- Forbes B.A. and Hicks K.E.S. (1993): Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens in a clinical laboratory by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 31: 1688-1694
- Fowler M.E. (1986): *Zoo and wild animal medicine.* Philadelphia: W.B. Saunders Company. 1-1127

- Francis J. (1947): Bovine tuberculosis. Staples Press Ltd., London
- Francis J. (1950): Control of infection with the bovine tubercle bacillus. *Lancet*. 258: 34-39
- Freiden T.R., Sterling T., Pablos-Mendéz A., Kilburn J.O., Cauthen G.M. and Dooley S.W. (1993): The emergence of drug-resistance tuberculosis in New York city. *N. Engl. J. Med.* 328: 521-526
- Gervois G., Veillant J.M., Fontaine J.F., Laroche G. and Dubois G. (1972): Epidémiologie de l'infection humaine par *Mycobacterium bovis*. *Archivio Monaldi per La Tisiologia e le Malattie del Apparato Respiratorio*. 27: 294-317
- Giuliani P. (1978): Contribution à l'étude de la tuberculose zoonose à *Mycobacterium bovis*. Enquêtes épidémiologiques de 7 cas dans le département de l'Isère. Thèse de Doct. Vét. Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, France
- González R. and Hanna B.A. (1987): Evaluation of Gen-Probe DNA hybridization system for identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium intracellulare*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 8: 69-77
- Goodfellow M. and Minnikin D.E. (1984): Circumscription of the genus. p: 1-24 In: G.P. Kubica and L.G. Wayne, eds. *The Mycobacteria: a sourcebook, part A*. Dekker, New York
- Goto M., Oka S.O., Okuzumi K., Kimura S. and Shimada K. (1991): Evaluation of acridinium ester labelled DNA probes for identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* complex in culture. *J. Clin. Microbiol.* 29: 2473-2476
- Goyal M., Saunders N.A., van Embden J.D.A, Young D.B. and Shaw J.R. (1997): Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by spoligotyping and IS6110 restriction fragment length polymorphism. *J. Clin. Microbiol.* 35: 647-651
- Graham A. and Colditz M.D. (1995): The efficacy of bacillus Calmette Guerin vaccination of new borns and infants in the prevention of tuberculosis: meta-analysis of the published literature. *Pediatrics*. 96: 29-35
- Grange J.M. (1996): The biology of the genus *Mycobacterium*. *J. appl. Bacteriol.* 81: 1S-9S
- Grange J.M. (1995): Human aspects of *Mycobacterium bovis* infection. In: *Mycobacterium bovis* infection in Animals and Humans. Iowa State University Press/Ames
- Grange J.M. (1980): Mycobacterial diseases. In I. Phillips, ed. *Currents topics in infection: N°1*. Edward Arnold Publishers. Ltd., U.K.
- Grange J.M. and Yates M.D. (1989): Incidence and nature of human tuberculosis due to *Mycobacterium africanum* in South-East England: 1977-87. *Epidemiol. Infect.* 103: 127-132
- Grange J.M. and Yates M.D. (1994): Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. *Vet. Microbiol.* 40: 137-151
- Grange J.M., Daborn C. and Cosivi O. (1994): HIV-related tuberculosis due to *Mycobacterium bovis*. *Eur. Respir. J.* 7: 1564-1566
- Grange J.M., Yates M.D. and de Kantor I. (1996): Guidelines for speciation within the *Mycobacterium tuberculosis* complex . 2nd ed. Geneva: World Health Organization; 1996. Unpub. Document WHO/EMC/ZOO/96.4
- Groenen P.M.A., van Bunschoten A.E., van Soolingen D. and van Embden J.D.A. (1993): Nature of DNA polymorphism in the Direct Repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*. Application for strain differentiation by a novel method. *Mol. Microbiol.* 10: 1057-1065
- Grosset J. (1993): Fréquence et gravité actuelle de la résistance de *Mycobacterium tuberculosis* aux antibiotiques. *Ann. Inst. Pasteur. (Actualités)*. 4: 194-202
- Grosset J. and Sors C.H. (1984): Les mycobactéries. *Presse Médicale*. 13: 215-218
- Grosset J. and Truffot-Pérot C.H. (1988): Etat actuel de la résistance de *Mycobacterium tuberculosis* aux antibiotiques. *Lettre de l'infectiologie*. Tome III: 369-377

- Grosset J. and Truffot-Pérnot C.H. (1984): Mise en évidence des mycobactéries. In: M. Veron. (ed.): Annales de contrôle de qualité en bactériologie. Laboratoire National de la Santé. Paris.
- Grosset J., Boisvert H. and Truffot-Pérnot C. (1990): Mycobactéries. In: L. Le Minor and M. Veron. Bactériologie Médicale. Paris. Flammarion. 965-1017
- Grosset J., Boisvert H., Lagrange L., and Baranton G. (1982): Mycobactéries. In: L. Le Minor and M. Veron (eds.): Bactériologie Médicale. 657p. Paris. Flammarion
- Grzybowski S., Barnett G. and Styblo K. (1975): Sujets en contact avec des cas de tuberculose pulmonaire active. Bull. Union Int. Tub. Mal. Resp. 50: 87-104
- Guide de la Lutte Anti-Tuberculeuse (1996): Ministère de la Santé publique. Royaume du Maroc. 5-30
- Gutiérrez C. and Juste J. (1996): Bacteriologia del agente de la tuberculosis caprina. Ovis. Ed. special: Tuberculosis Caprina. 46: 11-21
- Gutiérrez M., Samper S., Gavigan J.A., Garcia-Marin J.F. and Martin C. (1995): Differentiation by molecular typing of *Mycobacterium bovis* strains causing tuberculosis in cattle and goats. J. Clin. Microbiol. 33: 2953-2956
- Haagsma J. (1993): Bacteriology of mycobacteria, in particular the *Mycobacterium tuberculosis/ Mycobacterium bovis* complex. En Microbacteriosis de los animales domesticos: Tuberculosis, Paratuberculosis, Curso de post-grado de la facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza
- Haddad N. and Durand B. (2001): Intérêt et limites des différentes techniques de caractérisation des isolats. Exemple de la tuberculose. Epidemiol. et Santé Anim. 39: 43-59
- Hale Y.M., Desmond E.P., Jost K.C. Jr. and Salfinger M. (2000): Access to newer laboratory procedures: a call for action. Inter. J. Tuberc. Lung Dis. 4(Suppl. 2): S171-175
- Hale Y.M., Pfyffer G.E. and Salfinger M. (2001): Laboratory diagnosis of Mycobacterial infections: New tools and lessons learned. Clin. Infect. Dis. 33: 834-846
- Hance A.J., Grandchamp B., Lévy-Frébault V., Lecossier D., Rauzier J., Bocart D. and Gicquel B. (1989): Detection and identification of mycobacteria by amplification of mycobacterial DNA. Mol. Microbiol. 3: 843-849
- Hansen G.A. (1874): Undersogelser angaaende spedalskhedens arsager. Norsk Magazin for laegevitenskapen. 4: 1-88
- Hardie R.M. and Watson J.M. (1992): *Mycobacterium bovis* in England and Wales: past, present and future. Epidemiol. Infect. 109: 23-33
- Hedval E. (1942): Bovine tuberculosis in man. A clinical study of bovine tuberculosis, especially pulmonary tuberculosis in the southernmost part of Sweden. Acta. Med. Scand. 135 (suppl.): 1-196
- Hermans P.W.M., van Soolingen D., Dale J.W., Schuitema A.R.J., McAdam R.A., Catty D. and van Embden J.D.A. (1990a): Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. J. Clin. Microbiol. 28: 2051-2058
- Hermans P.W.M. Schuitema A.R.J., van Soolingen D., Berstynen C.P.H.J., Bik E.M., Thole J.E.R., Kolk A.H.J. and van Embden J.D.A. (1990b): Specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 28: 1204-1213
- Hermans P.W.M., van Soolingen D. and van Embden J.D.A. (1992): Characterization of a Major Polymorphic Tandem Repeat in *Mycobacterium tuberculosis* and its potential use in the epidemiology of *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium goodii*. J. Bacteriol. 174: 4157-4165
- Hermans P.W.M., van Soolingen D., Bik E.M., de Haas P.E.W., Dale J.W. and van Embden J.D.A. (1991): The insertion sequence IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. Infect. Immun. 59: 2695-2705

- Hermon-Taylor J. (1990): Molecular Biology of Crohn's disease mycobacteria. *Bailliere's Clinical Gastroenterology*. 4: 23-42
- Herrera D., Cano R., Godoy P., Peiro E.F., Castell J., Ibanez C. *et al.*, (1996): Multidrug resistant tuberculosis outbreak on HIV ward-Madrid. Spain, 1991-1995. *MMWR Morb. Mortal. WKLY. Rep.* 45: 331-332
- Herrera E. and Segovia M. (1996): Evaluation of mtp40 genomic fragment amplification for specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 34: 1108-1113
- Hersi L., Elwood K., Cowie R., Kunimoto D. and Long R. (1999): Tuberculose multirésistante en Alberta et en Colombie-Britannique de 1989 à 1998. *Can. Respir. J.* 6: 150-155
- Hopewell P.C. and Chaisson R.E. (2000): Tuberculosis and Immunodeficiency Virus Infection. In: L.B. Reichman and E.S. Hershfield, eds. *Tuberculosis: a comprehensive international approach*. New York: Marcel Dekker
- Howard S.T., Oughton M.T., Haddad A. and Johnson W.M. (1998): Absence du marqueur génétique IS6110 dans une souche de *Mycobacterium tuberculosis* isolée en Ontario. *Can J Infect Dis.* 9: 48-53
- Howard W.L., Maresh F., Muller E.E., Yanitelli S.A. and Woodruff G.F. (1949): The role of pulmonary cavitation in the development of bacterial resistance to streptomycin. *Am. Rev. Tuberc.* 59: 391
- Hubert B., Desenclos J.C. and Schwoebel V. (1995): Epidémiologie actuelle de la tuberculose. *Méd. Ther.* 1: 7-16
- Hughes M.S., Neill S.D. and Rogers M.S. (1996): Vaccination of the badger (*Meles meles*) against *Mycobacterium bovis*. *Vet. Microbiol.* 51: 363-379
- Hurtel B. (1994): La tuberculose: maladie tropicale oubliée. *Point Vét.* 159: 1-3
- Hutchings M.R. and Harris S. (1999): Quantifying the risk on tuberculosis infection to cattle posed by badger excreta. *Epidemiol. Infect.* 122: 167-174
- Ichiyama S., Iinuma Y., Yamori S., Hasegawa Y., Shimokata K. and Nakashima N. (1997): *Mycobacterium* growth indicator tube testing in conjunction with the AccuProbe or the AMPLICOR-PCR assay for detecting and identifying mycobacteria from sputum samples. *J. Clin. Microbiol.* 35: 2022-2025
- Idigbe E.O., Anyiwo C.E. and Onwujekwe D.I. (1986): Human pulmonary infections with bovine and atypical mycobacteria in Lagos. Nigeria. *J. Trop. Med. Hyg.* 89: 143-148
- Ishiguro N. and Sato G. (1988): Nucleotide sequence of insertion sequence IS3411 which flanks the citrate utilization determinant of transposon Tn3411. *J. Bacteriol.* 170: 1902-1906
- Jou N.T., Yoshimori R.B., Mason G. R., Louie J.S. and Liebling M.R. (1997): Single tube, nested, reverse transcriptase PCR for detection of viable *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 35: 1161-1165
- Joubert L. (1975): Tuberculoses et mycobactérioses atypiques. La pollution mycobactérienne et la tuberculose zoonose. *Information technique des services vétérinaires*. France, p: 25-38
- Joubert L. and Oudar J. (1966): Inter-transmissibilité et prophylaxie des tuberculoses humaines et animales. Le problème actuel des mycobactérioses atypiques. *Gazette médicale de France*. 1: 3603-3605
- Joubert L. and Prave M. (1975): Diagnostic différentiel bactériologique des mycobactéries au laboratoire. *Information technique des services vétérinaires*. France, p: 47-53
- Kamerbeek J., Schouls L., Kolk A., van Agterveld M., van Soolingen D., Kuijper S., Bunschoten A., Molhuizen H., Shaw R., Goyal M. and van Embden J. (1997): Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* 35: 907-914
- Kanai K. (1990): Introduction to Tuberculosis and Mycobacteria. SEAMIC/IMFJ, Tokyo, Japan. 221p.
- Kaneko S., Feinstone S.M., Schell J. and Gronenborn B. (1989): Rapid and sensitive method detection of serum hepatitis B virus DNA using the polymerase chain reaction technique. *J. Clin. Microbiol.* 27: 1930-1933

- Kapanoff D.E., Kilburn J.O., Glassroth J.L., Snider D.E., Farer L.S. and Good R.A. (1978): Continuing survey of tuberculosis primary drug resistance in the US. March 1975 to November 1977. A US Public Health Service Cooperative Study. *Am. Rev. Resp. Dis.* 118: 835-842
- Kapur V., Li L., Hamrich M.R., Plikaytis B.B., Shinnik T.M., Telenti A., Jacobs W.R., Banerjee A., Cole S., Yuen K.Y., Clarridge J.E., Kreiswirth B.N. and Musser J.M. (1995): Rapid *Mycobacterium* species assignment and unambiguous identification of mutations associated with antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by automated DNA sequencing. *Arch. Path. Lab. Med.* 119: 131-138
- Karlson A.G. and Carr D.T. (1970): Tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* - Report of six cases: 1954-1968. *Ann. Intern. Med.* 73: 979-983
- Karlson A.G. and Lessel E.F. (1970): *Mycobacterium bovis* nom. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 20: 273-282
- Kiehn T.E., Edwards F.F., Brannon P., Tsang A.Y *et al.*, (1985): Infections caused by *Mycobacterium avium* complex in immunocompromised patients: diagnosis by blood culture and fecal examination, antimicrobial susceptibility tests and morphological and seroagglutination characteristic. *J. Clin. Microbiol.* 121: 168-173
- Kimble E.J. (2001): Investigation of Iron Superoxide dismutase DNA from *Mycobacterium bovis* BCG as a vaccine against mycobacterial infections in mice. Thesis (Ph.D). University of Colorado. Health Sciences Center. 150p.
- Kirschner P., Rosenau J., Springer B., Teschner K., Feldmann K. and Böttger E.C. (1996): Diagnosis of mycobacterial infections by nucleic acid amplification: 18-month prospective study. *J. Clin. Microbiol.* 34: 304-312
- Kirschner P., Springer P., Vogel U., Meier A., Wrede A., Kiekenbeck M., Bange F.C. and Böttger E.C. (1993): Genotypic identification of mycobacteria by nucleic acid sequence determination: report of a 2-year experience in clinical laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 31: 2882-2889
- Koch R. (1882): Die Aetiologie der Tuberculose. *Berliner Klinische Wochenschrift: Organ für praktische Aertze.* 15: 221-230
- Konhya L.D., Himes E.M. and Thoen C.O. (1980): Bovine tuberculosis. Pages: 147-150. In: J.H. Steele, ed. Handbook series in zoonoses; section A: Bacterial, Rickettsial, and Mycotic Diseases, Vol. II. CRC Press, Boca Raton, Florida
- Kouadir M. (2001): Epidémiologie et importance économique de la tuberculose bovine aux abattoirs du Maroc. Thèse de Doct. Vét. IAV Hassan II. Rabat, Maroc
- Krebs A. and Koppler W. (1982): Die bedeutung von *Mycobacterium bovis* in der Tuberkulose epidemiology. *Zeitschrift Für Erkrankungen der Atnungs Organe.* 158: 101-109
- Kremer K., van Soolingen D., Frothingham R., de Haas W.H., Hermans P.W.M., Martin C., Palittapongarnpin P., Plikaytis B.B., Riley L.W., Yarkus M.A., Musser J.M. and van Embden J.D.A. (1999): Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J. Clin. Microbiol.* 37: 2607-2618
- Kubica G.P. (1979): La nomenclature actuelle des mycobactéries. *Bull. Un. Int. Tuberc.* 54: 217-223
- Kubin M. (1984): Distribution and ecology of non-living reservoirs opportunists and pathogens. In: G.P. Kubica and L.G. Wayne: *The mycobacteria: a source-book, part A:* 1313-1335. Dekker, New York
- Lall J.M. (1969): Tuberculosis among animals in India. *The Veterinary Bulletin.* 39: 385-390
- Lan N.T.N., Wells C.D., Binkin N.J., Becerra J.E., Linh P.D. and Co N.V. (1999): Quality control of smear microscopy for acid-fast bacilli: the case for blinded re-reading. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 3: 55-61
- Lannelle G. and Daffe M. (1991): Mycobacterial cell wall and pathogenicity: a lipidologist's view. *Res. Microbiol.* 142: 433-436

- Lazraq R. (1999): Clonage et expression de gènes dans les mycobactéries- Diagnostic rapide de *Mycobacterium tuberculosis*. Thèse de Doctorat d'État Es-Sciences, Université Med Ben Abdellah, Fac. Sciences Dhar Mehrez. Fès, Maroc
- Lazraq R., Clavel-Sérès S., David H.L. and Roulland-Dussoix D. (1990): Conjugative transfer of a shuttle plasmid from *Escherichia coli* to *Mycobacterium smegmatis*. FEMS Microbiol. Lett. 69: 135-138
- Lebrun L., Mathieu D., Saulnier C. and Nordmann P. (1997): Limits of commercial molecular tests for diagnosis of pulmonary tuberculosis. Eur. Respir. J. 10: 1874-1876
- Lehmann K.B. and Neumann R. (1896): Atlas und Grundriss der bacteriologie und Lehrbuch der speciellen bacteriologischen Diagnostik. 1st ed. J. F. Lehmann, München, pp.1-448
- Lepper A.W.D., Newton-Tabret D.A., Corner L.A., Carpenter L.A., Scanlan W.A., Williams O.J. and Helwig D.M. (1977): The use of bovine PPD tuberculin in the single caudal fold test to detect tuberculosis in beef cattle. Aust. Vet. J. 53: 208-213
- Le Pennec M.P., Adam M.N., and Col B.V.H. (1996): Épidémiologie des mycobactéries atypiques dans 33 hôpitaux généraux français. 17^{ème} Congrès de la société Européenne de Mycobactériologie. Paris, 5/6 juin 1996
- Lévy-Frébault V. (1992): Méthodes rapides de détection et de diagnostic des mycobactéries : Actualités et perspectives. Méd. Mal. Infect. 22: 391-406
- Lévy-Frébault V. and Portaels F. (1992): Proposed minimal standard for the genus *Mycobacterium* and for description of new slowly growing *Mycobacterium* species. Intern. J. System. Bacteriol. 42: 315-323
- Liébana E., Aranaz A., Francis B. and Cousins D. (1996): Assessment of genetic markers for species differentiation within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. J. Clin. Microbiol. 34: 933-938
- Linton C.J., Smart A.D., Leeming J.P., Jalal H., Telenti A., Bodmen T. and Millar M.R. (1995): Comparison of Random Amplified Polymorphic DNA with restriction fragment length polymorphism as epidemiological typing methods for *Mycobacterium tuberculosis*. Eur. Mol. Pathol. 48: M133-M135
- L'Kassmi H., Oualine M., Baaj A. and Nejmi S. (1998): Essai d'identification des mycobactéries: A propos de 214 souches. Rev. Mar. Biol. Infectiol. Tome IV. 1: 39-47
- Lo Y.M., Mehal W.Z. and Fleming K.A. (1988): False positive results and the PCR. Lancet. 2: 679
- Low N., Pfluger D. and Agger M. (1997): Disseminated *Mycobacterium avium* complex disease in the Swiss HIV Cohort Study: increasing incidence, unchanged prognosis. AIDS. 11: 1165-1171
- Lowell A.M. (1984): Tuberculosis: its social and economic impact and some thoughts on epidemiology. Pp: 1021-1056 in G.P. Kubica and L.G. Wayne, eds. The mycobacteria : a sourcebook, part B. Dekker, New York
- Lumeij J.T., Hajer R., Dik K.J., Dorrestein G.M. and Engel H.W.B. (1987): Diagnosis of pulmonary *Mycobacterium bovis* infection in a Tiger. Vet. Res. 120: 302-304
- Maggi C., Alvaréz E., de Kantor I and Nader A. (1998): Methodology for estimating the losses caused by bovine tuberculosis in Argentina. Sci. Tec. Rev. In Press. Cité par: Cosivi O., Grange J.M., Daborn C.J., Raviglione M.C., Fujikura T., Cousins D., Robinson R.A., Huchzermeyer H.F.A.K., de Kantor I. and Meslin F.X. (1998): Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. Emerg. Inf. Dis. 4: 59-70
- Manjunath N., Shankar P., Rajan L., Bhargava A., Saluja S. and Shrinivas T. (1991): Evaluation of a polymerase chain reaction for the diagnosis of tuberculosis. Tubercle. 72: 21-27
- Martin C., Ranés M. and Gicquel B. (1990): Plasmids, Antibiotic resistance, and mobile genetic elements in mycobacteria. In: Molecular Biology of the Mycobacteria. Edited by J. McFadden. Academic Press INC. San Diego, CA 92101
- McAdam R.A., Guilhot C. and Gicquel B. (1994): Transposition in Mycobacteria. In: B.R. Bloom (ed.). Tuberculosis: pathogenesis, protection and control. American Society of Microbiology, Washington, D.C. pp 199-216

- McAdam R.A., Hermans P.W.M., van Soolingen D., Zainuddin Z.F., Catty D. and van Embden J.D.A. (1990): Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence belonging to the IS3 family. *Mol. Microbiol.* 4: 1607-1013
- McFadden J., Kunze Z. and Seechurn P. (1990): DNA probes for detection and identification. In: *Molecular Biology of the Mycobacteria*. J. McFadden (ed.). London: Ac. Press, pp: 139-172
- Merchant I.A. and Barner R.D. (1981): Tuberculosis. Chapter 59. In: I.A. Merchant and R.D. Barner (eds.): *An outline of infectious diseases of domestic animals*. 3rd edition. Iowa State University Press. Ames Iowa, U.S.A.
- Metchock B.G., Nolte F.S. and Wallace R.J.Jr. (1999): *Mycobacterium*. In P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover and R.H. Yokken, editors. *Manual of Clinical Microbiology*, 7th ed. ASM Press, Washington, D.C. 399-437.
- Miller J., Jenny A., Rhyan J., Saari D. and Suarez D. (1997): Detection of *Mycobacterium bovis* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of cattle and elk by PCR amplification of an IS6110 sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms. *J. Vet. Diagn. Invest.* 9: 244-249
- Ministère de la Santé Publique (1994): Direction de l'Épidémiologie et des Programmes sanitaires. *Bulletin d'épidémiologie*. Ministère de la Santé Publique. Maroc. Mars 1994; 12
- Mohle-Boetani J.C., Miguelino V., Dewsnup D.H., Desmond E., Horowitz E., Waterman S.H. and Bick J. (2002): Tuberculosis Outbreak in a Housing Unit for Human Immunodeficiency Virus–Infected Patients in a Correctional Facility: Transmission Risk Factors and Effective Outbreak Control: *Clinical Infectious Diseases*. 34: 668-676
- Mposhy M., Binemo-Madi C. and Mudakikwa B. (1983): Incidence de la tuberculose bovine sur la santé des populations du Nord-Kivu (Zaïre). *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.* 36: 15-18
- Mullis K.B. and Falooma F.A. (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase-catalysed chain reaction. *Methods in Enzymology*. 155: 335- 350. Academic Press. London
- Murray C.J.L., Styblo K. and Rouillon A. (1990): La tuberculose dans les pays en développement: importance, stratégie de lutte et coût. *Bull. Union Int. Tub. Mal. Resp.* 65: 6-26
- Murray J.F. (1996): Expressions cliniques actuelles de la tuberculose. *Rev. Prat.* 46: 1344-1349
- Myers J.A. and Steele J.H. (1969): *Bovine tuberculosis control in Man and Animals*. Warren H. Green, Inc., St. Louis
- Nafeh M.A., Medhat A., Abdul Hameed A.G., Ahmad Y.A., Rashwan N.M. and Strickland G.T. (1992): Tuberculous peritonitis in Egypt: The value of laparoscopy in diagnosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 47: 470-477
- Neimark H., Baig M.A. and Carleton S. (1996): Direct identification and typing of *Mycobacterium tuberculosis* by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 34: 2454-2459
- Newton C.R. and Graham A. (1997): Amplifying the correct product. pp: 29-46. In: *Introduction to Biotechnologies PCR*. D. Billington (ed.). BIOS Scientific Publishers Limited, 1994, 1997. Second edition
- Nivin B., Fujiwara P.I., Hannifin J., and Kreiswirth B.N. (1998): Cross contamination with *Mycobacterium tuberculosis*: an epidemiological and laboratory investigation. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 19: 500-503
- Nolte F. and Metchock B. (1995): *Mycobacterium*. In: P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F. C. Tenover and R.H. Yolken (eds.): *Manual of Clinical Microbiology*, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. pp.400-437
- Nolte F.S., Metchock B., McGowa J.E., Edwards A., Okwumbua O., Thurmond C., Mitchel S., Plikaytis B. and Shinnick T. (1993): Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by polymerase chain reaction and Hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 31: 1777-1782

- O'Reilly L.M. and Daborne C.J. (1995): The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection in animals and man: a review. In. Tub. Lung Dis. Supp.76: 1-46
- Othmani S. E. (1999): Situation épidémiologique de la tuberculose au Maroc. Communication personnelle: Journée Bouzekri sur la tuberculose. Société Marocaine des Maladies Respiratoires. Rabat. 24 avril 1999. Faculté de Médecine et de Pharmacie, Rabat, Maroc
- Othmani S.E. (1995): National Tuberculosis Program, Ministry of Public Health. Morocco. Personal Communication
- Pablos-Mendéz A., Raviglione M.C., Laszlo A. *et al.*, (1998): Global surveillance for antituberculosis-drug resistance, 1994–1997. World Health Organization–International Union against Tuberculosis and Lung Disease Working Group on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance. N. Engl. J. Med. 338: 1641–1649.
- Pabst M.R., Gross J.M., Brozna J.P. and Goren M.B. (1988): Inhibition of macrophage priming by sulfatide from *Mycobacterium tuberculosis*. J. Immun. 140: 634-640
- Palenque E., Villena V., Rebello M.J., Jimenez M.S., and Samper S. (1998): transmission of multidrug resistant *Mycobacterium bovis* to an immunocompetent patient. Clin. Infect. Dis. 26: 995-996
- Pao C.C., Yen T.S.B., You J.B., Maa J.S., Fiss E.H. and Chang C.H. (1990): Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA amplification. J. Clin. Microbiol. 28: 1877-1880
- Parriaud P.J. (1985): Contribution à l'étude de la fiabilité des tests employés dans le dépistage de la tuberculose bovine. Thèse de Doct. Vét. E.N.V. Toulouse, France
- Patel R.J., Fries J.W.U., Piessens W.F. and Wirth D.F. (1990): Sequence analysis and amplification by polymerase chain reaction of a cloned DNA fragment for identification of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microbiol. 28: 513-518
- Peterson E.M., Lu R., Floyd C., Nakasone A., Friedly G. and de la Maza L.M. (1989): Direct identification of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* from amplified primary culture in BACTEC media using DNA probes. J. Clin. Microbiol. 27: 1543-1547
- Pfyffer G.E., Auckenthaler R., van Embden J.D.A. and van Soolingen D. (1998): *Mycobacterium canettii*, the smooth variant of *Mycobacterium tuberculosis*, isolated from a Swiss patient exposed in Africa. Emerg. Infect. Dis. 4: 631–634
- Pierre C., Lecossier D., Boussougant Y., Bocart D., Joly V., Yeni P. and Hance A.J. (1991): Use of reamplification protocol improves sensitivity of detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by amplification of DNA. J. Clin. Microbiol. 29: 712-717
- Pierre C., Olivier C., Lecossier D., Boussougant Y., Yeni R. and Hance A.J. (1993): Diagnosis of primary tuberculosis in children by amplification and detection of mycobacterial DNA. Am. Rev. Respir. Dis. 147: 420-424
- Pilet Ch., Bourdon J.L., Toma B., Marchal N. and Balbastre C. (1979): Bactériologie médicale et vétérinaire. 2^{ème} édition. A. Obré & R. Buttiaux (eds.). DOIN éditeurs. Paris. 438p.
- Plikaytis B.B., Plikaytis B.D. and Shinnick T.M. (1992a): Computer-assisted pattern recognition model for the identification of slowly growing Mycobacteria including *Mycobacterium tuberculosis*. J. Gen. Microbiol. 138: 2265-2273
- Plikaytis B.B., Plikaytis B.D., Yakus M.A., Butler W.R., Woodley C.L., Silcox V.A. and Shinnick T.M. (1992b): Differentiation of slowly growing *Mycobacterium* species, including *Mycobacterium tuberculosis*, by gene amplification and Restriction Fragment Length Polymorphism analysis. J. Clin. Microbiol. 30: 1815-1822
- Pope H., and Smith D.T. (1946): Synthesis of B-complex vitamins by tubercle bacilli when growth on synthetic media. Amer. Rev. Tub. 54: 559-563
- Poulet S. (1994): Organisation génomique de *Mycobacterium tuberculosis* et épidémiologie moléculaire de la tuberculose. Thèse de Doctorat. Université Paris 6. 190p.

- Poulet S. and Cole S.T. (1995): Characterization of the highly abundant polymorphic GC-rich-repetitive sequence (PGRS) present in *Mycobacterium tuberculosis*. Arch. Microbiol. 163: 87-95
- Prère M.F., Chandler M. and Fayet O. (1990): Transposition in *Shigella*: isolation and analysis of IS911, a new member of the IS3 group of insertion sequences. J. Bacteriol. 172: 4090-4099
- Ramakrishnan T. Suryanarayana M. and Gopinathan K.P. (1972): Intermediary metabolism of mycobacteria. Bacteriol. Rev. 36: 65-108
- Rastogi N. (1990): Killing intracellular mycobacteria in *in-vitro* macrophage systems: what may be the role of known host microbicidal mechanisms? Res. Microbiol. 141: 217-230
- Rastogi N., Legrand E. and Sola C. (2001): The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 20: 21-54
- Raviglione M.C., Snider D.E. and Kochi A. (1995): Global epidemiology of tuberculosis. JAMA. 273: 220-226
- Rieder H.L., Snider D.E. and Cauthen G.M. (1990): Extrapulmonary tuberculosis in the United States. Am. Rev. Resp. Dis. 141: 347-351
- Romand F., Gaudin J.L., Badichon R. and Souquet J.C. (1997): Tuberculose abdominale d'allure pseudo-tumorale. Presse Médicale. 26: 1717-1721
- Ross B.C. and Dwyer B. (1993): Rapid, simple method for typing isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by using the Polymerase Chain Reaction. J. Clin. Microbiol. 31: 329-334
- Ross B.C., Raios K., Jackson K. and Dwyer B. (1992): Molecular cloning of a highly repeated DNA element from *Mycobacterium tuberculosis* and its use as an epidemiological tool. J. Clin. Microbiol. 30: 942-946
- Rouillon A., Enarson D. and Chrétien J. (1996): Epidémiologie de la tuberculose dans le monde. EMC Pneumologie. 32: 1-15
- Runyon E.H. (1959): Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. Med. Clin. N. Amer. 43: 273-290
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B. and Erlich H.A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science. 239: 487-491
- Saiki R.K., Scharf S., Faloona F. A., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich A. and Arnheim N. (1985): Enzymatic amplification of β -globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science. 230: 1350-1354
- Samper S., Iglesias M.J., O'Tello L. *et al.*, (2000): Le réseau espagnol de surveillance de la tuberculose multi-résistante: Rapport de surveillance. Eurosurveillance. 5: 43-45
- Samper S., Martin C., Pinedo A., Rivero A., Blazquez J., Baquero F. *et al.*, (1997): Transmission between HIV infected patients of multidrug resistant tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*. AIDS. 11: 1237-1242
- Santé Canada (1999): La tuberculose: La résistance aux anti-tuberculeux au Canada. Ministère des Travaux publics et Services gouvernementaux. Canada
- Sapolsky R.M. and Else J.G. (1987): Bovine tuberculosis in wild baboon population: epidemiological aspects. J. Med. Primatology. 16: 229-235
- Sauret J., Jolis R., Ausina V., Castro O. and Cornudella R. (1992): Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis*: report of 10 cases. Tuberc. Lung Dis. 73: 388-391
- Schliesser T. (1992): *Mycobacterium bovis* infection in man. In: A.A.M. Moussa, O. Lotfi., S. Maher *et al.*, (eds.). Proceedings of the International Conference on Animal Tuberculosis in Africa and Middle East, Cairo: The General Organization of Veterinary Services. Cairo; 193-194
- Schmiedal A. (1968a): Development and present state of bovine tuberculosis in man. Bull. Int. Union Tuberc. 40: 5-32

- Schmiedal A. (1968b): Rapid decline in human tuberculosis and persistence of widespread tuberculosis of cattle. An unusual epidemiologic situation and its consequences. *Bull. Int. Union Tuberc.* 41: 297-300
- Schowobel V., Declut B., Haeghebaert S., Torrea G., Vincent V. and Grosset J. (1994): Multidrug-resistant tuberculosis in France. *Tuberc. Lun. Dis.* 75: S119
- Seijeoung K. (2001): Gender and tuberculosis among inmates. Thesis (Ph.D). University of Illinois. Chicago Health Sciences Center. 128p.
- Sepkowitz K.A., Tezak E.E., Recalde S. *et al.*, (1994): trends in the susceptibility of tuberculosis in New York City. 1987-1991. *Clin. Infec. Dis.* 18: 755-759
- Sequeira de latini M.D., Latini O.A., Lopez M.L. and Cecconi J.O. (1990): Tuberculosis bovina en seres humanos. 2a. parte: Periodo 1977-1989. *revista Argentina del torax.* 51: 1-13
- Serraino A., Marchetti G., Sanguinetti V., Rossi M.C., Zanoni R.G., Catozzi L., Bandera A., Dini W., Mignone W., Franzetti F. and Gori A. (1999): Monitoring of transmission of tuberculosis between wild boars and cattle: genotypical analysis of strains by molecular epidemiology techniques. *J. Clin. Microbiol.* 37: 2766-2771
- Sewell D.L., Rashad A.L., Rourke W.J., Jr Poor S.L., McCarthy J.C. and Pfaller M.A. (1993): Comparison of the Septi-Chek AFB and BACTEC systems and conventional culture for recovery of mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* 31: 2689-2691
- Sigurdsson J. (1945): Studies on the risk of infection with bovine tuberculosis to the rural population. With special reference to pulmonary tuberculosis. *Acta. Tuberc. Scand. Suppl.* XV: 1-250
- Sjöbring U., Mecklenburg M., Andersen A.B. and Miörner H. (1990): Polymerase chain reaction of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 28: 2200-2204
- Small P.M., McClenny N.B., Singh S.P., Schoolnik G.K., Tompkins L.S. and Mickelsen P.A. (1993): Molecular strain typing of *Mycobacterium tuberculosis* to confirm cross-contamination in the mycobacteriology laboratory and modification of procedures to minimize occurrence of false-positive cultures. *J. Clin. Microbiol.* 31: 1677-1682
- Smith A., Igoe D., O'Flanagan D. and Holohan T. (2000): Surveillance de la tuberculose en Irlande. *Eurosurveillance.* 5: 45-48
- Smyth N.T. (1992): The Polymerase Chain Reaction: History, Methods and Application. *Dia. Mol. Path.* 1: 85-172
- Snider D.E., Simone P.M., Dooley S.W. *et al.*, (1994): Multidrug resistant tuberculosis. *Scientific American*, May/June 16-25
- Soini H. and Musser J.M. (2001): Molecular diagnosis of mycobacteria. *Clin. Chem.* 47: 809–14.
- Soini H. and Viljanen M.K. (1997a): Gene amplification in the diagnosis of mycobacterial infections. Review article. *APMIS.* 105: 345-353
- Soini H. and Viljanen M.K. (1997b): Diversity of the 32-kilodalton protein gene may form a basis for species determination of potentially pathogenic infections. *J. Clin. Microbiol.* 35: 769-773
- Soini H., Agha S.A., El Fiky A. and Viljanen M.K. (1996): Comparison of Amplicor and 32-Kilodalton PCR in detection of *Mycobacterium tuberculosis* from sputum specimens. *J. Clin. Microbiol.* 34: 1829-1830
- Soini H., Pan X., Teeter L., Musser J.M. and Graviss E.A. (2001): Transmission dynamics and molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with low copy numbers of IS6110. *J. Clin. Microbiol.* 39: 217–21.
- Soini H., Skurnik M., Liippo K., Tala E. and Viljanen M.K. (1992): Detection and identification of mycobacteria by amplification of a segment of the gene coding for the 32-Kilodalton protein. *J. Clin. Microbiol.* 30: 2025-2028
- Sommers H.M. and Good R.C. (1985): *Mycobacterium*. In: E.H. Lennette, A. Ballows, W.L. Hausler and H.J. Shadomy, eds. *Manual of Clin. Microbiol.* 4th ed. American Society for Microbiol., Washington, D.C.

- Sritharan V. and Barker R.H.Jr. (1991): A simple method for diagnosing *Mycobacterium tuberculosis* infection in clinical samples using PCR. *Mol. Cell. Probes*. 5: 385-395
- Sritharan V., Iralu J.V. and Barker R.H. (1994): Comparison of genus and species-specific probes for PCR detection of mycobacterial infections. *Mol. Cell. Probes*. 8: 409-416
- Stackebrandt E., Rainey F.A. and Ward-Rainey N.L. (1997): Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria*, classis nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 479-491
- Stone B.L., Burman W.J., Hildred M.V., Jarboe E.A., Reves R.R. and Wilson M.L. (1997): The diagnostic yield of acid-fast-bacillus smear-positive sputum specimens. *J. Clin. Microbiol.* 35: 1030-1031
- Styblo K. (1991): Epidemiology of tuberculosis. Selected papers NKCV Royal Netherlands Tuberculosis Association. La Haye. 24
- Styblo K. (1990): Tuberculose et infection VIH: aspects mondiaux. *Bull. Union Int. Tub. Mal. Resp.* 65: 30-35
- Styblo K. (1980): Recent advances in tuberculosis. *Adv. Tuberc. Res.* 20: 1-63
- Styblo K., Meijer J. and Sutherland I. (1969): The transmission of tubercle bacilli in a human population. Tuberculosis surveillance. Research Unit Report N°1. *Bull. Un. Int. Tuberc.* 42: 5-104
- Sudre P. (1993): Aspects contemporains de l'épidémiologie de la tuberculose. *Ann. Inst. Pasteur/ Actualités*. 4: 173-180
- Sudre P., Ten Dam J. and Kochin A. (1992): Tuberculosis: a global overview of the situation today. *Bull. W. H. O.* 70: 149-159
- Sutherland I. (1976): Recent studies in the epidemiology of tuberculosis, based on the risk of being infected with tubercle bacilli. *Adv. Tuberc. Res.* 19: 1-63
- Tarara R., Suleman M.A., Sapolsky R., Wabomba M.J. and Else J.G. (1985): Tuberculosis in wild live baboons, *Papio cynocephalus anubis* (lesson), in Kenya. *J. Wild Dis.* 21: 137-140
- Tessaro S.V. (1986): The existing and potential importance of brucellosis and tuberculosis in Canadian wildlife: a review. *Can. Vet. J.* 27: 119-124
- Thiele D. (1990): The technique of Polymerase Chain Reaction- a New Diagnostic tool in Microbiology and other Scientific Fields (Review). *Zbl. Bakkt.* 273: 431-454
- Thierry D., Cave M.D., Eisenach K.D., Crawford J.T., Bates J.H., Gicquel B. and Guedson J.L. (1990a): IS6110, an IS-Like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Nucleic Acids Res.* 18: 188
- Thierry D., Brisson-Noel A., Vincent Lévy-Frébault V., Nguyer S., Guedson J.L. and Gicquel B. (1990b): Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 28: 2668-2673
- Thierry D., Chavarot P., Marchal G., Thi K.T. L., Ho M.L. *et al.*, (1995): *Mycobacterium tuberculosis* strains unidentified using the IS6110 probe can be detected by oligonucleotides derived from the mt308 sequence. *Res. Microbiol.* 146: 325-328
- Thoen C.O. and Himes E.M. (1986a): *Mycobacterium*. In: C.L. Gyles and C.O. Thoen, eds. Pathogenesis of bacterial infections in animals. I.S.U. Press, Ames, Iowa, USA
- Thoen C.O. and Himes E.M. (1986b): Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection. *Prog. Vet. Microbiol. Immun.* 2: 198-214
- Thoen C.O. and Himes E.M. (1984): *Mycobacterium tuberculosis* complex. 1209-1236 in: G.P. Kubica and L.G. Wayne. The Mycobacteria: a Sourcebook, part B. Dekker, New York
- Thoen C.O. and Himes E.M. (1981): Tuberculosis. In: Infectious Diseases of Wild Mammals. 2nd ed. Ames: The Iowa State University Press. 263-274

- Thoen C.O. (1997): *Mycobacterium bovis* infection in cattle: Pathogenesis. In: Proceedings of the Second International Conference on Animal Tuberculosis in Africa and the Middle East; 67-80, Rabat. Morocco, October 4-6, 1995 edited by Berrada J., Bouslikhane M., and Bouchriti N., Actes Editions, Morocco
- Thoen C.O. (1992): Pathogenesis of bovine tuberculosis. Proceedings of the first International Conference on Animal Tuberculosis in Africa and Middle East. Cairo. Egypt. 1992
- Thoen C.O. (1979): Factors associated with pathogenicity of mycobacteria. pp. 162-167 in: Schlessinger Microbiology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Thoen C.O. and Bloom B.R. (1995): Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* tuberculosis. In: *Mycobacterium bovis* infection in Animals and Humans. Iowa State University Press/Ames. First Edition, 1995
- Thorel M.F. (1997): Isolement et identification des Mycobactéries : *Mycobacterium bovis* et *Mycobacterium paratuberculosis*. In: Proceedings of the Second International Conference on Animal Tuberculosis in Africa and the Middle East; pp.67-80, Rabat. Morocco, October 4-6, 1995 edited by Berrada J., Bouslikhane M., and Bouchriti N., Actes Editions, Morocco
- Thorel M.F. (1994): Le rôle du laboratoire dans le contrôle de la tuberculose chez les animaux. Point Vét. 159 :35-40
- Thorel M.F. (1993): La paratuberculose: Le diagnostic bactériologique. Point Vét. 25: 725-731
- Thorel M.F. (1980): Mycobactéries identifiées dans un centre de recherches vétérinaires de 1973 à 1979. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur). 131A: 61-69
- Thorel M.F. and Moutou F. (1994): Tuberculose et animaux sauvages. Point. Vét. 159: 37-34
- Timmerman K.P. and Yu C.P.D. (1985): Complete sequence of IS3. Nucleic Acids Res. 13: 2127-2139
- Tisdell C.A., Harrisson S.R. and Ramsay G.C. (1999): The economic impacts of endemic diseases and disease control programmes. In: The economics of animal disease control. B.D. Perry. Ed. Rv. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 18: 380-398
- Tison F. and Carbonnelles B. (1972): Recherche, isolement et étude du bacille tuberculeux et des autres mycobactéries en pratique courante. 356p. Editions Crouan & Roques.
- Tonnel A.B. (1995): La tuberculose en France: comment arrêter l'épidémie actuelle? Rapport de la Conférence d'experts sur la Tuberculose. 15 décembre 1994, Paris. Sous l'égide de la Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF) et de la Société de Pneumologie de Langue Française (SPLF)
- Tortoli E., Lavinia F. and Simonetti M.T. (1997): Evaluation of a commercial ligase chain reaction kit (Abbott LCX) for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in pulmonary and extrapulmonary specimens. J. Clin. Microbiol. 35: 2424-2426
- Triglia T., Peterson M.G. and Kemp D.J. (1988): A procedure for in vitro amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences. Nuc. Ac. Res. 16: 81-86
- van Bekum A. (1994): DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR. Clin. Microbiol. Rev. 7: 174-184
- van Embden J.D., van Gorkom T., Kremer T., Jansen R., van der Zeijst B.A., Schoulds L.M. (2000): Genetic variation and evolutionary origin of the direct repeat locus of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. J Bacteriol. 182: 2393-401
- van Embden J.D.A., Cave M.D. and Crawford J.T. (1993): Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standard methodology. J Clin Microbiol. 31:406-409
- van Embden J.D.A., Schoulds L.M. and van Soolingen D. (1995): Molecular techniques: application in epidemiologic studies. In: C.O. Thoen and J.H. Steele. Eds. *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans. Ames (IA): Iowa State University Press; 15-27

- van Genus H.A., Meijer J. and Styblo K. (1975): Résultats de l'examen des sujets en contact avec des malades tuberculeux à Rotterdam, 1967-1969. Bull. Union Int. Tub. Mal. Resp. 50: 105-119
- van Soolingen D., de Haas P.E., Haagsma J., Eger T., Hermans P.W.M., Ritacco V., Alito A. and van Embden J.D. (1994): Use of various genetic markers in differentiation of *Mycobacterium bovis* strains from animals and humans and for studying epidemiology of bovine tuberculosis. J. Clin. Microbiol. 32: 2425-2433
- van Soolingen D., de Haas P.E.W., Hermans P.W.M., Groenen P.M.A. and van Embden J.D.A. (1993): Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microbiol. 31: 1987-1995
- van Soolingen D., Hermans P.E.W., de Haas P.E.W., Soll D.R. and van Embden J.D.A. (1991a): Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence dependent polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. J. Clin. Microbiol. 29: 2578-2586
- van Soolingen D., de Haas P.E.W., Hermans P.W.M. and van Embden J.D.A. (1991b): Manual for fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* strains. Protocols MMB, National Institute of Public Health and Environmental Protection, Bilthoven, The Netherlands.
- van Soolingen D., Hermans P.W.M. de Haas P.E.W. and van Embden J.D.A. (1992): Insertion element IS1081 associated Restriction Fragment Length Polymorphism in *Mycobacterium tuberculosis* complex species: a reliable tool for recognizing *Mycobacterium bovis* BCG. J. Clin. Microbiol. 30: 1772-1777
- van Soolingen D., Hoogenboezen T, de Haas P.E.W., Hermans P.W.M., Koedam M.A., Teppema K.S., Brennan P.J., Besra G.S., Portaels F., Top J., Schouls L.M. and van Embden J.D.A. (1997): A novel pathogenic taxon of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *canettii*: characterization of an exceptional isolate from Africa. Int. J. Syst. Bacteriol. 47: 1236-1245
- Vestal B.S. (1975): Procedures for the isolation and identification of mycobacteria. 3rd ed. US. Department of Health. Education and Welfare. Public Health Service. C.D.C. Atlanta, Georgia, USA
- Vincent V. (1994): Epidémiologie de la tuberculose chez l'homme. Point Vét. 159: 41-44
- Virtanen S. (1960): A study of Nitrate reduction by mycobacteria. The use of the nitrate reduction test in the identification of mycobacteria. Act. Tub. Scand. Suppl. 48: 1-119
- Walshe M.J., Grindle J., Nell. A. and Bachmann M. (1991): Dairy development in Sub-Saharan Africa. Washington D.C.: World Bank. African Technical Department Series; World Bank Technical Paper N°135
- Warren J.R., Bhattacharya M., De Almeida K.N.F., Trakas K., and Peterson L.R. (2000): A Minimum 5.0ml of Sputum Improves the Sensitivity of Acid-fast Smear for *Mycobacterium tuberculosis*. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 161: 1559-1562
- Wayne L.G. (1982): Microbiology of tubercle bacilli. Amer. Rev. Resp. Dis. 125: 31-410.
- Wayne L.G. and Kubica G.P. (1986): Mycobacteriaceae. Section 16, Mycobacteria. P: 1436-1457 in: P.H.A. Sneath, N.S. Mair., M. E. Sharpe and J.G. Holt (eds.). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol.2. Williams and Wilkins, Baltimore
- Wells A.Q. (1937): Tuberculosis in wild voles. Lancet. 232: 1121
- West S.C., Vainisi S.J., Vyganatas C.M. and Beluhan F.Z. (1981): Intraocular granulomas associated with tuberculosis in primates. J.A.V.M.A. 179: 1240-1244
- White C.L. and Harris S. (1995): Bovine tuberculosis in badger (*Meles meles*) populations in southwest England: an assessment of past, present, and possible future control strategies using simulation modeling. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 349: 415-432
- White T.J., Arnhein N. and Erlich H.A. (1989): The PCR. Trends. Gent. 5: 185-189
- WHO, (1994a): Tuberculosis Programs. Framework for effective Tuberculosis Control, Geneva, 1994 (WHO/TB/94. 179)

- WHO, (1994b): Report of WHO working group on zoonotic tuberculosis (*Mycobacterium bovis*), with the participation of FAO; 1994 June 14. Mainz, Germany. Geneva: the Organization; Unpub. Document WHO/CDS/VP/94.137
- WHO, (1997a): Antituberculosis drug resistance in the world: The WHO/IUATLD global project on anti tuberculosis drug resistance surveillance, 1994-1997. Geneva, Switzerland. WHO global Tb program, 1997 (WHO/TB/97. 229)
- WHO, (1997b): WHO report on the tuberculosis epidemic 1997. Global TB Program, Geneva.
- WHO, (1997c): Global Tuberculosis program. The year 2000 targets: future impact of DOTS on global Tuberculosis epidemic. Geneva. 1997 (WHO/GTB/CARG7/97.07)
- WHO (1998): Global Tuberculosis program. Status of tuberculosis in the 22 high burden countries and global constraints to tuberculosis control, Geneva, 1998 (WHO/TB/98.242)
- WHO (1999): Communicable diseases, Global Tuberculosis Control. WHO report 1999, Geneva. (WHO/Cds/CPC/TB/99.259)
- Wilson G.S and Miles A. (1975a): *Mycobacterium*. Pp: 565-612 in: Topley and Wilson's Principles of bacteriology, virology and immunology. Vol.1. 6th ed. Edward Arnold Publishers Ltd
- Wilson G.S. and Miles A. (1975b): Tuberculosis. Pp: 1724-1785. In Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunology. 6th ed. Vol.2. Edward Arnold Publishers Ltd.
- Wolinsky E. (1984): Non tuberculous mycobacteria and associated diseases. In: G.P. Kubica and L.G. Wayne: The mycobacteria: a source-book, part B: 1141-1208. Dekker, New York
- Wolinsky E. (1980): *Mycobacterium*. En Tratado de Microbiologia, Editado por B.D. Davis, R. Dulbecco, H.N. Eisen, H.S. Ginsberg, W.B. Wood y M. McCarthy, 867-892. Salvat Editores, S.A., Barcelona
- Wood A.J.J. (1993): Treatment of multidrug resistant tuberculosis. E. Engl. J. Med. 329: 784-791
- Woodford M.H. (1982): Tuberculosis in wildlife (survey of *Syncerus caffer*) in the Ruwenzori National Park (Part I). Tropical Animal Health and Production. 14: 81-88
- Yang Z., Ijaz K., Bates J.H., Eisenach K.D. and Cave M.D. (2000): Spoligotyping and Polymorphic GC-Rich Repetitive Sequence Fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* strains having few copies of IS6110. J. Clin. Microbiol. 38: 3572-3576
- Yeun L.K.W., Ross B.C., Jakson K.M. and Dwyer B. (1993): Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* strains from Vietnamese patients by Southern blot hybridization. J. Clin. Microbiol. 33: 1615-1618
- Youmans G.P. (1979a): The morphology and metabolism of mycobacteria. In: Tuberculosis. G.P. Youmans and W.B. Saunders Company. 8-45
- Youmans G.P. (1979b): Epidemiology of tuberculosis. In: Tuberculosis. G.P. Youmans (ed.). W.B. Saunders Company. 356-369
- Youmans G.P. and Youmans A.S. (1953): Studies on the metabolism of *Mycobacterium tuberculosis*. I. The effect oh carbohydrates and alcohols on the growth of *Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis*. J. Bacteriol. 65:92
- Youmans G.P. and Youmans A.S. (1950): The growth of recently isolated strains of *Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis* in liquid media. J. Bacteriol. 60: 569
- Yuen K.Y., Chan K.S., Chan C.M., Ho B.S.W., Dai L.K., Chau P.Y. and Ng M.H. (1993): Use of the PCR in routine diagnosis of treated and untreated pulmonary tuberculosis. J. Clin. Pathol. 46: 318-322
- Zainuddin Z.F. and Dale J.W. (1990): Polymorphic repetitive DNA sequences in *Mycobacterium tuberculosis* detected with a gene probe from a *Mycobacterium fortuitum* plasmid. J. Gen. Microbiol. 135: 2347-2355
- Zink A.R., Sola C., Reischl U., Brabner W., Rastogi N., Wolf H. and Nerlich A.G. (2003): Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* Complex DNAs from Egyptian Mummies by Spoligotyping. J. Clin. Microbiol. 41: 356-367

Annexe II

I. Milieux de culture

1. Milieu de Löwenstein-Jensen (L-J) (Difco)

1.1. Ingrédients:

Milieu Löwenstein base	7,2g
Eau distillée q.s.p.....	600ml
Œufs entiers.....	100ml

1.2. Composition du milieu de base (37g dans 600ml d'eau distillée)

Bacto Asparagine.....	3,6g
Mono Potassium Phosphate.....	2,4g
Magnesium Sulfate.....	0,24g
Magnesium Citrate.....	0,6g
Potato Flour.....	30g
Malachite Green.....	0,4g

1.3. Préparation:

Le milieu de base est suspendu dans l'eau distillée dans un erlenmeyer propre. La suspension est agitée, chauffée jusqu'à dissolution complète, stérilisée à l'autoclave pendant 15-20 minutes à 120°C, puis refroidie à 56°C.

Les œufs sont lavés à l'eau du robinet, séchés par un linge propre puis désinfectés avec de l'alcool puis du lugol. Le contenu des œufs est ensuite récupéré d'une manière aseptique dans un erlenmeyer stérile puis homogénéisé par agitation magnétique. Une quantité de 100ml de cette préparation est ajoutée à la solution de base, stérile, puis le tout est bien homogénéisé avant la distribution dans des tubes à vis. Ces derniers sont

ensuite incubés en position inclinée dans un four pasteur préchauffé à 100°C pendant 1 heure, afin de solidifier le milieu par coagulation. Les tubes sont ensuite refroidis doucement avant de les incuber (toujours en position inclinée) à 37°C pendant 24-48 heures, pour éliminer l'excès de buée et tester la stérilité du milieu.

2. Milieu de Prauskauer et Beck (P&B), modifié avec Sérum de cheval à 5%

2.1. Ingrédients:

L-Asparagine	5g
Phosphate de Potassium monobasique.....	5g
Sulfate de potassium anhydre.....	5g
Glycérine.....	20ml
Eau distillée.....	930ml
Citrate de Magnésium anhydre.....	1,5g
Sérum de cheval stérile.....	50ml

2.2. Préparation:

Dissoudre par chauffage au bain-marie, l'asparagine dans un petit volume d'eau. Dissoudre ensuite séparément, le Phosphate et Sulfates de Potassium dans des petits volumes d'eau. Mélanger les deux préparations et y ajouter la glycérine avant de compléter le volume d'eau. Ajuster le pH à 7 à l'aide d'une solution NaOH 1N. Ajouter le Citrate de Magnésium. Homogénéiser avant d'autoclaver à 120°C pendant 20 minutes. Laisser refroidir à 50°C puis ajouter le sérum de cheval d'une manière aseptique.

Homogénéiser l'ensemble puis filtrer le milieu à l'aide d'un filtre stérile de 0,45µ afin d'éliminer tout précipité formé lors de l'autoclavage. Distribuer dans des tubes à vis à raison de 4 ml par tube. Incuber à 37°C pendant 48 heures afin de tester la stérilité.

3. Milieu de Herrold au jaune d'œuf (Difco)

3.1. Ingrédients:

Peptone.....	9g
Chlorure de Sodium.....	4,5g
Agar (Special Noble-Difco).....	15,3g
Extrait de viande.....	2,7g
Glycérine.....	27ml
Eau distillée q.s.p.....	870ml
Jaunes d'œufs.....	6
Vert de Malachite à 2%.....	5ml
Hydroxyde de Sodium 1N.....	4,1ml

3.2. Préparation:

Mélanger et porter à ébullition tous les ingrédients sauf les jaunes d'œufs et le vert de Malachite. Ramener ensuite la température à 60°C puis ajuster le pH à 7,5 à l'aide de la solution d'Hydroxyde de Sodium. Après addition du vert de Malachite, le milieu de base est stérilisé à l'autoclave pendant 20 minutes à 120°C, ensuite la température est ramenée à 56°C et les jaunes d'œufs sont ajoutés d'une manière aseptique et le mélange est homogénéisé par agitation magnétique avant d'être distribué dans des tubes à vis stériles. Ces derniers sont ensuite gardés à température ambiante en position inclinée jusqu'à solidification complète du milieu puis incubés à 37°C pendant 48 heures afin de tester la stérilité avant toute utilisation.

4. Milieu de Middlebrook 7H10 enrichi avec l'O.A.D.C

4.1. Ingrédients:

Milieu Middlebrook 7H10 de base.....	4,7g
Eau distillée q.s.p.....	900ml
O.A.D.C (Difco).....	100ml

La solution O.A.D.C contient :

Acide Oléique.....	0,05g
Albumine bovine fraction V.....	5g
Dextrose.....	2g
Catalase.....	0,004g
Chlorure de Sodium.....	0,85g

4.2. Préparation:

Dissoudre le milieu de base dans l'eau distillée et porter à ébullition avant d'autoclaver à 120°C pendant 20 minutes. Ramener la température à 50-60°C puis ajouter stérilement la solution d'enrichissement (O.A.D.C.). Distribuer le mélange ensuite dans des tubes à vis stériles et les garder à température ambiante en position inclinée jusqu'à solidification complète du milieu puis incubés à 37°C pendant 48 heures afin de tester la stérilité avant toute utilisation.

II- Réactifs et solutions

1. Réactifs de la coloration de Ziehl-Neelsen:

1.1. Solutions de travail

1- Solution de stock de fuchsine basique saturée :

Alcool éthylique à 95%.....	100ml
Fuchsine basique.....	3g

2- Solution de travail de la fuchsine basique

Solution de stock de fuchsine basique saturée	10ml
Phénol liquide à 5%.....	90ml

Compléter avec 900ml d'eau distillée, laisser reposer pendant 24 heures puis filtrer.

3- Mélange acide-alcool

Acide hydrochloridrique concentré.....	3,2ml
Alcool éthylique à 95%.....	100ml

4- Solution du Bleu de Méthylène

Bleu de Méthylène.....	0,3%
Eau distillée.....	100ml

1.2. Technique de la coloration de Ziehl:

1. Fixer les frottis par flambage doux
2. Coloration : recouvrir par la fuchsine, laisser agir pendant 10-15 minutes
3. Décoloration : laver à l'eau, recouvrir la lame avec le mélange acide-alcool. Laisser agir pendant 1 minute.
4. Coloration de fond : laver, recolorer pendant 3 minutes par la solution de bleu de méthylène.
5. Laver à l'eau et sécher la lame.

3. Réactifs du test de la réduction des Nitrates :

3.1. Substrat:

NaNO ₃	0,085g
KH ₂ PO ₄	0,117g
Na ₂ HPO ₄ 12 H ₂ O.....	0,485g
H ₂ O distillée.....	100ml

pH7.0, autoclaver pendant 8 minutes

3.2. Réactifs :

- A : Acide Chlorhydrique dilué à moitié concentré
B : 0,1mg de sulfanilamide dans 50ml d'eau distillée
C : 0,05mg de bichlorhydrate de n (α-naphtyl) éthylène-diamine, dans 50ml d'eau distillée.

4. Bouillon glucosé au rouge de Phénol :

Bouillon de Tryptose	25g
Rouge de Phénol à 0,4%.....	10ml
Eau distillée q.s.p.....	100ml

5. Zéphiran :

Chlorure de Benzalkonium (Zéphiran à 17%).....1.2ml
Eau distillée stérile.....98,8ml

6. Tris HCL 1M pH8.0 :

Tris base.....1,211g
H₂O.....80ml
Ajuster le pH à 8.0 par une solution de HCL 1N puis
compléter le volume à 100ml.

7. EDTA 0,5M :

EDTA 2H₂O.....4,6525g
H₂O.....20ml
Dissoudre puis ajuster le pH à 8.0. Compléter le volume à
25ml.

8. TE, pH8.0 :

Tris 1M.....25ml
EDTA 0,5M.....10ml
Compléter à 500ml puis stériliser à l'autoclave

9. SDS/Protéinase K :

Protéinase K à 10mg/ml.....5µl
SDS à 10%.....75 µl

10. NaCL 5M :

NaCL.....29.2g
Eau distillée.....100ml
Stériliser à l'autoclave. Conserver à température ambiante

11. CTAB/NaCL :

NaCL.....4,1g
Eau distillée.....80ml

CTAB.....10g

Bien dissoudre à 65°C, ajuster ensuite le volume à 100ml.

12. TBE 10X :

Tris- Base.....108g

Acide borique.....55g

EDTA 0,5M.....40ml

Compléter à 1000ml avec de l'eau distillée. Stériliser par autoclavage. Diluer 9 fois pour avoir le TBE 1X.

13. Tampon de charge :

Bleu de Bromophénol.....45mg

Glycérol.....5ml

Eau distillée.....10ml

14. Bromure d'ethidium (10mg/ml) :

Bromure d'ethidium (BET).....1g

TBE 1X.....100ml

La concentration requise pour coloration est de 0,5 µg de solution de BET par ml de TBE1X, soit : 2.5 µl dans 50ml).

Annexe I

Tableau A: Nombre, date et origine de prélèvement des 200 expectorations

Code	Date de réception	Origine du prélèvement
C1	10 mai 2000	Ibn Sina
C2	10 mai 2000	Ibn Sina
C3	10 mai 2000	Ibn Sina
C4	10 mai 2000	Ibn Sina
C5	10 mai 2000	Ibn Sina
C6	10 mai 2000	Ibn Sina
C7	10 mai 2000	Ibn Sina
C8	10 mai 2000	Ibn Sina
C9	12 mai 2000	Ibn Sina
C10	12 mai 2000	Ibn Sina
C11	12 mai 2000	Ibn Sina
C12	12 mai 2000	Ibn Sina
C13	12 mai 2000	Ibn Sina
C14	12 mai 2000	Ibn Sina
C15	12 mai 2000	Ibn Sina
C16	12 mai 2000	Ibn Sina
C17	12 mai 2000	Ibn Sina
C18	12 mai 2000	Ibn Sina
C19	16 mai 2000	Ibn Sina
C20	16 mai 2000	Ibn Sina
C21	16 mai 2000	Ibn Sina
C22	16 mai 2000	Ibn Sina
C23	16 mai 2000	Ibn Sina
C24	16 mai 2000	Ibn Sina
C25	16 mai 2000	Ibn Sina
C26	16 mai 2000	Ibn Sina
C27	16 mai 2000	Ibn Sina
C28	16 mai 2000	Ibn Sina
C29	16 mai 2000	Ibn Sina
C30	16 mai 2000	Ibn Sina
C31	17 mai 2000	My Youssef
C32	17 mai 2000	My Youssef
C33	17 mai 2000	My Youssef
C34	17 mai 2000	My Youssef
C35	17 mai 2000	My Youssef
C36	17 mai 2000	My Youssef
C37	17 mai 2000	My Youssef
C38	17 mai 2000	My Youssef
C39	17 mai 2000	My Youssef
C40	17 mai 2000	My Youssef
C41	17 mai 2000	My Youssef
C42	17 mai 2000	My Youssef
C43	17 mai 2000	My Youssef
C44	18 mai 2000	Ibn Sina
C45	18 mai 2000	Ibn Sina

Code	Date de réception	Origine du prélèvement
C46	18 mai 2000	Ibn Sina
C47	18 mai 2000	Ibn Sina
C48	18 mai 2000	Ibn Sina
C49	18 mai 2000	Ibn Sina
C50	18 mai 2000	Ibn Sina
C51	18 mai 2000	Ibn Sina
C52	18 mai 2000	Ibn Sina
C53	18 mai 2000	Ibn Sina
C54	19 mai 2000	My Youssef
C55	19 mai 2000	My Youssef
C56	19 mai 2000	My Youssef
C57	19 mai 2000	My Youssef
C58	19 mai 2000	My Youssef
C59	19 mai 2000	My Youssef
C60	19 mai 2000	My Youssef
C61	19 mai 2000	My Youssef
C62	19 mai 2000	My Youssef
C63	19 mai 2000	My Youssef
C64	19 mai 2000	My Youssef
C65	19 mai 2000	My Youssef
C66	19 mai 2000	My Youssef
C67	19 mai 2000	My Youssef
C68	19 mai 2000	My Youssef
C69	24 mai 2000	My Youssef
C70	24 mai 2000	My Youssef
C71	24 mai 2000	My Youssef
C72	24 mai 2000	My Youssef
C73	24 mai 2000	My Youssef
C74	24 mai 2000	My Youssef
C75	24 mai 2000	My Youssef
C76	24 mai 2000	My Youssef
C77	24 mai 2000	My Youssef
C78	24 mai 2000	My Youssef
C79	24 mai 2000	My Youssef
C80	24 mai 2000	My Youssef
C81	24 mai 2000	My Youssef
C82	01 juin 2000	Ibn Sina
C83	01 juin 2000	Ibn Sina
C84	01 juin 2000	Ibn Sina
C85	01 juin 2000	Ibn Sina
C86	01 juin 2000	Ibn Sina
C87	01 juin 2000	Ibn Sina
C88	01 juin 2000	Ibn Sina
C89	01 juin 2000	Ibn Sina
C90	01 juin 2000	Ibn Sina
C91	01 juin 2000	Ibn Sina
C92	01 juin 2000	Ibn Sina
C93	01 juin 2000	Ibn Sina
C94	01 juin 2000	Ibn Sina

Code	Date de réception	Origine du prélèvement
C95	01 juin 2000	Ibn Sina
C96	01 juin 2000	Ibn Sina
C97	01 juin 2000	Ibn Sina
C98	01 juin 2000	Ibn Sina
C99	01 juin 2000	Ibn Sina
C100	01 juin 2000	Ibn Sina
C101	01 juin 2000	Ibn Sina
C102	08 juin 2000	Ibn Sina
C103	08 juin 2000	Ibn Sina
C104	08 juin 2000	Ibn Sina
C105	08 juin 2000	Ibn Sina
C106	08 juin 2000	Ibn Sina
C107	08 juin 2000	Ibn Sina
C108	08 juin 2000	Ibn Sina
C109	08 juin 2000	Ibn Sina
C110	09 juin 2000	My Youssef
C111	09 juin 2000	My Youssef
C112	09 juin 2000	My Youssef
C113	09 juin 2000	My Youssef
C114	09 juin 2000	My Youssef
C115	09 juin 2000	My Youssef
C116	09 juin 2000	My Youssef
C117	09 juin 2000	My Youssef
C118	09 juin 2000	My Youssef
C119	09 juin 2000	My Youssef
C120	09 juin 2000	My Youssef
C121	09 juin 2000	My Youssef
C122	09 juin 2000	My Youssef
C123	21 juin 2000	My Youssef
C124	21 juin 2000	My Youssef
C125	21 juin 2000	My Youssef
C126	21 juin 2000	My Youssef
C127	21 juin 2000	My Youssef
C128	21 juin 2000	My Youssef
C129	21 juin 2000	My Youssef
C130	21 juin 2000	My Youssef
C131	21 juin 2000	My Youssef
C132	21 juin 2000	My Youssef
C133	21 juin 2000	My Youssef
C134	21 juin 2000	My Youssef
C135	21 juin 2000	My Youssef
C136	21 juin 2000	My Youssef
C137	21 juin 2000	My Youssef
C138	21 juin 2000	My Youssef
C139	21 juin 2000	My Youssef
C140	21 juin 2000	My Youssef
C141	21 juin 2000	My Youssef
C142	21 juin 2000	My Youssef
C143	21 juin 2000	My Youssef

Code	Date de réception	Origine du prélèvement
C144	21 juin 2000	My Youssef
C145	22 juin 2000	Ibn Sina
C146	22 juin 2000	Ibn Sina
C147	22 juin 2000	Ibn Sina
C148	22 juin 2000	Ibn Sina
C149	22 juin 2000	Ibn Sina
C150	28 juin 2000	My Youssef
C151	28 juin 2000	My Youssef
C152	28 juin 2000	My Youssef
C153	28 juin 2000	My Youssef
C154	28 juin 2000	My Youssef
C155	28 juin 2000	My Youssef
C156	28 juin 2000	My Youssef
C157	28 juin 2000	My Youssef
C158	28 juin 2000	My Youssef
C159	28 juin 2000	My Youssef
C160	28 juin 2000	My Youssef
C161	28 juin 2000	My Youssef
C162	28 juin 2000	My Youssef
C163	28 juin 2000	My Youssef
C164	06 juillet 2000	My Youssef
C165	06 juillet 2000	My Youssef
C166	06 juillet 2000	My Youssef
C167	06 juillet 2000	My Youssef
C168	06 juillet 2000	My Youssef
C169	06 juillet 2000	My Youssef
C170	06 juillet 2000	My Youssef
C171	06 juillet 2000	My Youssef
C172	06 juillet 2000	My Youssef
C173	06 juillet 2000	My Youssef
C174	06 juillet 2000	My Youssef
C175	06 juillet 2000	My Youssef
C176	06 juillet 2000	My Youssef
C177	06 juillet 2000	My Youssef
C178	06 juillet 2000	My Youssef
C179	06 juillet 2000	My Youssef
C180	06 juillet 2000	My Youssef
C181	06 juillet 2000	My Youssef
C182	06 juillet 2000	My Youssef
C183	20 juillet 2000	My Youssef
C184	20 juillet 2000	My Youssef
C185	20 juillet 2000	My Youssef
C186	20 juillet 2000	My Youssef
C187	20 juillet 2000	My Youssef
C188	20 juillet 2000	My Youssef
C189	20 juillet 2000	My Youssef
C190	20 juillet 2000	My Youssef
C191	20 juillet 2000	My Youssef
C192	20 juillet 2000	My Youssef

Code	Date de réception	Origine du prélèvement
C193	20 juillet 2000	My Youssef
C194	20 juillet 2000	My Youssef
C195	20 juillet 2000	My Youssef
C196	20 juillet 2000	My Youssef
C197	07 février 2001	My Youssef
C198	07 février 2001	My Youssef
C199	27 février 2001	My Youssef
C200	02 mars 2001	My Youssef

Tableau B: Souches de référence Internationale

Numéro de référence	Espèces correspondantes
A ₁	<i>Mycobacterium</i> Neotype ATCC 19210
A ₂	MTB Neotype: <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
A ₃	H ₃₇ Rv: <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
A ₄	MPTB Neotype: <i>Mycobacterium paratuberculosis</i>
A ₅	<i>Mycobacterium chelonii</i> Lab
A ₆	<i>Mycobacterium Fortuitum</i> 3191
A ₇	<i>Mycobacterium avium</i> Neotype ATCC
A ₈	<i>Mycobacterium bovis</i> Glasgow BCG
A ₉	<i>Mycobacterium bovis</i> Tice
A ₁₀	<i>Mycobacterium bovis</i> Tice
A ₁₁	<i>Mycobacterium avium</i> 1T ser 1
A ₁₂	<i>Mycobacterium avium</i> 2T ser 1
A ₁₃	<i>Mycobacterium avium</i> 54T ser 2
A ₁₄	<i>Mycobacterium avium</i> 55T ser 2
A ₁₅	<i>Mycobacterium avium</i> 57T ser 4
A ₁₆	<i>Mycobacterium avium</i> 44T ser 8
A ₁₇	<i>Mycobacterium avium</i> 48T ser 8
A ₁₈	<i>Mycobacterium avium</i> 214 G (2106) ser 10
A ₁₉	<i>Mycobacterium phlei</i> 3198
A ₂₀	<i>Mycobacterium chelonae</i> NADC
A ₂₁	<i>Mycobacterium kansasii</i> 70-02425
A ₂₂	<i>Mycobacterium kansasii</i> 2572
A ₂₃	<i>Mycobacterium scrofulaceum</i> 963
A ₂₄	<i>Mycobacterium scrofulaceum</i> 730
A ₂₅	<i>Mycobacterium smegmatis</i> 607B
A ₂₆	<i>Mycobacterium smegmatis</i> Lab
A ₂₇	MPTB st 18 (<i>Mycobacterium paratuberculosis</i>)
A ₂₈	<i>Nocardia brasiliensis</i>
A ₂₉	<i>Nocardia asteroides</i>
A ₃₀	<i>Rhodococcus equi</i>
A ₃₁	<i>Mycobacterium phlei</i>
A ₃₂	<i>Mycobacterium fortuitum</i>

Tableau C: Souches de collection Marocaine

Numéro de référence	Espèces correspondantes
B ₁ BM ₁	<i>Mycobacterium bovis</i>
B ₂ BM ₂	<i>Mycobacterium bovis</i>
B ₃ BM ₃	<i>Mycobacterium bovis</i>
B ₄ BM ₄	<i>Mycobacterium bovis</i>
B ₅ BM ₅	<i>Mycobacterium bovis</i>
B ₆ BM ₆	<i>Mycobacterium bovis</i>
B ₇ BM ₇	<i>Mycobacterium bovis</i>
B ₈ BM ₈	<i>Mycobacterium bovis</i>
B ₉ BM ₉	<i>Mycobacterium avium ser1</i>
B ₁₀ BM ₁₀	<i>Mycobacterium avium ser1</i>
B ₁₁ BM ₁₁	<i>Mycobacterium avium ser1</i>
B ₁₂ BM ₁₂	<i>Mycobacterium bovis</i>
B ₁₃ BM ₁₃	<i>Mycobacterium avium ser1</i>

Tableau D: *Mycobacterium bovis* d'origine animale marocaine, isolés et identifiés au laboratoire

Casablanca	Fès	Meknès	Rabat
C ₂	F ₃	M ₂	R ₁
C ₄	F ₇	M ₇	R ₂
C ₈	F ₁₄	M ₉	R ₇
C ₁₄	F ₂₄	M ₁₂	R ₂₃
C ₇₄	F ₃₈	M ₁₃	R ₂₅
	F ₄₈	M ₁₄	R ₂₇
	F ₄₉	M ₁₅	R ₁₀₀
	F ₅₀	M ₂₁	
	F ₅₁	M ₂₅	
		M ₂₆	
		M ₂₉	
		M ₃₁	
		M ₃₄	
		M ₃₇	
		M ₃₈	
		M ₄₄	
		M ₄₅	
		M ₄₆	
		M ₂₅₂	

Tableau E: *Mycobacterium bovis* et Mycobactéries atypiques isolés à partir des expectorations (échantillons humains) et identifiés au laboratoire

Numéro de référence	Identification	Numéro de référence	Identification
C ₃₄	<i>M.bovis</i>	C ₁₀	Mycobactéries atypiques
C ₆₅	<i>M.bovis</i>	C ₃₂	Mycobactéries atypiques
C ₆₆	<i>M.bovis</i>	C ₅₁	Mycobactéries atypiques
C ₇₁	<i>M.bovis</i>	C ₆₀	Mycobactéries atypiques
C ₁₁₆	<i>M.bovis</i>	C ₆₂	Mycobactéries atypiques
C ₁₁₇	<i>M.bovis</i>	C ₁₁₉	Mycobactéries atypiques
C ₁₁₈	<i>M.bovis</i>	C ₁₂₇	Mycobactéries atypiques
C ₁₂₃	<i>M.bovis</i>	C ₁₂₈	Mycobactéries atypiques
C ₁₂₄	<i>M.bovis</i>	C ₁₃₆	Mycobactéries atypiques
C ₁₂₅	<i>M.bovis</i>	C ₁₃₈	Mycobactéries atypiques
C ₁₃₅	<i>M.bovis</i>	C ₁₄₅	Mycobactéries atypiques
C ₁₇₀	<i>M.bovis</i>	C ₁₅₀	Mycobactéries atypiques
C ₁₇₄	<i>M.bovis</i>	C ₁₅₅	Mycobactéries atypiques
C ₁₈₆	<i>M.bovis</i>	C ₁₅₆	Mycobactéries atypiques
C ₁₉₀	<i>M.bovis</i>	C ₁₅₈	Mycobactéries atypiques
C ₁₉₄	<i>M.bovis</i>	C ₁₆₀	Mycobactéries atypiques
C ₁₉₅	<i>M.bovis</i>	C ₁₆₉	Mycobactéries atypiques
C ₁₉₆	<i>M.bovis</i>	C ₁₇₂	Mycobactéries atypiques
		C ₁₇₆	Mycobactéries atypiques
		C ₁₇₇	Mycobactéries atypiques
		C ₁₈₃	Mycobactéries atypiques
		C ₁₈₄	Mycobactéries atypiques
		C ₁₉₃	Mycobactéries atypiques

Tableau F: *Mycobacterium tuberculosis* isolés à partir des expectorations (échantillons humains) et identifiés au laboratoire

Numéro de référence	Identification	Numéro de référence	Identification
C ₉	<i>M. tuberculosis</i>	C ₁₂₉	<i>M. tuberculosis</i>
C ₁₆	<i>M. tuberculosis</i>	C ₁₃₀	<i>M. tuberculosis</i>
C ₃₁	<i>M. tuberculosis</i>	C ₁₃₁	<i>M. tuberculosis</i>
C ₃₃	<i>M. tuberculosis</i>	C ₁₃₂	<i>M. tuberculosis</i>
C ₃₅	<i>M. tuberculosis</i>	C ₁₃₃	<i>M. tuberculosis</i>
C ₃₈	<i>M. tuberculosis</i>	C ₁₃₄	<i>M. tuberculosis</i>
C ₃₉	<i>M. tuberculosis</i>	C ₁₃₇	<i>M. tuberculosis</i>
C ₄₀	<i>M. tuberculosis</i>	C ₁₃₉	<i>M. tuberculosis</i>
C ₄₁	<i>M. tuberculosis</i>	C ₁₄₁	<i>M. tuberculosis</i>
C ₄₂	<i>M. tuberculosis</i>	C ₁₄₃	<i>M. tuberculosis</i>
C ₄₃	<i>M. tuberculosis</i>	C ₁₄₆	<i>M. tuberculosis</i>
C ₅₄	<i>M. tuberculosis</i>	C ₁₄₈	<i>M. tuberculosis</i>
C ₅₅	<i>M. tuberculosis</i>	C ₁₅₁	<i>M. tuberculosis</i>
C ₅₇	<i>M. tuberculosis</i>	C ₁₅₂	<i>M. tuberculosis</i>
C ₅₈	<i>M. tuberculosis</i>	C ₁₅₃	<i>M. tuberculosis</i>
C ₆₄	<i>M. tuberculosis</i>	C ₁₅₄	<i>M. tuberculosis</i>
C ₆₉	<i>M. tuberculosis</i>	C ₁₅₇	<i>M. tuberculosis</i>
C ₇₉	<i>M. tuberculosis</i>	C ₁₆₂	<i>M. tuberculosis</i>
C ₈₀	<i>M. tuberculosis</i>	C ₁₆₄	<i>M. tuberculosis</i>
C ₈₄	<i>M. tuberculosis</i>	C ₁₆₅	<i>M. tuberculosis</i>
C ₁₁₀	<i>M. tuberculosis</i>	C ₁₆₆	<i>M. tuberculosis</i>
C ₁₁₁	<i>M. tuberculosis</i>	C ₁₆₇	<i>M. tuberculosis</i>
C ₁₁₂	<i>M. tuberculosis</i>	C ₁₇₁	<i>M. tuberculosis</i>
C ₁₁₃	<i>M. tuberculosis</i>	C ₁₇₅	<i>M. tuberculosis</i>
C ₁₁₄	<i>M. tuberculosis</i>	C ₁₇₉	<i>M. tuberculosis</i>
C ₁₁₅	<i>M. tuberculosis</i>	C ₁₈₀	<i>M. tuberculosis</i>
C ₁₂₀	<i>M. tuberculosis</i>	C ₁₈₂	<i>M. tuberculosis</i>
C ₁₂₁	<i>M. tuberculosis</i>	C ₁₈₇	<i>M. tuberculosis</i>
C ₁₂₂	<i>M. tuberculosis</i>	C ₁₈₉	<i>M. tuberculosis</i>
C ₁₂₆	<i>M. tuberculosis</i>	C ₁₉₁	<i>M. tuberculosis</i>

Tableau N°28: Séquences et positions des amorces utilisées

Amorce	Séquences des amorces	Position des amorces	Produit de PCR	Références
INS1	5'CGTGAGGGCATCGAGGTGGC 3'	633-652	245pb	Ross & Dwyer, 1993
INS2*	5'ACGTAGGCGTCGGTGACAAA 3'	858-877		
T4**	5'CACCGTCGAACGGCTGATGA 3'	659-678	123pb	Eisenach <i>et al.</i> , 1990
T5	5'CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG 3'	762-781		

* : Complément de INS1

** : Complément de T5

