

UNIVERSITE MOHAMMED V - SOUISSI
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE -RABAT-

ANNEE: 2014

THESE N°: 54

**APPORT DE LA BIOLOGIE MOLECULAIRE
DANS LE DIAGNOSTIC DE LA TUBERCULOSE**

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement le :.....

PAR

Mlle. Khadija El BOUSKOURI

Née le 01 Avril 1988 à AZILAL.

Pour l'Obtention du Doctorat en Pharmacie

MOTS CLES : Tuberculose – Biologie moléculaire – Diagnostic – Résistance.

JURY

Mr. A. BELMEKKI Professeur d'Hématologie	PRESIDENT
Mr. S. ZOUHAIR Professeur de Microbiologie	RAPPORTEUR
Mr. Y. SEKHSOKH Professeur de Microbiologie	} JUGES
Mme. L. ARSALANE Professeur Agrégé de Microbiologie	
Mme. H. KEBBAJ Professeur Agrégé de Microbiologie	

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

سبحانك لا علم لنا إلا ما علمتنا
إنك أنت العليم الحكيم

سورة البقرة: الآية: 31

صِدْقَ اللَّهِ الْعَظِيمِ



UNIVERSITE MOHAMMED V- SOUISSI

FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE - RABAT

DOYENS HONORAIRES :

1962 – 1969 : **Professeur Abdelmalek FARAJ**
1969 – 1974 : Professeur Abdellatif BERBICH
1974 – 1981 : Professeur Bachir LAZRAK
1981 – 1989 : Professeur Taieb CHKILI
1989 – 1997 : Professeur Mohamed Tahar ALAOUI
1997 – 2003 : Professeur Abdelmajid BELMAHI
2003 – 2013 : Professeur Najia HAJJAJ - HASSOUNI



ADMINISTRATION :

Doyen : Professeur Mohamed ADNAOUI
Vice Doyen chargé des Affaires Académiques et étudiantes
Professeur Mohammed AHALLAT
Vice Doyen chargé de la Recherche et de la Coopération
Professeur Taoufiq DAKKA
Vice Doyen chargé des Affaires Spécifiques à la Pharmacie
Professeur Jamal TAOUFIK
Secrétaire Général : Mr. El Hassane AHALLAT

1- ENSEIGNANTS-CHERCHEURS MEDECINS ET PHARMACIENS

PROFESSEURS :

Mai et Octobre 1981

Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajih
Pr. TAOBANE Hamid*

Chirurgie Cardio-Vasculaire
Chirurgie Thoracique

Mai et Novembre 1982

Pr. BENOSMAN Abdellatif

Chirurgie Thoracique

Novembre 1983

Pr. HAJJAJ Najia ép. HASSOUNI

Rhumatologie

Décembre 1984

Pr. MAAOUNI Abdelaziz
Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajdi
Pr. SETTAF Abdellatif

Médecine Interne
Anesthésie -Réanimation
Chirurgie

Novembre et Décembre 1985

Pr. BENJELLOUN Halima
Pr. BENS Aid Younes
Pr. EL ALAOUI Faris Moulay El Mostafa

Cardiologie
Pathologie Chirurgicale
Neurologie

Janvier, Février et Décembre 1987

Pr. AJANA Ali
Pr. CHAHED OUZZANI Houria
Pr. EL YAACOUBI Moradh
Pr. ESSAID EL FEYDI Abdellah
Pr. LACHKAR Hassan
Pr. YAHYAOUI Mohamed

Décembre 1988

Pr. BENHAMAMOUCHE Mohamed Najib
Pr. DAFIRI Rachida
Pr. HERMAS Mohamed

Décembre 1989 Janvier et Novembre 1990

Pr. ADNAOUI Mohamed
Pr. BOUKILI MAKHOUKHI Abdelali*
Pr. CHAD Bouziane
Pr. CHKOFF Rachid
Pr. HACHIM Mohammed*
Pr. KHARBACH Aïcha
Pr. MANSOURI Fatima
Pr. OUZZANI Taïbi Mohamed Réda
Pr. TAZI Saoud Anas

Février Avril Juillet et Décembre 1991

Pr. AL HAMANY Zaïtounia
Pr. AZZOUZI Abderrahim
Pr. BAYAHIA Rabéa
Pr. BELKOUCHI Abdelkader
Pr. BENABDELLAH Chahrazad
Pr. BENCHEKROUN Belabbes Abdellatif
Pr. BENSOUDA Yahia
Pr. BERRAHO Amina
Pr. BEZZAD Rachid
Pr. CHABRAOUI Layachi
Pr. CHERRAH Yahia
Pr. CHOKAIRI Omar
Pr. JANATI Idrissi Mohamed*
Pr. KHATTAB Mohamed
Pr. SOULAYMANI Rachida
Pr. TAOUFIK Jamal

Décembre 1992

Pr. AHALLAT Mohamed
Pr. BENSOUDA Adil
Pr. BOUJIDA Mohamed Najib
Pr. CHAHED OUZZANI Laaziza
Pr. CHRAIBI Chafiq

Radiologie
Gastro-Entérologie
Traumatologie Orthopéd
Gastro-Entérologie
Médecine Interne
Neurologie

Chirurgie Pédiatrique
Radiologie
Traumatologie Orthopédie

Médecine Interne
Cardiologie
Pathologie Chirurgicale
Pathologie Chirurgicale
Médecine-Interne
Gynécologie -Obstétrique
Anatomie-Pathologique
Neurologie
Anesthésie Réanimation

Anatomie-Pathologique
Anesthésie Réanimation
Néphrologie
Chirurgie Générale
Hématologie
Chirurgie Générale
Pharmacie galénique
Ophtalmologie
Gynécologie Obstétrique
Biochimie et Chimie
Pharmacologie
Histologie Embryologie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Pharmacologie
Chimie thérapeutique

Chirurgie Générale
Anesthésie Réanimation
Radiologie
Gastro-Entérologie
Gynécologie Obstétrique



Pr. DAOUDI Rajae
Pr. DEHAYNI Mohamed*
Pr. EL OUAHABI Abdessamad
Pr. FELLAT Rokaya
Pr. GHAFIR Driss*
Pr. JIDDANE Mohamed
Pr. OUAZZANI Taibi Med Charaf Eddine
Pr. TAGHY Ahmed
Pr. ZOUHDI Mimoun

Mars 1994

Pr. BENJAAFAR Nouredine
Pr. BEN RAIS Nozha
Pr. CAOUI Malika
Pr. CHRAIBI Abdelmjid
Pr. EL AMRANI Sabah
Pr. EL AOUAD Rajae
Pr. EL BARDOUNI Ahmed
Pr. EL HASSANI My Rachid
Pr. ERROUGANI Abdelkader
Pr. ESSAKALI Malika
Pr. ETTAYEBI Fouad
Pr. HADRI Larbi*
Pr. HASSAM Badredine
Pr. IFRINE Lahssan
Pr. JELTHI Ahmed
Pr. MAHFOUD Mustapha
Pr. MOUDENE Ahmed*
Pr. RHRAB Brahim
Pr. SENOUCI Karima

Mars 1994

Pr. ABBAR Mohamed*
Pr. ABDELHAK M'barek
Pr. BELAIDI Halima
Pr. BRAHMI Rida Slimane
Pr. BENTAHILA Abdelali
Pr. BENYAHIA Mohammed Ali
Pr. BERRADA Mohamed Saleh
Pr. CHAMI Ilham
Pr. CHERKAOUI Lalla Ouafae
Pr. EL ABBADI Najia
Pr. HANINE Ahmed*
Pr. JALIL Abdelouahed
Pr. LAKHDAR Amina
Pr. MOUANE Nezha

Ophtalmologie
Gynécologie Obstétr
Neurochirurgie
Cardiologie
Médecine Interne
Anatomie
Gynécologie Obstét
Chirurgie Générale
Microbiologie



Radiothérapie
Biophysique
Biophysique
Endocrinologie et Maladies Métaboliques
Gynécologie Obstétrique
Immunologie
Traumato-Orthopédie
Radiologie
Chirurgie Générale
Immunologie
Chirurgie Pédiatrique
Médecine Interne
Dermatologie
Chirurgie Générale
Anatomie Pathologique
Traumatologie – Orthopédie
Traumatologie- Orthopédie
Gynécologie –Obstétrique
Dermatologie

Urologie
Chirurgie – Pédiatrique
Neurologie
Gynécologie Obstétrique
Pédiatrie
Gynécologie – Obstétrique
Traumatologie – Orthopédie
Radiologie
Ophtalmologie
Neurochirurgie
Radiologie
Chirurgie Générale
Gynécologie Obstétrique
Pédiatrie

Mars 1995

Pr. ABOUQUAL Redouane
Pr. AMRAOUI Mohamed
Pr. BAIDADA Abdelaziz
Pr. BARGACH Samir
Pr. CHAARI Jilali*
Pr. DIMOU M'barek*
Pr. DRISSI KAMILI Med Nordine*
Pr. EL MESNAOUI Abbes
Pr. ESSAKALI HOUSSYNI Leila
Pr. HDA Abdelhamid*
Pr. IBEN ATTYA ANDALOUSSI Ahmed
Pr. MANSOURI Aziz*
Pr. OUAZZANI CHAHDI Bahia
Pr. SEFIANI Abdelaziz
Pr. ZEGGWAGH Amine Ali

Décembre 1996

Pr. AMIL Touriya*
Pr. BELKACEM Rachid
Pr. BOULANOVAR Abdelkrim
Pr. EL ALAMI EL FARICHA EL Hassan
Pr. GAOUZI Ahmed
Pr. MAHFOUDI M'barek*
Pr. MOHAMMADI Mohamed
Pr. OUADGHIRI Mohamed
Pr. OUZEDDOUN Naima
Pr. ZBIR EL Mehdi*

Novembre 1997

Pr. ALAMI Mohamed Hassan
Pr. BEN SLIMANE Lounis
Pr. BIROUK Nazha
Pr. CHAOUIR Souad*
Pr. ERREIMI Naima
Pr. FELLAT Nadia
Pr. GUEDDARI Fatima Zohra
Pr. HAIMEUR Charki*
Pr. KADDOURI Noureddine
Pr. KOUTANI Abdellatif
Pr. LAHLOU Mohamed Khalid
Pr. MAHRAOUI CHAFIQ
Pr. OUAHABI Hamid*
Pr. TAOUFIQ Jallal
Pr. YOUSFI MALKI Mounia

Réanimation Médicale
Chirurgie Générale
Gynécologie Obstétrique
Gynécologie Obstétrique
Médecine Interne
Anesthésie Réanimation
Anesthésie Réanimation
Chirurgie Générale
Oto-Rhino-Laryngologi
Cardiologie
Urologie
Radiothérapie
Ophtalmologie
Génétique
Réanimation Médicale



Radiologie
Chirurgie Pédiatrie
Ophtalmologie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Radiologie
Médecine Interne
Traumatologie-Orthopédie
Néphrologie
Cardiologie

Gynécologie-Obstétrique
Urologie
Neurologie
Radiologie
Pédiatrie
Cardiologie
Radiologie
Anesthésie Réanimation
Chirurgie Pédiatrique
Urologie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Neurologie
Psychiatrie
Gynécologie Obstétrique

Novembre 1998

Pr. AFIFI RAJAA
Pr. BENOMAR ALI
Pr. BOUGTAB Abdesslam
Pr. ER RIHANI Hassan
Pr. EZZAITOUNI Fatima
Pr. LAZRAK Khalid *
Pr. BENKIRANE Majid*
Pr. KHATOURI ALI*
Pr. LABRAIMI Ahmed*

Janvier 2000

Pr. ABID Ahmed*
Pr. AIT OUMAR Hassan
Pr. BENJELLOUN Dakhama Badr.Sououd
Pr. BOURKADI Jamal-Eddine
Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Al Montacer
Pr. ECHARRAB El Mahjoub
Pr. EL FTOUH Mustapha
Pr. EL MOSTARCHID Brahim*
Pr. EL OTMANY Azzedine
Pr. ISMAILI Mohamed Hatim
Pr. ISMAILI Hassane*
Pr. KRAMI Hayat Ennoufouss
Pr. MAHMOUDI Abdelkrim*
Pr. TACHINANTE Rajae
Pr. TAZI MEZALEK Zoubida

Novembre 2000

Pr. AIDI Saadia
Pr. AIT OURHROUI Mohamed
Pr. AJANA Fatima Zohra
Pr. BENAMR Said
Pr. CHERTI Mohammed
Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Selma
Pr. EL HASSANI Amine
Pr. EL KHADER Khalid
Pr. EL MAGHRAOUI Abdellah*
Pr. GHARBI Mohamed El Hassan
Pr. HSSAIDA Rachid*
Pr. LAHLOU Abdou
Pr. MAFTAH Mohamed*
Pr. MAHASSINI Najat
Pr. MDAGHRI ALAOUI Asmae
Pr. NASSIH Mohamed*
Pr. ROUIMI Abdelhadi*

Gastro-Entérologie
Neurologie
Chirurgie Générale
Oncologie Médicale
Néphrologie
Traumatologie Orthopédie
Hématologie
Cardiologie
Anatomie Pathologique

Pneumophtisiologie
Pédiatrie
Pédiatrie
Pneumo-phtisiologie
Chirurgie Générale
Chirurgie Générale
Pneumo-phtisiologie
Neurochirurgie
Chirurgie Générale
Anesthésie-Réanimation
Traumatologie Orthopédie
Gastro-Entérologie
Anesthésie-Réanimation
Anesthésie-Réanimation
Médecine Interne

Neurologie
Dermatologie
Gastro-Entérologie
Chirurgie Générale
Cardiologie
Anesthésie-Réanimation
Pédiatrie
Urologie
Rhumatologie
Endocrinologie et Maladies Métaboliques
Anesthésie-Réanimation
Traumatologie Orthopédie
Neurochirurgie
Anatomie Pathologique
Pédiatrie
Stomatologie Et Chirurgie Maxillo-Faciale
Neurologie



Décembre 2000

Pr. ZOHAI ABDELAH*

Décembre 2001

Pr. ABABOU Adil
Pr. BALKHI Hicham*
Pr. BELMEKKI Mohammed
Pr. BENABDELJLIL Maria
Pr. BENAMAR Loubna
Pr. BENAMOR Jouda
Pr. BENELBARHDADI Imane
Pr. BENNANI Rajae
Pr. BENOACHANE Thami
Pr. BENYOUSSEF Khalil
Pr. BERRADA Rachid
Pr. BEZZA Ahmed*
Pr. BOUCHIKHI IDRISSE Med Larbi
Pr. BOUMDIN El Hassane*
Pr. CHAT Latifa
Pr. DAALI Mustapha*
Pr. DRISSI Sidi Mourad*
Pr. EL HIJRI Ahmed
Pr. EL MAAQILI Moulay Rachid
Pr. EL MADHI Tarik
Pr. EL MOUSSAIF Hamid
Pr. EL OUNANI Mohamed
Pr. ETTAIR Said
Pr. GAZZAZ Miloudi*
Pr. GOURINDA Hassan
Pr. HRORA Abdelmalek
Pr. KABBAJ Saad
Pr. KABIRI EL Hassane*
Pr. LAMRANI Moulay Omar
Pr. LEKEHAL Brahim
Pr. MAHASSIN Fattouma*
Pr. MEDARHRI Jalil
Pr. MIKDAME Mohammed*
Pr. MOHSINE Raouf
Pr. NOUINI Yassine
Pr. SABBAH Farid
Pr. SEFIANI Yasser
Pr. TAOUFIQ BENCHEKROUN Soumia

ORL

Anesthésie-Réanimation
Anesthésie-Réanimation
Ophtalmologie
Neurologie
Néphrologie
Pneumo-phtisiologie
Gastro-Entérologie
Cardiologie
Pédiatrie
Dermatologie
Gynécologie Obstétrique
Rhumatologie
Anatomie
Radiologie
Radiologie
Chirurgie Générale
Radiologie
Anesthésie-Réanimation
Neuro-Chirurgie
Chirurgie-Pédiatrique
Ophtalmologie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Neuro-Chirurgie
Chirurgie-Pédiatrique
Chirurgie Générale
Anesthésie-Réanimation
Chirurgie Thoracique
Traumatologie Orthopédie
Chirurgie Vasculaire Périphérique
Médecine Interne
Chirurgie Générale
Hématologie Clinique
Chirurgie Générale
Urologie
Chirurgie Générale
Chirurgie Vasculaire Périphérique
Pédiatrie



Décembre 2002

Pr. AL BOUZIDI Abderrahmane*
Pr. AMEUR Ahmed *
Pr. AMRI Rachida
Pr. AOURARH Aziz*
Pr. BAMOU Youssef *
Pr. BELMEJDOUB Ghizlene*
Pr. BENZEKRI Laila
Pr. BENZZOUBEIR Nadia
Pr. BERNOUSSI Zakiya
Pr. BICHRA Mohamed Zakariya*
Pr. CHOHO Abdelkrim *
Pr. CHKIRATE Bouchra
Pr. EL ALAMI EL FELLOUS Sidi Zouhair
Pr. EL BARNOUSSI Leila
Pr. EL HAOURI Mohamed *
Pr. EL MANSARI Omar*
Pr. ES-SADEL Abdelhamid
Pr. FILALI ADIB Abdelhai
Pr. HADDOUR Leila
Pr. HAJJI Zakia
Pr. IKEN Ali
Pr. ISMAEL Farid
Pr. JAAFAR Abdeloihab*
Pr. KRIOUILE Yamina
Pr. LAGHMARI Mina
Pr. MABROUK Hfid*
Pr. MOUSSAOUI RAHALI Driss*
Pr. MOUSTAGHFIR Abdelhamid*
Pr. NAITLHO Abdelhamid*
Pr. OUJILAL Abdelilah
Pr. RACHID Khalid *
Pr. RAISS Mohamed
Pr. RGUIBI IDRISSE Sidi Mustapha*
Pr. RHOU Hakima
Pr. SIAH Samir *
Pr. THIMOU Amal
Pr. ZENTAR Aziz*

Janvier 2004

Pr. ABDELLAH El Hassan
Pr. AMRANI Mariam
Pr. BENBOUZID Mohammed Anas
Pr. BENKIRANE Ahmed*
Pr. BOUGHALEM Mohamed*

Anatomie Pathologique
Urologie
Cardiologie
Gastro-Entérologie
Biochimie-Chimie
Endocrinologie et Maladies Métaboliques
Dermatologie
Gastro-Entérologie
Anatomie Pathologique
Psychiatrie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Chirurgie Pédiatrique
Gynécologie Obstétrique
Dermatologie
Chirurgie Générale
Chirurgie Générale
Gynécologie Obstétrique
Cardiologie
Ophtalmologie
Urologie
Traumatologie Orthopédie
Traumatologie Orthopédie
Pédiatrie
Ophtalmologie
Traumatologie Orthopédie
Gynécologie Obstétrique
Cardiologie
Médecine Interne
Oto-Rhino-Laryngologie
Traumatologie Orthopédie
Chirurgie Générale
Pneumophtisiologie
Néphrologie
Anesthésie Réanimation
Pédiatrie
Chirurgie Générale

Ophtalmologie
Anatomie Pathologique
Oto-Rhino-Laryngologie
Gastro-Entérologie
Anesthésie Réanimation



Pr. BOULAADAS Malik
 Pr. BOURAZZA Ahmed*
 Pr. CHAGAR Belkacem*
 Pr. CHERRADI Nadia
 Pr. EL FENNI Jamal*
 Pr. EL HANCHI ZAKI
 Pr. EL KHORASSANI Mohamed
 Pr. EL YOUNASSI Badreddine*
 Pr. HACHI Hafid
 Pr. JABOUIRIK Fatima
 Pr. KHABOUZE Samira
 Pr. KHARMAZ Mohamed
 Pr. LEZREK Mohammed*
 Pr. MOUGHIL Said
 Pr. OUBAAZ Abdelbarre*
 Pr. TARIB Abdelilah*
 Pr. TIJAMI Fouad
 Pr. ZARZUR Jamila

Janvier 2005

Pr. ABBASSI Abdellah
 Pr. AL KANDRY Sif Eddine*
 Pr. ALAOUI Ahmed Essaid
 Pr. ALLALI Fadoua
 Pr. AMAZOUZI Abdellah
 Pr. AZIZ Nouredine*
 Pr. BAHIRI Rachid
 Pr. BARKAT Amina
 Pr. BENHALIMA Hanane
 Pr. BENYASS Aatif
 Pr. BERNOUSSI Abdelghani
 Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Mohamed
 Pr. DOUDOUH Abderrahim*
 Pr. EL HAMZAOUI Sakina*
 Pr. HAJJI Leila
 Pr. HESSISSEN Leila
 Pr. JIDAL Mohamed*
 Pr. LAAROUSSI Mohamed
 Pr. LYAGOUBI Mohammed
 Pr. NIAMANE Radouane*
 Pr. RAGALA Abdelhak
 Pr. SBIHI Souad
 Pr. ZERAIDI Najia

Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
 Neurologie
 Traumatologie Orthopédie
 Anatomie Pathologique
 Radiologie
 Gynécologie Obstétrique
 Pédiatrie
 Cardiologie
 Chirurgie Générale
 Pédiatrie
 Gynécologie Obstétrique
 Traumatologie Orthopédie
 Urologie
 Chirurgie Cardio-Vasculaire
 Ophtalmologie
 Pharmacie Clinique
 Chirurgie Générale
 Cardiologie



Chirurgie Réparatrice et Plastique
 Chirurgie Générale
 Microbiologie
 Rhumatologie
 Ophtalmologie
 Radiologie
 Rhumatologie
 Pédiatrie
 Stomatologie et Chirurgie Maxillo Faciale
 Cardiologie
 Ophtalmologie
 Ophtalmologie
 Biophysique
 Microbiologie
 Cardiologie (mise en disposition)
 Pédiatrie
 Radiologie
 Chirurgie Cardio-vasculaire
 Parasitologie
 Rhumatologie
 Gynécologie Obstétrique
 Histo-Embryologie Cytogénétique
 Gynécologie Obstétrique

Décembre 2005

Pr. CHANI Mohamed

Avril 2006

Pr. ACHEMLAL Lahsen*

Pr. AKJOUJ Said*

Pr. BELMEKKI Abdelkader*

Pr. BENCHEIKH Razika

Pr. BIYI Abdelhamid*

Pr. BOUHAFS Mohamed El Amine

Pr. BOULAHYA Abdellatif*

Pr. CHENGUETI ANSARI Anas

Pr. DOGHMI Nawal

Pr. ESSAMRI Wafaa

Pr. FELLAT Ibtissam

Pr. FAROUDY Mamoun

Pr. GHADOUANE Mohammed*

Pr. HARMOUCHE Hicham

Pr. HANAFI Sidi Mohamed*

Pr. IDRIS LAHLOU Amine*

Pr. JROUNDI Laila

Pr. KARMOUNI Tariq

Pr. KILI Amina

Pr. KISRA Hassan

Pr. KISRA Mounir

Pr. LAATIRIS Abdelkader*

Pr. LMIMOUNI Badreddine*

Pr. MANSOURI Hamid*

Pr. OUANASS Abderrazzak

Pr. SAFI Soumaya*

Pr. SEKKAT Fatima Zahra

Pr. SOUALHI Mouna

Pr. TELLAL Saida*

Pr. ZAHRAOUI Rachida

Octobre 2007

Pr. ABIDI Khalid

Pr. ACHACHI Leila

Pr. ACHOUR Abdessamad*

Pr. AIT HOUSSA Mahdi*

Pr. AMHAJJI Larbi*

Pr. AMMAR Haddou*

Pr. AOUI Sarra

Pr. BAITE Abdelouahed*

Pr. BALOUCH Lhousaine*

Pr. BENZIANE Hamid*

Anesthésie Réanimation

Rhumatologie

Radiologie

Hématologie

O.R.L

Biophysique

Chirurgie - Pédiatrique

Chirurgie Cardio – Vasculaire

Gynécologie Obstétrique

Cardiologie

Gastro-entérologie

Cardiologie

Anesthésie Réanimation

Urologie

Médecine Interne

Anesthésie Réanimation

Microbiologie

Radiologie

Urologie

Pédiatrie

Psychiatrie

Chirurgie – Pédiatrique

Pharmacie Galénique

Parasitologie

Radiothérapie

Psychiatrie

Endocrinologie

Psychiatrie

Pneumo – Phtisiologie

Biochimie

Pneumo – Phtisiologie

Réanimation médicale

Pneumo phtisiologie

Chirurgie générale

Chirurgie cardio vasculaire

Traumatologie orthopédie

ORL

Parasitologie

Anesthésie réanimation

Biochimie-chimie

Pharmacie clinique



Pr. BOUTIMZINE Nourdine
Pr. CHARKAOUI Naoual*
Pr. EHIRCHIOU Abdelkader*
Pr. ELABSI Mohamed
Pr. EL BEKKALI Youssef*
Pr. EL MOUSSAOUI Rachid
Pr. EL OMARI Fatima
Pr. GANA Rachid
Pr. GHARIB Nouredine
Pr. HADADI Khalid*
Pr. ICHOU Mohamed*
Pr. ISMAILI Nadia
Pr. KEBDANI Tayeb
Pr. LALAOUI SALIM Jaafar*
Pr. LOUZI Lhoussain*
Pr. MADANI Naoufel
Pr. MAHI Mohamed*
Pr. MARC Karima
Pr. MASRAR Azlarab
Pr. MOUSSAOUI Abdelmajid
Pr. MOUTAJ Redouane *
Pr. MRABET Mustapha*
Pr. MRANI Saad*
Pr. OUZZIF Ez zohra*
Pr. RABHI Monsef*
Pr. RADOUANE Bouchaib*
Pr. SEFFAR Myriame
Pr. SEKHSOKH Yessine*
Pr. SIFAT Hassan*
Pr. TABERKANET Mustafa*
Pr. TACHFOUTI Samira
Pr. TAJDINE Mohammed Tariq*
Pr. TANANE Mansour*
Pr. TLIGUI Houssain
Pr. TOUATI Zakia

Décembre 2007

Pr. DOUHAL ABDERRAHMAN

Décembre 2008

Pr. ZOUBIR Mohamed*

Pr. TAHIRI My El Hassan*

Mars 2009

Pr. ABOUZAHIR Ali*

Pr. AGDR Aomar*

Pr. AIT ALI Abdelmounaim*

Ophtalmologie
Pharmacie galénique
Chirurgie générale
Chirurgie générale
Chirurgie cardio vasculaire
Anesthésie réanimation
Psychiatrie
Neuro chirurgie
Chirurgie plastique et réparatrice
Radiothérapie
Oncologie médicale
Dermatologie
Radiothérapie
Anesthésie réanimation
Microbiologie
Réanimation médicale
Radiologie
Pneumo phtisiologie
Hématologique
Anesthésier réanimation
Parasitologie
Médecine préventive santé publique et hygiène
Virologie
Biochimie-chimie
Médecine interne
Radiologie
Microbiologie
Microbiologie
Radiothérapie
Chirurgie vasculaire périphérique
Ophtalmologie
Chirurgie générale
Traumatologie orthopédie
Parasitologie
Cardiologie



Ophtalmologie

Anesthésie Réanimation

Chirurgie Générale

Médecine interne

Pédiatre

Chirurgie Générale

Pr. AIT BENHADDOU El hachmia
 Pr. AKHADDAR Ali*
 Pr. ALLALI Nazik
 Pr. AMAHZOUNE Brahim*
 Pr. AMINE Bouchra
 Pr. ARKHA Yassir
 Pr. AZENDOUR Hicham*
 Pr. BELYAMANI Lahcen*
 Pr. BJIJOU Younes
 Pr. BOUHSAIN Sanae*
 Pr. BOUI Mohammed*
 Pr. BOUNAIM Ahmed*
 Pr. BOUSSOUGA Mostapha*
 Pr. CHAKOUR Mohammed *
 Pr. CHTATA Hassan Toufik*
 Pr. DOGHMI Kamal*
 Pr. EL MALKI Hadj Omar
 Pr. EL OUENNASS Mostapha*
 Pr. ENNIBI Khalid*
 Pr. FATHI Khalid
 Pr. HASSIKOU Hasna *
 Pr. KABBAJ Nawal
 Pr. KABIRI Meryem
 Pr. KADI Said *
 Pr. KARBOUBI Lamya
 Pr. L'KASSIMI Hachemi*
 Pr. LAMSAOURI Jamal*
 Pr. MARMADE Lahcen
 Pr. MESKINI Toufik
 Pr. MESSAOUDI Nezha *
 Pr. MSSROURI Rahal
 Pr. NASSAR Ittimade
 Pr. OUKERRAJ Latifa
 Pr. RHORFI Ismail Abderrahmani *
 Pr. ZOUHAIR Said*

PROFESSEURS AGREGES :

Octobre 2010

Pr. ALILOU Mustapha
 Pr. AMEZIANE Taoufiq*
 Pr. BELAGUID Abdelaziz
 Pr. BOUAITY Brahim*
 Pr. CHADLI Mariama*
 Pr. CHEMSI Mohamed*
 Pr. DAMI Abdellah*

Neurologie
 Neuro-chirurgie
 Radiologie
 Chirurgie Cardio-vasculaire
 Rhumatologie
 Neuro-chirurgie
 Anesthésie Réanimation
 Anesthésie Réanimation
 Anatomie
 Biochimie-chimie
 Dermatologie
 Chirurgie Générale
 Traumatologie orthopédique
 Hématologie biologique
 Chirurgie vasculaire périphérique
 Hématologie clinique
 Chirurgie Générale
 Microbiologie
 Médecine interne
 Gynécologie obstétrique
 Rhumatologie
 Gastro-entérologie
 Pédiatrie
 Traumatologie orthopédique
 Pédiatrie
 Microbiologie
 Chimie Thérapeutique
 Chirurgie Cardio-vasculaire
 Pédiatrie
 Hématologie biologique
 Chirurgie Générale
 Radiologie
 Cardiologie
 Pneumo-phtisiologie
 Microbiologie

Anesthésie réanimation
 Médecine interne
 Physiologie
 ORL
 Microbiologie
 Médecine aéronautique
 Biochimie chimie



Pr. DARBI Abdellatif*
 Pr. DENDANE Mohammed Anouar
 Pr. EL HAFIDI Naima
 Pr. EL KHARRAS Abdennasser*
 Pr. EL MAZOUZ Samir
 Pr. EL SAYEGH Hachem
 Pr. ERRABIH Ikram
 Pr. LAMALMI Najat
 Pr. LEZREK Mounir
 Pr. MALIH Mohamed*
 Pr. MOSADIK Ahlam
 Pr. MOUJAHID Mountassir*
 Pr. NAZIH Mouna*
 Pr. ZOUAIDIA Fouad

Mai 2012

Pr. AMRANI Abdelouahed
 Pr. ABOUELALAA Khalil*
 Pr. BELAIZI Mohamed*
 Pr. BENCHEBBA Drissi*
 Pr. DRISSI Mohamed*
 Pr. EL ALAOUI MHAMDI Mouna
 Pr. EL KHATTABI Abdessadek*
 Pr. EL OUAZZANI Hanane*
 Pr. ER-RAJI Mounir
 Pr. JAHID Ahmed
 Pr. MEHSSANI Jamal*
 Pr. RAISSOUNI Maha*

Février 2013

Pr. AHID Samir
 Pr. AIT EL CADI Mina
 Pr. AMRANI HANCHI Laila
 Pr. AMOUR Mourad
 Pr. AWAB Almahdi
 Pr. BELAYACHI Jihane
 Pr. BELKHADIR Zakaria Houssain
 Pr. BENCHEKROUN Laila
 Pr. BENKIRANE Souad
 Pr. BENNANA Ahmed*
 Pr. BENSEFFAJ Nadia
 Pr. BENSAGHIR Mustapha*
 Pr. BENYAHIA Mohammed*
 Pr. BOUATIA Mustapha
 Pr. BOUABID Ahmed Salim*
 Pr. BOUTARBOUCH Mahjouba
 Pr. CHAIB Ali*
 Pr. DENDANE Tarek
 Pr. DINI Nouzha*
 Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Mohamed Ali
 Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Najwa
 Pr. ELFATEMI Nizare

Radiologie
 Chirurgie pédiatrique
 Pédiatrie
 Radiologie
 Chirurgie plastique et réparatrice
 Urologie
 Gastro entérologie
 Anatomie pathologique
 Ophtalmologie
 Pédiatrie
 Anesthésie Réanimation
 Chirurgie générale
 Hématologie
 Anatomie pathologique



Chirurgie Pédiatrique
 Anesthésie Réanimation
 Psychiatrie
 Traumatologie Orthopédique
 Anesthésie Réanimation
 Chirurgie Générale
 Médecine Interne
 Pneumophtisiologie
 Chirurgie Pédiatrique
 Anatomie pathologique
 Psychiatrie
 Cardiologie

Pharmacologie – Chimie
 Toxicologie
 Gastro-ENTÉROLOGIE
 Anesthésie Réanimation
 Anesthésie Réanimation
 Réanimation Médicale
 Anesthésie Réanimation
 Biochimie-Chimie
 Hématologie
 Informatique Pharmaceutique
 Immunologie
 Anesthésie Réanimation
 Néphrologie
 Chimie Analytique
 Traumatologie Orthopédie
 Anatomie
 Cardiologie
 Réanimation Médicale
 Pédiatrie
 Anesthésie Réanimation
 Radiologie
 Neuro-Chirurgie



Pr. EL HARTI Jaouad
Pr. EL JOUDI Rachid*
Pr. EL KABABRI Maria
Pr. EL KHANNOUSSI Basma
Pr. EL KHLOUFI Samir
Pr. EL KORAICHI Alae
Pr. EN-NOUALI Hassane*
Pr. ERGUIG Laila
Pr. FIKRI Meryim
Pr. GHANIMI Zineb
Pr. GHFIR Imade
Pr. IMANE Zineb
Pr. IRAQI Hind
Pr. KABBAJ Hakima
Pr. KADIRI Mohamed*
Pr. LATIB Rachida
Pr. MAAMAR Mouna Fatima Zahra
Pr. MEDDAH Bouchra
Pr. MELHAOUI Adyl
Pr. MRABTI Hind
Pr. NEJJARI Rachid
Pr. OUBEJJA Houda
Pr. OUKABLI Mohamed*
Pr. RAHALI Younes
Pr. RATBI Ilham
Pr. RAHMANI Mounia
Pr. REDA Karim*
Pr. REGRAGUI Wafa
Pr. RKAIN Hanan
Pr. ROSTOM Samira
Pr. ROUAS Lamiaa
Pr. ROUIBAA Fedoua*
Pr. SALIHOUN Mouna
Pr. SAYAH Rochde
Pr. SEDDIK Hassan*
Pr. ZERHOUNI Hicham
Pr. ZINE Ali*

Avril 2013

Pr. EL KHATIB Mohamed Karim*
Pr. GHOUNDALE Omar*
Pr. ZYANI Mohammad*

Chimie Thérapeutique
Toxicologie
Pédiatrie
Anatomie Pathologie
Anatomie
Anesthésie Réanimation
Radiologie
Physiologie
Radiologie
Pédiatrie
Médecine Nucléaire
Pédiatrie
Endocrinologie et maladies métaboliques
Microbiologie
Psychiatrie
Radiologie
Médecine Interne
Pharmacologie
Neuro-chirurgie
Oncologie Médicale
Pharmacognosie
Chirurgie Pédiatrique
Anatomie Pathologique
Pharmacie Galénique
Génétique
Neurologie
Ophtalmologie
Neurologie
Physiologie
Rhumatologie
Anatomie Pathologique
Gastro-Entérologie
Gastro-Entérologie
Chirurgie Cardio-Vasculaire
Gastro-Entérologie
Chirurgie Pédiatrique
Traumatologie Orthopédie

Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
Urologie
Médecine Interne

***Enseignants Militaires**

2- ENSEIGNANTS – CHERCHEURS SCIENTIFIQUES

PROFESSEURS / PRs. HABILITES

Pr. ABOUDRAR Saadia
Pr. ALAMI OUHABI Naima
Pr. ALAOUI KATIM
Pr. ALAOUI SLIMANI Lalla Naïma
Pr. ANSAR M'hammed
Pr. BOUHOUCHE Ahmed
Pr. BOUKLOUZE Abdelaziz
Pr. BOURJOUANE Mohamed
Pr. CHAHED OUZZANI Lalla Chadia
Pr. DAKKA Taoufiq
Pr. DRAOUI Mustapha
Pr. EL GUESSABI Lahcen
Pr. ETTAIB Abdelkader
Pr. FAOUZI Moulay El Abbas
Pr. HAMZAOUI Laila
Pr. HMAMOUCHE Mohamed
Pr. IBRAHIMI Azeddine
Pr. KHANFRI Jamal Eddine
Pr. OULAD BOUYAHYA IDRISSE Med
Pr. REDHA Ahlam
Pr. TOUATI Driss
Pr. ZAHIDI Ahmed
Pr. ZELLOU Amina

Physiologie
Biochimie
Pharmacologie
Histologie-Embryologie
Chimie Organique et Pharmacie Chimique
Génétique Humaine
Applications Pharmaceutiques
Microbiologie
Biochimie
Physiologie
Chimie Analytique
Pharmacognosie
Zootechnie
Pharmacologie
Biophysique
Chimie Organique
Biotechnologie
Biologie
Chimie Organique
Biochimie
Pharmacognosie
Pharmacologie
Chimie Organique



Mise à jour le 13/02/2014 par le
Service des Ressources Humaines

Dédicaces



A Mon Cher Père

*Le grand militant, qui a toujours été l'exemple pour moi,
qui m'a toujours poussée à me surpasser dans tout ce que j'entreprends,
qui m'a transmis cette rage de vaincre la faim de savoir.
Celui qui a été ma source de motivation, le moteur de mes ambitions,
qui m'a appris que le savoir est une richesse que nul ne peut voler.*

*Je prie Dieu qu'Il vous protège, vous garde,
vous donne la santé et vous accorde la longévité.*



A Ma Chère mère

Aucun mot, aussi expressif qu'il soit, ne saurait remercier à sa juste valeur, l'être qui a consacré sa vie à parfaire mon éducation avec un dévouement inégal. C'est grâce à vos précieux conseils, votre prière, votre générosité, votre patience, votre soutien inépuisable et votre bénédiction, que j'ai pu surmonter le stress et les difficultés des longues années d'études.

Je prie Dieu qu'Il vous protège, vous garde, vous donne la santé et vous accorde la longévité.



*A mes frères : Habib, Aziz, Moustapha
et Abd Allah*

A Mes sœurs : Nadia, Fatima

*Vous m'avez comblé par votre générosité et votre soutien
durant toute mon existence et vous continuent toujours
de m'entourer de votre ample affection.*

*Ces quelques lignes ne sauront exprimer toute l'affection
et l'amour que je vous porte, votre soutien et vos encouragements
ont été pour moi d'un grand réconfort.*

*Que Dieu vous assiste et vous réserve une vie pleine
de succès et de bonheur.*

A mes beaux frères : Mouhamed, Hassane

A mes belles sœurs : Kaoutar, fatima-zahra

Merci pour votre soutien et votre aide



A mes neveux : Mourad, Rachid, Amine et Achraf

*Au petits anges de notre famille :
mes nièces :Basma,Safa et Marwa.*

A mes très chères amies :

*Je ne peux trouver les mots convenables et sincères
pour vous exprimer mon affection et mes pensées, vous êtes pour
moi des sœurs et des amies sur qui je peux compter.*

*En témoignage de l'amitié qui nous uni et des souvenirs de tous
les moments que nous avons passés ensemble, je vous dédie ce travail
et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.*

Je vous aime

*A tous ceux qui ont participé de près
ou de loin à l'élaboration de ce travail.*

*A toute personne m'ayant consacré un moment pour m'aider,
me conseiller, m'encourager ou simplement me sourire.*

A tous ceux que j'ai omis de citer.

Je vous dédie cette thèse en témoignage de ma reconnaissance



*A mon maître et président de thèse :
Monsieur le professeur A. BELMEKKI
Professeur d'hématologie*

*Je vous suis infiniment reconnaissante du grand honneur
que vous me faites en acceptant de présider le jury de cette thèse.
Votre grand savoir, votre modestie et votre amabilité ont toujours
suscité en moi une grande estime.*

*Veillez trouver Monsieur le professeur, dans ce travail,
le témoignage de ma vive gratitude et haute considération*



*A mon Maitre et Rapporteur de thèse :
Monsieur le professeur S.ZOUHAIR
Professeur de microbiologie*

*Vous m'avez faites un grand honneur en ayant accepté
de me guider le long de la réalisation de ce travail.*

*Que votre patience, votre compréhension et votre rigueur de travail
soient pour moi un exemple à suivre. Je vous conserverai toujours ma
profonde reconnaissance et souvenir de votre modestie de savoir.*

*Veillez accepter, Monsieur le Professeur, mes sincères remerciements
et tous le respect que je vous témoigne*



A Maître et juge de thèse :
Monsieur le professeur Y. SEKHSOKH
Professeur de Microbiologie

Vous avez accepté avec une grande amabilité de juger cette thèse.
Je vous remercie chaleureusement pour le privilège que vous m'avez
accordé en siégeant parmi le jury de cette thèse.



*A mon Maitre et juge de thèse :
Madame le Professeur L. ARSALANE
Professeur agrégé de Microbiologie*

*C'est pour moi un très grand honneur que vous acceptiez
de siéger parmi notre honorable jury.*

*Vous m'avez orientée et vous m'avez éclairée les modalités
de la recherche scientifique.*

*Vos remarques et vos conseils successifs ont permis d'améliorer
les différentes versions de cette thèse.*

*Vos compétences professionnelles et vos qualités humaines
seront pour moi un exemple dans l'exercice de la profession.*

*La bienvenue et la simplicité par laquelle vous m'avez accueillie,
votre infinie patience, votre bienveillance et votre
encouragement m'ont beaucoup émue.*

*Permettez-moi de vous présenter à travers ce travail le témoignage de
mon grand respect et de ma profonde considération.*



*A mon Maitre et juge de thèse :
Madame le Professeur H.KEBBAJ
Professeur Agrégé de Microbiologie*

Je vous remercie vivement d'avoir accepté de juger ce travail.

*Veillez trouver, ici, l'expression de mes plus chaleureux
remerciements et ma grande reconnaissance.*



SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : GENERALITES	4
I .CLASSIFICATION	5
II. CARACTERES BACTERIOLOGIQUES	9
1. Caractères morphologiques.....	9
2. Caractères cultureux.....	11
3. Caractères Biochimiques :.....	11
4. Caractères antigéniques et génétiques	13
III. EPIDEMIOLOGIE	15
1. Profil épidémiologique.....	15
A .Tuberculose dans le monde.....	15
B. Tuberculose en Europe.....	17
C. Tuberculose au Maroc.....	18
2 .Agents pathogènes	20
3. Réservoir.....	20
4. Modes de transmission	21
5. Facteurs de risque.....	21
5.1 Facteurs liés à l'environnement.....	22
a. Séjour en zone d'endémie.	22
b. Séjour en collectivité	22
c. Activité professionnelle en milieu de soins.....	22
5.2 Facteurs favorisants liés à l'individu	22
a. Situations de précarité.....	23
b. Age	23
c. Traitements immunosuppresseurs.....	26
d. Co-infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH).....	27
e. Le tabagisme.....	28

IV .PHYSIOPATHOLOGIE	29
V-ASPECTS CLINIQUES	32
1. Tuberculose pulmonaire	33
2. Tuberculoses extrapulmonaires.....	34
a. Tuberculose ganglionnaire.....	34
b. Tuberculose du système nerveux central	35
c. Pleurésies tuberculeuses.....	36
d. Tuberculose osseuse	37
e. Miliaire tuberculeuse	37
f. Péricardite tuberculeuse.....	38
g. Tuberculose urogénitale.....	39
h. Tuberculose digestive	39
i. Tuberculose cutanée	40
VI .TRAITEMENT	41
1. Traitement de la tuberculose.....	41
2. Traitement de la tuberculose multirésistante	44
VII .PREVENTION DE LA TUBERCULOSE	47
A. Méthodes de lutte :	47
1 .Contrôle des sources de dissémination :	47
2 .Dépistage précoce des sujets contagieux :	48
3. Traitement des cas contagieux :	48
4. Contrôle des sources de Mycobacterium bovis :	49
5 .Vaccination :	49
6. Chimio prophylaxie	51
B. Stratégies de lutte :	52
1. La stratégie DOTS :	52
2. HALTE à la Tuberculose :	52

CHAPITRE II : Diagnostic bactériologique et résistance aux antituberculeux.....	53
I. TECHNIQUES CLASSIQUES	54
A. Diagnostic bactériologique	54
1 .Prélèvements	56
a. Prélèvements respiratoires	56
b. Autres prélèvements	56
c. Décontamination, fluidification, concentration	57
2. L'examen microscopique :	59
3. La culture	66
4. Identification	70
B. Résistance aux antituberculeux	71
1. Epidémiologie des résistances.....	71
2. Définitions	74
a. Résistance bactérienne à un antibiotique	74
b. Résistance naturelle	74
c. Résistance acquise	76
d. Résistances primaire et secondaire	76
e. Sélection des mutants résistants	76
f. Multirésistance (MDR= « multi drug résistant »).....	77
g. Polyrésistance	77
h. Résistance extensive (XDR = « extensive second-line drug résistance ») ou ultrarésistance.....	77
3. Modes d'action des antituberculeux et mécanismes de résistance	78
3.1 Antituberculeux de « première ligne »	80
a. Isoniazide (INH)	80
b. Rifampicine (RMP)	81
c. Pyrazinamide	82
d. Ethambutol.....	83
3. 2Antituberculeux de «seconde ligne ».....	84
a. Les fluoroquinolones	84

b. Aminosides et apparentés.....	84
c. Ethionamide/ Thiacetazone.....	85
d. La cyclosérine	85
e. L'acide para-amino salicylique	86
4. Etude de la résistance aux antituberculeux par les méthodes phénotypiques	88
a. Méthode des proportions en milieu solide	88
b. Méthode des proportions en milieu liquide.....	90
II. TECHNIQUES MOLECULAIRE	92
A. Apport dans le diagnostic de la tuberculose.....	92
A.1. Amplification génique	92
1. Polymerase chain reaction (PCR).....	92
2. PCR en temps réel	93
a. Test PCR Xpert MTB/RIF.....	93
b. Test Genotype® MTBDRplus	95
c. PCR Cobas Amplicor Roche	95
2. Amplification de l'ARN par TMA	96
3. Amplification par LCR	96
4. Amplification par SDA.....	97
A.2 Identification par hybridation :.....	97
1. Test AMTDTt (Gen-Probe).....	98
2. Technique Inno-Lipa Mycobacteria	98
3. Test Accuprobe	99
4. Le système GenoType MTBC.....	99
A.3. Typage Moléculaire	100
1. La méthode de référence RFLP IS6110.....	100
2. Spoligotyping.....	101
3. MIRU.....	102
4. Rep-PCR.....	103

B. Apport dans l'étude de la résistance aux antibacillaires	104
B.1 Méthodes d'amplification	104
B.2. Hybridation.....	106
1. La bandelette INNO-LiPA Rif.TB	107
2. GenoType MTBDR plus.....	109
3. GenoType MTBDRsl.....	113
4. MAS-PCR.....	113
5. Test Xpert MTB/RIF	113
CONCLUSION	114
RESUME	114
BIBLIOGRAPHIE	114

Listes des figures

Figure 1 : Taxonomie des mycobactéries [4].

Figure 2 : Classification de *Runyon* des mycobactéries atypiques [4].

Figure 3 : Frottis montrant des bacilles de Koch colorés en rouge (Coloration de Ziehl-Neelsen) [13].

Figure 4: Structure de la paroi des mycobactéries [15].

Figure 5 : Représentation du génome de *M. tuberculosis* H37Rv [19].

Figure 6 : Taux d'incidence de la tuberculose estimé (pour 100000) dans le monde en 2010 d'après l'organisation mondiale de la santé [23].

Figure 7 : Histoire naturelle de la tuberculose [52]

Figure 8 : Radiographie du thorax d'un patient présentant une tuberculose pulmonaire avancée [53]

Figure 9: Principales étapes du diagnostic bactériologique des infections à *Mycobacterium Tuberculosis* [11].

Figure 10 : Étapes de la coloration de Ziehl-Neelsen et de la coloration à l'auramine [11]

Figure 11: Examen direct d'un frottis réalisé à partir d'une expectoration après coloration de Ziehl-Neelsen (grossissement *1000) : Présence de bacilles colorés en rose (BAAR) [11]

Figure 12 : Examen direct après coloration de Ziehl Neelsen (grossissement*1000) d'une culture de Mycobactérie de la tuberculose en milieu liquide : Présence de bacilles groupés en « cordes ». [11]

Figure 13 : Aspect microscopique des BAAR colorés à l'Auramine

Figure 14 : Cultures sur milieu de Löwenstein-Jensen [11].

Figure 15 : Pays ayant au moins un cas de tuberculose ultrarésistante en 2011 [88]

Figure 16: Pourcentage de nouveaux cas de tuberculose multirésistante d'après l'OMS en 2012 [88]

Figure 17 : Structure de la paroi des mycobactéries [76].

Figure 18: Structure de l'isoniazide (INH) [93]

Figure 19: Structure de la rifampicine (RIF) [93]

Figure 20 : Structure de l'éthambutol (EMB) [93]

Figure 21: Etude de la sensibilité aux antituberculeux en milieux liquides par la méthode MGIT® (Bactec) [11]

Figure 22 : Carte de la séquence d'insertion IS 6110 (1.35 Kb) [81]

Figure 23 : Profil génomique en spoligotyping de quelques membres du complexe des bacilles de la tuberculose [82].

Figure 24 : Principe de la recherche de mutation dans le gène *rpoB* par hybridation sur bandelette : Exemple du test INNO-LiPA Rif.TB [60]

Figure 25: Exemple de résultats de la recherche de mutation dans les gènes *rpoB* et *KatG* par hybridation sur bandelette Genotype MTBDR plus [92].

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Caractères cultureux et biochimiques de certaines mycobactéries du complexe *tuberculosis* [11.18]

Tableau II : Facteurs de risque d'identification d'infection et de progression vers la maladie chez des enfants exposés à un cas de tuberculose respiratoire [40].

Tableau III : Posologies et caractéristiques des principaux antituberculeux [38]

Tableau IV : Traitement de la tuberculose résistante à un antituberculeux [32].

Tableau V : Caractéristiques des différentes méthodes de décontamination des échantillons en vue de la recherche de mycobactérie [11]

Tableau VI : Notation des résultats de l'examen direct d'expectoration. [11]

Tableau VII: Classification des antituberculeux selon l'OMS [92]

Tableau VIII: Principales propriétés et mécanismes d'action des antituberculeux [92]

Tableau IX : Sensibilité et spécificité de l'antibiogramme en milieu liquide pour la détection des résistances aux antituberculeux [60]

Tableau X : Performances diagnostiques de l'Xpert MTB/RIF (Cepheid, États- Unis) dans les tuberculoses extra- pulmonaires [86].

Tableau XI: Cibles et caractéristiques des méthodes de détection moléculaire de la résistance aux antituberculeux [2]

Tableau XII : Sensibilité et spécificité du test Genotype MTBDR plus comparées à l'antibiogramme [60].

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADNr : Acide DésoxyriboNucléique ribosomal

AFSSAPS: Agence française de sécurité sanitaire et produits de santé

AMTDT: Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct Test

ARN : Acide riboNucléique

ARNr : Acide riboNucléique ribosomal

BAAR : Bacilles acido alcool résistants

BCG : Bacille de Calmette et Guérin

BK : Bacille de Koch

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CS : Cyclosérine

DAT : Dispensaires Anti Tuberculeux

DOTS : Traitement de courte durée sous surveillance directe

DR : Direct Repeat

EM : Examens microscopiques

EMB : Ethambutol

ETH : Ethionamide

FB : Fès-Boulemane

FQL: Fluoroquinolone

GC : Guanine-cytosine

GCBH : Gharb-Chrarda-Beni-Hssen

IS: Séquence d'insertion

ITL : Infection tuberculeuse latente

INH : Isoniazide

LCR : Transcription Media Ligase

L J : Löwenstein-Jensen

LAM : Lipoarabinomannane

LCR: Liquide Céphalorachidien

LED: Light-Emitting Diodes

LPS: Lipopolysaccharide

LVX: Lévoﬂoxacine

mAGP: Mycolyl-arabinogalactanepeptidoglycane

MDR: Multidrug-resistant

MGIT: Mycobacteria Growth Indicator Tube

MIRU: Mycobacterial Interspersed Repetitive Units

MNT: Mycobactérium non tuberculosis

MOX: Moxifloxacin

MTB: *Mycobacterium tuberculosis*

MTB : *Mycobacterium tuberculosis* complex

OADC : Acide Oléique, Albumine, Dextrose, Catalase

OFSP : Office Fédéral de la Santé Publique

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PAS : Acide para-amino-salicylique

PCR : Polymerase Chain Reaction

PE : proline-glutamate

PPE : proline-proline-glutamate

PNI : Programme National d'Immunisation

PZA : Pyrazinamide

RFLP : polymorphisme de longueur des fragments de restriction

RMP : Rifampicine

RSZZ : Rabat Salé Zemmour Zaers

SDA : Strand Displacement Amplification

SM: Streptomycine

SMD : Souss-Massa-Daraa

SSCP : polymorphisme de conformation des simples brins

TB : Tuberculose

TBC: Tuberculose pulmonaire commune

TBE : Tuberculose extra pulmonaire

TB-MR : Tuberculose à bacilles multirésistants

TCH: Hydrazide de l'acide thiophène 2 carboxylique

TMA : Transcription Mediated Amplification

TPM0 : Tuberculose pulmonaire à microscopie négative

TPM+ : Tuberculose Pulmonaire à microscopie positive

TT : Tanger - Tétouan

VIH: Virus de l'Immunodéficience Humaine

XDR : Extensively drug-resistant

Introduction



La tuberculose est une maladie infectieuse contagieuse, à déclaration obligatoire, due à un ensemble de mycobactéries pathogènes spécifiques de l'Homme, appartenant au complexe *Mycobacterium tuberculosis* [1]. Les mycobactéries sont des bactéries appartenant au genre *Mycobacterium*, seul représentant de la famille des Mycobacteriaceae [2]. D'un point de vue taxonomique, l'inclusion dans le genre *Mycobacterium* repose sur trois critères:

- L'acido-alcool-resistance des bacilles,
- L'existence d'acides mycoliques dans la paroi,
- Un contenu élevé en guanine et en cytosine (GC %) de l'acide ribonucléique, compris entre 61 et 71 %. Les mycobactéries peuvent être différenciées selon leur pigmentation et leur vitesse de croissance : La production de colonies isolées est obtenue en plus de sept jours (espèces à croissance lente) ou en moins de sept jours (espèces à croissance rapide) [2].

Le complexe *M. tuberculosis* regroupe plusieurs espèces : *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti*. On distingue également *M. leprae*, espèce toujours non cultivable in vitro, agent de la lèpre. Les autres groupes sont pathogènes opportunistes de l'homme (mycobactéries atypiques). La lenteur de croissance des mycobactéries (une division toutes les 20 heures environ) exige l'utilisation de milieux spéciaux (milieu liquide, milieu solide : l'œuf de Lowenstein-Jensen (LJ) ou milieu de Coletsos enrichi en pyruvate de sodium) et de techniques de fluidification-décontamination pour les sélectionner et les concentrer au sein d'un échantillon pluri-microbien [2].

La tuberculose représente un problème majeur de santé publique mondial en raison de sa fréquence et de sa morbi-mortalité: Les chiffres de la tuberculose dans le monde sont en effet impressionnants, avec un tiers de la population mondiale infectée. En 2012, 8,6 millions de personnes ont développé la tuberculose et 1,3 million en sont décédées [1]. Plus de 95 % des patients tuberculeux vivent dans les pays en voie de développement [1]. Actuellement, la tuberculose est en nette recrudescence même dans les pays développés, parallèlement à l'infection à VIH qui constitue à la fois un facteur d'aggravation individuel et un facteur d'extension de la maladie sur le plan épidémiologique. Par ailleurs, l'émergence de souches

multirésistantes aux antituberculeux représente une menace épidémiologique et économique importante pour les pays qui en sont touchés. En 2012, environ 450 000 cas de tuberculose multirésistante ont été recensés dans le monde chez des patients signalés comme atteints de tuberculose pulmonaire [1]. La tuberculose multirésistante résulte avant tout d'un traitement inadapté. L'utilisation inappropriée, incorrecte des antituberculeux, ou l'utilisation de médicaments de médiocre qualité, peuvent entraîner une résistance aux médicaments [1]. L'augmentation progressive de la proportion de cas multirésistants parmi les nouveaux cas de tuberculose montre que le contrôle de la tuberculose n'est pas garanti à l'avenir.

Au laboratoire, le caractère acido-alcoolo-résistant des bacilles tuberculeux est confirmé par la coloration de Ziehl-Neelsen à chaud ou à froid. Cet examen direct permet un dépistage rapide, le jour même, mais il est peu sensible, ne pouvant détecter des concentrations inférieures à 10^4 bacilles/ml. De plus, il manque de spécificité en cas de mycobactériose atypique. La culture est sensible et spécifique, mais nécessite deux à huit semaines d'incubation. Ce délai, auquel il faut rajouter en cas de positivité le temps nécessaire à l'identification et à la réalisation de l'antibiogramme, peut être préjudiciable pour une prise en charge rapide et adéquate du patient. L'utilisation de milieux liquides avec détection fluorimétrique (Bactec 960) ou colorimétrique (BacT/Alert) permet de raccourcir le délai d'apparition de la positivité. Les techniques de biologie moléculaire sont actuellement une alternative à la détection et à l'identification de *M. tuberculosis* permettant de s'affranchir de la lenteur de croissance des bacilles [3]. L'évolution des techniques de biologie moléculaire ouvre ainsi, de nouvelles pistes pour le diagnostic de la tuberculose, l'identification des espèces de mycobactéries et la détection de la résistance aux antituberculeux.

Les objectifs de ce travail seront d'une part de rappeler les caractères bactériologiques, épidémiologiques, cliniques, curatifs et préventifs de la tuberculose, d'autre part de détailler les techniques bactériologiques classiques de diagnostic de la tuberculose et de souligner l'apport des techniques de biologie moléculaire actuelles dans la prise en charge thérapeutique rapide et efficace des patients tuberculeux.

Chapitre I : Généralités



I .CLASSIFICATION

Les mycobactéries appartiennent au genre *Mycobacterium*, de la famille des Mycobacteriaceae, de l'ordre des Actinomycetales et de la classe des Actinobactéries [2.4.5].

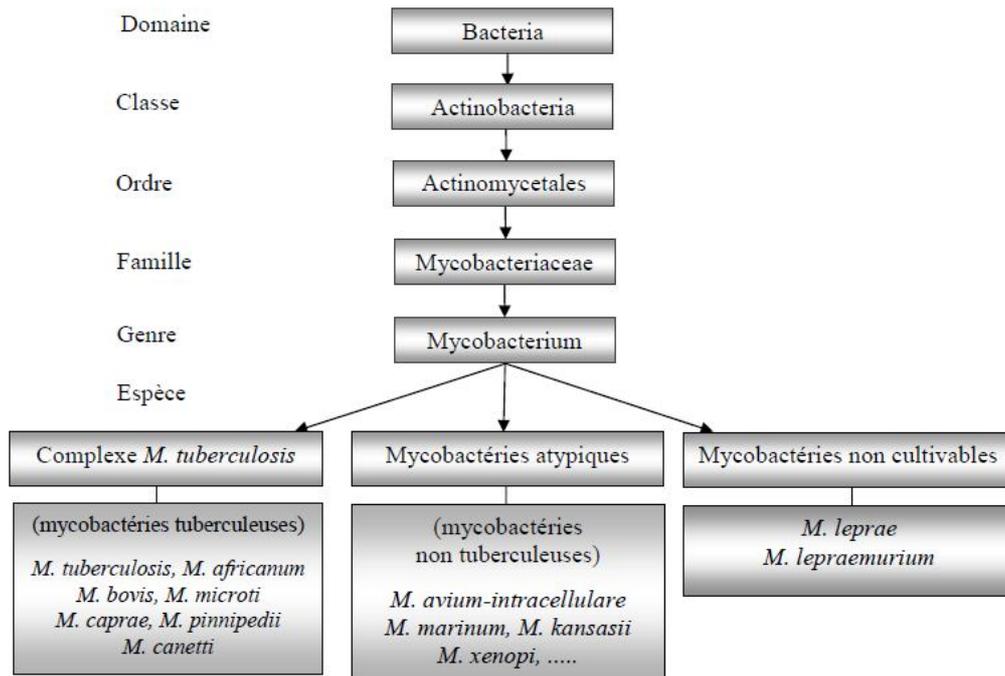


Figure 1 : Taxonomie des mycobactéries [4].

La définition du genre *Mycobacterium* repose sur trois critères [2]. :

- l'acido-alcool-résistance des bacilles,
- la présence d'acides mycoliques à structure particulière dans la paroi
- la valeur élevée (61 % à 71 %) du contenu en guanine-cytosine (GC %) de l'acide désoxyribonucléique (ADN) excepté pour *M. leprae* (55 %).

Les mycobactéries, capables de causer la tuberculose, sont regroupées sous la dénomination « **mycobactéries du complexe *M. tuberculosis*** » (Figure 1) :

- *Mycobacterium tuberculosis* : le plus fréquent
- *Mycobacterium africanum* : agent responsable, le plus souvent, de la tuberculose en Afrique de l'ouest [6].
- *Mycobacterium bovis* : agent responsable de la tuberculose chez les bovins et parfois chez l'homme [7].
- *Mycobacterium microti*: agent responsable de la tuberculose chez les rongeurs, les chèvres et les mammifères marins [8].
- *Mycobacterium canetti* : agent responsable de tuberculose humaine (en particulier à Djibouti) [9,10].

Les autres mycobactéries sont appelées **mycobactéries atypiques** ou non tuberculeuses (Figure 2). Ces mycobactéries sont omniprésentes dans l'environnement. Dans certaines circonstances (immunodépression, lésion, maladie préexistante,...), certaines d'entre elles peuvent devenir pathogènes pour l'homme. On parle dans ce cas d'infection opportuniste appelée aussi mycobactériose [2].

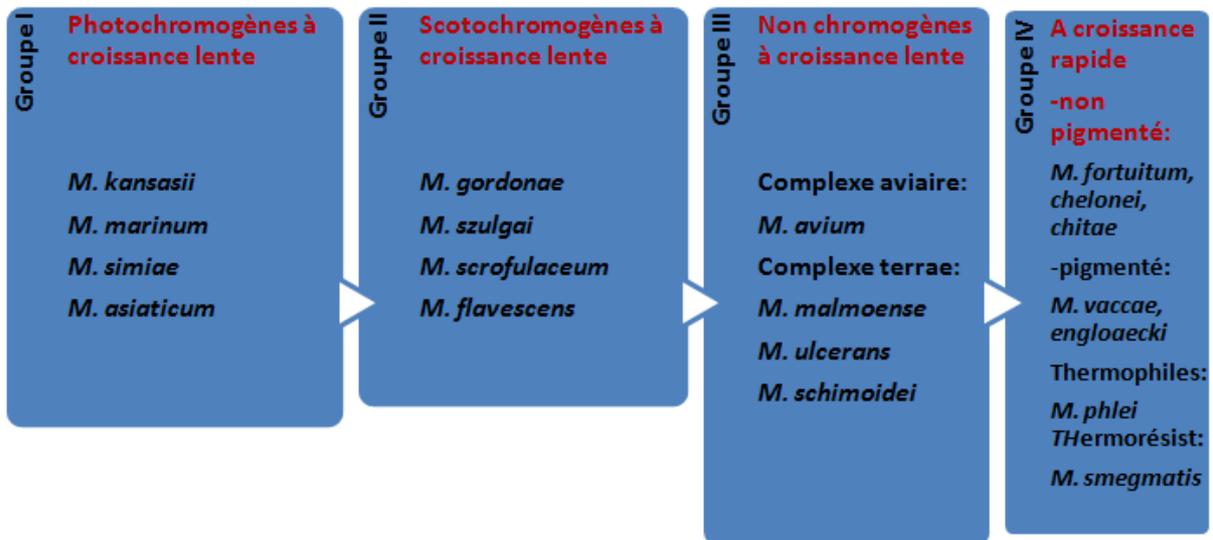


Figure 2 : Classification de Runyon des mycobactéries atypiques [4].

Photochromogène: synthèse de pigment jaune en présence de lumière

Scotochromogène: synthèse de pigment jaune en présence et absence de lumière

Parmi les mycobactéries atypiques les plus fréquemment isolées :

- *Mycobacterium avium-intracellulare*: agent responsable de maladies respiratoires
- *Mycobacterium ulcerans*: agent responsable de l'ulcère de Buruli (nécroses chroniques de la peau et des tissus mous)
- *Mycobacterium marinum*: agent responsable d'infections cutanées torpides (maladie des aquariums)
- *Mycobacterium abscessus*: agent responsable d'infections cutanées et pulmonaires (notamment chez les patients mucoviscidosiques)

En général, on classe dans une troisième catégorie, *M. leprae* et *M. lepraemurium*, les agents de la lèpre chez l'homme et le rat, caractérisés par leur incapacité à être cultivés *in vitro* (Figure 1).

Les espèces de Mycobactéries peuvent être également groupées en 2 grands groupes [11] :

- **Groupe des Mycobactéries cultivables à vitesse de croissance lente (> 7 jours) :**
Complexe «tuberculosis » responsable de la maladie tuberculeuse humaine : *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum* On distingue également *M. leprae*, espèce toujours non cultivable in vitro, agent de la lèpre.

-**Les Mycobactéries cultivables à vitesse de croissance rapide (<7 jours) :** ou mycobactéries non tuberculeuses ou atypiques : *M. avium*, *M. marinum*, *M. fortuitum*

Les mycobactéries à croissance lente se développent sur des milieux de culture particuliers tels le milieu de Löwenstein-Jensen ou Middle brook, tandis que les espèces à croissance rapide sont capables de se cultiver sur gélose nutritive ou peptonée.

Ces différences phénotypiques sont corrélées au nombre de copies du gène codant l'acide ribonucléique ribosomal (ARNr) 16S. Généralement, les espèces à croissance lente possèdent une seule copie, les mycobactéries à croissance rapide en possèdent deux. Des différences structurales de l'ADNr 16S sont également retrouvées selon le taux de croissance des espèces. La division phénotypique majeure entre espèces à croissance rapide et espèces à croissance lente apparaît comme un embranchement majeur dans les arbres phylogénétiques obtenus par séquençage de différents gènes (ADNr 16S, *hsp 65*, *rpo B*, *gyr B*) conservés au cours de l'évolution [2,11].

II. CARACTERES BACTERIOLOGIQUES

1) Caractères morphologiques

Mycobacterium tuberculosis se présente sous la forme d'un fin bâtonnet, de 4 µm de long et 0,4 µm de large, d'où le nom de « bacille » (Figure 3).

Les bacilles tuberculeux sont rectilignes ou légèrement incurvés, non sporulants et dépourvus de capsule [12].

➤ Acido-alcool résistance:

Ces bactéries sont difficilement colorées par la coloration de Gram mais sont considérées comme à Gram positif [14]. En fait, la paroi des mycobactéries possède une structure plus complexe que la paroi des bactéries à Gram positif et sur un frottis coloré par la technique de Gram, les mycobactéries apparaissent souvent comme non colorées. Leur mise en évidence repose sur leur propriété particulière d'acido-alcool-résistance, c'est pourquoi on les appelle des B.A.A.R. (Bacilles Acido-Alcool Résistants). Cette propriété confère la capacité à la mycobactérie de résister à l'action conjointe de l'alcool et de l'acide. Sur le plan structural, les mycobactéries se caractérisent par une paroi riche en lipides (60 % des constituants) et dont la constitution explique, au moins partiellement, les propriétés tinctoriales, la pathogénicité et la résistance à divers antibiotiques [2,15,16].

La paroi est composée de longues chaînes lipidiques d'acides mycoliques et d'un assortiment de lipides libres plus courts, tels que le mycocérosate, les glycolipides phénoliques et différents phospholipides (Figure 4). En outre, une série de polysaccharides et de glycolipides inhabituels pour la plupart spécifiques de l'espèce, sont associés à la partie externe de la paroi. Les acides mycoliques de la paroi sont reliés de manière covalente au peptidoglycane par l'intermédiaire de l'arabinogalactane. La paroi présente donc une structure unique de type mycolyl-arabinogalactanepeptidoglycane (mAGP). Le lipoarabinomannane (LAM), qui peut être considéré comme le «lipopolysaccharide (LPS) mycobactérien» s'intercale de manière non covalente dans cet enchevêtrement complexe [17].

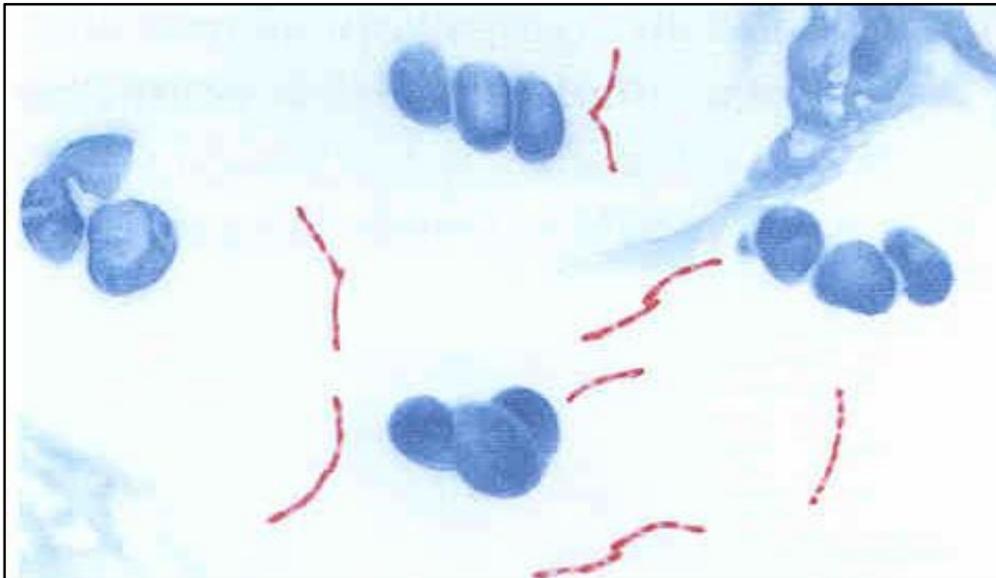


Figure 3 : Frottis montrant des bacilles de koch (BK) colorés en rouge (Coloration de Ziehl-Neelsen) [13].

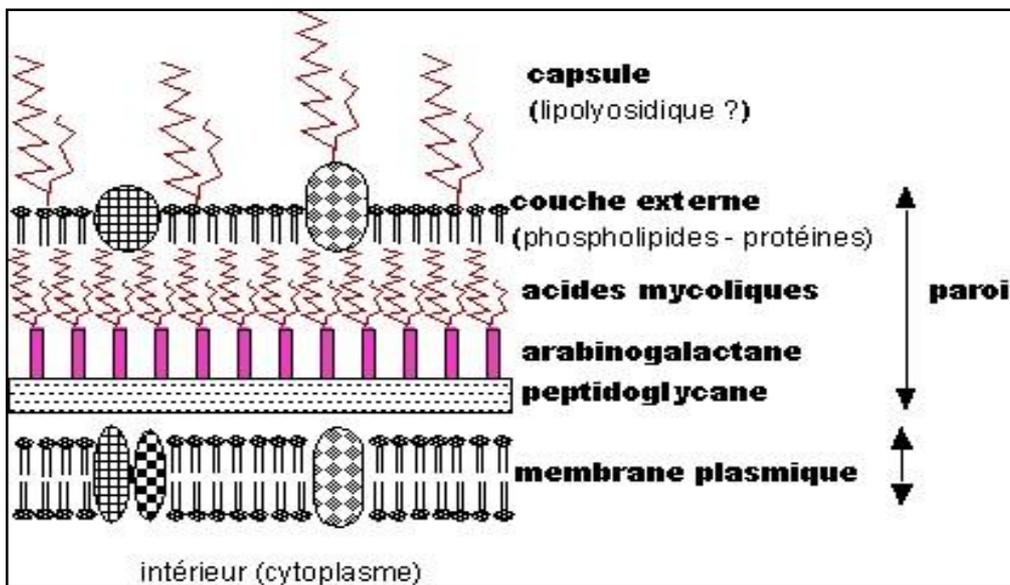


Figure 4: structure de la paroi des mycobactéries [15].

2. Caractères cultureux

- L'aérobiose stricte est nécessaire pour la multiplication des mycobactéries : Les organes pulmonaires de part leur vascularisation sont très oxygénés, ce qui facilitera leur contamination ; la tension augmentée de CO₂ favorise la croissance [11].
- La lenteur de multiplication : *M.tuberculosis* est classé parmi les mycobactéries à croissance lente. La présence d'une seule copie du gène codant l'ARN ribosomique 16S chez *M. tuberculosis* a été corrélée à une vitesse de croissance lente, contre deux copies chez les autres mycobactéries (croissance rapide). La croissance et le métabolisme lents des mycobactéries concourent certainement à leur capacité de s'adapter aux conditions environnementales [2,11].

3. Caractères Biochimiques :

M. tuberculosis accumule de l'acide nicotinique (niacine positive). La niacine peut être révélée par le test de Konno (niacine-test, Konno 1956).

- La nitrate réductase est positive.
- Croissance en présence de TCH (résistance au TCH).
- La catalase est thermolabile.
- *M. tuberculosis* est naturellement sensible à l'isoniazide. Par contre, si la souche présente une résistance de haut niveau à l'isoniazide, son activité catalasique à 22°C est réduite ou même absente.

Espèces de mycobactéries	Aspect des colonies	Croissance favorisée	TCH 2mg/l	PZA 200 mg/l	CS 30 mg/l	Nitrate réductase	Niacine Test
tuberculosis	Eugonique rugueux	-	R	R	S	+	+
africanum	Dysgonique rugueux	+	S(v)	R	S	-(v)	(v)
bovis	Dysgonique lisse	+	S	S	S	-	-
Bovis var BCG	Eugonique rugueux	-	S	S	R	-	-

**Tableau I : Caractères cultureux et biochimiques de certaines mycobactéries
du complexe tuberculosis [11.18]**

TCH : Hydrazide de l'acide thiophène 2carboxilique ; PZA :Pyrazinamide; CS :Cyclosérine
V :Variable ;R :Résistant ;S :Sensible

4. Caractères antigéniques et génétiques

M.tuberculosis est très riche en lipides. Surtout concentrés dans la paroi qu'ils rendent peu perméable aux substances hydrophiles, ce sont des acides gras complexes. Parmi ceux-ci les acides mycoliques jouent un rôle important dans l'acido-alcool-résistance et dans la structure très particulière de la paroi des mycobactéries, caractérisées par trois couches successives de constituants liés par des liaisons covalentes : le peptidoglycane, l'arabinogalactane et les acides mycoliques [2,15,16]

Les constituants protéiniques sont les éléments importants de l'activité de la tuberculine qui est un mélange complexe. Les techniques de génie génétique ont permis d'obtenir plusieurs protéines purifiées à partir de la paroi [2,15,16] .

Les constituants de *M.tuberculosis* provoquent la formation de nombreux anticorps qui n'ont pas de rôle protecteur et sont de médiocres outils diagnostiques de la tuberculose. Dans la tuberculose, l'immunité est à médiation cellulaire et non humorale [2,15,16] .

Le génome de *M. tuberculosis* consiste en un chromosome circulaire de 4.411.529 paires de bases, comprend plus de 4,4 millions de paires de bases et correspond à environ 4 000 gènes codant des protéines et 50 gènes codant de l'ARN (Figure 5). Le pourcentage en GC est de 65,6 % en moyenne, mais le génome présente des régions beaucoup plus riches en GC, notamment deux grandes familles de gènes dites PE et PPE aussi appelées *polymorphic GC repetitive sequences*. Plus de la moitié des gènes codent des protéines à fonctions connues, 27 % des fonctions putatives et 15 % des protéines à fonction inconnue qui pourraient correspondre à des protéines spécifiques des mycobactéries. Environ 9 % du génome code les protéines des familles PE (motif Pro-Glu) et PPE (motif Pro-Pro-Glu), dont les structures répétitives représentent une source probable de variations antigéniques [47]. Le génome de *M. tuberculosis* est caractérisé par l'abondance de gènes codant des enzymes impliquées dans le métabolisme des lipides. Plus de 250 enzymes ont été identifiées, alors que chez *Escherichia coli* seuls 50 ont été individualisées. On retrouve les gènes du métabolisme

aérobie mais aussi ceux des chaînes anaérobies de transport des électrons. L'existence de ces gènes confirme la capacité d'adaptation de *M. tuberculosis* aux changements d'environnement comme la faible tension en oxygène prévalant dans le granulome ou les tissus pauvres en oxygène. *M. tuberculosis* est très riche en éléments répétés, séquences d'insertion (IS) et répétitions en tandem (*mycobacterial insertion repetitive units* [MIRU]. Certaines de ces IS présentent des similarités élevées avec d'autres actinomycètes comme *Rhodococcus* ou *Nocardia*, suggérant la possibilité de transfert horizontal, vestige probable de l'époque où l'organisme ancêtre des bacilles de la tuberculose était un saprophyte du sol. La séquence d'insertion IS6110 est présente en copies multiples et associée à un polymorphisme élevé de position dans le génome 49. Les MIRU identifiées dans 41 loci chez H37Rv présentent un polymorphisme de répétition dans la plupart des loci. Le polymorphisme de ces deux marqueurs est mis à profit dans le typage de *M.tuberculosis* [2,19,20].

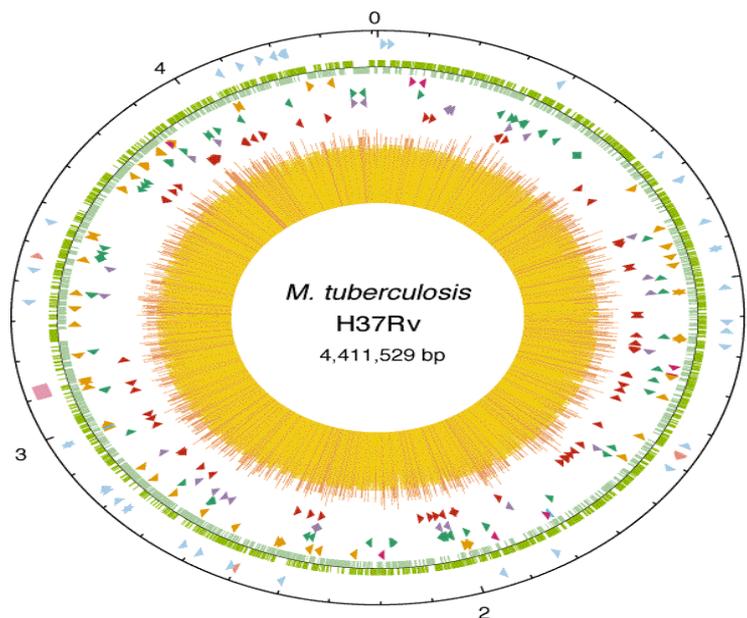


Figure 5: Représentation du génome de *M. tuberculosis* [19].

III. EPIDEMIOLOGIE

1. Profil épidémiologique

A .Tuberculose dans le monde

A l'heure actuelle, la tuberculose demeure un problème majeur de santé publique au niveau mondial [2]. C'est la principale cause de décès lié à une maladie infectieuse curable [1]. Elle est la deuxième cause infectieuse de décès dans le monde après le VIH [21]. L'OMS estime à 8,8 millions le nombre de nouveaux cas par an en 2010, soit une incidence estimée à $128/10^5$ habitants. Parmi ces cas estimés, 65% seulement avaient été déclarés [22]. Les décès dus à la tuberculose sont estimés à 1,45 million (1,1 million dans la population VIH-négative et 0,35 million supplémentaire chez les personnes séropositives pour le VIH [3,22]. Parmi les nouveaux cas pulmonaires déclarés, 57% étaient des cas avec un examen direct positif [21,22].

En 2011, l'incidence mondiale de la tuberculose-maladie était de 9 millions de nouveaux cas et près de 1,5 millions de décès liés à cette maladie. Il existe une disparité majeure entre les pays en voie de développement et les pays industrialisés [21].

En 20 ans, de 1990 à 2010, les taux de mortalité ont baissé de 80 % et les taux d'incidence de 3,4 % par an. Mais c'est en Chine et en Inde que l'on retrouve toujours le plus grand nombre de patients tuberculeux avec plus de 40 % des cas mondiaux (plus de 3,5 millions de nouveaux cas par an). L'Afrique subsaharienne compte 24%. L'incidence dans cette sous-région est 2 fois plus élevée qu'en Asie et dépasse les 350 cas pour 100 000 habitants. Enfin, si la majorité des décès dus à la tuberculose surviennent en Asie, le taux de mortalité le plus élevé au monde est toujours en Afrique sub-saharienne [2].

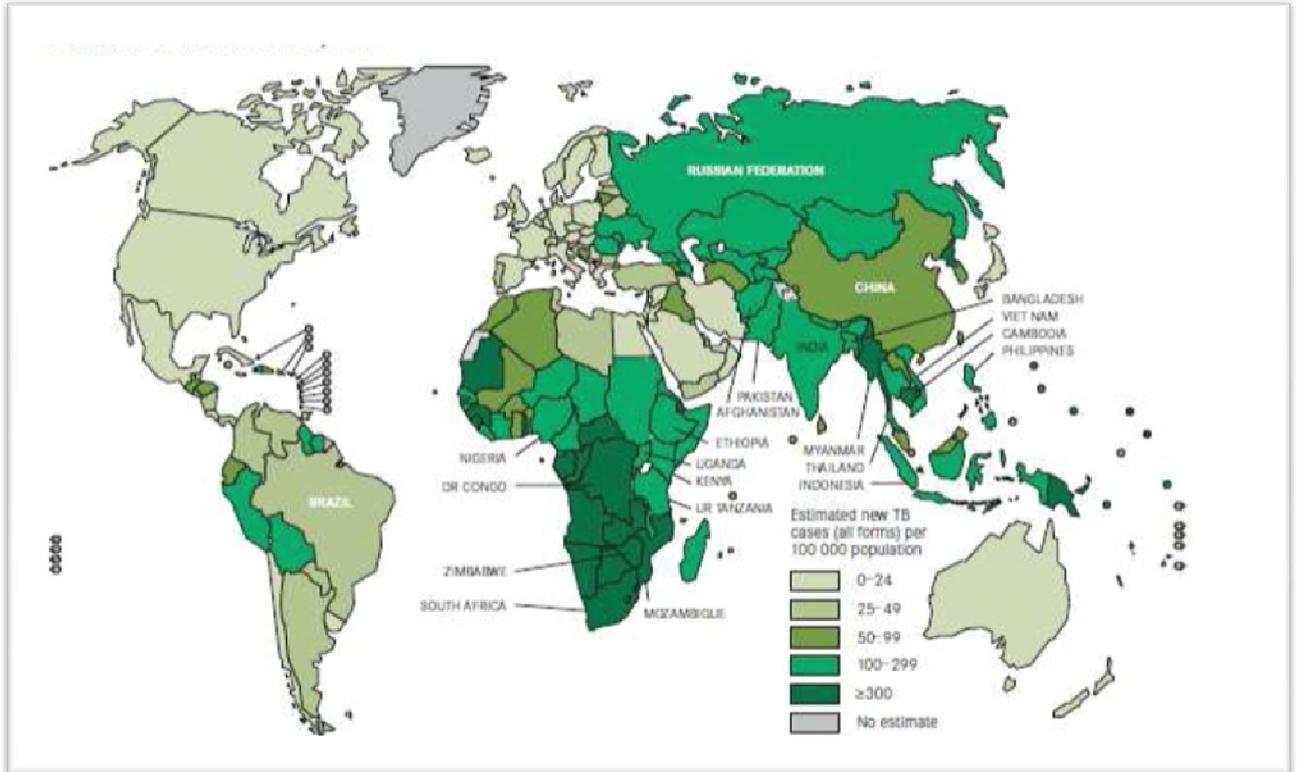


Figure 6 : Taux d'incidence de la tuberculose estimé pour 100000 habitants dans le monde en 2010 d'après l'Organisation Mondiale de la Santé. [22]

B. Tuberculose en Europe

Les données européennes montrent une situation très contrastée avec une augmentation d'Ouest en Est. En Europe de l'Ouest, l'incidence moyenne est de 11 cas pour 100 000 habitants avec une tendance générale à la diminution depuis 1995 [2]. Dans les pays où l'incidence a augmenté (Danemark, Royaume-Uni, Norvège), la tendance est due à l'augmentation des cas nés à l'étranger. La diminution annuelle du nombre de cas est plus forte chez les nationaux (-7,6 %) que chez les patients d'origine étrangère (-3,3%) [2]. Dans les pays de l'Europe du centre, l'incidence moyenne est de 41 cas pour 100 000 habitants [2]. La tendance est à la diminution ou à la stabilité sauf en Bulgarie et en Roumanie où les taux d'incidence ont augmenté de 5 % par an. Dans les pays d'Europe de l'Est (ex-Union soviétique), les taux sont élevés avec une moyenne de 92 cas pour 100 000 habitants et surtout révèlent des augmentations annuelles constantes et fortes de l'ordre de 6 à 12 % dans la plupart des pays. La répartition par tranche d'âge varie également selon les régions. En Europe de l'Ouest, les patients âgés de plus de 65 ans représentent la classe d'âge la plus importante (23 % des cas), alors qu'en Europe de l'Est, l'incidence est plus élevée chez les jeunes adultes de 25 à 44 ans (43 % des cas) [2].

➤ **Tuberculose en France**

La France est aujourd'hui un pays considéré comme à faible incidence de tuberculose : En 2009, 5276 cas ont été notifiés (5246 en France métropolitaine et 130 dans les territoires d'Outre-mer), soit une incidence de 8,1 cas pour 100 000 habitants [23]. En 2008, le nombre de cas de tuberculose maladie déclarés était de 5758 cas [24]. En 2010, la vaste majorité des régions présentent des taux inférieurs à 10 nouveaux cas pour 100 000 habitants. L'Ile-de-France et la Guyane se singularisent avec des taux respectifs de 16,3 et 15,9 pour 100 000 habitants [26]. Au sein de la région Ile-de-France, il existait des situations épidémiologiques très différentes entre les départements puisqu'un rapport de 1 à 4 était observé entre les départements de plus faible et de plus fort taux de TB (7,7/105 dans les Yvelines et 31,4/105 en Seine-Saint-Denis en 2010). Ces disparités dans les taux d'incidence régionaux se retrouvent à toutes les échelles géographiques et touchent également les grandes agglomérations comme Marseille. Les disparités géographiques sont en grande partie liées aux caractéristiques sociodémographiques des populations qui composent le territoire [25].

Bien que la France fasse partie des pays à faible incidence, un taux de TB élevé est constaté dans certaines régions et dans certaines catégories de la population [26]. Les personnes sans domicile fixe avec un taux d'incidence de 155 cas pour 100 000 et les patients nés à l'étranger, notamment en Afrique. Les taux sont de 4,1 pour les personnes nées en France et 36,1 pour celles nées à l'étranger. Ce taux diminue avec l'ancienneté de l'entrée en France. Il n'est plus que de 16,8 pour 100 000 après plus de 10 ans passés en France [25].

Quant au taux supérieur à la moyenne nationale de 11,8 observé chez les personnes de 65 ans et plus, il s'explique pour une large part, par des réactivations d'infections acquises à une période où l'incidence de tuberculose en France était plus fréquente qu'aujourd'hui (80 pour 100 000 en 1960) [25].

C. Tuberculose au Maroc

Les premiers cas de tuberculose ont été notifiés entre 1900 et 1903 à l'hôpital français de Tanger. Ensuite, l'incidence de la maladie a connu une évolution progressive justifiant l'ouverture d'un nombre important de Dispensaires Anti Tuberculeux (DAT) à Fès, à Casablanca, à Rabat, à Marrakech et à Meknès, et l'aménagement en 1923 à Mogador (Essaouira) d'un hôtel sanatorium par les anglais [27].

En dépit de l'existence de programmes de lutte contre la tuberculose depuis les années 1960 et la généralisation du programme vaccinal par le BCG, la tuberculose demeure encore un problème majeur de santé publique au Maroc [28].

La prévalence était de 82 pour 100 000 habitants (25 562 nouveaux cas) en 2008 [28].

Les données épidémiologiques de 2012 rapportent un total de 27 437 nouveaux cas de tuberculose toutes formes confondues, donnant lieu à une incidence de 83 cas pour 100.000 habitants et 35 nouveaux cas pour 100 000 habitants pour la tuberculose pulmonaire à frottis positif [27,28]. Depuis les 5 dernières années, la forme la plus prédominante est la forme extrapulmonaire (TEP) avec en 2012, un total de 13122 cas de TEP (47,8%) contre 11 572 cas

(42,2%) de tuberculose pulmonaire à microscopie positive (TPM+), 2343 (8,5%) de tuberculose pulmonaire à microscopie négative (TPMO) et 400 cas (1,5%) de primo-infection (PIT) [27]. L'étude des formes anatomocliniques montre que parmi les formes extrapulmonaires, les atteintes pleurales sont les plus fréquentes (45% des cas), suivies de l'atteinte ganglionnaire, urogénitale, digestive et cutanée en cinquième position [29].

Cette maladie affecte l'adulte jeune de la société : 65% des cas ont un âge compris entre 15 et 45 ans et 80% ont un âge inférieur à 45 ans [27]. 58% des cas sont des hommes contre 42% de femmes [28]. La tuberculose est plus fréquente dans les régions les plus urbanisées et les plus peuplées du pays [27]. 65% des cas enregistrés au niveau national sont identifiés dans six grandes régions représentées par le Grand Casablanca, Tanger-Tétouan (TT), Fès-Boulemane (FB), Rabat-Salé-Zemmour-Zaer (RSZZ), Gharb-Chrarda-Beni-Hssen (GCBH) et Souss-Massa-Daraa (SMD) [28]. Les grandes villes sont particulièrement affectées; par exemple, 20% des nouveaux cas de tuberculose sont notifiés à Casablanca où l'incidence peut dépasser 140 nouveaux cas pour 100.000 par an dans certaines de ses préfectures [27]. Les populations les plus touchées des grandes villes sont celles concentrées dans les quartiers pauvres et péri-urbains où les facteurs de transmission de la maladie sont favorables : habitat insalubre, pauvreté, précarité sociale, forte promiscuité humaine, malnutrition et autres [27]. La prévalence de l'infection au VIH chez les malades tuberculeux est de 1,7% selon la dernière enquête de 2008. Cette estimation est confirmée par l'activité de routine de dépistage du VIH à visée diagnostique chez les patients tuberculeux sous traitement [27].

2 .Agents pathogènes

Les mycobactéries, capables de causer la tuberculose, sont regroupées sous la dénomination « mycobactéries du complexe *M. tuberculosis* ».

On distingue :

- *Mycobacterium tuberculosis*
- *Mycobacterium africanum* : agent responsable, le plus souvent, de la tuberculose en Afrique de l'ouest [6].
- *Mycobacterium bovis* : agent responsable de la tuberculose chez les bovins et parfois chez l'homme [7].
- *Mycobacterium microti*, *caprae* et *pinnipedii* : agents responsables de la tuberculose chez les rongeurs, les chèvres et les mammifères marins [8].
- *Mycobacterium canetti* : agent responsable de tuberculose humaine (en particulier à Djibouti) [9,10].

3. Réservoir

Il est essentiellement humain. Les sujets infectés porteurs de lésions fermées ne représentent qu'un réservoir potentiel. Les sujets porteurs de lésions ouvertes constituent de véritables réservoir, ce sont des disséminateurs, ils émettent par l'intermédiaire des crachats, de la toux voire d'une lésion externe des mycobactéries dans le milieu extérieur d'une manière continue mais intermittente [31]. Le réservoir animal est rarement en cause, représenté essentiellement par les animaux domestiques (exemple : chats, chiens ou bovins qui sont sensibles à *M.bovis* et *M.tuberculosis*) [31,32].

4. Modes de transmission

La transmission du bacille tuberculeux se produit essentiellement par voie aérienne, et l'infection concerne d'abord les poumons où se multiplient les bacilles, sans provoquer d'anomalies cliniques ou radiologiques. Après inhalation de bacilles, les facteurs qui conditionnent la survenue d'une infection sont liés à la richesse bacillaire de l'aérosol infectant, à la durée, à la répétition des expositions et aux moyens de défense de l'organisme, dont l'immunité cellulaire. La fréquence à laquelle une infection survient après l'inhalation de bacilles viables parmi des enfants de race blanche de 0 à 14ans en contact intime au domicile avec un tuberculeux nouvellement découvert est estimée à 35 % si le tuberculeux était positif à l'examen direct, 11 % si le tuberculeux était négatif à l'examen direct mais positif en culture. Il est donc compréhensible que les mauvaises conditions de vie, la promiscuité en maison de retraite, dans les foyers ou en milieu carcéral, l'exposition professionnelle dans les établissements de soins, l'infection par le VIH, soient des facteurs de risque pour la survenue de l'infection tuberculeuse [32,33]. *M. bovis* se transmet à l'homme par l'ingestion de lait non pasteurisé d'une vache infectée. La tuberculose bovine a pour hôtes habituels les bovins, mais peut se transmettre à l'homme de même qu'à d'autres animaux comme les porcins, les bisons et les cervidés.

5. Facteurs de risque

Chez les personnes infectées par le bacille tuberculeux, le risque de développer la maladie au cours de l'existence est de 10%. Toutefois, les personnes dont le système immunitaire est affaibli, telles que les personnes vivant avec le VIH, les personnes souffrant de malnutrition ou de diabète, ou encore les fumeurs, courent un risque beaucoup plus élevé de développer la maladie [1].

5.1 Facteurs liés à l'environnement

Les facteurs favorisant le risque de contamination respiratoire sont les suivants.

a. Séjour en zone d'endémie.

En France, les taux sont de 4,1 pour les personnes nées en France et 36,1 pour celles nées à l'étranger. Ce taux diminue avec l'ancienneté de l'entrée en France. Chez les personnes en France depuis moins de 2 ans, le taux est de 230 pour 100 000 (408 pour les personnes nées en Afrique) [34].

b. Séjour en collectivité

Chez les patients résidant en collectivité ou pour lesquels la promiscuité est forte, le risque de tuberculose est accru. Les résidences pour personnes âgées, les foyers de travailleurs, les centres d'hébergements sociaux, les établissements pénitentiaires sont des réservoirs potentiels, avec un risque accru de dissémination [35].

c. Activité professionnelle en milieu de soins

Certains personnels sont susceptibles d'être professionnellement exposés à des contacts répétés avec le bacille de Koch (services hospitaliers, laboratoires, soins à domicile ...). En France, la tuberculose est reconnue comme maladie professionnelle. Deux études rétrospectives menées dans des hôpitaux français révèlent une incidence estimée de tuberculose, chez les soignants augmentée par rapport à la population générale [35].

5.2 Facteurs favorisants liés à l'individu

L'altération des défenses immunitaires facilite l'expression de la tuberculose «maladie». Les facteurs favorisants individuels sont multiples.

a. Situations de précarité

La malnutrition, par les perturbations des défenses immunitaires cellulaires qu'elle occasionne, est le principal facteur de développement du bacille tuberculeux dans l'organisme. Une tuberculose doit donc être évoquée chez tout patient en situation de précarité ou chez les patients alcooliques.

A Paris, en 2002, avec 1 150 cas déclarés, l'incidence de la tuberculose atteint 54 cas pour 100 000 habitants, soit 4,5 fois l'incidence nationale. Ce chiffre est semblable à celui retrouvé dans la ville de New York, qui a été attribué à une dégradation des conditions socio-économiques [35].

b. Age

➤ Sujet âgé

Avec l'âge, les capacités de réponse immunitaire sont diminuées. Cette baisse progressive de l'immunité naturelle favorise la réactivation endogène de la tuberculose. Dans les pays industrialisés, ce sont les sujets de plus de 65 ans qui sont le plus touchés par la tuberculose du fait de l'infection survenue à une période de plus forte endémie et d'une baisse des défenses immunitaires. La mortalité est plus lourde que chez le sujet jeune atteignant près de 100 % au-delà de 90 ans [36].

Le tableau clinique chez le sujet âgé est peu spécifique et la difficulté est d'évoquer ce diagnostic chez des patients présentant souvent une polyopathie. Le délai entre l'apparition des premiers symptômes et la mise en route du traitement est de l'ordre de 3 mois. Le séjour en institution représente un facteur de risque important, même lorsqu'il s'agit de réactivation de lésions anciennes. La fréquence du cancer bronchique dans cette population doit être soulignée [25].

➤ **Enfant**

En 2012, en France, on a estimé que 530 000 enfants étaient atteints de tuberculose et 74 000 enfants séronégatifs pour le VIH décédés de la tuberculose [1]. Les tuberculoses chez l'enfant de moins de 15 ans représentent plus de 5 % des tuberculoses déclarées, avec une incidence 11 fois supérieure chez les enfants en provenance de pays d'endémie tuberculeuse. La tuberculose de l'enfant représente un bon indicateur de la circulation du BK dans la population car elle correspond toujours à une infection récente à partir d'une personne proche [37,38]. La prévalence des atteintes pédiatriques reflétant de façon précise le niveau de contrôle de la tuberculose dans une communauté [39].

De point de vue épidémiologique, les enfants ne représentent pas un facteur important de propagation de la maladie car en cas de TB, l'enfant est toujours paucibacillaire, ne tousse pas efficacement, et a peu de chance de transmettre la maladie. Malgré cela, en 2000, globalement plus de 10 % des cas nouvellement diagnostiqués concernaient des enfants. Il faut aussi considérer que dans les régions endémiques, la tuberculose de l'enfant n'est souvent pas diagnostiquée. Elle constitue la première cause de décès des nourrissons infectés par le VIH en Afrique du Sud, et un grand nombre d'enfant décèdent encore d'une pneumonie TB non reconnue [39,1].

✓ *Facteurs de risque d'infection tuberculeuse chez l'enfant :*

Le risque d'infection chez l'enfant exposé est modulé par différents facteurs, liés à la contagiosité du cas index, aux conditions d'exposition et à l'enfant lui même. La bonne connaissance de ces facteurs et la standardisation de leur recueil sont des éléments très importants pour l'amélioration de l'efficacité du dépistage. Cela permet d'évaluer le niveau de risque pour chaque enfant et de guider les indications thérapeutiques. Une fois l'enfant infecté, d'autres facteurs sont susceptibles de favoriser la progression immédiate vers la maladie [40] (tableau II). Le principal de ces facteurs est le jeune âge de l'enfant jusqu'à cinq ans. Le risque de progression de la maladie en cas d'infection est très augmenté [38,40]. En Guinée, le contact d'un adulte souffrant d'une tuberculose pulmonaire augmente de 70 % la mortalité des enfants de moins de cinq ans, l'excès de mortalité étant le plus important entre 3 et 4 ans. Le risque est multiplié par 8 quand il s'agit de la mère de l'enfant [39]

	Facteurs augmentant le risque D'infection	Facteurs augmentant le risque de progression vers la maladie en cas d'infection
Facteurs liés au contamineur	Nombre croissant de bacilles à l'examen direct Présence de caverne à la radiographie de thorax Tabagisme actif 10	Présence de caverne à la radiographie de thorax
Facteurs liés à l'enfant exposé	Mauvaises conditions socioéconomiques Naissance dans un pays à forte incidence de tuberculose Adolescent Lien familiale de premier degré avec le contamineur Tabagisme actif (adolescent) Tabagisme passif	Age inférieur à 5ans Immunodépression Insuffisance rénale Diabète
Facteurs liés aux conditions d'exposition	Durée d'exposition Répétition des expositions Confinement lors de l'exposition Proximité nocturne avec le contamineur	

Tableau II : Facteurs de risque d'identification d'infection et de progression vers la maladie chez des enfants exposés à un cas de tuberculose respiratoire [40].

Une étude à propos de 47 cas retrouve un pourcentage de 72 % d'enfants vaccinés chez les tuberculeux ; de même, une autre étude à propos de 147 enfants tuberculeux, rapporte 67% d'enfants supposés vaccinés et préconise un contrôle par le BCG des tests tuberculiniques 3 mois après la vaccination et rapporte une absence de contrôle de l'allergie tuberculinique chez les enfants scolarisés. En dehors du contrôle de la vaccination par le BCG, la présence de nourrisson dans le milieu de contagion tuberculeux, est à l'origine de la survenue d'une tuberculose même chez l'enfant vacciné. La protection conférée par le BCG est alors dépassée ; en revanche le BCG protégerait contre les formes graves de tuberculose telles une miliaire ou une méningite tuberculeuse [41].

c. Traitements immunosuppresseurs

Le rôle d'une corticothérapie, d'une chimiothérapie anticancéreuse ou de tout autre traitement immunosuppresseur dans la réactivation clinique d'une tuberculose pulmonaire ou extrapulmonaire est bien connu. Il faut insister sur la responsabilité nouvelle de l'infliximab (Remicade®), de l'adalimumab (Humira ®), anticorps monoclonaux liés au *tumour necrosis factor* utilisés dans le traitement de fond de la polyarthrite rhumatoïde ou de la maladie de Crohn. Fin 2001, en Europe et aux Etats-Unis, ce sont 130 cas de tuberculose survenant avec ce type de traitement qui avaient été notifiés aux autorités sanitaires. En France, en septembre 2002, 21 observations ont été signalées. La tuberculose se déclare entre la deuxième et la dixième perfusion, le plus souvent après la troisième. Plus de la moitié sont des TEP. Deux décès ont été enregistrés. Il y a eu aussi d'autres infections opportunistes. Ceci a conduit l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (AFSSAPS) à éditer en février 2002 des recommandations. Il faut dépister une tuberculose latente ou active avant l'initiation de tout traitement par infliximab ou par adalimumab. Dans tous les cas, lorsqu'une tuberculose est suspectée ou diagnostiquée, le traitement par anticorps monoclonaux doit être différé [35].

d. Co-infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH)

Les personnes qui sont infectées à la fois par le VIH ont 21 à 34 fois plus de risques de développer la tuberculose. Le risque de développer une tuberculose active est également plus grand chez les personnes qui souffrent d'autres affections qui affaiblissent leur système immunitaire. Dans le monde, au moins un tiers des 35 millions de personnes vivant avec le VIH sont infectées par le bacille tuberculeux bien qu'elles n'aient pas toutes encore développé une tuberculose évolutive. Les personnes vivant avec le VIH et infectées par la tuberculose multiplient par 30 le risque de développer une tuberculose évolutive que les personnes qui ne sont pas infectées par le VIH [1]. La tuberculose et le VIH, qui accélèrent mutuellement leur progression, forment une association meurtrière. Une personne positive pour le VIH qui est aussi infectée par le bacille a beaucoup plus de risques de développer une tuberculose évolutive. En 2012, environ 320 000 personnes sont décédées d'une tuberculose associée au VIH ; ainsi la tuberculose est une cause majeure de décès chez les personnes vivant avec le VIH et est responsable d'un quart de tous les décès. Près de 25% des décès parmi les personnes vivant avec le VIH sont dus à la tuberculose. En 2012, on estimait à 1,1 million le nombre de nouveaux cas de tuberculose chez des personnes positives pour le VIH, 75% d'entre elles vivant en Afrique [1].

La tuberculose est donc la complication infectieuse opportuniste la plus commune et la cause de décès la plus fréquente des patients infectés par le VIH. *Mycobacterium tuberculosis* et le VIH forment donc réellement « un duo maudit », chacun aggravant et accélérant la progression de l'autre [1].

Selon une étude rétrospective menée à Cotonou, Bénin chez 1086 patients, 259 étaient co-infectés par le VIH. L'âge moyen des co-infectés était de 36 ans. Le taux de dépistage du VIH chez les patients infectés par la tuberculose était de 99% [42].

D'après une autre étude rétrospective à Yaoundé, Cameroun portant sur 1647 malades tuberculeux dont le statut sérologique pour le VIH était connu pour 1419 d'entre eux, la séroprévalence de l'infection à VIH était de 35 % dans l'ensemble et respectivement de 31,3 %, 43,4 % et 47,7 % chez les tuberculeux pulmonaires à microscopie positive,

à microscopie négative et à localisation extrapulmonaire. Comparés aux patients VIH négatifs, les patients VIH positifs étaient plus âgés (36ans versus 30ans, $p < 0,0001$) et incluait plus de femmes (57,1 % versus 37,3 %, $p = 0,001$) [44]. Une autre étude rapporte 29 cas co-infectés par le VIH et la tuberculose, colligés au service des maladies infectieuses du CHU Mohammed VI de Marrakech, pendant une durée de 5 ans allant de 2007 à 2012. L'âge moyen des patients était de 47,5 ans (22 ans à 73 ans). On notait 10,3% de tuberculose pulmonaire, 55,2% de tuberculose extrapulmonaire et 34,5% de tuberculose disséminée [43].

e. Le tabagisme

Le tabagisme accroît fortement le risque de tuberculose et de décès. L'OMS affirme que plus de 20% des cas de tuberculose dans le monde peuvent être attribués au tabagisme [45]. La relation entre le tabac et la tuberculose a été évoquée depuis 1918 ; et depuis cette date plusieurs études ont confirmé cette relation. L'incidence de la tuberculose augmente avec la consommation du tabac, ce risque est multiplié par 2 voire 4 en cas de nombre de cigarettes consommées par jour supérieur à 20 [46]. Ainsi une exposition prolongée des bronches à la fumée de tabac induit-elle une altération de la clairance muco-ciliaire qui favorise la persistance des germes, dont l'adhésion à la muqueuse bronchique est augmentée [46]. La symptomatologie clinique de la tuberculose est beaucoup plus bruyante en cas de tabagisme associé ; les lésions radiologiques sont diffuses avec la présence de multiples cavités, de lésion nodulaires et d'aspect en miliaire. La recherche de bacille de Koch à l'examen direct des expectorations est souvent positive.

Le tabagisme influence l'évolution sous traitement et le risque de décès par tuberculose ainsi, le délai de négativation des bacilles de Koch dans les expectorations est beaucoup plus long chez les sujets tabagiques. Le tabagisme associé à l'alcoolisme constitue un facteur de risque de développer une résistance secondaire aux antibacillaires [46].

IV .PHYSIOPATHOLOGIE

La tuberculose fait suite à l'inhalation de particules infectieuses émises par un patient-source atteint de tuberculose pulmonaire, particulièrement lors d'un effort de toux, d'éternuement, ou de vocalisation. Ces particules infectieuses, appelées gouttelettes de Pflügge, sèchent rapidement dans l'air, mais peuvent rester en suspension dans une pièce non aérée pendant environ 30 minutes en conservant leur infectiosité [17]. La tuberculose est dite bacillifère lorsqu'elle est suffisamment productive pour que l'examen direct des prélèvements respiratoires visualise des BAAR. Des études anciennes ont montré qu'un patient présentant une tuberculose bacillifère émet environ 3 000 particules infectieuses lors d'un effort de toux, une quantité équivalente s'il parle pendant 5 minutes et beaucoup plus lorsqu'il éternue [17]. La richesse en bacilles tuberculeux dans les prélèvements respiratoires est de loin le principal facteur de risque de transmission [17]. Une étude réalisée aux Pays-Bas dans les années 70 auprès d'enfants a montré que le taux d'attaque (pourcentage de sujets contact infectés) était de 50 % en cas de patient-source bacillifère, vs 5 % en cas de patient-source présentant une tuberculose documentée par la culture des prélèvements respiratoires, mais ne retrouvant pas de BAAR à l'examen direct [33] .

Néanmoins, bien que le risque soit faible, une proportion non négligeable de cas peut survenir après une exposition à un sujet présentant une tuberculose à bacilloscopie négative. Ainsi, dans une étude réalisée à Vancouver (Canada), 22 % des cas index étaient à frottis négatifs. Aux Pays-Bas, 13 % des cas de tuberculose à culture positive pris en charge de 1996 à 2004 étaient secondaires à des tuberculoses pulmonaires avec absence de BAAR à l'examen direct [33].

Dans la minorité des cas, les bacilles atteignent les alvéoles pulmonaires. Là, ils entrent en contact avec les macrophages alvéolaires qui, en général, les phagocytent, les dégradent et les éliminent. Cependant, si les défenses immunitaires innées de l'individu sont réduites, si l'infection est importante (charge bactérienne élevée) ou si la bactérie est fortement virulente, il arrive que des bacilles survivent dans les macrophages et s'y multiplient. Les macrophages

colonisés finissent par éclater et libérer un grand nombre de bacilles capables d'infecter, à leur tour, d'autres macrophages. Ainsi, un foyer infectieux se développe au niveau du poumon et provoque la formation d'une lésion ou « chancre d'inoculation ». Le corps de la personne infectée réagit à cette « primo-infection » par le développement d'une réponse immunitaire cellulaire et la formation d'un granulome constitué principalement de macrophages infectés et de cellules T [46,47]. Dans 90% des cas, la maladie ne se développe pas. Le granulome se calcifie et les bacilles emprisonnés restent sous contrôle à l'état quiescent, on parle d'infection tuberculeuse latente (ITL) » [48]. Ces patients ne sont pas contagieux. Chez la plupart des individus, la « primo-infection » passe inaperçue. On peut cependant, parfois, observer de la fièvre, une adénopathie, une perte d'appétit,.... La primo-infection peut être mise en évidence chez un patient grâce au test d'hypersensibilité retardée (intradermoréaction à la tuberculine) [49].

Chez environ 10% des personnes infectées par *M. tuberculosis*, la tuberculose active se développe [47,50]. Elle peut se développer soit directement après la primo-infection, soit après plusieurs années suite à la réactivation de l'« infection tuberculeuse latente ». Dans ce cas, la lésion précédemment formée se nécrose et les bacilles tuberculeux quiescents sont libérés [51].

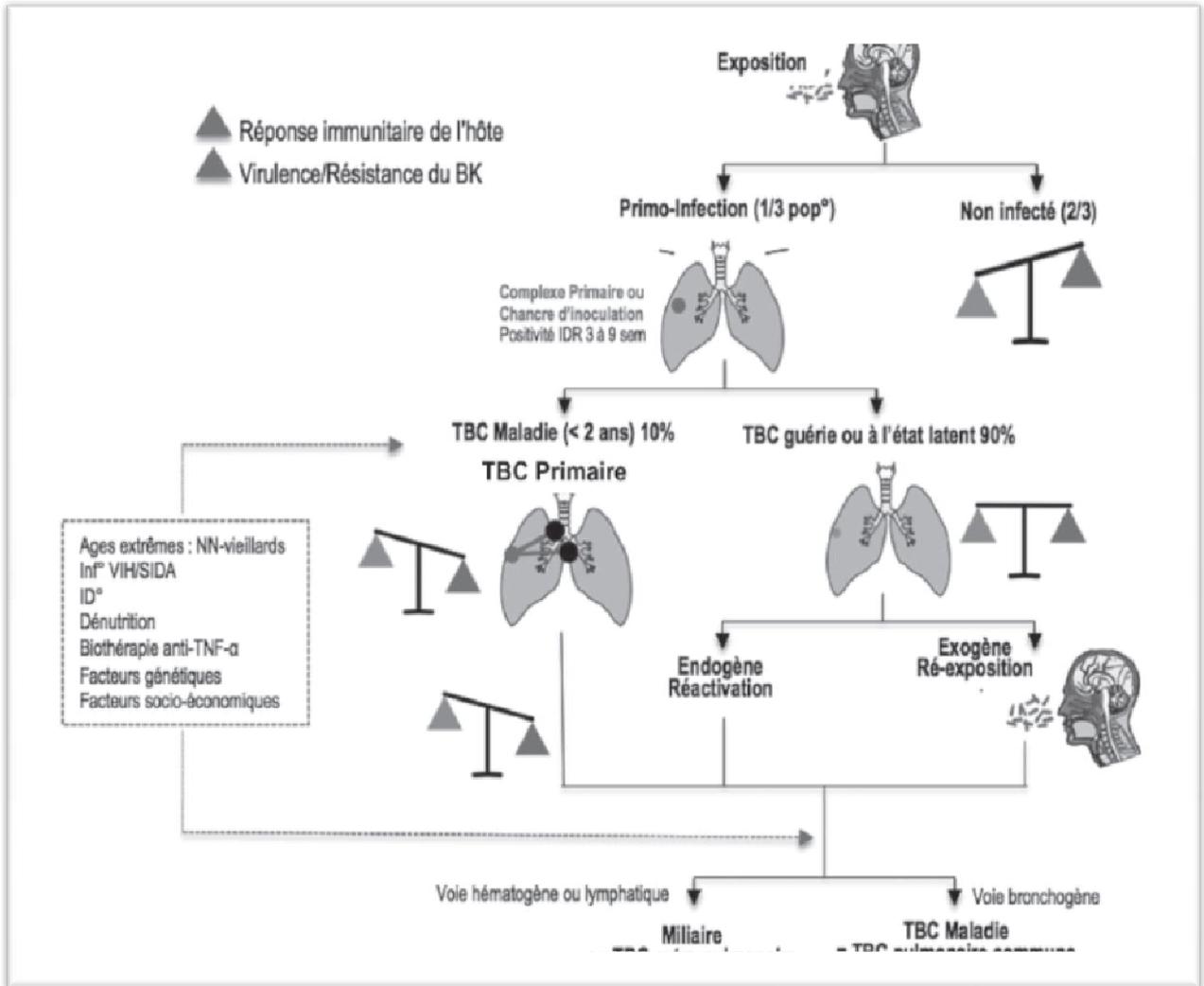


Figure 7 : Histoire naturelle de la tuberculose [52]

V-ASPECTS CLINIQUES

L'infection due au bacille tuberculeux (BK) peut se présenter sous diverses formes:

- Pulmonaires dans deux tiers à trois quarts des cas, et ou
- Extrapulmonaires : tous les organes pouvant être potentiellement atteints (ganglions, méninges, os, etc).

Seule la forme pulmonaire de la tuberculose est contagieuse, lorsque le BK est présent dans l'expectoration, surtout s'il est détecté dès l'examen microscopique direct [50]. A l'échelle mondiale, l'OMS rapporte, parmi tous les cas de TB, 14 % de TBE sans atteinte pulmonaire concomitante. Alors que la majorité des TB actives touchent le système respiratoire, plusieurs études rapportent une augmentation récente de l'incidence des TBE. Aux Etats-Unis, la proportion de TBE est passée de 16 % en 1993 à 20,4 % en 2008, avec une prépondérance de TB ganglionnaires (41 %) ; viennent ensuite les atteintes pleurales (17,7 %), ostéoarticulaires (11 %), péritonéales (6,1 %), urogénitales (5,3 %), et méningées (4,7 %) [2]. En Angleterre en 2008, plus de 40 % des cas de TB rapportées sont des TBE, les populations nées en dehors du territoire britannique étant les plus touchées, tandis qu'en France le pourcentage des TBE est de l'ordre de 25 % à 27 %. En Suisse, les données publiées par l'OFSP pour la période 2001- 2004 rapportent 37% de cas de TBE. Une étude récente effectuée dans le canton de Genève, où l'incidence de TB est de 2,5 fois supérieure à la moyenne nationale suisse, révèle que 54 % des cas présentaient une atteinte extrapulmonaire dont 37 % étaient exclusivement extrathoraciques [51].

1. Tuberculose pulmonaire

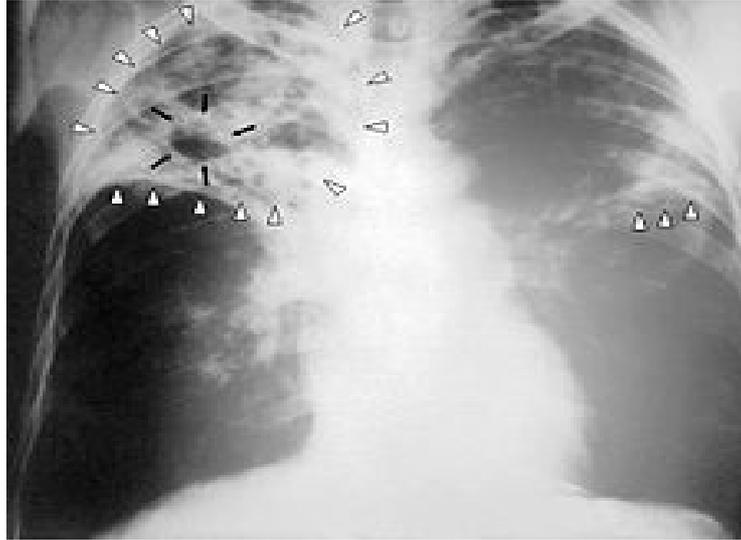


Figure 8 : Radiographie du thorax d'un patient avec une tuberculose pulmonaire avancée [53].

La tuberculose pulmonaire est le résultat :

- Soit d'une infection exogène à partir d'un sujet très contagieux (tuberculose primaire), et/ou chez un hôte plus ou moins immunodéprimé.
- Soit d'une réactivation endogène à partir de bacilles persistants après une infection tuberculeuse, ou une tuberculose pulmonaire insuffisamment ou non traitée ayant laissé en place des bacilles vivants (tuberculose secondaire) [32].

Le plus souvent, les symptômes s'installent progressivement et persistent plusieurs semaines. Les signes respiratoires ne sont pas spécifiques. La toux, d'abord sèche, devient productive et des douleurs thoraciques apparaissent. On évoque en premier lieu une pneumopathie banale, mais l'interrogatoire retrouve une altération de l'état général, un amaigrissement et des sueurs nocturnes. L'évolution est traînante et les antibiotiques usuels sont inefficaces. Les hémoptysies sont moins fréquentes, mais ont l'intérêt d'inquiéter le patient, puis le médecin. Elles révèlent 10 à 15 % des tuberculoses. Une dyspnée se manifeste dans les formes très étendues [51].

La radiographie du thorax est évocatrice par la localisation et l'aspect des lésions. Les anomalies siègent typiquement dans les lobes supérieurs au sommet ou dans le segment apical du lobe inférieur. Elles sont isolées ou associées, de type infiltrat, caverne ou nodule, souvent bilatérales, accompagnées d'une réaction pleurale. Ces manifestations cliniques et radiographiques doivent conduire à la réalisation d'une intradermoréaction et de prélèvements bactériologiques.

Les formes actuellement observées chez des patients en situation de précarité se manifestent moins de 2 ans après la primo-infection et correspondent souvent à des formes pulmonaires aiguës. Si l'atteinte pulmonaire demeure la plus fréquente, elle est souvent associée, notamment chez les sujets originaires d'Afrique et d'Inde à des atteintes ganglionnaires et à un mal de Pott plurivertébral [51].

2. Tuberculoses extrapulmonaires

Associées ou non à une atteinte pulmonaire, elles représentent environ 25 % des cas déclarés. L'infection des différents organes par voie hématogène, lymphatique ou aérienne peut se traduire par une localisation prédominante alors que le foyer initial a depuis longtemps disparu. Le diagnostic repose sur l'isolement du BK (urines, liquide céphalorachidien]) ou sur l'anatomopathologie (ganglion, os, moelle osseuse, etc.) [51].

a. Tuberculose ganglionnaire

La tuberculose ganglionnaire est souvent observée chez les enfants et chez les jeunes adultes, moins fréquemment chez les sujets de race blanche [30]. Plusieurs travaux notent une légère prédominance chez la femme (ratio homme/femme : 1/1,3) [50]. Les adénopathies prennent souvent l'aspect de masses de consistance dure, non mobiles, douloureuses et inflammatoires. Dans une étude récente portant sur 106 cas d'adénite tuberculeuse, les aires ganglionnaires les plus fréquemment affectées étaient les aires cervicales (57 %), puis supraclaviculaires (26 %), sous-mandibulaires (13 %) et axillaires (12 %). Parmi les

localisations moins fréquemment rapportées, notons les aires sous-mentonnières (4 %), inguinales (3 %), épitrochléennes (3 %) et auriculaires postérieures (3 %). Sont également décrites des adénites bilatérales. Cette étude révèle aussi que 15 % de patients se présentaient d'emblée avec une TB pulmonaire concomitante [50]. En cas de localisation sous-dermique, l'atteinte ganglionnaire tuberculeuse est à l'origine d'une tuméfaction douloureuse d'un ou plusieurs ganglions lymphatiques. Des ganglions non contigus peuvent être atteints. La peau en regard est d'abord normale, mais elle se modifie progressivement avant une fistulisation qui cicatrise difficilement. Le diagnostic de la tuberculose ganglionnaire est établi par ponction au pôle supérieur de l'adénopathie (particulièrement chez l'immunodéprimé), ou par biopsie pour l'étude microbiologique du matériel obtenu, et pour l'examen histocytologique qui peut mettre en évidence un granulome avec nécrose caséuse chez les sujets immunocompétents [30].

b. Tuberculose du système nerveux central

La méningite est beaucoup plus fréquente que les tuberculomes intracrâniens. L'atteinte du système nerveux central représente environ 5 % de tous les cas de tuberculose extrapulmonaire, tant chez l'homme que chez la femme [32]. Elle se présente sous la forme d'une méningite d'installation plutôt progressive sur quelques semaines, isolée, ou associée à des signes neurologiques focaux, avec en particulier une atteinte évocatrice de la base du crâne. Le début est souvent insidieux (fièvre, anorexie, vomissements, régression pondérale, céphalées) avec des troubles du comportement (irritabilité, apathie) qui sont parfois les seules manifestations à attirer l'attention, plus tardivement, des signes neurologiques apparaissent (convulsions, une raideur de la nuque, paralysie oculomotrice, troubles de conscience, coma) [51].

La méningite tuberculeuse survient classiquement surtout chez l'enfant de moins de 5 ans ; elle est le résultat soit d'un ensemencement méningé et de la prolifération du bacille tuberculeux, soit d'une rupture d'un foyer tuberculeux préexistant. La ponction lombaire est l'étape essentielle du diagnostic, précédée d'un examen tomodensitométrique du crâne qui

peut montrer un œdème diffus ou une hydrocéphalie obstructive. La ponction lombaire ramène un liquide sous pression, qui contient 100 à 1 000 cellules/mm³. Chez deux tiers à trois quarts des malades le liquide est lymphocytaire, les polynucléaires prédominant à la phase précoce de la méningite. La protéinorachie est élevée chez tous les malades et la glycorachie est abaissée. Les bacilles sont vus à l'examen direct chez 10 % à 20 % des malades, les cultures étant positives chez 45 % à 90 % d'entre eux. Une élévation de l'ADA (adénosine désaminase) dans le liquide céphalorachidien est un argument pour le diagnostic de tuberculose. Les tuberculomes ont une présentation clinique plus discrète que les méningites. Il s'agit habituellement d'une lésion focale augmentant progressivement de volume et responsable de signes neurologiques en foyer, bien qu'une hypertension intracrânienne sans atteinte focale soit possible. Le liquide céphalorachidien est habituellement normal et le diagnostic peut être établi par le scanner et la biopsie ou aspiration d'une lésion [32].

c. Pleurésies tuberculeuses

Les atteintes pleurales tuberculeuses sont à l'origine soit d'une pleurésie sérofibrineuse, soit d'un empyème. La pleurésie sérofibrineuse, bien qu'elle puisse être accompagnée de localisation pulmonaire, a peu de particularités cliniques et elle peut être la seule manifestation de la tuberculose. Le scanner peut retrouver un épaississement pleural et des localisations pulmonaires et médiastinales évocatrices de tuberculose non visibles sur la radiographie standard du thorax. La ponction pleurale ramène un liquide citrin exsudatif. La mesure de la concentration pleurale d'adénosine désaminase (ADA), élevée dans la pleurésie tuberculeuse, peut contribuer au diagnostic : le dosage de l'ADA a une sensibilité de 92 % et une spécificité de 90 % pour le diagnostic de pleurésie tuberculeuse. La cytologie est pauvre en cellules mésothéliales et en éosinophiles, riche en leucocytes (100 à 5 000/mm³), polynucléaires initialement, cellules lymphomonocytaires. L'examen principal, et qui peut être répété, est la ponction-biopsie de la plèvre avec les aiguilles d'Abrams. La rentabilité de l'examen est excellente puisque 80 % environ des pleurésies sérofibrineuses tuberculeuses peuvent être diagnostiquées par la mise en évidence de granulomes tuberculoïdes. L'incertitude diagnostique justifie le recours à la pleuroscopie diagnostique [32].

d. Tuberculose osseuse

La plus fréquente localisation ostéoarticulaire est la spondylodiscite tuberculeuse appelée aussi « mal de Pott ». Elle correspond à une atteinte vertébrale et discale avec formation d'abcès froids paravertébraux pouvant entraîner des déformations rachidiennes et des tassements vertébraux ainsi que des complications neurologiques par compression. Des ostéoarthrites tuberculeuses touchant les structures périphériques sont également décrites. Dans la majorité des cas, elles se présentent sous la forme d'une monoarthrite chronique, touchant plus fréquemment la hanche ou le genou. Des abcès froids peuvent se développer au contact de l'articulation et se fistuliser. Des co-infections à germes banals peuvent coexister, voire même être le mode de révélation de l'infection tuberculeuse sous-jacente. De plus, le diagnostic différentiel peut être difficile lorsque la tuberculose se développe sur une articulation pathologique préexistante (goutte, arthrite inflammatoire, etc.). En l'absence d'une autre atteinte tuberculeuse extra-articulaire, la biopsie osseuse à visée microbiologique et histologique est nécessaire au diagnostic. Le traitement est en priorité médical et prolongé ; le recours à la chirurgie est licite en cas d'instabilité articulaire et à envisager après l'échec du traitement médical [51].

e. Miliaire tuberculeuse

La miliaire tuberculeuse est une forme grave, aiguë de tuberculose due à la dissémination lymphohématogène des bacilles tuberculeux à partir d'une lésion focale rompue dans le flux sanguin ou lymphatique. C'est une affection relativement peu fréquente, représentant moins de 2 % des tuberculoses selon certains auteurs et environ 8 % des tuberculoses extrapulmonaires [54]. La miliaire survient soit chez des sujets jeunes, rapidement après infection tuberculeuse, surtout dans les pays de haute endémie tuberculeuse et/ou de co-infection VIH, soit par réactivation, chez des sujets plus âgés, dans les zones de basse prévalence tuberculeuse. Le terme de miliaire provient de la similarité des lésions miliaires tuberculeuses (granulomes de 1 à 3 mm de diamètre) avec des grains de mil : ces lésions sont vues sur la radiographie du thorax dans 85 % des cas sous la forme de micronodules diffus aux deux champs, les poumons étant toujours atteints, les autres organes de façon variable. Elle commence habituellement insidieusement par de l'anorexie, des malaises, la fièvre, la perte de poids, symptômes qui s'aggravent progressivement et s'enrichissent de diverses manifestations liées à la dissémination du bacille tuberculeux, mais qui aboutissent à un tableau infectieux sévère avec insuffisance respiratoire se majorant

progressivement. La toux, la dyspnée et l'hémoptysie peuvent manquer ; les céphalées et les confusions liées à une méningite tuberculeuse sont rares, comme l'hépatomégalie, les adénopathies et la splénomégalie. Des épanchements pleuraux et péricardiques, voire péritonéaux, peuvent être présents. Un signe spécifique mais rare de la miliaire tuberculeuse est le tubercule de Bouchut, tache jaunâtre à bords flous, peu saillante, pouvant devenir blanchâtre lorsque la maladie progresse, siégeant sur la rétine près d'un vaisseau ; cette atteinte rétinienne peut être rapprochée des lésions cutanées (papules, macules, taches purpuriques) qui sont des lésions de vascularite infectieuse.

La radiographie retrouve une dispersion régulière des nodules de 1 à 3 mm dans les deux champs pulmonaires ; des épaissements des septa interlobulaires et de fins réseaux intralobulaires sont souvent présents ; d'autres anomalies radiologiques sont dues à la tuberculose comme un complexe primaire ou des lésions de tuberculose antérieure qui suggèrent une réactivation. L'infection sévère se majorant s'associe à une insuffisance respiratoire avec apparition d'opacités diffuses ou localisées en verre dépoli s'aggravant progressivement jusqu'au syndrome de détresse respiratoire aiguë. [32].

f. Péricardite tuberculeuse

Bien que peu fréquente, elle est potentiellement fatale et doit être reconnue. Elle tend à survenir plus fréquemment en cas de co-infection VIH. L'épanchement péricardique avec un épaissement péricardique ou une atteinte péricardique est la forme la plus fréquente. Les symptômes observés résultent de l'infection ou de l'atteinte péricardique (fièvre, amaigrissement, sueurs nocturnes), tardivement on peut observer une toux, une dyspnée, une orthopnée, et une douleur thoracique pouvant mimer une douleur angineuse. Le péricarde peut contenir jusqu'à 2 à 4 l, l'épanchement peut être hémorragique et renfermer des monocytes et des polynucléaires. Comme dans la pleurésie sérofibrineuse tuberculeuse, la mesure de la concentration d'ADA peut contribuer au diagnostic. Le bacille tuberculeux est retrouvé dans 25 % à 30 % des cas, examen direct et culture combinés. La biopsie du péricarde pour examen microbiologique et histologique permet le plus souvent le diagnostic, bien que des aspects non spécifiques puissent faire exclure à tort une tuberculose. À cause de l'inflammation persistante, un épaissement progressif du péricarde et de l'épicarde survient chez 90 % des sujets, s'accompagnant d'une constriction cardiaque chronique [32].

g. Tuberculose urogénitale

Une tuberculose rénale peut survenir quelle que soit la forme de tuberculose. Souvent elle est retrouvée de façon concomitante à une localisation pulmonaire qui n'est pas nécessairement active. La leucocyturie aseptique est évocatrice et l'urographie objective habituellement des anomalies d'autant plus importantes que l'évolution de l'infection est prolongée : des modifications des structures urinaires qui paraissent rétrécies et rigides, avec une moindre capacité à se déformer, des calcifications suggestives et une hydronéphrose. La recherche de mycobactéries sur les urines, prélevées le matin, 3 jours de suite, au mieux après restriction hydrique, et leur mise en culture permet d'établir le diagnostic dans la majorité des cas. Si une obstruction se développe, une corticothérapie adjuvante au traitement antibiotique peut permettre la levée de l'obstacle. En l'absence d'amélioration ou en cas de complication, le recours à la chirurgie peut être nécessaire. Chez l'homme, une atteinte génitale est fréquemment associée à l'atteinte rénale, pouvant impliquer la prostate, les vésicules séminales, les épидидymes et les testicules. Le diagnostic est suggéré par la mise en évidence de calcifications repérables à l'examen clinique. Chez la femme, la tuberculose génitale débute par une salpingite, à partir de laquelle l'infection peut progresser vers les autres organes génitaux, et provoquer une stérilité [51].

h. Tuberculose digestive

La contamination du tube digestif est le résultat de l'ingestion directe de bacilles tuberculeux dans le bol alimentaire, de la déglutition de sécrétions respiratoires contenant le bacille tuberculeux, d'une dissémination hématogène ou d'un foyer tuberculeux contigu. Les lésions sont des ulcérations et/ou des infiltrations. Les symptômes sont des douleurs, une masse abdominale palpable, un syndrome occlusif et une diarrhée. Il est essentiel de distinguer la maladie de Crohn d'une tuberculose intestinale, en raison des stratégies thérapeutiques très différentes que ces deux maladies impliquent. L'imagerie est contributive

au diagnostic, mais la colonoscopie et la coéloscopie bien davantage en permettant l'étude anatomopathologique et microbiologique [32]. L'évolution peut se faire vers des complications telles qu'une hémorragie, une perforation, une obstruction, une fistulisation et des troubles sévères de malabsorption. La réponse au traitement antibiotique est excellente et doit laisser si possible le délai nécessaire à son évaluation avant tout recours à la chirurgie. Des tuberculoses pancréatiques existent sous un aspect d'abcès ou de masse hétérogène, impliquant aussi des ganglions, qui peuvent à tort orienter vers une tumeur. Par ailleurs, les voies biliaires peuvent être obstruées par des adénopathies tuberculeuses contiguës. Des cholangites tuberculeuses ascendantes ont été aussi décrites. La tuberculose est une cause fréquente d'hépatite granulomateuse, habituellement asymptomatique, ou du moins associée à une élévation isolée des phosphatases alcalines [51].

i. Tuberculose cutanée

La tuberculose cutanée peut se présenter exceptionnellement sous forme d'un chancre après inoculation locale (tatouage, traumatismes), ou parfois sous forme d'une ulcération cutanée ou périorificielle des muqueuses buccales ou génitoanales. Dans ce cas, elle résulte de l'extension à la peau ou à la muqueuse d'une infection pulmonaire, intestinale ou urogénitale en évolution [51]. C'est une maladie du sujet jeune, 60 % des patients ont moins de 30 ans, pourcentage retrouvé également dans les séries maghrébines. En Europe, la tuberculose cutanée reste rare ; elle représente respectivement 2,1 et 0,14 % de l'ensemble des tuberculoses et des affections dermatologiques dans une étude espagnole. Elle se distingue des autres formes extrapulmonaires par un grand polymorphisme anatomoclinique. Le lupus tuberculeux représente la forme clinique prédominante en Europe contrastant avec la prédominance des scrofulodermes et gommages au Maroc [29].

VI .TRAITEMENT

1. Traitement de la tuberculose

Les traitements antituberculeux utilisés actuellement ont été découverts entre les années 1950 et 1970 : isoniazide (INH), rifampicine (RMP), éthambutol (EMB) et pyrazinamide (PZN). Avant la mise à disposition de ces médicaments efficaces, 50 % des patients atteints de tuberculose active mouraient dans les deux ans [55]. Depuis l'avènement de cette chimiothérapie antituberculeuse, la guérison est généralement obtenue quand les conditions d'une bonne prise en charge sont réunies [55]. Le traitement antibiotique a pour objectif d'obtenir une bactéricidie rapide, d'éviter le développement de bactéries résistantes et d'éradiquer les bacilles persistants dans les foyers tuberculeux pour prévenir une rechute. Les antibiotiques n'ont pas la même activité sur les différentes populations de bacilles de Koch présentes chez l'hôte. En effet, ils coexistent trois formes de bacilles au sein d'un même foyer : des bacilles à métabolisme actif en milieu anaérobie (extracellulaire ou intracavitaire), des formes intramacrophagiques (intracellulaires pour lesquelles les antibiotiques doivent avoir une bonne diffusion intracellulaire et une activité en milieu acide), des bacilles intracaséux quiescents ou dormants difficiles d'accès aux antibiotiques et dont le métabolisme est très lent et rend nécessaire un traitement prolongé [38].

L'adjonction successive de ces antituberculeux a permis de réduire la durée du traitement qui est passée de 24 mois à seulement six mois. Les différents antibiotiques ont permis d'obtenir une stérilisation complète des lésions et d'être actif sur les différentes populations de bacilles intra- ou extracellulaires, quiescents ou non. La polychimiothérapie a permis de réduire la sélection de mutants résistants. La durée recommandée de traitement de la tuberculose pulmonaire est de six mois [38].

Il existe plusieurs schémas thérapeutiques possibles, tous comprennent une phase initiale de traitement d'attaque intensif d'une durée habituelle de deux mois puis une phase d'entretien d'au moins quatre mois. Le traitement classique est d'une durée totale de six mois associant les deux premiers mois :

- L'INH (4 à 5 mg/kg/j)
- La RMP (10 mg/kg/j),
- L'EMB (15 à 20 mg/kg/j)
- La PZA (20 à 30 mg/kg/j)

Relayé pendant les quatre mois suivants par une bithérapie associant INH et RMP (**Tableau 3**). L'EMB doit être systématiquement associé en début de traitement, au minimum jusqu'aux résultats des tests phénotypiques (antibiogramme) à des antituberculeux de première ligne. Son rôle est de prévenir l'apparition de nouvelle résistance en cas de sensibilité diminuée ou de résistance de la souche à l'INH. Cela est justifié par l'incidence relativement élevée de résistance à l'INH [33]. Après réception d'un antibiogramme multisensible, la décision de l'arrêt de l'EMB peut ainsi être discutée selon la sévérité du cas [38].

Dénomination commune internationale	Nom commercial Spécialité	Présentation	Posologie	Effets indésirables
Isoniazide (INH)	Rimifon (Formes combinées : Rifinah et Rifater)	Forme orale : (comprimé) à 50 mg et 150 mg	Adulte : 4à5mg/kg/j Enfant : 5à10 mg/kg/j Ne pas dépasser 300 mg/j	Cytolyse Hypersensibilité Troubles neuropsychiatriques Lupus induit
Rifampicine(RMP)	Rifadine Rimactan (Formes combiné :Rifinah et Rifater)	Forme orale : gélule de 300 mg Sirop 100 mg/5ml Forme parentérale (ampoule) :600 mg	Adultes :10 mg/kg/j Enfant : 10à20 mg/kg/j Ne pas dépasser 600 mg/j	Hypersensibilité Insuffisance rénale
Rifabutine	Ansatipline	Forme orale : gélule de 150 mg	Adulte : 10 mg/kg/j Ne pas dépasser 600 mg/j	Hypersensibilité Insuffisance rénale
Ethambutol(EMB)	Myambutol Dexambuthol	Forme orale : comprimé de 500mg (Dexambuthol) comprimé de 400mg (Myambutol) Forme parentérale (ampoule Myambutol) 1000 mg/10 ml	Adulte : 15 à20 mg/kg/j Enfant : 15à25 mg/kg/j Ne pas dépasser 2,5 g/j	Névrite optique rétrobulbaire
Pyrazinamide(PZA)	Pyrilène Forme combinées :Rifater	Forme orale: comprimé de 500 mg	Adulte et enfant 20 à 30 mg/kg/j Ne Pas dépasser 2000 mg/j	Insuffisance rénal Hyperuricémie

Tableau III : Posologies et caractéristiques des principaux antituberculeux [38]

2. Traitement de la tuberculose multirésistante

Les schémas thérapeutiques pour le traitement de la tuberculose à bacilles multirésistants sont très longs, mal toléré, coûteux et nettement moins efficaces que le traitement de première ligne de la tuberculose sensible aux médicaments [56].

Les rapports de l'OMS montrent que seulement 48% de plus de 25 000 patients atteints de la tuberculose MDR dans 107 pays qui ont commencé le traitement de la tuberculose MDR en 2009 terminent leur traitement avec (15%) de décès, (14%) interruption du traitement, (9%) échec du traitement, (14%) [57]. Une méta-analyse individuelle des 9153 patients atteints de tuberculose à bacilles multirésistants, à partir de 32 observations cohortes, rapporte les résultats suivants (54% de réussite, 23% défaut, 8% d'échec ou de rechute et 15% de mort) [56]. Les patients présentant des souches de tuberculose qui avaient acquis une résistance supplémentaire aux médicaments injectables de deuxième ligne, et aux fluoroquinolones, ou les deux (XDR tuberculose) avaient des mauvais résultats, avec des taux de succès du traitement de moins de 50% [57].

L'accès au traitement est médiocre contre les souches résistantes de tuberculose, cependant, dans certains pays à forte charge de morbidité, le taux de succès du traitement est amélioré, et des taux de guérison plus de 75% sont obtenus. Une étude réalisée par Van Deun et 76 collègues en 2010, ont montré d'excellents résultats chez les patients tuberculeux MDR du Bangladesh qui ont été traités pendant 9 mois avec gatifloxacine, la clofazimine, éthambutol, pyrazinamide tout au long de la période de traitement, complétée par procainamide, la kanamycine, et une dose élevée d'Isoniazide pendant une phase intensive d'un minimum de 4 mois [58]

L'OMS a émis des recommandations concernant la prise en charge des tuberculoses résistantes, tout en soulignant l'insuffisance de données conclusives [32]. La durée préconisée de la phase intensive (comprenant un agent injectable) est d'au moins six mois ou au moins quatre à six mois après la conversion bactériologique (définie par la négativation des examens microscopiques (EM) et des cultures). La durée totale de traitement recommandée est d'au moins 18 mois après conversion bactériologique. Le traitement d'une

tuberculose multirésistante doit comprendre au moins quatre agents antituberculeux efficaces. La prise du traitement sous supervision directe (DOT) est fortement recommandée. La fréquence de surveillance des EM et des cultures est mensuelle jusqu'à la conversion puis devient trimestrielle pour les cultures et reste mensuelle pour les EM. La société de pneumologie de langue française recommande quant à elle, que le patient n'ait jamais moins de trois médicaments actifs en début de traitement, et préconise de traiter au moins 12 mois après négativation des cultures [57].

L'OMS préconise une recherche rapide de résistance à l'INH et à la rifampicine ou, ou à la rifampicine seulement (ce qui suppose un test moléculaire de résistance). Le Tableau 4 indique quels traitements prescrire en cas de résistance à un seul des antituberculeux majeurs de première intention. Les traitements des tuberculoses multirésistantes doivent comprendre des antituberculeux oraux de première ligne (PZA associé ou non à l'EMB), une quinolone de dernière génération (LVX ou MOX), deux des antituberculeux oraux de seconde ligne (thioamide et ETH ou PTH, isoxazolidinone et CS ou TZ, PAS), et à la phase intensive initiale un antituberculeux injectable (kanamycine, amikacine ou capréomycine), à choisir parmi les antituberculeux non résistants. Quant aux tuberculoses ultrarésistantes, elles font appel aux antituberculeux précités auxquels les bacilles restent sensibles et à des antituberculeux dont l'efficacité reste incertaine. La chirurgie peut avoir sa place dans le traitement de ces tuberculoses résistantes [32].

Résistance	Durée traitement en mois (association d'antituberculeux)	
	Initialement connue	Identifiée en cours de traitement
INH	2(RMP+EMB+PZA+ SM+7(RMP+EMB)	6(INH+RMP+EMB+PZA) 2(RMP+EMB+PZA)+ 10(RMP+EMB*)
RMP	2(RMP+EMB+PZA+ 16- 22(INH+EMB+_PZA) 12 (INH+EMB+PZA+FQL)	
EMB	2(RMP+EMB+PZA)+ 7(INH+RMP)	2(RMP+EMB+PZA)+ 7(INH+RMP)
PZA	2 (INH+RMP+EMB)+ 7(INH+RMP)	2(INH+RMP+EMB)+ 7(INH+RMP)

INH:

Isoniazide;RMP:Rifampicine;EMB:Ethambutol;PZA:Pyrazinamide;SM:Streptomycine;FQL:Fluroquinolone (Moxifloxacin ou Lévofoxacin)*EMB:15 mg/kg

Tableau IV: Traitement de la tuberculose résistant à un antituberculeux [32].

VII .PREVENTION DE LA TUBERCULOSE

La lutte contre la tuberculose s'entend comme un ensemble d'actions collectives organisées et conjuguées, destinées à limiter les conséquences de cette maladie en termes de mortalité et de morbidité.

Comme pour toute maladie infectieuse, la lutte contre la tuberculose s'efforce à:

- Prémunir les sujets susceptibles contre l'infection ou contre la maladie ;
- Interrompre la chaîne de transmission entre individus ;
- Empêcher l'évolution de l'infection vers la maladie

La maîtrise de la tuberculose repose principalement sur l'interruption de la chaîne de transmission afin de réduire le nombre de nouveaux cas au-dessous d'un seuil significatif. On estime ainsi que lorsque l'incidence annuelle de toutes formes de tuberculose est inférieure à $20/10^5$ ou a fortiori à $10/10^5$ (OMS), la maladie est maîtrisée d'un point de vue de santé publique [22].

A. Méthodes de lutte :

1 .Contrôle des sources de dissémination :

La maladie étant surtout transmise par voie respiratoire, la présence de bacilles acido-alcoolo-résistants à l'examen bactériologique direct de l'expectoration constitue un important marqueur de la transmission. Les personnes dont l'examen direct de l'expectoration est négatif mais qui ont des cultures positives à *M. tuberculosis* ont une contagiosité cinq fois moins importante, aussi leur rôle est-il plus secondaire dans un objectif de maîtrise. Enfin, on sait que la tuberculose peut être transmise par des malades avec culture négative, mais sur le plan

de la dissémination cette diffusion est encore plus anecdotique et constitue donc une moindre priorité (même s'il existe un continuum évolutif entre les patients négatifs et positifs) [22].

2 .Dépistage précoce des sujets contagieux :

La maîtrise de la maladie repose donc sur l'identification la plus précoce des sources principales de transmission de l'infection (en pratique surtout les personnes malades symptomatiques) et leur traitement rapide, efficace et suivi afin de réduire l'exposition des membres de la communauté [22].

3. Traitement des cas contagieux :

Lorsque les souches sont sensibles, les traitements antibiotiques actuels sont rapidement efficaces et diminuent considérablement la quantité et la vitalité de *M. tuberculosis* et donc la contagiosité. Lors du traitement initial d'une tuberculose à germes sensibles, la décroissance du nombre de bacilles dans l'expectoration est spectaculaire de l'ordre de 90 % en 24 heures et 99 % en une semaine. Dans les conditions réelles avec présence d'un traitement bien conduit et bien suivi, et en absence de résistance, on estime en pratique que la contagiosité d'un patient est maîtrisée après deux à trois semaines (et après une semaine chez un patient à bactériologie négative), mais il reste difficile d'affirmer (faute de test définitif) l'absence de tout risque de contagion.

Chez les sujets qui présentent des cavernes à l'examen radiologique ou une toux persistante et dont les bacilles sont résistants aux antibiotiques ainsi que chez certains malades vivant en hébergement collectif, il est préférable de confirmer la non-contagiosité par la négativité de trois examens bactériologiques des crachats [22].

4. Contrôle des sources de *Mycobacterium bovis* :

La source d'infection tuberculeuse qui a été le plus efficacement maîtrisée est le cheptel bovin. Même si la tuberculose à *M. bovis* a toujours été moins fréquente et, comme de nombreuses zoonoses, ne se propagent pas entre humains, elle représentait historiquement une part significative des tuberculoses de l'enfant et des formes extrapulmonaires, et elle n'a disparu ni chez l'homme, ni surtout chez les réservoirs animaux. Elle représentait historiquement une part significative des tuberculoses de l'enfant et des formes extrapulmonaires, et elle n'a disparu ni chez l'homme, ni chez les réservoirs animaux. Elle a été remarquablement maîtrisée durant la première moitié du siècle dernier par la conjonction de mesures drastiques de pasteurisation du lait, de surveillance des réactions tuberculiques chez les bovins et par l'abatage des troupeaux malades [22].

5. Vaccination :

Le vaccin BCG est un *Mycobacterium bovis* atténué obtenu par Calmette et Guérin grâce à des passages en série durant 13 ans (1909-1921) [58]. Il est disponible sous forme lyophilisée qui doit être conservée à 4 °C et à l'abri de la lumière, pour injection strictement intradermique (vaccin BCG SSI®) [32].

La plupart des pays à incidence élevée (> 20 pour 100 000) recommandent la vaccination par le BCG à tous les enfants dès la naissance. Au Maroc le programme national de vaccination a été introduit par l'OMS depuis 1974 [59].

La couverture Vaccinale par le BCG est la plus élevée dans le monde [59], (plus de 3 milliards de doses), en particulier dans les pays de forte incidence qui adoptent le programme de vaccination de l'OMS [22].

Chez une personne préalablement vaccinée, qui serait ensuite exposée au bacille tuberculeux, le vaccin limite le risque de progression vers la TB maladie [32]. L'efficacité du BCG a toujours été controversée [58].

Plusieurs études ont confirmé l'intérêt du BCG avec un taux de protection estimé à 84 % pour les tuberculoses extrapulmonaires, et 54 % pour les tuberculoses pulmonaires, soit un taux global de protection de 73 %. Ultérieurement, une méta-analyse a conclu que l'efficacité du vaccin est de 50 % à 60 % pour les formes confondues et de 70 % à 80 % pour les formes graves (miliaires, méningites) [60]. Si l'efficacité du BCG paraît maximale lorsque la vaccination est effectuée entre 6 mois et 10 ans, le risque de tuberculose existe dans les milieux socio-économiques à risque dès la première année de vie [32]. L'abandon de la vaccination effective dans certains pays s'était accompagné d'une augmentation de l'incidence de la tuberculose, notamment chez les enfants nés de parents étrangers, en raison d'une couverture vaccinale insuffisante malgré des facteurs de risque élevé. Cette possibilité ne peut être écartée depuis l'arrêt de la vaccination obligatoire [58].

Les contre-indications à la vaccination par le BCG sont rares, limitées aux maladies infectieuses évolutives, aux états d'immunodépression, à l'eczéma en poussée, aux maladies auto-immunes, à la grossesse. Aussi le BCG est contre-indiqué en cas de sida ; même si la vaccination est effectuée au stade d'infection non compliqué par le VIH, elle ne prémunit pas contre la tuberculose au stade de sida.

L'OMS ne recommande sa pratique chez les sujets séropositifs asymptomatiques qu'en cas de forte prévalence de tuberculose dans l'entourage, c'est-à-dire dans la région géographique ou dans le milieu socio-économique du sujet. Pour les enfants de mère séropositive, il faut attendre l'âge de 1 an avant de savoir s'ils sont infectés par le VIH ou non (auparavant leur séropositivité peut en effet être due aux anticorps maternels). Cependant, il est recommandé d'effectuer la vaccination chez ces nouveau-nés comme chez les séronégatifs, sauf en cas de sida avéré [32].

6. Chimio prophylaxie

Elle est envisagée après une exposition suspecte ou avérée à un cas de tuberculose pulmonaire, chez des personnes dont l'infection par le bacille tuberculeux est attestée par l'allergie tuberculinique (tuberculose-infection ou primo-infection), sans argument clinique ni radiologique pour une tuberculose-maladie. Ce traitement permet chez l'immunocompétent de réduire l'incidence de la tuberculose maladie de 50 à 65% et repose classiquement sur l'INH (10 mg/kg par jour avant l'âge de deux ans et 5 mg/kg par jour au-delà, sans dépasser 300 mg/jour), soit en monothérapie pendant neuf mois (première option chez l'adulte), soit en association avec la RMP (première option chez l'enfant), ce qui permet de diminuer la durée de traitement à trois mois et pourrait favoriser l'observance [55]. L'indication de la chimio prophylaxie n'est pas formelle et dépend essentiellement du terrain: on recommande de traiter «tout enfant de moins de deux ans et tout sujet, enfant ou adulte, immunodéprimé ou porteur d'une pathologie chronique l'exposant à un risque élevé de progression rapide vers la tuberculose-maladie» [61]. Le praticien devra évaluer le risque pour le sujet-contact de développer une tuberculose maladie, ainsi que la gravité que pourrait présenter celle-ci [61]

B. Stratégies de lutte :

1. La stratégie DOTS :

Depuis 1995, l'OMS a adopté une stratégie dite « DOTS » (*directly observed therapy, short course*) afin de lutter contre la tuberculose. Cette stratégie repose sur une politique mondiale visant à améliorer la détection, le traitement et le suivi des malades en contrôlant la prise des traitements. De plus, elle a pour but de promouvoir la recherche de nouvelles thérapeutiques et de nouveaux vaccins. Ce cadre a été affiné et complété en y intégrant de nouvelles problématiques (MDR, co-infection VIH, engagement du secteur privé, renforcement des systèmes de santé, droits des malades, recherche, etc.) pour former la pierre angulaire de la stratégie du partenariat mondial HALTE à la Tuberculose [22].

2. HALTE à la Tuberculose :

Elle constitue le fondement des interventions et de la stratégie de maîtrise de la tuberculose dans les pays à forte prévalence de TB/VIH. Elle a été conçue pour renforcer le succès des DOTS afin d'atteindre la cible d'un des objectifs du Millénaire pour le développement, à savoir réduire de moitié les cas de tuberculose d'ici 2015 par rapport à leurs niveaux de 1990 et pouvoir disposer des technologies diagnostiques simples (notamment des instruments de détection rapide) au point de traitement, une identification clinique des cas de tuberculose latente, de nouveaux médicaments antituberculeux permettant une guérison en un à deux mois, qui seraient efficaces contre les souches MDR, et compatibles avec les antirétroviraux, ainsi qu'un nouveau vaccin contre la tuberculose. Le point fort de ce plan d'éradication est qu'il aborde tous les problèmes à résoudre en vue d'améliorer la lutte contre cette maladie de façon globale, intégrant l'ensemble des facteurs épidémiologiques tels que l'impact de la co-infection VIH, la pauvreté et les problèmes liés aux souches multirésistantes [22].

CHAPITRE II :
Diagnostic bactériologique
et résistance aux antituberculeux



I. TECHNIQUES CLASSIQUES

A. Diagnostic bactériologique

Le diagnostic actuel de la tuberculose repose sur un faisceau d'arguments cliniques, radiologiques et biologiques. Le diagnostic bactériologique classique repose sur l'examen microscopique, la culture et l'identification biochimique des bacilles. Les différentes étapes du diagnostic des mycobactéries de la tuberculose sont présentées sur la figure 9.

Des améliorations ont été apportées et ont permis d'augmenter la sensibilité et surtout la rapidité: Les nouveaux outils mis à la disposition de la communauté médicale sont essentiellement des outils de biologie moléculaire. La société de pneumologie de langue française a fait, en 2004, des propositions pour préciser leur place dans la décision thérapeutique. Ces outils n'ont fait, depuis cette date que prendre de l'importance [62].

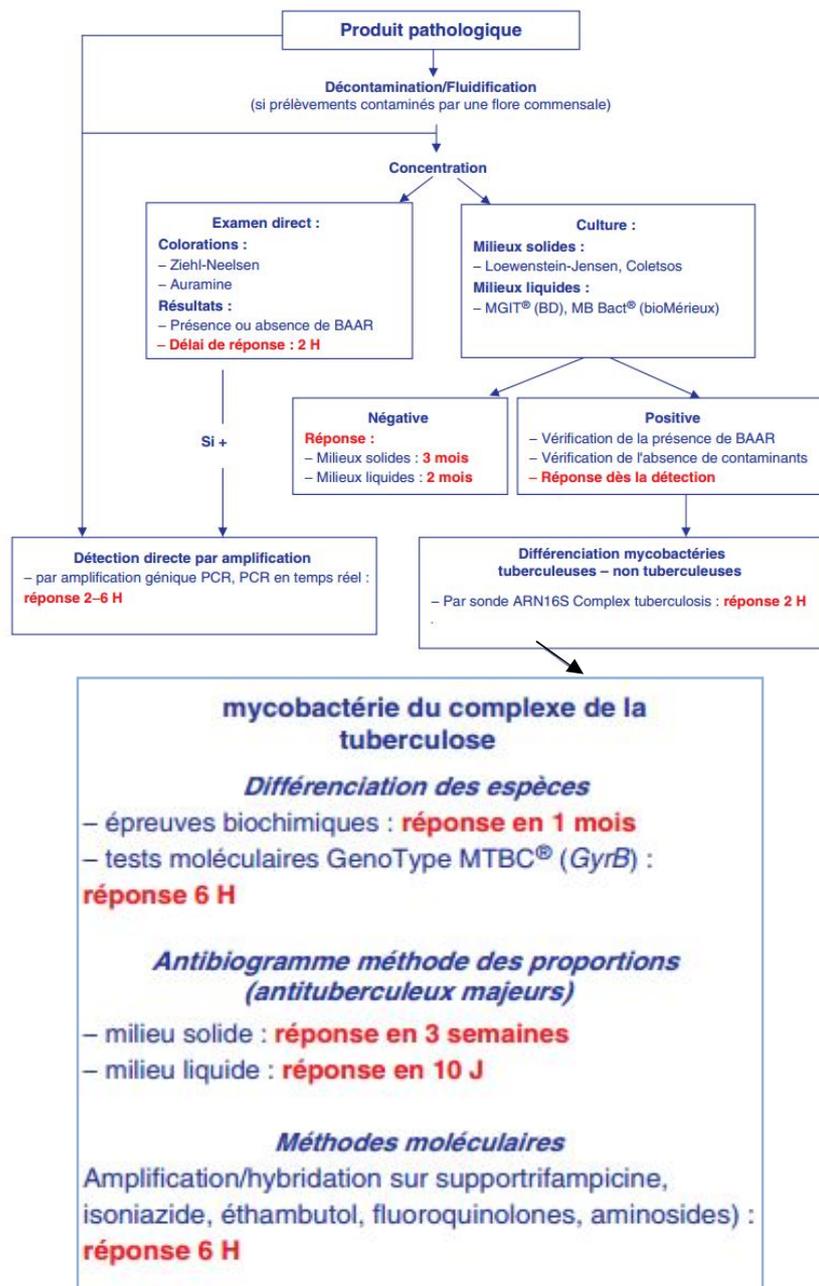


Figure 9 : Principales étapes du diagnostic bactériologique des infections à *Mycobacterium Tuberculosis* [11].

1 .Prélèvements

La majorité des prélèvements reçus au laboratoire (environ 75 %) ont une origine broncho-pulmonaire (expectorations, tubages gastriques, aspirations bronchiques, lavages bronchoalvéolaires). En cas de suspicion de tuberculose extrapulmonaire, des prélèvements d'urine, de liquides cérébrospinaux, de liquides pleuraux, d'abcès et de ganglions sont réalisés. Les prélèvements initiaux sont réalisés chez des sujets sans antibiothérapie antituberculeuse. L'émission bacillaire étant intermittente, les expectorations et tubages gastriques doivent être répétés si possible 3 jours de suite et traités séparément par le laboratoire. La conservation des prélèvements à 4 °C en vue d'un examen différé de 72 heures permet encore un examen fiable en limitant la prolifération des bactéries commensales [2].

a. Prélèvements respiratoires

Les prélèvements doivent permettre l'obtention de sécrétions respiratoires profondes et éviter les prélèvements salivaires. Les expectorations spontanées sont recueillies après un effort de toux le matin au lever chez un sujet à jeun après rinçage de la bouche à l'eau stérile. Si le sujet ne tousse pas, les expectorations sont provoquées par inhalation d'un aérosol de sérum physiologique de 3 à 5ml ou après kinésithérapie. Les tubages gastriques permettent le recueil des sécrétions bronchiques dégluties au cours de la nuit et sont réalisés au lit du malade chez un sujet alité depuis la veille et à jeun. Les prélèvements sont répétés 3 jours de suite. Les aspirations, les brossages bronchiques et les liquides de lavages bronchoalvéolaires, recueillis lors d'une fibroscopie, sont également contributifs. Les expectorations et les tubages recueillis après examens endoscopiques se révèlent plus volontiers positifs [2.1].

b. Autres prélèvements

Lors d'une tuberculose pulmonaire, d'autres prélèvements peuvent être réalisés en cas de suspicion de localisations extrapulmonaires concomitantes (liquide cérébrospinal, liquides d'ascite, pleuraux, articulaires). Les urines présentant une pyurie aseptique, recueillies après restriction hydrique la veille du prélèvement, sont adressées au laboratoire 3 jours de suite. La recherche de mycobactéries (3jours de suite) dans le sang (suspicion de tuberculose ou de mycobactériose disséminée) est réalisée sur des flacons adaptés aux systèmes de lecture automatisée [2.18].

c. Décontamination, fluidification, concentration

En fonction du caractère polymicrobien (tubages, expectorations, liquides d'aspiration bronchique, urines, abcès fistulisés, etc.) ou monomicrobien (liquides de ponction, collections fermées, biopsies prélevées stérilement), les échantillons font l'objet ou non d'une étape de fluidification-homogénéisation-décontamination qui a pour but d'éliminer la flore commensale qui envahirait les milieux de culture avant la détection des mycobactéries (bactéries à croissance lente). Différentes techniques de fluidification sont disponibles au laboratoire (Tableau 5). La technique la plus fréquemment utilisée (méthode de Kubica) combine l'action mucolytique et fluidifiante de la N-acétyl-L-cystéine (libération des bactéries du mucus) à l'action décontaminante (élimination de la flore commensale) d'une solution de soude en présence de citrate de sodium. Le produit de décontamination est concentré par centrifugation pour confectionner deux lames en vue de la coloration pour l'examen direct et pour réaliser la mise en culture sur milieux solides (Löwenstein, Coletsos) et liquides. Une fraction peut être conservée pour une amplification génique réalisée secondairement (examen direct positif, situations cliniques particulières) [2].

Méthode	Agent décontaminant	Agent fluidifiant	Neutralisation	Cultures milieux liquides	Amplification	Remarque
Tacquet-Tison	Soude 1% Soude 2%	Lauryl sulfate	Acide sulfurique	-	-	Activité bactériostatique de l'agent fluidifiant, biologie moléculaire non réalisable
Kubica	Soude 1%	N-acétyl-cystéine 0,5% Citrate de sodium	Tampon phosphate	+	+	Recommandée si milieux liquides
Petroff	Acide oxalique	Soude 2%	Acide chlorhydrique	+	+	Moindre sensibilité
		0	Tampon phosphate	+	+	Peut-être associée à la méthode de Kubica

Tableau V : Caractéristiques des différentes méthodes de décontamination des échantillons en vue de la recherche de mycobactéries [11]

2. L'examen microscopique :

L'OMS considère l'examen microscopique prioritaire et essentiel car lorsqu'il est positif, il signe le caractère particulièrement contagieux du cas de tuberculose, ce qui permet de prendre les mesures de prévention adéquates [63].

➤ Principe

Les espèces du genre *Mycobacterium* sont très difficilement colorées par la coloration de Gram. Le principe des colorations des mycobactéries (Ziehl-Neelsen, auramine) est basé sur la propriété d'acido-alcool-résistance [62].

➤ Colorations

Ziehl-Neelsen

La technique de référence est le Ziehl-Neelsen à chaud : le frottis est coloré par une solution de fuchsine phéniquée. Après décoloration par un mélange acide-alcool, la lame est rincée à l'eau distillée stérile puis contre-colorée par une solution de bleu de méthylène. Les frottis sont ensuite rincés à l'eau distillée puis séchés à l'étuve (Figure 10).

L'observation est effectuée à l'objectif $\times 100$ à l'immersion. Les mycobactéries colorées par la fuchsine phéniquée apparaissent en rouge vif sur le fond bleu de la préparation (débris cellulaires, mucus, bactéries commensales). *M. tuberculosis* apparaît sous forme de bacilles longs [2,11,62] (Figure 11).

Méthode de fluorescence

Le principe de la coloration à l'auramine est le même que pour la coloration de Ziehl-Neelsen : coloration des bacilles par une solution d'auramine O phéniquée à froid contre-colorée avec une solution de rouge de thiazine (Figure10). Les lames sont observées à l'aide d'un microscope muni d'un dispositif à fluorescence à l'objectif $\times 25$. Les mycobactéries apparaissent comme des bacilles fluorescents jaune vert sur fond rouge (figure13) [2].

La microscopie à fluorescence après coloration à l'auramine augmente la sensibilité de la microscopie d'environ 10 % par rapport à la méthode classique de Ziehl-Neelsen et permet une lecture entre trois à quatre fois plus rapide des frottis, lus sous plus faible grossissement. Dans les pays du Sud, cet examen n'est utilisé que dans les laboratoires de référence en raison du coût du microscope à fluorescence, de l'utilisation de lampes à vapeur de mercure et des besoins d'une chambre noire. Les systèmes récents utilisant des lampes *light-emitting diodes* (LED) incorporées ou s'adaptant sur un microscope à lumière claire, sans nécessité de chambre noire, sont une bonne alternative au microscope à fluorescence conventionnel pour les laboratoires périphériques des pays du Sud ; Ces lampes ont l'avantage d'avoir une durée de vie de 10 000 heures contre 200 heures pour les lampes à mercure, ne produisent pas d'ultraviolet et nécessitent beaucoup moins d'électricité que la microscopie conventionnelle . Ces nouvelles méthodes sont actuellement recommandées par l'OMS en remplacement des méthodes conventionnelles de fluorescence et pourraient prochainement se substituer à la méthode de Ziehl-Neelsen dans les pays du Sud [64].

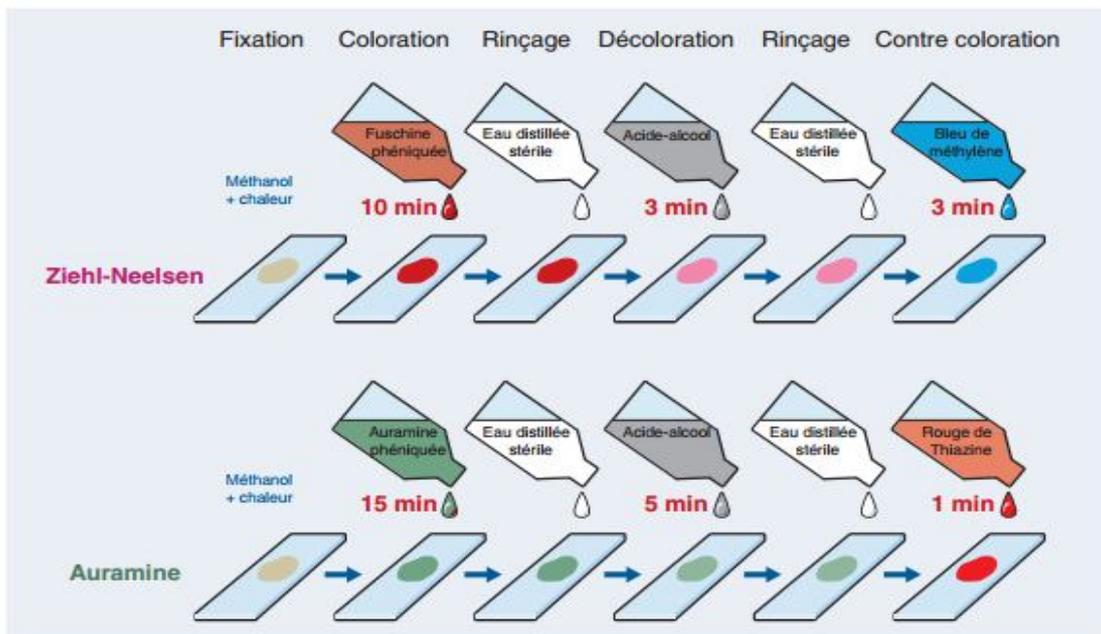


Figure10 : Étapes de la coloration de Ziehl-Neelsen et de la coloration à l'auramine [11]

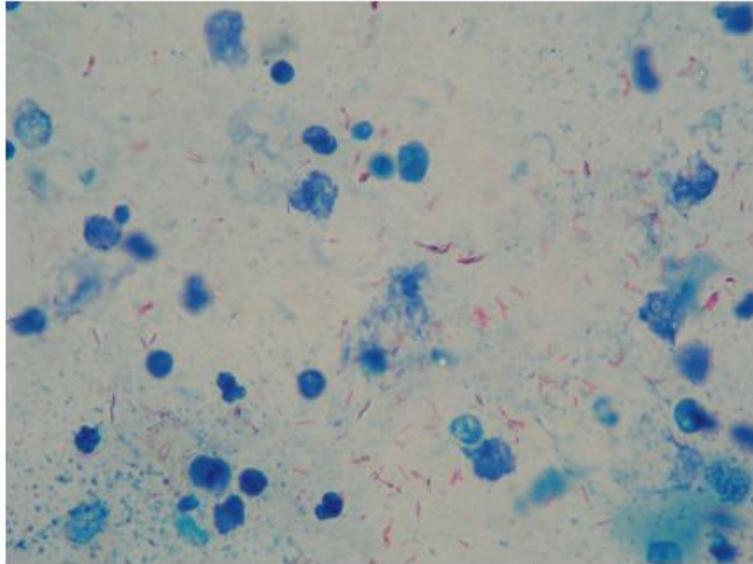


Figure 11 : Examen direct d'un frottis réalisé à partir d'une expectoration après coloration de Ziehl-Neelsen (grossissement *1000) : Présence de bacilles colorés en rose (BAAR) sur fond bleu [11]

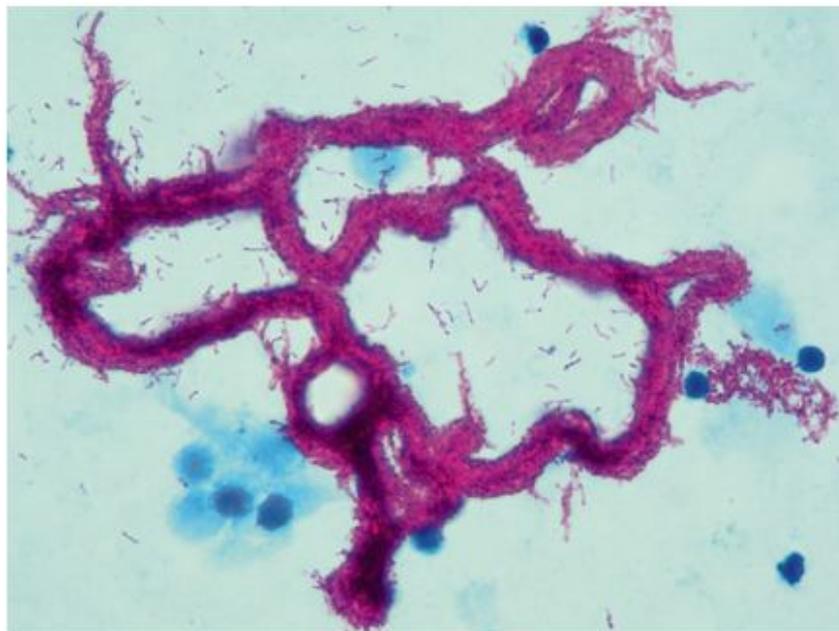


Figure 12 : Examen direct après coloration de Ziehl Neelsen (grossissement *1000) d'une culture de Mycobactérie de la tuberculose en milieu liquide. Présence de bacilles groupés en « cordes ». [11]

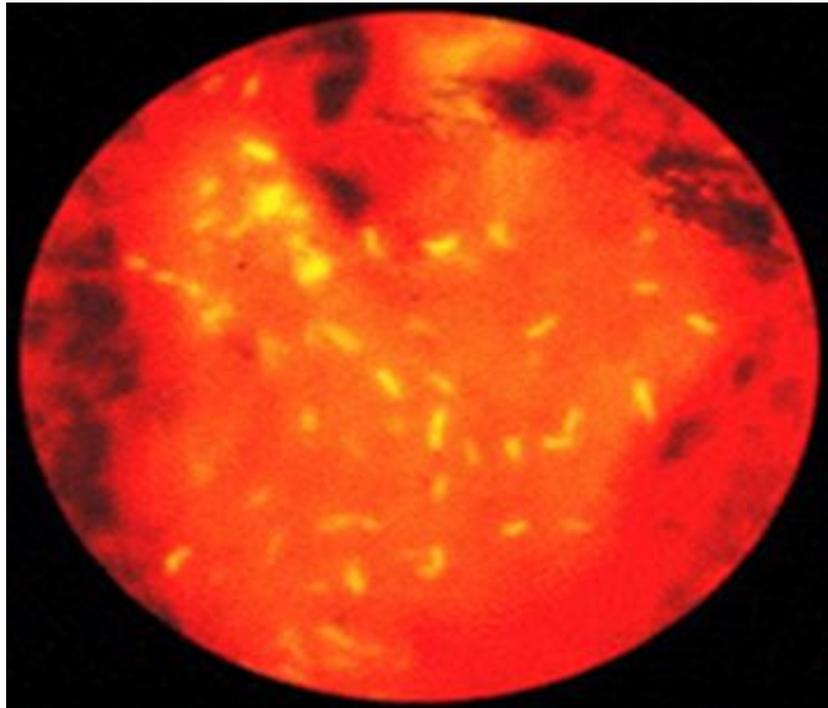


Figure 13 : Aspect microscopique des BAAR colorés à l'Auramine [11]

➤ **Résultat**

L'examen microscopique met donc en évidence des bacilles acido-alcoolo résistants (BAAR) sans faire la distinction entre bacilles de la tuberculose et des mycobactéries atypiques. La réponse signale la présence ou l'absence de BAAR et exprime en cas de positivité la densité bacillaire (Tableau VI).

Nombre de bacilles observés			Réponse
Auramine (*250)	Auramine (*400)	Ziehl-Neelsen (*1000)	
Aucun	Aucun	Aucun	Absence de BAAR
1 à 10 en 30 champs	1 à 2 en 70 champs	1 à 2 en 300 champs	Equivoque, à contrôler
1 à 10 en 10 champs	2 à 20 en 50 champs	1 à 10 en 100 champs	Présence de BAAR (+)
1 à 10 par champ	4 à 40 en 10 champs	1 à 10 en 10 champs	Présence de BAAR (++)
10 à 100 par champ	4 à 40 par champ	1 à 10 par champs	Présence de BAAR (+++)
>100 par champ	>40 par champ	>10 par champs	Présence de BAAR (++++)

Tableau VI : notation des résultats de l'examen direct d'expectoration [11].

➤ **Sensibilité de l'examen microscopique :**

L'examen microscopique a une spécificité très élevée, voisine de 100 %, bien qu'il mette en évidence des bacilles acido-alcool résistants (BAAR) sans faire la distinction entre bacilles de la tuberculose et mycobactéries atypiques. L'expérience montre toutefois que, dans la majorité des cas et en particulier dans les pays en voie de développement, ces BAAR sont des bacilles de la tuberculose, mais sa valeur diagnostique est faible chez les patients VIH+ du fait d'une spécificité médiocre [63,64].

La sensibilité est relativement faible : le prélèvement doit contenir 10^5 BAAR/ml pour que la probabilité de positivité de l'examen soit supérieure à 95 % [62,61]. Cette sensibilité médiocre ne permet pas de confirmer le diagnostic que dans 60-70 % [64]. Ce chiffre est bien inférieur dans les cas de tuberculoses extrapulmonaires, où seules 10 à 20 % des cultures positives sont examen microscopique positif [65]. Les différentes études montrent que le pourcentage de sensibilité est d'environ 50 % pour les échantillons d'origine pulmonaire et qu'il est encore plus faible pour les extrapulmonaires [64]. Néanmoins, l'examen microscopique demeure une étape incontournable dans le diagnostic de la tuberculose, particulièrement en cas de suspicion de tuberculose et la présence de BAAR à l'examen direct dans des prélèvements respiratoires indique que le patient est « bacillifère » et contagieux. Ce résultat doit être transmis au service clinique sans délai en vue de l'instauration de la prise immédiate de mesures d'isolement si celles-ci n'ont pas été initiées et d'un traitement antituberculeux. De même, l'absence de BAAR (après 3 semaines de traitement généralement) à l'examen direct de trois prélèvements consécutifs est nécessaire à la levée des mesures d'isolement du patient. Un frottis est considéré comme négatif (absence d'éléments suspects) après au moins 15 minutes d'observation de la lame par la méthode de Ziehl-Neelsen (300 champs) et au moins 5 minutes par la méthode à l'auramine. La méthode à l'auramine permet d'éliminer rapidement les frottis négatifs et intéresse donc les laboratoires effectuant de grandes séries [62,63]. Les avantages de l'examen microscopique sont la rapidité d'exécution, le faible coût, l'accessibilité, et l'identification des patients les plus contagieux [63]. Par conséquent, lorsque l'examen microscopique est négatif, ce qui est le cas dans environ la moitié des cas de tuberculose pulmonaire bactériologiquement documentés (culture positive), le clinicien est amené à attendre les résultats des cultures pour confirmer le diagnostic de tuberculose [63,66].

➤ **Optimisation des résultats de l'examen microscopique**

Plusieurs interventions permettent d'améliorer les performances de l'examen microscopique, en commençant par la révision du seuil de 10 BAAR/100 champs longtemps recommandé par l'OMS pour définir un résultat frottis-positif et l'examen de trois crachats. L'abaissement du seuil à 1 BAAR/100 champs augmente la sensibilité de l'examen microscopique, notamment chez les patients dont les expectorations sont de moins bonne qualité et de plus faible volume comme les femmes et les patients immunodéprimés. Plusieurs études, dont une méta-analyse, ont montré le très faible gain (+2,3 %) de l'examen microscopique du troisième crachat. En 2008, l'OMS a révisé la définition de cas frottis-positif pour les pays à haute prévalence d'infection VIH, définissant un cas frottis-positif à partir d'un résultat de crachat frottis positif (≥ 1 BAAR/100 champs), sur deux crachats collectés, le deuxième n'étant examiné que si l'examen du premier est négatif [62]. L'optimisation de l'examen microscopique peut se faire en améliorant la qualité de l'expectoration. Des mesures simples de motivation et une vérification systématique de la qualité des expectorations évaluées dans un essai clinique randomisé au Pakistan ont permis d'augmenter significativement le rendement diagnostique de l'examen microscopique chez les femmes, en améliorant la qualité et en augmentant le volume des expectorations. Des méthodes d'induction du crachat après nébulisation de sérum salé hypertonique ont des résultats similaires, voire supérieurs à ceux des tubages gastriques chez les enfants et chez les adultes ne pouvant pas cracher, avec une meilleure acceptabilité par les patients et la possibilité d'être réalisés en ambulatoire. Néanmoins, ces méthodes augmentent le risque de contamination du manipulateur par le bacille de la TB et nécessitent des mesures de protection qui ne sont pas toujours disponibles dans les centres de santé des pays du Sud. Des alternatives au tubage gastrique, comme l'aspiration nasogastrique, l'utilisation du String Test (fil de nylon contenu dans une capsule gélatineuse avalée par le patient pour collecter les bacilles déglutis) ou du Lung Flute (vibrations intrabronchiques obtenues lorsque le patient souffle dans une petite flûte) sont en cours d'évaluation. Enfin, la concentration préalable du crachat peut aussi augmenter la sensibilité de l'examen microscopique. Les méthodes de

concentration étudiées associent classiquement une première phase de liquéfaction du crachat par un agent chimique, puis une deuxième phase de concentration par centrifugation ou sédimentation par gravité. L'agent chimique le plus fréquemment utilisé est l'hypochlorite de sodium (NaOCl) en raison de sa grande disponibilité et de son faible coût. Néanmoins, ces méthodes s'accompagnent d'une faible diminution de spécificité. L'utilisation des méthodes de concentration n'est pas à ce jour recommandée par l'OMS [64].

➤ **Résultats faussement positifs**

Des faux-positifs peuvent être observés si les réactifs utilisés ont été préparés avec de l'eau du robinet (mycobactéries saprophytes) et avec des prélèvements contenant des *Nocardia* (acido-alcool-résistance partielle) ou des bactéries apparentées.

➤ **Résultats faussement négatifs :**

Ils sont habituellement dus à des insuffisances dans la préparation, la coloration et la lecture de la lame. Le recueil correct de l'échantillon et la sélection soigneuse des particules de crachats sont des éléments essentiels de la préparation du frottis. On devra y porter une attention toute spéciale.

3. Culture

Lorsque l'examen microscopique est négatif, le clinicien est amené à attendre les résultats de la culture pour confirmer le diagnostic. La culture est beaucoup plus sensible que l'examen microscopique (la moitié des cas de la tuberculose pulmonaire et une proportion plus importante encore des cas extrapulmonaires documentés sont négatifs à l'examen microscopique et ne sont diagnostiqués que par la culture). En raison de la croissance lente des mycobactéries, il est souvent indispensable d'attendre plusieurs semaines, pour obtenir le résultat.

Sur milieu solide de Lowenstein-Jensen, les colonies sont détectées en moyenne en trois à quatre semaines, en deux si le prélèvement est très riche en bacilles (examen microscopique positif) mais parfois en six ou plus si le prélèvement est paucibacillaire (examen microscopique négatif) [64]. La culture de MTB du crachat ou d'autres prélèvements bronchiques ou alvéolaires est la méthode diagnostique la plus sensible, avec un seuil de détection de dix à 100 bacilles/mL, contre 5000 et 10 000 BAAR/mL pour l'examen microscopique. Elle augmente la détection de TB de 30 à 50 % par rapport à la microscopie, permet de diagnostiquer les patients plus précocement, avant qu'ils ne deviennent plus infectieux et fournit le matériel nécessaire à la réalisation d'antibiogrammes [66].

➤ **Milieux de culture :**

La culture des mycobactéries nécessite le recours à des milieux spécifiques et complexes en raison d'une croissance lente et de la nécessité d'apporter des lipides. Les milieux se présentent en tube ou flacon à vis afin de permettre une observation prolongée sans dessiccation ni création d'aérosols. L'association des milieux liquides à des milieux solides est recommandée. Les mycobactéries nécessitent pour la plupart des milieux enrichis et des conditions strictes pour leur croissance (température comprise entre 30 °C et 45 °C, aérobiose et pH optimal situé à 6,7) [63].

- Milieux solides

Le milieu solide le plus utilisé pour l'ensemencement des produits pathologiques est le milieu de Lowenstein-Jensen à base d'œuf et qui contient un antiseptique (vert malachite). L'adjonction de certains composés comme le pyruvate de sodium dans le milieu de Coletso ou le citrate de fer favorise la croissance respectivement de *M. bovis* et *M. africanum*, et de *M. Haemophilus*. Les tubes sont ensemencés et incubés à 37 °C. Les milieux sont observés une fois par semaine pendant au moins 8 semaines. L'observation des cultures durant la première semaine permet de mettre en évidence une contamination par des bactéries commensales ou la présence d'une mycobactérie à croissance rapide. Dès l'apparition de colonies, un frottis

coloré par la méthode de Ziehl-Neelsen est effectué pour vérifier la présence de BAAR avant de déclarer la culture positive. Le nombre de colonies est rapporté ainsi que le délai d'apparition de la culture. Sur milieu de Loewenstein-Jensen, les colonies des mycobactéries de la tuberculose apparaissent après 2 à 3 semaines d'incubation en fonction de la densité microbienne de l'échantillon. Les colonies sont différentes des autres mycobactéries (Figure14), elles sont lisses de couleur crèmeuse sur les cultures jeunes, deviennent beiges, rugueuses, à bords irréguliers en « chou-fleur », dites eugoniques. Les colonies de *M. bovis* et *M. africanum* ont une croissance plus lente, 3 à 6 semaines sur milieu Loewenstein, et sont souvent dysgoniques [2.67].

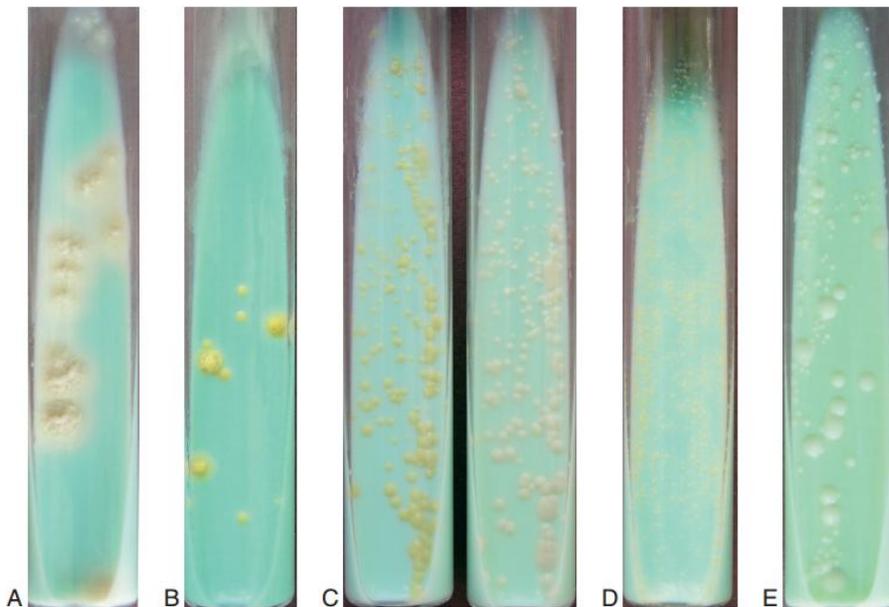


Figure 14 : Cultures sur milieu de Löwenstein-Jensen [11].

- A) – Colonies de *Mycobacterium tuberculosis*.
- B) – Colonies de *Mycobacterium szulgai* (espèce scotochromogène).
- C) – Colonies de *Mycobacterium marinum* (espèce photochromogène).
- D) – Colonies de *Mycobacterium xenopi* (espèce non pigmentée à croissance lente).
- E) – Colonies de *Mycobacterium chelonae* (espèce à croissance rapide).

- Milieux liquides

Les milieux liquides sont fabriqués pour la plupart avec la même base (7H9), ils doivent être supplémentés avec des facteurs de croissance et rendus sélectifs à l'aide d'un mélange d'antibiotiques (afin d'augmenter la spécificité de la culture). Certains de ces milieux sont couplés à une détection automatique de la croissance (MGIT[®] 960, Versa Trek[®], BacT/Alert 3D[®]). La détection est réalisée par fluorescence, colorimétrie ou diminution de pression suivant les automates [68].

Plusieurs techniques de culture en milieu liquide ont été développées. La première est la respirométrie radiométrique qui repose sur la détection du C₁₄ (CO₂) radioactif produit dans un milieu 7H12B (BACTEC TB460). Ce milieu implique les contraintes de la gestion des produits radioactifs et la technique est semi-automatisée, beaucoup de laboratoires ne l'appliquent pas pour des raisons de coût (2 fois plus élevé que la méthode conventionnelle [3,65,66]). Le milieu Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) est un milieu supplémenté par un inhibiteur Panta (polymyxine B, azlocilline, acide nalidixique, triméthoprime et amphotéricine B) et du stéarate de polyoxyéthylène [11]. La détection de croissance est indiquée grâce à un indicateur fluorescent sensible à la concentration du milieu en oxygène. La diminution de la concentration en O₂ génère une fluorescence après excitation à 365 nm. Cette fluorescence est détectable à l'œil nu ou à l'aide d'un automate (MGIT 9601, Becton Dickinson). Cette technique permet également la réalisation de l'étude de la sensibilité des mycobactéries du groupe tuberculosis aux antibiotiques [68].

Le BacT/Alert MP1 (bioMerieux) est un milieu qui détecte la croissance des mycobactéries grâce à un indicateur coloré situé à la base du flacon. Cet indicateur est sensible à l'augmentation du pH, conséquence de la présence de CO₂. Le système est automatisé sur BacT/Alert 3 D1 et il n'est plus possible de réaliser un antibiogramme avec ce système [68].

Le milieu MB Redox® contient un sel de tétrazolium incolore réduit en formazan (rouge à violet) insoluble en milieu aqueux lors de la croissance. Le formazan s'accumule à la surface sous forme de grains permettant de visualiser les microcolonies sous forme de particules colorées visibles à l'œil nu [2].

Le milieu Bio FM® (Biorad) est un milieu liquide Middle brook 7H9 enrichi en OADC contenant un substrat chromogène. Les cultures positives présentent une coloration bleue virant parfois au violet [11].

Le système VersaTREK/ESP Culture System II (système VersaTREK) associe un milieu de culture liquide, un supplément de croissance et pour les échantillons potentiellement contaminés, et un supplément antibiotique. Le milieu VersaTREK est un milieu de croissance sélectif. Le système de détection incube automatiquement et surveille en permanence les flacons de culture inoculés d'échantillons. Des éponges placées dans les flacons VersaTREK Myco fournissent une matrice de support de croissance et augmentent la surface exposée à l'oxygène de la partie supérieure du flacon. La technologie est basée sur la détection des modifications de pression dans la partie supérieure du flacon fermé, production ou consommation de gaz dues à la croissance bactérienne (mesure toutes les 24 minutes) [68].

Les délais d'isolement sont plus courts sur milieux liquides par rapport à ceux observés sur milieux solides. La sensibilité de la culture par cette méthode s'avère supérieure à la méthode conventionnelle [2,11,62,64,65]. Les méthodes sur milieu liquide ont une sensibilité supérieure de 10-15 %, sont automatisables et réduisent les délais de résultats de six à deux semaines. En revanche, la visualisation des colonies sur les milieux solides permet de détecter les cultures mixtes de mycobactéries [69].

4. Identification

L'identification des mycobactéries obtenues en culture repose habituellement sur l'étude des caractères cultureux et biochimiques qui est longue (le plus souvent plusieurs semaines) et fastidieuse. On remplace maintenant, lorsqu'on en a les moyens, ces épreuves par l'hybridation avec des sondes complémentaires de séquences génomiques spécifiques.

B. Résistance aux antituberculeux

1. Epidémiologie des résistances

Le phénomène de résistance aux antituberculeux a été décrit pour la première fois en 1948, soit quelques années après la première utilisation de la streptomycine pour le traitement de la tuberculose. La sélection de mutants résistants a été identifiée comme cause d'échec thérapeutique. Actuellement et à travers le monde, ce n'est pas tant la mono résistance aux médicaments antituberculeux qui fait l'objet de grandes préoccupations mais le plus grand souci réside dans la multirésistance à la combinaison des principaux antituberculeux utilisés dans les protocoles thérapeutiques standards. Les premiers foyers de TBMR sont identifiés dès la fin des années 1980; La TB UR décrite pour la première fois en 2006 en Afrique du Sud dans une région très touchée par l'infection VIH, est depuis répertoriée dans près de 50 pays. Les souches UR sont en fait apparues depuis les années 2000 [70,71]. D'après les derniers recensements de l'Organisation mondiale de la santé (OMS), la tuberculose multirésistante est présente dans toutes les régions du monde où une surveillance des résistances médicamenteuses a été mise en place et le nombre de cas semble augmenter progressivement. Ce nombre est estimé à près d'un demi-million par année sur un total de huit millions de cas de tuberculose. La proportion des cas de multirésistance sur l'ensemble des cas de tuberculose varie selon les régions, de 0 à 15 %. Les proportions les plus élevées s'observent en Europe de l'Est, en Asie Centrale, en Inde et dans certaines provinces de Chine. Ce sont le plus souvent des régions où l'incidence de la tuberculose est élevée, souvent aussi des régions où le taux de guérison est inférieur aux attentes de l'OMS (85 %) et où le taux de rechutes est élevé, traduisant l'incapacité relative du programme local à assurer la guérison de la majorité des malades [72]. Dans son rapport mondial 2012 sur la tuberculose, l'OMS estime que 3,7% (fourchette 2.1 - 5 · 2%) des nouveaux cas et 20% (intervalle 13-26%) déjà traités ont une tuberculose multirésistante (MDR). Dans de nombreux pays de l'Est de l'Europe et Asie centrale, 9-32% des nouveaux patients et plus de 50 % des patients traités ont une tuberculose MDR. Le nombre de pays signalant des cas de tuberculose XDR a augmenté : 84 pays ont signalé au moins un cas, au dernier recensement en 2011 ; Les pays d'Europe de l'Est ont les plus haut taux de tuberculose résistante aux médicaments dans le monde entier, et la plupart des cas de tuberculose MDR surviennent dans les Pays asiatiques comme la Chine, l'Inde, les Philippines, et en Indonésie [73].

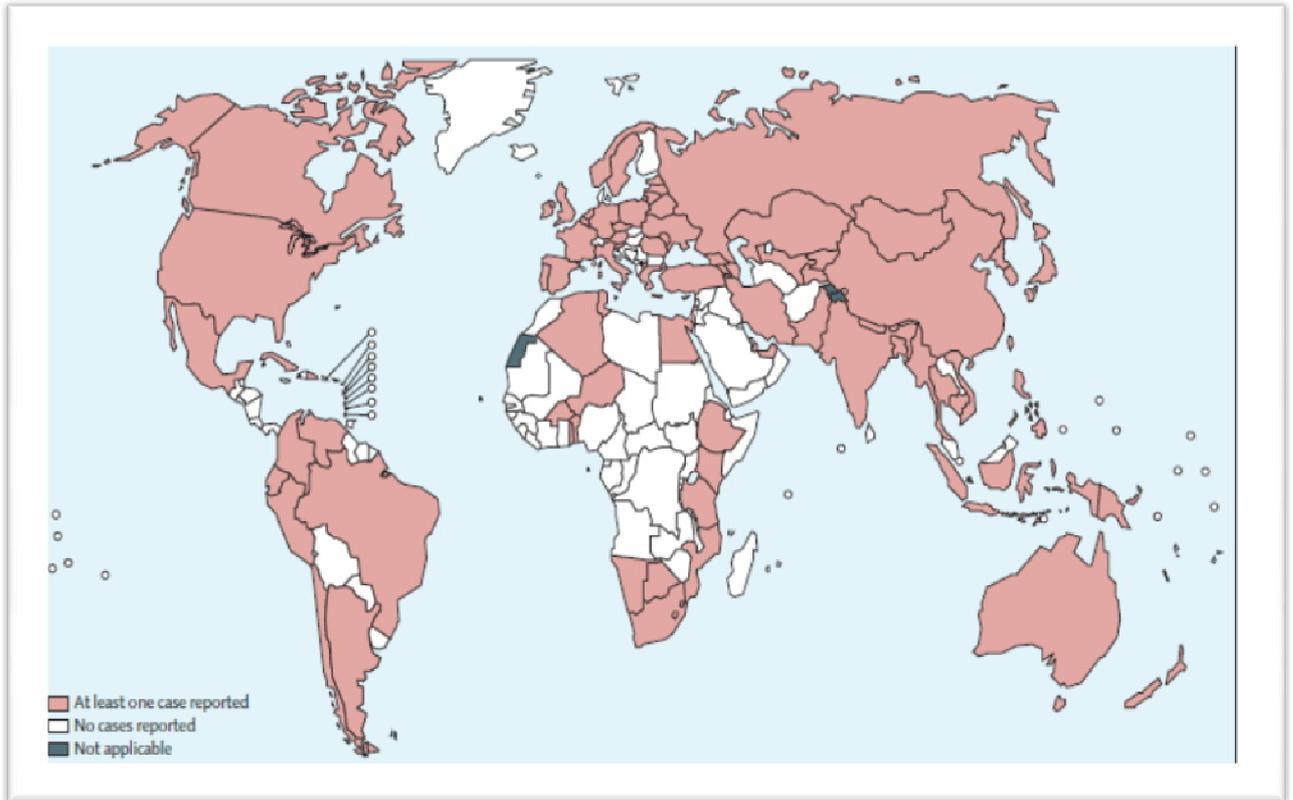


Figure 15 : Les pays ayant au moins un cas de tuberculose ultrarésistante en 2011) [73].

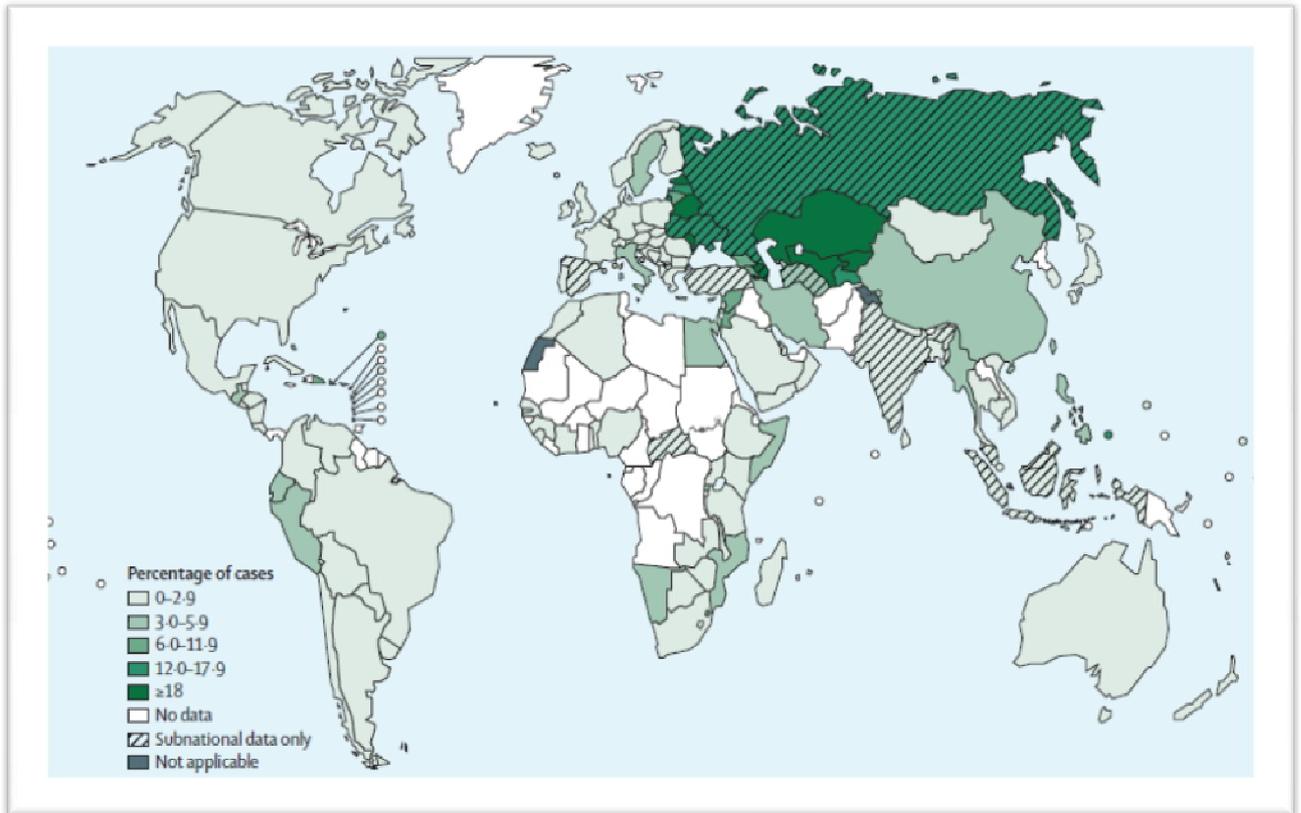


Figure 16: Pourcentage de nouveaux cas de tuberculose multirésistante (OMS 2012) [73]

2. Définitions

a. Résistance bactérienne à un antibiotique

La « résistance à un antibiotique » est un caractère phénotypique caractérisant la capacité d'une bactérie à survivre (et à se multiplier), en présence de cet antibiotique, à une concentration qui est habituellement bactéricide ou bactériostatique. La résistance d'une bactérie à un antibiotique entraîne la perte d'efficacité de ce médicament lors du traitement d'une infection causée par cette bactérie. Cette situation nécessite l'adaptation du traitement [72].

b. Résistance naturelle

Les membres du complexe *tuberculosis* sont naturellement résistants à la plupart des antibiotiques usuels. En effet, ils ne sont sensibles qu'à un petit nombre d'antibiotiques dits « antibiotiques antituberculeux ». Chez les mycobactéries, le phénotype « sensible » ou « résistant » à un antibiotique donné est spécifique d'espèce. Les mycobactéries du complexe *tuberculosis* sont naturellement résistantes aux principales familles d'antibiotiques comme les β -lactamines, les macrolides, les cyclines, les sulfamides et les glycopeptides [74,75].

Les mycobactéries non tuberculeuses présentent également une résistance naturelle à ces antibiotiques usuels. De plus, elles sont naturellement résistantes à la plupart des antibiotiques efficaces sur *M. tuberculosis* tels que l'isoniazide, la pyrazinamide, l'ethambutol, l'acide p-aminosalicylique.

La faible perméabilité de la paroi mycobactérienne est en général, mise en cause pour expliquer le haut niveau de résistance naturelle. La paroi mycobactérienne présente une architecture caractéristique et particulièrement complexe (Figure 17). Son squelette est composé de trois éléments majeurs associés de manière covalente: le peptidoglycane, l'arabinogalactane et les acides mycoliques. Les acides mycoliques sont de longues chaînes d'acides gras (de 60 à 90 atomes de carbone) insérées parallèlement les unes par rapport aux

autres et formant un arrangement compact perpendiculaire au plan de la membrane plasmique. Ils constituent ainsi une enveloppe lipidique très peu perméable aux composés hydrophiles et en particulier à un bon nombre d'antibiotiques. Il a été estimé que la paroi des mycobactéries est, par exemple, 100 à 1000 fois moins perméable au β -lactamines que la paroi d'*Escherichia Coli* et même 10 fois plus faible que celle de *Pseudomonas aeruginosa* espèce pourtant très imperméable [89]. La structure de la paroi n'est pas la seule responsable de la haute résistance naturelle de *M. tuberculosis*. La production d'enzymes modifiant les antibiotiques a également été décrite chez *M. tuberculosis* comme, par exemple, la β -lactamase responsable de la résistance naturelle aux β -lactamines ou l'aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase impliquée dans la résistance aux aminosides, une moindre affinité pour la cible a été décrite chez les quinolones [74,75].

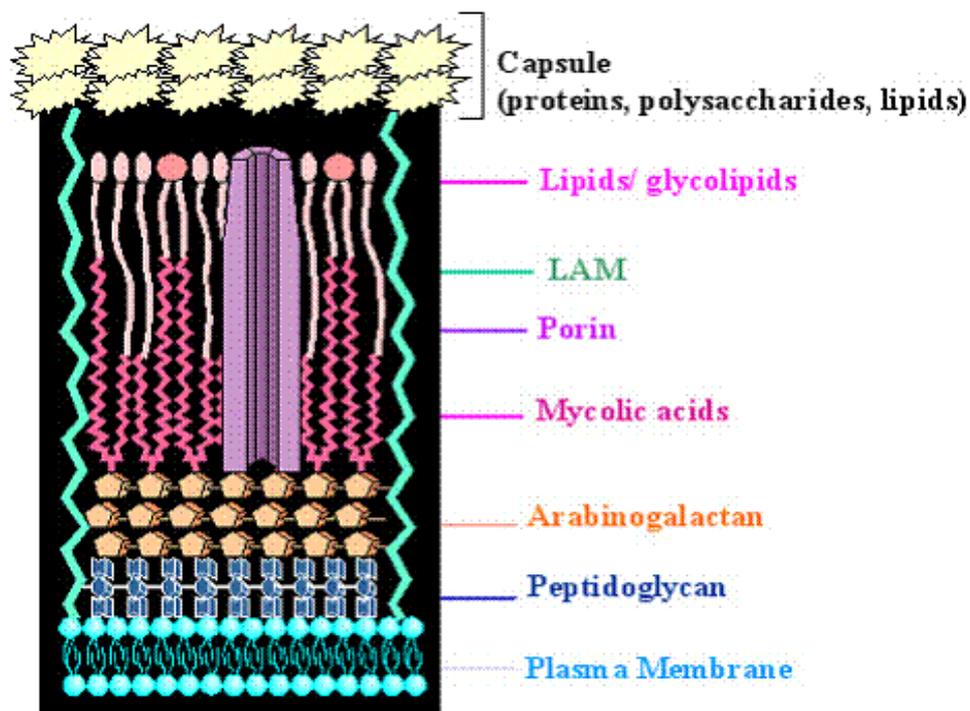


Figure 17: Structure de la paroi des mycobactéries [76].

c. Résistance acquise

La résistance acquise chez les mycobactéries est toujours liée aux mutations de gènes chromosomiques et n'est pas transférable d'une souche à l'autre. Il n'a pas été décrit de plasmides ou de transposons de résistance. Chez les souches résistantes à plusieurs antibiotiques, il est clair que chacune des résistances est acquise indépendamment des autres, le plus souvent de façon successive en fonction des antibiotiques utilisés pour le traitement. Ces mutations ont lieu soit dans les gènes de structure de la cible de l'antibiotique ce qui entraîne une diminution de l'affinité de la cible pour l'antibiotique (Rifampicine, fluoroquinolones, aminosides, Ethambutol), soit dans le gène codant pour une enzyme dite activatrice car transformant l'antibiotique en une substance active (Isoniazide, Pyrazinamide) [74].

d. Résistances primaire et secondaire

Une bactérie tuberculeuse résistante isolée d'un patient qui n'a jamais été traité pour une tuberculose auparavant, est considérée comme une souche de « résistance primaire ». Par contre, une bactérie tuberculeuse résistante provenant d'un patient traité précédemment pour une tuberculose (pendant au moins un mois), est probablement une mycobactérie mutante résistante, apparue chez ce patient et est alors considérée comme une souche de « résistance secondaire ou acquise » [70].

e. Sélection des mutants résistants

Dès que le premier médicament antituberculeux fut introduit dans le traitement de la tuberculose, l'émergence d'isolats résistants de *M. tuberculosis* fut observée. Le même scénario s'est répété par la suite pour chaque utilisation d'antibiotiques antituberculeux en monothérapie: INH, RIF... Par ailleurs, lorsque les bactéries sont exposées à un antibiotique, la pression de sélection favorise le développement de mutants résistants. Ces observations menèrent les chercheurs à suggérer que la thérapie combinée, utilisant plus d'un antibiotique, pourrait réduire l'émergence de bactéries résistantes durant le traitement. Malgré la mise en place et l'efficacité de cette mesure, on remarque aujourd'hui encore l'émergence de souches de *M. tuberculosis* résistantes aux antibiotiques, représentant un problème croissant pour le contrôle mondial de la tuberculose [70]

f. Multirésistance (MDR= « multi drug résistant »

Une mycobactérie est dite « multirésistante » si son profil associe une résistance à la fois à l'isoniazide et à la rifampicine, quels que soient les résultats pour les autres antibiotiques. On classe, dans les multirésistants, les bacilles résistants de bas niveau à l'isoniazide. Dans la plupart des cohortes publiées, le niveau de résistance n'est pas mentionné. Cela explique peut-être l'efficacité paradoxale de l'isoniazide retrouvé dans certaines études [70].

g. Polyrésistance

Elle est définie par la résistance à plusieurs antibiotiques à l'exclusion de l'association isoniazide-rifampicine [70].

h. Résistance extensive (XDR = « extensive second-line drug résistance ») ou ultrarésistance

Plusieurs définitions ont été données. Celle qui s'applique maintenant au niveau international a été révisée par l'OMS en octobre 2006. Il s'agit des souches à la fois résistantes à l'isoniazide, à la rifampicine, aux fluoroquinolones et à un injectable parmi : amikacine, kanamycine, capréomycine [70].

3. Modes d'action des antituberculeux et mécanismes de résistance

La résistance aux antituberculeux n'est pas un phénomène récent. Les souches résistantes à la streptomycine sont apparues très rapidement après l'introduction de cet antibiotique dans le traitement de la tuberculose. La résistance est due à des mutations chromosomiques spontanées avec une fréquence variable selon les antibiotiques (tableau 8). Elle est non transférable d'une souche à une autre. La fréquence de mutations, calculée par la proportion de mutants résistants au sein d'une population bactérienne sensible ou « sauvages », varie selon l'antibiotique, et, si elle est de 10^{-5} pour l'INH, pour la rifampicine, elle est de 10^{-2} pour la cyclosérine et 10^{-3} pour les thionamides. Dans le cas de souches résistantes à plusieurs antibiotiques, chaque résistance est acquise indépendamment, le plus souvent en fonction des antibiotiques utilisés [77].

Le panel des antituberculeux est spécifique et très limité. Actuellement, on distingue les antibiotiques dits de première ligne comme l'isoniazide, la rifampicine, l'éthambutol et le pyrazinamide et les antibiotiques de deuxième ligne comme les aminoglycosides, polypeptides, fluoroquinolones, thioamides, cyclosérine et acide para-amino salicylique. L'OMS propose une classification des antituberculeux en 5 groupes (tableau 7) [77].

Groupe	Molécules
Groupes 1 : 1re ligne orale	Isoniazide, rifampicine, éthambutol, Pyrazinamide,
Groupes 2 : injectable	Kanamycine, amikacine, capréomycine, Viomycine, streptomycine
Groupes 3 : fluoroquinolones	Moxifloxacine, lévofloxacine, ofloxacine
Groupes 4 : 2e ligne orale bactériostatique	Ethionamide, prothionamide, cyclosérine, Terizidone, acide p-aminosalicylique
Groupes 5 : activité douteuse (non recommandés par l'OMS)	Thiocétazone, clofazimine, linezolid, clarithromycine

Tableau VII : Classification des antituberculeux selon l'OMS [77].

3.1 Antituberculeux de « première ligne »

a. Isoniazide (INH)

➤ Mode d'action

L'isoniazide (INH, acide isonicotinique hydrazide) est un antibiotique synthétique dont l'activité antituberculeuse a été mise en évidence en 1952. Sa spécificité pour les mycobactéries, sa haute efficacité et sa faible toxicité pour le patient ont fait de cette molécule le pilier de la lutte contre la tuberculose dans le monde entier.

C'est un antituberculeux bactéricide qui inhibe la synthèse de la paroi bactérienne par deux mécanismes :

1. action sur la catalase peroxydase codée par le gène *katG* ; l'oxydation de l'INH par cet enzyme aboutit à la formation d'un métabolite actif entraînant la mort cellulaire ;

2. inhibition de la synthèse de la protéine *inhA* codée par le gène *inhA*. Cette protéine joue un rôle important dans la synthèse des acides mycoliques à longue chaîne [74,77].

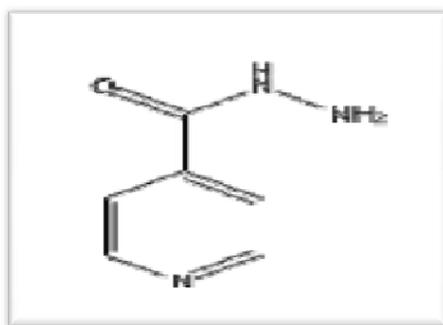


Figure 18: Structure de l'isoniazide (INH) [78]

➤ Mécanismes de résistance

De nombreuses mutations ont été mises en évidence, mais deux seulement sont à l'origine des principales résistances en clinique :

- La mutation ou les délétions partielles du gène *katG* impliqué dans la transformation de l'INH en produit actif qui donnent un niveau de résistance élevé (CMI > 10 µg/ml).

- La mutation du gène *inhA* impliqué dans la synthèse des acides gras qui se traduit par une résistance de bas niveau (CMI > 0,2 mais < 1 µg/ml), cette résistance est croisée avec celle de l'éthionamide.

Des mutations sur d'autres gènes ont été mises en évidence, mais leur implication dans la résistance n'a pas été formellement prouvée. Il s'agit du gène *ahpC* qui code pour une hydroperoxyde réductase, du gène *ndh* codant pour la NADH déshydrogénase, le gène *kasA* codant pour une -ketoacyl ACP réductase ainsi que des gènes *mabA*, *furA*, *mshA*. Cependant, toutes ces mutations n'expliquent pas toutes les résistances observées, il existe donc encore des mécanismes inconnus [74,77].

b. Rifampicine (RMP)

➤ Mode d'action :

Deux molécules sont utilisées, la rifampicine et son dérivé hemisynthétique, la rifabutine. Cette dernière est essentiellement utilisée chez les sujets en traitement pour le VIH. La rifampicine découverte en 1964 est un dérivé de la rifamycine SV, son effet bactéricide est dû à l'arrêt de la synthèse protéique par sa fixation sur la sous-unité de l'ARN polymérase [74,77].

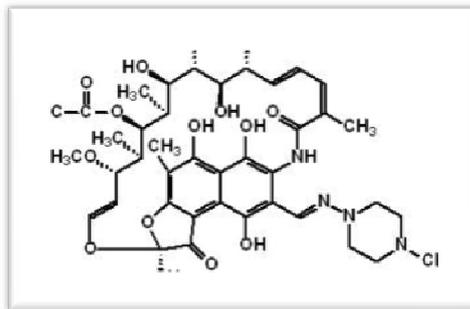


Figure 19: Structure de la rifampicine (RIF) [78]

➤ **Mécanismes de résistance :**

La résistance est liée à des mutations du gène *rpoB* codant la sous-unité β de l'ARN polymérase. Ces mutations se trouvent dans une région 81 pb du gène, les mutations en position 531, 526 et 516 sont les plus fréquentes et donnent une résistance de haut niveau (CMI > 32 $\mu\text{g/ml}$), celle-ci est croisée pour toutes les rifamycine. Des mutations spécifiques en 511, 516, 518 et 522 sont associées à un bas niveau de résistance et dans ce cas, la souche peut être sensible à la rifabutine. Les mutations connues représentent environ 95 % des souches résistantes. D'autre part, il est démontré qu'il pouvait exister un système d'efflux, mais qui s'exprimait à bas niveau [74,77].

c. Pyrazinamide

➤ **Mode d'action**

Comme l'INH, le pyrazinamide est un dérivé du nicotinamide et une prodrogue qui nécessite son activation par une pyrazinamidase codée par le gène *pncA*. Le résultat est une accumulation d'acide pyrazinoïque qui est la forme active sur les bacilles «semi-dormants» dans un environnement à pH acide. Son mode d'action est encore mal connu, la cible pourrait être le complexe FAS-I implique dans la synthèse des acides gras à courte chaîne, mais il est démontré que l'acide pyrazinoïque avait en plus une action sur le potentiel membranaire et inhibait les fonctions de transfert de la membrane [74,77].

➤ **Mécanismes de résistance**

Les mutations du gène *pncA* codant la pyrazinamidase serait le mécanisme principal de la résistance au pyrazinamide. Ces mutations sont très variées, incluant : substitutions, délétions et insertions de nucléotides mais n'expliquent pas toutes les résistances, on peut supposer qu'il existe d'autres mécanismes tels qu'une modification de la cible ou un efflux. D'autre part, la difficulté des tests phénotypiques pour rechercher la résistance explique peut être aussi le manque de corrélation avec la biologie moléculaire [72,74].

d. Ethambutol

➤ Mode d'action

C'est un dérivé de l'éthylènediamine, il inhibe la synthèse des acides mycoliques. La cible est une arabinosyl transferase, enzyme intervenant dans la liaison de l'arabino-galactane [74,77].

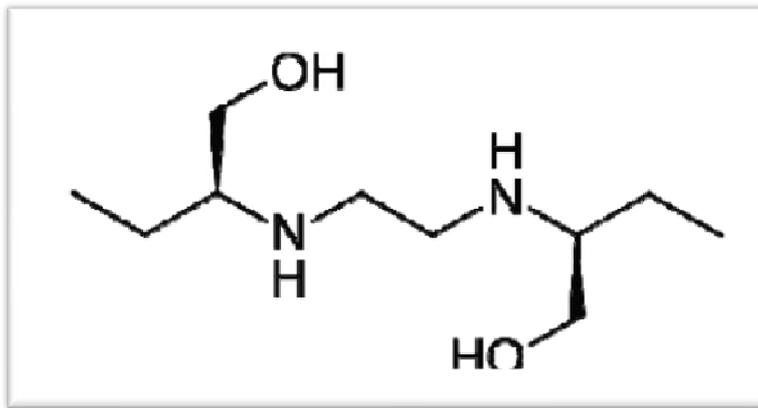


Figure 20 : structure de l'éthambutol (EMB) [78]

➤ Mécanismes de résistance

La mutation est liée à des mutations du gène *embB* et occasionnellement *embC*. D'autres mutations sont situées en amont de l'opéron *embABC*. Il a été montré que le niveau de résistance était très différent selon l'acide aminé substitué. Cependant, 35 % des souches résistantes à bas niveau (CMI < 10 µg/ml) n'ont pas de mutation, ce qui suggère qu'il existe d'autres mécanismes de résistance [74,77].

3. 2 Antituberculeux de «seconde ligne »

a. Les fluoroquinolones

➤ Mode d'action

Plusieurs molécules de cette classe (ofloxacin, lévofloxacin, moxifloxacin) ont une action sur *M. tuberculosis*, elles inhibent la réplication de l'ADN en agissant sur les topoisomérases de type II impliquées dans le surenroulement de l'ADN [74,77].

➤ Mécanismes de résistance

La résistance acquise est due dans la majorité des cas à une mutation du gène *gyrA*, dans le domaine QRDR, de nombreux codons sont concernés. De façon beaucoup plus rare, il a été décrit des mutations sur le gène *gyrB*. En général, le haut niveau de résistance nécessite les mutations concomitantes sur *gyrA* et *gyrB*. Récemment, un nouveau mécanisme de résistance lié à *MfpA* a été identifié. Les résistances pour lesquelles aucune mutation n'est mise en évidence pourraient être liées à une imperméabilité ou un efflux [74,77].

b. Aminosides et apparentés

➤ Mode d'action

La streptomycine, premier antibiotique utilisé dans le traitement de la tuberculose, est maintenant classée comme la kanamycine, l'amikacine et la capreomycine dans les antibiotiques de deuxième ligne. Tous les aminosides agissent sur la synthèse protéique. La cible principale est le ribosome et en particulier la sous-unité 30S. La fixation sur le ribosome conduit à une altération de la synthèse des protéines [72,74].

➤ Mécanismes de résistance

La résistance est le plus souvent liée à la modification de la cible. Pour la streptomycine, il s'agit le plus souvent d'une mutation du gène *rpsL* de la protéine ribosomale conférant un haut niveau de résistance. On peut trouver aussi des mutations du gène *rrs* de

l'ARN 16S. Cependant, 30 % des mécanismes de résistance essentiellement à bas niveau restent des mécanismes inconnus, mais récemment il a été décrit dans des souches de bas niveau de résistance une mutation dans le gène gidB codant pour une méthyltransférase. La résistance à la streptomycine n'est pas croisée avec celle de la kanamycine et amikacine. En ce qui concerne la kanamycine et amikacine, la résistance est croisée, elle est de haut niveau et liée essentiellement à la mutation du gène rrs. Il a été décrit quelques souches résistantes à la kanamycine mais sensibles à l'amikacine [74,77].

c. Ethionamide/ Thiacetazone

➤ Mode d'action

L'éthionamide est un analogue structural de l'isoniazide, il agit sur la synthèse des acides mycoliques [74,77].

➤ Mécanismes de résistance

La résistance est due à des mutations sur les gènes etaA et ethA, la mutation sur inhA confère une résistance à l'INH mais aussi à l'éthionamide [74,77].

d. La cyclosérine

➤ Mode d'action

Elle possède une action bactériostatique par inhibition compétitive de l'alanine racemase (Alr) et de la D-alanine ligase (Ddl) nécessaire à l'élaboration du peptidoglycane [74,77].

➤ Mécanismes de résistance

La résistance implique la surexpression des gènes alrA et ddl codant respectivement pour la D-alanine racemase et D-alanine ligase [74,77].

e. L'acide para-amino salicylique

➤ Mode d'action

Analogie structural de l'acide para-amino benzoïque, C'est un inhibiteur de l'acide folique. Il inhibe la dihydroptérate synthétase, enzyme responsable de l'incorporation de l'acide para-amino benzoïque dans l'acide dihydropteroïque, précurseur de l'acide folique. Il pourrait aussi inhiber la synthèse des mycobactines qui sont des chélateurs du fer [74,77].

➤ Mécanismes de résistance

La résistance serait due à une mutation du gène thyA codant pour thymidilate synthétase qui intervient dans le niveau intracellulaire des folates [74,77].

ATB	CMI mg /l	Site d'action	Activité	Gènes impliqués dans la résistance	Proportion mutants R	Fonction du gène
Isoniazide	0,02- 0,2	Acides mycoliques	Bactéricide	Kat G Inh A	10-6	Catalase peroxydase Inhibition de la protéine inhA
Rifampicine	0,05-1	Synthèse protéique	Bactéricide	rpoB	10-7	Sous-unité de la RNA polymérase
Pyrazinamide	16-50		Bactéricide	pncA	–	Nicotinamidase/ pyrazinamidase
Ethambutol	1-5	Arabinogalactane	Bactériostatique	embB	10-6	Arabinosyl transferase
Streptomycine	2-8	Synthèse protéique	Bactéricide	rpsL rrs gidB	10-6	Proteine ribosomale 16S rRNA 16S rRNA methyltransferase
Amikacine Kanamycine	2-4	Synthèse protéique	Bactéricide	rrs	10-6	rRNA 16S
Capreomycine			Bactéricide	tlyA	10-7	Methyltransferase
Fluoroquinolones	0,5- 2,5	DNA gyrase	Bactéricide	gyrA gyrB		Sous unité A de DNA gyrase Sous unite D de DNA gyrase
Ethionamide Thiacetazone	2,5-10	Acides mycoliques	Bactéricide	etaA/ethA	10-3	Mono-oxygénase
Acide para- amino Salicylique	1-8	Acide folique Métabolisme du fer	Bactéricide	thyA	10-5	Thymidylate synthétase
Cycloserine		Peptidoglycane	Bactériostatique	alrA / ddl	10-2	D-alanine racemase / ligase

Tableau VIII : Principales propriétés et mécanismes d'action des antituberculeux [77]

4. Etude de la résistance aux antituberculeux par les méthodes phénotypiques

a. Méthode des proportions en milieu solide

La méthode de référence dite « des proportions » détermine la proportion de mutants résistants aux antibiotiques. Une souche est déclarée résistante lorsque la proportion des colonies résistantes est égale ou supérieure à une proportion critique (1 % ou 10 % selon les antibiotiques), qui a été définie par l'étude des échecs thérapeutiques comme la concentration nécessaire pour inhiber au moins 95 % des souches sauvages. Cette concentration peut être différente selon le milieu utilisé [2,90]. La méthode des proportions est effectuée sur milieu de Löwenstein-Jensen. Des dilutions de la souche à étudier sont ensemencées sur des milieux témoins (sans antibiotique) et sur des milieux contenant des antibiotiques afin d'obtenir des cultures dont le nombre de colonies est comptable. Les antituberculeux sont incorporés à des concentrations critiques déterminées et corrélées aux concentrations sériques obtenues chez les patients à des posologies usuelles. L'ensemencement des milieux est effectué à partir d'une suspension homogénéisée ou directement à partir du produit pathologique si celui-ci présente un examen direct positif. Une lecture précoce réalisée au vingt-et-unième jour permet de détecter les résistances franches et la lecture définitive est réalisée au quarante-deuxième jour. Le nombre de colonies apparues sur les différents tubes est compté et permet de déduire la proportion de bacilles résistants présents dans la souche. Celle-ci est déclarée résistante, lorsque la proportion des colonies résistantes est égale ou supérieure à une proportion critique (1 % pour la streptomycine, l'isoniazide, la rifampicine, l'éthambutol). Bien que considéré comme un antituberculeux de première ligne, le pyrazinamide est souvent testé en seconde intention en raison des performances médiocres des milieux acides utilisés nécessaires à l'activité de cet antibiotique. À pH acide, la croissance des mycobactéries est diminuée et peut être négative sur le témoin sans antibiotique et inversement un milieu insuffisamment acide peut permettre à tort la croissance en présence de la pyrazinamide (faux-positif). La proportion critique est pour cet antituberculeux de 10 %. Le recours à une méthode moléculaire est souvent indispensable pour détecter et caractériser cette résistance qui demeure rare chez *M. tuberculosis* [2,62].

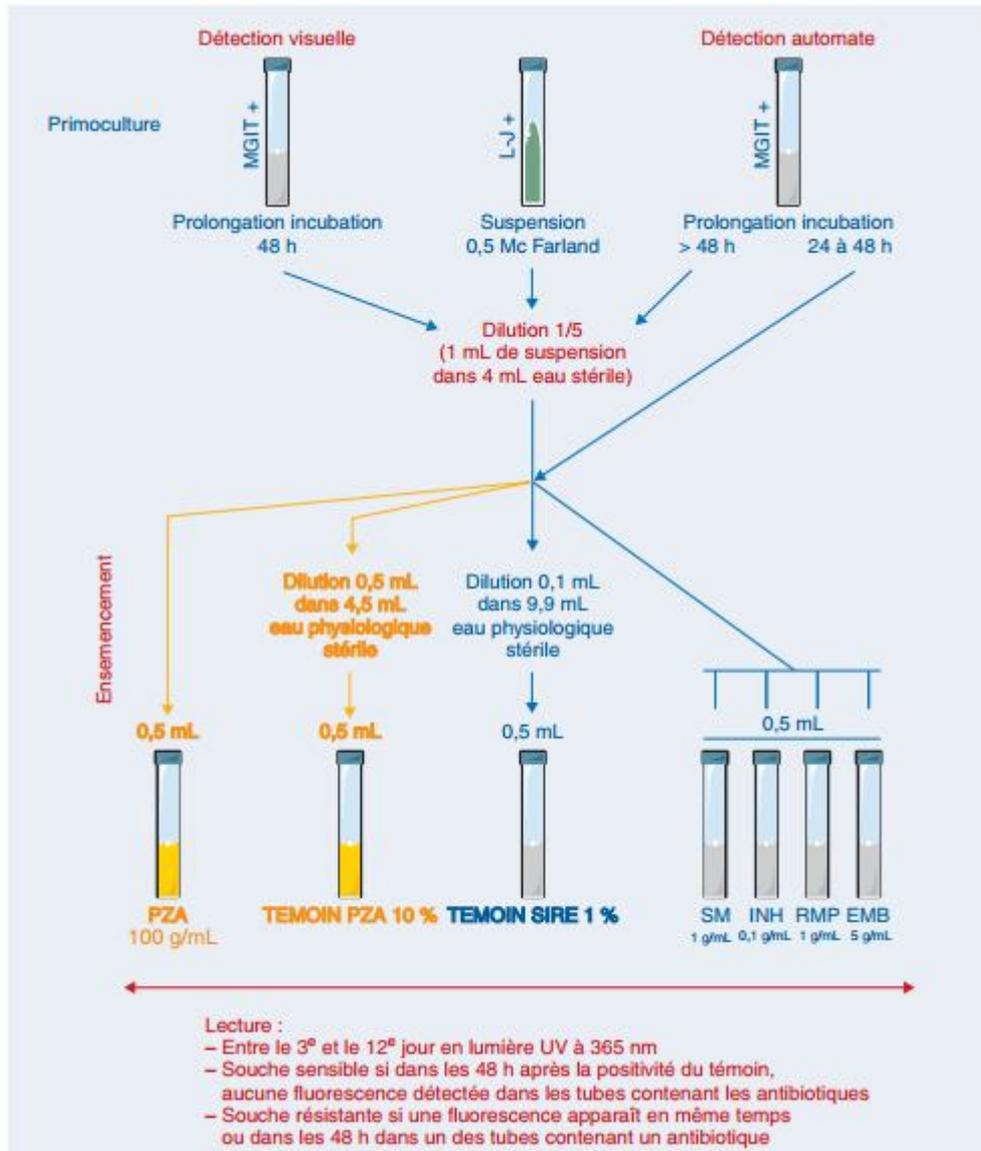


Figure 21 : Etude de la sensibilité aux antituberculeux en milieux liquides par la méthode MGIT® (Bactec) [11]

b. Méthode des proportions en milieu liquide

La méthode des proportions en milieu liquide est analogue à celle réalisée en milieu solide mais permet de raccourcir le délai de réponse de 5 à 14 jours. La mesure automatisée de la croissance se fait par fluorescence (MGIT 960 ®) ou par détection de la diminution de pression due à la consommation d'oxygène (Versa trek ®) [2,11]. Les réactifs nécessaires sont commercialisés sous la forme de deux trousse, l'une comportant l'isoniazide, la rifampicine, Ethambutol et, pour le MGIT, la streptomycine et l'autre la pyrazinamide. L'adaptation de l'antibiogramme en milieu liquide à la mesure de la sensibilité aux antituberculeux de second ligne est en cours [62].

Une souche est déclarée sensible si dans les 48 heures qui suivent la positivité du témoin (inoculum dilué au 1/100 par rapport au tube contenant les antibiotiques), aucune croissance n'est détectée dans les tubes contenant les antibiotiques. Si une croissance est détectée en même temps ou dans les 48 heures dans un des tubes contenant un antibiotique, cette souche est considérée résistante à cet antibiotique. En cas de résultats douteux, il est recommandé de déterminer la proportion exacte de mutants résistants sur milieu solide [62]. L'avantage évident de l'antibiogramme en milieu liquide sur la méthode des proportions en milieu solide est le délai de réponse : les résultats sont obtenus en huit à dix jours au lieu de trois à six semaines. Les résultats sont obtenus en huit à dix jours au lieu de trois à six semaines. La concordance des résultats avec ceux de la méthode de référence est bonne, de plus de 90%. Elle est meilleure pour la rifampicine et l'isoniazide que pour la streptomycine et l'Ethambutol (Tableau 9). Elle est particulièrement bonne pour la rifampicine avec laquelle on n'observe pratiquement aucun faux résistant. Il est toutefois important de noter que pour tous les antibiotiques, on observe des faux-sensibles responsables d'erreurs dites « majeures » (1,5 à 2,5% pour l'isoniazide et la rifampicine, 5 à 8% pour la streptomycine et l'Ethambutol). Pour le pyrazinamide, comme on l'observe avec la méthode des proportions, les faux-résistants sont nombreux et les résultats sont peu reproductibles [62].

	Sensibilité a				Spécificité b				Total pourcentage concordants
	INH	RMP	SM	EMB	INH	RMP	SM	EMB	
MGIT manuel	97,3	94,8	94,4	93	100	100	94	96,9	97,2
Bactec 960	100	98,7	94,9	91,4	95,7	99,8	96,8	98,3	97,9
Versa Trek	98,6	100	/	ND	83,3	100	/	ND	94,4
Total	98,6	97,5	94,7	92	92,1	99,9	95,9	98,8	97,3

INH : Isoniazide (0,1 mg/l) ;RMP :Rifampicine (1mg/l) ;SM :Streptomycine (1 mg/l ou 0,8mg/l en MGIT manuel) ; EMB :éthambutol (5mg/l ou 3,5mg/l en MGIT manuel) ;ND :non déterminé (absence de souches résistantes dans les études).

a Pourcentage de souches classées résistantes par la méthode de référence qui sont déclarées résistantes par l'antibiogramme en milieu liquide.

b Pourcentage de souches classées sensibles par la méthode de référence déclarées sensible par l'antibiogramme en milieu liquide.

Tableau IX : Sensibilité et spécificité de l'antibiogramme en milieu liquide pour la détection des résistances aux antituberculeux [62]

II. TECHNIQUES MOLECULAIRE

A. Apport dans le diagnostic de la tuberculose

A.1. Amplification génique

L'amplification génique repose sur l'amplification des acides nucléiques après extraction, par PCR ou autres techniques d'amplification et détection par hybridation à une sonde.

Les tests d'amplification génique ont pour finalité d'augmenter le nombre de copies d'un segment cible d'acide nucléique de manière à permettre sa détection. Ce sont des tests puissants dont le seuil théorique de sensibilité est d'une molécule d'ADN (ou d'ARN). Ils sont rapides car ils s'affranchissent au temps de multiplication des bacilles et ne reposent que sur des réactions enzymatiques. Appliqués au diagnostic de la tuberculose, ils permettent de détecter rapidement la présence de bacilles du complexe *M. tuberculosis* dans les prélèvements en cas d'examen microscopique négatif et par conséquent de pallier à la lenteur de la culture et à l'étude longue et fastidieuse des caractères culturaux et métaboliques [69].

1. Polymerase chain reaction (PCR)

La polymerase chain reaction (PCR) a été utilisée dès le début des années 1990 pour la détection des mycobactéries et principalement celle de la tuberculose. L'extraction constitue une étape préalable indispensable à la détection de l'ADN des mycobactéries et peut être réalisée avec des résultats satisfaisants en utilisant des coffrets d'extraction adaptés aux différents types de prélèvements (tissus, sang...). Maintenant, des automates d'extraction permettent d'obtenir des résultats équivalents.

Les techniques d'amplification génique utilisées dans les méthodes de détection sont variées mais reposent sur le même principe : amplifier une séquence nucléotidique par répllication in vitro de multiples copies d'ADN à partir d'un extrait par réaction de

polymérisation en chaîne, à l'aide d'amorces encadrant cette séquence et l'activité d'une ou plusieurs enzymes (polymérase, transcriptase inverse), la cible est multipliée en plusieurs millions de copies au cours des 30 à 35 cycles de la réaction. La détection du produit d'amplification par hybridation sur membrane ou en milieu liquide et pour certains kits, réalisée au fur et à mesure du déroulement de la réaction d'amplification (PCR en temps réel) [2,79].

2. PCR en temps réel

La polymerase chain reaction (PCR) en temps réel (RT PCR) permet de suivre en temps réel l'amplification des acides nucléiques, elle a fait l'objet de nombreuses évaluations dans le cadre du diagnostic de la tuberculose. La RT PCR fait appel à deux amorces et une sonde spécifique de la séquence d'intérêt. La sonde est marquée à ses extrémités par un quencher d'une part, et un fluorophore d'autre part. Lors de la PCR, l'activité 5' exonucléasique de la Taq polymérase provoque la libération du fluorophore qui s'éloigne alors du « quencher » augmentant ainsi la fluorescence émise dans le milieu. La fluorescence devient proportionnelle à la quantité d'acide nucléique formé, elle-même proportionnelle à la quantité initiale d'acide nucléique cible. Cette technique présente de nombreux avantages : plusieurs fluorophores peuvent être utilisés simultanément (PCR multiplex), temps d'amplification courts (inférieurs à deux heures), traitement informatisé des données permettant de tester un nombre important d'échantillons en un temps réduit [80,81].

a. *Test PCR Xpert MTB/RIF*

PCR Xpert MTB/RIF est une méthode très prometteuse de PCR en temps réel (Xpert MTB/RIF, Cepheid, Sunnyvale, CA, Etats-Unis), qui permet d'établir à la fois la présence de MTB et d'une mutation du gène *rpoB* indiquant une résistance à la rifampicine en moins de deux heures [82]. Cette technique est également performante dans les cas infectés par le VIH, avec une augmentation de 45% dans la détection des cas par rapport à l'examen direct au microscope et peut être utilisé pour le diagnostic de la tuberculose extrapulmonaire à partir

d'une gamme d'échantillons biologiques. La Xpert MTB / RIF Assay a été rapidement adoptée par l'OMS en Décembre 2010 [83]. Cette technique, outre sa rapidité, semble avoir une sensibilité nettement plus élevée dans les échantillons négatifs à l'examen microscopique (72 %) que les méthodes PCR traditionnelles commercialisées [82-85]. D'après des analyses de littérature, les performances de l'Xpert MTB/RIF, toujours comparé à la culture comme technique de référence, sont les suivantes: sensibilité variant de 43 % pour les liquides (plèvre, ascite, LCR...) à 81 % pour les biopsies ; spécificité allant de 97 % à 99 % selon le type de prélèvement (Tableau 10) [86].

Types de prélèvements	Nombre d'études	Nombre de patients	Sensibilité % (IC 95 %)	Spécificité % (IC 95 %)
Biopsies tissulaires	6	1 086	81 (70- 89)	99 (95- 100)
Liquides	4	587	43 (23- 64)	99 (98- 100)
Autres	5	823	83 (67- 92)	97 (95- 99)

IC 95 % : intervalle de confiance à 95 %.

Tableau X: Performances diagnostiques de l'Xpert MTB/RIF (Cepheid, États- Unis) dans les tuberculoses extra- pulmonaires [86].

b. Test Genotype® MTBDRplus

Le test Genotype® MTBDRplus est un test moléculaire réalisé à partir des prélèvements à microscopie positive ou à partir des cultures, permettant l'identification de *M. tuberculosis* et la détection de la résistance à la rifampicine et à l'isoniazide (haut et bas niveau de résistance) [64]. Le système GenoType MTBC (Hain Life Sciences) permet d'identifier les différentes espèces au sein du complexe MTB. Ce test est basé sur la mise en évidence des différences dans le gène *gyrB* (gyrase B) par amplification de l'ADN et hybridation du produit d'amplification avec des sondes spécifiques. Ce test a un apport énorme pour les laboratoires de diagnostic, car il a permis de passer d'une identification des espèces par tests biochimiques sur plusieurs semaines, avec parfois des difficultés d'interprétation, à une méthode très fiable et réalisable en une journée [82].

c. PCR Cobas AmpliCor Roche

Le test vise à amplifier une cible spécifique du genre *Mycobacterium* de 584 nucléotides, située dans une région hautement conservée du gène de l'ARN ribosomal 16S des mycobactéries (AmpliCor Mycobacterium Tuberculosis Test®, Roche). Son principe utilise une amplification par une Taq polymérase de l'ADN codant une partie spécifique de ARN 16S. Cette amplification consiste en quatre étapes : une étape de préparation de l'échantillon suivie de trois étapes automatisées: amplification de l'ADN cible par PCR, hybridation des amplicons à des sondes oligonucléotidiques spécifiques de la cible et détection par réaction colorimétrique [64,87].

2. Amplification de l'ARN par TMA

C'est une réaction d'amplification transcriptionnelle de l'ARN par Transcription Mediated Amplification (TMA) : trousse Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct Test ou AMTD (BioMérieux). Cette technique fait appel à l'amplification isotherme d'une séquence spécifique de l'ARN 16S générant des copies d'ARN. Il n'existe pas de contrôle interne et la technique est entièrement manuelle [63,88].

L'avantage essentiel d'amplifier l'ARN transcrit dans la bactérie à partir d'une séquence d'ADN donnée est environ 1000 fois plus élevé que le nombre de copie de cet ADN. Ceci confère donc théoriquement à la TMA une sensibilité supérieure à la PCR. La réaction se déroule à température constante, ce qui évite le recours à un thermocycleur. Cette méthode est développée et commercialisée par Gen Prob et BioMérieux dans la trousse Amplified Mycobactérium tuberculosis Direct Test [63].

3. Amplification par LCR

C'est une réaction d'amplification génique par Ligase Chain Reaction (LCR) : test LCX Probe (Abbott). Cette technique est automatisée [63] et se base sur un procédé d'amplification par réalisation de cycle de ligature de 2 sondes nucléotidiques spécifiques de *M. tuberculosis* et choisies de manière à être juxtaposées lorsqu'elles s'hybrident à l'ADN cible. Le système de détection est basé sur un procédé d'immunocapture.

4. Amplification par SDA

C'est une réaction d'amplification par Strand Displacement Amplification (SDA) : trousse BD ProbeTec™ ET DTB Assay (Becton Dickinson). Il s'agit d'une amplification isotherme d'ADN réalisée dans un automate qui couple l'amplification et la détection. Il existe un contrôle interne automatique. La cible est l'ADN et les amorces sont hybridées sur l'ADN contiennent un site de restriction spécifique pour une enzyme (Hinc II) [63,88].

A.2 Identification par hybridation :

Les sondes nucléiques sont particulièrement indiquées pour l'identification des mycobactéries en culture, car le matériel génétique est présent en grande quantité. L'hybridation moléculaire ne doit être effectuée que sur des cultures pures, les milieux solides et liquides pouvant être utilisés indifféremment [88].

L'hybridation avec des sondes complémentaires de séquences génomiques spécifiques constitue aujourd'hui le moyen le plus utilisé pour identifier les mycobactéries obtenues en culture. Elle remplace avantageusement l'étude des caractères cultureux et biochimiques qui, pour être complète, demandait souvent plusieurs semaines. Les sondes Accuprobe®, complémentaires d'un fragment spécifique d'ARN, et les bandelettes Genotype Mycobacterium® (HainScience) ou INNO LiPA Mycobacteria® (Innogenetics) permettent d'identifier *Mycobacterium tuberculosis* complex en culture, dans un délai de quelques heures seulement, avec une excellente sensibilité ($\approx 100\%$) et une excellente spécificité ($\approx 95\%$) [80,89]. Leurs performances, lorsqu'on les applique directement au prélèvement pour l'identification des bacilles observés à l'examen microscopique sont moins bonnes (dépendantes du nombre de bacilles observés), voire insuffisantes avec les sondes Accuprobe qui fonctionnent sans amplification de la cible. Ces bandelettes assurent, en plus de l'identification de *M. tuberculosis*, celle des espèces de mycobactéries atypiques les plus fréquemment rencontrées (35 avec les bandelettes Genotype Mycobacterium). En revanche, elles ne permettent pas d'identifier les espèces au sein du complexe *tuberculosis*.

Pour ce faire, on dispose d'une autre bandelette, la bandelette Genotype MTBC® (Hain Science) basée sur une PCR multiplex dont les cibles sont le gène de l'ARN 23S (pour *M. tuberculosis* complex), la région RD1 (pour *M. bovis*) et le gène gyrB (pour *M. Africanum*, *M. Tuberculosis* et *M. Canetti*) [80].

1. Test AMTDTt (Gen-Probe)

GenoType Mycobacteria (Hain Diagnostika) : cette méthode nécessite une amplification de l'espace intergénique 16–23S suivie d'une hybridation sur une bandelette où sont fixées des sondes biotinylées. Elle permet le diagnostic du complexe *tuberculosis* et de 15 espèces de MNT. [63.82].

2. Technique Inno-Lipa Mycobacteria

Ce test d'hybridation inverse sur bandelettes de nitrocellulose, nécessite une extraction et une amplification préalables. Les hybrides sont détectés à l'aide du système avidine biotine. Le substrat spécifique de la phosphatase alcaline permet une détection chromogénique. Les bandelettes Inno-Lipa™ permettent la détection des mycobactéries du complexe *M. tuberculosis* et de 7 espèces de mycobactéries atypiques (*M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. gordonae*, *M. xenopi*, *M. chelonae* et *M. scrofulaceum*) [88].

Les sondes spécifiques de chacune de ces espèces, ainsi qu'une sonde spécifique du genre *Mycobacterium*, sont immobilisées sur chaque bandelette [88]. La sensibilité et la spécificité de cette technique est identique à celle de Gen-Probe, elle présente l'avantage de confirmer l'appartenance de la souche à la famille des mycobactéries et d'identifier un plus grand nombre d'espèces. En revanche, elle nécessite une amplification, donc un temps de manipulation beaucoup plus long et son coût est élevé [63].

3. Test Accuprobe

C'est un test d'identification rapide des mycobactéries (*complexe M. tuberculosis, complexe M. avium, M. intracellulare, M. kansasii, M. gordonae*). Il s'emploie à partir de cultures car sa sensibilité est limitée, ne permet pas son utilisation directement sur les prélèvements cliniques [65,78]. L'utilisation d'une sonde mono spécifique en milieu liquide (*Mycobacterium Tuberculosis Complex, Accuprobe*[®]) détectant les mycobactéries de la tuberculose. Une sonde d'ADN complémentaire d'ARNr 16S marquée est mise en présence d'un lysat de culture préparé à partir de milieux solides ou de milieux liquides. Après hybridation avec l'ARNr et élimination des fragments de sonde non hybridés, la sonde hybridée est détectée par chimioluminescence à l'aide d'un luminomètre. Cette sonde présente de très bonnes sensibilité (100 %) et spécificité (proche de 100 %) [63,65]. Les avantages de cette méthode sont l'utilisation unitaire et la rapidité (le résultat est obtenu en 2 heures, et la réaction d'hybridation est entièrement automatisée, ne nécessitant que la préparation de l'échantillon) de la réponse fournie aux cliniciens (2heures) afin de le conforter dans son choix thérapeutique ou d'instaurer un traitement antituberculeux [63,88]. La sonde du complexe *M. tuberculosis* ne permet pas de différencier les espèces appartenant à ce complexe [63,65].

4. Le système GenoType MTBC

Le système GenoType MTBC (Hain Life Sciences) permet d'identifier les différentes espèces au sein du complexe MTB. Ce test est basé sur la mise en évidence des différences dans le gène *gyrB* (gyrase B) par amplification de l'ADN et hybridation du produit d'amplification à des sondes spécifiques [82].

A.3. Typage Moléculaire

1. La méthode de référence RFLP IS6110

La méthode RFLP-IS6110 est la méthode de référence pour le typage génomique des bacilles de la tuberculose. Elle repose sur la détermination du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) présentant la séquence IS6110, une séquence d'insertion, soit un petit élément génétique mobile ne comportant que les gènes nécessaires à sa transposition et à sa régulation [90]. L'élément IS6110 est une séquence d'insertion spécifique des bacilles de la tuberculose et absent des autres espèces mycobactériennes. Chez *M. tuberculosis*, la distribution d'IS6110 varie d'une souche à l'autre avec un nombre de copies variable et des localisations différentes sur le chromosome (polymorphisme de position et dans le nombre variable de copies d'une souche à l'autre) [91]. Ce polymorphisme de distribution de IS6110 est le résultat de transpositions ou de divers événements génétiques successifs survenus au cours de l'évolution des bacilles de la tuberculose. Ces polymorphismes sont limités d'une part par l'existence de souches dépourvues de toute IS6110 ou d'autres présentant une ou deux copies seulement et d'autre part, par la présence de sites d'insertion préférentiels [90]. La technique consiste à digérer le génome par *PvuII*, une enzyme de restriction qui ne coupe qu'une fois dans IS6110, puis à séparer les fragments par électrophorèse en gel d'agarose. Par hybridation avec la séquence répétée IS6110, on révèle le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) des quelques fragments d'ADN qui portent IS6110 (Figure 22). On génère ainsi des profils génomiques caractéristiques, facilement comparables. Les profils sont stables au cours du temps, atout majeur et indispensable pour définir la technique RFLP IS6110 comme un bon outil épidémiologique [91]. La réalisation de la technique (extraction de l'ADN, purification, digestion, électrophorèse, transfert sur membrane, hybridation, révélation) s'effectue sur une dizaine de jours. En plus d'être lente, la méthode est lourde car elle nécessite plusieurs milligrammes de culture mycobactériennes, l'ADN doit être très pur et de bonne qualité sans dommage physique. Cette méthode est aujourd'hui remplacée par des méthodes rapides amplifiant des régions spécifiques du génome [90].

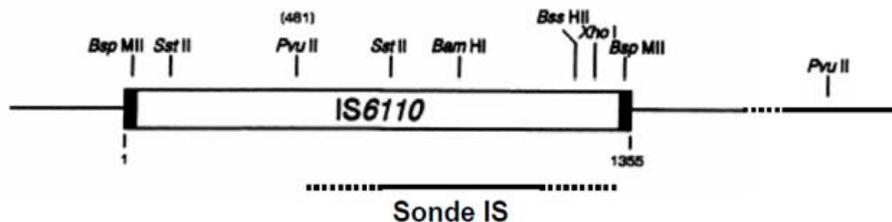


Figure 22: Carte de la séquence d'insertion IS 6110 (1,35 Kb) [91]

2. Spoligotyping

Le spoligotyping est une méthode de typage moléculaire fondée sur le polymorphisme des séquences nucléotidiques localisées entre les séquences identiques de 36 pb de la région DR « Direct Repeat » et présent uniquement chez les membres du complexe *M. tuberculosis*. Le nombre de séquences DR peut varier entre les souches de la même espèce. Ces séquences de 36 pb sont séparées par des séquences non répétitives d'ADN de 36-41 Pb appelées séquences inter-DR ou « spacers », dont les variations sont limitées. Quarante-trois séquences inter-DR ou *spacers* ont été synthétisées et immobilisées sur une membrane de nylon commercialisée (Isogen Bioscience B.V., BT Maarsen, Pays Bas) [90].

La méthode utilise deux amorces complémentaires de la partie conservée de la région DR, dirigées vers l'extérieur, qui amplifient les séquences inter-DR. La région DR est amplifiée grâce à deux amorces extérieures (DRa, DRb) [91]. Les profils génomiques sont révélés après hybridation avec la membrane portant l'ensemble des 43 séquences inter-DR connues. On définit un spoligotype sur la présence ou l'absence d'un ou plusieurs *spacers*. La méthode du **spoligotyping** présente plusieurs avantages : simple, rapide, reproductible. Par ailleurs l'analyse des profils de spoligotype ne nécessite pas de logiciel d'interprétation complexe comme c'est le cas du RFLP ; elle est plus discriminante que la méthode RFLP IS6110 pour les souches à faible nombre de copies de IS6110. C'est donc une excellente méthode de *screening* utile dans le cadre de larges enquêtes épidémiologiques [90,91].

Souche	Spoligotype					
	1	9	19	29	39	43
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	■	■	■	■	■	■
<i>M. bovis</i> BCG Pasteur	■	■	■	■	■	■
<i>M. tuberculosis</i> Beijing or W	□	□	□	□	□	□
<i>M. africanum</i> type A1	■	■	■	■	■	■
type A2	■	■	■	■	■	■
<i>M. canettii</i>	□	□	□	□	□	□
<i>M. microti</i>	□	□	□	□	□	□

■ Hybridation positive; □ absence d'hybridation.

Figure 23 : Profil génomique en spoligotyping de quelques membres du complexe des bacilles de la tuberculose [92].

3. MIRU

Une nouvelle méthode s'appuyant sur le polymorphisme d'une nouvelle classe d'éléments répétés identifiés chez les bacilles de la tuberculose et chez *M. lepræ* : les MIRU (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units). Le séquençage complet de *M. tuberculosis* H37Rv a révélé 41 loci d'intégration de ces éléments, constitués de séquences répétées de 51 à 77 Pb, dans les régions intercistroniques de différents opérons. Les unités MIRU sont dupliquées en nombre variable selon les souches et selon les loci. La technique consiste en l'amplification par PCR grâce à des amorces spécifiques des régions flanquantes et en la détermination de la taille des produits amplifiés, qui reflètent le nombre de copies de l'élément au locus étudié après simple migration sur gel d'électrophorèse. La méthode de typage par MIRU révèle une reproductibilité et une sensibilité de 100 % [91]. Cette méthode est actuellement la plus performante car elle permet de typer toutes les souches, y compris celles ayant un faible nombre de copies IS6110 [82]. Sur les souches bien discriminées par la méthode de référence, l'analyse par MIRU est comparable à celle de RFLP IS6110, ce qui fait de cette méthode la plus performante des méthodes de typage moléculaire de *M. tuberculosis* [91]. Elle est en plus assez simple à implanter pour les laboratoires pratiquant les techniques de biologie moléculaire [82].

4. Rep-PCR

Dernièrement, une autre méthode commerciale de typage pour différentes bactéries (rep-PCR Diversilab, Bacterial Barcodes Inc, Biomérieux, Houston, TX, Etats-Unis) ; elle a été évaluée pour MTB (rep-PCR Diversilab *Mycobacterium Tuberculosis* Typing kit). Cette technique amplifie les régions entre des séquences répétées non codantes du génome et les produits d'amplification sont analysés dans une puce où migre un gel à travers des microcapillaires. La méthode sépare et analyse les fragments amplifiés de différentes tailles et d'intensités de fluorescence variable. Cette méthode a été utilisée avec succès en parallèle avec un typage IS 6110- RFLP pour mettre en évidence une épidémie à Genève de 15 cas d'immigrés venant d'un même pays. Une récente comparaison des techniques RFLP, MIRU et rep-PCR a démontré la supériorité de la technique MIRU comme outil de typage PCR par rapport à la rep-PCR [82].

❖ Résultats

La détection des acides nucléiques augmente la spécificité du diagnostic de la tuberculose ; toutefois, elle a une sensibilité trop basse en particulier pour les échantillons négatifs à l'examen microscopique [82]. En cas d'examen direct positif sur un prélèvement pulmonaire, cette technique a une sensibilité évaluée à 98,2 % et elle permet de différencier une tuberculose d'une infection à mycobactéries atypiques. La sensibilité est moins bonne en cas d'examen direct négatif 72,5 % et un résultat négatif en biologie moléculaire n'exclut pas une tuberculose [93,94]. La détection d'acides nucléiques dans les autres échantillons cliniques, en particulier les biopsies, peut être négative à cause de la présence d'inhibiteurs d'amplification. Ceux-ci doivent donc être systématiquement recherchés quel que soit le type d'échantillon et de méthode d'extraction des acides nucléiques [82]. Pour ces prélèvements extra respiratoires (biopsies, urines, LCR), la sensibilité de la PCR est meilleure que celle de l'examen microscopique (81,3 % vs 48 %), mais varie selon la nature du prélèvement et demeure moins performante que la culture [67,93,94].

B. Apport dans l'étude de la résistance aux antibacillaires

B.1 Méthodes d'amplification

Avec l'antibiogramme, malgré l'apport des milieux liquides, les résultats sont obtenus, au mieux, dans un délai de deux à quatre semaines après le prélèvement. Les techniques de biologie moléculaire, qui s'affranchissent de la culture, offrent la possibilité d'obtenir des résultats beaucoup plus rapidement et suscitent donc un vif intérêt. Les gènes codant la cible des principaux antituberculeux ainsi que la plupart des mutations responsables de la résistance ont été récemment identifiés. Lorsque les mutations sont localisées sur de petits fragments de gènes, elles peuvent être détectées, après amplification du fragment par détermination de la séquence nucléotidique ou par hybridation avec des sondes oligonucléotidiques spécifiques fixées sur bandelette. L'intérêt de la détection moléculaire de la résistance varie d'un antituberculeux à un autre en fonction de plusieurs facteurs (état de la connaissance des gènes de résistance, nombre et taille des gènes impliqués dans la résistance, impact thérapeutique de la résistance et difficultés rencontrées avec les phénotypiques) [62].

La détection moléculaire de la résistance à la rifampicine, marqueur de multirésistance a été la première à être développée, plus de 95% des souches résistantes portant une mutation sur un petit fragment d'un seul gène : Le gène *rpoB*. La détection moléculaire de la résistance aux fluoroquinolones, antibiotiques essentiels en cas de multirésistance, est plus relativement facile parce que, comme pour la rifampicine, plus de 95% des souches résistantes portent une mutation sur un petit fragment de deux gènes *gyrA* et *gyrB*. Le séquençage du gène *pncA* pour la détection de la résistance au pyrazinamide est intéressant parce qu'il y a de grosses difficultés d'interprétation des résultats de l'antibiogramme avec cet antibiotique dont le rôle est important en cas de multirésistance. Toutefois, la diversité des mutations répertoriées étant grande et leur effet n'étant pas toujours clairement établi, l'exploitation des résultats du séquençage est délicate. La détection moléculaire de la résistance à l'isoniazide, difficile du fait du nombre important de gènes impliqués (gène *KatG*, *inhA*, *ndh*, *mshA*...). Sa mise en œuvre a été considérablement simplifiée et ses performances améliorées avec la mise sur le marché de la trousse Génotype MTBDR plus qui détecte près de 90% des mutations responsables [62].

A l'heure actuelle, la plupart des techniques de biologie moléculaire reposent sur réaction d'amplification d'ADN qui permet d'obtenir, dans un délai rapide, une quantité suffisante de matériel pour permettre la mise en évidence des mutations. Cette étape peut être réalisée par plusieurs techniques : la plus ancienne est l'analyse de la mobilité électrophorétique de l'ADN simple brin (SSCP), l'hybridation sur bandelette et la détermination de la séquence nucléotidique [95]

L'analyse SSCP consiste à apprécier la mobilité électrophorétique de la forme simple brin d'un fragment d'ADN obtenu par amplification [95]. La détermination de la séquence nucléotidique est réservée aux laboratoires de bactériologie possédant les techniques de biologie moléculaire et ayant accès au matériel nécessaire (automate de séquençage et logiciel d'aide à l'analyse de séquence) [90]. La technique d'hybridation sur bandelettes est beaucoup plus simple à mettre en œuvre [62]. Des tests d'hybridation inverse sur bandelettes ont été développés ; ils sont réalisables sur cultures ou sur prélèvements à microscopie positive ciblant le gène *rpoB* dont les mutations sont responsables de la résistance à la rifampicine. L'OMS recommande l'usage de ces tests pour le diagnostic rapide de la multi résistance aux antituberculeux chez les nouveaux patients des régions où l'incidence de la multirésistance est élevée. En effet, comme le taux de mutation conduisant à la résistance à la rifampicine est beaucoup plus bas que celui de l'isoniazide, la probabilité qu'une souche résistante à la rifampicine le soit aussi à l'isoniazide est très élevée [11]. L'OMS recommande également un test récemment développé (en 2011) et qui consiste en une PCR en temps réel, semi-nichée, combinant dans une cartouche unique, le traitement de l'échantillon, la détection des cibles (fragments du gène *rpoB*) et l'amplification enzymatique. Ce test a une sensibilité supérieure à celle des bandelettes comparable à celui des autres tests d'amplification génique (environ 100 bacilles/ml) [11]. En France, il est recommandé de recourir à ces tests pour les patients à risque de multirésistance: échecs thérapeutiques, patients ayant reçu plusieurs traitements antituberculeux, personnes provenant de pays à forte endémie de tuberculose multirésistante, contacts des patients à tuberculose multirésistante [11]. Une nouvelle bandelette, la bandelette Geno Type MTBDRsl, a été mise sur le marché en 2009 pour la détection de la résistance aux antituberculeux de seconde ligne les plus importants (fluoroquinolones, amikacine/capreomycine) et à l'éthambutol [62].

B.2. Hybridation

L'hybridation sur bandelette consiste à amplifier un fragment de gène, à le marquer et l'hybrider sur des sondes fixées sur bandelette. Les hybrides sont révélés par l'apparition d'une coloration [60,68]. Ces méthodes ont été mises au point pour détecter la résistance à la rifampicine, deux bandelettes sont disponibles dans le commerce, la bandelette INNO-LiPA Rif.TB (Innogenetics) et la bandelette Geno Type MTBDRplus (Hain Science) [2. 62,67] puis élargies à d'autres antituberculeux (isoniazide, éthambutol, aminosides, fluoroquinolones). Actuellement, deux coffrets permettent respectivement la détection des mutants résistants les plus fréquents à la rifampicine et l'isoniazide (GenoType MTBDR*plus*[®]) et à l'éthambutol, les aminosides et les fluoroquinolones (GenoType MTBDR*sl*[®])

Méthode	Antibiotique	Gène	Nombre de sondes sauvages	Nombre de sondes positions mutées
INNO-LIPA	Rifampicine	rpoB	5	4
RIF.TB				
MTBDR plus[®]	Rifampicine	rpoB	8	4
	Isoniazide	KatG	1	2
		KatG	2	4
MTBDR sl[®]	Fluoroquinolones	gyrA	3	6
	Aminoglycoside	ns	2	2
	Ethambutol	ns	1	2
Xpert	Rifampicine	rpoB	5	0b
MTB/RIF a				
a Polymérase chain réaction en temps réel.				
b La détection de la résistance est observée par la diminution du nombre de sondes hybridées sur le produit de polymérase chain réaction.				

Tableau XI : Cibles et caractéristiques des méthodes de détection moléculaire de la résistance aux antituberculeux [2]

1. La bandelette INNO-LiPA Rif.TB

Le premier kit commercialisé pour la détection de la résistance à la rifampicine fut INNO-LiPA Rif.TB. Le principe repose sur l'amplification de la région du gène (séquence nucléotidique susceptible d'être mutée), une biotinylation de l'amplicon, et une hybridation à d'une part à des sondes spécifiques de sa conformation normale (témoin sensible) et d'autre part à des sonde spécifiques des mutations ponctuelles connues immobilisées sur un support de nitrocellulose. La révélation des hybridomes se fait par colorimétrie (biotine et streptavidine couplée à la phosphatase alcaline). Cinq sondes hybrident avec les séquences de la souche sauvage, les quatre autres avec les principales mutations (figure 24). Les premières évaluations du test à partir des souches ont montré une sensibilité de 97 % par rapport aux tests phénotypiques ; la sensibilité est selon les études de 90 à 97 % et la spécificité proche de 100% [63]. Une étude portant sur 360 échantillons pour la détection de *M. tuberculosis* a révélé une sensibilité de 82,2 % et une spécificité de 66,7 % par rapport à la culture et l'identification conventionnelle, mais respectivement 100 % et 96,9 % pour la résistance à la rifampicine [93]. Les résultats sont obtenus en 24h ; elle est commercialisée sous forme d'un coffret prêt à l'emploi pour la détection de la résistance à la Rifampicine (INNOLiPA Rif TB InnoGenetics) qui résulte de la mutation groupée dans une région délimitée du gène *rpoB*. Les résultats sont fiables. Il est possible de l'appliquer directement aux prélèvement riches en bacilles [61].

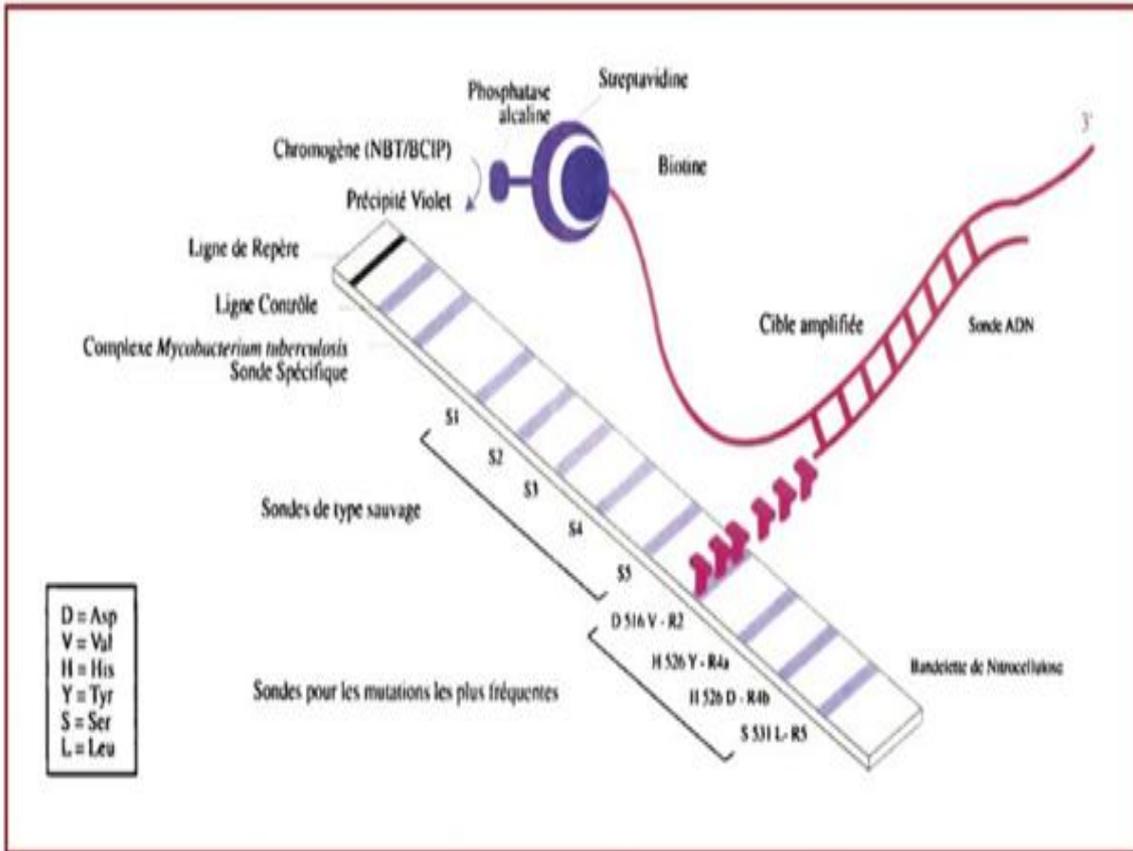


Figure 24 : Principe de la recherche de mutation dans le gène *rpoB* par hybridation sur bandelette : Exemple du test INNO-LiPA Rif.TB [63]

2. GenoType MTBDR plus

GenoType MTBDRplus est basé sur le principe d'une hybridation inverse, il permet la détection conjointe des mutations sur le gène *rpoB* pour la rifampicine et les gènes *katG* et *inhA* pour les résistances à haut et bas niveau à l'isoniazide et a donc supplanté la bandelette INNO-LiPA Rif [2,93]

Sur bandelette Genotype MTBDRplus sont fixées à :

Des sondes spécifiques des allèles sauvages du gène *rpoB*, de la position 315 du gène *KatG* et des positions _8_15 et _16 du régulateur du gène *inhA*.

Des sondes spécifique des mutations les plus fréquemment en cause dans la résistance à la rifampicine (S513L, H526Y, H526D, et D516V de *rpoB*) et à l'isoniazide (deux triplets déterminant la mutation S315T de *KatG* et _15 C T, _16A G, _8T C, _8T A de *inhA*). Avec ce jeu de sonde, il est possible de préciser si les gènes *rpoB*, *KatG* et *inhA* sont sauvages ou s'ils sont le siège de mutations aux positions testées. Un signal d'hybridation positif avec les sondes détectant spécifiquement les mutations les plus fréquentes révèle la présence de ces mutations. L'absence d'hybridation avec la sonde sauvage sans hybridation avec les sondes des mutations les plus fréquentes révèle la présence de mutations plus rares dont l'identification précise en pourra être obtenue que par séquençage du gène concerné (Figure 25) [2].

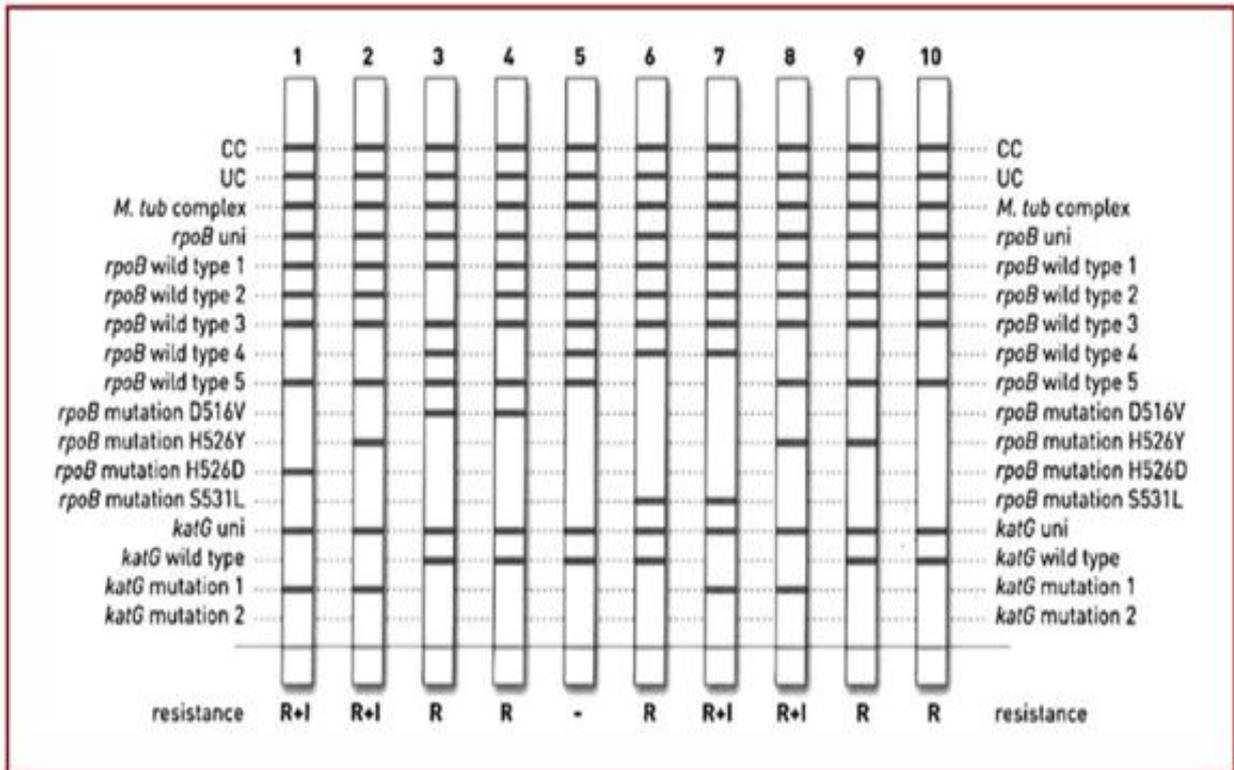


Figure 25 : Exemple de résultats de la recherche de mutations dans les gènes rpoB et KatG par hybridation sur bandelette Genotype MTBDR plus [63].

Les performances de la technique évaluée se révèlent excellentes, que la technique soit appliquée aux cultures ou directement aux prélèvements à examen microscopique positif: la spécificité est de 100 % et la sensibilité supérieure à 90% pour la détection de la résistance à la rifampicine et de la résistance à haut niveau à l'isoniazide (tableau12) [96]. Elle est moins bonne pour la détection de la résistance à bas niveau à l'isoniazide, ce qui retentit sur la sensibilité globale pour la détection de la résistance à cet antibiotique (de 73 à 97 % selon les études et les souches concernées) .Lorsque la technique est appliquée à des prélèvements pauvres en bacilles (examen microscopique négatif), les performances sont, comme celles de l'amplification génique nettement moins bonnes [63].

Les articles portant sur l'évaluation de ce même kit dans le cadre de la résistance à l'INH rapportent également d'excellentes performances. Cette technique apparaît indispensable en routine ; elle confirme le diagnostic, précise dans un fort pourcentage de cas la nature de la mutation et le niveau de résistance à la rifampicine. Les méthodes moléculaires basées sur le séquençage ne doivent être pratiquées que pour des mutations moins fréquentes et lors d'un problème éventuel d'interprétation Il faut espérer que le nouveau kit basé sur le même principe et qui étudie la résistance à l'éthambutol, aux aminosides et aux fluoroquinolones donne les mêmes performances [96].

	Auteurs	Rifampicine		Isoniazide	
		Se a	Sp b	Se a	Sp b
Souches	Brossier et al.	100	100	86	100
	Hilleman et al.	98,7	100	92	100
	Lacoma et al.	91,7	100	73	100
	Miotto et al.	/	/	79,2	/
Prélèvement BAAR +	Hilleman et al.	96,8	100	90,2	100
	Lacoma et al.	100	100	92,6	100
	Miotto et al.	/	/	/	/
	Barnard et al.	98,9	99,4	94,2	99,7

a Sensibilité.

b Spécificité.

c Quatre-vingt-quatorze pour cent parmi les souches à haut niveau de résistance.

d Parmi les souches résistance, 85,7% à haut niveau de résistance.

e Deux faux-négatifs provenant d'un même malade

Tableau XII : Sensibilité et spécificité du test Genotype MTBDRplus comparées à l'antibiogramme [62].

3. GenoType MTBDRsl

Il permet de détecter les mutations *gyrA* pour les fluoroquinolones, *rrs* pour les aminoglycosides et *embB* pour l'éthambutol [92]. Deux évaluations de la bandelette GenoType® MTBDRsl ont révélé que les résultats obtenus sont bons mais imparfaits pour les fluoroquinolones et l'amikacine (sensibilité ≈ 90 %), moins bons pour la kanamycine et la capréomycine (sensibilité : ≈ 80 %) et insuffisants pour l'éthambutol (sensibilité : ≈ 60 %) [63].

4. MAS-PCR

L'analyse MAS-PCR est un procédé simple et rapide pour la détection de la résistance à l'INH et RIF de *Mycobacterium tuberculosis* (MT) des souches cliniques, cette PCR multiplex spécifique de l'allèle est utilisée pour cibler les codons 516, 526, et 531 du gène *rpo B*, le codon 315 du gène *katG* et la région du promoteur *mabA-inhA*. Ces codons ont été le plus souvent impliqués dans des mutations ponctuelles associées à la résistance RIF-et INH dans les différentes études ; la réaction de polymérisation en chaîne multiplex spécifique d'allèle (MAS-PCR) est développée pour détecter simultanément les mutations les plus fréquentes associées à la résistance à l'isoniazide (INH) et rifampicine (RIF) en un seul essai [60].

Une analyse récente a été testée avec 53 isolats cliniques. Une sensibilité de 92,6% dans la détection de la TB et RIF-résistance a été trouvée. La sensibilité pour la détection de la résistance à l'INH était de 88,6%. Ce test est facile à réaliser et à interpréter et il est peu coûteux [97].

5. Test Xpert MTB/RIF

D'autres techniques, comme les biopuces (TB bio chip, BioMérieux...) sont très attrayantes mais ne sont pas encore utilisées, même dans les laboratoires spécialisés, car elles nécessitent un matériel très coûteux et des réactifs qui ne sont pas commercialisés ou pas encore validés. La nouvelle technique Cepheid MTB/RIF GeneXpert®, qui ne nécessite pas d'équipement spécialisé de biologie moléculaire et dont la mise en œuvre semble très simple, est prometteuse. Son coût et ses performances restent à évaluer en routine [64].

Conclusion



La tuberculose constitue un problème majeur de santé publique, un tiers de la population mondiale étant considéré comme contaminé et huit millions de nouveaux cas étant détectés chaque année, surtout dans les pays en voie de développement. Dans les pays développés, on assiste à l'émergence et à la diffusion de souches multirésistantes au traitement antituberculeux de première intention.

Les méthodes conventionnelles demeurent des outils incontournables pour le diagnostic biologique de la tuberculose. Elles nécessitent le recours à des techniques spécifiques de coloration et des milieux de cultures spéciaux. Actuellement, le diagnostic a été amélioré par les techniques de biologie moléculaire qui sont progressivement implantées dans les laboratoires. Ces techniques sont très sensibles et permettent un diagnostic rapide en quelques heures.

En effet, parmi ces méthodes moléculaires, la technique d'hybridation sur bandelettes, reste simple à mettre en œuvre avec du matériel qui est aujourd'hui présent dans de nombreux laboratoires de Microbiologie (thermocycleur et bain-marie agité). Elle peut être appliquée directement aux échantillons lorsqu'ils sont riches en bacilles acido-alcool-résistants. On peut alors identifier les bacilles vus au microscope comme appartenant au complexe *M.tuberculosis* et détecter la présence de mutations conférant la résistance à la rifampicine et l'isoniazide dans les 48 à 72 heures qui suivent le prélèvement, ce qui est capital pour la prise en charge des malades et de leur entourage.

La détection des acides nucléiques augmente la spécificité du diagnostic de la tuberculose. En cas d'examen direct positif sur un prélèvement pulmonaire, cette technique a une sensibilité élevée et elle permet de différencier une tuberculose d'une infection à mycobactéries atypiques. Cependant, un résultat négatif en biologie moléculaire n'exclut pas une tuberculose. Pour les prélèvements extra-pulmonaires (biopsies, urines, LCR), la sensibilité de la PCR est meilleure que celle de l'examen microscopique, mais varie selon la nature du prélèvement et demeure moins performante que la culture.

Résumé



RÉSUMÉ

-Titre : Apport de la biologie moléculaire dans le diagnostic de la tuberculose

-Auteur : El Bouskouri Khadija

-Rapporteur : Professeur Said Zouhair

-Mots clés : Tuberculose – biologie moléculaire –diagnostic– Résistance.

La tuberculose est une maladie infectieuse contagieuse, à déclaration obligatoire. L'agent pathogène responsable est souvent le bacille de Koch (BK) appartenant au complexe *Mycobacterium tuberculosis*.

La tuberculose représente un problème majeur de santé publique mondial en raison de sa fréquence et de sa morbi-mortalité : les chiffres de la tuberculose dans le monde sont impressionnants, avec un tiers de la population mondiale infectée. En 2012, 8,6 millions de personnes ont développé la tuberculose et 1,3 million en sont décédées. Plus de 95 % des patients tuberculeux vivent dans les pays en voie de développement. L'infection par le VIH constitue à la fois un facteur d'aggravation individuel et un facteur d'extension de la maladie sur le plan épidémiologique. Par ailleurs, les souches multirésistantes aux antituberculeux représentent un sérieux problème de santé publique, vu le caractère pandémique de leur émergence.

Le diagnostic bactériologique repose essentiellement sur l'examen microscopique, la culture et l'identification biochimique des bacilles acido-alcoolo-résistants (BAAR). En revanche, les outils de biologie moléculaire ont actuellement une place prépondérante dans la détection, l'identification et l'étude de la résistance aux antituberculeux du complexe *tuberculosis*.

ABSTRACT

-Title: Interest of molecular biology in the diagnosis of tuberculosis

-Author: EL bouskouri khadija

-Rapporteur: Professor Said Zouhair

-Keywords: Tuberculosis - bacteriological diagnosis- molecular biology - resistance.

Tuberculosis is a contagious infectious disease notifiable. The causative pathogen is often the bacillus of Koch (BK) belonging to the *Mycobacterium tuberculosis* complex.

Tuberculosis is a major global public health problem because of its frequency and its morbidity and mortality: Numbers of TB in the world are impressive, with a third of the world population infected. In 2012, 8.6 million people developed tuberculosis and 1.3 million died. More than 95% of TB patients live in developing countries. Infection with HIV is both an individual factor of worsening and an extension of the disease factor epidemiologically. Furthermore, multidrug-resistant TB strains represent a serious public health problem, given the pandemic nature of their emergence.

Bacteriological diagnosis is mainly based on microscopic examination, culture and biochemical identification of acid-fast bacilli-(AFB).

In contrast, molecular biology tools have currently a prominent place in the detection, identification and study of drug resistance *tuberculosis* complex.

ملخص

عنوان: أهمية البيولوجيا الجزيئية في تشخيص السل

الكاتبة: اليوسكوري خديجة

المشرف: الأستاذ سعيد زهير

الكلمات الرئيسية: السل, التشخيص البكتريولوجي, البيولوجيا الجزيئية. مقاومة

السل مرض جرثومي معد يتوجب الإعلان عنه، غالبا ما تسببه عصية كوخ التي تنتمي إلى مركب المتفطرات السلوية.

يعتبر السل مشكلا صحيا عالميا كبيرا نظرا لانتشاره وارتفاع عدد الوفيات الناتجة عنه .

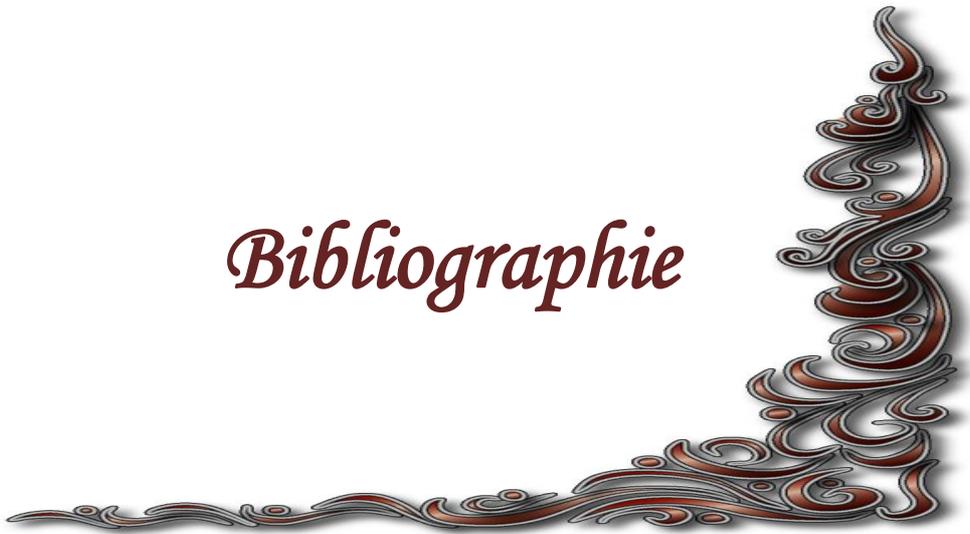
تثير أرقام السل العديد من المخاوف إذ أن حوالي ثلث سكان العالم مصاب بالمرض. في سنة 2012 أصيب 8.6 مليون شخص بالمرض في حين توفي بسببه 1.3 مليون. أكثر من 95% من المصابين بالسل ينحدرون من البلدان النامية.

تساهم الإصابة بداء فقدان المناعة المكتسبة في تفاقم المرض وتفشي الوباء. بالإضافة إلى أن ظهور سلالات متعددة المقاومة للعقاقير أصبح مشكلة خطيرة نظرا لطابع ظهورها الوبائي.

يستند التشخيص البكتريولوجي أساسا على الفحص المجهرى والزراعة وتحديد الطبيعة البيوكيميائية للعصيات المقاومة للأحماض.

في المقابل أصبحت الأدوات البيولوجية الجزيئية تحتل حاليا مكانا بارزا في الكشف وتحديد ودراسة سلالات المتفطرات السلوية المقاومة للعقاقير

Bibliographie



- 1 - OMS. Rapport 2013 sur la lutte contre la tuberculose dans le monde <http://www.who.int> consulté le 12.02.2014
- 2 - C. Martin . Bactériologie des mycobactéries responsables d'infection respiratoire. Elsevier Masson.2012; 1-17
- 3 - V.Vincent.Diagnostic bactériologique de la tuberculose. Revue Francophone Des Laboratoires Elsevier Masson.2013 ; 449 BIS :38-43.
- 4 - T. M. Shinnick . Mycobacterial taxonomy. European Journal of Clinical Microbiological Infections Diseases.1994;13: 884-901.
- 5 - V. Vincent. Taxonomie des mycobactéries. Revue française des laboratoires.1995; 273: 27-31.
- 6 - D. Bonard..What is the meaning of repeated isolation of Mycobacterium africanum? International Journal of Tuberculose Lung Disease.2000;4: 1176-1180
- 7 - L. M. O'Reilly.The epidemiology of Mycobacterium bovis infections in animals and man: a review. Tuberculose Lung Disease .1995;76 (1): 1-46.
- 8 - W. M. Prodinger. Infection of red deer, cattle, and humans with Mycobacterium bovis subsp. caprae in western Austria. Journal of Clinical Microbiologie.2002;40:2270-2272.
- 9 - D.van Soolingen.A novel pathogenic taxon of the Mycobacterium tuberculosis complex. Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa Int J Syst Bacteriol 1997; 47:1236-1245.
- 10 - J. L.Koeck. Emergence de cas de tuberculose dus à Mycobacterium tuberculosis subsp. canetti à Djibouti. Comptes Rendus de Séances. Séance de la Société de pathologie exotique. Communications libres du 16 février 2005. Institut Pasteur, Paris.
- 11 - F. Denis.Mycobactéries. Bactériologie Médicale.2011 ; 507-535
- 12 - R. M. Harshey. Rate of ribonucleic acid chain growth in Mycobacterium tuberculosis H37Rv. Journal of Bacteriological disease .1977;129: 616-622.

- 13 - J.P.Coulon.Tuberculose .EMC.Stomatologie, 2001;22: 10-14
- 14 - M. Daffé.Structure de l'enveloppe de Mycobacterium tuberculosis. Medecine des maladies infectieuses . 1996;26 :891-7.
- 15 - P.J. Brennan.The envelope of mycobacteria. Annu Rev Biochem.1995; 64 : 29-63
- 16 - M. Daffé. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. Adv Microbiol Physiol .1998; 39 : 131-203
- 17 - L. Kremer. Le lipoarabinomannane :structure et fonctions d'un glycolipide impliqué dans la pathogénie tuberculeuse. Medicine sciences .1999;15 : 842-50
- 18 - Bacterioweb.univ-fcomte.fr/bibliotheque/remic/19-Mycob.pdf
- 19 - S. T.Cole. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. Nature.1998; 393: 537-544.
- 20 - C.Demangel. Apports de la génomique de mycobactéries à la définition de nouvelles stratégies thérapeutiques et vaccinales anti-tuberculeuse. Revue francophones des laboratoires. 2006;381 :23-30.
- 21 - T. May.Aspects cliniques actuels de la tuberculose. EMC-Radiologie .2005 ;2 : 116–120
- 22 - D.Che. Epidémiologie de la tuberculose et politique de lute contre la tuberculose. EMC-Pneumologie.2013;6-019-A-32 1-11
- 23 - N.Valin.la tuberculose en France en 2010 : Epidémiologie clinique et microbiologique.Revue des maladies respiratoires .2012;29 ,267-276
- 24 - D. Che. Épidémiologie de la tuberculose en France en 2008. Médecine et maladies infectieuses.2011; 41,372–378
- 25 - Che D . Epidemiology of tuberculosis. Rev Prat.2012 ; 62(4):473-478
- 26 - H. Bezanahary .Intérêt du typage moléculaire pour l'épidémiologie de la tuberculose en Limousin (1998–2006) .Médecine et maladies infectieuses.2008 ; 38 : 309–317

- 27 - Plan national d'accélération de la réduction de l'incidence de la tuberculose 2013-2016 ; <http://ccm.tanmia.ma/plans/> Plan National de Lutte Anti Tuberculose 2013-2016.
- 28 - M. Adnaoui. Épidémiologie de la tuberculose dans les pays du Maghreb. La Revue de médecine interne .2009; 30S : S265–S267
- 29 - N. Akhdari. Tuberculose cutanée de l'enfant au Maroc : étude de 30 cas. Archives de pédiatrie.2006 ; 13 :1098–1101
- 30 - P Innes. La tuberculose bovine (Mycobacterium bovis). scientifique vétérinaire - épidémiologie/MAAARO. 2011
- 31 - R.Ghodbane.Non-human sources of Mycobacterium tuberculosis. Tuberculosis. 2013;93:589-595.
- 32 - G.Huchon. Tuberculose : infection et maladie. EMC-Pneumologie .2012; 9(4) 6-019-A. 33:1-22
- 33 - P.Tattevin.Tuberculose et santé de travail. Référence en santé au travail.2012;132 :15-31
- 34 - H. Bezanahary . Intérêt du typage moléculaire pour l'épidémiologie de la tuberculose en Limousin (1998–2006) .Médecine et maladies infectieuses.2008; 38 : 309–317
- 35 - T. May .Aspects cliniques actuels de la tuberculose. EMC-Radiologie .2005.2 : 116–120
- 36 - M.C. Dombret. Tuberculose pulmonaire de l'adulte. EMC-Médecine.2004 ; 1 :406–416
- 37 - L. Mbalaa. Validité du score de Keith Edwards dans le diagnostic de la tuberculose pulmonaire chez l'enfant. Archives de Pédiatrie.2014;21:13-19
- 38 - C. Billy.Aspects cliniques et thérapeutiques de la tuberculose chez l'enfant et l'adulte. EMC-Maladies Infectieuses.2004;1:81–98.

- 39 - A. Hamzaoui. La tuberculose de l'enfant. Rev Pneumol Clin. 2014.
- 40 - C. Delacourt. Facteurs de risque de tuberculose chez l'enfant. Archives de pédiatrie.2005; 12 :S80-S82
- 41 - L. El Harim Roudies. Aspects de la tuberculose de l'enfant à propos de 465 cas. Maroc Médical.2007;29 :1-14.
- 42 - 42- P. Fraisse .Evaluation de la prise en charge en pneumologie : tuberculose. Rev Mal Respir.2006 ; 23 : 643-59
- 43 - A. Abardazzou. La tuberculose chez les patients infectés par le VIH et suivis au CHU Mohammed VI de Marrakech entre 2007 et 2012. 2013. Th. Méd : Marrakech, Faculté de Médecine et de Pharmacie.2013 ; 79.
- 44 - E.W.P.Yone.Impact de l'évolution de la tuberculose de l'adulte à Yaoundé,Caméroun.Revue de pneumologie clinique, 2012 ;68 :338-344 .
- 45 - B.Amara.Attitude et connaissance des pneumo-Phtisiologue marocains vis-à-vis du tabagique chez leurs patients tuberculeux.Rev mal respir.2008 ; 25 :569-575
- 46 - M.Underner.Tabac et tuberculose. Presse Med.2012; 41: 1171–1180
- 47 - P. Peyron.Foamy macrophages from tuberculous patients' granulomas constitute a nutrient-rich reservoir for M. tuberculosis persistence. PLoS Pathog.2008; 4: e1000204.
- 48 - S. H.Kaufmann .Protection against tuberculosis: cytokines, T cells, and macrophages. Ann Rheum Dis.2002;61 (2): 54-58
- 49 - Item ECN.PILLY.www.editions-médicales.com.Copyright 2014.Alinea plus-CMIL
- 50 - J. Mazza-Staldera .La tuberculose extrapulmonaire. Revue des Maladies Respiratoires. 2012 ;29 :566—578
- 51 - A.Dinh.Aspect cliniques et thérapeutique de la tuberculose chez l'adulte et l'enfant.EMC-Maladies infectieuses .2013;10(4) :1-11

- 52 - Histoire naturelle de la tuberculose
<http://www.respir.com/doc/abonne/pathologie/tuberculose/TuberculosePhysiopath1.asp>
- 53 - 53-Radiographie du thorax d'un patient avec une tuberculose pulmonaire avancée
<https://www.google.co.ma/search newwindow =Radiographie>
- 54 - N.O. Touré . Miliaire tuberculeuse : à propos de 49 cas. Revue des Maladies Respiratoires .2011 ; 28 :312-316
- 55 - S.Bouchik.Durée de traitement des tuberculoses extapulmonaires :Six mois ou plus ?Analyse de la base de données TB-Info.Medecine interne .2012; 33 :665-671.
- 56 - P.Tattevin .Traitement de la tuberculose en 2007.Médecine et maladie infectieuse. 2007;37 :617-628.
- 57 - I. Abubakar. Drug-resistant tuberculosis: time for visionary political Leadership. Lancet Infect Dis.2013;13: 529–39
- 58 - S. Greffe .Prise en charge de la tuberculose multirésistante dans trois hôpitaux français. Médecine et maladies infectieuses.2011 ; 41 :20–24
- 59 - P. Fraisse. Evaluation de la prise en charge en pneumologie : tuberculose. Rev Mal Respir.2006; 23 : 643-59
- 60 - S. Belamalem .Les réactions locales liées au vaccin BCG. European Scientific Journal edition. 2013;(9) : 1857 – 7881 .1857- 7431
- 61 - P.BEGUE. La tuberculose en France : Comment arrêter l'épidémie actuelle ?Med mal infect .1995;25 :454-78.
- 62 - C. Truffot-Pernot .Les tests bactériologiques de la tuberculose maladie : standards et perspectives.Revue des maladies respiratoire .2011 ;28 :1034-1047.
- 63 - J. Guigay. Quels sont les nouveaux outils diagnostiques de la tuberculose ? Quel est leur intérêt pour la prise en charge du malade et quelles sont leurs indications ? Rev Mal Respir. 2004 ;21 : 3S44-3S50

- 64 - M. Bonnet. Les nouveaux tests diagnostiques de la tuberculose maladie : de la théorie à la pratique dans les pays du Sud. *Revue des maladies respiratoire*.2011 ;28 :1310-1320
- 65 - J. Maugein. Diagnostic microbiologique de la tuberculose et intérêt de la PCR. *Médecine et maladies infectieuses* .2003 ; 33 :153s–158s.
- 66 - C. Collet. Tuberculose et diagnostic rapide : avancées ou échecs ? *Immuno-analyse & Biologie spécialisée*. 2003; 18 : 283–288.
- 67 - V. Martinez .Techniques diagnostique de la tuberculose et des autres mycobactérioses. *Archives de pédiatrie*.2005;12 :S96-S101.
- 68 - A. Gravet. La culture et l'antibiogramme de mycobactéries sur automate VersaTREK .*Pathologie biologie*.2011;59 : 32-38
- 69 - C. Truffot-Pernot. Diagnostic moderne de la tuberculose. *Presse Med*.2006; 35: 1737–1744
- 70 - 70- N. Benfenatki. La Tuberculose multirésistante. *La Revue de médecine Interne*.2009 ; 30S :S268–S272
- 71 - M. Fréchet-Jachym. Tuberculose résistante. *EMC, Pneumologie*.2009; 6-019-A-35
- 72 - J.-P. Zellweger. La tuberculose multirésistante : extension, menace et solutions .*Revue des maladies respiratoires*.2011;28 :1025-1033.
- 73 - I. Abubakar. Drug-resistant tuberculosis: time for visionary political Leadership. *Lancet Infect Dis*.2013;13: 529–39
- 74 - N. Veziris. Résistance aux antituberculeux. *Archives de pédiatrie*.2005;12 :S102-S109.
- 75 - E. Cambau. Résistance aux antituberculeux. *Antibiotiques*.2003 ;5 :29-37
- 76 - <http://web.uct.ac.za/depts/mmi/lsteyn/cellwall.html>

- 77 - J. Maugein .La résistance aux antituberculeux. revue francophone des laboratoires.mai 2010.;422 :43-50
- 78 - S. Faure. Antituberculeux.Actualité pharmaceutique.2009;484 :45-48
- 79 - V. Mathys. La PCR en temps réel : principe et application en infectiologie. Antibiotiques 2007; 9 : 205-211
- 80 - V. Drouillon . Identification rapide de Mycobacterium tuberculosis complex dans les échantillons respiratoires par amplification d'ARN en temps réel. Pathologie Biologie.2006; 54 :518–522
- 81 - F. Garnier . Biologie moléculaire : application,à la détection, à l'identification et au génotypage. Bactériologie médicales ;chapitre 4 :43-63.
- 82 - B. Ninet. Nouveaux tests pour le diagnostic de la tuberculose. Revue des maladie respiratoires.2011;28:823-833.
- 83 - Mario Raviglione .Scaling up interventions to achieve global tuberculosis control: progress and new developments. The lancet 25 May 2012.2012 ; 379 : 1902–1913
- 84 - F.-X.Blan.Tuberculose :le réveil d'une belle endormie.Revue des maladies respiratoires actualité.2011 ;3 :520-525.
- 85 - F.- X. Blanc.Tuberculose : quelques certitudes et encore beaucoup d'inconnues. Revue des Maladies Respiratoires Actualités . 2012 ; 4 : 419-424
- 86 - M. L'Hadj.Les nouveaux tests de diagnostic de la tuberculose. Rev Mal Respir.2006; 23 : 10S85-10S87
- 87 - S. Trombert-Paolantoni. Apport de la détection des mycobactéries du complexe tuberculosis par PCR dans des prélèvements pulmonaires et extrapulmonaires. Pathologie Biologie.2006 ; 54 : 488–492
- 88 - A. Kerleguer.Apport de la biologie moléculaire au diagnostic de la tuberculose. Revue Française des Laboratoires.2002; 343:67-70.

- 89 - S. Trombert-Paolantoni. Comparaison de deux techniques d'hybridation moléculaire dans l'identification de mycobactéries en pratique courante. *Pathologie Biologie* .2004; 52 :462–468.
- 90 - F.Jaureguy.Place de la spoligotypage lors d'une enquête épidémiologique devant un cas de suspicion de tuberculose pulmonaire nosocomiale. *Pathologie biologie*, 2005;53 :481-481.
- 91 - V. Vincent. Apport épidémiologique du typage moléculaire des bacilles de la tuberculose. *Médecine et maladies infectieuses*.2003 ; 33 :159s–166s
- 92 - J D. van Embden .Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology., *J. Clin. Microbiol.* 1993;31(2):406.
- 93 - C.Sola .Epidémiologie moléculaire de la tuberculose dans l'agglomération angevine étudiée par 3 stratégie d'association de 3 méthode de génotypage par PCR.*Pathologie biologie* .2003;51 :13-20.
- 94 - G. Marcadé.Tests de diagnostic rapide en bactériologie. *Immuno-analyse et Biologie Spécialisée*. 2013;28 : Pages 167–173.
- 95 - W. Sougakatt.Diagnostic moléculaire de la resistance de *mycobacterium tuberculosis* aux antituberculeux. *Rev Française des Laboratoires*.1999;314 :25-28
- 96 - M. Fabre.Performances du kit MTBDRplus dans le cadre de la surveillance de la résistance à la rifampicine chez *Mycobacterium tuberculosis*. *Pathologie Biologie*. 2011 ; 59 : 94–96.
- 97 - Z. Allegui .Detection of isoniazid and rifampin resistance of *Mycobacterium tuberculosis* by a multiplex allele-specific polymerase chain reaction (PCR) assay. *International Journal of Mycobacteriology*.2012;QA 1:34 –39

Serment de Galien

Je jure en présence des maîtres de cette faculté :

- *D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- *D'exercer ma profession avec conscience, dans l'intérêt de la santé public, sans jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humain.*
- *D'être fidèle dans l'exercice de la pharmacie à la législation en vigueur, aux règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- *De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession, de ne jamais consentir à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.*
- *Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses, que je sois méprisé de mes confrères si je manquais à mes engagements.*

قسم الصيدلي

بسم الله الرحمن الرحيم

أقسم بالله العظيم

- ◀ أن أراقب الله في مهنتي
- ◀ أن أبجل أساتذتي الذين تعلمت على أيديهم مبادئ مهنتي وأعترف لهم بالجميل وأبقى دوماً وفيًا لتعاليمهم.
- ◀ أن أزاوّل مهنتي بوازع من ضميري لما فيه صالح الصحة العمومية، وأن لا أقصر أبداً في مسؤوليتي وواجباتي تجاه المريض وكرامته الإنسانية.
- ◀ أن ألتزم أثناء ممارستي للصيدلة بالقوانين المعمول بها وبأدب السلوك والشرف، وكذا بالاستقامة والترفع.
- ◀ أن لا أفشي الأسرار التي قد تعهد إلى أو التي قد أطلع عليها أثناء القيام بمهامي، وأن لا أوافق على استعمال معلوماتي لإفساد الأخلاق أو تشجيع الأعمال الإجرامية.
- ◀ لأحضى بتقدير الناس إن أنا تقيدت بعهودي، أو أحتقر من طرف زملائي إن أنا لم أف بالالتزاماتي.

"والله على ما أقول شهيد"

جامعة محمد الخامس – السويسي
كلية الطب والصيدلة بالرباط

أطروحة رقم: 54

سنة : 2014

أهمية البيولوجيا الجزيئية في تشخيص السل

أطروحة

قدمت ونوقشت علانية يوم :

من طرفه

الآنسة: خديجة البوسكوري

المرددة في: 01 أبريل 1988 بأزيلال

لنيل شهادة الدكتوراه في الصيدلة

الكلمات الأساسية: السل – البيولوجيا الجزيئية – التشخيص البكتريولوجي – مقاومة.

تحت إشراف اللجنة المكونة من الأساتذة

رئيس

السيد: عبد القادر بلمكي

أستاذ في علم الدم

مشرف

السيد: سعيد زهير

أستاذ في علم الأحياء الدقيقة

أعضاء

السيد: ياسين سخسوخ

أستاذ في علم الأحياء الدقيقة

السيدة: لياء أرسلان

أستاذة مبرزة في علم الأحياء الدقيقة

السيدة: حكيمه قياح

أستاذة مبرزة في علم الأحياء الدقيقة