

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

ANNEE: 2018

THESE N °:146

L'APPORT DES TECHNIQUES DE LA BIOLOGIE
MOLECULAIRE EN MATIERE DU DIAGNOSTIC,
D'EVALUATION DE LA RESISTANCE AUX
ANTIBACILLAIRES ET D'ETUDE DES MARQUEURS
EPIDEMIOLOGIQUES

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement le :.../... / 2018

PAR

Mlle OUSGUINE Asmae

Née le 15 Janvier 1992 à Salé

Pour l'Obtention du doctorat en médecine

**Mots-clés: Tuberculose – biologie moléculaire – diagnostic – Résistance -
Marqueur épidémiologique.**

JURY :

Pr A. GAOUZI

Professeur de Pédiatrie

PRÉSIDENT

Pr M. ZOUHDI

Professeur de Microbiologie

RAPPORTEUR

Pr M. CHADLI

Professeur de Microbiologie

Pr S. EL HAMZAOUI

Professeur de Microbiologie

Pr Y. SEKHSOKH

Professeur de Microbiologie

JUGES

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



**UNIVERSITE MOHAMMED V DE RABAT
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. Mohamed KARRA

**1- ENSEIGNANTS-CHERCHEURS MEDECINS
ET
PHARMACIENS**

PROFESSEURS :

Décembre 1984

Pr. MAAOUNI Abdelaziz	Médecine Interne – <u>Clinique Royale</u>
Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajdi	Anesthésie -Réanimation
Pr. SETTAF Abdellatif	pathologie Chirurgicale

Novembre et Décembre 1985

Pr. BENSAID Younes	Pathologie Chirurgicale
--------------------	-------------------------

Janvier, Février et Décembre 1987

Pr. CHAHED OUZZANI Houria	Gastro-Entérologie
Pr. LACHKAR Hassan	Médecine Interne
Pr. YAHYAOUY Mohamed	Neurologie

Décembre 1988

Pr. BENHAMAMOUCH Mohamed Najib	Chirurgie Pédiatrique
Pr. DAFIRI Rachida	Radiologie

Décembre 1989

Pr. ADNABOU Mohamed
Pr. CHAD Bouziane
Pr. OUAZZANI Taïbi Mohamed Réda

Janvier et Novembre 1990

Pr. CHKOFF Rachid
Pr. HACHIM Mohammed*
Pr. KHARBACH Aïcha
Pr. MANSOURI Fatima
Pr. TAZI Saoud Anas

Février Avril Juillet et Décembre 1991

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

Décembre 1992

Pr. AHALLAT Mohamed
Pr. BENSOUDA Adil
Pr. BOUJIDA Mohamed Najib
Pr. CHAHED OUAZZANI Laaziza
Pr. CHRAIBI Chafiq
Pr. DEHAYNI Mohamed*
Pr. EL OUAHABI Abdessamad
Pr. FELLAT Rokaya
Pr. GHAFIR Driss*
Pr. JIDDANE Mohamed
Pr. TAGHY Ahmed
Pr. ZOUHDI Mimoun

Mars 1994

Pr. BENJAAFAR Nouredine
Pr. BEN RAIS Nozha
Pr. CAOUI Malika

Médecine Interne – **Doyen de la FMPR**
Pathologie Chirurgicale
Neurologie

Pathologie Chirurgicale
Médecine-Interne
Gynécologie -Obstétrique
Anatomie-Pathologie
Anesthésie Réanimation



Anatomie-Pathologique
Anesthésie Réanimation – **Doyen de la FMPO**
Néphrologie
Chirurgie Générale
Chirurgie Générale
Pharmacie galénique
Ophtalmologie
Gynécologie Obstétrique
Biochimie et Chimie
Pharmacologie
Histologie Embryologie
Pédiatrie
Pharmacologie – **Dir. du Centre National PV**
Chimie thérapeutique **V.D à la pharmacie+Dir du CEDOC**

Chirurgie Générale V.D Aff. Acad. et Estud
Anesthésie Réanimation
Radiologie
Gastro-Entérologie
Gynécologie Obstétrique
Gynécologie Obstétrique
Neurochirurgie
Cardiologie
Médecine Interne
Anatomie
Chirurgie Générale
Microbiologie

Radiothérapie
Biophysique
Biophysique

Pr. CHRAIBI Abdelmjid

Pr. EL AMRANI Sabah
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. RHRAB Brahim
Pr. SENOUCI Karima

Mars 1994

Pr. ABBAR Mohamed*
Pr. ABDELHAK M'barek
Pr. BELAIDI Halima
Pr. BENTAHILA Abdelali
Pr. BENYAHIA Mohammed Ali
Pr. BERRADA Mohamed Saleh
Pr. CHAMI Ilham
Pr. CHERKAOUI LallaOuafae
Pr. JALIL Abdelouahed
Pr. LAKHDAR Amina
Pr. MOUANE Nezha

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*
Anesthésie Réanimation
Pr. EL MESNAOUI Abbes
Pr. ESSAKALI HOUSSYNI Leila
Pr. HDA Abdelhamid*
Pr. IBEN ATTYA ANDALOUSSI Ahmed
Pr. OUAZZANI CHAHDI Bahia
Pr. SEFIANI Abdelaziz

Endocrinologie et Maladies Métaboliques
Doyen de la FMPA

Gynécologie Obstétrique
Traumato-Orthopédie
Radiologie
Chirurgie Générale- **Directeur CHIS**
Immunologie
Chirurgie Pédiatrique
Médecine Interne
Dermatologie
Chirurgie Générale
Anatomie Pathologique
Traumatologie – Orthopédie
Gynécologie –Obstétrique
Dermatologie

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



Réanimation Médicale
Chirurgie Générale
Gynécologie Obstétrique
Gynécologie Obstétrique
Médecine Interne
Anesthésie Réanimation

Chirurgie Générale
Oto-Rhino-Laryngologie
Cardiologie - **Directeur HMI Med V**
Urologie
Ophtalmologie
Génétique

Pr. ZEGGWAGH Amine Ali

Réanimation Médicale

Décembre 1996

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

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

Novembre 1997

Pr. ALAMI Mohamed Hassan
Pr. BEN SLIMANE Lounis
Pr. BIROUK Nazha
Pr. ERREIMI Naima
Pr. FELLAT Nadia
Pr. HAIMEUR Charki*
Pr. KADDOURI Nouredine
Pr. KOUTANI Abdellatif
Pr. LAHLOU Mohamed Khalid
Pr. MAHRAOUI CHAFIQ
Pr. TAOUFIQ Jallal
Pr. YOUSFI MALKI Mounia

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



Novembre 1998

Pr. AFIFI RAJAA
Pr. BENOMAR ALI
Pr. BOUGTAB Abdesslam
Pr. ER RIHANI Hassan
Pr. BENKIRANE Majid*
Pr. KHATOURI ALI*

Gastro-Entérologie
Neurologie – **Doyen de la FMP Abulcassis**
Chirurgie Générale
Oncologie Médicale
Hématologie
Cardiologie

Janvier 2000

Pr. ABID Ahmed*
Pr. AIT OUMAR Hassan
Pr. BENJELLOUN DakhamaBadr.Sououd
Pr. BOURKADI Jamal-Eddine
Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Al Montacer
Pr. ECHARRAB El Mahjoub
Pr. EL FTOUH Mustapha
Pr. EL MOSTARCHID Brahim*
Pr. ISMAILI Hassane*

Pneumophtisiologie
Pédiatrie
Pédiatrie
Pneumo-phtisiologie
Chirurgie Générale
Chirurgie Générale
Pneumo-phtisiologie
Neurochirurgie
Traumatologie Orthopédie- **Dir. Hop. Av. Marr.**

Pr. MAHMOUDI Abdelkrim*
Pr. TACHINANTE Rajae
Pr. TAZI MEZALEK Zoubida

Novembre 2000

Pr. AIDI Saadia
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. MAHASSINI Najat
Pr. MDAGHRI ALAOUI Asmae
Pr. ROUIMI Abdelhadi*

Décembre 2000

Pr. ZOHAIR ABDELAH*

Décembre 2001

Pr. BALKHI Hicham*
Pr. BENABDELJLIL Maria
Pr. BENAMAR Loubna
Pr. BENAMOR Jouda
Pr. BENELBARHDADI Imane
Pr. BENNANI Rajae
Pr. BENOUACHANE Thami
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 OUNANI Mohamed
Pr. ETTAIR Said
Pr. GAZZAZ Miloudi*
Pr. HRORA Abdelmalek
Pr. KABBAJ Saad
Pr. KABIRI EL Hassane*
Pr. LAMRANI Moulay Omar

Anesthésie-Réanimation **Inspecteur du SSM**
Anesthésie-Réanimation
Médecine Interne

Neurologie
Gastro-Entérologie
Chirurgie Générale
Cardiologie
Anesthésie-Réanimation
Pédiatrie **Directeur Hop: ChekikhZaied**
Urologie
Rhumatologie
Endocrinologie et Maladies Métaboliques
Anatomie Pathologique
Pédiatrie
Neurologie



ORL

Anesthésie-Réanimation
Neurologie
Néphrologie
Pneumo-phtisiologie
Gastro-Entérologie
Cardiologie
Pédiatrie
Rhumatologie
Anatomie
Radiologie
Radiologie
Chirurgie Générale
Radiologie
Anesthésie-Réanimation
Neuro-Chirurgie
Chirurgie-Pédiatrique
Chirurgie Générale
Pédiatrie **Directeur. Hop.d'Enfants**
Neuro-Chirurgie
Chirurgie Générale
Anesthésie-Réanimation
Chirurgie Thoracique
Traumatologie Orthopédie

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

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 HAOURI Mohamed *
 Pr. FILALI ADIB Abdelhai
 Pr. HAJJI Zakia
 Pr. IKEN Ali
 Pr. JAAFAR Abdeloihab*
 Pr. KRIOUILE Yamina
 Pr. LAGHMARI Mina
 Pr. MABROUK Hfid*
 Pr. MOUSSAOUI RAHALI Driss*
 Pr. OUJILAL Abdelilah
 Pr. RACHID Khalid *
 Pr. RAISS Mohamed
 Pr. RGUIBI IDRISSE Sidi Mustapha*
 Pr. RHOUE Hakima
 Pr. SIAH Samir *
 Pr. THIMOU Amal
 Pr. ZENTAR Aziz*

Chirurgie Vasculaire Périphérique
 Médecine Interne
 Chirurgie Générale
 Hématologie Clinique
 Chirurgie Générale
 Urologie **Directeur Hôpital Ibn Sina**
 Chirurgie Générale
 Chirurgie Vasculaire Périphérique
 Pédiatrie

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



Janvier 2004

Pr. ABDELLAH El Hassan
Pr. AMRANI Mariam
Pr. BENBOUZID Mohammed Anas
Pr. BENKIRANE Ahmed*
Pr. BOUGHALEM Mohamed*
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. KHARMAZ Mohamed
Pr. MOUGHIL Said
Pr. OUBAAZ Abdelbarre*
Pr. TARIB Abdelilah*
Pr. TIJAMI Fouad
Pr. ZARZUR Jamila

Ophtalmologie
Anatomie Pathologique
Oto-Rhino-Laryngologie
Gastro-Entérologie
Anesthésie Réanimation
Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
Neurologie
Traumatologie Orthopédie
Anatomie Pathologique
Radiologie
Gynécologie Obstétrique
Pédiatrie
Cardiologie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Traumatologie Orthopédie
Chirurgie Cardio-Vasculaire
Ophtalmologie
Pharmacie Clinique
Chirurgie Générale
Cardiologie



Janvier 2005

Pr. ABBASSI Abdellah
Pr. AL KANDRY Sif Eddine*
Pr. ALLALI Fadoua
Pr. AMAZOUZI Abdellah
Pr. AZIZ Nouredine*
Pr. BAHIRI Rachid
Pr. BARKAT Amina
Pr. BENYASS Aatif
Pr. BERNOUSSI Abdelghani
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

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

Décembre 2005

Pr. CHANI Mohamed

Anesthésie Réanimation

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. FELLAT Ibtissam
Pr. FAROUDY Mamoun
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

Rhumatologie
Radiologie
Hématologie
O.R.L
Biophysique
Chirurgie - Pédiatrique
Chirurgie Cardio – Vasculaire
Gynécologie Obstétrique
Cardiologie
Cardiologie
Anesthésie Réanimation
Médecine Interne
Anesthésie Réanimation
Microbiologie
Radiologie
Urologie
Pédiatrie
Psychiatrie
Chirurgie – Pédiatrique
Pharmacie Galénique
Parasitologie
Radiothérapie
Psychiatrie
Endocrinologie
Psychiatrie
Pneumo – Phtisiologie
Biochimie
Pneumo – Phtisiologie



Octobre 2007

Pr. ABIDI Khalid
Pr. ACHACHI Leila
Pr. ACHOUR Abdessamad*
Pr. AIT HOUSSA Mahdi*
Pr. AMHAJJI Larbi*
Pr. AOUI Sarra
Pr. BAITE Abdelouahed*
Pr. BALOUCH Lhousaine*
Pr. BENZIANE Hamid*
Pr. BOUTIMZINE Nourdine
Pr. CHARKAOUI Naoual*

Réanimation médicale
Pneumo phtisiologie
Chirurgie générale
Chirurgie cardio vasculaire
Traumatologie orthopédie
Parasitologie
Anesthésie réanimation **Directeur ERSM**
Biochimie-chimie
Pharmacie clinique
Ophtalmologie
Pharmacie galénique

Pr. EHIRCHIOU Abdelkader*
 Pr. ELABSI Mohamed
 Pr. EL MOUSSAOUI Rachid
 Pr. EL OMARI Fatima
 Pr. GHARIB Noureddine
 Pr. HADADI Khalid*
 Pr. ICHOU Mohamed*
 Pr. ISMAILI Nadia
 Pr. KEBDANI Tayeb
 Pr. LALAOU SALIM Jaafar*
 Pr. LOUZI Lhoussain*
 Pr. MADANI Naoufel
 Pr. MAHI Mohamed*
 Pr. MARC Karima
 Pr. MASRAR Azlarab
 Pr. MRABET Mustapha*
 Pr. MRANI Saad*
 Pr. OUZZIF Ezzohra*
 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*
 Pr. AIT BENHADDOU El hachmia
 Pr. AKHADDAR Ali*
 Pr. ALLALI Nazik
 Pr. AMINE Bouchra
 Pr. ARKHA Yassir

Chirurgie générale
 Chirurgie générale
 Anesthésie réanimation
 Psychiatrie
 Chirurgie plastique et réparatrice
 Radiothérapie
 Oncologie médicale
 Dermatologie
 Radiothérapie
 Anesthésie réanimation
 Microbiologie
 Réanimation médicale
 Radiologie
 Pneumo phtisiologie
 Hématologique
 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
 Neurologie
 Neuro-chirurgie
 Radiologie
 Rhumatologie
 Neuro-chirurgie



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. KARBOUBI Lamya
 Pr. L'KASSIMIHachemi*
 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 *

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*
 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. MOSADIK Ahlam

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
 Pédiatrie
 Microbiologie **Directeur Hôpital My Ismail**
 Chimie Thérapeutique
 Chirurgie Cardio-vasculaire
 Pédiatrie
 Hématologie biologique
 Chirurgie Générale
 Radiologie
 Cardiologie
 Pneumo-phtisiologie



Anesthésie réanimation
 Médecine interne
 Physiologie
 ORL
 Microbiologie
 Médecine aéronautique
 Biochimie chimie
 Radiologie
 Chirurgie pédiatrique
 Pédiatrie
 Radiologie
 Chirurgie plastique et réparatrice
 Urologie
 Gastro entérologie
 Anatomie pathologique
 Anesthésie Réanimation

Pr. MOUJAHID Mountassir*
Pr. NAZIH Mouna*
Pr. ZOUAIDIA Fouad

Chirurgie générale
Hématologie
Anatomie pathologique

Mai 2012

Pr. AMRANI Abdelouahed
Pr. ABOUELALAA Khalil*
Pr. BELAIZI Mohamed*
Pr. BENCHEBBA Driss*
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*

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



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. BENSGHIR 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
Pr. EL GUERROUJ Hasnae
Pr. EL HARTI Jaouad
Pr. EL JOUDI Rachid*

Pharmacologie – Chimie
Toxicologie
Gastro-Entérologie
Anesthésie Réanimation
Anesthésie Réanimation
Réanimation Médicale
Anesthésie Réanimation
Biochimie-Chimie
Hématologie
Informatique Pharmaceutique0.
Anesthésie Réanimation
Néphrologie
Chimie Analytique
Traumatologie Orthopédie
Anatomie
Cardiologie
Réanimation Médicale
Pédiatrie
Anesthésie Réanimation
Radiologie
Neuro-Chirurgie
Médecine Nucléaire
Chimie Thérapeutique
Toxicologie

Pr. EL KABABRI Maria
 Pr. EL KHANNOUSSI Basma
 Pr. EL KHLOUFI Samir
 Pr. EL KORAICHI Alae
 Pr. EN-NOUALI Hassane*
 Pr. ERRGUIG Laila
 Pr. FIKRI Meryim
 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*

Pédiatrie
 Anatomie Pathologie
 Anatomie
 Anesthésie Réanimation
 Radiologie
 Physiologie
 Radiologie
 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



Avril 2013

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

Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
 Urologie
 Médecine Interne

****Enseignants Militaires***

MARS 2014

ACHIR ABDELLAH
BENCHAKROUN MOHAMMED
BOUCHIKH MOHAMMED
EL KABBAJ DRISS
EL MACHTANI IDRISSE SAMIRA
HARDIZI HOUYAM
HASSANI AMALE
HERRAK LAILA
JANANE ABDELLA TIF
JEAIDI ANASS
KOUACH JAOUAD
LEMNOUER ABDELHAY
MAKRAM SANAA
OULAHYANE RACHID
RHISSASSI MOHAMED JMFAR
SABRY MOHAMED
SEKKACH YOUSSEF
TAZL MOUKBA. :LA.KLA.

****Enseignants Militaires***

DECEMBRE 2014

ABILKACEM RACHID'
AIT BOUGHIMA FADILA
BEKKALI HICHAM
BENAZZOU SALMA
BOUABDELLAH MOUNYA
BOUCHRIK MOURAD
DERRAJI SOUFIANE
DOBLALI TAOUFIK
EL AYOUBI EL IDRISSE ALI
EL GHADBANE ABDEDAIM HATIM
EL MARJANY MOHAMMED
FEJJAL NAWFAL
JAHIDI MOHAMED
LAKHAL ZOUHAIR
OUDGHIRI NEZHA
Rami Mohamed
SABIR MARIA
SBAI IDRISSE KARIM

****Enseignants Militaires***

Chirurgie Thoracique
Traumatologie- Orthopédie
Chirurgie Thoracique
Néphrologie
Biochimie-Chimie
Histologie- Embryologie-Cytogénétique
Pédiatrie
Pneumologie
Urologie
Hématologie Biologique
Génécologie-Obstétrique
Microbiologie
Pharmacologie
Chirurgie Pédiatrique
CCV
Cardiologie
Médecine Interne
Génécologie-Obstétrique



Pédiatrie
Médecine Légale
Anesthésie-Réanimation
Chirurgie Maxillo-Faciale
Biochimie-Chimie
Parasitologie
Pharmacie Clinique
Microbiologie
Anatomie
Anesthésie-Réanimation
Radiothérapie
Chirurgie Réparatrice et Plastique
O.R.L
Cardiologie
Anesthésie-Réanimation
Chirurgie Pédiatrique
Psychiatrie
Médecine préventive, santé publique et Hyg.

AOUT 2015

Meziane meryem
Tahrilatifa

Dermatologie
Rhumatologie

JANVIER 2016

BENKABBOU AMINE
EL ASRI FOUAD
ERRAMI NOUREDDINE
NITASSI SOPHIA

Chirurgie Générale
Ophtalmologie
O.R.L
O.R.L

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 LallaChadia
Pr. DAKKA Taoufiq
Pr. DRAOUI Mustapha
Pr. EL GUESSABI Lahcen
Pr. ETTAIB Abdelkader
Pr. FAOUZI Moulay El Abbes
Pr. HAMZAOU Laila
Pr. HMAMOUCHE Mohamed
Pr. IBRAHIMI Azeddine
Pr. KHANFRI Jamal Eddine
Pr. OULAD BOUYAHYA IDRIS Med
Pr. REDHA Ahlam
Pr. TOUATI Driss
Pr. ZAHIDI Ahmed
Pr. ZELLOU Amina

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



*Mise à jour le 14/12/2016 par le
Service des Ressources Humain*

Dédicaces

*Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la
reconnaissance....*

Aussi, c'est tout simplement que :

Je dédie cette thèse à ...

A ALLAH

Le tout miséricordieux,

Le très miséricordieux,

Le tout puissant,

Qui m'a inspiré,

Qui ma guidé sur le droit chemin,

Je vous dois ce que je suis devenue,

Soumission, louanges et remerciements,

Pour votre clémence et miséricorde

A mes chers Parents OUSGUINE Abdellah et KAOUKAB Malika

Merci pour votre amour, pour tout l'enseignement que vous m'avez transmis, pour avoir toujours cru en moi et m'avoir toujours soutenu, pour vos sacrifices, pour l'encouragement sans limites que vous ne cessez de m'offrir, pour votre soutien dans les moments difficiles, pour votre courage et patience...

Vos prières n'ont jamais cessé et si je suis à cette étape de la vie c'est grâce à vos encouragements et vos paroles de soutien.

Les mots seuls ne pourraient exprimer tout mon amour ni mon estime pour vous. Ce travail est le vôtre.

Aucune dédicace ne saurait exprimer ni la profondeur de mes sentiments ni l'amplitude de ma reconnaissance

Puisse dieu le tout puissant vous combler de bonne santé et vous accorder longue vie pleine de bonheur et prospérité.

Je vous aime mes très chers parents.

A mes très chère frères et sœurs Said, Kaoutar, Abdelhaq, Hajar et Youssef

Les mots ne sauraient exprimer l'étendue de l'affection que j'ai pour vous et surtout ma gratitude. Vous avez toujours été des amis fidèles et des confidents.

Vos grands cœurs, vos qualités humaines, vos ambitions m'ont toujours impressionnés et m'ont permis à mon tour de me surpasser.

Vous m'avez soutenu dans les différentes étapes de ma vie et de mes études. Mon amour pour vous est si profond.

A mon cher oncle OUSGUINE Mohammed

Je te remercie pour tous tes conseils, ton soutien, ton amitié et ton bonne humeur. J'espère que ce travail sera le témoignage de mon amour et mon respect

A tous mes oncles et à toutes mes tantes

Malgré la distance nous resterons toujours liés par des liens forts d'amour, merci pour le soutien à tout moment.

A la mémoire de feu mes grands-parents

J'aurais tant aimé que vous soyez présents. Que Dieu ait vos âmes dans sa sainte miséricorde

À mes chères amies : Aicha, Boutayna, Hanane, Imane, Oumaima ...

*Veillez trouver dans ce travail l'expression de mon respect le plus
profond et mon affection la plus sincère.*

À toutes les personnes qui ont participé à l'élaboration de ce travail

*À tous ceux ou celles qui me sont chers et que j'ai omis
involontairement de citer.*

REMERCIEMENTS

A notre maître et président de thèse
Monsieur le professeur GAOUZI Ahmed
Professeur de Pédiatrie

Vous avez bien voulu nous faire honneur en acceptant de présider le
Jury de cette thèse.

Vos qualités humaines et professionnelles sont pour nous un exemple à
suivre.

Soyez assuré de notre vive reconnaissance et de notre profond respect

A notre maître et rapporteur de thèse
Monsieur le Professeur Mimoun ZOUMDI
Professeur de Microbiologie

*Vous avez bien voulu nous confier ce travail riche d'intérêt et nous
guider à chaque étape de sa réalisation.*

*Vous nous avez toujours réservé le meilleur accueil, malgré vos
obligations professionnelles.*

*Vos encouragements inlassables, votre amabilité, votre gentillesse
méritent toute admiration.*

*Nous saisissons cette occasion pour vous exprimer notre profonde
gratitude tout en vous témoignant notre respect.*

À notre maître et juge de thèse

Madame le Professeur Mariama CHADLI

Professeur de Microbiologie

Nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce travail. Veuillez accepter, maître, l'expression de notre profond respect et de notre reconnaissance.

À Notre Maître et Juge de thèse

Madame le Professeur Sakina EL HAMZAOUI

Professeur de Microbiologie

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

*Votre modestie, votre sérieux et votre compétence professionnelle seront
pour nous un exemple dans l'exercice de notre profession.*

*Permettez-nous de vous présenter dans ce travail, le témoignage de
notre grand respect.*

À notre maître et juge de thèse
Monsieur le Professeur Yassine SEKHSOKH
Professeur de Microbiologie

*Nous sommes infiniment sensibles à l'honneur que vous nous faites de
siéger parmi notre jury de thèse.*

*Nous portons une grande considération tant pour votre extrême
gentillesse que pour vos qualités professionnelles.*

*Veillez trouver ici, cher Maître, l'expression de notre profond respect
et de notre sincère reconnaissance.*

*Je n'oublie pas de remercier vivement **Mme Ouafae LAHLOU**,
responsable du Laboratoire National de Référence de Tuberculose à
l'Institut Nationale d'Hygiène de Rabat pour son amabilité et son aide
précieuse.*

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Les caractères cultureux et biochimiques de certaines mycobactéries du MTBC.	11
Tableau 2: Antituberculeux combinés : composition et posologie.	72
Tableau 3: Médicaments recommandés pour le traitement de la tuberculose résistante à la rifampicine et de la tuberculose multi-résistante.....	86
Tableau 4 : La surveillance minimale pour évaluer la tolérance au traitement antituberculeux....	91
Tableau 5 : Algorithme pour le diagnostic ciblé et le traitement de l'ITL chez les sujets issus des groupes à risque.	98
Tableau 6 : Les différents schémas thérapeutiques recommandés par l'OMS.	100
Tableau 7: Les principaux caractères d'identification des mycobactéries	106
Tableau 8: Mécanismes de résistance aux médicaments chez MTB	110
Tableau 9: Performance du test Amplicor Mycobacterium tuberculosis pour le diagnostic de la tuberculose.....	121
Tableau 10: La performance de la GenXpert MTB/RIF dans le diagnostic de la tuberculose pulmonaire.....	125
Tableau 11 : La performance du test Xpert MTB/RIF dans le diagnostic de la tuberculose extra pulmonaire.....	127
Tableau 12: L'utilité du test Xpert MTB / RIF pour diagnostiquer la tuberculose pulmonaire et extra pulmonaire dans la population pédiatrique.	129
Tableau 13 : La sensibilité du test Xpert MTB / RIF par rapport à l'examen microscopique en matière de diagnostic de la tuberculose chez des patients atteints du VIH.....	133
Tableau 14 : Les données d'études publiées récemment décrivant la performance de TB-LAMP.....	138
Tableau 15: Evaluation du test LCx M. tuberculosis pour la détection du MTB sur des échantillons respiratoires et extra respiratoires.	141
Tableau 16: Evaluation du test BD ProbeTec (DTB) pour la détection de la tuberculose sur les échantillons cliniques.	144
Tableau 17: Tableau comparatif des principales méthodes moléculaires de typage de M.tuberculosis.	168

Tableau 18 : Performance du test GeneXpert MTB / RIF pour la détection de la résistance à la rifampicine dans les échantillons pulmonaires.....	174
Tableau 19 : La performance des tests MTBDRplus et MTBDRsl pour la détection de la tuberculose pharmaco résistante directement sur des échantillons pulmonaires en comparaison avec l'étalon d'or.....	178
Tableau 20 : Caractéristiques des versions 1.0 et 2.0 du génotype MTBDRsl selon le fabricant	182

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Mycobactéries responsables des manifestations respiratoires, cutanées, génito-urinaires, ganglionnaires et ostéo-articulaires.	6
Figure 2: MTB en microscopie électronique à balayage colorisée.	9
Figure 3: Aspect macroscopique des colonies du MTB à la culture sur le milieu de Lowenstein-Jensen.	9
Figure 4: Représentation schématique de l'enveloppe mycobactérienne et de ses principaux constituants.	12
<i>Figure 5: L'effet des principaux composants des mycobactéries sur la réponse des cellules hôtes.</i>	<i>15</i>
Figure 6 : Représentation du génome de MTB H37Rv.	19
Figure 7 : La pathogénèse de la tuberculose.	25
Figure 8: Le taux d'incidence mondiale de la tuberculose active	32
Figure 9: Evolution du nombre de cas et de l'incidence de la tuberculose au Maroc, entre 1990-2016.	33
Figure 10: Distribution proportionnelle, par régions, des cas de tuberculose rapportés en 2016.	34
Figure 11 : L'évolution des stratégies de l'OMS contre la tuberculose	40
Figure 12 : Radiographie thoracique de face montrant les différentes lésions tuberculeuses.	48
Figure 13: Images radiologiques montrant un syndrome interstitiel micronodulaire bilatéral et disséminé.	49
Figure 14 : Adénite tuberculeuse chez une jeune patiente.	50
Figure 15 : L'urographie intraveineuse : sténose serrée de la jonction urétéro-vésicale droite avec urétéro-hydronéphrose.	56
Figure 16: Patient âgé de 31 ans traité pour tuberculose pulmonaire en 2007 et 2008 (notion de mal-observance). Radiographie du thorax : lésions nodulaires et cavitaires bilatérales prédominantes aux deux lobes supérieurs.	63
Figure 17 : Activité in vivo des antibiotiques antituberculeux de première ligne, en cas de tuberculose cavitaire	65

Figure 18: Les recommandations de l'OMS sur l'utilisation du régime court contre la TB-MR...	84
Figure 19 : Représentation schématique de la réaction d'amplification génique par PCR .	118
Figure 20: Méthode du test Xpert MTB/RIF	123
Figure 21: Conception d'un test d'hybridation inverse sur bandelette : Le test INNO-LiPA® MYCOBACTERIA v2	148
Figure 24: Fonctionnement du séquençage du génome complet	166

LISTE DES ABREVIATIONS

BK : Bacille de koch

TB : Tuberculose

BAAR : Bacille acido-alcoolorésistant

OMS : Organisation mondiale de la santé

LAT : Lutte antituberculeuse

ODD : Objectifs de développement durable

MTB : Mycobacterium tuberculosis

MNT : Mycobactéries non tuberculeuses

MTBC : Complexe Mycobacterium tuberculosis

MR : Multirésistante

UR : Ultrarésistante

TR : Totalelement résistante

BCG : Bacille de Calmette et Guérin

MAC : Complexe M. avium

UV : Ultra-violets

TCH : Hydrazide de l'acide thiophène 2-carboxylique

PZA : Pyrazinamide

mAGP : Complexe peptidoglycanemycoloyl- arabinogalactane

AG : Arabinogalactane

LAM : Lipoarabinomannane

LPS : Lipopolysaccharide

TDM : Dimycolate de tréhalose

DIM : Phtiocérol dimycocérosates

NO : Monoxyde d'azote

TNF- α : Facteur de nécrose tumorale-alpha

IL : Interleukine

PGLs : Phénolglycolipides

SL : Sulfatides

DAT : 2,3-Diacyltréhaloses

TAT : 2, 3,6 Tri-O-acyltréhalose

PAT : Penta-acyltréhaloses

iNOS : Synthase inductible du monoxyde d'azote

AM: Arabinomannane

Fbp: Fibronectin-binding protein

P19 : Lipoglycoprotéine LpqH

TLR2 : Récepteur de type « Toll » 2

APA : Alanine-proline

DPP : Dérivé Protéique Purifié

Hsp : Protéine de choc thermique

RD : Région de répétition directe

GC : Guanine et cytosine

ARNt : Acide ribonucléique de transfert

ARN : Acide ribonucléique

PGRS : Séquences polymorphes riches en Guanine et Cytosine

IS : Séquence d'insertion

ESAT-6 : Cible antigénique à sécrétion précoce 6

CFP-10 : Protéine 10 du filtrat de culture

CMH : Complexes majeurs d'histocompatibilité

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

IFN- γ : Interféron gamma

LT : Lymphocytes T

LB : Lymphocytes B

TP : Tuberculose pulmonaire

TEP : Tuberculose extra pulmonaire

TCT : Test cutané tuberculinique

IDR : Intradermo-Réaction

PNLAT : Programme National de Lutte Antituberculeuse

DOTS : Traitement de brève durée sous surveillance directe

TPM+ : Tuberculose pulmonaire à microscopie positive

EMB: Ethambutol

INH: Isoniazide

RIF: Rifampicine

PZA: Pyrazinamide

SM: Streptomycine

AMK: Amikacine

KAN: Kanamycine

CAP : Capréomycine

PAS : Acide para-amino-salicylique

LFX : Lévofoxacine

MXF : Moxifloxacin

GFX : Gatifloxacin

ETO : Ethionamide

PTO : Prothionamide

CS : Cyclosérine

TRD : Térizidone

LNZ : Linézolide

CFZ : Clofazimine

Hh : Isoniazide à dose haute

BDQ : Bédaquiline

DLM : Délamanide

IPM : Imipénème–cilastatine

MPM : Méropénème

THZ : Thiocétazone

AMX-CLV : Amoxicilline protégée

TUG : TB urogénitale

LCR : Liquide céphalo-rachidien

CD4 : Lymphocyte T CD4+

ITL : Infection tuberculeuse latente

ATU : Autorisation Temporaire d'Utilisation

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

TB-RR : TB résistante à la RIF

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

INH-NAD : Isoniazide-Nicotinamide Adénine Dinucléotide

LBA : Lavage broncho-alvéolaire

RT-PCR : PCR en temps réel

TAG : Test d'amplification génique

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	1
1ère Partie : LA TUBERCULOSE ET L'AGENT RESPONSABLE.....	3
1. L'AGENT RESPONSABLE : MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS.....	4
A. <i>Le genre Mycobacterium</i>	4
1. Nomenclature.....	4
2. Définition.....	4
3. Classification	4
B. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	6
1. Historique :	6
2. Habitat.....	8
3. Caractères bactériologiques	8
3.1. Morphologie	8
3.2. Culture.....	9
3.3. Sensibilité aux agents physiques et chimiques.....	9
3.4. Caractères biochimiques	10
3.5. Caractères antigéniques et génétiques.....	11
2. LA TUBERCULOSE.....	21
A. <i>Physiopathologie</i>	21
1. Transmission du bacille tuberculeux	21
2. Infection tuberculeuse.....	26
3. Tuberculose maladie	26
3.1. Tuberculose thoracique	27
3.2. Tuberculose extra-thoracique	27
4. Réponse immunitaire de la tuberculose	28
4.1. Réponse immunitaire humorale	29
4.2. Réponse immunitaire cellulaire.....	29
B. <i>Situation de la maladie au 21ème siècle</i>	31

1. Situation dans le monde	31
1.1. Répartition géographique de la tuberculose humaine dans le monde	31
1.2. Tuberculose et mortalité.....	31
1.3. Tuberculose et morbidité.....	31
1.4. Tendances de l'évolution de la tuberculose	32
2. Situation au Maroc.....	33
2.1. Incidence	33
2.2. Facteurs expliquant cette propagation.....	35
2.3. Outils de la lutte antituberculeuse	37
2.4. Lutte antituberculeuse au Maroc	43
<i>C. Manifestations cliniques et radiologiques de la tuberculose.....</i>	<i>46</i>
1. Primo-infection tuberculeuse.....	46
2. Réactivation de la tuberculose pulmonaire	46
3. Tuberculose disséminée ou miliaire	48
4. Tuberculose extra pulmonaire	49
4.1. Tuberculose ganglionnaire	49
4.2. Tuberculose pleurale	51
4.3. Tuberculose digestive.....	52
4.4. Tuberculose ostéoarticulaire	54
4.5. Tuberculose urogénitale	55
4.6. Tuberculose neuroméningée	57
5. Tuberculose chez l'enfant.....	58
6. Présentation clinique de la tuberculose chez les patients VIH séropositif	60
7. Présentation clinique de la tuberculose multi résistante	61
<i>D. Traitement.....</i>	<i>63</i>
1. Traitement de la tuberculose maladie	63
1.1 Buts du traitement	63
1.2. Bases biologiques du traitement antituberculeux.....	63
1.3. Moyens du traitement.....	65
1.4. Modalités pratiques du traitement	78

2. Traitement de la tuberculose latente	96
2.1. Identification des groupes à risque admissibles au traitement de l'infection tuberculeuse latente	96
2.2. Algorithme pour tester et traiter une ITL	97
2.3. Schémas thérapeutiques	99
2.4. Surveillance des patients sous traitement de l'ITL	100
2 ^{ème} partie : DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE, IDENTIFICATION DES MARQUEURS EPIDEMIOLOGIQUE ET RESISTANCE AUX ANTITUBERCULEUX	102
1. TECHNIQUES CLASSIQUES	103
A. <i>Diagnostic bactériologique et méthodes de différenciation</i>	103
1. Examen microscopique.....	103
2. Culture	104
3. Identification.....	105
B. <i>Résistance aux antituberculeux</i>	107
1. Définitions	107
1.1. Résistance bactérienne à un antibiotique	107
1.2. Résistance naturelle.....	107
1.3. Résistance acquise.....	107
1.4. Résistance dans les nouveaux cas et dans les cas traités antérieurement.....	108
2. Mécanismes d'acquisition de la résistance	108
2.1. Mécanisme de résistance à l'isoniazide	111
2.2. Mécanisme de résistance à la rifampicine.....	111
2.3. Mécanisme de résistance à l'éthambutol.....	111
2.4. Mécanisme de résistance à la pyrazinamide	112
2.5. Mécanisme de résistance à la streptomycine.....	112
3. Résistances multiples.....	112
3.1. Multi résistance	112
3.2. Tuberculose pré-ultra résistante	112
3.3. Résistance extensive ou ultrarésistance.....	113
4. Détection phénotypique de la résistance aux médicaments antituberculeux.....	113

4.1. Méthode des proportions	113
4.2. Méthode des CMI.....	114
4.3. Méthode de MODS	114
4.4. Méthodes colorimétriques par indicateur redox	115
4.5. Test à la nitrate réductase	115
<i>C. Marquage épidémiologique</i>	<i>116</i>
2. TECHNIQUES MOLECULAIRE.....	117
<i>A. Apport dans le diagnostic de la tuberculose et dans l'identification des marqueurs épidémiologiques</i>	<i>117</i>
1. Méthodes d'amplification génique	117
1.1. PCR classique.....	117
1.2. PCR en temps réel	122
1.3. Amplification isotherme induite par boucle.....	137
1.4. Amplification transcriptionnelle de l'ARN par TMA.....	138
1.5. Amplification par LCR.....	139
1.6. Amplification par SDA	141
2. Identification par hybridation moléculaire	146
2.1. Technique INNO-LiPA Mycobacteria	146
2.2. Test Accuprobe	148
2.3. GenoType MTBC et GenoType Mycobacterium CM/AS	149
3. Typage Moléculaire	153
3.1. Méthode de IS6110-RFLP	154
3.2. Spoligotypage.....	156
3.3. MIRU-VNTR	159
3.4. Rep-PCR.....	163
3.5. Séquençage du génome complet	165
3.6. Autres techniques	170
<i>B. Apport dans l'étude de la résistance aux anti-bacillaires</i>	<i>172</i>
1. Test Xpert MTB/RIF	172
2. Bandelette INNO-LiPA Rif. TB	176

3. GenoType MTBDR plus et MTBDRsl.....	177
4. Séquençage du génome.....	182
CONCLUSION	185
BIBLIOGRAPHIE	192
RESUME.....	189

INTRODUCTION

La tuberculose est une maladie infectieuse à transmission interhumaine liée au bacille de koch (BK).

Il s'agit d'un problème de santé publique majeur dans le monde malgré les nombreuses stratégies de lutte antituberculeuse (LAT) (1).

En 2015, l'OMS estimait à 10,4 millions le nombre de nouveaux cas (incidents) de TB dans le monde avec 1,4 million de décès (2).

La coïnfection avec le VIH, l'émergence de formes de tuberculose MR, puis UR et TR ne fait que compliquer encore plus la situation rendant la prise en charge des patients beaucoup plus difficile et la nécessité d'un diagnostic sensible et rapide encore plus urgente (3).

Une des cibles des objectifs de développement durable (ODD) – adopté en 2015 pour 2030 - consiste à mettre un terme à l'épidémie mondiale de TB. La Stratégie OMS pour mettre fin à la TB, approuvée par l'Assemblée mondiale de la Santé en 2014 appelle à réduire de 90 % le nombre de décès par TB et de 80 % le taux d'incidence de la maladie d'ici à 2030, par rapport à 2015 (2).

Afin d'atteindre ces objectifs, des efforts soutenus de l'OMS et de nombreuses organisations internationales ont été investis dans le développement et la mise en place de nouveaux tests diagnostiques. Plusieurs techniques ont été introduites au cours de ces dernières années. Elles ont permis d'améliorer la sensibilité des tests classiques et de remédier à leur lenteur. Le développement des méthodes de biologie moléculaire, leur standardisation et leur automatisation sont actuellement en train de révolutionner ce diagnostic. Ces techniques, qui étaient l'apanage des laboratoires spécialisés, tendent à se généraliser. Le dernier test d'amplification génique en temps réel Xpert MTB/RIF permet en quelques heures un diagnostic rapide de la TB ainsi que de la résistance à la RIF et son utilisation a été approuvée par l'OMS et ce même dans les structures de soin périphériques (3).

Le présent rapport a pour objet d'une part de rappeler les caractères bactériologiques, épidémiologiques, cliniques, curatifs et préventifs de la TB et d'autre part de détailler les techniques bactériologiques classiques, de souligner l'apport des techniques de la biologie moléculaire actuelles dans le diagnostic rapide de la TB, l'évaluation de la résistance et dans le typage des souches de MTB.

1ÈRE PARTIE :
LA TUBERCULOSE ET L'AGENT
RESPONSABLE

1. L'AGENT RESPONSABLE : MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

A. Le genre Mycobacterium

1. Nomenclature

Le terme Mycobacterium provient de deux racines empruntées au grec, le préfixe « Myco-» signifie un champignon et « Bacterium » un bâtonnet, en faisant allusion à la façon dont les mycobactéries ont été observées pour se développer comme des pellicules moulées, en forme de moisissures, à la surface des milieux liquides où elles sont cultivées (4). Cette description caractérise l'ordre des Actinomycétales

Du point de vue taxonomique, les mycobactéries appartiennent à l'ordre des Actinomycétales, au sous-ordre des Corynebacterineae et en particulier à la famille des Mycobacteriaceae qui ne comprend qu'un seul genre : le genre Mycobacterium (5). Celui-ci regroupe plus de 125 espèces parmi lesquelles on trouve le MTB, agent de la TB.

2. Définition

Classiquement, l'inclusion dans le genre Mycobacterium repose sur des propriétés morphologiques et tinctoriales mais récemment la Comité internationale de bactériologie systématique a proposé 3 critères pour attribuer un germe au genre Mycobacterium (6):

- l'acido-alcool-résistance des bacilles,
- le contenu de l'ADN en Guanine et Cytosine (G+C%) est compris entre 61 et 71 % et
- la synthèse d'acides mycoliques de 60 à 90 atomes de carbone libérant des esters de pyrolyse de 22 à 26 atomes de carbone.

Alors que d'autres organismes peuvent présenter une certaine acido-alcool-résistance et une valeur de G+C% comparable, les mycobactéries se singularisent par la présence d'acides mycoliques particuliers (7) (6) (5).

3. Classification

À ce jour, plus de 170 espèces de mycobactéries ont été reconnues (8), leur classification est nécessaire afin de mieux identifier chaque espèce.

Pour cela plusieurs approches sont décrites pour permettre la classification des mycobactéries : phénotypiques, moléculaires et phylogéniques (5). Dans la pratique courante les mycobactéries sont classées en 3 groupes selon leur pouvoir pathogène :

- Le complexe *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) se subdivise en sous-espèces (9):
 - ✓ *Mycobacterium tuberculosis*, bacille de Koch ("BK"), il est responsable de la TB humaine ;
 - ✓ *Mycobacterium africanum* fréquemment isolé chez les tuberculeux en Afrique de l'Ouest et du Centre est très proche du précédent ;
 - ✓ *Mycobacterium canettii* qui lui est retrouvé dans les cas provenant de la corne de l'Afrique ;
 - ✓ *Mycobacterium bovis*, pouvant infecter l'Homme et d'autres animaux, est l'agent de la TB bovine. Un mutant de *Mycobacterium bovis*, le BCG, est utilisé comme vaccin ;
 - ✓ Il inclut également d'autres bacilles qui se sont adaptés à des hôtes animaux spécifiques : par exemple, *Mycobacterium mungi* pour la mangouste, le « dassie bacillus » pour le daman des rochers, *Mycobacterium orygis* pour les gazelles oryx, *Mycobacterium pinnipedii* pour les phoques, *Mycobacterium microti* pour les campagnols et *Mycobacterium caprae* pour les caprins. (10) (11) (12)
- *Mycobacterium leprae* ou bacille de Hansen et *Mycobacterium lepraemurium*, les agents de la lèpre de l'homme et du rat, sont des bactéries à croissance lente non cultivables in vitro (13).
- Mycobactéries non tuberculeuses (MNT) ou les mycobactéries atypiques sont des germes cosmopolites dont la source de transmission est environnementale. Elles infectent le plus souvent des patients fragilisés (immunodépression, traumatisme, intervention chirurgicale) ou présentant une pathologie respiratoire chronique (mucoviscidose, dilatation des bronches). Elles peuvent être à l'origine d'adénites, de pneumopathies, d'ostéo-arthrites ou d'infections cutanées ainsi que d'infections systémiques (14) (15). Seules quelques MNT : MAC (*M. avium*, *M. intracellulare*, *M. triplex*, *M. lentiflavum*, *M. celatum* ou *M. conspicuum*), appelé *M. avium* complex par les Anglo-saxons, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium abscessus* (*M. abscessus* stricto sensu, *Mycobacterium massiliense* et *Mycobacterium bollettii*), *Mycobacterium malmoense*,

Mycobacterium szulgai, *Mycobacterium smegmatis* ont une pathogénicité pulmonaire prouvée (16).

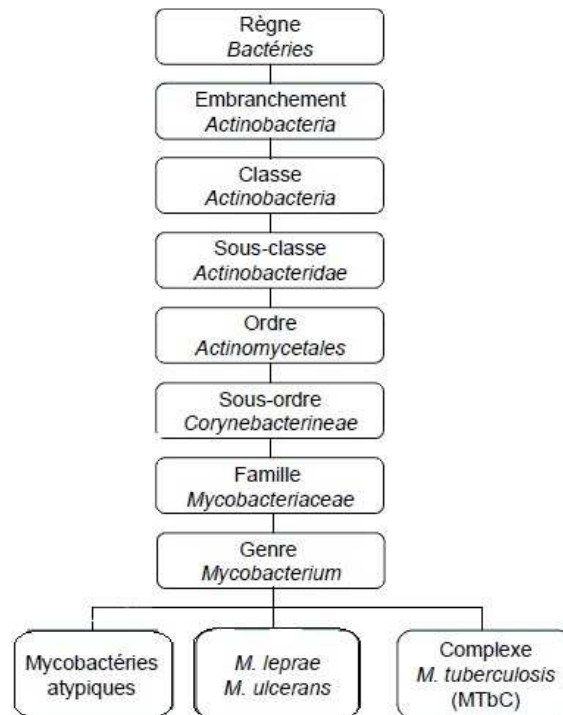


Figure 1: Mycobactéries responsables des manifestations respiratoires, cutanées, génito-urinaires, ganglionnaires et ostéo-articulaires.

B. *Mycobacterium tuberculosis*

1. Historique :

La TB a toujours existé, dès la préhistoire, une maladie connue dans les civilisations anciennes (17).

L'ensemble des données recueillies par l'étude du papyrus médicaux, par l'iconographie, surtout par les données paléo-pathologique en particulier les acquis récents obtenus par les techniques de la biologie moléculaire appliquées aux momies égyptiennes amènent à conclure que la TB a certainement affectée l'Égypte ancienne et a concouru à la brièveté de l'espérance de vie des habitants de la vallée du Nil (18).

En Mésopotamie, le code de la loi babylonienne, connu sous le nom de Code de Hammourabi, qui date de l'an 2000 avant J.-C., a mentionné la TB parmi plusieurs autres maladies (19).

En Grèce antique Hippocrate, (460-377 avant J.-C.), en fit la première description, sous les noms de phtisie, de peste blanche ou de consommation (il [elle] se consume...) (20) (19).

Le caractère contagieux des épidémies aurait été reconnu, selon Sigrid Hunke l'historienne des religions (1963 : 160-164), par les médecins Arabes du Moyen-âge: celui de la lèpre par MASAOUEIH (YUHANNA IBN MASAWAIH, JEAN MÉSUÉ, 243_857), au IX^e siècle, celui de la phtisie pulmonaire par IBN SINA (AVICENNE, 980-1037), au début du XI^e siècle celui de la peste par IBN AL-CHATIB (1313-1374), en 1348 (21).

A la Renaissance, Girolamo Fracastoro, bat en brèche la théorie galénique des miasmes pour évoquer en parlant de la contagiosité de la syphilis et de la TB « des particules invisibles capables de se multiplier » (20).

La notion de tubercule se fait jour au milieu du XVII^e siècle : Franciscus de LE BOË (SYLVIUS, 1614-1672) fut le premier à décrire, en 1650, le nodule tuberculeux du poumon des phtisiques (21).

La compréhension moderne de la TB a commencé par les travaux de Laennec qui en 1804 avait décrit les lésions tuberculeuses et leur évolution, il en réduit toutes les formes à la même maladie et il a également décrit la plupart des signes physiques de la TB pulmonaire mais il nie la contagiosité (21) (19) (17) (20) (22).

En 1865, Jean-Antoine VILLEMIN, démontre que la TB est une maladie infectieuse, contagieuse et inoculable, donc évitable (17).

La conception officielle présumant que « la tuberculose est une maladie héréditaire d'origine constitutionnelle » devait s'effondrer comme un château de cartes avec la découverte le 24 mars 1882, par Robert Koch (1843-1910) du bacille (BK) qui portera désormais son nom (17) (21) (22) (20) (19).

En 1890 la tuberculine est mise au point par Robert KOCH, elle lui assigne initialement un rôle de prémunition éventuelle, mais le remède est pire que le mal (21). Ce n'est qu'en 1907 que Von Pirquet a appliqué le phénomène de Koch pour le diagnostic de la TB (c'est l'intradermoréaction à la tuberculine) (17).

En 1921, Léon CALMETTE (1863-1933) et Jean-Marie GUÉRIN (1872-1961) proposent leur vaccin vivant atténué, le BCG, obtenu par les passages répétés sur un milieu bilité à base de pomme de terre (21) (22) (19) (23). Au Maroc, la vaccination par le BCG introduite en 1935

dans certaines régions et ciblant des populations spécifiques n'a été systématisée qu'en 1970 (24).

La découverte des antibiotiques marque la fin de l'âge des sanatoriums (20). Découverte par Selman Abraham Waksman en 1943, la SM a montré son efficacité en monothérapie dans un essai clinique randomisé 3 ans plus tard. Cependant, dès les premières utilisations, les premières souches résistantes à cette antibiothérapie ont émergé, mais au vu du succès du traitement de la TB par antibiotiques, un effort considérable a été déployé pendant une bonne dizaine d'années, entre 1950 et 1963. Cette période a vu naître l'ensemble des antituberculeux encore aujourd'hui en usage, comme l'INH (en 1952), le PZA (en 1954), l'EMB (en 1961) et la RIF (en 1963) (23).

Dans les pays industrialisés, l'amélioration des conditions de vie et la découverte des antituberculeux ont permis dans les années 1950 jusqu'à 1980 une diminution de la maladie. En 1993, la résurgence de la TB à l'échelle internationale a amené l'OMS à la déclarer « urgence mondiale » (25) (26).

2. Habitat

MTB est un parasite strict de l'espèce humaine. Les animaux familiers de l'homme peuvent occasionnellement être contaminés (27) (28).

3. Caractères bactériologiques

3.1. Morphologie

Les mycobactéries sont définies comme des bacilles droits ou légèrement incurvés de 1 - 10 µm de long et 0,2 - 0,6 µm de large, immobiles, incapables de former des spores et des capsules. En plus de la forme bacillaire unie, on observe la forme bacillaire granulée et la forme coccidie considérées comme des stades différents d'un même cycle (29) (28).

La composition particulière de leur paroi ne permet pas leur coloration par la méthode de Gram, mais leur confère une acido-alcool-résistance mise en évidence par des techniques de coloration spécialement développées, dérivées de la méthode originale de Ziehl-Neelsen (6).

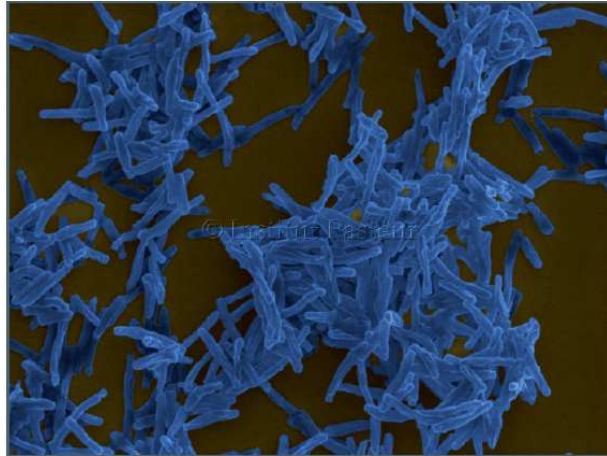


Figure 2: MTB en microscopie électronique à balayage colorisée.

3.2. Culture

MTB cultive lentement (vingt heure), en aérobiose stricte, à une température comprise entre 35-37 °C, avec un pH optimal de 6.7 et sur des milieux spéciaux (30) (29).

Sur le milieu de Lowenstein-Jensen, les colonies de MTB apparaissent en 15 à 21 jours et sont élevées, épaisses, irrégulières, d'une surface rugueuses, donnant un aspect « en chou-fleur » (aspect eugonique) de couleur qui vire du crème-beige à chamois, ne sont pas pigmentées même après exposition à la lumière, friables, mais difficiles à émulsionner (14).

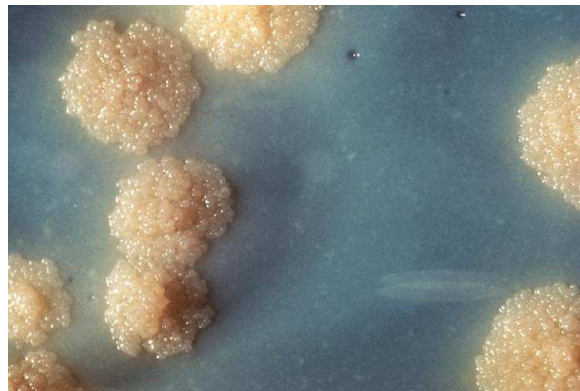


Figure 3: Aspect macroscopique des colonies du MTB à la culture sur le milieu de Lowenstein-Jensen.

3.3. Sensibilité aux agents physiques et chimiques

Les bacilles tuberculeux sont sensibles à la chaleur humide (121°C pendant au moins 15 minutes), à la lumière solaire, aux rayons Ultra-violet (UV) et aux radiations ionisantes. Par

contre, ils sont moyennement résistants au froid et à la dessiccation (il reste virulent un mois dans les crachats desséchés et plusieurs mois dans la terre) (31) (32).

Le MTB est résistant à la plupart des détergents et désinfectants (les ammoniums quaternaires, le digluconate de Chlorhexidine, l'iodophore...etc.). Cependant, il est généralement sensible à l'éthanol 70%, le povidone-iode, l'hypochlorite de sodium au phénol (5%) et à la glutaraldéhyde alcalin 2% (33).

3.4. Caractères biochimiques

L'identification de MTB à partir de la culture fait appel aux caractères biochimiques suivants (34) (35) (36) (37):

- La synthèse importante de l'acide nicotinique ou de la niacine ;
- L'activité catalasique thermolabile ;
- La présence d'une nitrate-réductase ;
- Sa résistance à l'Hydrazide de l'acide thiophène 2-carboxylique (TCH) et sa sensibilité à la PZA.

3.5. Caractères antigéniques et génétiques

Tableau 1: Les caractères culturels et biochimiques de certaines mycobactéries du MTBC.

3.5.1. Enveloppe mycobactérienne

Sous-espèces	Aspect des colonies	Délai de croissance	Couleur	Pigmentation	TCH	PZA	Nitrate-réductase	Niacine
MTB	Eugoniques Rugueuses « chou-fleur »	14-28 jours	Beige	Aucune	Résistant	Sensible	Positif	Positif
M.africanum	Dysgoniques Rugueuses Plates à centre surélevé	60-90 jours	Beige	Aucune	Sensible / résistant	Sensible	Variable	Variable
M.bovis	Dysgoniques Lisses « gouttelettes »	30-40 jours	Cire de bougie	Aucune	Sensible	Résistant	Négatif	Négatif

3.5.1.1. Structure

L'enveloppe de MTB et de celle des autres mycobactéries est composée schématiquement, en allant du cytoplasme vers l'extérieur d'une membrane plasmique qui est séparée du squelette pariétal par un espace péri-plasmique. La membrane plasmique est constituée d'une bicouche

The diagram illustrates the complex structure of the Mycobacterium tuberculosis cell wall. It shows a cross-section of the cell envelope, including the inner and outer membranes, the peptidoglycan layer, and the various lipids and proteins embedded within or attached to these layers. Key components labeled include:

- Porin:** A green protein embedded in the outer membrane.
- Mannose cap:** A cluster of blue spheres at the outermost surface.
- surface glycolipid:** Lipids with multiple sugar head groups.
- mycolic acids:** Long, wavy hydrophobic chains.
- galactan:** A branched polysaccharide chain.
- peptidoglycan:** A layer of alternating sugar and amino acid units.
- AG (Arabinogalactan):** A polysaccharide chain attached to the peptidoglycan.
- LAM (Lipoarabinomannan):** A large, complex molecule with multiple sugar and lipid components.
- Araf (Arabinose):** A sugar unit within the LAM structure.
- Manp (Mannose):** A sugar unit within the LAM structure.
- Inositol:** A sugar unit attached to the peptidoglycan.
- PIMs (Phosphatidylinositol mannosides):** Lipids attached to the inner membrane.
- LM (Lipomannan):** A lipid molecule attached to the inner membrane.
- Rha-GlcNAc linker:** A linker between a rhamnose and a glucosamine unit.
- PO₄:** A phosphate group.

LAM : Lipoarabinomannanes ; AG : arabinogalactanes LM : Lipomannanes ; PIMs : Phosphatidyl-inositol mannosides
--

3.5.1.2. Molécules associées à la paroi

3.5.1.2.1. Lipides

Parmi les constituants lipidiques caractéristiques des Mycobactéries et qui sont responsables de la consistance cireuse de ces microorganismes, on cite **l'acide mycolique**. Ces acides gras à longues chaîne carbonée, α -ramifiés, β -hydroxylés, constituent le support moléculaire de l'acido-alcool- résistance. Ils entrent dans la constitution du complexe mAGP. Ce dernier exerce l'effet d'un hydrophobe tout autour de la cellule, il fixe directement la fuchisine et la retient au niveau du cytoplasme, assurant ainsi l'intensité et la réfringence de la coloration. Il constitue une barrière physique prévenant l'action décolorante des acides et des alcools (6). L'identification du MTB par la chromatographie en phase gazeuse dans les conditions de pyrolyse se fait par la mise en évidence de trois types d'acides mycoliques : il s'agit des acides dicyclopropaniques, méthoxylés et cétoniques de C76 à C90 atomes de carbone. L'identification est acquise aussi par la longueur de la chaîne α -ramifiée des acides mycoliques du bacille tuberculeux (26 atomes de carbone) (41).

Le lipoarabinomannane (LAM), qui peut être considéré comme le « lipopolysaccharide (LPS) mycobactérien » constitue un facteur de virulence majeur. A côté de son rôle dans l'intégrité de la paroi cellulaire mycobactérienne (42), il est impliqué dans l'atténuation de la réponse immune de l'hôte ainsi que dans l'adhérence et l'internalisation du bacille dans les macrophages. Par ailleurs, au cours de son trafic intracellulaire, le LAM interagit avec des molécules du CD1 qui le présentent alors aux lymphocytes T. Ce mode de présentation d'antigène joue un rôle important dans l'acquisition de l'immunité à médiation cellulaire, notamment pour lutter contre des pathogènes synthétisant des glycolipides non usuels tels que le LAM (43).

Le dimycolate de tréhalose (TDM) ou le facteur cord est un glycolipide toxique composé de tréhalose et d'acides mycoliques (44) retrouvé enfoui dans les couches profondes de la capsule du MTB (41). C'est une molécule qui joue un rôle important dans la virulence et donc dans la pathogenèse de la TB (45). Le TDM exerce un effet immunomodifiant, en stimulant l'immunité adaptative innée, précoce et à la fois humorale et cellulaire. La plupart des fonctions peuvent être associées à leur capacité à induire une large gamme de chimiokines et des cytokines (46).

Les phthiocérol dimycocérosates (DIM) sont des lipides majeurs de l'enveloppe mycobactérienne. La production de DIM contribue à la croissance initiale de MTB en le protégeant de l'action du monoxyde d'azote (NO) libéré par les macrophages activés et en modulant la réponse immunitaire précoce par son action sur la sécrétion du facteur de nécrose tumorale (TNF) -alpha et d'interleukine (IL) -6 (47).

Les phénolglycolipides (PGLs) sont synthétisés par certaines souches du MTBC. Les souches déficientes dans la production des PGLs sont des mutants naturels avec une mutation dans le gène *pks15/1* (48). Ce glycolipide retrouvé chez des souches de TB hyper virulentes inhibe la libération des médiateurs pro-inflammatoires (des cytokines pro-inflammatoires, TNF- α , IL-6 et IL-12) de manière dose-dépendante (49).

Les sulfatides (SL) sont des acyltréhaloses retrouvées dans l'enveloppe cellulaire de MTB et *M. canettii* (50). Le SL-1 est la sulfatide la plus représentée sur la membrane de MTB (51). Les sulfatides exercent une influence inhibitrice sélective sur la fusion membranaire du phagosome-lysosome évitant ainsi l'exposition aux hydrolases lysosomales (52) (53) (54).

La 2,3-diacyltréhaloses (DAT), la 2, 3,6 tri-O-acyltréhalose (TAT) et la penta-acyltréhaloses (PAT) sont des dérivés de tréhalose restreints à certaines espèces du MTBC y compris le BK. Ils jouent non seulement un rôle structurel dans l'enveloppe cellulaire, mais contribuent également à la capacité de MTB à se multiplier et à persister dans l'hôte infecté. La DAT, la TAT et la PAT favorisent la survie intracellulaire de la bactérie par l'inhibition de la production du NO et l'expression de la synthase inductible du monoxyde d'azote (iNOS). Ils modulent les réponses immunitaires de l'hôte par l'inhibition de l'action des lymphocytes T et la production des cytokines (55) (56).

La cire D est un peptidoglycolipide macromoléculaire qui a des propriétés biologiques importantes telles que l'effet adjuvant de Freund et l'induction d'arthrite adjuvante (57). Ces propriétés semblent dues à la stimulation du système réticulo-endothélial (58).

Composant	Production de granu- lomes ^a	Activation des macro- phages ^a	Toxicité	Résistance accrue de l'hôte ^a	Pouvoir adjuvant	Dysfonc- tionnement des lyso- somes	Bouclier microbien
Cellule entière	+	+	-	+	+	+(viable)	
Cire D	+ ^b	+ ^b	±	+	+	-	
Adjuvant hydrosoluble	±	+	-	+	+	-	
N-glycolyl muramyl- dipeptide	+	+	±	+	+	-	-
Dimycolate 6,6' de tréhalose («cord factor»)	+	+	+	+	+		
Sulfatides	-	-	-	-	-	+ ^c	
Acid phtiénoïque et acides mycocérosiques	+	+	±	-	-	-	
Mycosides C	-	-	-	-	-	-	+

^a Il peut être nécessaire que le composant soit présenté dans de l'huile pour exercer cet effet.
^b Lorsque des peptides sont attachés.
^c Non toxique en soi, mais agit synergiquement, seulement à faible dose, avec le «cord factor» sur les membranes.

Figure 5: L'effet des principaux composants des mycobactéries sur la réponse des cellules hôtes. (59)

3.5.1.2.2. Polysaccharides

Ce sont essentiellement le mannane de 4 kDa, l'arabinomannane de masse apparente de 13 kDa et le glucane d'environ 120 kDa, les trois polysaccharides qui sont rencontrés à la couche la plus externe de l'enveloppe supposée être la capsule des mycobactéries (41). L'arabinomannane représente les mêmes compositions saccharidiques que le lipoarabinomannane, mais il est dépourvu de la partie lipidique. Il est démontré que la vaccination avec les conjugués mycobactériens d'arabinomannane (AM) a suscité des réponses qui ont contribué à la protection contre l'infection par le MTB (60).

Au niveau du squelette pariétal mycobactérien, le principal polysaccharide antigénique est un hétéro polysaccharide, l'**arabinogalactane (AG)** (41). Sa fonction apparente est l'attachement de la couche d'acide mycolique aux peptidoglycanes. Par ailleurs des expériences menées in vitro suggèrent que l'AG peut contribuer au blocage des réactions immunitaires à médiation cellulaire induites par des lymphocytes (61). L'un des principaux médicaments

antituberculeux, l'éthambutol (EMB), agit en inhibant la biogenèse de la paroi cellulaire, apparemment par son action directe sur la biosynthèse de l'AG (62) (63).

3.5.2. Protéines

Le matériel extracellulaire sécrété par MTB dans les milieux de culture ainsi que le matériel de surface contiennent des protéines (38). Parmi ces protéines, on retrouve notamment les protéines de 19kDa, 38 kDa, 30/31kDa (ou Fbp pour fibronectin-binding protein).

La lipoglycoprotéine LpqH ou l'antigène lipoprotéique de 19 kDa (p19) est un antigène majeur de la paroi cellulaire de MTB. P19 induit une immunité à médiation cellulaire par l'activation des lymphocytes T. Elle peut se comporter comme un agoniste de TLR2 qui réduit la présentation des antigènes aux cellules T, favorise la phagocytose des mycobactéries et induit l'apoptose des macrophages. D'ailleurs, c'est un composant majeur des vésicules membranaires activement sécrétées par le MTB dans les macrophages infectés (64) (65)

Le complexe d'antigènes 85 est un complexe de trois produits géniques apparentés de 30 à 31 kDa, intitulés FbpA, FbpB et FbpC2. Les trois protéines présentent des propriétés de liaison à la fibronectine et agissent comme des mycolyltransférases impliquées dans les étapes finales de l'assemblage de la paroi cellulaire mycobactérienne (66)

La protéine de 38 kDa est un constituant majeur du liquide de la culture pendant la croissance de MTB sur le milieu synthétique de Sauton et du BCG. Cette protéine induit une réponse immunitaire médiée par les lymphocytes T avec une spécificité élevée pour le MTB. De ce fait, il est un candidat principal pour le développement de nouveaux réactifs diagnostiques pour la TB (67).

Le complexe d'antigènes de 45/47 kDa ou l'antigène alanine-proline (APA), représentant moins de 2% du matériel spécifiquement libéré ou excrété pendant la croissance de MTB ou du BCG, pourrait être utilisé pour le diagnostic de la TB. Cependant, leurs faibles valeurs prédictives (sensibilité de 76,9% et spécificité de 73,2%), la sérologie anti-APA ne peut pas être recommandée pour le diagnostic de routine de la TB (68)

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 d'où l'appellation de **DPP** pour Dérivé Protéique Purifié (69) (70).

Le peptidoglycane est un polymère complexe, responsable de la rigidité de la paroi. Il présente une structure chimique analogue à celle du peptidoglycane des autres bactéries. Cependant, il se distingue par la présence d'un acide muramique qui est N-glycolylé au lieu d'être N-acétylé (41) (71). Les enzymes (GlmS, GlmM, GlmU, MurA, MurB, MurC, MurD, MurE, MurF...) qui catalysent la biosynthèse des peptidoglycanes chez MTB sont essentielles et, par conséquent, leur inhibition devrait entraîner une destruction ciblée de ce pathogène (72)

La capacité de MTB à survivre sous stress oxydatif in vivo est un aspect important de sa pathogénèse. **Les protéines de choc thermique (hsp)** sont des chaperons moléculaires essentiels pour maintenir les fonctions cellulaires pendant les conditions normales et de stress. Les protéines de choc thermique jouent également un rôle dans la présentation de l'antigène et l'activation des lymphocytes et des macrophages (73).

Le complexe d'antigène A60 est présent dans le cytosol des mycobactéries typiques et atypiques. Il contient environ 89 épitopes reconnus par différents anticorps (74). C'est un composant thermostable de DPP qui est utilisé dans le sérodiagnostic de la TB. Malheureusement, cette molécule n'est pas spécifique aux mycobactéries, car elle est également présente dans les espèces de *Nocardia* et *Corynebacterium* (75).

L'ESAT-6 (6-kDa early secretory antigenic target) et **la CFP-10** (culture filtrate protein-10) sont des antigènes immunodominants (76), exprimés respectivement par les gènes *esxA* / *Rv3875* et *esxB* / *Rv3874* appartenant à la région RD1. La CFP-10 agit probablement comme un chaperon. L'ESAT-6 a des propriétés cytolytiques et contribue à la propagation de cellule-à-cellule des mycobactéries dans l'hôte (77). ESAT-6 et CFP-10 sont utilisés dans le développement de nouveaux diagnostics et de nouveaux vaccins.

3.5.3. Génome

L'étape génomique de la TB débute en 1993, soit plus d'un siècle après la découverte du bacille par Koch. Alors que l'OMS déclare cette année la TB « urgence mondiale », l'équipe hollandaise de Van Embden décrit le typage par « polymorphisme de longueur des fragments de restriction » permettant pour la première fois de différencier les souches. En 1998, il est finalisé le premier séquençage complet d'une mycobactérie, MTB H37Rv5 (Une souche virulente isolée en 1905 puis propagée in vitro) (26). Actuellement, nous disposons des

génomés complets de neuf organismes du MTBC (1 *M. africanum*, 2 *M. bovis* et 9 MTB) ainsi que ceux de 24 MNT sont actuellement disponibles (78)

Dans le cas de MTB, le séquençage et l'analyse systématique du génome de la souche H37Rv a permis de mettre en évidence que le chromosome de MTB est circulaire. Il contient 4.411.532 paires de bases, contenant environ 4018 gènes codant des protéines soit une capacité de codage de 91.2% avec un pourcentage de bases GC d'environ 65,9 (79) (80). On constatait aussi qu'une fraction importante des séquences codantes était impliquée dans la synthèse d'enzymes de la lipogenèse et de la lipolyse. Ceux-ci sont nécessaires à la synthèse de la paroi du bacille riche en lipides. Près de 10% du génome de *Mycobacterium tuberculosis* est consacrée à deux familles de protéines hautement enrichies et énigmatiques appelées PE et PPE, dont certaines sont des facteurs importants de virulence et d'immunogénicité (81). Des enzymes, souvent associées à une virulence bactérienne, en particulier des phospholipases, étaient également caractérisées (82) (83) (84).

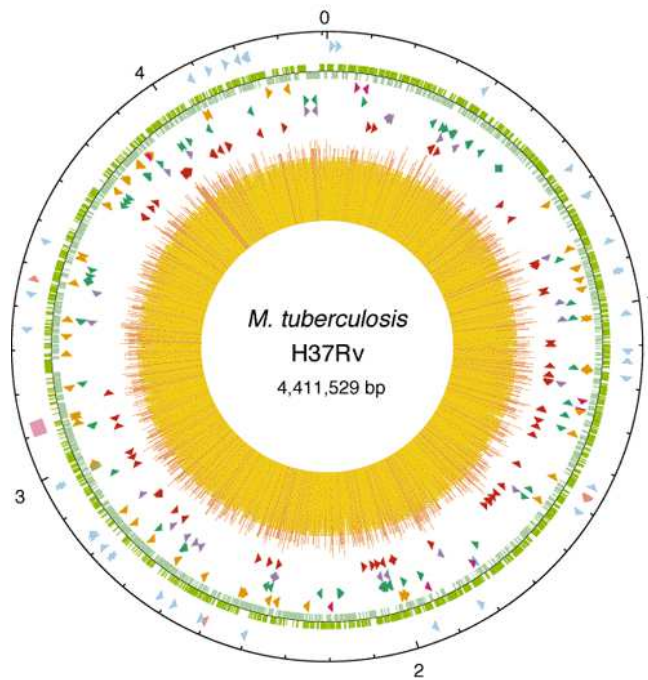


Figure 6 : Représentation du génome de MTB H37Rv (84).

Le cercle extérieur indique l'échelle en méga base (Mb), le « 0 » représente l'origine de la réplication. Le premier anneau de l'extérieur indique les positions des gènes de l'ARN stables (les ARNr sont en bleus et les autres sont de couleur rose) et la région de DR (cube rose). Les entrailles du second anneau montrent la séquence codante par brin (sens horaire en vert foncé ; antihoraire en vert clair). Le troisième anneau représente l'ADN répétitif (séquences d'insertion en orange ; famille REP13E12 en rose foncé ; prophage en bleu). Le quatrième anneau montre les positions des gènes codant pour les membres de famille de la protéine PPE (vert). Le cinquième anneau montre des gènes codant pour les membres de famille de la protéine PE (violet à l'exclusion PGRS). Le sixième cycle montre les positions des séquences PGRS (rouge pourpre). L'histogramme (au centre) représente les zones contenant G+C (<65% G + C en jaune ; > 65% G + C en rouge)

Les mutations, plus que les transferts horizontaux de gène, ont conduit à l'évolution récente de MTB et son adaptation à l'hôte humain (85).

L'ADN de MTB présente plus de 99,9 % d'identité avec celui des autres membres du MTBC : *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. canettii* et *M. microti* (83).

Néanmoins, la diversité génétique de MTB est liée à la présence des sites monomorphes et polymorphes dans le génome de la bactérie pouvant être divisés en trois groupes : polymorphismes mononucléotidiques (SNPs), polymorphismes de larges séquences (LSP) et polymorphismes dans des séquences répétitives. Ce dernier a été soumis à une caractérisation ultérieure révélant deux classes de séquences d'ADN répétitives : les séquences répétées dispersées telles que des séquences d'insertion (IS) et les répétitions directes (DR) ; et les séquences répétées en Tandem (VNTR). Les courtes répétitions en tandem sont en outre classées en répétitions en tandem polymorphiques majeures (MPTR) et des répétitions en tandem exactes (ETR) (86).

Comparés aux SNPs et aux LSP, les polymorphismes dans les séquences répétitives ont tendance à évoluer plus rapidement, ce qui se traduit par des profils analogues dans les espèces MTB qui sont complètement indépendants. Par conséquent, la recherche sur les polymorphismes dans les séquences répétitives a conduit à son utilisation dans les enquêtes épidémiologiques ; les deux autres polymorphismes se sont également révélés être un marqueur utile dans l'épidémiologie moléculaire) (86).

Le haut degré de polymorphisme est observé en nombre et en position des séquences répétitives dispersées telles que des éléments d'insertion (IS) et des répétitions directes (DR). Parmi les séquences d'insertion, seize copies d'IS6110 et six copies d'IS1081 ont été dénombrées pour la souche de référence H37Rv (84). Certaines souches de MTB contiennent jusqu'à 25 copies d'IS6110 par génome (86). La mobilité de l'IS6110 sur le chromosome et sa présence en un grand nombre de copie, lui confèrent un niveau de discrimination qui est fort par rapport à celui des autres séquences d'insertion (IS1081, IS1547 et IS-like element). Cette propriété explique son utilisation répandue comme outil de typage génétique des souches du MTBC (87).

De plus, les régions RD3 et RD11 du génome de MTB H37Rv correspondent à deux prophages ϕ Rv1 et ϕ Rv2 (88) (84). Certains gènes des deux prophages peuvent être traduits et fonctionnels. L'expression d'autres tels que Rv1577c, Rv2650c, Rv2652c, Rv2659c et Rv2658c peut varier et aider MTB à s'adapter aux fluctuations environnementales et donc à participer à la virulence (89).

2. LA TUBERCULOSE

A. Physiopathologie

1. Transmission du bacille tuberculeux

MTB est susceptible d'infecter tous les tissus de l'organisme, mais seule la contamination pulmonaire a une signification épidémiologique. Les personnes atteintes de TB maladie en phase active (malade bacillifère) et à frottis positif sont potentiellement contagieuses. Cependant les patients atteints de TB à frottis négatif contribuent également à la transmission de la TB d'un taux allant jusqu'à 13%. On estime qu'un patient infecté et non traité peut ainsi contaminer 10 à 15 autres personnes en l'espace d'une année (90). Une personne bacillifère devient non contagieuse au bout de 2 semaines du traitement antituberculeux, donc la mise des patients sous un traitement antituberculeux efficace dans les plus brefs délais constitue le meilleur moyen pour interrompre la transmission.

Le risque de contamination dépend de la concentration des mycobactéries dans l'air ambiant, de la virulence des micro-organismes, de la durée d'exposition, de la prédisposition de la personne en contact et en particulier de l'état de son système immunitaire (91).

Le malade, atteint par une TB pulmonaire, émet dans l'air de fines gouttelettes (gouttelettes de Flügge) chargées de quelques bactéries, notamment lorsqu'il tousse, parle, éternue ou chante. Une toux peut ainsi produire 3000 germes et une expectoration jusqu'à 100000 germes /ml de crachat. Une partie des gouttelettes émises se dessèchent très rapidement dans l'air ambiant et forment les droplets nuclei de 1-5 µm de diamètre. Ce sont ces éléments qui jouent le rôle décisif dans la transmission de l'infection car ils restent longtemps en suspension dans l'air (environ 6 heures). De plus, en raison de leur petite taille, ils peuvent échapper au système muco-épithélial cilié de l'arbre bronchique pour parvenir aux alvéoles pulmonaire. L'agent tuberculeux est hautement virulent, un à trois germes sont suffisants pour infecter un individu au niveau de l'alvéole pulmonaire (92) (93) (94).

Les «droplet nuclei» qui ont sédimenté sur les sols et les surfaces ne constituent pas de risque. Le bacille peut rapidement être détruit par une exposition aux ultraviolets et la concentration des gouttelettes infectieuses peut être abaissée par une bonne ventilation (95).

Tout matériel biologique provenant des tissus infectés doit être considéré a priori comme infectieux ; ce risque est cependant étroitement lié à la formation d'aérosols, par exemple lors des manipulations en laboratoire (96), du traitement des plaies ou au cours d'autopsies (97).

La transmission par des objets contaminés est rare, par exemple en cas de blessure lors d'autopsies ou d'emploi d'instruments mal désinfectés (bronchoscopes) (98) (99). Les surfaces contaminées, le linge des malades ou les objets d'usage courant ne présentent pas de risque infectieux significatif (100).

Du point de vue pathogénique, après la dépose des particules au niveau des alvéoles, les bacilles sont reconnus par les macrophages et les cellules dendritiques grâce à des récepteurs type « DC-SIGN ». Ce récepteur est une lectine qui reconnaît les sucres dont est particulièrement riche le BK (101). Ensuite, ils sont phagocytés par les macrophages alvéolaires matures et seront le plus souvent détruits (102).

Cependant, les macrophages alvéolaires sont hautement permissifs vis-à-vis du MTB, favorisant sa multiplication au contraire des cellules dendritiques qui sont capables de contrôler la réplication des mycobactéries sans les éradiquer (103). Les mécanismes de défense cellulaire engagés à l'issue de la phagocytose aboutissent à la lyse bactérienne après fusion des lysosomes au phagosome. De même, après activation, les macrophages libèrent des radicaux nitrés ou oxydés pouvant entraîner la mort bactérienne. Or, MTB résiste à ces deux mécanismes dans les macrophages humains. En effet, les macrophages humains, même activés par l'interféron γ , ne tuent pas MTB. Il semble que seule une co-activation par la vitamine D permette d'obtenir une bactéricidie dans ces cellules. L'action anti-mycobactérienne des dérivés nitrés n'a été démontrée que dans les macrophages murins. Enfin, les propriétés particulières des composants de la paroi mycobactérienne (riche en lipides) permettent au bacille de résister à l'action des dérivés oxydés (104). Au sein du phagosome dans le macrophage, MTB bloque les processus naturels de la maturation vacuolaire, empêchant l'évolution du phagosome vers un phagolysosome. Deux actions essentielles, liées à la présence intracellulaire de bacilles vivants dans la vacuole, sont observées : une exclusion de la membrane de la vacuole d'une pompe à protons appelée v-ATPase qui entraîne le maintien d'un pH proche de la neutralité (6,5) (105) ; et la rétention de protéines cellulaires à la surface du phagosome empêchant sa fusion avec les lysosomes

(106). L'absence d'acidification et de fusion des lysosomes permet à MTB de survivre au sein des macrophages dans un environnement finalement moins hostile qu'il n'y paraît. Cette vacuole présente en plus l'avantage de rester un compartiment dynamique, c'est-à-dire en contact avec les voies endosomales cellulaires de biosynthèse et de recyclage (107). Cette situation permet à MTB de rester en contact avec tout ce que la cellule peut capter ou recycler ou synthétiser et que la bactérie peut utiliser comme nutriments (108).

La mort des macrophages permet la libération des facteurs solubles (chémokines, cytokines) favorisant le recrutement d'autres cellules comme les monocytes circulants, ainsi que la mise en place d'une réponse inflammatoire. Celle-ci est également liée à la libération des facteurs pariétaux bactériens. Les monocytes se différencient en macrophages et ingèrent les mycobactéries mais ne les détruisent pas. Les bacilles vont alors se multiplier d'une manière logarithmique (108).

Les CD₄⁺ se présentent en fait sous deux formes ou deux états. Immatures, elles sont capables de phagocyter les corps étrangers et présentent peu de complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH-I et -II) à leur surface. Après phagocytose ou activation par un signal (chémokines, cytokines), les CD₄⁺ deviennent matures, perdant leur capacité de phagocyter, tout en acquérant des marqueurs de migration (CCR-7) à leur surface ainsi que de grandes quantités de CMH-I et -II. C'est seulement dans cet état activé que les CD₄⁺ sont capables d'activer les lymphocytes T naïfs au sein du ganglion lymphatique (109). (108)

Deux à trois semaines après l'infection, ils atteignent les ganglions lymphatiques satellites où ils stimulent les lymphocytes T (LT) CD₄⁺ et CD₈⁺, induisant le développement d'une immunité cellulaire T (immunité cellulaire retardée). Les LT antigène-spécifiques migrent vers le site d'infection initiaux où ils entraînent une réaction inflammatoire en reconnaissant les antigènes des bactéries tuberculeuses vivantes ou mortes. Un foyer infectieux local, appelé tubercule ou « chancre d'inoculation », se constitue ainsi progressivement. Il contient des macrophages vivants, dégénérés (cellules épithélioïdes) ou fusionnés (cellules géantes), des cellules dendritiques, des bacilles et des lymphocytes T et des plasmocytes. Ce tubercule peut devenir un granulome avec nécrose centrale et fibrose, ceci joue ainsi un rôle crucial dans la limitation de la croissance bactérienne, du dommage tissulaire et de la dissémination bactérienne. Le site alvéolaire initial et les ganglions infectés constituent le complexe

primaire. La constitution et l'évolution des granulomes sont sous la dépendance de la réponse immunitaire innée et acquise de l'hôte ainsi que de la composition moléculaire pariétale des souches infectantes. Une réponse immunitaire favorable à l'hôte se traduit par la formation de petits granulomes calcifiés contenant des bacilles en état de dormance (chez 90% d'individus infectés). Cet état de latence pourrait être interrompu par réactivation suite à une baisse de la surveillance immune causée par une immunodépression ou par une infection par le Virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ou encore par une réinfection par MTB. Lorsqu'ils sont réactivés, les granulomes évoluent vers la caséification, la nécrose et la formation de cavernes. Le contenu en bacilles peut alors être évacué par les bronches. Avant la pleine expression de la réponse immune, les bacilles isolés ou présents au sein des cellules mononuclées ont pu diffuser par voie lymphatique et/ou sanguine vers d'autres sites. Leur multiplication est variable au sein des différents sites et selon les organes (110) (111) (59).

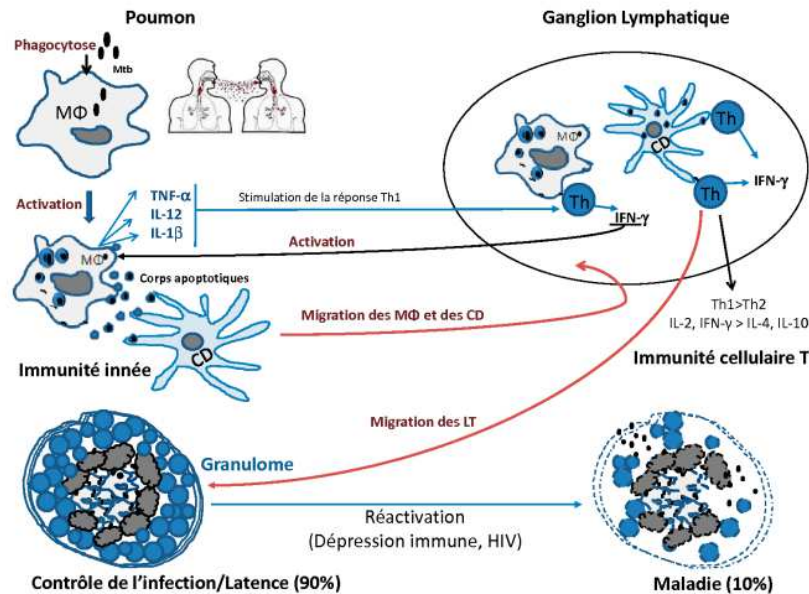


Figure 7 : La pathogénèse de la tuberculose (110).

La transmission de MTB est essentiellement interhumaine et se fait quasi exclusivement par voie aérienne. Les bacilles sont phagocytés par les macrophages alvéolaires matures et seront le plus souvent détruits. Cependant, les bacilles qui échappent à cette destruction vont se multiplier à l'intérieur des macrophages jusqu'à la mort de ces cellules. Cette mort par nécrose et/ou apoptose permet à la fois la prise en charge des débris cellulaires par les CD et la libération de facteurs solubles comme les chimiokines et cytokines nécessaires à la mise en place d'une réponse inflammatoire. Les macrophages et/ou les CD activés par les bacilles ou les corps apoptotiques migrent vers les ganglions lymphatiques satellites où ils stimulent les lymphocytes T CD4+ et CD8+, induisant le développement d'une immunité cellulaire T. En effet, ces cellules T CD4+ et T CD8 exercent leur effet protecteur par une production massive de cytokines, essentiellement l'interféron gamma (IFN-γ), nécessaire à l'activation des macrophages. Les cellules Th1 induites par l'IL-12, générée par les CD et les macrophages activés, secrètent l'IL-2 et l'IFN-γ assurant une action protectrice contre MTB. Les cellules du type Th2 secrètent les interleukines IL-4 et IL-10 qui exercent une action négative sur la réponse immune. Les lymphocytes T antigène-spécifiques migrent vers le site d'infection concourant à la formation du granulome et ainsi à l'arrêt de la croissance logarithmique des bacilles. Une réponse immunitaire favorable à l'hôte se traduit par la formation de petits granulomes calcifiés contenant des bacilles en état de dormance (chez 90% d'individus infectés). Cet état de latence pourrait être interrompu par réactivation suite à une baisse de la surveillance immune causée par une immunodépression ou par une infection au VIH ou encore par une réinfection par MTB.

2. Infection tuberculeuse

Après l'inhalation de bacilles tuberculeux, plusieurs évolutions sont possibles (112) :

- L'absence d'infection (succès des défenses innées) ;
- L'évolution d'un seul tenant vers la maladie tuberculeuse (primo-infection tuberculeuse patente ou TB de primo-infection) ;
- La phase d'infection latente prolongée puis progression vers la TB ;
- La phase d'infection latente indéfinie (bacilles quiescents) sans progression ultérieure vers la TB ;
- La phase d'infection latente suivie de l'élimination des bacilles tuberculeux.

Dans la plupart des situations, le développement d'une immunité cellulaire spécifique mettant en jeu différents types de LT limite la multiplication et la dissémination secondaire des bacilles. Le sujet reste asymptomatique. C'est la TB infection ou infection tuberculeuse ou primo-infection. La TB infection témoigne de la rencontre avec le BK. Elle se traduit par la positivité de la réaction d'hypersensibilité de type retardé à la tuberculine. Il s'agit du « virage » des réactions tuberculiniques qui s'accompagne d'un examen clinique normal, d'une radiographie thoracique normale et d'une bactériologie négative (111).

3. Tuberculose maladie

Le continuum entre la TB infection et la TB maladie dépend de plusieurs facteurs. Dans environ 10% des cas, la multiplication bacillaire est mal contrôlée et des lésions granulomateuses pathologiques apparaissent. C'est la TB maladie. Dans environ 5% des cas, une TB primaire se déclare dans les suites immédiates de l'infection en l'espace de quelques semaines ou de quelques mois. Il s'agit en premier lieu d'enfants en bas âge et des personnes immunodéprimées, avec un taux d'incidence annuelle estimé à environ 10 % en cas d'infection par le VIH (113) (114). Un autre groupe, également estimé à 5% des sujets infectés, ne présente une réactivation de la TB qu'après plusieurs années (115) (116). Par comparaison avec une contamination ancienne de très nombreuses années, une infection récente présente un risque significativement plus élevé d'évoluer vers une TB active dans les deux à trois ans qui suivent. C'est chez les personnes infectées depuis plusieurs années et qui ne présentent aucun facteur favorisant (notamment de déficience immunitaire) que le risque de réactivation est le plus faible puisqu'il est d'environ un cas pour 1000 personnes par année

(117). Ce risque de réactivation dépend de facteurs immunologiques et de l'âge de la personne contaminée (enfants en bas âge et jeunes adultes) et il est corrélé au diamètre de l'induration au test à la tuberculine (118)

La TB maladie s'accompagne de signes cliniques et/ou radiologiques et/ou d'une bactériologie positive. La maladie tuberculeuse présente différents types de localisation (91) (111).

3.1. Tuberculose thoracique

Lors du passage de la TB latente en TB pulmonaire active, le granulome tend à s'élargir, cette étape se succède par la liquéfaction et la cavitation du centre caséux, très riche en bacilles tuberculeux viables. Face à la prédominance d'oxygène aux apex et la moindre circulation lymphatique à ce niveau, les bacilles aérobies retrouvent les conditions favorables à leur évolution et reprennent leur multiplication. La fuite du matériel intra cavitaires dans les voies aériennes explique la propagation de la maladie dans d'autres régions du poumon, ce qui entraîne une réaction inflammatoire intense et provoque la toux et l'expectoration chronique. C'est à ce stade que le patient est le plus contagieux.

Au Maroc, le poumon est le lieu privilégié de la tuberculose, représentant ainsi près de la moitié des cas enregistrés, soit 48% des tuberculoses pulmonaires (TP) (119). Les TB maladies bacillifères à l'examen microscopique direct (appelées TB maladies actives) sont responsables de la transmission des bacilles tuberculeux et donc de la dissémination de la maladie dans la population. Les cas de TB confirmés bactériologiquement en 2015 ont représenté 44% des cas notifiés (119).

3.2. Tuberculose extra-thoracique

La TB extra pulmonaire (TEP) est définie comme une infection par MTB qui affecte les tissus et les organes à l'extérieur du parenchyme pulmonaire. En fait, elle est secondaire à l'atteinte du parenchyme pulmonaire par dissémination. Cette dissémination extra-pulmonaire se fait probablement via les ganglions lymphatiques qui drainent la région pulmonaire infectée ou directement par voie hématogène (120) (121).

Depuis longtemps, il a été supposé que les macrophages infectés par les bacilles gagnent ensuite la circulation sanguine et assurent ainsi la dissémination extra pulmonaire de MTB.

Cependant, plusieurs travaux ont montré que le rôle des macrophages dans la dissémination est au mieux marginal et que cette étape importante dans la pathogénie de MTB dépend essentiellement de l'interaction du bacille avec les cellules autres que les macrophages, comme les cellules épithéliales pulmonaires via l'adhésine HBHA (122).

Les bacilles disséminés peuvent ensuite se développer, surtout dans les régions extra-pulmonaires dites vulnérables du sujet infecté et y provoquer des pathologies parfois graves. Les sites extra-pulmonaires vulnérables comprennent la plèvre, les méninges, les ganglions, le péricarde, l'extrémité des os longs, le péritoine ainsi que le tractus uro-génital (122) (123).

La proportion de la forme extra-pulmonaire était la plus élevée en 2015, avec 52% des cas (dont 3% étaient des cas de primo-infection TB) (119). Elle siège par ordre de fréquence décroissant, au niveau ganglionnaire, pleural, péritonéal, ostéo-articulaire, neuro-méningé et génito-urinaire (124) (123). Les disséminations méningées et la miliaire restent en particulier dans les pays en développement cause d'une forte mortalité (125).

Dans un travail portant sur une population qui présente une atteinte extra pulmonaire dans l'état de l'Arkansas (États-Unis), trois facteurs de risques indépendants ont été identifiés comme prédisposant à une TEP (126) :

- Être de race noire ;
- Être du sexe féminin et ;
- Être infecté par le VIH

Plus récemment, un travail du même groupe suggère que l'infection par une souche Beijing/w pourrait faciliter le développement d'une atteinte extra thoracique. Dans ce travail, parmi les sujets atteints de TEP, la population asiatique était le groupe ethnique prédominant (43 %) (127). Il semble donc que l'incidence de TEP dépend non seulement de la région géographique et de l'ethnie, mais aussi de la souche de MTB (128).

En France, le délai diagnostique, en moyenne de 3 mois, est plus long que pour les TB maladies pulmonaires ; il varie suivant les localisations (111).

4. Réponse immunitaire de la tuberculose

La mise en évidence d'une réponse immunologique spécifique (explorant l'immunité cellulaire T et/ou anticorps) pourrait être un appoint très utile pour des patients tuberculeux sans

documentation microbiologique rapide. Ces tests devraient également être très utiles dans le cas des TB pauci bacillaires comme les formes extra pulmonaires et chez l'enfant.

4.1. Réponse immunitaire humorale

Le domaine de la sérologie de la TB fournit des données abondantes montrant que MTB induit une réponse immunitaire humorale à une grande variété d'antigènes mycobactériens chez les humains en dépit d'un agent pathogène intracellulaire (129).

Il est généralement admis que la réponse immunitaire à MTB est biphasique, la réponse cellulaire de l'IFN- γ étant détectée tôt et la réponse aux anticorps dirigée contre l'IL-4 détectée tard dans le cours de l'infection (130) (131) (132),

La réponse immunitaire humorale aux antigènes mycobactériens diffère en fonction du stade de la maladie (133). L'observation des titres élevés d'anticorps contre les antigènes mycobactériens chez des patients atteints de la maladie, a soutenu historiquement l'argument que ces anticorps doivent être non protecteurs. Néanmoins, diverses études montrent ou suggèrent que certains anticorps ont une fonction protectrice contre la TB (134).

Les réponses lymphocytaires B sont mises en évidence soit par le titrage des anticorps antituberculeux circulants soit par la numération des LB sécréteurs d'anticorps spécifiques. Ces techniques ne sont pas encore utilisées dans le diagnostic de la TB maladie. Elles font l'objet de recherches cliniques et malgré plusieurs publications, aucun test n'a été validé et commercialisé dans cette indication, à l'exception du test A60 qui devrait être retiré du marché du fait de son absence de spécificité (132)

4.2. Réponse immunitaire cellulaire

MTB est un exemple classique d'un agent pathogène pour lequel la réponse protectrice repose sur l'immunité à médiation cellulaire. Dans les modèles animaux d'immunité mycobactérienne, la protection peut être conférée par transfert adoptif de cellules T sensibilisées à des animaux immunologiquement naïfs (135) (136). La réponse cellulaire T n'est mise en route qu'à partir des 2 à 4 semaines suivant le contact infectieux des sujets par le bacille tuberculeux.

Son rôle fondamental dans le contrôle de la TB est confirmé par des observations faites chez les sujets infectés par le VIH. Chez ces sujets, l'effet immunologique du VIH se manifeste surtout sur l'immunité à médiation cellulaire, la partie du système immunitaire qui joue le rôle

le plus important dans la réponse de l'organisme contre MTB. Le déficit immunitaire provoqué par l'infection à VIH diminue la capacité de l'hôte de contenir l'infection tuberculeuse et de prévenir une nouvelle infection ou une réinfection par MTB. L'infection par le VIH nuit à la production de l'IFN- γ spécifique à la défense immunitaire de l'hôte contre le MTB. Les réponses déficientes de l'IFN- γ contribuent à la vulnérabilité élevée à la TB chez les personnes séropositives (137). Il modifie également la réaction d'hypersensibilité retardée qui intervient dans le test cutané tuberculinique (138). L'interaction du VIH et de la TB est bidirectionnelle, car l'infection par le VIH favorise l'évolution d'une TB latente en TB maladie active et donc contagieuse et MTB stimule les réplifications du virus VIH et l'évolution naturelle du sida (139). La survenue d'une TB évolutive pulmonaire ou extra-pulmonaire chez une personne VIH positive définit le passage au stade SIDA (classification de CDC) ou au stade III ou IV de l'OMS (140).

A l'inverse chez le sujet immunocompétent, la réactivité au test cutané tuberculinique (TCT) ou l'Intradermo-Réaction (IDR) est liée de manière épidémiologique à une résistance à une réinfection exogène avec MTB (141). Le TCT mesure la réponse in vivo d'hypersensibilité de type retardé des individus testés. Cette réponse inflammatoire locale correspond à l'accumulation de cellules mononuclées et au dépôt de collagène produits sous l'influence de la libération de plusieurs cytokines (dont l'IFN- γ) et chimiokines sécrétées par les LT spécifiques de type Th1 qui ont reconnu les antigènes présents dans la tuberculine. Un TCT positif est aussi détecté chez les patients qui présentent une TB maladie. Cependant, environ 20 à 30 % des patients ayant une TB maladie sévère ont une réponse cellulaire T diminuée voire absente. Ceci est observé en particulier chez les patients présentant une TB miliaire. Cette absence de réponse est liée d'une part à la compartimentalisation des cellules T effectrices au sein des granulomes tissulaires et d'autre part à une sidération des réponses cellulaires T effectrices associées à l'hyperproduction de médiateurs anti-inflammatoires et une augmentation des cellules T régulatrices (132).

Le vaccin par le BCG protège contre la TB. C'est une immunité acquise et à médiation cellulaire lente. Une infection par MTB, survenant après la vaccination, joue un rôle très important du fait que ce nouveau contact antigénique a un effet de rappel renforçant l'immunité existante et provoquant la mobilisation rapide des cellules qui interviennent dans

la destruction des bacilles tuberculeux. En l'absence d'une immunité préexistante, les microorganismes peuvent proliférer (59).

B. Situation de la maladie au 21ème siècle

1. Situation dans le monde

Depuis le XIXe siècle, la mortalité et la morbidité tuberculeuse décroissent en Europe. Dans les années 1950, cette baisse s'est accélérée avec la découverte des antituberculeux efficaces. Cependant, la TB n'est toujours pas une pathologie du passé. Elle reste un problème de santé publique, trop longtemps négligé.

1.1. Répartition géographique de la tuberculose humaine dans le monde

On l'observe dans toutes les régions du monde. En 2015, il y a eu le plus grand nombre de cas en Asie, avec 61% des nouveaux cas, suivie de l'Afrique, avec 26% des nouveaux cas (142).

En 2015, 87% des nouveaux cas se sont produits dans les 30 pays à forte charge de la TB. Six pays ont totalisé 60% des nouveaux cas : Inde, Indonésie, Chine, Nigéria, Pakistan et Afrique du Sud (142). Les progrès mondiaux dépendent de ceux qui seront faits dans ces pays pour la prévention et les soins de cette maladie.

1.2. Tuberculose et mortalité

Le traitement contre la TB a permis d'éviter 49 millions de décès dans le monde entre 2000 et 2015, mais il subsiste d'importantes lacunes en matière de diagnostic et de traitement (142).

Selon les estimations, 1,4 million de décès en 2015 étaient dus à la TB et 0,4 million de décès supplémentaires concernaient les cas de TB chez les personnes vivant avec le VIH (142). Plus de 95% des décès dus à la TB surviennent dans les pays à revenu faible ou intermédiaire (119).

Le nombre de décès par TB a baissé de 22 % entre 2000 et 2015, depuis 2010 c'est dans la Région de la Méditerranée orientale et dans la Région européenne que le taux de mortalité a reculé le plus rapidement (de 6.5% et 6.2% par an, respectivement) et dans la Région africaine qu'il a baissé le moins vite (baisse de 2.2% par an) (142). Néanmoins, la TB demeure l'une des 10 principales causes de décès dans le monde en 2015 avant le VIH et le paludisme.

1.3. Tuberculose et morbidité

L'objectif du Millénaire pour le développement, préconisant d'avoir maîtrisé l'épidémie de TB et inversé la tendance avant 2015, a été atteint (119).

En 2015, on estimait à 10,4 millions le nombre de nouveaux cas (incidents) de TB dans le monde, dont 5,9 millions (56 %) chez les hommes, 3,5 millions (34 %) chez les femmes (142). On estime que 1 million (10%) d'enfants ont développé la TB et 170 000 en sont morts (à l'exclusion de ceux ayant le VIH) (142). Les personnes vivant avec le VIH représentaient 1,2 million (11 %) sur l'ensemble des nouveaux cas de TB (142).

1.4. Tendances de l'évolution de la tuberculose

Dans le monde entier, le rythme de diminution de l'incidence de la TB est resté à seulement 1,5% de 2014 à 2015 (142). Il faut accélérer la tendance pour parvenir à une réduction annuelle de 4% à 5% d'ici à 2020 et atteindre les premiers jalons de la Stratégie de l'OMS pour mettre fin à la TB (142).

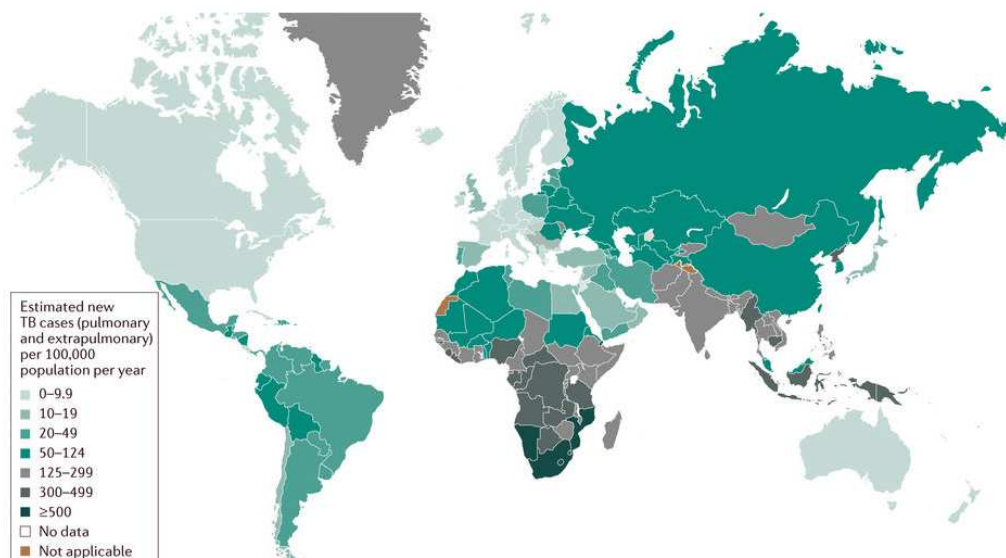


Figure 8: Le taux d'incidence mondiale de la tuberculose active (143).

2. Situation au Maroc

2.1. Incidence

En 2016, un total de 31.542 cas de TB, toutes formes confondues, a été notifié, correspondant à une incidence de 91/100.000 habitants (144).

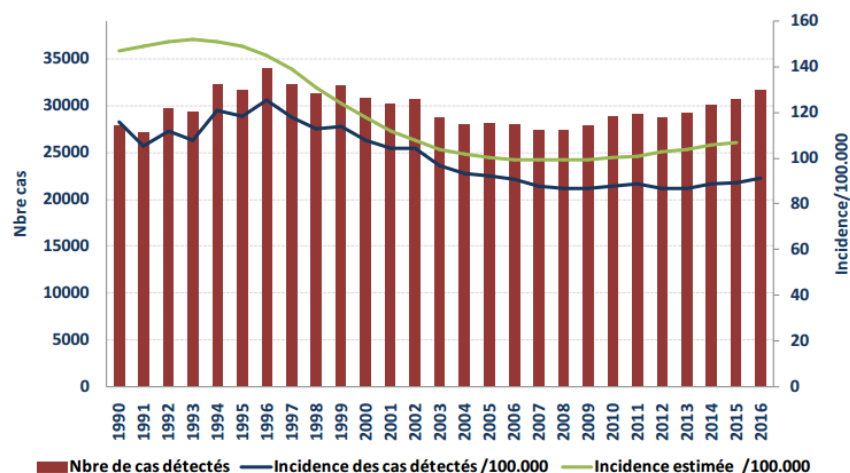


Figure 9: Evolution du nombre de cas et de l'incidence de la tuberculose au Maroc, entre 1990-2016 (144).

En 2015, le nombre de décès par TB était de 656 cas (119).

Entre 2000 et 2015, l'incidence globale a régressé de 17% et celle de la forme pulmonaire à frottis positif a régressé de 20%. La proportion de la forme extra-pulmonaire était la plus élevée en 2015, avec 52% des cas (dont 3% étaient des cas de primo-infection TB), contre 48% des cas de TP (119).

Les cas de TB confirmés bactériologiquement en 2015 ont représenté 44% des cas notifiés, contre 56% des cas diagnostiqués selon des critères cliniques (119).

La distribution selon l'âge révèle que les jeunes, âgés de 15 à 45, représentaient 63% des cas. Tandis que le sex-ratio masculin/féminin était de 1,5 (144).

87% des cas ont été rapportés par 6 Régions, correspondant à 78% de la population nationale (144).

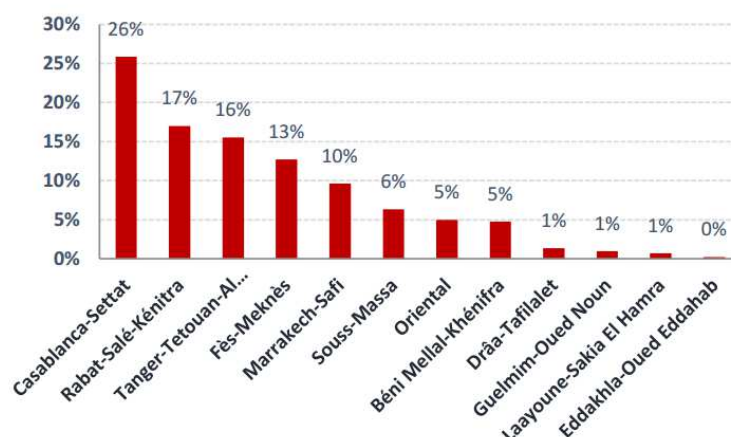


Figure 10: Distribution proportionnelle, par régions, des cas de tuberculose rapportés en 2016 (144).

La maladie s'est concentrée en milieu urbain, plus particulièrement au niveau des quartiers défavorisés des grandes villes à densité de population très élevée. Ainsi qu'au niveau des zones périurbaines des grandes agglomérations, là où les facteurs de transmission de la maladie sont favorables : habitat insalubre, pauvreté, précarité sociale, forte promiscuité humaine, malnutrition et autres (144).

L'atteinte de la cible 6-C des Objectifs du Millénaire pour le Développement, en ayant inversé la tendance de TB entre 1990 et 2015 ; selon les données officielles de l'OMS pour le Maroc (l'incidence estimée par l'OMS a baissé de 27% et la mortalité a baissé de 59%). Cela a été possible grâce aux performances du Programme National de Lutte Antituberculeuse (PNLAT), notamment (144):

- Le taux de détection de TB, passé de 75% à 83%, a permis de diagnostiquer et de prendre en charge de plus en plus de cas prévalant ;
- Le taux de succès thérapeutique a été maintenu à plus de 86% depuis 1995 ;
- Le taux d'interruption du traitement et de perdus de vue a été abaissé à 7,4% ;
- La prévalence de TB-MR a été maintenue très basse : 1% de résistance primaire et 8,7% de résistance secondaire.

La riposte à la TB a toujours constitué une priorité du Ministère de la Santé (144):

- La prise en charge thérapeutique est assurée gratuitement à l'ensemble des malades tuberculeux ;

- Le budget annuel alloué au PNLAT est passé de 30 millions MAD en 2012 à 60 millions MAD en 2016 ;
- La subvention du fonds mondial de lutte contre le sida, la TB et le paludisme de près de 85 millions MAD sur la période 2012-2017.

Cela a permis de renforcer l'offre de dépistage et de diagnostic, en réaménageant les centres de diagnostic de la TB et des maladies respiratoires et en les équipant d'appareils numériques de radiologie et de technologie de laboratoire de pointe, basée sur la biologie moléculaire (144).

2.2. Facteurs expliquant cette propagation

2.2.1. Epidémie de VIH/Sida

Paradoxalement, la maladie a réapparu à la fin des années 80 alimentée par la pandémie du VIH/sida. Dans quelques années, la TB est devenue - et continue d'être - une cause majeure de maladie et de décès chez les personnes vivant avec le VIH /sida dans les régions pauvres en ressources au monde (145). En outre, la pandémie du sida a encore favorisé l'émergence d'une TB-MR et spécialement une TB-UR rendant la situation plus délicate (146).

Au moins un tiers des personnes vivant avec le VIH dans le monde en 2015 étaient aussi infectées par le bacille tuberculeux. Chez les personnes infectées par MTB seulement, le risque à vie de développer une TB varie entre 10% et 20%. Chez les personnes co-infectées par MTB et le VIH, le risque annuel peut dépasser 10%. Les sujets infectés ayant également le VIH ont 20 à 30 fois plus de risque de développer une TB évolutive que les autres. En Afrique, le VIH est le principal déterminant de la hausse de l'incidence de la TB observée ces dix dernières années. A savoir qu'en 2015, on estime qu'il y a eu 1,2 million de nouveaux cas de TB chez des séropositifs pour le VIH, dont 71% vivaient en Afrique. Le VIH a probablement eu un effet plus faible sur la prévalence de la TB que sur l'incidence, car le virus réduit considérablement l'espérance de vie des patients atteints de TB (142).

La TB et le VIH forment une association meurtrière, chacun accélérant l'évolution de l'autre. En 2015, environ 0,4 million de personnes sont mortes d'une TB associée au VIH. Environ 35% des décès parmi les personnes vivant avec le VIH ont été dus à la TB en 2015 (142).

Parmi toutes les maladies opportunistes associées au VIH/sida, la caractéristique distinctive de la TB réside principalement dans sa diffusion aérienne auprès d'autres patients, des

travailleurs de la santé et de l'ensemble de la communauté (147) (148) (149). La pauvreté, les inégalités sociales, l'accès difficile aux systèmes de santé publique et le manque d'éducation sanitaire entraînent une situation critique de santé publique qui entrave les efforts internationaux visant à contrôler les deux maladies.

Les interactions médicamenteuses entre les traitements utilisés contre ces deux maladies, notamment entre la RIF et de nombreux antirétroviraux, la réduction de l'efficacité des médicaments et la toxicité accrue des médicaments, ont rendu la gestion thérapeutique des personnes co-infectées un défi majeur (150).

2.2.2. Emergence et la propagation de souches résistantes aux antituberculeux

La LAT repose sur l'interruption de la chaîne de transmission par une détection rapide des cas et leur traitement adéquat. Mais cet objectif est loin d'être atteint, à cause, entre autres, de leur capacité à subir des mutations génétiques qui vont les rendre résistantes aux antituberculeux (151). L'émergence de ces souches est favorisée par les échecs thérapeutiques, principalement dus aux difficultés diagnostiques, aux erreurs de prescription, aux défauts d'approvisionnement en antituberculeux dans certains pays et à une mauvaise observance (152).

Si la résistance se manifeste contre les deux antituberculeux les plus actifs, l'INH et la RIF, la souche est dite multi résistante (multidrug-resistant tuberculosis ou MDR-TB). Si la résistance inclut également les médicaments injectables (AMK, KAN et CAP) et les quinolones, la souche est dite ultra résistante (extensively resistant tuberculosis ou XDR-TB). Enfin, si la souche devient finalement résistante à tous les antituberculeux connus, elle est désignée comme totalement résistante (totally drug-resistant tuberculosis ou TDR-TB) (153).

En 2015, environ 480 000 personnes ont eu une TB-MR dans le monde. De plus, environ 100 000 personnes ont développé une résistance à la RIF (le médicament de première intention le plus efficace) et ont eu besoin d'un traitement pour la TB-MR. Le fardeau de la TB-MR pèse en grande partie sur trois pays, la Chine, la Fédération de Russie et l'Inde, représentant ensemble près de la moitié des cas dans le monde. En 2015, près de 9,5 % des cas de TB-MR avaient en fait une TB-UR (142). Au Maroc et en 2015, 160 patients ont développé une TB-MR (119)

La MR, dont la prévalence semble augmenter dans le monde, représente une des menaces très sérieuses pour le contrôle de la TB car le traitement, même s'il est disponible, fait appel à des médicaments dits de seconde ligne, moins efficaces, plus toxiques et plus coûteux (jusqu'à 100 fois le prix d'un traitement d'une souche sensible) et dure plus longtemps que le traitement standard de la TB à germe sensible (jusqu'à 2 ans). En outre, les malades atteints de TB-MR peuvent rester contagieux plus longtemps que les autres et transmettre les germes à leur entourage pendant une période plus longue, contribuant ainsi à l'extension de la maladie dans la population. La TB-MR représente donc une menace épidémiologique et une charge économique importante pour les pays qui en sont touchés (153).

2.2.3. Autres facteurs

La persistance de la TB est attribuable également aux facteurs suivants : la pauvreté, la croissance démographique et les migrations, la négligence des pouvoirs publics vis-à-vis des structures de contrôle de la maladie, l'absence ou la désorganisation des programmes de contrôle de la maladie, la mauvaise gestion des programmes de lutte antituberculeuse, le manque d'accès aux soins, le manque de moyens financiers, logistiques et humains (154).

Chez les sujets-contact de cas de TB, un petit nombre de facteurs comportent un risque important de développement de la TB : la malnutrition, l'absence de traitement ou un traitement incomplet de l'ITL, un âge entre 0 et 10 ans ou un contact au sein du ménage et une dimension de l>IDR ≥ 5 mm. D'autres facteurs significatifs de risque ont été la présence d'un cancer, l'emploi de corticostéroïdes, l'alcoolisme, l'utilisation de drogues intraveineuses, l'exposition à un cas à bacilloscopie positive des frottis, le fait d'être aborigène et un statut socioéconomique médiocre (155).

La connaissance des principaux facteurs de risque permet l'identification des populations à risque et dès lors permet une meilleure efficacité de la LAT.

2.3. Outils de la lutte antituberculeuse

2.3.1. DOTS et Halte à la tuberculose

La thérapie directement observée formait la pierre angulaire de la stratégie mondiale de lutte contre la TB lancée par l'OMS en 1995, appelée « DOTS » (pour Directly Observed Treatment Short course - traitement de brève durée sous surveillance directe), visant pour l'an 2000 de dépister 70% des cas de TB pulmonaire à microscopie positive (TPM+) et d'en guérir

85% (156). Cette stratégie comporte cinq éléments considérés comme essentiels dans la lutte mondiale contre la TB (154) :

- L'engagement pouvoirs publics.
- Un réseau de laboratoire de microscopie pour le dépistage passif des TPM+.
- L'application d'une chimiothérapie standardisée, de brève durée et supervisée.
- Un approvisionnement régulier en médicaments et en produits de laboratoire.
- Un système d'information et de notification pour suivre les tendances de la TB.

Depuis l'introduction de la stratégie DOTS, des progrès considérables ont été réalisés dans la lutte mondiale contre la TB. Durant la décennie passée : en 2005, la stratégie DOTS avait été mise en application dans 182 pays, couvrant 77 % de la population mondiale et le taux de détection des patients sous stratégie DOTS s'est accru de 11 % en 1995 à plus de 60 % à la fin de 2006. Grâce à la stratégie DOTS, 10 millions de patients ont été guéris depuis que l'OMS a déclaré la TB comme urgence médicale mondiale en 1993 (156).

Le partenariat Halte à la TB est une coalition d'organisations internationales, de pays, d'organisations nationales gouvernementales et non gouvernementales et de donateurs. Elle groupe plus de 1200 organisations qui mettent en commun leurs connaissances et leur expérience dans le cadre de six groupes de travail axés sur les domaines les plus critiques de la lutte (l'élargissement de la stratégie DOTS, la pharmaco résistance, la coïnfection TB/VIH, nouveaux outils diagnostiques, mise au point de médicament, mise au point de vaccin) (157).

Les cibles de cette stratégie sont les suivantes (157) :

- Pour 2015 : réduire la prévalence et la mortalité de 50% par rapport à 1990 ;
- pour 2050 : éliminer la TB en tant que problème de santé publique.

En 2006, l'OMS a élaboré une nouvelle stratégie Halte à la TB 2006-2015 visant la réduction considérable du poids mondial de la TB d'ici 2015, dans le sens des objectifs du Millénaire pour le développement et de ceux fixés par le partenariat Halte à la TB (160). Cette stratégie comprend les éléments suivants (160):

- Poursuivre l'extension et le renforcement d'une stratégie DOTS de qualité ;
- Prendre en charge la coïnfection TB-VIH, la TB-MR et répondre aux besoins des populations pauvres et vulnérables ;

- Contribuer au renforcement des systèmes de santé sur la base de soins de santé primaires ;
- Impliquer tous les soignants ;
- Par des partenariats, donner les moyens d'agir aux malades de la TB et aux communautés ;
- Favoriser et promouvoir la recherche.

La fin de l'année 2010 se situe à mi-parcours du Plan mondial Halte à la TB 2006-2015 et constitue manifestement le moment de mettre à jour le Plan en mettant l'accent sur les cinq dernières années conduisant à l'année butoir de 2015 (160). De ce fait, un nouveau plan pour 2011-2015 est élaboré. Ce plan intitulé Plan mondial Halte à la TB 2011-2015: Transformer la lutte vers l'élimination de la TB (Global Plan to Stop TB 2011-2015: Transforming the Fight-Towards Elimination of Tuberculosis) signale, pour la première fois, toutes les lacunes de la recherche qu'il faut combler pour mettre sur le marché des tests de dépistage rapide de la TB, des schémas thérapeutiques plus courts et un vaccin totalement efficace. Il montre également comment les programmes de santé publique peuvent favoriser l'accès universel aux soins, moderniser les laboratoires de diagnostic et adopter les tests de dépistage révolutionnaires disponibles depuis peu (161).

En 2014, l'Assemblée mondiale de la Santé a adopté la Stratégie proposée par l'OMS pour combattre la TB après 2015 et s'est engagée à la mettre en œuvre (159). Cette stratégie vise à mettre un terme à l'épidémie mondiale de TB en réduisant de 95% le nombre des décès par TB et de 90% l'incidence entre 2015 et 2035 et à ce qu'aucune famille ne supporte des coûts catastrophiques dus à cette maladie (159). Elle fixe des jalons intermédiaires pour 2020, 2025 et 2030. C'est une stratégie qui prend en compte les facteurs de risque (diabète, malnutrition, tabagisme, etc.) et les facteurs socioéconomiques qui sont souvent associés à la TB (159).

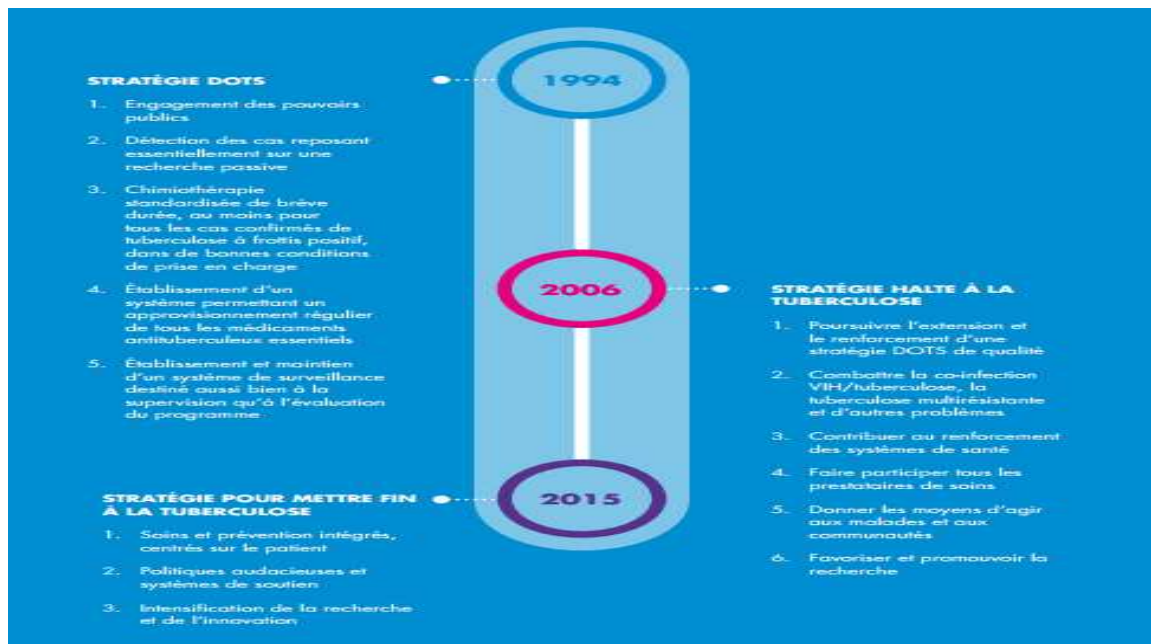


Figure 11 : L'évolution des stratégies de l'OMS contre la tuberculose (161)

2.3.2. BCG

Pour atteindre les nouveaux objectifs de fin de TB d'une réduction de 95% des décès de la TB et d'une réduction de 90% des cas de TB d'ici 2035, une approche globale est nécessaire qui comprend des vaccins nouveaux et plus efficaces, ainsi qu'un diagnostic et un traitement améliorés (162).

Le BCG actuel, est administré aux nouveau-nés dans le cadre du programme élargi de vaccination. Depuis sa première utilisation en 1921, le BCG est devenu le vaccin le plus largement administré dans l'histoire avec environ 4 milliards de doses administrées dans le monde entier. L'OMS recommande actuellement la vaccination au BCG dans les pays à forte TB endémique. La vaccination BCG est également recommandée pour les enfants présentant un risque accru d'exposition à la TB dans les pays à faible endémie et pour les personnes exposées à la TB-MR. La protection apportée par le BCG vis-à-vis de la TB maladie est estimée chez l'enfant jusqu'à 85 % pour les formes graves (miliaires et méningites) et jusqu'à 75 % pour les formes pulmonaires (163).

Bien que le vaccin BCG ait été utilisé depuis un siècle dans de nombreux pays, il ne protège pas contre la TP chez l'adulte et même cause une BCGite disséminée dans une population VIH séropositive (163). L'efficacité de BCG a varié de 0% dans les zones tropicales à environ

80% en Amérique du Nord et en Europe du Nord. L'inefficacité est expliquée par le fait que le BCG est incapable d'induire une longue durée de mémoire immunitaire après la vaccination (164) et que l'exposition préalable aux mycobactéries environnementales interfère avec l'efficacité du BCG (165).

Il est impossible d'utiliser BCG pour éliminer l'infection par MTB ou pour prévenir l'apparition et la réactivation de la TB (166). Il existe donc un besoin urgent de vaccins nouveaux, sûrs et efficaces qui protègent contre toutes les formes de TB, y compris les souches résistantes aux médicaments, dans tous les groupes d'âge, y compris les personnes atteintes du VIH.

Seize différents candidats vaccins contre la TB sont actuellement en essais cliniques, avec des études approfondies ou actuellement en cours de preuve (phase IIb) sur le terrain et beaucoup plus dans le développement préclinique. Ces candidats vaccins comprennent cinq qui sont basés sur des mycobactéries de cellules entières et le reste sont diverses approches basées sur des sous-unités dans lesquelles les antigènes de MTB sont exprimés sous forme de protéines recombinantes qui sont formulées avec des adjuvants ou présentées dans des vecteurs viraux recombinants. Les principales pierres d'achoppement dans le développement du vaccin contre la TB à ce jour ont été le manque de corrélation immunologique de la protection, la réalité selon laquelle la protection dans les modèles de prévention préclinique ne reflète pas les données d'efficacité sur le terrain et, dans ce contexte, la nécessité d'un modèle de défi humain pour aider à rationaliser la sélection des candidats pour procéder à des études d'efficacité. La poursuite de la recherche dans ces domaines est essentielle pour faciliter et dégrader le développement des produits vaccins et se déroule parallèlement à l'avancement des candidats dans la clinique (167).

2.3.3. Traitement

Le traitement antituberculeux a deux objectifs principaux. Tout d'abord, il est nécessaire de tuer rapidement ces bacilles vivant de façon extracellulaire dans les cavités pulmonaires, qui sont métaboliquement actives et se divisent en continu ; Ceci est nécessaire pour atteindre la négativité du crachat et donc empêcher une nouvelle transmission de la maladie. Deuxièmement, il est nécessaire d'obtenir une stérilisation complète et l'élimination des bacilles moins actifs retrouvés dans les lésions fermées acides et anoxiques et de tuer les

bacilles semi-dormants vivant en intracellulaire dans d'autres tissus de l'hôte, sinon ces bacilles peuvent persister et seront responsables des rechutes subséquentes de la TB. L'INH est le médicament ayant le plus grand effet bactéricide, alors que RIF et PZA ont le plus grand effet stérilisant. Ces raisons, ainsi que la prévention de la résistance aux médicaments, favorisent l'utilisation d'une thérapie combinée pour le traitement de la TB (168).

Le traitement actuel de courte durée pour l'élimination complète des bacilles actifs et dormants comportent deux phases :

- Phase initiale : trois ou plus de médicaments (généralement INH, RIF, PZA et EMB ou SM), qui sont utilisés pendant deux mois et permettent un abattement rapide des bactéries actives, ce qui entraîne une négativation des expectorations.
- Phase de continuation : comporte moins de médicaments (généralement INH et RIF), qui sont utilisés pendant 4 à 7 mois, visant à tuer les bacilles restants ou inactifs et à prévenir la récurrence.

Les médicaments pour traiter la TB sont habituellement classés comme médicaments de première et de deuxième intention. Traditionnellement, il existe cinq médicaments de première ligne : INH, RIF (ou rifabutine, peu d'action sur cytochrome P450), EMB, PZA et SM. Les médicaments de deuxième ligne comprennent : Aminoglycosides (AMK, KAN), Polypeptide (CAP), Fluoroquinolones (MFX, LFX et GFX), Thioamides (ETO, PTO), CS, PAS, Thiocétazone, CFZ (Lamprène), Amoxicilline-acide clavulanique, Clarithromycine et LN2 (Zyvoxid) (169).

Cependant, l'observance insuffisante du traitement en raison de sa longueur, de sa complexité et de la toxicité associée, ainsi que l'inefficacité des activités de contrôle augmentent le risque d'apparition de formes résistantes aux médicaments, qui sont beaucoup plus difficiles et beaucoup plus onéreuses à traiter. La recherche de nouveaux médicaments est donc une priorité, afin de raccourcir et simplifier le traitement de la TB et d'améliorer le traitement de la TB chez les personnes infectées par le VIH, en utilisant des médicaments qui n'interagissent pas avec les médicaments antirétroviraux. Il y a actuellement dans le monde plus de 30 molécules recensées dans la liste des médicaments potentiels contre la TB, dont 11 sont en phase de développement clinique. Des essais sont en cours pour raccourcir la durée du traitement de 6 à 4 mois par l'inclusion des Fluoroquinolones (GFX, MFX) et de nouveaux

candidats prometteurs sont actuellement testés en phases de développement précliniques et cliniques (156).

2.4. Lutte antituberculeuse au Maroc

2.4.1. Histoire de la lutte contre la tuberculose au Maroc

La lutte antituberculeuse au Maroc date des années 1900, quand l'incidence de la TB a connu une incidence 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 (158).

La déclaration des cas a été instaurée en 1930 par une circulaire du Directeur de la Santé et de l'Hygiène Publiques qui a précisé la définition des nouveaux cas et les principes de la déclaration (24). Celle-ci n'est devenue effective et régulière qu'en 1950 (24). Des études pour évaluer le risque annuel (RA) d'infection tuberculeuse dans la population marocaine ont été menées régulièrement avec l'appui de l'OMS révélant une réduction du RA qui est passée de 7,8 % au début des années cinquante à 2,5% au début des années quatre-vingt-dix (24). La vaccination par le BCG par voie buccale introduite en 1935 dans certaines régions et ciblant des populations spécifiques (les nouveaux nés, les enfants et les adolescents) n'a été systématisée qu'en 1970 (24). Elle a été administrée par voie sous cutanée pour les marocains recrutés pour travailler en France en 1939 (158).

Les premières campagnes internationales de vaccinations BCG soutenues par l'Organisation Mondiale de la Santé ont été lancées en 1949-1950 puis consolidées à partir de 1969 par un vaccin lyophilisé de l'Institut Pasteur, obligatoire à la naissance (158). Cette période se distingue par la création de la première Ligue Marocaine Contre la TB en 1959 (158).

L'introduction du traitement court utilisant la RIF dans une dizaine de provinces s'est faite au début des années 80 (158).

Le programme national de lutte antituberculeuse mis en place à la fin des années soixante-dix a connu une restructuration (1991) et de nombreux développements dont l'implantation de la stratégie «Direct Observed Treatment» (DOTS) préconisée par l'OMS (158). Cette dernière a visé pour l'an 2000 de dépister 70% des cas de TB pulmonaire à microscopie positive (TPM+) et d'en guérir 85%.

Pour appuyer la stratégie DOTS, un partenariat Stop TB de l'OMS a été créé en 2000 (158). S'inscrivant dans cette dynamique globale, le Maroc a fourni des efforts énormes et a pu atteindre avec succès les objectifs définis par l'OMS en terme de dépistage et de succès thérapeutique (le taux annuel de détection des cas de TB à plus de 80% et le taux annuel de succès thérapeutique à plus de 85%), ce qu'il lui a valu la médaille d'or en 2004 (158).

En 2006, à l'issue de la stratégie Halte à la TB 2006-2015, le Maroc l'a adopté et s'est engagé à la mettre en œuvre dans toutes ses composantes telles qu'elles sont définies par l'OMS et le Partenariat mondial Halte à la TB (158). En 2010, le plan stratégique de lutte antituberculeuse (LAT) a été revu donnant lieu à un plan couvrant la période 2011-2015, adapté à la situation de notre pays et orienté selon ses priorités. Cette stratégie a pour but de réduire la charge de morbidité de la TB dans la population marocaine dans le sens des objectifs du Millénaire pour le développement et de ceux approuvés par le partenariat Halte à la TB (158).

2.4.2. Plan national d'accélération de la réduction de l'incidence de la tuberculose 2013-2016

L'incidence des cas notifiés de TB pulmonaire à frottis positifs (TPM+) diminue régulièrement d'année en année d'environ 3% par an. Un taux qui est loin de l'objectif fixé par le programme national de lutte contre la TB (158). Face à la volonté d'infléchir la tendance de l'incidence de la maladie, un nouveau plan intitulé : Plan d'accélération de la réduction de l'incidence de la TB 2013-2016, est élaboré (158). Ce plan a pour objectif d'atteindre un taux annuel de diminution de l'incidence de la TB de 6% d'ici 2016, en vue de l'atteinte de l'objectif d'élimination de la TB d'ici 2050 (158).

Le plan national d'accélération de la réduction de l'incidence de la TB 2013-2016 s'appuie sur les axes suivants (158) :

- L'amélioration du dépistage et l'accessibilité au diagnostic à travers le renforcement du réseau de laboratoire, l'implication soutenue des praticiens de tous les secteurs et le ciblage des populations à haut risque.
- L'amélioration de la prise en charge de la TB à travers :
 - ✓ L'application des normes et standards nationaux de la prise en charge thérapeutique à tous les niveaux du système de soins ;
 - ✓ L'intégration de l'appui psychosocial des malades tuberculeux ;
 - ✓ L'amélioration de l'accessibilité au traitement et la disponibilité des médicaments ;

- ✓ La mise à niveau de l'infrastructure et de l'équipement ;
- ✓ L'affectation et la mobilisation des ressources humaines nécessaires.
- Le renforcement du partenariat et l'intersectorialité en vue d'une réponse à la fois intégrée, holistique et globale, etc. à travers l'élaboration et la mise en œuvre d'interventions concrètes définies dans les plans d'appui.
- L'amélioration de la surveillance épidémiologique et le développement de la recherche dans le domaine de la lutte antituberculeuse.
- La mise en place de mécanismes de coordination et de gestion pour assurer une bonne gouvernance à tous les niveaux central, régional et provincial.

2.4.3. Plan Stratégique National de lutte antituberculeuse 2017-2021

Bien que l'incidence estimée par l'OMS ait baissé d'une moyenne annuelle de 1,1% entre 1990 et 2015, cette baisse reste lente et en deçà des aspirations nationales, tant les déterminants de la maladie sont multiples et se rapportent, essentiellement, aux conditions socio-économiques (144).

Aussi, les actions à entreprendre doivent dépasser le seul domaine médical pour cibler ces déterminants, selon une approche multisectorielle, voire même communautaire (144).

Le chantier de la régionalisation avancée dans notre pays et l'engagement politique au plus haut niveau à l'atteinte des Objectifs de Développement Durable (ODD) constituent d'excellentes opportunités de redynamisation de la lutte contre la TB en vue d'y mettre fin à l'horizon de 2030 (144).

Dans ce cadre, le Plan Stratégique National de lutte antituberculeuse 2017-2021 est en cours de finalisation par le Ministère de la Santé et ses partenaires institutionnels et de la société civile (144). Ce plan s'articule parfaitement avec l'initiative mondiale de l'OMS dite « Stratégie pour mettre fin à la TB 2016-2035 », ainsi que son plan mondial 2016-2020 (144). Ses objectifs stratégiques sont (144):

- Réduire le nombre de décès liés à la TB de 40% en 2021 par rapport à l'année 2015
- Augmenter le nombre annuel de cas détectés à 36.300 à l'horizon de 2021 ;
- Atteindre un taux de succès thérapeutique d'au moins 90% à partir de 2018.

C. Manifestations cliniques et radiologiques de la tuberculose

1. Primo-infection tuberculeuse

Sur le plan clinique, la primo-infection tuberculeuse est en règle générale asymptomatique (171). On observe une primo-infection tuberculeuse chez les enfants nouvellement infectés et chez les patients à infection VIH. Le diagnostic peut aussi occasionnellement être posé chez des adultes, en particulier dans le cadre d'enquêtes d'entourage. La plupart du temps, le diagnostic est associé à un test à la tuberculine, respectivement à un test IGRA positifs (91) (170).

La primo-infection est le plus souvent latente (tout se résume à une conversion de l'IDR), mais elle peut être patente, responsable de signes généraux, de symptômes respiratoires, et/ou d'anomalies radiologiques (171). L'expression clinique la plus fréquente est un syndrome infectieux avec ou sans splénomégalie. Le tableau clinique peut être réduit à l'association d'une asthénie, d'une anorexie et d'un amaigrissement sans cause bien précise identifiée, voire à une simple asthénie isolée. D'autres manifestations sont l'érythème noueux, la kérato-conjonctivite phlycténulaire et les adénopathies externes. L'érythème noueux est fait de nodosités de 1 à 4 cm de diamètre, enchâssées dans le derme et l'hypoderme, saillantes sous la peau, douloureuses, siégeant à la face antéro-interne des jambes, s'étendant aux cuisses et au bord cubital des avant-bras ; l'éruption fait suite à des arthralgies, voire à un énanthème et évolue par poussées successives en trois à cinq semaines. La kérato-conjonctivite est caractérisée par une rougeur conjonctivale et de petites phlyctènes de la taille d'une tête d'épingle. Les adénopathies peuvent être cervicales sous-maxillaires, axillaires ; sans traitement, elles évoluent vers la caséification, le ramollissement et la fistulisation. La radiographie thoracique montre, dans la forme typique, le complexe ganglio-pulmonaire : petit nodule parenchymateux associé à une adénopathie médiastinale homolatérale. Les anomalies radiologiques peuvent être également sous formes d'un trouble de la ventilation, une pleurésie ou des opacités nodulaires (28).

2. Réactivation de la tuberculose pulmonaire (172) (28) (171) (173)

Dans certains cas le tableau clinique est celui d'une maladie respiratoire aiguë : hémoptysie, épanchement pleural, pneumothorax, infection broncho-pulmonaire aiguë ne régressant pas de façon satisfaisante sous antibiothérapie usuelle, syndrome pseudo grippal, bronchites

récidivantes. Mais le plus souvent, les symptômes s'installent progressivement et persistent. La toux d'abord sèche devient productive, l'expectoration, d'abord muqueuse, devient purulente. L'asthénie ne cède pas au repos, l'amaigrissement peut être très rapide, la fièvre bien tolérée passe souvent inaperçue, accompagnée de sueurs à prédominance nocturne. Tous ces signes sont inconstants et évoluent de façon chronique et insidieuses. L'interrogatoire est donc essentiel.

En pratique dans les zones endémiques, tout symptôme respiratoire et toute anomalie radiologique persistant depuis plus de deux semaines, doivent faire suspecter la TB et devrait être exclue au moyen d'une radiographie thoracique et de tests microbiologiques.

Les anomalies radiologiques usuelles sont caractéristiques, mais non pathognomoniques, par leur localisation et leur aspect :

- Elles siègent dans les segments apicaux et postérieurs des lobes supérieurs ou segments supérieurs des lobes inférieurs ;
- Les anomalies suivantes peuvent être isolées ou associées, souvent bilatérales, accompagner une pleurésie : nodules de taille variable, isolés, confluents, localisés ou dispersés ; opacités en plages homogènes ou non, rarement systématisées ; cavités solitaires ou multiples ; des adénopathies médiastinales satellites sont fréquentes

Par conséquent, même en présence de lésions hautement suggestives de TB dans une radiographie et dans un contexte clinique et épidémiologique favorable, le diagnostic de la maladie ne doit jamais être admis sur la base uniquement de données radiologiques. Cependant, la radiographie thoracique est toujours une bonne méthode pour exclure la TB. Par conséquent, si un patient immunocompétent a une radiographie normale, on est pratiquement certain qu'il ne souffre pas de TB pulmonaire.

La scanographie n'est pas indispensable mais permet de mieux observer les lésions, notamment les cavernes et les adénopathies.

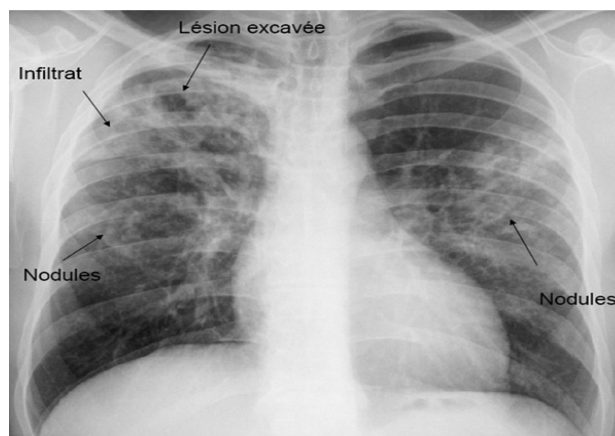


Figure 12 : Radiographie thoracique de face montrant les différentes lésions tuberculeuses (174).

3. Tuberculose disséminée ou miliaire (28) (175) (171)

La TB miliaire est le résultat de la dissémination hémotogène de BK soit à partir d'une infection tuberculeuse récente, soit à partir d'une réactivation d'un foyer tuberculeux ancien. Elle touche en priorité les enfants en bas âge, les personnes âgées et les sujets immunodéficients.

Des facteurs prédisposant ont été décrits tels que l'alcoolisme, une cirrhose, un cancer, la grossesse en particulier dans la période du post-partum, un traitement par immunosuppresseurs. En revanche, il n'existe souvent aucun antécédent de TB.

En raison de la dissémination du BK, les manifestations cliniques sont diverses et peu spécifiques, mais réalisent un tableau infectieux sévère avec insuffisance respiratoire se majorant progressivement : fièvre, amaigrissement, anorexie, asthénie, toux, dyspnée, plus rarement céphalée et confusion liées à une méningite tuberculeuse, hépatomégalie, adénopathies et splénomégalie. Le seul signe spécifique de la miliaire tuberculeuse est le tubercule de Bouchut qui est une tache blanche à bords flous, peu saillante, siégeant sur la rétine près d'un vaisseau. Il convient de rechercher d'autres localisations de la TB : méningite, péricardite, péritonite, atteinte hépto-spléno-ganglionnaire.

Le terme de miliaire provient de la similarité des lésions miliaires tuberculeuses (granulomes de 1-2 mm de diamètre) avec un aspect en «grains de mil » vues sur la radiographie du thorax dans 85 % des cas sous la forme des opacités micronodulaires diffuses aux deux champs; d'autres anomalies radiologiques dues à la TB sont observées. Le diagnostic doit être évoqué

sur des symptômes cliniques car la radiographie pulmonaire peut être normale à un stade précoce. Le scanner permet l'identification des localisations pulmonaires et extra-pulmonaires.

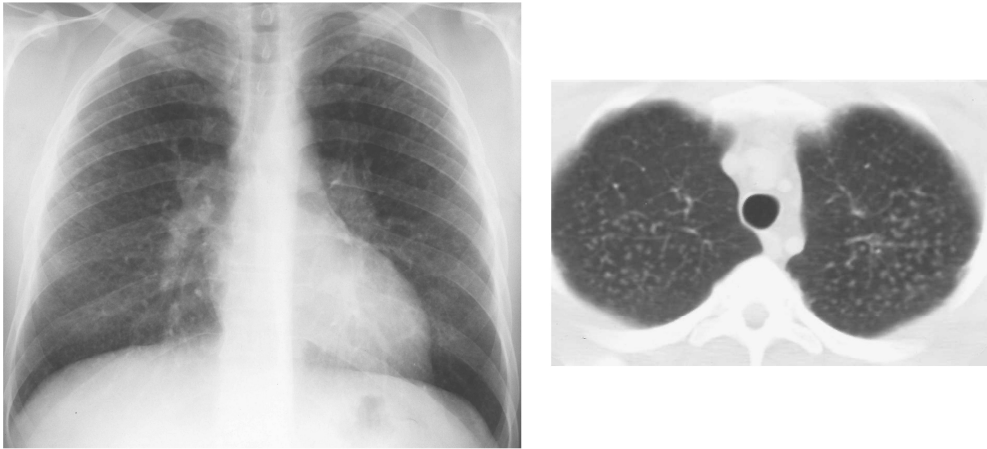


Figure 13: Images radiologiques montrant un syndrome interstitiel micronodulaire bilatéral et disséminé (176).

Dans le doute diagnostique, un traitement antituberculeux permettra de faire céder la fièvre en une dizaine de jours avant que les complications ne surviennent. Le syndrome de détresse respiratoire aiguë (miliaire asphyxiante), une coagulation intra vasculaire disséminée, la méningite tuberculeuse, l'insuffisance hépatique secondaire à une hépatite tuberculeuse, la pancréatite aiguë, péritonite secondaire à une perforation intestinale, l'insuffisance rénale aiguë (IRA), pancytopénie, l'insuffisance surrénalienne subaiguë etc., constituent parmi autres les complications les plus redoutables de la miliaire tuberculeuse.

4. Tuberculose extra pulmonaire

4.1. Tuberculose ganglionnaire (177) (128) (171) (28)

La TB ganglionnaire (TG) constitue avec l'atteinte pleurale, une des formes les plus fréquentes de la TB extra pulmonaire. La prévalence de la TG est plus élevée dans les pays en développement par rapport aux pays développés. L'incidence est de 20% dans des études réalisées au Maroc. Elle est souvent observée chez les enfants et moins fréquemment chez les sujets de race blanche, le ratio homme/femme : est de 1/1,3 avec une légère prédominance chez la femme.

Il existe généralement peu de symptômes généraux. Classiquement, les adénopathies prennent l'aspect de masses de consistance dure, non mobiles et douloureuses. La peau en regard est d'abord normale, mais progressivement elle se modifie avant fistulisation à la peau, fistulisation qui cicatrise difficilement. L'atteinte est souvent bilatérale et des ganglions non contigus peuvent être atteints. Les formes généralisées sont particulièrement décrites au cours du sida.



Figure 14 : Adénite tuberculeuse chez une jeune patiente.

Dans une étude marocaine portant sur 357 cas d'adénite tuberculeuse, les adénopathies étaient cervicales dans 95%, médiastinales dans 5,1%, abdominales dans 3,7%, axillaires dans 2,8% et inguinales dans 0,3% des cas. La même étude a montré que 28,6% des patients se présentaient d'emblée avec une TB pulmonaire concomitante, d'où l'importance de toujours effectuer une radiographie de thorax (voire au moindre doute un scanner) et des cultures d'expectorations induites ou spontanées lors du bilan d'adénites présumées tuberculeuses. Notons que, dans les recommandations les plus récentes de l'OMS sur la TB, les adénopathies intra thoraciques (médiastinales) sont considérées comme TBE.

Le diagnostic d'atteinte tuberculeuse ganglionnaire est établi par biopsie ou ponction avec étude microbiologique directe et culture du matériel obtenu et examen histo-cytologique. Si le bacille tuberculeux n'est pas retrouvé, un granulome avec nécrose caséuse peut être mis en évidence chez les sujets immunocompétents. Dans le cas d'adénopathies profondes, en particulier médiastinales, le diagnostic différentiel est difficile avec un cancer ou un

lymphome. Un aspect tomodensitométrique hypodense du centre du ganglion et prise de contraste à sa périphérie est évocateur d'une origine tuberculeuse.

4.2. Tuberculose pleurale (171) (128) (28) (172) (178)

Avec l'atteinte ganglionnaire, la TB pleurale est la forme la plus fréquente de TBE et représente 3 à 5 % des cas de TB chez des sujets non infectés par le VIH dans les pays industrialisés. Elle est plus fréquente lors d'infection par le VIH, chez l'enfant et l'adulte jeune et survient classiquement trois à six mois après la primo-infection tuberculeuse. Les atteintes pleurales tuberculeuses sont à l'origine soit d'une pleurésie sérofibrineuse, soit d'un empyème.

L'extension à la plèvre se fait par suffusion de contiguïté. Les pleurésies tuberculeuses sont classiquement décrites dans les semaines ou mois suivant une primo-infection. Cependant, cette atteinte séreuse peut être concomitante d'une TB pulmonaire active ou d'une miliaire. L'épanchement pleural en lui-même peut rester asymptomatique, en particulier s'il est inférieur à 300 ml. Les symptômes les plus fréquents sont la toux non productive et la douleur thoracique pleurétique. Une toux accompagnée d'expectoration peut être présente en cas d'atteinte pulmonaire associée, ce qui est fréquent. Le patient peut être essoufflé en cas d'épanchement important. Des signes généraux tels que la fièvre subaiguë, la perte de poids, les sueurs nocturnes, l'anorexie et le malaise peuvent être présentes. En règle générale, une maladie aiguë est plus susceptible de se produire chez les patients plus jeunes qui sont plus immunocompétents. La ponction pleurale ramène un liquide citrin exsudatif (30-50 g/l de protéine, densité supérieure à 1,018, coagulation spontanée). La cytologie est pauvre en cellules mésothéliales et en éosinophiles, riche en lymphocytes. L'isolement du BK est relativement rare (environ 30 %). La méthode diagnostique de choix pour obtenir du matériel en vue d'un examen histologique et microbiologique reste la biopsie à l'aiguille d'Abrams, préférée à la thoracoscopie dans les pays à haute endémie et à condition de disposer des compétences nécessaires. La biopsie pleurale peut mettre en évidence des granulomes tuberculoïdes et permettre l'isolement du bacille. L'évolution naturelle de l'épanchement tuberculeux chez le sujet immunocompétent est la guérison spontanée en quelques semaines à quelques mois dans 90 % de cas mais 40 à 60 % des patients vont présenter une réactivation

ou une progression vers une TB pulmonaire ou extra pulmonaire, d'où l'indication à un traitement classique.

L'empyème tuberculeux, rare aujourd'hui, est un abcès tuberculeux pleural. Il se développe habituellement dans le tissu fibreux résultant d'une pleurésie tuberculeuse, d'un pneumothorax thérapeutique ou d'une thoracoplastie, ceci dans le contexte d'un traitement antituberculeux non satisfaisant. L'infection peut être d'évolution insidieuse et peu symptomatique (asthénie, fébricule, douleur thoracique). À la différence de la pleurite tuberculeuse, le liquide pleural de l'empyème est purulent, le plus souvent positif à l'examen microscopique pour recherche de BAAR et très cellulaire (> 100 000 neutrophiles). Le pH est inférieur à 7,20, le glucose inférieur à 20 mg/dl et le taux de LDH est supérieur à 1000 UI/L. La thoracentèse thérapeutique est recommandée afin d'éviter un effet de « couenne » cicatricielle engainant le poumon. L'« empyema necessitatis » est une complication rare de l'empyème tuberculeux : le matériel caséux provenant de la plèvre fistulise à la peau. Plus rarement, le contenu caséux peut se drainer vers l'œsophage, la colonne vertébrale, le tissu cellulaire sous-cutané para vertébral, le rétro péritoine ou le péricarde. Radiologiquement, l'épaississement pleural témoigne de l'accumulation du pus, le scanner thoracique ou la résonance magnétique sont les examens de choix pour le diagnostic des complications.

4.3. Tuberculose digestive (124) (128) (28) (171)

Elles représentent environ 5 % de l'ensemble des localisations extra pulmonaires. Cette fréquence est plus importante et pourrait doubler à tripler chez les sujets séropositifs. Au cours de la TB abdominale tous les organes peuvent être atteints et les localisations les plus habituelles de la TB digestive sont l'intestin grêle (44%), le caecum (35%) et l'iléo-caecum (16%). L'atteinte isolée du côlon est rare, elle est estimée entre 2 et 9% et dominée par l'atteinte du côlon droit. Les autres localisations abdominales concernent les ganglions, le péritoine, le foie et la rate.

La péritonite tuberculeuse est l'atteinte abdominale la plus fréquente. Elle résulte soit de la réactivation d'une TB latente suite à la dissémination hématogène d'un foyer pulmonaire, soit de la rupture d'un ganglion mésentérique, soit encore de l'extension d'une infection urogénitale ou intestinale. La TB péritonéale est généralement douloureuse et s'accompagne souvent d'une augmentation du volume abdominal. La fièvre, un amaigrissement et une

anorexie sont assez fréquents. La péritonite tuberculeuse peut coexister avec une cirrhose et une ascite ; une tension abdominale chez un malade ascitique doit évoquer une infection abdominale et faire pratiquer une ponction d'ascite. Cette dernière ramène un liquide exsudatif contient entre 50 et 10 000 leucocytes/ μ l, des lymphocytes, mais aussi des polynucléaires neutrophiles. L'examen direct retrouve exceptionnellement des bacilles tuberculeux et les cultures ne sont positives que dans 50 % des cas. Il n'est pas rare que le diagnostic soit posé par l'aspect macroscopique typique (nodules ou plaques blanchâtres au niveau du péritoine) lors d'une laparoscopie ou laparotomie exploratrice et confirmé histologiquement après biopsie péritonéale. Les taux sanguins de CA-125 sont en général élevés, bien que souvent inférieurs à 500 UI/ml. La diminution des taux de CA-125 sous traitement antituberculeux semble être un bon indicateur de la réponse au traitement. La radiographie du thorax peut être utile pour attester de l'atteinte secondaire.

L'atteinte digestive peut être primitive par ingestion directe de *Mycobacterium* ou secondaire à des lésions pulmonaires très bacillifères par voie hématogène ou lymphatique. La symptomatologie des TB du tube digestif diffère, bien entendu, de celle des TB péritonéales. Le tableau clinique de la TB digestive est en général peu spécifique, se traduisant par un amaigrissement, une fébricule, un ballonnement abdominal douloureux, une constipation, une ascite, une diarrhée avec parfois un syndrome dysentérique en cas de localisation recto-sigmoïdienne, voire une forme pseudo-tumorale. Des complications sont à craindre dont la perforation, le plus souvent cloisonnée, la fistulisation, l'occlusion, l'hémorragie ou la malabsorption en cas d'atteinte iléocæcale. L'atteinte intestinale, prédomine au carrefour iléocæcal et se présente radiologiquement comme des anses agglomérées, à paroi épaissie de façon habituellement concentrique. Cet épaississement peut être hétérogène avec des foyers hypo denses en rapport avec de la nécrose caséuse. En général, le diagnostic est posé par l'aspect typique à la colonoscopie, avec présence des érosions muqueuses, des ulcérations avec des zones nécrotico-hémorragiques, des zones de rétrécissement ou de sténose infranchissable avec des bourgeons autour. Cependant, les biopsies per-endoscopiques ne sont pas toujours concluantes. Des colorations spécifiques (Ziehl-Nilson) et une mise en culture seront systématiquement réalisées (positive dans 42 à 69%). Le recours à une laparotomie peut être justifié en urgence devant une complication (sténose, occlusion, masse compressive, mise

à plat de certaines cavités caséifiées, perforation et fistule), ou différée dans un but diagnostique.

Des TB 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 et des cholangites tuberculeuses ascendantes ont été aussi décrites. La TB est une cause fréquente d'hépatite granulomateuse, habituellement asymptomatique, ou du moins associée à une élévation isolée des phosphatases alcalines.

4.4. Tuberculose ostéoarticulaire (171) (28) (128) (172) (179)

Elles représentent environ 5 % des TEP.

La spondylodiscite tuberculeuse ou Mal de Pott, est l'atteinte ostéoarticulaire tuberculeuse la plus fréquente dans les pays en voie de développement. L'atteinte vertébrale est le plus souvent d'origine hématogène, plus rarement par inoculation directe. L'infection touche d'abord l'os spongieux, hautement vascularisé, puis s'étend vers le disque intervertébral avec formation d'abcès froids para vertébraux pouvant entraîner des déformations rachidiennes et des tassements vertébraux ainsi que des complications neurologiques par compression. La TB rachidienne est chronique et insidieuse. Les symptômes initiaux associent la présence de rachialgies localisée et reproductible à la palpation, accompagnée de symptômes généraux (fièvre, asthénie, perte de poids et sueurs nocturnes). L'évolution est marquée par la survenue d'une symptomatologie neurologique déficitaire. Les atteintes multi-étagées sont fréquentes et doivent être recherchées systématiquement (par IRM). Les localisations les plus fréquentes sont thoracique basse et lombaire haute. Les méthodes diagnostiques de choix sont l'imagerie de la colonne vertébrale par scanner ou IRM. La ponction biopsie sous contrôle cytologique permet d'obtenir la preuve bactériologique. La recherche d'un terrain d'immunodépression doit être une règle, devant toute TB vertébrale.

Des ostéoarthrites tuberculeuses touchant les structures périphériques sont également décrites. Dans la majorité des cas, elles se présentent sous la forme d'une mono arthrite chronique, touchant plus fréquemment la hanche ou le genou. Des abcès froids peuvent se développer au contact de l'articulation et se fistuliser. Des coïnfections à germes banals peuvent coexister, voire même être le mode de révélation de l'infection tuberculeuse sous-jacente. En l'absence

d'une autre atteinte tuberculeuse extra-articulaire, la biopsie osseuse à visée microbiologique et histologique est nécessaire au diagnostic.

4.5. Tuberculose urogénitale (28) (180) (181) (182)

La TB urogénitale (TUG) occupe le 5ème rang après les localisations tuberculeuses pulmonaires, ganglionnaires, ostéo-articulaires et digestives, soit 260 à 305 nouveaux cas/an. D'après une expérience de 10 ans du service de l'urologie « B » à l'hôpital Avicenne de Rabat, la TUG touche avec prédilection l'adulte jeune, avec un âge moyen des patients qui est de 40 ans. Une légère prédominance masculine a été enregistrée dans la même série et qui est expliquée par la fréquence de l'atteinte génitale aisément accessible à l'examen clinique chez l'homme.

Après ensemencement par voie hématogène, le bacille tuberculeux est présent le plus souvent dans les deux reins, même si dans la majorité des cas, la maladie n'est cliniquement qu'unilatérale. Secondairement, l'infection se propage par voie urinaire descendante, avec extension à la médullaire rénale, aux papilles et aux calices puis aux voies excrétrices urinaires. Chez l'homme, l'atteinte génitale peut se faire par extension d'une localisation urinaire par voie canalaire rétrograde ou par voie hématogène à partir d'un foyer à distance, notamment pulmonaire. Chez la femme, l'atteinte génitale se fait exclusivement par voie hématogène. Une transmission sexuelle serait possible, comme l'évoquent de rares cas rapportés dans la littérature.

La TUG est caractérisée par un grand polymorphisme clinique. Au stade initial le malade est asymptomatique dans certains cas on peut assister à des signes d'imprégnation tuberculeuses types : asthénie, amaigrissement, anorexie, fébricule vespéral et sueurs nocturnes. Avec la progression de la maladie, il peut se produire une nécrose papillaire avec formation de cavités, destruction du parenchyme rénal et extension au système collecteur. L'atteinte urétérale peut induire une hydronéphrose. C'est surtout avec l'atteinte de la vessie que le malade devient symptomatique avec la dysurie, l'hématurie, la pollakiurie, des brûlures mictionnelles et des douleurs lombaires discrètes voire une colique néphrétique. En fait, il s'agit d'une cystite chronique qui est rebelle aux traitements usuels. L'atteinte génitale sans atteinte rénale chez la femme est beaucoup plus fréquente que chez l'homme ; elle est à l'origine de douleurs pelviennes, d'irrégularités menstruelles, d'une infertilité. Chez l'homme, un nodule

épididymaire et une orchi-épididymite révèlent le plus souvent l'atteinte génitale, mais une fistule scrotale, une hydrocèle et une prostatite, sont éventuellement observées.

Un grand nombre de malades asymptomatiques atteints de TUG sont identifiés en raison d'une analyse des urines recueillies trois jours de suite qui est anormale dans plus de 90 % des TUG. Une pyurie amicrobienne et une hématurie microscopique doivent rendre méfiant et faire rechercher le BK par des urocultures ou par des outils de la biologie moléculaire.

La suspicion d'une TUG est renforcée par la présence d'anomalies radiographiques retrouvées chez 75 % des sujets atteints de TUG. L'urographie intraveineuse précise la situation de l'atteinte urinaire. Le recours à la cystoscopie et l'analyse des fragments biopsiques constituent parfois les meilleurs moyens de diagnostic devant des recherches de BK revenant négatives.



Figure 15 : L'urographie intraveineuse : sténose serrée de la jonction urétéro-vésicale droite avec urétéro-hydronéphrose.

Dans les pays endémiques, on est encore confronté à des formes graves de la TUG, en raison du caractère destructeur de la pathologie, qui est responsable des conséquences sur la fonction rénale, spermatique et mictionnelle.

4.6. Tuberculose neuroméningée (171) (28) (128) (183)

L'atteinte tuberculeuse du SNC représente environ 1 % des cas de TB mais ses conséquences sont potentiellement dévastatrices avec une mortalité rapportée dans les pays en voie de développement de l'ordre de 44 à 69%. La méningite est beaucoup plus fréquente que les tuberculomes solitaires ou multiples.

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 BK soit d'une rupture d'un vieux foyer tuberculeux. Dans les méningites le processus est limité à la base du cerveau et les symptômes sont des céphalées, une diminution de la vigilance, la raideur de la nuque et des symptômes déficitaires focaux et/ou une atteinte des paires crâniennes. La méningite tuberculeuse peut se compliquer d'artérite des vaisseaux de la base du crâne, avec possibilité d'accidents vasculaires cérébraux ischémiques manifestés par la présence d'une hémiplégie ou d'une tétraplégie. Plus rarement, des cas de thrombophlébite cérébrale compliquant une TB du SNC ont été rapportés. La ponction lombaire est l'étape essentielle du diagnostic, précédée au moindre doute sur une hyperpression intracrânienne, d'un examen tomodensitométrique du crâne. La ponction avec analyse du liquide céphalo-rachidien (LCR) révèle la présence d'une pléocytose avec une lymphocytose à plus de 60 %. Les protéines sont élevées (de l'ordre de 100 mg/dl) avec une hypoglycorrachie (glucose souvent inférieur à 50 % du taux plasmatique). Le diagnostic de certitude est posé sur la base de la présence de BK dans le LCR soit à l'examen direct (5 à 20 % des cas) soit à la culture (40 % des cas). Une hyponatrémie par sécrétion inappropriée d'hormone antidiurétique est habituelle. La présence d'une localisation extra-neurologique, y compris pulmonaire, est rare dans la TB du SNC, sa présence est parfois décisive et doit être recherchée attentivement et de façon systématique. L'imagerie cérébrale par scanner ou IRM révèle classiquement un épaississement et un rehaussement des méninges surtout dans les régions basales, avec parfois un élargissement des ventricules.

Les tuberculomes sont des masses granulomateuses avasculaires avec un centre nécrotique (caséum) qui mesurent le plus souvent entre 2 et 8 cm, entourées d'un tissu cérébral normal avec un œdème péri lésionnel. Les patients peuvent se présenter avec de la fièvre, des céphalées, des vomissements, des déficits neurologiques focaux et un œdème papillaire.

L'expression clinique peut cependant rester très discrète. Le scanner cérébral permet de mettre en évidence un signe évocateur, mais dont la spécificité a été remise en question : le « Target sign ». Ce dernier est constitué d'une lésion sphérique avec un nid central, le tuberculome et d'un anneau périphérique prenant le contraste correspondant à l'œdème péri lésionnel. L'IRM est aussi utile dans le diagnostic, après l'injection du produit de contraste et révèle le rehaussement de l'anneau périphérique. La biopsie stéréotaxique permet d'établir le diagnostic définitif et d'obtenir du matériel pour l'analyse histopathologique et microbiologique (128).

5. Tuberculose chez l'enfant (184) (185) (186) (187) (188) (189) (171)

Selon les estimations réalisées en 2015 par l'OMS, au moins un million d'enfants contractent la TB chaque année. De tous les cas de TB, environ 10% à 20% concernent des enfants. En 2014, 81,000 enfants sont morts de la TB. De plus, il y a eu 55,000 décès dû à la TB parmi les enfants vivant avec le VIH. Au Maroc, la TB de l'enfant représente 15 % de l'atteinte tuberculeuse par âge. En réalité, la charge de la TB chez l'enfant est probablement plus élevée, en particulier parce que les symptômes de la maladie sont peu spécifiques ce qui est à l'origine des difficultés liées à son diagnostic.

La transmission du MTB chez les enfants se fait toujours, à partir d'un adulte contaminateur (TPM+) qu'il faut rechercher activement. La survenue d'une TB chez l'enfant est un indicateur non seulement de la circulation du BK mais aussi de l'échec du dépistage et de la prise en charge de la TB.

Chez l'enfant, la TB maladie se développe le plus souvent dans les suites immédiates d'une TB infection récente. Pratiquement, les enfants sont pauci bacillaires, ce qui a pour conséquences, une preuve bactériologique qui est peu fréquente et un risque faible de contagiosité.

Le risque de passage de la TB infection à la TB maladie est plus important chez l'enfant et varie en fonction de l'âge. Jusqu'à cinq ans, le risque de progression vers la maladie en cas d'infection est très augmenté. Ce risque est surtout majeur pour les moins de deux ans, ce qui justifie la prophylaxie systématique dans cette tranche d'âge.

Le risque de développer une forme grave (forme disséminée, miliaire, méningite) est plus important chez l'enfant, tout particulièrement chez le nourrisson.

La PIT constitue l'éventualité la plus fréquente. Son diagnostic est déterminé par l'absence de maladie clinique et radiologique et la mise en évidence d'une réponse immunitaire spécifique (positivité de l>IDR). Elle est asymptomatique. Dans 10% des cas, l'infection devient patente et donc symptomatique. Dans le cas de la primo-infection patente pulmonaire les signes sont non spécifiques : toux, fièvre, anorexie, asthénie, mauvaise croissance pondérale, sueurs nocturnes, tachypnée voire dyspnée, etc. Exceptionnellement, elle peut simuler une fièvre typhoïde (typho-bacillose) avec fièvre en plateau à 39°- 40°, isolée avec une langue propre en cas de terrain particulier de malnutrition sévère ou de déficit immunitaire. Le risque de dissémination de l'infection, avec l'association de localisations extra pulmonaires aux manifestations pulmonaires, est particulièrement élevé chez l'enfant de moins de cinq ans. Les localisations extra pulmonaires peuvent également être observées dans environ un tiers des TB de l'adolescence. Il peut s'agir de : Méningites et méningo-miliaires tuberculeuses ; TB des séreuses : pleurale, péritonéale, péricardique ; TB ganglionnaire superficielle ; TB ostéo-articulaire ou osseuse des membres, TB du rachis (mal de Pott) ; TB rénale et autres localisations (exceptionnelles chez l'enfant).

L'essentiel est de penser à la TB devant tout contexte à risque, devant toute situation clinique, en particulier respiratoire rebelle à un traitement correctement conduit. La pratique d'une IDR s'impose dans toutes ces situations.

L>IDR reste l'outil diagnostique de première ligne, mais qui doit être interprété de manière très prudente prenant en compte le contexte clinique, en particulier s'il s'agit d'un dépistage de l'infection ou du diagnostic d'une TB maladie. Ainsi le diamètre de l>IDR sera interprété différemment : 9 mm est suffisant pour le diagnostic de TB infection, mais le diagnostic de TB maladie nécessite une valeur de 13 mm.

Par définition, la radiographie de thorax doit être normale pour affirmer le diagnostic d'ITL. Les incidences face et profil sont souhaitables pour une visualisation radiologique optimale chez le jeune enfant. Au cours de la TB maladie de l'enfant, une grande variété d'aspects radiologiques va être observée au niveau thoracique : atteinte ganglionnaire, compression des voies aériennes adjacentes et troubles de ventilation des segments pulmonaires d'aval par les adénopathies , opacités parenchymateuses souvent segmentaires ou lobaires, calcifications

parenchymateuses et ganglionnaires, nodules centrolobulaires de diamètre inférieur à 2cm, infiltrats des sommets et cavernes chez l'adolescent et plus rarement un épanchement pleural. La recherche de BK doit se faire avant tout par tubage gastrique au moins trois jours de suite. Le lavage broncho alvéolaire réalisé au cours de la fibroscopie bronchique n'a pas une sensibilité supérieure à celle des tubages gastriques. Au cours des TB maladies respiratoires de l'enfant, le frottis n'est positif que dans 20 % des cas au maximum et la culture dans environ 50 % des cas. Comme chez l'adulte, l'amplification génomique par Polymerase Chain Reaction ou PCR a une sensibilité comparable à celle de la culture. Elle surtout utile quand le diagnostic est difficile, comme chez les nouveau-nés et les immunodéprimés.

L'endoscopie bronchique est utile en cas de suspicion de TB maladie, en montrant une atteinte endobronchique très évocatrice. Elle montre une réduction du calibre bronchique par compression d'une adénopathie adjacente, un granulome, du caséum obstructif ou une inflammation muqueuse importante.

Bref, le diagnostic de TB chez l'enfant repose sur 3 ordres de données :

- Des données anamnestiques : notion de contag, recherche d'un contaminateur avant tout dans l'entourage immédiat, mais aussi parfois à l'école ou ailleurs. Cette recherche du contaminateur fait partie intégrante de la prise en charge de l'enfant. Lorsque le contaminateur est identifié, un dépistage dans son entourage est nécessaire à la recherche d'autres personnes infectées ;
- Des données cliniques non spécifiques plus ou moins évocatrices ; un interrogatoire et un examen clinique complet s'imposent dans tous les cas ;
- Des données para cliniques qui sont la clé du diagnostic à condition de les interpréter dans le contexte.

6. Présentation clinique de la tuberculose chez les patients VIH séropositif (28) (171)

Les personnes infectées par le VIH sont plus à risque de se contaminer par le BK et de développer rapidement une TB maladie dans les suites immédiates du contag. Ce mode de révélation précoce de l'infection et ses caractéristiques se rapprochent des observations chez les enfants. Cependant, la présentation de la TB maladie lors du sida peut prendre des formes très variées, typiques ou atypiques. Les caractéristiques cliniques dépendent de l'intensité de

l'immunodépression corrélée au déficit en lymphocytes T CD4+ (CD4) mesurés dans le sang circulant.

Lorsque ce nombre de CD4 est inférieur à 200/mm³, correspondant à un stade avancé de l'infection par le VIH, les atteintes extra respiratoires représentent la moitié des formes de TB et les adénopathies sont fréquentes. Les anomalies radiologiques ne facilitent pas le diagnostic de la TB, car ce qui est observé ne ressemble que rarement à ce qui peut être constaté chez les sujets tuberculeux VIH négatifs. Les adénopathies médiastinales sont fréquentes. Les images cavitaires, les opacités apicales sont rares, avec plutôt une distribution des atteintes dans les lobes moyens et inférieurs ; les images miliaires sont observées dans 15 % des cas ; le plus souvent les anomalies sont frustes, avec des opacités nodulaires disséminées ou groupées, des infiltrats siégeant volontiers dans les zones déclives. L'évolution suggère une infection bactérienne non tuberculeuse ou une pneumopathie d'hypersensibilité, les anomalies radiologiques pouvant se modifier d'un jour à l'autre. L'IDR n'a aucune utilité, car négative en raison de l'immunodépression. La biopsie du matériel tuberculeux ne retrouve pas le granulome tuberculoïde avec nécrose caséuse, en raison encore de l'immunodépression. A l'inverse, les recherches de BK seront très souvent richement positives : les BK sont retrouvés dans 50 % des cas par l'examen direct et dans quasi 100 % des cas par la culture ; dans 10 % des cas les hémocultures sont positives pour le BK. Ces BK peuvent être résistants aux antituberculeux usuels. Enfin, la TB chez ces malades est souvent intriquée avec d'autres infections opportunistes.

Lorsque le nombre de CD4 est supérieur à 300/mm³, les atteintes extra respiratoires représentent 10 à 15 % des cas et les adénopathies sont rares. Les localisations pulmonaires restent alors classiques, prédominant aux sommets et ayant tendance à s'excaver. Lors d'une TB maladie, l'IDR est en général positive au stade précoce de l'infection par le VIH.

7. Présentation clinique de la tuberculose multi résistante (190) (153)

La TB multi résistante (TB-MR) est souvent soupçonnée chez un patient présentant un échec thérapeutique ou une rechute. Elle peut aussi être soupçonnée sur le plan épidémiologique quand une personne a été exposée à un cas confirmé de TB-MR. Afin de diagnostiquer plus efficacement les personnes atteintes de TB-MR, l'OMS a établi une liste des groupes de patients potentiellement exposés au risque de TB-MR. Parmi lesquels on cite:

- Échecs de traitement ;
- Rechutes et les interruptions de traitement, dont le frottis est positif 2 mois et 3 mois après la reprise du traitement ;
- Contacts étroits de patients atteints de TB-MR et qui ont une TB active ;
- Contacts symptomatiques et/ou ayant des anomalies radiologiques d'un cas de TB-MR connu ;
- Personnes séropositives au VIH ;
- Personnes vivant dans des environnements à haute prévalence de TB-MR (prisons. . .) ;
- Personnes ayant reçu des médicaments antituberculeux de mauvaise qualité ou de qualité inconnue ;
- Rupture de stock de médicaments ;
- Tuberculeux ayant une diarrhée chronique due à une malabsorption ou à une accélération du transit.

Les signes et les symptômes évocateurs de TB-MR sont semblables à ceux des patients atteints de TB pharmaco-sensible. Cependant, du fait qu'elle est diagnostiquée tardivement, la TB-MR peut avoir une présentation clinique et radiologique plus sévère et une évolution plus lente.

Une étude rétrospective des dossiers des patients tuberculeux multi résistants colligés au service de phthisiologie de l'hôpital Moulay Youssef de Rabat, a permis de déterminer le profil radiologique de ces patients. Les aspects radiologiques chez la majorité des cas 66.3% sont variables étendues et bilatérales. Dans 48,6 % des cas, on trouve des lésions excavées, suivi des infiltrats hilo-apicales dans 27 % des cas, des opacités nodulaires et micronodulaires dans 25,7 %, des images aréolaires dans 21,6 %, une dystrophie bulleuse dans 14,8 % des cas, des opacités d'allure alvéolaire dans 13,5 % des cas, un pneumothorax ainsi qu'une pleurésie ont été retrouvé chez 9,4 % et 8,1 % des patients respectivement, notant la possibilités de l'existence de plusieurs lésions radiologique chez le même patient (191).



Figure 16: Patient âgé de 31 ans traité pour tuberculose pulmonaire en 2007 et 2008 (notion de mal-observance). Radiographie du thorax : lésions nodulaires et cavitaires bilatérales prédominantes aux deux lobes supérieurs (190).

Le diagnostic de la TB-MR reposera dans tous les cas sur un interrogatoire minutieux qui précisera les antécédents de TB et de traitement antituberculeux, surtout s'il a été suivi de manière irrégulière ou interrompue et les autres antécédents (infection par le VIH, diabète, maladie rénale, cancer, syndrome de malabsorption chronique, corticothérapie au long cours, traitement immunosuppresseur. . .) ainsi qu'un examen physique complet.

D. Traitement

1. Traitement de la tuberculose maladie

1.1 Buts du traitement

Le traitement antituberculeux est un traitement à destinée individuelle qui vise à guérir les patients mais ce traitement a également une dimension collective : couper la chaîne de transmission de l'infection et prévenir l'émergence de bacilles multi résistants (192).

1.2. Bases biologiques du traitement antituberculeux

Le premier objectif de la poly-chimiothérapie est l'action complémentaire des antibiotiques sur les différentes populations de bacilles qui permet d'obtenir la guérison en six mois et d'éviter la rechute à bacilles sensibles. Dans ce cadre, les deux antibiotiques essentiels sont l'INH et la RIF. L'historique des essais thérapeutiques antituberculeux montre que c'est la RIF, associée à l'INH, qui a permis dans un premier temps de réduire la durée du traitement de 18 à 9 mois, en raison de son action sur les bacilles à multiplication lente du caséum. Le

PZA, qui joue un rôle très important grâce à son action sur les bacilles intracellulaires, a permis de réduire dans un second temps la durée du traitement de neuf à six mois. Le deuxième objectif de la poly-chimiothérapie est d'empêcher la sélection de mutants résistants à l'origine de rechutes à bacilles résistants. En effet, avant la mise au traitement, il y a dans une caverne tuberculeuse d'un malade infecté par une souche normalement sensible - qui contient 10^8 bacilles - 10^2 bacilles résistants à l'INH et 10 bacilles résistants à la RIF. L'association INH-RIF permet d'éviter la sélection de mutants résistants à chacun d'entre eux, inéluctable en cas de monothérapie par l'un de ces deux antibiotiques. L'EMB, antibiotique bactériostatique, joue un rôle très important en évitant la sélection de mutants résistants à la RIF en cas de TB multi-bacillaire à souche d'emblée résistante à l'INH (résistance dite primaire) ce qui est le cas chez un peu moins de 5 % des patients n'ayant jamais reçu d'antituberculeux. Cette proportion de patients avec une souche d'emblée résistante à l'INH est la conséquence des échecs thérapeutiques par sélection de mutants résistants survenus lorsque le traitement de la TB n'était pas bien codifié. Lorsque l'on dispose des résultats des tests de sensibilité, l'utilité de l'adjonction de l'EMB pour les TB à bacilles sensibles à l'INH peut être discutée, puisque l'EMB n'est vraiment utile qu'en cas de résistance à l'INH. Cependant, les résultats des tests de sensibilité étant disponibles en général cinq à sept semaines après le prélèvement et la durée de la phase initiale du traitement comprenant l'EMB étant de deux mois, le retentissement pratique des résultats de l'antibiogramme sur l'arrêt de l'EMB est limité (193).

Antibiotiques	Activité sur les bacilles			Proportion de mutants résistants au sein d'une population sensible	Apport dans le traitement
	À multiplication active (caverne) ~108 bacilles	À multiplication lente À pH acide (macrophage) ~105 bacilles	À pH neutre (foyers caséux) ~105 bacilles		
Isoniazide (INH)	++	+	0	10-6	Antibiotique le plus rapidement bactéricide 18 mois -> 9 mois 9 mois -> 6 mois Empêche sélection de RMP-R si résistance primaire à INH
Rifampicine (RMP)	++	+	+	10-7	
Pyrazinamide (PZA)	0	++	0	> 10-5	
Éthambutol (EMB)	±	±	0	10-6	

+, ++ : activité bactéricide ; ± : activité bactériostatique ; 0 : pas d'activité

Figure 17 : Activité in vivo des antibiotiques antituberculeux de première ligne, en cas de tuberculose cavitaire (193).

1.3. Moyens du traitement

1.3.1. Anti bacillaires

1.3.1.1. Médicaments antituberculeux de « première ligne » (192) (193) (194) (195)

1.3.1.1.1. Isoniazide

Découvert en 1912, ses propriétés antituberculeuses n'ont été décrites qu'en 1952.

L'isoniazide (INH) est présent sous deux formes :

- Formes orales
 - ✓ Rimifon Laphal® : comprimés à 50 mg et 150 mg (liste I).
 - ✓ PMS-Isoniazide : solution buvable 10 mg/ml. Cette présentation nécessite une ATU (L'Autorisation Temporaire d'Utilisation) nominative, lorsque le patient ne peut pas prendre les formes solides.
- Forme injectable
 - ✓ Rimifon Laphal® injectable, ampoules 500 mg/5 ml (liste I).

L'INH est un antituberculeux majeur bactéricide exclusivement réservé, en association, à la prophylaxie et au traitement de la TB sous toutes ses formes, ainsi que pour le traitement des mycobactérioses.

Traitement curatif de la TB est toujours associé à d'autres antituberculeux, la posologie chez l'adulte est de 4 à 6 mg/kg/j en une seule prise le matin à jeun et chez l'enfant de 10 à 15 mg/kg/j ; la dose maximale est de 300 mg.

L'INH a des effets toxiques, principalement hépatiques et neurologiques. Cette fréquence est évaluée à 5 %. Son hépato-toxicité est potentiellement mortelle, elle est majorée par l'association à la RIF.

Les effets indésirables d'ordre hépatiques sont généralement imprévisibles, de nature cytolytique avec augmentation des transaminases sériques, qui se révèlent être autant la preuve de la prise médicamenteuse que la manifestation d'un effet indésirable. Elle s'observe chez 10 à 20 % des malades sous INH seul mais dans un pourcentage plus élevé en cas d'association avec la RIF. Une hépatite clinique survient chez 0,5 à 2 % des malades sous INH et chez 2,5 à 6 % en cas d'association à la RIF. Une hépatite mixte est rare ; elle se manifeste dès le premier trimestre et régresse à l'arrêt du traitement ; elle est exceptionnellement mortelle. Les facteurs favorisant l'apparition d'une hépatite toxique sont le déficit de prise en charge et de surveillance, le mésusage d'alcool, l'association de médicaments hépatotoxiques, l'âge avancé, une vulnérabilité hépatique.

Des neuropathies périphériques doses dépendantes touchent 0,2 % des patients. Elles se localisent essentiellement sur les membres inférieurs dans un tableau de polynévrite. Elles sont partiellement liées à un déficit en vitamine B6, l'INH facilitant l'excrétion urinaire du pyridoxal. Un apport de pyridoxine permet de réduire leur risque de survenue. Elles sont plus fréquentes chez les sujets acétyleurs lents, sous traitement neurotoxique, les alcooliques, les dénutris, les diabétiques, les insuffisants rénaux, comme chez les femmes enceintes ou allaitantes et chez les patients traités pour infection VIH (neuropathie douloureuse des membres inférieurs dans l'association de l'INH et stavudine).

De multiples manifestations cutanées ont été signalées à type d'érythème relevant d'une hypersensibilité immédiate, d'acné, de photosensibilisation. La pellagre par carence en vitamine B3 liée à la prise d'INH chez les sujets acétyleurs lents associe un érythème pigmenté, un état dysthymique et une diarrhée.

D'autres effets indésirables ont été décrits dans la littérature à savoir :

- Des névrites optiques rétrobulbaires ;
- Des manifestations psychiatriques type : insomnies, états d'agitation, troubles confusionnels, psychotiques ou maniaques, réversibles à l'arrêt du médicament ;
- Des convulsions ;

- Une leucopénie, parfois associée à une neutropénie ;
- Drug Rash With Eosinophilia and Systemic Symptoms (DRESS) ;
- Le lupus induit par l'INH ;
- Le Syndrome épaule-main ;
- Des manifestations digestives (des gastralgies, nausées, vomissements, bouche sèche et troubles du transit, pancréatite aiguë) ;
- Une fièvre isolée ;
- Une gynécomastie ;
- Un syndrome de Cushing.

L'INH est formellement contre-indiqué devant un antécédent d'hépatite due à l'INH ou d'insuffisance hépatique sévère. Néanmoins, il doit être pris avec beaucoup de précaution chez les patients souffrants d'une hépatite chronique, d'une insuffisance rénale sévère, d'un alcoolisme chronique et chez les femmes enceintes.

De multiples interactions médicamenteuses sont décrites ; l'INH est un inhibiteur des cytochromes P450 et peut donc, lors d'association avec de nombreux médicaments (anti vitamine K, kétoconazole, carbamazépine, stavudine, fénitoïne, etc.) augmenter leur concentration plasmatique, avec risque de surdosage par blocage de leur catabolisme hépatique. L'hépatotoxicité due à l'INH est majorée par l'association à la RIF qui est un puissant inducteur enzymatique favorisant l'accumulation de métabolites hépatotoxiques ; en revanche, l'INH ne modifie pas le métabolisme de la RIF.

1.3.1.1.2. Rifampicine

Introduite sur le marché en 1967, la rifampicine (RIF) a radicalement changé le traitement de la TB.

Toutes les présentations de RIF sont inscrites sur la liste I :

- Formes orales
 - ✓ Rifadine®, Rimactan® : gélules à 300 mg.
 - ✓ Rifadine® suspension à 2 % : flacons de 24 mesures à 100 mg/mesure.
- Forme injectable
 - ✓ Rifadine® 600 mg lyophilisat pour perfusion IV

C'est un antituberculeux majeur, son association à l'INH reste la clef de voûte du traitement actuel de la TB sous toutes ses formes en raison du faible taux de résistance primaire. Vue sa propriété en tant qu'un antibiotique à large spectre, il est utilisé en association dans certaines infections sévères à staphylocoques, légionelloses, brucelloses, lèpre, etc. D'ailleurs, la RIF est l'antibiotique de choix pour la prophylaxie de la méningite à méningocoque.

La prise de 10 mg/kg/j de la RIF chez l'adulte et l'enfant, le matin à jeun en 1 prise associée aux autres antituberculeux et en continu, permet le traitement curatif ou prophylactique de la TB.

La RIF est un antituberculeux majeur généralement bien toléré. Les effets indésirables sont estimés à environ 6 % des sujets traités qu'il s'agisse de manifestations toxiques ou de réactions immunoallergiques. Les événements indésirables graves relèvent pour l'essentiel des traitements discontinus et associent une insuffisance rénale aiguë, un état de choc et une anémie hémolytique.

L'hépto-toxicité intrinsèque du médicament est faible. Une augmentation précoce et modérée des transaminases est notée dans 10 à 15 % des cas, ainsi qu'une cholestase hépatique légère. Quatre facteurs favorisent ces manifestations : un âge avancé, l'éthylisme chronique, une hépatopathie évolutive, l'association de médicaments hépatotoxiques dont l'INH.

La RIF est à l'origine de nausées, vomissements, douleurs abdominales, voire de rare intolérance digestive. Des cas de colites pseudomembraneuses et à éosinophiles induites par la prise de RIF ont été décrites.

Réactions immunoallergiques peuvent survenir au décours de l'administration de la RIF. Les formes les plus graves s'observent lors d'administrations intermittentes du médicament :

- Réactions d'hypersensibilité immédiate manifestaient par des réactions cutanées urticariennes, des œdèmes, ailleurs des bronchospasmes, une hypotension, voire un choc anaphylactique ;
- Réactions de phénomène d'Arthus ;
- L'association de fièvre, arthralgies et syndrome pseudo grippal.

La RIF est un des inducteurs les plus puissants des enzymes hépatiques (CYP 3A4, 2C9, 2C19). Le métabolisme de nombreux médicaments se trouve induit par la RIF, entraînant une augmentation de la clairance et donc une diminution de la demi-vie et des concentrations

plasmatiques de ces médicaments : immunosuppresseurs, œstroprogestatifs, anti vitamines K, antiépileptiques, méthadone, inhibiteurs de la protéase du VIH, inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase reverse (INNRT), antifongiques azolés, etc. Il est donc nécessaire d'ajuster les posologies des médicaments associés. La RIF est contre-indiquée avec les inhibiteurs de la protéase du VIH et la delavirdine ; la rifabutine sera prescrite dans ce cas.

La RIF est contre-indiquée en cas de présence d'une porphyrie ou d'une allergie aux rifamycines.

1.3.1.1.3. Pyrazinamide

Proche de l'INH, le pyrazinamide (PZA) était connu depuis 1952 mais avait été rapidement abandonné en raison de sa toxicité hépatique : des études longues et nombreuses ont conduit à le réhabiliter dans les années 1980.

Le PZA est présent sous la forme orale uniquement :

- Pirilène® comprimés sécables 500 mg (liste I).
- PZA-Ciba® solution buvable 250 mg/5 ml (cette présentation doit faire l'objet d'une demande d'ATU nominative)

Il est indiqué uniquement dans le traitement de la TB. Son addition à la trithérapie classique (INH, RIF, EMB) a permis de réduire la durée du traitement à 6 mois.

La posologie recommandée du PZA est de 30 mg/kg/jour en une seule prise le matin à jeun pendant la période initiale de traitement antituberculeux.

Parmi les effets indésirables que peut induit le PZA, on peut citer :

- Digestifs apparaissent dans moins de 10 % des cas à type de nausées, vomissements, diarrhées, douleurs abdominales ;
- Cutanés (1 à 13 %) : Rashes urticariens diffus et parfois un choc anaphylactique, des réactions de photo-toxicité, érythèmes polymorphes, acné, voire pellagre ;
- Hépatiques : L'hépatite cytolytique est l'effet secondaire le plus sérieux ; elle est dose dépendante mais la seule responsabilité du PZA est difficile à affirmer compte tenu de l'habituelle association du médicament à l'INH et à la RIF. La fréquence de l'hépatite est évaluée à 0,5 à 10 % pour une durée de traitement de deux mois et selon les associations médicamenteuses. Des cas d'hépatites fulminantes mortelles ont été rapportés en cas de traitement d'infections tuberculeuses latentes par

association RIF –PZA. Un cas d'hépatite granulomateuse faisant suite à l'administration du PZA a été décrit ; une surveillance biologique est donc nécessaire pour prévenir les hépatites avec ictères ;

- Hyper-uricémie fréquente pouvant entraîner des arthralgies et plus rarement de véritables crises de goutte (les premières cèdent habituellement à un traitement) ;
- Des fièvres isolées et/ou des bouffées vasomotrices sont possibles ;
- Des thrombopénies sévères ont été décrites, nécessitant l'arrêt du médicament.

Le PZA est contre-indiqué devant les cas suivants : Porphyrie, Grossesse, Insuffisance hépatique et Insuffisance rénale (sauf nécessité absolue).

1.3.1.1.4. Ethambutol

Toutes les présentations sont inscrites sur la liste I.

- Formes orales
 - ✓ Dexambutol®: comprimés 500 mg.
 - ✓ Myambutol®: comprimés à 400 mg.
- Forme injectable
 - ✓ Myambutol® 1 g : ampoules de 10 ml.

Dans le schéma thérapeutique antituberculeux, le rôle de l'éthambutol (EMB) est de protéger la RIF contre la sélection de mutant RIF-résistant. En revanche, pour certains auteurs, l'utilité de l'EMB est contestée dans la quadruple association RIF-INH-PZA-EMB.

La posologie d'EMB qu'il faut administrer est fixée à 15-20 mg/kg/j chez l'adulte (25 mg/kg en cas de rechute ou de multi résistance) et à 25-30 mg/kg/j chez l'enfant.

Cet antituberculeux bactériostatique est globalement bien toléré. Il induit un risque de toxicité sur le nerf optique qui justifie un suivi attentif chez les patients à risques (alcoolo-tabagiques, diabétiques, insuffisants rénaux, sujets traités par disulfirame, anti-inflammatoires et antipaludéens de synthèse ou présentant des antécédents familiaux de pathologies visuelles). L'ensemble des manifestations indésirables, qui peuvent être induites à l'occasion de son utilisation, sont exposées dans ce qui suit :

- La névrite optique rétrobulbaire (NORB) apparaît en moyenne dans les deux mois qui suivent le début de la prise médicamenteuse. L'atteinte est dose dépendante avec une incidence de 18 % chez des patients recevant 30mg/kg par jour ;

- L'EMB a une toxicité directe sur les structures rétinienne ;
- Les neuropathies sensitivomotrices et des troubles neuropsychiques avec vertiges et céphalées sont possibles ;
- Une élévation transitoire de la bilirubinémie et des cas de néphropathies tubulo-interstitielles de mécanisme toxique sont possibles ;
- Des réactions allergiques cutanées prurigineuses ou purpuriques sont rares. L'association de rashes cutanés à une hyper éosinophilie et à des infiltrats pulmonaires a été décrite ;
- L'hyper uricémie induite par l'EMB est exceptionnelle.

L'EMB est contre indiqué chez les sujets atteints d'une névrite optique ou évoquant la présence d'une hypersensibilité connue au médicament.

1.3.1.1.5. Intérêt des formes combinées

Les formes combinant plusieurs antibiotiques permettent de simplifier l'administration du traitement. La prescription d'une spécialité associant dans le même comprimé RIF, INH et PZA ($\pm$ EMB) pendant deux mois, puis d'une spécialité associant dans le même comprimé RIF et INH pendant quatre mois, présente un avantage évident en termes d'observance. En cas de mauvaise observance, les formes combinées évitent la sélection d'un mutant résistant, alors que les antibiotiques prescrits individuellement exposent au risque de monothérapie et donc de sélection de mutants résistants. Les formes combinées sont utilisées selon les posologies présentées dans le Tableau 2. L'utilisation de formes combinées amène parfois à s'écarter un peu de la posologie moyenne recommandée, en restant néanmoins dans les limites fixées par l'OMS.

Tableau 2: Antituberculeux combinés : composition (en mg), posologie (en nombre de comprimés par jour).

Combinaisons	Quadruple	Triple	Double	Double
Isoniazide	75	50	75	150
Rifampicine	150	120	150	300
Pyrazinamide	400	300	-	-
Éthambutol	275	-	-	-
Spécialité	Rimstar*	Rifater*	Rimactazid*	Rifinah*
Posologie	30–37 kg = 2	30 – 39 kg = 3	30–37 kg = 2	> 50 kg = 2
	38 – 54 kg = 3	40 – 49 kg = 4	38 – 54 kg = 3	
	> 55 kg = 4	50 – 65 kg = 5	>55 kg = 4	
		> 65 kg = 6		

1.3.1.2. Médicaments anti -tuberculeux de « seconde ligne » et alternatifs (192) (194) (195)

Les antituberculeux de deuxième ligne sont, soit des médicaments antibiotiques ayant une autre indication principale, soit des médicaments antituberculeux anciens et abandonnés pour le traitement de première ligne. Pour la plupart ils n'ont pas formellement l'indication « traitement de la TB » dans leur autorisation de mise sur le marché.

1.3.1.2.1. Streptomycine

Découverte en 1944 par Waksman, la streptomycine (SM) est un aminoglycoside extrait des souches de *Streptomyces griseus*.

Elle est présente sous une forme injectable : Streptomycine® 1 g poudres, inscrite sur la liste I, qu'il faut administrer en IM (possibilité de perfusions IV, de 30 à 60 minutes) à une posologie de 15 mg/kg/j de préférence.

La SM fait partie des antituberculeux majeurs répertoriés par l'O.M.S. Actuellement, elle n'est plus utilisée en première intention du fait de son administration parentérale exclusive et de sa toxicité rénale et auditive dose-dépendante. Elle est utilisée en deuxième intention en cas de TB résistante à la RIF ou en cas d'atteinte de la fonction hépatique, gênant l'utilisation des autres antituberculeux de première ligne potentiellement hépatotoxiques.

Les situations contre-indiquant l'utilisation de la SM sont l'allergie aux aminosides, la myasthénie et la grossesse.

Lors de l'utilisation de la SP, il faut éviter de l'associer aux médicaments ototoxiques et néphrotoxiques, ainsi qu'aux myorelaxants, curarisants et à certains anesthésiques.

1.3.1.2.2. CAPREOMYCINE (Capastat®)

De structure polypeptidique, la capréomycine (CAP) est un anti bacillaire mineur. Elle est active sur certaines souches résistantes à la SM, mais il existe une résistance croisée avec la KAN.

Elle produit les mêmes effets indésirables que la SM ; elle est administrée uniquement par voie parentérale. Elle est disponible en ATU.

Sa posologie est de 15 à 30 mg/kg en IM et doit être adaptée en cas d'insuffisance rénale.

1.3.1.2.3. Cyclosérine (Cyclosérine®)

La CS est un antituberculeux tuberculostatique de 2^e ligne en raison de sa toxicité neurologique. Les effets secondaires fréquemment constatés sont des neuropathies périphériques, des convulsions, des troubles du comportement. Elle est donc contre-indiquée chez les patients ayant des antécédents neuropsychiatriques. L'administration concomitante de pyridoxine (200 à 300 mg/j) permet de prévenir et de traiter ces effets neurologiques. La posologie usuelle est de 15 à 20 mg/kg/j par voie orale sans dépasser 1 g par jour.

1.3.1.2.4. Ethionamide (Trécator®)

L'ETO est bactériostatique. C'est un dérivé de l'acide iso-nicotinique. Les effets secondaires sont gastro-intestinaux, hépatiques avec élévation des transaminases (surveillance mensuelle) et neuropsychiatriques.

La posologie est de 15 à 20 mg/kg/j sans dépasser 1 g par jour et elle nécessite une adaptation chez les patients insuffisants rénaux.

Il peut être intéressant d'y associer du nicotinamide et de la pyridoxine.

1.3.1.2.5. Aminosides

La KAN a une activité bactéricide in vitro et in vivo sur le BK. L'AMK, par sa structure voisine, a également démontré son effet sur le BK. Elle est utilisée dans le traitement de la TB à la posologie de 15 mg/kg mais n'a actuellement pas d'AMM dans cette indication. Comme

tous les aminosides, elle est contre-indiquée chez la femme enceinte et l'enfant de moins de 6 ans.

1.3.1.2.6. Acide para-amino salicylique (Paser®)

L'acide para-amino salicylique (PAS) est un antituberculeux bactériostatique actif uniquement sur le BK.

Les effets secondaires principaux sont des troubles digestifs (nausées, vomissements et diarrhées) et des réactions d'hypersensibilité (fréquence de 5 à 10 %). Des symptômes d'hypothyroïdie peuvent apparaître à long terme.

Il est contre-indiqué en cas d'insuffisance rénale sévère.

La posologie de PAS est de 8 à 12 g/jour en 2 ou 3 prises. Le contenu des sachets doit être mélangé dans un aliment acide avant d'être administré.

1.3.1.2.7. Thioacétazone (Thioacétazone-INH®)

La thioacétazone est bactériostatique et peut être utilisée en remplacement de l'EMB, en particulier en cas de non-disponibilité de celui-ci dans certains pays. Elle peut provoquer des troubles digestifs, des rashs cutanés et des troubles de la vision.

Son utilisation n'est pas recommandée chez les patients séropositifs pour le VIH en raison d'un risque augmenté d'effets indésirables cutanés potentiellement mortels.

1.3.1.2.8. Rifabutine

Proche de la RIF, elle appartient à la famille des rifamycines.

Elle est présente sous une forme orale : Ansatine® : gélules à 150 mg (liste I).

La Rifabutine est indiquée dans le traitement de la TB-MR en particulier à la RIF ou en cas de contre-indication à la RIF, ainsi que dans le traitement préventif et curatif des infections à MAC chez les patients VIH.

Les myalgies, les arthralgies, la modification du goût, la neutropénie, la coloration rouge des urines et des larmes, la thrombocytopénie, les rashs cutanés sont possibles comme effets indésirables de la Rifabutine.

Avec un effet inducteur enzymatique, la rifabutine peut accélérer le métabolisme de certains médicaments comme les contraceptifs oraux, certains antirétroviraux (anti protéases).

1.3.1.2.9. Quinolones

La LFX (Tavanic®) et la MFX (IziloX®) ont montré une activité in vitro sur le BK.

Elles doivent être prescrites en association avec d'autres antituberculeux et réservées aux cas de TB-MR notamment à la RIF.

Elles sont contre-indiquées chez les patients de moins de 15 ans en raison notamment de leur toxicité articulaire

1.3.1.2.10. Oxazolidinones

Le Linézolide ou LNZ (Zyvoxid®) qui est le premier représentant développé de la famille des oxazolidinones, pourrait être utilisé, mais uniquement en deuxième ou troisième ligne de traitement pour des TB-MR ou -UR (hors AMM). Il expose à des risques fréquents de neuropathies et d'anémie. Des essais cliniques sont actuellement en cours dans cette nouvelle indication du LNZ.

1.3.1.3. Nouveaux médicaments (196) (197) (198) (199) (200) (201) (202)

Face à la récurrence de la résistance aux antibiotiques traditionnels et à ses conséquences sanitaires, de nouvelles molécules sont constamment synthétisées et testées dans les laboratoires de recherche pharmaceutique. Elles permettent d'explorer des modes d'action innovants.

Parmi ces molécules, la bédaquiline et le délamanide, ont récemment obtenue (2014) une AMM conditionnelle des instances européennes. Pourtant, en octobre 2016, seulement 5 700 patients dans le monde ont eu accès à la bédaquiline et à peine 405 au délamanide. Selon les estimations les plus récentes de l'OMS, en 2015, 580 000 personnes auraient eu besoin d'un traitement contre la TB-MR.

Précisons que la bédaquiline agit en inhibant spécifiquement l'ATP (adénosine-5'-triphosphate) synthase mycobactérienne, une enzyme indispensable à l'approvisionnement énergétique de MTB.

Tandis que le délamanide est un dérivé nitro-imidazolé qui inhibe la synthèse de l'acide mycolique. Développé par Otsuka Pharmaceutical, très bactéricide à faible concentration, il présente une excellente activité sur MTB sensible et résistant. Les preuves de son efficacité sont fondées sur des données très limitées. Son profil de tolérance semble favorable en dehors du risque important d'allongement de l'intervalle QT identifié, qui peut être problématique en cas d'association à d'autres médicaments allongeant le QT.

Pour la première fois en six ans, un médicament antituberculeux candidat (TBA-354) en est aux essais de phase I. TBA-354 vient de la classe de nitroimidazole des produits chimiques, connue pour être pertinent contre médicament-sensible et la TB résistante aux médicaments.

Parmi les nouvelles molécules, ont été sélectionnées le PA-824, la diarylquinolone TMC207, la diamine SQ109 et les dérivés pyrroles. Pour la plupart, leur mécanisme d'action n'est connu que partiellement. Autant le PA-824 nécessite d'autres études cliniques pour confirmer son efficacité, autant les autres nouveaux composés sont en attente de phases II (TMC207 et SQ109) et de phase I (les dérivés pyrroles).

Actuellement, d'autres molécules de modes d'action différents sont en cours d'évaluation préclinique (la dipipéridine SQ609, le SQ641 et, le synthetase inhibitor FAS20013). D'autres sont au stade de la recherche (le composé du nitrofuranylamides : Lee952, l'inhibiteur de la peptide-déformylase bactérienne BB-3497, les pleuromutilins et la phytothérapie : les antituberculeux polyynes issus des racines d'*Angelica sinensis*).

1.3.2. Traitement adjuvant

1.3.2.1. Chirurgie

La chirurgie de la TB est devenue de plus en plus rare.

Les indications chirurgicales se limitent au traitement des séquelles pleuro-parenchymateuses et notamment à leur complication. L'aspergillisation des cavités résiduelles et l'hémoptysie sont les plus fréquentes.

Certaines adénites des TB résistantes aux traitements médicaux nécessitent une prise en charge chirurgicale.

Le traitement chirurgical doit faire partie de la stratégie thérapeutique globale dans le traitement des mycobactéries atypiques et/ou bactéries multi résistantes. Son rôle est de supprimer des cavités pleuro-parenchymateuses résiduelles responsables de la persistance d'expectoration positive ou de la résistance bactériologique au traitement. Ces cavités sont éliminées soit par une exérèse ou fermées par une colapsothérapie qui permet leur effondrement.

Les formes nodulaires des lésions spécifiques ne sont pas exceptionnelles. La TB pulmonaire pseudo-tumorale peut simuler l'aspect radiologique d'une opacité hilare ou médiastino-

pulmonaire d'allure tumorale ; le diagnostic histologique et bactériologique dans ces cas nécessite par fois, une biopsie chirurgicale.

La pleurésie sérofibrineuse pose le problème de diagnostic sur le plan bactériologique et histologique. La TB pleurale est la localisation extra-pulmonaire la plus fréquente. Le diagnostic ne peut être obtenu, dans environ 50 % des cas, que par pleuro-scopie (203).

1.3.2.2. Corticothérapie

Les lignes directrices cliniques actuelles conseillent l'utilisation de corticoïdes pour le traitement de TB en cas de : méningite tuberculeuse, miliaire hypoxémiante, tuberculome cérébral, obstruction bronchique chez l'enfant et quelquefois en cas de péricardite tuberculeuse. Le bénéfice potentiel des corticoïdes dans le traitement de la TB pulmonaire reste incertain (204).

1.3.2.3. Vitaminothérapie

La neuropathie à l'INH survient en présence de facteurs de risque (VIH, alcoolisme, diabète, insuffisance rénale, dénutrition, grossesse ou allaitement, médicaments neurotoxiques) et se manifeste initialement par des brûlures des pieds. La vitamine B6 est le traitement préventif à faible dose et curatif à forte dose (205).

1.3.3. Isolement des patients contagieux (193) (206)

En cas de TPM+ l'isolement, avec ou sans hospitalisation, est recommandé pendant la phase de contagiosité maximale, qui persiste d'une à trois semaines après la mise au traitement. La levée de l'isolement est décidée au vu de l'amélioration clinique (diminution de la toux, retour à l'apyrexie) et/ou de la négativation de l'examen microscopique direct de l'expectoration.

En cas de doute sur l'existence d'une résistance des bacilles aux antibiotiques de première ligne, l'isolement doit être prolongé. Un tel doute peut être fondé sur:

- Un antécédent de traitement antituberculeux ;
- Un sujet en provenance d'un pays de forte résistance ;
- Un échappement clinique au traitement ;
- Une séropositivité pour le VIH.

Un ensemble de mesures techniques, organisationnelles et personnelles doivent être prévues dans tout hôpital accueillant de ce type de patients à savoir :

- Mesures techniques (impératives en cas de TB-MR, recommandées dans les autres cas) :
 - ✓ Ventilation mécanique des locaux ;
 - ✓ Renouvellement de l'air d'au moins 6 fois par heure ;
 - ✓ Mise en dépression de l'isolement par rapport aux locaux avoisinants ;
 - ✓ Aménée de l'air adéquat dans l'isolement ;
 - ✓ Evacuation de l'air vicié vers l'extérieur, à travers un filtre adéquat ;
 - ✓ Aménagement d'un local d'accès fonctionnant comme sas.
- Mesures organisationnelles :
 - ✓ Désignation claire du local d'isolement ;
 - ✓ Réglementation d'accès au local ;
 - ✓ Prescriptions d'hygiène pour le patient ;
 - ✓ Limitation de séjour du patient hors de l'isolement ;
 - ✓ Information et enseignement du personnel sur les mesures à prendre.
- Mesures de protection personnelles :
 - ✓ Port d'un masque de protection respiratoire pour le personnel et les visiteurs ;
 - ✓ Port de gants et de survêtements lors de certaines interventions.

1.4. Modalités pratiques du traitement

1.4.1. Règles générales (207) (208)

Le diagnostic de la TB est évoqué sur des signes généraux, des signes cliniques respiratoires ou extra-respiratoires, des examens complémentaires ou du fait d'un contexte épidémiologique particulier. À l'issue de cette étape, des mesures d'isolement respiratoire sont prises durant la courte période diagnostique. Cette période doit conduire à éliminer le diagnostic, ou à mettre sous traitement dans un délai de une semaine les formes contagieuses et de un mois les formes non contagieuses, en particulier extra-pulmonaires. Cette mise sous traitement, avant ou après confirmation du diagnostic, est précédée d'une évaluation clinique et biologique visant à faire le bilan des localisations de la maladie, à rechercher des facteurs favorisants, en particulier une immunodépression, à rechercher des contre-indications à certains traitements antituberculeux, à rechercher des éléments orientant vers une résistance et

à faire le bilan psychosocial des éventuels freins au traitement. Pour être efficace, la chimiothérapie doit obéir aux règles suivantes :

- Ne jamais commencer un traitement antituberculeux avant d'avoir obtenu un diagnostic de certitude ou fortement suspecté ;
- Une association judicieuse de quatre médicaments antituberculeux pendant la phase initiale de tout régime thérapeutique pour réduire le plutôt possible, la charge bactérienne et éviter l'émergence des souches résistantes ;
- Une posologie correcte pour assurer la stérilisation des lésions ;
- Une prise régulière des médicaments ;
- Une durée suffisante du traitement antituberculeux ;
- Une prise à jeun le matin sous la supervision d'une personne formée et sensibilisée.
- Une surveillance régulière de l'efficacité et la tolérance des antituberculeux.

1.4.2. Régimes thérapeutiques standards

1.4.2.1. Nouveaux cas

Les nouveaux cas sont définis comme des patients n'ayant aucun antécédent de traitement antituberculeux ou ayant reçu un traitement antituberculeux pendant moins d'un mois. Les nouveaux cas peuvent avoir TP frottis négatif ou frottis positif ou une TEP.

1.4.2.1.1. Tuberculose pulmonaire et extra pulmonaire (à l'exception de la méningite tuberculeuse et de la Tuberculose ostéo-articulaire et du rachis) (209) (192)

Selon le nouveau régime du programme de lutte antituberculeuse au Maroc de 2011, la prise en charge thérapeutique de la TB repose sur l'administration quotidienne d'un traitement standard de 6 mois associant 4 médicaments antituberculeux. Le schéma de traitement recommandé par l'OMS/UICTMR, par L'ATS/CDC/IDSA et par le BTS/BMRC est basé sur la prise d'INH (5 mg/kg/jour) et de RIF (10 mg/kg/jour). Ce traitement est pris dans tous les cas, par voie orale, à jeun, une fois par jour, à distance des repas (30 minutes à 1 heure avant les repas ou 2 heures après). Durant les deux premiers mois (phase initiale), le traitement comprend en plus le PZA (25 mg/kg) et l'EMB (15 mg/kg). L'INH et la RIF sont poursuivis seuls durant les quatre mois suivants (phase de continuation). Le passage en deuxième phase à 2 mois ne se fait qu'après analyse des résultats de la première phase et, quand il peut être

disponible, analyse de l'antibiogramme. Une réévaluation de la posologie en fonction de la variation du poids est également souvent nécessaire.

Le traitement de 8 mois 2 (HRZE) / 6 (HE) ou 2 (SHRZ) / 6 (HE) est encore utilisé dans certains pays mais il est démontré que les rechutes et échecs sont plus fréquents avec ce traitement qu'avec celui de 6 mois. Il doit être donc remplacé par le traitement de 6 mois.

1.4.2.1.2. Méningite tuberculeuse et Tuberculose ostéo-articulaire et du rachis (210) (209)

Le traitement antituberculeux de la TB du système nerveux central est bien codifié dans les nouvelles recommandations, il débute par une quadrithérapie d'induction associant INH, RIF, EMB et PZA pendant 2 mois. Une bithérapie de consolidation associant INH et RIF y fait suite pour laquelle une durée de 4 mois semble habituellement suffisante bien qu'une durée de 9 à 12 mois soit souvent recommandée par précaution. Pour la méningite, l'OMS-UICTMR recommande de remplacer l'EMB par la SM, car le premier ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique. Il est également recommandé d'administrer un traitement corticoïde à tous les patients atteints de méningite tuberculeuse.

Bien qu'il existe peu de preuves du bénéfice d'un traitement prolongé, il est recommandé de traiter la TB ostéo-articulaire pendant 9-12 mois avec 2 (HRZE) / 7-10 (HR), principalement parce qu'il est difficile d'évaluer la réponse au traitement. Le Mal de Pott est une forme grave de la TB qui doit être traitée en priorité (risque de séquelles neurologiques dues à la compression chronique de la moelle épinière). En l'absence de déformation importante du rachis et de déficit neurologique, la plupart des cas peuvent être traités avec le repos, l'immobilisation par corset et les médicaments antituberculeux. La chirurgie doit être envisagée chez les patients présentant un déficit neurologique ou une lésion instable du rachis et/ou en cas de non réponse au traitement.

1.4.2.2. Patients précédemment traités

Les patients précédemment traités sont définis comme des patients ayant déjà reçu un traitement antituberculeux pendant un mois ou plus. Il est essentiel de détecter chez ces patients une résistance aux médicaments, en particulier une TB-MR afin de prescrire un traitement efficace. Les traitements de première ligne ne sont pas efficaces contre les souches multi-résistantes et leur utilisation aurait des conséquences néfastes sur le pronostic du patient (mortalité) et peut entraîner l'amplification de la résistance et la propagation de la TB-MR.

La résistance aux médicaments doit être recherchée chez tout patient ayant déjà été traité, au début du traitement ou avant de le débiter. Le test Xpert MTB/RIF est la méthode de choix pour dépister une TB-MR, en raison de sa sensibilité et de sa rapidité d'exécution. Une fois la multi-résistance est confirmée par le test Xpert MTB/RIF, il faut effectuer un antibiogramme évaluant l'activité de l'ensemble des antituberculeux de première et de seconde ligne. Les stratégies sans antibiogramme ne sont pas recommandées pour les patients précédemment traités. Toutefois, certains programmes peuvent n'avoir d'autre choix que de prendre en charge des patients dans ces circonstances.

1.4.2.2.1. Traitement d'un échec

Un échec se définit comme la persistance de cultures positives (de façon permanente ou après une négativation transitoire) cinq mois ou plus après le début du traitement. Après 3 mois de traitement pour TB à souche sensible, 95% des patients ont des cultures négatives et ont une amélioration clinique significative. La positivité des examens de l'expectoration à 3 mois, une compliance très imparfaite, des problèmes graves et prolongés de tolérance, une posologie inadaptée ou une malabsorption, le retour tardif de l'information sur une résistance initiale aux antituberculeux sont autant de causes possibles d'échecs en cours de traitement. Ces situations nécessitent une réévaluation de la situation par une équipe hautement spécialisées et une reprise d'un traitement qui sera le plus souvent un traitement non standard. La principale cause d'échec thérapeutique est la résistance des bacilles aux antituberculeux. Un antibiogramme sera systématiquement refait sur une souche isolée après 3 mois de traitement. Après avoir analysé les différentes causes possibles d'échec au traitement et en cas de suspicion de résistance aux antituberculeux, il peut être nécessaire d'interrompre le traitement inefficace pour éviter « un effet amplificateur » et le développement d'autres résistances. Si l'état clinique du patient le permet, attendre les résultats de l'antibiogramme. Si le tableau clinique l'exige, on débute un traitement antituberculeux empirique en suivant les critères énoncés pour la prise en charge des TB-MR (192).

1.4.2.2.2. Traitement d'une rechute (192) (193)

La rechute est suspectée, chez un patient qui a terminé son traitement, déclaré guéri après une cure complète de chimiothérapie correctement suivie et dont les cultures de crachats de fin de traitement étaient négatives, devant une détérioration clinique et radiologique compatible avec

une TB évolutive. Il est fondamental de réaliser les prélèvements microbiologiques pour confirmer la rechute et réaliser un nouvel antibiogramme sur une souche récemment isolée. La rechute peut être liée à un défaut de stérilisation des tissus hôtes, la souche de MTB restant sensible, mais dans des zones endémiques il faut craindre une réinfection par une nouvelle souche de BK. La plupart des rechutes surviennent dans les 6 à 12 mois suivant l'arrêt du traitement avec dans la plupart des cas des souches sensibles si le traitement comprenait de la RIF. En absence de RIF, le risque de rechute est plus élevé.

Si le traitement préalable a été bien conduit pour une TB à bacilles sensibles, l'American Thoracic Society recommande la reprise d'une quadrithérapie standard RHZE jusqu'au retour de l'antibiogramme. S'il existe une forte suspicion de résistance, le malade sera pris en charge comme une TB à bacilles résistants. S'il existe une suspicion intermédiaire de résistance, l'OMS a édicté des recommandations de retraitement pour les pays où les antibiogrammes ne sont pas disponibles. Il s'agit dans ce cas d'un traitement standard auquel on ajoute un aminoside (SM ou AMK) durant la phase initiale, c'est-à-dire pendant les deux premiers mois du traitement, en raison de la plus grande proportion de souches résistantes dans cette situation (résistance secondaire). En France les experts recommandent de se baser sur les données de l'antibiogramme disponible ou présomptif pour débiter un retraitement.

1.4.2.2.3. Interruption du traitement

Il n'existe pas de recommandation sur la prise en charge des interruptions de traitement. Mais, en général (193):

- Si l'interruption se produit pendant la phase initiale du traitement et dure deux semaines ou plus, le traitement doit être recommencé à son début. Cependant, si l'arrêt est de moins de deux semaines, le traitement peut être continué. Dans tous les cas, le malade doit recevoir intégralement les deux mois de traitement de la phase initiale ;
- Si l'interruption de traitement se produit pendant la phase de continuation et :
 - ✓ Si le malade a pris plus de 80 % de la dose totale, une prolongation de traitement n'est pas nécessaire (surtout si le malade avait un examen microscopique initial des expectorations négatif ; si l'examen microscopique était positif, une prolongation de traitement est conseillée) ;

- ✓ Si le patient a reçu moins de 80% du traitement et si l'arrêt a duré plus de trois mois, le traitement doit être recommencé entièrement. Si l'arrêt a duré moins de trois mois, il suffit de reprendre le traitement jusqu'à ce que la totalité des doses requises soient prises par le patient.

1.4.2.3. Traitement en cas de résistance suspectée ou confirmée (211) (209) (212) (213)

1.4.2.3.1. Traitement en cas de mono résistance ou de poly résistance

En cas de résistance confirmée à l'INH, dans les formes peu bacillifères, la deuxième phase comprendra 7 mois de RIF et d'EMB. Dans les formes bacillifères il est recommandé de demander un avis spécialisé pour évaluer le risque d'acquisition de résistance et l'adjonction d'un nouvel antituberculeux.

En cas de résistance naturelle (M bovis) ou acquise au PZA, le traitement sans PZA est recommandé pour une durée totale de 9 mois.

1.4.2.3.2. Traitement d'une tuberculose multi résistante

Les schémas longs de TB-MR sont des traitements pour la TB résistante à la RIF (TB-RR) ou de TB multi-résistante (TB-MR), qui durent 18 mois ou plus et qui peuvent être normalisés ou individualisés. Ces schémas sont généralement conçus pour inclure un nombre minimum d'antituberculeux de deuxième ligne considérés comme efficaces en fonction des antécédents du patient ou des modèles de résistance aux médicaments (Tableau 3). Ces schémas ont déjà été qualifiés de «conventionnels», ayant été le pilier du traitement contre la TB-MR avant la mise à jour de 2016. Le schéma long doit contenir au moins cinq médicaments efficaces contre la TB pendant la phase intensive, y compris la PZA et quatre médicaments de deuxième ligne- un choisi parmi le groupe A et un autre parmi les antituberculeux classés groupe B et au moins deux du groupe C - (recommandation conditionnelle avec un très faible niveau de preuve). Si le nombre minimum de médicaments efficaces contre la TB ne peut être composé comme indiqué ci-dessus, un agent du groupe D2 et d'autres agents du groupe D3 peuvent être ajouté pour porter le total à cinq. Chez les patients atteints de TB-RR ou de TB-MR, il est recommandé de renforcer encore le régime avec une dose élevée d'INH et / ou d'EMB (recommandation conditionnelle avec un très faible niveau de preuve).

Avec ces schémas thérapeutiques classiques, qui durent de 18 à 24 mois, on obtient de faibles taux de guérison – seulement 50% en moyenne au niveau mondial. Récemment, un régime de

traitement de TB-MR plus court de 9 à 12 mois peut être utilisé à la place des régimes plus longs dans des situations bien précises (recommandation conditionnelle avec un très faible niveau de preuve). Ce schéma court est indiqué chez les patients atteints de TB-RR ou de TB-MR, qui n'ont pas été traités avec des médicaments de deuxième intention et chez lesquels la résistance aux Fluoroquinolones et aux agents injectables de deuxième ligne a été exclue ou est jugée hautement improbable. Un organigramme décrivant la sélection des patients sur le régime de TB-MR plus court est présenté ci-dessous (figure 18).

Les schémas thérapeutiques courts de TB-MR ont été normalisés en contenu et en durée et se sont divisés en deux parties distinctes. La première est une phase intensive de quatre mois (prolongée jusqu'à un maximum de six mois en cas de manque de conversion du frottis) et comprenait les médicaments suivants : GFX (ou MFX), KAN, PTO, CFZ, dose élevée d'INH, le PZA et l'EMB. Celle-ci est suivie d'une phase de continuation de cinq mois avec les médicaments suivants : la GFX (ou la MFX), la CFZ, le PZA et l'EMB.

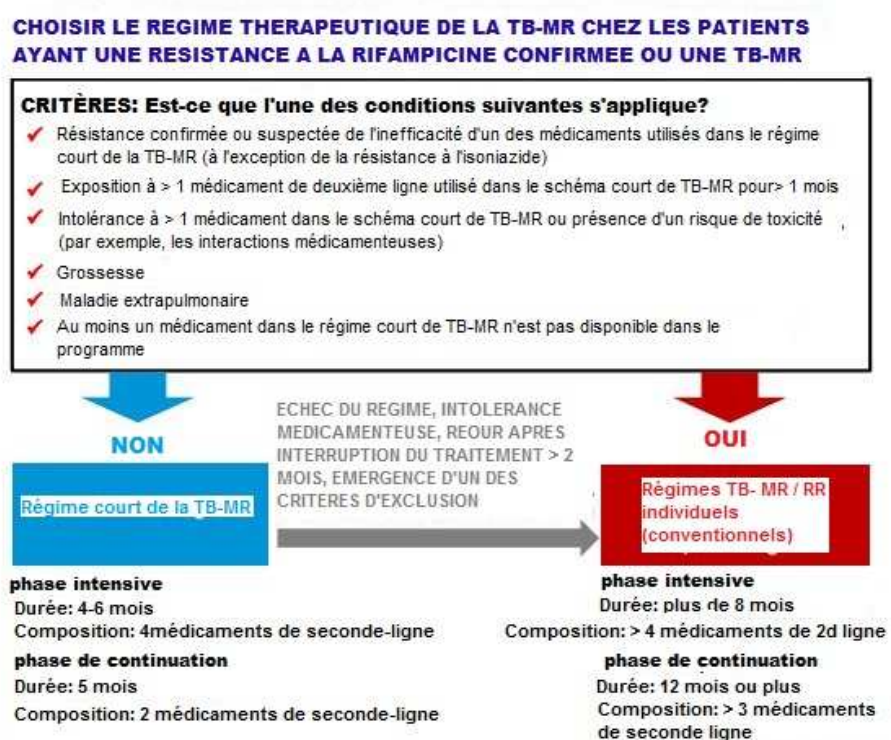


Figure 18: Les recommandations de l'OMS sur l'utilisation du régime court contre la TB-MR (214).

D'autres modifications ont été apportées par les recommandations 2016 de l'OMS, à savoir :

- Les médicaments utilisés dans la conception des régimes longs de traitement de TB-MR sont maintenant regroupés différemment en fonction des preuves actuelles de leur efficacité et de leur sécurité. La CFZ et le LNZ sont maintenant recommandés comme médicaments secondaires de deuxième ligne dans le schéma de TB-MR, tandis que le PAS peut être envisagé en complément ;
- La Clarithromycine et d'autres macrolides ne sont plus inclus parmi les médicaments à utiliser pour le traitement de TB-MR / TB-RR ;
- Bédaquiline et Délamanide ont maintenant été assignés à un sous-groupe spécifique d'agents complémentaires. En octobre 2016, l'OMS a publié sa nouvelle politique sur le Délamanide ;
- Le Délamanide peut maintenant être utilisé parallèlement à des traitements longs de TB-MR chez les patients âgés de 6 à 17 ans. Bédaquiline n'est encore recommandé que pour les adultes.
- Le traitement contre la TB-MR est recommandé pour tous les patients atteints de TB-RR, indépendamment de la confirmation de la résistance à l'INH. Seule l'étude de la résistance à la RIF est recommandée ;
- Il est recommandé que tout patient - enfant ou adulte - avec TB-RR chez qui la résistance à l'INH est absente ou inconnue, soit traité par un schéma court de TB-MR, soit traité -si cela ne peut être utilisé- par un régime long de TB-MR auquel l'INH est ajouté ;
- Des recommandations spécifiques sont faites pour le traitement des enfants atteints de TB-RR ou de TB-MR ;
- Utilisation de l'examen microscopique du frottis et de la culture pour surveiller la réponse au traitement, plutôt que de la microscopie de frottis seule, est recommandée pour la surveillance de la réponse des patients atteints de TB multi résistante au traitement ;
- Des recommandations éclairées sur le rôle de la chirurgie dans le traitement de la TB-MR sont maintenant incluses. Elles sont en faveur d'une résection pulmonaire partielle élective (lobectomie ou segmentaire) réalisée parallèlement à la pharmacothérapie.

Tableau 3: Médicaments recommandés pour le traitement de la tuberculose résistante à la rifampicine et de la tuberculose multi-résistante (213).

Groupe A : Fluoroquinolones		Lévofloxacine	LFX
		Moxifloxacine	MFX
		Gatifloxacine	GFX
Groupe B : Agents injectables de deuxième ligne		Amikacine	AMK
		Capréomycine	CAP
		Kanamycine	KAN
		(Streptomycine)	(SM)
Groupe C : Autres agents de base de deuxième ligne		Ethionamide / prothionamide	ETO / PTO
		Cyclosérine / térizidone	CS / TRD
		Linézolide	LZD
		Clofazimine	CFZ
Groupe D : Agents complémentaires (Ne fait pas parti du régime de base de TB-MR)	D1	Pyrazinamide	PZA
		Ethambutol	EMB
		Isoniazide forte dose	Hh
	D2	Bédaquiline	BDQ
		Délamanide	DLM
	D3	Acide para-amino-salicylique	PAS
		Imipénème–cilastatine	IPM
		Méropénème	MPM
		Amoxicilline protégée	AMX-CLV
		(Thioacétazone)	(THZ)

1.4.2.3.3. Traitement d'une tuberculose ultra résistante

La TB ultrarésistante (TB-UR) est beaucoup plus difficile à traiter que la TB-MR et extrêmement difficile à traiter chez les patients infectés par le VIH. Il n'existe actuellement aucun rapport sur des patients infectés par le VIH rapidement diagnostiqués TB-UR et placés sous traitement adéquat. En revanche, il existe quelques rapports de cohortes de patients VIH-négatifs montrant des taux guérison dépassant les 50%. Il existe peu de données sur les différentes approches cliniques dans la TB-UR. La prise en charge d'un patient atteint de TB-UR (diagnostic confirmé ou presque certain) est la suivante (172) :

- Envisager une utilisation plus longue du médicament injectable (12 mois voire le traitement complet). Si la souche du patient est résistante à tous les injectables, utiliser un injectable qui n'a jamais été utilisé chez ce patient ;
- Utiliser une Fluoroquinolones de troisième génération comme la MFX ;
- Utiliser tous les médicaments du Groupe 4 (ETO / PTO / CS / PAS) qui n'ont pas été utilisés de manière extensive lors d'un traitement antérieur ou tout médicament susceptible d'être efficace ;
- Utiliser deux ou plusieurs médicaments du Groupe 5 (BDQ / LNZ / CFZ / AMX-CLV / Hh / THZ / IPM / MPM). Ajouter la bédaquiline. Penser à l'INH à forte dose si le faible niveau de résistance est documenté ou si aucune mutation du gène katG n'est détectée ;
- Utiliser tous les médicaments du Groupe 1 (INH / RIF / PZA / EMB / Rifabutine) susceptibles d'être efficaces ;
- Envisager la chirurgie si la maladie est localisée ;
- Envisager l'usage compassionnel de nouveaux agents. La durée minimale suggérée de traitement de la TB-UR est de 24 mois.

1.4.3 Traitement des cas particuliers (209) (193)

1.4.3.1. Femmes

1.4.3.1.1. Femmes enceintes

Le traitement curatif de la TB est impératif chez la femme enceinte pour le succès de la grossesse et la bonne santé du nouveau-né. Il est identique au traitement standard. La RIF doit a priori être évitée au cours des dernières semaines de grossesse, mais l'administration de vitamine K1 à la mère et à l'enfant permet de prévenir d'éventuelles hémorragies maternelles et néonatales. Le PZA, bien qu'inclus dans le traitement standard chez la femme enceinte recommandé par l'OMS et l'UIC, n'est pas recommandé en France et aux États-Unis en raison de l'absence de données sur une éventuelle tératogénicité. Si le PZA n'est pas utilisé, la durée totale du traitement devra être prolongée jusqu'à neuf mois. L'administration de vitamine B6 permet de prévenir les éventuels effets neurotoxiques de l'INH. La SM est ototoxique pour le fœtus et en aucun cas elle ne doit pas être utilisée durant la grossesse.

1.4.3.1.2. Femme allaitante

Le traitement des femmes qui allaitent est impératif pour prévenir la transmission de l'infection au nouveau-né. Il est identique au traitement standard. Le nouveau-né doit recevoir une chimio prévention par INH et être vacciné par le BCG à l'issue de ce traitement et après vérification des tests cutanés. La supplémentation en pyridoxine est également recommandée chez la femme allaitante sous INH.

1.4.3.1.3. Femmes sous contraception

La RIF ou rifabutine réduit l'efficacité des contraceptifs hormonaux. Les moyens de contraception qui peuvent être proposés sont : la médroxyprogestérone en IM ou une méthode mécanique (diaphragme, préservatif, stérilet) ou, en dernier recours, un contraceptif oral fortement dosé en œstrogènes (50 µg / Cp), pendant toute la durée du traitement.

1.4.3.2. Enfants

Chez l'enfant, le schéma thérapeutique est 2 (HRZE) / 4 (HR), sauf en cas de méningite tuberculeuse ou ostéo-articulaire où l'enfant reçoit 2 (HRZE) / 10 (HR). Quel que soit l'âge de l'enfant, l'EMB s'il est correctement dosé (c.-à-d. 20 mg/kg/jour) est sans danger, en particulier sur le plan de la toxicité oculaire. Son utilisation chez l'enfant est courante dans le traitement de la TB pharmaco-sensible. La SM doit être évitée en raison du risque de lésions définitives du nerf auditif et parce que les injections sont douloureuses. Par conséquent, le régime de retraitement n'est pas recommandé chez les enfants.

Les enfants atteints de TB sont souvent malnutris. Les enfants souffrant de malnutrition sévère doivent recevoir des aliments thérapeutiques. En l'absence de malnutrition sévère, les enfants reçoivent des suppléments nutritionnels sous forme de rations alimentaires standards ou de nourriture prête à l'emploi pour au moins les deux premiers mois de traitement si possible.

1.4.3.3. Insuffisance hépatique

Cette section couvre le traitement de la TB chez les patients atteints d'une maladie du foie préexistante.

Les patients avec les conditions suivantes peuvent recevoir les régimes de TB habituels à condition qu'il n'y ait aucune évidence clinique d'une maladie hépatique chronique : transport de virus de l'hépatite, antécédents d'hépatite aiguë, consommation actuelle d'alcool excessive.

Cependant, les réactions hépatotoxiques aux médicaments antituberculeux peuvent être plus fréquentes chez ces patients et devraient donc être anticipées.

Chez les patients atteints d'une maladie hépatique instable ou avancée, les tests de la fonction hépatique doivent être effectués au début du traitement, si possible. Si le niveau sérique d'alanine aminotransférase (ALAT) est plus de 3 fois la normale avant l'initiation du traitement, les régimes suivants doivent être pris en considération. Plus la maladie du foie est instable ou sévère, Il faut utiliser moins de médicaments hépatotoxiques.

Les schémas possibles comprennent:

- Deux médicaments hépatotoxiques (plutôt que les trois dans le schéma standard) :
 - ✓ 9 mois d'INH et de RIF, plus l'EMB (jusqu'à ou à moins que la susceptibilité à l'INH soit documentée) ;
 - ✓ 2 mois d'INH, de RIF, de SM et d'EMB, suivis de 6 mois d'INH et de RIF ;
 - ✓ 6-9 mois de RIF, de PZA et d'EMB.
- Un médicament hépatotoxique : 2 mois d'INH, d'EMB et de SM, suivis de 10 mois d'INH et d'EMB ;
- Aucun médicament hépatotoxique : 18-24 mois de SM, d'EMB et de Fluoroquinolones.

Une consultation d'expert est recommandée pour traiter les patients présentant une maladie du foie avancée ou instable.

La surveillance clinique (et les tests de la fonction hépatique, si possible) de tous les patients présentant une maladie du foie préexistante devraient être effectués pendant le traitement.

1.4.3.4. Insuffisance rénale

Chez le patient en insuffisance rénale avec clairance de la créatinine > 30 ml/min, le traitement antituberculeux standard est recommandé ; l'EMB étant utilisé dans la fourchette basse de posologie (15 mg/kg). Chez le patient avec clairance < 30 ml/min il est recommandé de réduire la posologie d'EMB (7-10 mg/kg), de réduire celle du PZA (15 mg/kg) et de l'INH (3-4 mg/kg). Chez le patient dialysé, il est recommandé d'administrer le traitement 3 fois par semaine, après chaque dialyse. L'EMB ne sera utilisé que chez les sujets bacillifères et à la posologie de 10 mg/kg après chaque dialyse. La posologie unitaire de RIF et de PZA est

inchangée, la posologie unitaire d'INH est de 3-4 mg/kg. Des dosages sériques sont recommandés (avis d'experts).

1.4.4. Surveillance du traitement (215) (194) (193)

La surveillance du patient est nécessaire pour évaluer la réaction de la maladie au traitement, identifier et prendre en charge les réactions secondaires indésirables des médicaments.

1.4.4.1. Evaluation de la réaction de la maladie au traitement

Pour estimer la réaction de la TP au traitement, la méthode la plus rapide est la microscopie du frottis d'expectoration. Tous les patients devraient être surveillés pour juger de la réaction au traitement, que l'on évalue le mieux avec la TP par des analyses microscopiques d'expectorations (deux spécimens) au moins à la fin de la phase initiale du traitement (à deux mois), à cinq mois et à la fin du traitement. Le fait d'avoir un frottis d'expectoration positif à la fin de cinq mois de traitement définit l'échec du traitement, indiquant le besoin de détermination de la sensibilité des bacilles aux antibiotiques et de recommencer un nouveau traitement. Bien qu'utilisées couramment, les évaluations radiographiques ont montré qu'elles n'étaient pas fiables pour évaluer la réaction au traitement. De même, l'évaluation clinique peut ne pas être fiable et peut induire en erreur lors de la surveillance de patients atteints de TP.

Chez les patients atteints de TEP et chez les enfants, les évaluations cliniques peuvent être le seul moyen disponible pour évaluer la réaction au traitement. Les effets secondaires des médicaments apparaissent, dans presque la totalité des cas, pendant le 1er mois de traitement.

1.4.4.2. Evaluation des réactions indésirables des antituberculeux

La surveillance clinique et para-clinique minimale qui doit être effectué tout au long des six mois de traitement est résumée dans le Tableau 4.

Tableau 4 : La surveillance minimale pour évaluer la tolérance au traitement antituberculeux.

	Avant traitement	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M9	M12
Examens cliniques/consultation	*	*	*	*	*		*	*	*
Transaminases 1	*	J7- J14, J30		*		*			
NFS	*	J7- J14, J30		*		*			
Créatininémie	*								
Uricémie	*								
Examens ophtalmologiques 2	*	J15	*		*		*		

1. Entre J10 et J20 afin de vérifier la négativation de l'examen direct et lever de l'isolement respiratoire.
2. Si EMB prescrit dans l'association.

La majorité des antibiotiques étant excrétés par voie rénale, la fonction rénale (Créatininémie) doit être contrôlée avant le début du traitement. Si elle est normale, elle n'a pas lieu d'être contrôlée à nouveau.

L'INH, la RIF et le PZA étant métabolisés par le foie et pouvant entraîner un certain degré de cytolyse, la fonction hépatique (transaminases) doit être contrôlée avant le traitement et après deux, quatre, six et huit semaines de traitement. Une surveillance accrue des transaminases au cours de la première semaine de traitement est recommandée en présence d'autres facteurs de risque hépatique.

Le PZA et ses métabolites étant excrétés en compétition avec l'acide urique, l'uricémie doit être dosée avant traitement.

L'EMB pouvant être toxique pour le nerf optique, la fonction visuelle (champ visuel et vision des couleurs) doit être contrôlée au cours du premier mois de traitement. Pour limiter les

risques de contagion lors d'un examen ophtalmologique initial, on peut différer légèrement celui-ci jusqu'à ce que la contagiosité ait nettement diminué (soit après 1 à 2 semaines de traitement).

Dans les cas où les résultats des examens para-cliniques effectués avant la mise au traitement sont anormaux, la posologie des antibiotiques doit être rigoureusement adaptée à ces résultats de manière à éviter les risques de toxicité. Pour cela, il est prudent de faire appel à un praticien expérimenté.

Les dosages sériques d'antituberculeux ne sont pas recommandés en routine. Ils peuvent être utiles en cas de suspicion de mauvaise observance, de malabsorption digestive ou d'interaction médicamenteuse.

Compte tenu de la perte de poids fréquente au moment du diagnostic d'une TB, il est nécessaire d'adapter les posologies à la progression du poids sous traitement.

1.4.4.3. Prise en charge des effets secondaires des antituberculeux

Une élévation des transaminases sous traitement doit conduire à vérifier la posologie des médicaments rapportée au poids, notamment celle du PZA. Un respect strict de la posologie du PZA (pas plus de 25 mg/kg/jour) diminue considérablement le risque d'hépatite fulminante.

- Si les transaminases restent inférieures à 6 fois la limite supérieure des valeurs usuelles, le traitement n'a pas lieu d'être modifié, mais on vérifiera que la posologie de ces antibiotiques est bien adaptée et on intensifiera la surveillance hépatique ;
- Si les transaminases atteignent ou dépassent 6 fois la normale, l'INH et la PZA sont arrêtés jusqu'à normalisation du bilan hépatique. Une bithérapie par RIF et EMB ou un autre antituberculeux est conservée. L'INH est ensuite réintroduit à faible dose (3 mg/kg) avec un suivi des transaminases bihebdomadaire. Si le PZA doit être repris, un dosage quotidien des transaminases est requis et leur ré-ascension impose l'arrêt de la molécule. Dans ce cas, la phase initiale est prolongée de 2 à 4 mois tandis que la durée globale de traitement passe à 9 mois.

Au cours du traitement par le PZA, il y a une augmentation de l'uricémie par compétition au niveau de l'élimination rénale. L'hyper uricémie, conséquence normale du traitement, peut parfois entraîner des arthralgies, rarement de véritables crises de goutte. Les arthralgies, qui

cèdent habituellement à un simple traitement antalgique (aspirine), ne nécessitent pas l'arrêt du PZA. A contrario, les crises de goutte sont traitées par un uricosurique et peuvent imposer l'arrêt du PZA si l'adaptation de la posologie n'est pas suffisante pour éviter leur réapparition. La surveillance systématique de l'uricémie sous traitement est utile, l'hyper uricémie étant un des indicateurs de l'observance du traitement.

Une neuropathie périphérique, signalée par des paresthésies distales des membres inférieurs, habituellement causées par l'INH, peut survenir chez les dénutris et éthyliques. La vitamine B6 (50 mg/jour) permet de remédier à cet effet secondaire. Elle doit être administrée préventivement chez les malades à risque, c'est-à-dire en cas de grossesse, d'exogénose, de dénutrition, de diabète, d'insuffisance rénale et d'infection par le VIH.

1.4.5. Supervision du traitement (DOTS) (215)

La lutte antituberculeuse est basée sur la stratégie DOTS (Directly Observed Treatment Short-Course). C'est une stratégie globale, dont le traitement sous observation directe (TOD) n'est qu'une des cinq composantes : (1) engagement politique du gouvernement, (2) réseau de centres de microscopie avec contrôle de qualité, (3) approvisionnement régulier en médicaments et matériel, (4) traitement standardisé directement observé, (5) bon système de notification. La prise de médicaments au cours de la phase initiale (les 2 premiers mois) doit être strictement supervisée tous les jours par un personnel de santé ou une personne habilitée et formée à cette tâche : à l'hôpital, au centre de santé, au poste de santé ou même à domicile. Le responsable du traitement doit voir le malade prendre ses médicaments (« traitement directement observé »). L'adhésion au traitement est le facteur critique déterminant de l'observance thérapeutique et donc de sa réussite, la méthode « TOD » sus-décrite vise à promouvoir et évaluer ce facteur.

1.4.6. Résultats thérapeutiques (216)

Deux types de patients sont clairement distingués dans les nouvelles définitions des résultats thérapeutiques :

- Les patients qui suivent un traitement contre la TB sensible aux médicaments ;
- Les patients qui suivent un traitement de deuxième intention contre la TB résistante aux médicaments (poly chimiothérapie incluant des médicaments autres que ceux du groupe 1)

1.4.6.1. Résultats thérapeutiques pour les patients tuberculeux (exclusion faite des patients suivant un traitement contre la tuberculose RR ou contre la tuberculose MR)

Résultat thérapeutique	Définition
Guérison	Un patient atteint de TB pulmonaire chez qui l'affection a été confirmée bactériologiquement en début de traitement présente des résultats négatifs (selon l'examen des frottis ou la mise en culture) au cours du dernier mois de traitement et au moins une fois auparavant.
Traitement terminé	Le patient tuberculeux a terminé le traitement sans signe d'échec, MAIS on ne dispose pas de données indiquant que les résultats de l'examen des frottis ou de la mise en culture ont été négatifs au cours du dernier mois de traitement et au moins une fois auparavant, soit parce que les tests n'ont pas été réalisés soit parce que les résultats ne sont pas disponibles.
Échec thérapeutique	Le patient tuberculeux continue de présenter des résultats positifs (selon l'examen des frottis ou la mise en culture) après cinq mois de traitement ou plus.
Décès	Le patient tuberculeux meurt pour une raison quelconque au cours du traitement ou avant de l'avoir commencé.
Perdu de vue	Le patient tuberculeux n'a pas entamé de traitement ou celui-ci a été interrompu pendant deux mois consécutifs ou plus.
Non évalué	Patient tuberculeux à qui aucun résultat thérapeutique n'a été attribué. Cette catégorie inclut les cas transférés à une autre unité de traitement (« transferts sortants ») et ceux dont les résultats sont inconnus de l'unité chargée de la notification.
Succès thérapeutique	Somme des patients guéris et des patients ayant terminé leur traitement.

1.4.6.2. Résultats thérapeutiques pour les patients atteints de tuberculose RR, de tuberculose MR ou de tuberculose UR et suivant un traitement de deuxième intention

Résultat thérapeutique	Définition
Guérison	Le traitement a été mené à bien conformément aux recommandations nationales, sans signe d'échec ET après la phase intensive, trois cultures ou plus ont été réalisées à au moins 30 jours d'intervalle et elles ont produit des résultats négatifs.
Traitement terminé	Le traitement a été mené à bien conformément aux recommandations nationales, sans signe d'échec, MAIS rien n'indique qu'après la phase intensive trois cultures ou plus aient été réalisées à au moins 30 jours d'intervalle et qu'elles aient produit des résultats négatifs.
Échec thérapeutique	Il a été mis fin au traitement ou le schéma doit être modifié pour deux antituberculeux au moins, en raison : – d'une absence de conversion avant la fin de la phase intensive, ou – d'une réversion bactériologique survenant durant la phase d'entretien qui suit la conversion au statut négatif, ou – de signes d'acquisition d'une résistance supplémentaire aux fluoroquinolones ou aux médicaments injectables de deuxième intention, ou – de réactions indésirables.
Décès	Le patient meurt pour une raison quelconque au cours du traitement ou avant de l'avoir commencé.
Perdu de vue	Patient dont le traitement a été interrompu pendant deux mois consécutifs ou plus.
Non évalué	Patient tuberculeux à qui aucun résultat thérapeutique n'a été attribué. Cette catégorie inclut les cas transférés à une autre unité de traitement (« transferts sortants ») et ceux dont les résultats sont inconnus de l'unité chargée de la notification.
Succès thérapeutique	Somme des patients guéris et des patients ayant terminé leur traitement.

Dans le cas d'un échec thérapeutique, on parle d'absence de conversion avant la fin de la phase intensive si cette dernière n'a pas lieu au cours de la durée maximale retenue par le programme national de lutte antituberculeuse. En l'absence de définition, on propose de fixer ce seuil à huit mois. Il est proposé que les critères définitoires des catégories Guérison, Traitement terminé et Échec thérapeutique commencent à s'appliquer huit mois après le début du traitement. Ici, les termes «conversion» et «réversion» sont définis comme suit en rapport avec les cultures :

- Conversion (au statut négatif) : deux cultures consécutives, réalisées à au moins 30 jours d'intervalle, ont produit des résultats négatifs. On considère alors comme date de conversion la date à laquelle l'échantillon de la première culture négative a été collecté.
- Réversion (vers un statut positif) : après une conversion initiale, deux cultures consécutives, réalisées à au moins 30 jours d'intervalle, ont produit des résultats positifs. Lorsqu'il s'agit de définir l'échec thérapeutique, la réversion n'est prise en compte que si elle survient au cours de la phase d'entretien.

2. Traitement de la tuberculose latente (217) (218) (219) (220) (221) (222) (192)

2.1. Identification des groupes à risque admissibles au traitement de l'infection tuberculeuse latente

En 2015, l'OMS a publié des directives sur le dépistage, le traitement et la prise en charge de l'infection tuberculeuse latente (ITL) chez les personnes infectées pour lesquelles le risque d'évolution en maladie active était le plus élevé. Ces directives préconisent l'adoption d'une approche ciblée en matière de santé publique, qui inclut le dépistage dans certains groupes à haut risque de réactivation de l'ITL, associé à un traitement préventif chez les personnes pour qui ce traitement sera le plus bénéfique.

Les groupes cibles incluent les personnes vivant avec le VIH, les adultes et les enfants en contact avec des personnes atteintes d'une TB pulmonaire, les patients qui commencent un traitement par un inhibiteur du facteur de nécrose tumorale, les patients sous dialyse, les patients en préparation d'une greffe et les patients atteints d'une silicose. D'autres groupes vulnérables ou difficiles à joindre, dans lesquels l'incidence de la TB est plus élevée, incluent les détenus, les personnes ayant une pharmacodépendance ou une dépendance à l'alcool, les intervenants auprès des sans-abri, les résidents d'établissements de soins de longue durée, les peuples autochtones et les immigrants en provenance de pays où le fardeau de la TB est élevé. Néanmoins, dans les pays à ressources limitées et dans les autres pays à revenu intermédiaire - le Maroc à titre indicatif - le dépistage et le traitement de l'ITL n'est systématique que chez :

- Les personnes séropositives (VIH positifs) ;
- Les enfants de moins de 5 ans se trouvant dans l'entourage d'un sujet atteint d'une forme de TB contagieuse et qui, après une évaluation clinique appropriée, se sont révélés de ne pas avoir une TB active, mais la ITL devrait être traitée.

2.2. Algorithme pour tester et traiter une ITL

Les sujets soupçonnés être à risque accru d'infection tuberculeuse, doivent tout d'abord être interrogées sur la présence ou l'absence des symptômes de la TB avant d'être testées pour l'ITL. Le test de libération d'interféron gamma (TLIG) et l'intradermo-réaction (IDR) sont tous les deux recommandés comme outils de dépistage. Une radiographie pulmonaire devrait être réalisée avant d'instaurer un traitement de l'ITL pour exclure une TB active.

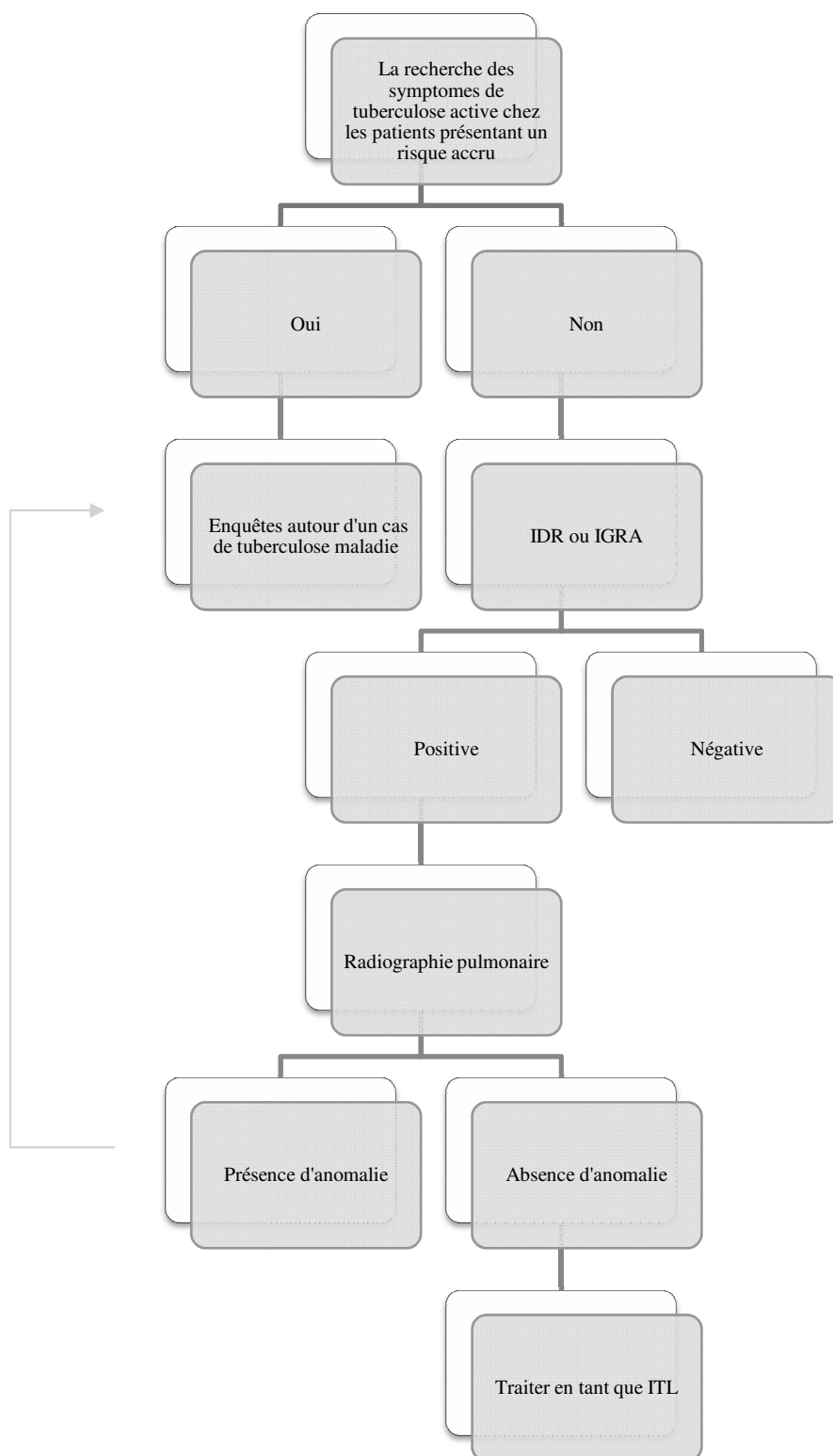


Tableau 5 : Algorithme pour le diagnostic ciblé et le traitement de l'ITL chez les sujets issus des groupes à risque (217).

2.3. Schémas thérapeutiques

Plusieurs options thérapeutiques sont recommandées par l'OMS pour le traitement de l'ITL ils sont regroupées dans le tableau 6.

Chez l'enfant, lorsqu'un traitement d'ITL est indiqué en cas de contact avec un cas de TB à bacilles a priori sensible, l'association INH et RIF est recommandée pour une durée de 3 mois. Le régime composé de l'INH seul est une alternative possible.

Chez l'adulte, lorsqu'un traitement d'ITL est justifié en cas de contact avec un cas de TB à bacilles a priori sensibles, il est recommandé d'administrer l'INH pour une durée de 9 mois. L'association INH et RIF, pour une durée de 3 mois est une alternative possible.

Chez l'enfant comme chez l'adulte, lorsqu'un traitement d'ITL est justifié en cas de contact avec un cas de TB à bacilles sensibles, il est recommandé de ne pas donner de la RIF seule ou l'association RIF-PZA du fait du manque d'études d'une qualité méthodologique suffisante (RIF) et d'un moins bon rapport bénéfice/toxicité (RIF - PZA).

Lorsqu'un traitement de la TB infection est justifié au cours de grossesse, les recommandations habituelles peuvent être appliquées. L'allaitement n'est pas contre-indiqué.

Lorsqu'un traitement d'ITL est justifié dans une situation immunodéprimante (VIH positif par exemple), le traitement recommandé est l'INH seul. RIF et les régimes contenant de la Rifapentine peuvent induire des interactions médicamenteuses avec les antirétroviraux, d'où la nécessité de les éviter chez les patients VIH positifs.

Lorsqu'un traitement d'ITL est justifié en cas de maladie hépatique grave, le traitement recommandé est la RIF seule pour une durée de 3 mois.

Lorsqu'un traitement de la TB infection est justifié en cas d'insuffisance rénale terminale, les recommandations habituelles peuvent être appliquées.

Lorsqu'un traitement d'ITL est justifié en cas de contact avec un cas de TB résistante à l'INH, en absence de données aucune recommandations générales ne peut être donné.

Lorsqu'un traitement d'ITL est justifié en cas de contact avec un cas de TB-MR, il est recommandé d'obtenir l'antibiogramme complet de la souche avant de proposer un traitement préventif.

Tableau 6 : Les différents schémas thérapeutiques recommandés par l'OMS.

Régime	Durée	Dose par kg de poids
Isoniazide	6-9 mois	5 mg/kg chez l'adulte (au maximum 300 mg/j) 10 mg/kg chez l'enfant
Rifapentine plus isoniazide hebdomadaire (12 doses)	3 mois	Isoniazide : 15 mg/kg maximum 900 mg/semaine Rifapentine : 300 mg (10.0-14.0 kg) 450 mg (14.1-25.0 kg) 600 mg (25.1-32.0 kg) 750 mg (32.1- 49.9 kg) 900 mg ($\geq$ 50 kg)
Rifampicine plus isoniazide	3-4 mois	Rifampicine : 10 mg/kg chez l'enfant et chez l'adulte (au maximum 600 mg/j) Isoniazide : 5 mg/kg chez l'adulte (au maximum 300 mg) 10 mg chez l'enfant
Rifampicine	3-4 mois	10 mg/kg chez l'adulte (au maximum 600 mg/j) 10 mg/kg chez l'enfant

2.4. Surveillance des patients sous traitement de l'ITL

Chez l'adulte, lorsqu'un traitement d'ITL comportant de l'INH est justifié, il est recommandé de réaliser une surveillance des transaminases pendant le premier mois de traitement, en particulier chez la personne âgée, l'alcoolique, la femme en post-partum, le malade non compliant et en cas d'association à d'autres médicaments hépatotoxiques.

Chez l'enfant, lorsqu'un traitement d'ITL comportant de l'INH est justifié, il est recommandé de surveiller cliniquement l'enfant tous les mois et de donner une information soigneuse aux parents sur les signes témoignant d'une éventuelle toxicité du traitement : douleurs abdominales, vomissements et ictère. Un dosage systématique des transaminases est recommandé chez les enfants ayant une pathologie hépatique ou dont la famille a une mauvaise compréhension des signes cliniques de toxicité.

Chez l'enfant, comme chez l'adulte, il est recommandé d'interrompre le traitement en cas d'apparition de signes cliniques d'hépatotoxicité.

**2^{ÈME} PARTIE : DIAGNOSTIC
BACTERIOLOGIQUE,
IDENTIFICATION DES MARQUEURS
EPIDEMIOLOGIQUE ET RESISTANCE
AUX ANTITUBERCULEUX**

1. TECHNIQUES CLASSIQUES

A. Diagnostic bactériologique et méthodes de différenciation

La mise en évidence de la présence du BK dans les produits biologiques constitue le diagnostic de certitude de la TB.

Dans les formes pulmonaires, seules les expectorations contenant des mucosités permettent d'identifier les malades bacillifères. Tout tuberculeux présumé contagieux devra donner au minimum 2, de préférence 3, échantillons de crachat émis par la toux spontanée ou après manœuvre kinésithérapique facilitant l'expectoration (223). Le recueil se fait dans un flacon large, à fermeture hermétique et non stérile. Un crachat salivaire sera rejeté et on recommencera le prélèvement. On prélève toujours le matin au réveil, chez un patient à jeun, après avoir pratiqué une toilette bucco-dentaire. Le tubage gastrique permet de récupérer les crachats déglutis pendant le sommeil lorsque l'obtention de mucosités est impossible (c'est le cas des jeunes enfants) (224). Le prélèvement doit être répété au minimum 2 jours de suite. Les patients chez qui le diagnostic fait souvent défaut, un protocole alternatif d'un jour peut être proposé, il consiste en la collecte de deux échantillons d'expectoration le même jour (225).

Pour les recherches extra-pulmonaires, les liquides biologiques ou la biopsie sont acceptables, reçus en pot stérile et non sur écouvillon (226).

La démarche générale du diagnostic bactériologique de la TB repose tout d'abord sur la recherche de bacilles acido-alcoolorésistants (BAAR) par l'examen microscopique, la mise en milieux de culture spécifiques, l'identification du BK à partir de la culture en faisant appel aux méthodes biochimiques et moléculaires et l'étude de la sensibilité face aux antituberculeux (224).

1. Examen microscopique

Il s'agit d'une technique simple, rapide (résultats obtenus en deux heures) et peu coûteuse, très spécifique dans les zones où la prévalence de la TB est très élevée. Il constitue une étape essentielle pour la détection de MTB par sa propriété tinctoriale d'acido-alcool-résistance après coloration de Ziehl-Neelsen (après action de la fuchsine, la préparation est traitée par l'acide nitrique puis par l'alcool). Cependant, cette propriété est partagée par toutes les

mycobactéries ce qui ne permet pas de conclure sur l'identité de l'espèce observée à ce stade de l'examen. Les BAAR sont facilement détectables après une coloration fluorescente à l'Auramine des étalements du produit pathologique. Les BAAR apparaissent sous forme de bacilles verts fluorescents sur fond rouge pour les frottis colorés à l'Auramine et rosés sur fond bleu après coloration de Ziehl-Neelsen (227). A l'examen direct la charge bacillaire est quantifiée en nombre de BAAR par champ ou sur la lame. Il est peu sensible car le seuil de détection microscopique est de l'ordre de 10^4 BAAR/ml d'échantillon (224). Dans la TP, ce seuil signe le caractère bacillifère et donc contagieux de la maladie, amenant le clinicien à prendre très rapidement les mesures de prévention adéquates pour l'entourage.

La qualité de l'examen direct est influencée par la nature du prélèvement, sa sensibilité varie de 10–20 % pour les prélèvements extra-pulmonaires contre 65 % pour les échantillons pulmonaires (228). Son apport dans la TB pédiatrique et chez les patients coïnfectés par le VIH est restreint (225). Par ailleurs, un examen direct positif ne renseigne pas sur le caractère vivant ou mort des bacilles, donc il n'est pas un bon marqueur d'efficacité thérapeutique, d'échec thérapeutique ou de rechute tuberculeuse (229).

Face à un examen microscopique négative -ce qui est le cas dans environ la moitié des cas de TP- le médecin est amené à attendre les résultats des cultures pour confirmer le diagnostic de TB.

2. Culture

La culture est la méthode de référence pour le diagnostic de la TB « gold standard ». Par définition, elle est de loin plus sensible et plus spécifique que l'examen microscopique. C'est une méthode qui permet non seulement d'identifier la bactérie en cause, mais aussi de mesurer sa sensibilité aux antituberculeux et de déterminer l'empreinte d'ADN des isolats pour les études d'épidémiologie moléculaire (230).

Les sécrétions respiratoires et les urines ainsi que d'autres prélèvements éventuellement non stériles doivent être décontaminés avant d'êtreensemencés dans les milieux de culture solides et/ou liquides.

Les milieux solides sélectifs de Lowenstein-Jensen et de Coletsos définissent les caractères cultureux classiques de MTB, tels que mentionnés dans le chapitre B. *Mycobacterium tuberculosis* de la première partie de notre rapport. La culture sur des milieux solides nécessite

4-8 semaines avant d'obtenir un diagnostic confirmé, d'où l'intérêt des nouvelles techniques de culture en milieu liquide (Middlebrook, MGIT®, Versa TREK®, BacT/ALERT®). Qu'elles soient automatisées ou non, ces méthodes permettent de réduire de façon significative le délai de positivité de 10 à 14 jours en moyenne par rapport aux cultures en milieu solide (229) (231). La coloration de Ziehl-Nelsen des MTB cultivés sur les milieux liquides met en évidence un mode de groupement en longues "cordes", qui est attribué à la production d'une substance appelée le « cord factor » (227). Cependant, bien que les méthodes de culture liquides puissent fournir un moyen rapide, elles exposent à un risque de contamination croisée entre prélèvements (224). La combinaison des deux milieux de culture solide et liquide permet de renforcer le diagnostic (232).

3. Identification

Après un temps d'incubation qui varie selon les espèces, les cultures positives sont soumises à une approche analytique d'identification. Cette approche repose sur des caractères biochimiques (mise en évidence de l'équipement enzymatique du BK) et cultureux (Aspect, vitesse, croissance en présence d'inhibiteurs), regroupés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 7: Les principaux caractères d'identification des mycobactéries (233).

	Croissance		Pigmentation		Niacine	Catalase		Nitrate-réductase	Tween 80		Urée		β-glucosidase	Arylsulfatase 3 j	Températures de croissance				Croissance sur				
	<5 j	>5 j	Obs.	Lum.		22 °C	68 °C		5 j	10 j	3 h	18 h			30 °C	37 °C	42 °C	52 °C	Tb 1 (10 µg)	TCH (2 µg)	Cyclo (30 µg)	Gélose	Lévulose
<i>M. tuberculosis</i>	+	****	+	+	****	****	+	****	++	++	+	++	****	+	****	****	+	+	****	+	+		
<i>M. bovis</i>	+	****	+	+	****	****	+	****	+	+	+	++	+	+	****	****	+	+	****	+	+		
<i>M. bovis</i> BCG	+	****	+	+	****	****	+	****	+	+	****	****	+	+	****	****	+	****	****	+	+		
<i>M. africanum</i>	+	****	+	+	++	****	+	++	++	++	+	++	++	+	****	****	+	+	++	+	+		
<i>M. kansasii</i>	+	****	+	****	+	****	****	****	****	****	+	++	++	++	****	****	+	+	++	+	+		
<i>M. marinum</i>	****	+	+	****	++	****	++	+	****	****	****	+	++	****	+	+	+	****	****	+	+		
<i>M. scrofulaceum</i>	+	****	****	****	+	****	****	++	+	+	++	****	+	+	****	****	+	++	****	+	+		
<i>M. goodii</i>	+	****	****	****	+	****	****	+	****	****	+	+	+	+	****	****	+	****	****	+	+		
<i>M. flavescens</i>	+	****	****	****	+	****	****	****	****	****	+	+	+	++	****	****	+	+	****	****	+		
<i>M. szulgai</i>	+	****	++	****	+	****	****	****	+	++	++	++	++	++	****	****	+	+	****	****	+		
<i>M. avium-intracellulare</i>	+	****	+	+	+	****	****	+	+	+	+	+	+	+	****	****	++	+	****	****	+		
<i>M. xenopi</i>	+	****	****	****	+	****	****	+	+	+	+	+	+	****	****	****	++	****	****	+	+		
<i>M. simiae</i>	+	****	++	****	++	****	****	+	+	+	++	****	+	+	****	****	+	+	****	****	+		
<i>M. terrae</i>	+	****	+	+	+	****	****	****	****	****	+	+	++	++	****	****	+	+	****	****	+		
<i>M. non chromogenicum</i>	+	****	+	+	+	****	****	****	****	****	+	+	++	++	****	****	++	+	****	****	+		
<i>M. gastri</i>	+	****	+	+	+	****	****	++	****	****	+	+	++	++	****	****	+	+	****	****	+		
<i>M. fortuitum</i>	****	+	+	+	+	****	****	++	++	++	+	++	****	****	****	****	+	+	****	****	****		
<i>M. chelonae</i>	****	+	+	+	+	****	****	++	++	+	++	+	****	****	****	****	+	+	****	****	+		
Autres du groupe IV	****	+	++	++	+	****	****	++	++	++	++	++	+	++	****	****	++	+	****	****	****		

**** > 95 % de souches positives

++ de 25 % à 75 % de souches positives

+++ > 75 % de souches positives

• < 25 % de souches positives

En conclusion, le diagnostic bactériologique conventionnel garde toujours sa place dans le diagnostic de la tuberculose maladie et les prises de décision thérapeutique.

Microscopie des frottis d'expectoration nécessite l'examen des échantillons d'expectorations à l'aide d'un microscope pour déterminer la présence des BAAR. Dans les définitions de cas actuelles recommandées par l'OMS, un résultat positif est requis pour un diagnostic de tuberculose pulmonaire à bacilloscopie positive.

Méthodes basées sur la culture est la norme de référence actuelle, elle nécessite une capacité de laboratoire plus développée et peut prendre jusqu'à 12 semaines pour fournir des résultats. Cependant, le manque de sensibilité (l'examen microscopique direct) et le long délai de rendu des résultats (la culture) font de la mise en place d'un outil performant et rapide un défi à soulever.

B. Résistance aux antituberculeux

1. Définitions

1.1. Résistance bactérienne à un antibiotique

On distingue trois types de résistance microbienne : génétique, microbiologique et clinique (234).

La résistance génétique peut être définie comme un changement (mutation, transferts de gènes, etc.) dans le code génétique du micro-organisme, codant ainsi un gène altéré.

La résistance microbiologique se traduit par la capacité d'une souche bactérienne à survivre et à se multiplier malgré son exposition à un antibiotique et à des concentrations qui sont habituellement bactéricides ou bactériostatiques.

La résistance clinique est la plus pertinente dans le cadre de la pratique médicale courante, puisqu'elle se traduit par l'échec clinique d'une antibiothérapie.

1.2. Résistance naturelle

La résistance naturelle ou intrinsèque est programmée sur le génome bactérien. Elle permet aussi de connaître le spectre d'activité des antibiotiques. Par exemple les mycobactéries du MTBC sont naturellement résistantes aux principales familles d'antibiotiques comme les β -lactamines, les macrolides, les cyclines, les sulfamides et les glycopeptides. Cette résistance est la résultante de plusieurs mécanismes à savoir la faible perméabilité de la paroi, la production d'enzymes hydrolysant les antibiotiques, la moindre affinité de la cible pour un antibiotique, etc. (235) (236).

La résistance naturelle est un caractère stable, transmis à la descendance mais il n'est pas ou peu transmissible à d'autres espèces. A ce titre, elles constituent un critère d'identification. Par exemples, au sein même des mycobactéries, le phénotype de sensibilité et de résistance naturelle aux antibiotiques est spécifique d'une espèce de mycobactérie. Les mycobactéries atypiques sont résistantes à la plupart des antituberculeux spécifiques (INH, PZA, EMB, PAS), c'est-à-dire des antibiotiques spécifiquement actifs sur les mycobactéries du MTBC (235).

1.3. Résistance acquise

La résistance acquise résulte d'une modification du capital génétique de la bactérie, lui permettant de tolérer une concentration d'antibiotique plus élevée que celle qui inhibe les souches sensibles de la même espèce. La résistance acquise est moins stable, elle ne concerne que quelques souches d'une même espèce mais peut s'étendre : leur fréquence varie dans le temps mais aussi dans l'espace (région, ville, hôpital ou même service). Elles constituent un marqueur épidémiologique. Ce phénomène a atteint une telle ampleur que la seule identification bactérienne ne permet plus de prédire le comportement d'une souche isolée vis-à-vis des antibiotiques d'où l'intérêt et la nécessité de réaliser des antibiogrammes (236) (237).

1.4. Résistance dans les nouveaux cas et dans les cas traités antérieurement

La résistance dans les nouveaux cas est définie par la présence d'une souche de MTB isolée chez des patients n'ayant jamais été traités par des médicaments antituberculeux ou qui l'ont été pendant moins d'un mois (238).

La résistance dans les cas traités antérieurement est définie par la présence d'une souche de MTB isolée chez des patients qui admettent avoir été traités pour la TB pendant 1 mois ou plus, tout en regroupant l'ensemble des cas d'échecs, chroniques, de rechutes et de reprises de traitement antituberculeux (239).

2. Mécanismes d'acquisition de la résistance

L'acquisition de la résistance chromosomique bactérienne aux antituberculeux est un phénomène mutationnel. Elle intéresse les gènes chromosomiques qui codent soit pour des protéines cibles de certains antibiotiques (ARN polymérase et RIF, ribosome et SM, ADN gyrase et Fluoroquinolones), soit pour des enzymes impliquées dans l'activation de l'antibiotique en substance active (catalase-peroxydase et INH, pyrazinamidase et PZA). Les résistances mutationnelles sont stables (elles sont héréditairement transmissibles), spontanées (elles préexistent à l'utilisation de l'antibiotique), spécifiques (elles n'intéressent qu'un antibiotique ou qu'une famille d'antibiotiques à la fois), rares (la fréquence de survenue des mutations est de 10^{-6} pour la SM, 10^{-5} pour l'INH et la PZA et 10^{-8} pour la RIF et les Fluoroquinolones) et représentent 10 à 20 % des mécanismes de résistance acquise aux antituberculeux. L'utilisation inappropriée des antibiotiques ne détermine pas la résistance chromosomique mais sélectionne des bactéries déjà résistantes. Une monothérapie

antibiotique exerce une pression de sélection importante sur la population bactérienne visée. La probabilité d'apparition d'une mutation double est très faible, puisqu'égal au produit des probabilités de chaque mutation simple soit $10^{-8} \times 10^{-5} = 10^{-13}$ lors d'une bithérapie à base de PZA et RIF, à titre d'exemple. C'est pourquoi l'association de plusieurs antibiotiques empêche la sélection des mutants résistants à chacun d'entre eux. De plus, l'activité bactéricide du traitement est meilleure en multi-thérapie (240) (241). On conclue qu'une multi-thérapie antituberculeuse utilisée à des concentrations thérapeutiques (supérieures à la CMI) permet d'éviter cette sélection.

Tableau 8: Mécanismes de résistance aux médicaments chez MTB (238)

Médicament (année de la découverte)	CMI µg/m	Gène(s) impliqué(s)) dans la résistance	Fonction du gène	Rôle	Mécanisme d'action	Fréquence de mutation %
Isoniazide (1952)	0,02–0,2	katG	Catalase- peroxydase	Transformation du prodrug	Inhibition de la biosynthèse de l'acide mycolique et autres effets multiples	50–95
		inhA	Enoyl ACP réductase	Cible du médicament		8– 43
Rifampicine (1966)	0,05–1	rpoB	Sous-unité β d'ARN polymérase	Cible du médicament	Inhibition de la synthèse d'ARN	95
Pyrazinamide (1952)	16–50 (pH 5,5)	pncA	Nicotinamidase/ pyrazinamidase	Transformation du prodrug	Disparition de l'énergie de membrane	72–97
Ethambutol (1961)	1–5	embB	Arabinosyl transférase	Cible du médicament	Inhibition de la synthèse d'arabinogalactane	47–65
Streptomycine (1944)	2–8	rpsL	Protéine ribosomiale S12	Cible du médicament	Inhibition de la synthèse des protéines	52–59
		rrs	rARN 16S	Cible du médicament		8–21
		gidB	rARN méthyltransférase (G527 dans la boucle 530)	Cible du médicament		?
Amikacine/ Kanamycine (1957)	2– 4	rrs	rARN 16S	Cible du médicament	Inhibition de la synthèse des protéines	76
Capréomycine (1960)		tlyA	2'-O- méthyltransférase			
Quinolones (1963)	0,5–2,5	gyrA	Sous-unité A d'ADN gyrase	Cible du médicament	Inhibition de l'ADN gyrase	75–94
		gyrB	Sous-unité B d'ADN gyrase			
Ethionamide (1956)	2,5–10	etaA/ethA	Flavine monooxygénase	Cible du médicament	Inhibition de la synthèse d'acide mycolique	37
		inhA		Transformation du prodrug		56
PAS (1946)	1–8	thyA	Thymidylate synthase	Activation du médicament?	Inhibition de l'acide folique et du métabolisme du fer?	36

CMI = concentration minimale inhibitrice ; ACP = acyl carrier protein (protéine de transport du groupement acyl)

2.1. Mécanisme de résistance à l'isoniazide

Dans MTB résistant à l'INH, au moins trois gènes sont impliqués dans sa résistance.

Dans plus de 50-60% des cas, la cible primaire de l'inhibition de l'INH est le katG. Ce gène code pour l'enzyme catalase peroxydase de MTB. Les mutations ponctuelles « faux-sens », touchant le plus souvent le codon 315, semblent être les plus fréquentes. Pourtant, des délétions et des insertions ont été décrites chez certaines souches résistantes (242).

La résistance à l'INH peut également survenir dans 10 à 20 %, par suite de mutations dans la région du promoteur de l'opéron *mabA/inhA*, en provoquant une surexpression de l'*InhA*, ou par des mutations au niveau du site actif de l'*InhA*, en réduisant l'affinité de l'*InhA* pour le dérivé INH-NAD. L'*inhA* est une réductase de la protéine de transport du groupe enoylacyl. Elle est impliquée dans l'élongation des acides gras lors de la synthèse de l'acide mycolique (243).

L'implication d'un troisième gène, le gène *ahpC*, codant pour l'alkylhydroperoxyde réductase, est encore controversée. La surexpression de l'enzyme, a été observée pour compenser la perte de la catalase-peroxydase dans les souches résistantes (244).

Enfin, des mutations du gène *kasA*, qui code pour une enzyme impliquée dans la synthèse des acides mycoliques (beta-ketoacylacyl carrier protein synthetase), ont également été décrites, mais leur rôle dans la résistance clinique reste à démontrer (238).

2.2. Mécanisme de résistance à la rifampicine

La RIF est l'un des antibiotiques majeurs pour le traitement de la TB. Il agit sur la sous-unité β de l'ARN polymérase, codée par le gène *rpoB*, où il bloque physiquement l'élongation de la chaîne de l'ARN. Les mutations intéressent la région de 81 bp (de 507 à 533) codant pour la résistance à la RIF (RRDR). Les mutations ponctuelles dans les codons 531, 516 et 526, sont parmi les mutations les plus fréquemment observées dans les souches résistantes à la RIF. Ces «points chauds» mutationnels sont utilisés pour identifier rapidement les isolats résistants au RIF (245).

2.3. Mécanisme de résistance à l'éthambutol

L'EMB antibiotique bactériostatique, est un traitement privilégié contre les bacilles au stade de multiplication et inefficace sur les bacilles « dormants ». L'EMB interfère avec la biosynthèse de l'arabinogalactan de la paroi cellulaire, en ciblant plus particulièrement,

l'enzyme arabinosyl transférase. Cette dernière, est codée par trois gènes organisés en un opéron embCAB de 10 kb. La mutation du codon Met306 d'embB est la plus fréquente dans les isolats cliniques résistants à l'EMB, expliquant jusqu'à 68% des souches résistantes. Néanmoins, 32 % des souches résistantes à l'EMB ne présentaient aucune mutation d'embB (246).

2.4. Mécanisme de résistance à la pyrazinamide

L'introduction du PZA a permis de raccourcir la durée du traitement de 9 à 6 mois. Il agit sur les bacilles « persistants » dans l'environnement à pH acide des lésions. Sa cible est mal élucidée. Des mutations du gène *pncA* sont responsables de la déficience d'activité de la pyrazinamidase (l'enzyme responsable de la transformation du PZA en forme active, l'acide pyrazinoïque). Celles-ci ont été identifiées chez 80 à 100 % des souches résistantes au PZA (247).

2.5. Mécanisme de résistance à la streptomycine

La SM est un antibiotique appartenant à la classe des aminosides. Sa cible est la sous-unité 30S du ribosome qui comporte l'ARNr16S codé par le gène *rrs* et la protéine ribosomale S12 codée par le gène *rpsL*. Après interaction avec la protéine S12, la SM se lie à l'ARNr16S et inhibe la synthèse protéique. La résistance à la SM de MTB est liée à des mutations du gène *rpsL* (55 % des souches étudiées) et du gène *rrs* (15 % des souches étudiées). Pour 30 % des souches, le mécanisme de résistance est inconnu (240) (238).

3. Résistances multiples

3.1. Multi résistance

La TB-MR ou TB-MDR (Multidrug Resistant tuberculosis) est due à un bacille qui résiste et à l'INH et à la RIF, les 2 antituberculeux de première ligne les plus puissants (248).

3.2. Tuberculose pré-ultra résistante

Parmi les TB-MR, on distingue les TB « pré ultra-résistante » (pré-UR) quand les mycobactéries sont également résistantes aux Fluoroquinolones ou à un antituberculeux injectable de deuxième ligne (249).

3.3. Résistance extensive ou ultrarésistance

La TB-UR appelée aussi la TB-XDR à partir de l'abréviation anglo-saxonne « eXtensively Drug Resistant TB » est une TB avec une résistance à au moins l'INH et la RIF, ainsi qu'une résistance supplémentaire à une Fluoroquinolones et à un agent injectable de deuxième ligne (AMK, KAN ou CAP) (239).

4. Détection phénotypique de la résistance aux médicaments antituberculeux

4.1. Méthode des proportions

La méthode des proportions, décrite pour la première fois par Canetti, Rist et Grosset en 1963, est la méthode phénotypique recommandée par l'OMS pour la détection de la sensibilité aux antituberculeux de première intention (RIF, INH, EMB, SM et PZA). Cette méthode consiste à déterminer pour la souche à étudier la proportion de mutants résistants à chaque antituberculeux dans une population bacillaire. Elle peut être réalisée sur milieu solide ou liquide.

4.1.1. Méthode des proportions en milieu solide

La méthode est effectuée à partir de la primo-culture, sur milieu solide de Lowenstein-Jensen contenant une concentration critique d'antibiotique. Les résultats sont obtenus après quatre à six semaines de l'identification de la bactérie, en dénombrant les colonies qui se sont développées. Le rapport du nombre des bacilles viables sur le milieu imprégné par l'antibiotique à celui des bacilles développés sur milieu témoin sans antibiotique, permet d'établir une proportion. L'interprétation des résultats (souche sensible ou résistante) est achevée en comparant les proportions à celles critiques conventionnellement définies (250).

La réalisation de cette méthode sur un milieu acide est nécessaire à l'activité du PZA. Pourtant, elle donne de médiocres résultats car un pH très acide est peu favorable à la croissance de MTB, d'où l'intérêt des méthodes moléculaires.

4.1.2. Méthode des proportions en milieu liquide

La technique appelée Bactec 460 TB (Becton Dickinson) est une technique semi-automatisée, considérée comme une alternative fiable à la méthode des proportions en milieu solide (251). C'est une méthode radiométrique qui utilise comme indicateur de croissance la mesure de la quantité de $^{14}\text{CO}_2$ produite dans les flacons en présence ou en l'absence d'antibiotiques. La

sensibilité se manifeste par une inhibition de croissance dans les flacons contenant les antibiotiques. Elle est comparée ensuite à la croissance observée dans les flacons témoins sans antibiotique inoculés dans les mêmes conditions que le test (témoins 100 %) et les flacons témoins inoculés avec la dilution au 1/100 (témoins 1 %). Une souche est considérée comme sensible quand la croissance obtenue en présence d'antibiotiques est inférieure à celle du témoin 1 %. En général, un résultat positif est obtenu en 7 à 14 jours. D'autres systèmes à détection complètement automatisée avec un temps de réponse similaire, mais non radioactifs sont maintenant également disponibles, le Bactec/MGIT 960, MB / BacT et le Versa TREK (252).

En comparaison avec la méthode classique sur milieu solide de Lowenstein-Jensen (LJ), 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 plus du coût qui reste élevé, la culture sur milieu liquide s'accompagne d'un risque plus important de contamination que la méthode de LJ. Le manque d'infrastructures adaptées, notamment en ce qui concerne les conditions de biosécurité, de programmes d'assurance qualité et de personnel bien formé compliquent les possibilités de décentralisation de la culture de MTB dans les pays du Sud (253).

4.2. Méthode des CMI

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques de MTB peut également être réalisée par mesure des concentrations minimales inhibitrices (CMI). Il s'agit de mettre un inoculum bactérien en contact avec des concentrations décroissantes d'antibiotiques afin de déterminer, après un temps de contact à 37°C, la plus faible concentration d'antibiotique capable d'inhiber 99 % de l'inoculum. La détermination des CMI peut être réalisée par des méthodes des dilutions en milieu gélosé (Middlebrook 7H11 supplémentée en OADC) ou liquide ou par technique des bandelettes E-test. Les résultats sont obtenus en 5 à 10 jours (254).

4.3. Méthode de MODS

La détection de la résistance aux antituberculeux peut également être réalisée selon le test d'observation microscopique de la sensibilité aux médicaments MODS (microscopic observation drug susceptibility). Cette technique repose sur l'observation microscopique quotidienne de la croissance des MTB sous forme de « cordes » sinueuses dans un milieu

liquide contenant des antituberculeux (l'INH ou la RIF). Les avantages de cette technique sont son faible coût et sa rapidité. Cette méthode est surtout utilisée dans les pays en voie de développement où elle permet de détecter rapidement la présence de souche MR avec une sensibilité et une spécificité respectives de 100 % et 94 % (255).

La limitation de l'utilisation de la technique de MODS est due à côté à des craintes de biosécurité, à l'exigence d'un microscope inversé. En outre, le fait de se fier qu'à des critères d'identification cultureux (morphologie et vitesse de croissance), peut entraîner une confusion avec les MNT (*M. chelonae*). L'étude de la sensibilité pour l'EMB et la SM par cette méthode est moins satisfaisante, ce qui n'est pas inhabituel.

4.4. Méthodes colorimétriques par indicateur redox

Les tests colorimétriques reposent sur la capacité des mycobactéries à virer la couleur d'un indicateur d'oxydation-réduction qui est ajouté au milieu de culture que ce soit en présence ou en absence de médicaments. Plusieurs indicateurs redox ont été proposés, à savoir : le bleu d'alar (virage du bleu au rose), le MTT ou le diméthylthiazol-diphényltétrazolium (vire du jaune au violet) et la résazurine (vire du bleu au rose). Le virage de l'indicateur est le résultat de sa réduction par les souches résistantes. Les CMI des médicaments antituberculeux sont disponibles dans les 8 jours après l'isolement des bactéries.

C'est une technique assez simple, performante en matière de détection de TB-MR avec une précision globale de 97% et elle peut être pratiquée sur des microplaques facilitant le dépistage d'un grand nombre d'isolats en une courte durée. Elle peut également être réalisée dans des tubes fermés rendant moindre le souci de la biosécurité.

4.5. Test à la nitrate réductase

Le test du nitrate réductase (NRA) est basé sur le pouvoir de MTB à réduire le nitrate en nitrite grâce à nitrate réductase. Cette propriété est décelable à l'œil nu par l'apparition d'une coloration rouge après réaction de Griess. Dans une méta-analyse, le NRA a prouvé une haute performance dans la détection de la sensibilité à la RIF et l'INH (256). C'est une technique qui est moins coûteuse, rapide (5-28 jours par direct NRA et en 5-14 jours par indirect NRA), qui garde sa sensibilité et sa spécificité quand elle est utilisée directement sur des isolats cliniques (257).

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. Malgré l'avènement des techniques de biologie moléculaire, qui offrent la possibilité d'obtenir des résultats beaucoup plus rapidement, l'OMS recommande toujours l'antibiogramme phénotypique en tant que norme de référence pour l'étude de la sensibilité aux antibacillaires.

C. Marquage épidémiologique

Les études épidémiologiques de la TB ont pour but de repérer des souches de comportement similaire évoquant un lien épidémiologique. De ce fait, ces investigations sont inéluctables pour comprendre la pathogénèse de la maladie et pour étudier la transmission de MTB dans les institutions (hôpitaux, prisons, etc.) et dans la communauté.

Dans cet objectif que les premières méthodes discriminatoires reposées sur des marqueurs phénotypiques ont été appliquées. Parmi ces méthodes on trouve l'étude de la morphologie des colonies, l'évaluation de la sensibilité aux médicaments antituberculeux et le typage des mycobactériophages. Cette dernière, appelée aussi lysotypage, est une méthode qui classe les différentes souches de MTB en étudiant la sensibilité de chacune d'elles à l'infection par les phages (virus spécifiques de clones bactériens qui lysent les cellules bactériennes sur les cultures).

L'utilité des méthodes phénotypiques est limitée par la variabilité phénotypique des mycobactéries. Par exemple, les profils de sensibilité aux antituberculeux peuvent changer pour le même isolat par l'acquisition d'une résistance à un ou plusieurs médicaments antituberculeux (259) (260). Bien que le typage des phages ait été utilisé pour différencier les souches de MTB, seul un faible nombre de mycobactériophages est reconnu, limitant ainsi sa valeur dans les études épidémiologiques de la TB (259) (260) (261) (260). La discrimination entre les souches en fonction de leurs caractéristiques biochimiques et sérologiques est encore plus infructueuse.

Un tournant dans cette quête a été le développement d'outils de biologie moléculaire dans les années 1980. Les techniques basées sur l'ADN ont révolutionné l'épidémiologie de la TB et d'autres maladies mycobactériennes, car elles permettent d'interroger le génome entier qui est unique et relativement stable pour chaque souche (259).

2. TECHNIQUES MOLECULAIRE

A. Apport dans le diagnostic de la tuberculose et dans l'identification des marqueurs épidémiologiques

Le raccourcissement du délai diagnostique de la TB était depuis toujours la hantise des milliers de recherches dans ce domaine. L'examen microscopique direct est une technique simple, rapide, peu coûteuse et hautement spécifique mais peu sensible (258). La culture des mycobactéries, suivie d'une identification biochimique, est plus sensible et spécifique, mais leur croissance sur les milieux solides nécessite un délai de deux à huit semaines (259). En conséquence l'avènement de nouvelles techniques diagnostiques comme la biologie moléculaire est devenu indispensable.

La détection de MTB, à partir des cultures ou directement dans les produits pathologiques, est une application idéale des techniques de la biologie moléculaire. Les performances de ces méthodes sont à discuter.

1. Méthodes d'amplification génique

Elles regroupent l'ensemble des méthodes qui ont pour but d'augmenter le nombre de copies d'un segment cible d'acides nucléiques (ADN ou ARN) de manière à permettre sa détection (260). Ce n'est qu'avec l'invention de la PCR en 1985, que plusieurs autres technologies d'amplification ont été développées et ont eu un impact majeur sur divers domaines de la recherche fondamentale et la recherche appliquée, y compris celui de la microbiologie moléculaire.

1.1. PCR classique

La PCR (Polymerase Chain Reaction) ou l'amplification en chaîne par polymérisation est une technique d'amplification qualitative ou encore semi-quantitative, qui est réalisée *in vitro* pour obtenir des quantités importantes d'ADN à partir d'une petite quantité. Le produit obtenu fera l'objet des tests ultérieurs. Bien que la cible IS6110 est la plus couramment utilisée, il existe d'autres gènes cibles qui peuvent être envisagés tel que : 16S ARNr, gène de la protéine 65 kDa (Rv0440), *devR* (Rv3133c), gène de la protéine MPB-64/MPT-64 (Rv1980c) et le gène de la protéine 38 kDa (Rv0934) (261).

Le profil d'un des cycles de la PCR classique peut se décomposer en 3 étapes : une dénaturation thermique de l'ADN à 93-95°C permet dans 30 secondes à 1 minute la rupture

des liaisons hydrogènes et par conséquent de convertir l'ADN bi-caténaire en ADN monocaténaire servant de matrice. Puis la température du milieu est amenée à 50 –65°C permettant ainsi une hybridation d'un couple d'oligonucléotides amorces qui délimitent la région d'ADN à amplifier durant 30 secondes à 1 minute. Enfin une élongation des brins d'ADN à partir des extrémités 3'OH des deux amorces est obtenue grâce à une enzyme thermorésistante, la TAqADN polymérase, à une température optimale de 72°C et pour une durée de 30 secondes à 2 minutes (262) (263).

Le mélange réactionnel est constitué par les éléments suivants : tampon, magnésium, des désoxyribonucléotides : dATP, dCTP, dGTP et dTTP, deux amorces et une ADN polymérase thermorésistante. Le tout est contenu dans des tubes qui sont placés dans un appareil permettant de faire varier la température au cours du temps. Cet appareil est appelé thermocycleur (264).

A la fin de chaque cycle, on obtient une copie de l'ADN cible qui pourra à son tour être la cible d'un nouveau cycle, l'amplification est donc exponentielle. De même, des n cycles d'amplification se succèdent, le nombre théorique de copies obtenues est de 2^n .

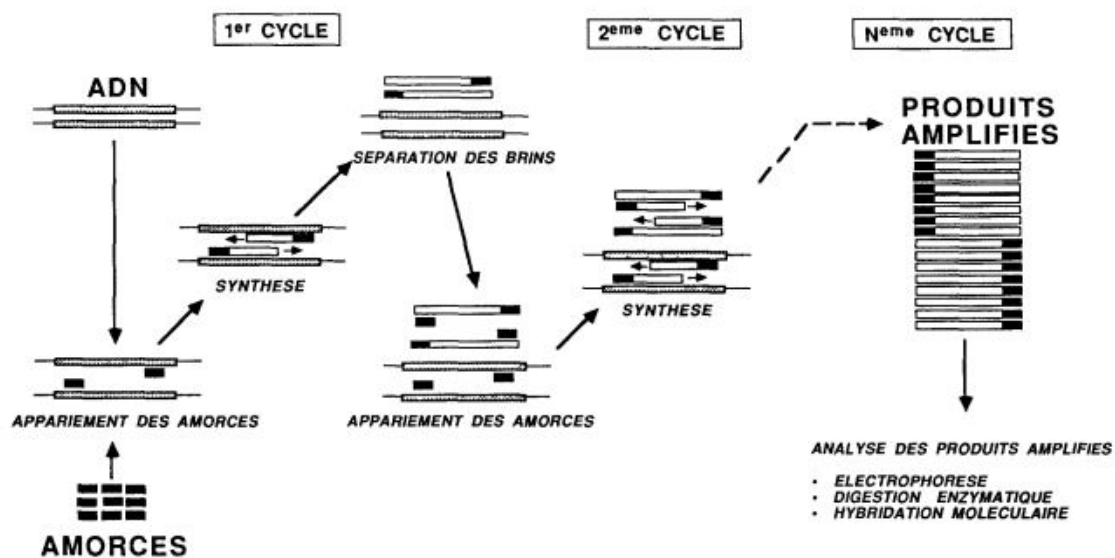


Figure 19 : Représentation schématique de la réaction d'amplification génique par PCR (265). Le produit de l'amplification est soumis par la suite à une électrophorèse au gel d'agarose après addition d'un agent intercalant (le bromure d'éthidium ou SYBR safe) et exposition aux rayons UV (262).

Certes la PCR est attractive en raison de sa rapidité, sensibilité et reproductibilité, mais il est utile de connaître ces limites :

- Du point de vue technique, la taille des séquences à amplifier ne doit pas dépasser 3Kb (266).
- D'autre part les amplifications faites à partir d'une seule copie sont théoriquement réalisables mais très difficilement en pratique (267).
- La PCR trouvait sa limite aussi dans la quantité de l'ADN produite qui ne change pas après 40-50 cycles sous effet plateau (268).

Les efforts ont tendu alors vers la commercialisation de la PCR par l'invention de deux méthodes. La première est l'Amplicor M. tuberculosis complex qui permet une détection manuelle de la mycobactérie et le Cobas Amplicor M. tuberculosis complex qui est considérée comme sa forme semi-automatisée (269).

La performance des différentes versions de la PCR dans le diagnostic de la TB a été discutée dans plusieurs études et revues de littérature, avec néanmoins des résultats variables. Elle a été évaluée le plus souvent par rapport au « gold standard » constitué par la culture. Une étude du laboratoire national de référence de la TB à l'Institut Nationale d'Hygiène a été établie en 2012 pour évaluer l'utilité de la technique maison-PCR utilisant comme cible l'IS6110. La technique appliquée sur 305 échantillons d'origine pulmonaire et extra pulmonaire, a montré une bonne sensibilité (92.4%) et un seuil de spécificité très élevé (98.0%), les valeurs prédictives positive et négative ont été respectivement de 96.4 % et 95.3 % (270). L'application de la PCR-maison sur de l'ADN extraite de l'expectoration fixée sur des lames de frottis, semble optimiser la sensibilité de la technique (de 72% pour la PCR seule à 86% pour l'association PCR-frottis) (278).

Le Tableau 9 rassemble cinq études qui évaluent l'apport du test Amplicor Mycobacterium tuberculosis complex dans le diagnostic de la TB chez des patients de toutes catégories y compris les enfants et les VIH séropositifs. Pour les échantillons pulmonaires, la sensibilité et la spécificité du test varient de 72-93% et de 84-99.3% respectivement, les meilleurs résultats ont été obtenus sur des échantillons d'expectoration à frottis positifs.

Dans un contexte clinique avec des taux élevés de VIH, l'étude de Kivihya-Ndugga et ses collègues montre que l'utilisation de la PCR Amplicor chez les VIH-séropositifs, n'a pas

affecté sa haute sensibilité (89% contre 95% chez les VIH-négatifs) (273). L'application du test sur une population pédiatrique (279), révèle une sensibilité comparable à la culture (44%) mais moindre à celle obtenue par la PCR-maison (60%), en outre il a été noté beaucoup de faux négatifs.

Les sensibilités mentionnées pour les échantillons extra-pulmonaires sont moins bonnes avec des chiffres qui varient de 27.3-100.0%, le taux de spécificité est de 87.5-100%. L'hétérogénéité des chiffres est expliquée par la variabilité du type des échantillons extra-pulmonaires et de l'étalon d'or choisi. La plus faible sensibilité est obtenue sur des prélèvements du liquide pleural et d'abcès. La présence des faux-négatifs lors de l'analyse de ce type d'échantillon est expliqué par la présence des inhibiteurs de l'amplification (l'héparine, l'hémoglobine, le phénol, etc.) et des erreurs techniques (la quantité ou une qualité inappropriée de l'échantillon, l'enlèvement involontaire de la pastille centrifugée pendant la préparation de l'échantillon ou une répartition inégale des mycobactéries lors de l'aliquotage (280)). Pour surmonter ces erreurs et augmenter la sensibilité du test, l'évaluation de plus d'un échantillon par patient a été suggérée (281); cependant, il est difficile d'obtenir certains échantillons plus d'une fois (par exemple, biopsies osseuses et ponction du liquide péricardique).

Tableau 9: Performance du test Amplicor Mycobacterium tuberculosis pour le diagnostic de la tuberculose.

Référence de l'étude	Nombre d'échantillons/type d'échantillon	Nombre de cultures réalisées/BAA R+	Le Gold standard utilisé pour évaluer le test	Sensibilité %	Spécificité %	VPP %	VPN %	Sensibilité pour les BAAR+ %	Sensibilité pour les BAAR- %
Chun-Kai Huang et al. (277)	123/R	123/29	Culture, corrélation clinique	72	98.6	97.3	83.7	84.9	47.1
Kivihya-Ndugga et al. (273)	1,398/R	867/490	Culture	93	84	indisponible	indisponible	99.7	82.1
Michos et al. (281)	2296/R +E	2296/50	Culture, corrélation clinique	80.8	98.4	77.7	98.6	indisponible	indisponible
	650/Exp +LBA			90.7	99.3	90.7	99.3		
	747/LG			87.2	99.4	89.5	99.3		
	512/LPl			68.0	98.1	65.4	98.3		
	74/LPr			100.0	92.9	42.9	100.0		
	104/A			63.3	94.6	82.6	86.4		
	189/U			85.7	95.6	42.8	99.4		
	20/O			100.0	87.5	66.7	100.0		
Mitarai et al. (274)	75/E (LPI)	22/4	Culture, corrélation clinique	27.3	97.6	indisponible	indisponible	100	17.2
Baek et al. (282)	29/E (A)	0	Corrélation clinique	76.4	100	indisponible	indisponible	indisponible	Indisponible

R : échantillon respiratoire ; E : échantillon extra respiratoire ; Exp : expectoration ; LBA : lavage broncho-alvéolaire ; LG : liquide gastrique ; LPl : liquide pleural ; LPr : liquide pericardique ; A : abcès ; U : urines ; O : os

En résumé, la PCR est justifiée sur des échantillons d'expectoration à bacilloscopie positive et potentiellement sur des échantillons à frottis négatif si la présentation clinique est très

évatrice de la TB. Des directives récentes du « Centre pour le contrôle et la prévention des maladies » (CDC ou Centers for Disease Control and prevention) aux états unies appuient cette approche (277). Chez les patients à bacilloscopie négative, la PCR peut également être utile, même si elle doit être utilisée avec beaucoup de prudence. Si la suspicion clinique est élevée, le traitement peut être commencé, mais face à l'incertitude, il vaut mieux attendre que les résultats de la culture soient disponibles avant de commencer le traitement. Le meilleur rendement pour cette technique est obtenu sur les échantillons respiratoires, par contre il a été noté beaucoup de faux négatifs pour les TEP (278).

1.2. PCR en temps réel

La RT-PCR a révolutionné la façon dont les laboratoires de microbiologie clinique diagnostiquent la TB. Cette technique est basée sur la détection et la quantification d'un signal fluorescent émis par un reporter fluorescent (Taqman, molecular beacons...) dont l'intensité d'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction de PCR (279) (280). Plusieurs cibles peuvent être amplifiées et détectées (multiplexing). La RT-PCR ne repose pas sur une détection en point final des produits, mais sur une analyse de la cinétique de la réaction.

L'instrumentation RT-PCR nécessite beaucoup moins de temps pratique et les tests sont beaucoup plus simples à réaliser que les méthodes PCR conventionnelles. La PCR et la détection peuvent être effectuées simultanément et non séquentiellement par des systèmes « en tube fermé » ce qui diminue à la fois le temps de réponse et le risque de libération d'acides nucléiques amplifiés dans l'environnement et la contamination des analyses ultérieures (281).

Les sondes utilisées en RT-PCR pour différencier des séquences cibles - qui diffèrent l'une de l'autre par une seule ou plusieurs substitutions nucléotidiques - confère à cette technique une haute sensibilité pour mettre en évidence des mutations ponctuelles. De telles mutations peuvent être déterminantes pour le typage des mycobactéries, ou encore, pour la mise en évidence d'une résistance à un antibiotique. La PCR quantitative en temps réel s'est ainsi révélée d'un grand intérêt pour l'automatisation, donnant ainsi naissance à des méthodes très prometteuses ayant supplanté les anciennes techniques.

1.2.1 Test PCR Xpert MTB/RIF

L' Xpert MTB/RIF (GeneXpert, Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) est une technique unitaire, sécurisée et automatisée d'amplification de l'acide nucléique en temps réel multi-colorimétrique pour la détection rapide et simultanée de la TB et de la résistance à la RIF (282). Sa réalisation sur la plate-forme GeneXpert a permis de simplifier les tests moléculaires fondés sur la RT-PCR en intégrant en une seule cartouche les processus de préparation des échantillons, d'amplification et de détection. Pour détecter les souches du MTBC et les mutations associées à la résistance à la RIF, la région centrale cible de 81 pb du gène *rpoB* qui code la sous-unité de l'ARN polymérase est amplifiée et couplée avec cinq sondes de type « balise moléculaire » ou probes (A, B, C, D, E de type « beacons »). Ces sondes moléculaires uniques garantissant un haut degré de spécificité se chevauchent le long de la séquence cible et s'hybrident avec les séquences sauvages (non mutée) de MTB.

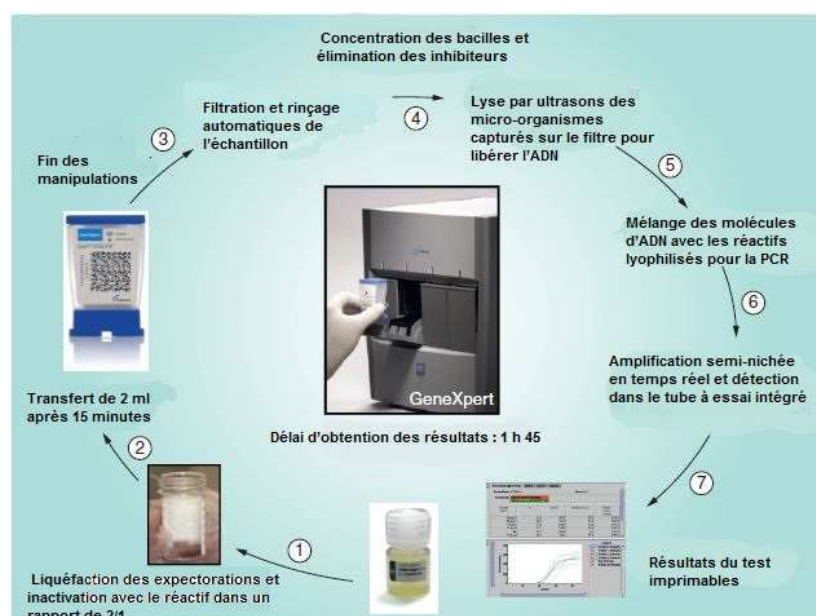


Figure 20: Méthode du test Xpert MTB/RIF (283)

Deux volumes de réactif sont ajoutés à un volume d'expectorations brutes ou trois volumes à un volume de pellet décontaminé. Le mélange est agité, mis à incuber à température ambiante pendant 15 minutes, puis agité de nouveau. Ensuite, un volume de 2 à 3 ml est prélevé et transféré dans la cartouche du test, qui est ensuite chargée dans l'appareil. Toutes les étapes ultérieures sont automatisées. L'utilisateur obtient un résultat qu'il peut imprimer du type : « Détection de MTB, pas de résistance à RIF détectée »

Ce test simple peut être installé pratiquement n'importe où, ne nécessite pas d'équipement spécialisé de biologie moléculaire et fournit directement les résultats à partir des expectorations en moins de deux heures. Outre il n'y a pratiquement pas de risque de contamination croisée des échantillons et il n'est pas nécessaire de disposer d'un environnement spécifique de sécurité biologique. Cependant, dans les pays à faibles revenus, son coût, ses limitations environnementales (électricité régulière et stable, température correcte), les difficultés liées à l'approvisionnement en tests et à la maintenance de l'appareil sont des obstacles majeurs (284) (285).

En Décembre 2010, l'OMS a introduit l'utilisation large du test Cepheid Xpert® MTB / RIF. En juillet 2013, la FDA a accordé une autorisation de mise en marché du test. Au début, il n'a été validé que pour les échantillons pulmonaires, mais en 2013, l'OMS a élargi les recommandations sur l'utilisation de ce test pour le diagnostic de la TP, de la TB pédiatrique, de la TEP pulmonaire et de la résistance à la RIF.

1.2.1.1. Apport du test Xpert MTB/RIF dans le diagnostic de la tuberculose pulmonaire

La performance du GeneXpert MTB/RIF dans le diagnostic de la TB pulmonaire a été évaluée dans plusieurs études avec néanmoins des résultats variables (Tableau 10). Ces résultats démontrent de bonnes performances du test Xpert MTB / RIF pour la détection de la TB sur les échantillons pulmonaires en raison de sa rapidité et de la détection simultanée de MTB et de la résistance à la RIF, particulièrement bénéfique chez les patients atteints de TB associée à la MR et au VIH.

La sensibilité du test Xpert MTB/RIF (dépasse 82.3%) est meilleure que celle de l'examen microscopique et proche de celle de la mise en culture en milieu solide et donc le fait d'utiliser le test Xpert MTB/RIF plutôt que l'examen microscopique et que la mise en culture classiques comme test diagnostique initial en cas de suspicion de TB chez tout adulte, respecte les recommandations de l'OMS (286).

Sa valeur prédictive négative est excellente (plus de 94 %) ce qui signifie que dans la plupart des situations, un résultat négatif exclut avec exactitude une TB. Vu que la capacité du test dépend de la qualité des échantillons collectés, devant tout résultat négatif avec une forte suspicion de TB, il est nécessaire de continuer à prendre en charge le patient et d'effectuer un

autre test diagnostique, y compris de répéter le test Xpert MTB/RIF, en utilisant un nouvel échantillon d'expectorations.

La spécificité du test Xpert MTB/RIF (supérieure à 91 %) pour la détection de la TB est élevée. Il est peu probable qu'un résultat faussement positif soit lié à la détection par le test Xpert MTB/RIF de bacilles de MTB morts qui n'auraient pas été détectés par la mise en culture qui représente la norme de référence actuelle.

Ces propriétés, permettent d'utiliser Xpert MTB/RIF comme test complémentaire après un examen microscopique de frottis dont le résultat s'est avéré négatif (286).

Tableau 10: La performance de la GenXpert MTB/RIF dans le diagnostic de la tuberculose pulmonaire.

Référence de l'étude	Nombre d'échantillons	Nombre de cultures réalisées/B AAR+	Le Gold standard utilisé pour évaluer le test	Sensibilité %	Spécificité %	VPP %	VPN %	Sensibilité pour les BAAR + %	Sensibilité pour les BAAR- %
Luetkemeyer et al. (287)	992	960/152	Culture	85.2	99.2	94.9	97.6	96.7	59.3
Bojang et al. (288)	285	175/71	Culture MGIT	99.1	96.0	indisponible	Indisponible	100	100
Pimkina et al. (289)	792	792/282	Culture LJ et/ou MGIT	93.7	91.7	91.3	94	97.8	82.5
Moussa et al. (290)	432	71/62	Culture LJ	92.96	98.33	96.35	96.72	indisponible	indisponible
Zeka et al. (291)	253	110/32	Culture et corrélation clinique	82.3	100	94.6	100	100	68.6
Agraw et al. (292)	170	170/14	Culture MGIT	86.8	93.1	78.5	96	100	79.1
Parcell et al. (293)	2103	1951/48	Culture	95.8	99.5	82.1	99.9	indisponible	indisponible

1.2.1.2. Apport du test Xpert MTB/RIF dans le diagnostic de la tuberculose extra pulmonaire

Le test Xpert MTB / RIF a été développé, optimisé, évalué et approuvé spécifiquement pour la détection de la TP. Plus récemment, les études se sont étendues à divers échantillons cliniques non respiratoires de patients atteints de TEP. Le tableau 11 regroupe les différentes études menées sur la performance du test Xpert dans le diagnostic de la TEP. La sensibilité du test varie de 25 à 100% et sa spécificité de 16.6 à 100%. L'hétérogénéité des résultats peut s'expliquer par différents facteurs dont la différence entre les populations étudiées, les critères de sélection des patients, le type de TEP, la qualité et la nature des échantillons, les différences dans les méthodes de traitement des échantillons et le « Gold standard » utilisé dans les études (294).

La plus faible sensibilité du GeneXpert® a été observée pour les échantillons du liquide pleural (25%) et d'urine (47.8%), ce qui peut être expliqué par la nature pauci bacillaire des prélèvements ou par la présence de substance inhibitrice. La sensibilité de l'Xpert MTB/RIF est donc faible, ceci explique pourquoi la biopsie pleurale est privilégiée pour le diagnostic de la TB pleurale (295).

A la lumière de ces données et de plusieurs méta-analyses (296) (297), l'OMS a actualisé en octobre 2013, ses recommandations politiques en matière de l'utilité de l'Xpert MTB/RIF dans le diagnostic de la TEP. De ce fait le test Xpert MTB/RIF peut être utilisé comme test de remplacement pour la pratique habituelle (y compris pour le remplacement de l'examen microscopique, de la mise en culture et de l'histopathologie classiques) pour tester des échantillons particuliers ne provenant pas des voies respiratoires (ganglions lymphatiques et autres tissus) en cas de suspicion de TEP chez un patient (286).

Le GeneXpert peut être un outil utile, fournissant une détection rapide du MTB dans les échantillons extra pulmonaires (environ 2 heures). Un avantage supplémentaire du test GeneXpert MTB / RIF est qu'il peut être utilisé directement sur les échantillons de LCR et sur les échantillons extra pulmonaires homogénéisés (obtenus à partir de biopsies de ganglions lymphatiques ou d'autres tissus) ou sur des échantillons décontaminés si une mise en culture est effectuée en parallèle. Les échantillons extra pulmonaires notamment du LCR sont typiquement pauci bacillaires, difficiles à collecter (la collecte de l'échantillon nécessite une

procédure invasive) et l'obtention d'un volume d'échantillon suffisant et/ou de plusieurs échantillons peut être difficile. Pour cette raison l'OMS recommande fortement l'utilisation du test Xpert MTB/RIF plutôt que la mise en culture. En revanche si un volume suffisant de LCR est disponible, des méthodes de concentration doivent être utilisées pour augmenter le rendement du test (286).

Tableau 11 : La performance du test Xpert MTB/RIF dans le diagnostic de la tuberculose extra pulmonaire.

Référence de l'étude	Pays	Nombre de prélèvement	Type de prélèvement	Test de référence	Sensibilité %	Spécificité %	VPP %	VPN %
Marouane et al. (298)	Tunisie	153	Extra pulmonaire	Diagnostic*	84.7	96.8	94.3	91
Diallo et al. (299)	Sénégal	544	Extra pulmonaire	Culture	94,74	97,95	84,38	99,38
Hillemann et al. (300)	Allemagne	501	Extra pulmonaire	Culture	77.3	98.2	I	I
Causse (301)	Espagne	340	Extra pulmonaire	Culture	95	100	100	99
Tortoli et al. (302)	Italie	980	Extra pulmonaire	Culture ou corrélation clinique	77.6	99.9	I	I
Zeka et al. (303)	Turquie	176	Extra pulmonaire	Culture	67.6	96.5	80.7	93.2
Massi et al. (304)	Indonésie	70	Osseux (disco-vertébrale)	Culture	100	16.6	35.48	100
Friedrich et al. (305)	Afrique du sud	25	Liquide pleurale	Culture	25	100	I	I
Ghariani et al. (306)	Tunisie	174	Ganglionnaire	Culture	87.5	73.3	94	55
Peter (307)	Afrique du sud	175	Urine	Culture	47.8	98	I	I

I: Indisponible

*Le diagnostic est basé sur un ensemble de critères clinique, radiologique, microbiologique, anatomopathologique et thérapeutique.

1.2.1.3. Apport du test Xpert MTB/RIF dans le diagnostic de la tuberculose dans la population pédiatrique

La confirmation de la TP chez l'enfant reste un défi diagnostique. Ceci est expliqué par la combinaison de plusieurs facteurs : les signes et les symptômes non spécifiques de la maladie, la nature pauci bacillaire des échantillons, les difficultés d'obtention des échantillons d'expectoration adéquats et l'absence d'un test diagnostique sensible (308). La mise en œuvre du Gene Xpert MTB / RIF a le potentiel de faire progresser le diagnostic de la TB pédiatrique. Le tableau 12 résume les données de sept études sur l'utilisation du test Xpert MTB / RIF pour diagnostiquer la TP et TEP chez les enfants. En utilisant la culture comme « Gold standard », six de ces études ont rapporté que la sensibilité du test Xpert MTB / RIF pour la TP était environ deux à trois fois plus élevée que celle de l'examen microscopique des expectorations induites, des aspirations nasopharyngées et des tubages gastriques (309) (310) (311) (316) (312) (313) (314). La sensibilité varie entre 19,4% et 91,6% et la spécificité était de 86,8% à 100%.

Trois des études ont rapporté un rendement additionnel élevé (27,8%, 25% et 20%) à partir d'un deuxième échantillon (310) (312) (313). Lors de l'analyse d'échantillons prélevés des sites extra pulmonaires, on déduit que le test Xpert MTB / RIF améliore le rendement diagnostique (314).

Au bout du compte, par rapport à la microscopie, Xpert offre une meilleure sensibilité pour le diagnostic de la TP chez les enfants et son extension aux échantillons extra pulmonaire améliorera l'accès au diagnostic de la TB pour les enfants. Bien que Xpert aide à fournir une confirmation rapide de la maladie, sa sensibilité reste moindre que celle de la culture. Un résultat Xpert négatif n'exclut pas la TB. Un bon sens clinique est encore nécessaire pour décider quand commencer un traitement antituberculeux (315).

Tableau 12: L'utilité du test Xpert MTB / RIF pour diagnostiquer la tuberculose pulmonaire et extra pulmonaire dans la population pédiatrique.

Référence	Pays	Résumé de l'étude
Togun et al. (311)	Gambie	Dans cette étude prospective, un échantillon d'expectoration induite a été obtenu à partir de 487 sujet-contact de cas de TB ayant un âge moyen de 6 ans (3-9 ans). En utilisant l'ensemble des données cliniques, radiologiques et bactériologiques comme test de référence l' Xpert MTB / RIF avait une sensibilité de 19,4%, significativement plus élevé que celle de la microscopie des frottis (9,7%), mais comparable à celle de la culture (22,6%). Les sensibilités de la combinaison des tests diagnostiques Xpert et culture d'un côté et de Xpert, culture et l'examen microscopique d'un autre côté semble être comparable (32.3% contre 33.9%). La spécificité était de 100%. En utilisant la culture seule comme étalon d'or la sensibilité et la spécificité de Xpert MTB/RIF sont ainsi respectivement de 42.9% et 98.7%.
Singh et al. (316)	Inde	L'étude a porté sur des échantillons de tubage gastrique et d'expectoration induite de 50 personnes âgées de 0-15 ans suspectées de TP. Cette étude a montré que Xpert est un test sensible et spécifique pour le diagnostic de la TP pédiatrique par rapport à la culture MGIT en tant que norme d'excellence. La sensibilité et la spécificité de l'Xpert étaient respectivement de 91,6% et 86,8%.
Bates (309)	Zambie	Étude prospective des patients hospitalisés (n = 930) avec un âge moyen de 24 mois (maximum 15 ans) suspectés tuberculeux : en prenant la culture comme étalon d'or, le test Xpert MTB / RIF était plus sensible que la microscopie aussi bien sur les échantillons d'expectoration (90.0% contre 30.0%) que sur ceux du tubage gastrique (68.8% contre 25.0%) et la spécificité était de 98.5% pour les échantillons d'expectoration et de 99.3% pour ceux du tubage gastrique.
Nicol et al. (310)	Afrique de sud	Étude prospective des patients hospitalisés (n = 452) avec un âge moyen de 19.4 mois (maximum 15 ans) suspectés de TP : à partir de deux échantillons d'expectations induites, le test Xpert MTB / RIF avait une sensibilité de 75,9% significativement plus élevé que celle de l'examen microscopique (37.9%). La spécificité est de 98,8% comparée à 100% de la microscopie. Dans les cas ayant un frottis négatif, le rendement additionnel du deuxième test Xpert MTB / RIF était de 27,8%.
A. Rachow et al. (312)	Tanzanie	Étude prospective de 164 enfants âgés de moins de 14 ans (âge moyen de 5,8 ans) : sur 28 cas de TB confirmée par culture (LJ et MGIT) l'Xpert MTB/RIF a diagnostiqué 21 cas (75%). Il a détecté 7/7 des cas à bacilloscopie positive avec une sensibilité de 100% et 14/21 des cas à frottis négatif et culture positive avec une sensibilité de 66.6%; les rendements additionnels des deuxième et troisième échantillons étaient respectivement de 20% et 16%.
HJ Zar et al. (313)	Afrique du sud	Étude prospective des patients hospitalisés (n = 535) avec un âge moyen de 19 mois (maximum 15 ans) suspectés tuberculeux : la sensibilité et la spécificité de l'Xpert MTB/RIF réalisé sur des

		échantillons d'expectorations induites a été de 73.6 et 98.9 % respectivement contre 32.2 et 100% pour la microscopie directe. Sur des échantillons d'aspirations rhinopharyngées les sensibilités ont été plus basses. le rendement additionnel du test Xpert MTB / RIF réalisé sur le deuxième échantillon d'aspiration rhinopharyngé a été de 36.7% contre 26.3% pour la culture. Quant aux échantillons d'expectoration induite le rendement additionnel du test Xpert MTB / RIF a été de 25% contre 17.6% pour la culture
E. Tortoli et al. (314)	Italie	Étude du diagnostic de TEP chez les adultes et les enfants à partir de différents types d'échantillons (biopsies tissulaires, liquide pleural, aspirations gastriques, pus, LCR et urine). L'étude utilise comme norme de référence : la culture, la radiologie, l'histologie et la réponse au traitement : la sensibilité dans les échantillons provenant d'enfants (86,9%) avait tendance à être plus élevée que dans les échantillons d'adultes (77,6%), peut-être en raison de la distribution différente des types d'échantillons cliniques notamment ceux à faible rendement (liquide pleural et cavitaire) dans les deux groupes.

1.2.1.4. Apport du test Xpert MTB/RIF dans le diagnostic de la tuberculose chez les patients VIH séropositifs

L'examen microscopique des expectorations a une sensibilité particulièrement faible pour la détection de la TB parmi les sujets VIH séropositifs. Donc pour ceux ayant un résultat négatif à la microscopie, mais qui sont toujours présumés tuberculeux, la culture a été la seule option diagnostique. Cependant, la culture ne peut être entreprise qu'au niveau central et les résultats sont généralement disponibles après un certain nombre de semaines ou de mois. En décembre 2011, l'OMS a approuvé l'utilisation de l'Xpert MTB/RIF pour le diagnostic de la TB chez les sujets VIH-positifs (317).

Le tableau 13 résume huit études de patients infectés par le VIH, en comparant la sensibilité de l'examen microscopique des expectorations et le test Xpert MTB / RIF avec la culture utilisée comme étalon-Or. L'Xpert MTB/RIF est sensible et spécifique à la détection de la TP lorsqu'il est utilisé comme test initial de diagnostic chez les adultes présumés avoir une sérologie VIH-positive associée à la TB. La sensibilité médiane de l'examen microscopique est de 46.15 % (intervalle 22.2-68.9) comparée à 79.0 % (58.3-97.8) avec le test Xpert MTB / RIF. La sensibilité globale du test Xpert MTB / RIF pour la TB associée au VIH est très hétérogène (fourchette de 58.3-97.8 %) et c'est probablement le résultat de la sélection des patients.

La sensibilité la plus faible est rapportée dans une étude en Afrique du Sud où les patients sous traitement antirétroviral ont été soumis à un dépistage actif de la TB indépendamment des symptômes. La sous-analyse a montré que l’Xpert MTB/RIF augmente la détection des cas de TB d'environ 36% par rapport à la microscopie chez les personnes vivant avec le VIH (318).

Dans l'ensemble, les sensibilités sont élevées dans les études qui ont porté sur des patients avec des symptômes chroniques ayant bénéficié d’une prise en charge ambulatoire, mais les plus hautes sensibilités sont notées chez les sujets hospitalisés (tableau 13). Ainsi, la sensibilité du test Xpert MTB / RIF se rapporte à la sévérité des symptômes, qui à son tour peut refléter la charge mycobactérienne. Bien que la sensibilité de l’examen microscopique des expectorations soit nettement plus faible chez les patients infectés par le VIH que chez les patients non infectés (319), une telle association n'est pas claire pour le test Xpert MTB / RIF. La sensibilité est inférieure d'environ 10% chez les patients infectés par le VIH par rapport à ceux sans VIH (319). Cependant, les résultats de la sixième étude des patients hospitalisés, ont montré l'inverse (320).

Une étude faite pour comparer le rendement clinique de l’Xpert MTB/RIF et de l’examen microscopique chez les sujets VIH-positifs et VIH-négatifs ayant une TB séreuse, trouve que parmi les 21 échantillons des patients VIH-positifs 4/21 (19.05%) sont frottis positif et 9/21(42.85%) ont un GeneXpert positif. Ces résultats montrent que le GeneXpert MTB/RIF est plus sensible que l’examen microscopique des expectorations en matière de diagnostic de la TEP. Son rendement chez les patients VIH et non-VIH est le même (321).

D’ailleurs ce test est considéré le plus avantageux chez les sujets co-infectés VIH-TB vu que (322) :

- Il améliore la qualité du diagnostic rapide de la TB parmi les sujets atteints de VIH, en fournissant un diagnostic bactériologiquement confirmé dans 36 à 75% des cas de TP à frottis négatif.
- Il facilite le diagnostic précoce et réduit les délais de traitement antituberculeux, en particulier pour la TP à frottis négatif et dans les cliniques décentralisées dans les zones à forte prévalence du VIH.

- Il améliore la sensibilité, la rapidité de détection de la résistance à la RIF chez les adultes et les enfants vivant avec le VIH, facilitant alors l'initiation du traitement avec le régime médicamenteux correct.
- Il est réalisable même lorsqu'il est effectué par un personnel non technique dans les lieux de soins.

Tableau 13 : La sensibilité du test Xpert MTB / RIF par rapport à l'examen microscopique en matière de diagnostic de la tuberculose chez des patients atteints du VIH.

Référence de l'étude	Pays	Population étudiée	Sélection des patients	Sensibilité de la microscopie %	Sensibilité du Xpert MTB/RIF %
G. Theron et al. (319)	Afrique du sud	En ambulatoire (VIH-positifs et VIH-négatifs)	Patients suspectés tuberculeux *	VIH + : 50 VIH - : 73.2	VIH + : 69.6 VIH - : 82.9
W. Ssengooba et al. (323)	Uganda	En ambulatoire et en hospitalier (VIH +)	Patients suspectés tuberculeux avec une toux > 2 semaines	31.7	76.4
LE. Scott et al. (324)	Afrique du sud	En ambulatoire (la plupart sont VIH positifs)	Patients suspectés tuberculeux avec une toux > 2 semaines	54	84
T. T. Balcha et al. (325)	Ethiopie	En ambulatoire (VIH positifs)	Patients suspectés tuberculeux**	22.9	66.4
S. D. Lawn (318)	Afrique du sud	En ambulatoire (patients pris en charge au sein d'une clinique pour un traitement antirétroviral)	Patients non sélectionnés, ayant bénéficié d'un dépistage pour la TB sans tenir compte des symptômes présents avant la thérapie antirétrovirale	22.2	58.3

J. O'Grady et al. (320)	Zambie	Les sujets hospitaliers (VIH positifs et VIH négatifs)	Tous ceux qui peuvent expectorer	VIH+ : 52.8 VIH - : 48.6	VIH+: 88.2 VIH - : 74.3
M. E. Balcells et al. (326)	Chili	Les sujets hospitaliers (VIH positifs)	Patients admis pour suspicion de TB avec persistance des symptômes pour > 10 jours	66.7	91.7
G. Carriquiry et al. (327)	Pérou	Les sujets hospitaliers (VIH positifs)	Patients admis pour suspicion de TB, toux> 10 jours, Radiographie thoracique anormal et d'autres signes additionnels.	68.9	97.8

*Culture positive et résistance à la RIF phénotypiquement diagnostiquée.

**Critères sociodémographiques, antécédents, les symptômes et examen physique performant.

*** Système de notation : a) toux pendant plus de 2 semaines et production d'expectorations (2 points pour chaque) ; b) perte de poids au cours des 3 derniers mois, perte d'appétit récente et douleur thoracique (1 point pour chacun).

1.2.2. COBAS® TaqMan® MTB

Le test COBAS® TaqMan® MTB est un test d'amplification d'acide nucléique in vitro pour la détection qualitative de l'ADN du MTBC dans des échantillons respiratoires humains liquéfiés, décontaminés et concentrés, y compris les expectorations et les LBA. Le test utilise le kit de préparation des échantillons respiratoires AMPLICOR® pour la préparation manuelle des échantillons et l'analyseur COBAS® TaqMan® 48 pour l'amplification et la détection automatiques (328).

L'amplification subséquente est réalisée par RT-PCR ciblant le gène responsable de l'ARN 16S, suivie de l'utilisation d'une sonde TaqMan pour la détection de l'ADN du MTBC dans des échantillons cliniques (329).

Le test COBAS® TaqMan® MTB offre jusqu'à 48 tests par cycle et fournit des résultats en deux heures et demie, après la préparation de l'échantillon. Le test permet une amplification et une détection automatiques dans un système fermé. Le contrôle interne systématique pour chaque test permet d'améliorer le contrôle de qualité dans le laboratoire (328) (329).

En termes de performance du test, des études des laboratoires en Corée du sud et en Taiwan ont évalué l'utilité de COBAS® TaqMan® MTB pour le diagnostic de la TB dans des échantillons respiratoires. Park et ses collègues ont testé 1154 échantillons et ont trouvé une sensibilité globale de 60% qui diminue à 36.4% pour les échantillons à frottis négatifs. La spécificité est de 99,2%, ce qui est comparable aux résultats d'études d'échantillons respiratoires à frottis négatif (330). Huh et ses collègues ont testé une large gamme d'échantillons (n = 6772) et ont rapporté une sensibilité similaire de 66.9% et une spécificité de 99.5% (331). En revanche, l'étude de Lee et ses collègues incluant des résultats provenant de seulement 586 échantillons, a révélé une sensibilité globale de 82.7% nettement supérieure à celle obtenue dans les études précédentes (332). D'excellents résultats ont également été rapportés dans une étude en Taiwan dans laquelle des patients (n = 1093) avec suspicion de TP ont été étudiés prospectivement (333). Une norme de référence de culture en milieux solide JN, test BD MGIT TBc identification et le GenoType Mycobacterium CM a été utilisée. La sensibilité globale et la spécificité ont été rapportées comme étant de 91.5 et 98,7%, respectivement. Deux autres études ont évalué l'apport de COBAS® TaqMan®

MTB pour le diagnostic de la TB extra pulmonaire. La première étude Suédoise réalisée sur 1005 échantillons extra pulmonaire, a révélé une sensibilité de 51% et une spécificité de 99% (334). Presque les mêmes chiffres ont été obtenus dans l'étude de Bloemberg et ses collègues (sensibilité et spécificité de 63.6% et 94.6% respectivement) (335)

Une méta-analyse récente a confirmé que le test Cobas présente des performances hétérogènes (336). Cette hétérogénéité peut être due au statut des frottis à l'examen direct, aux types d'échantillons variables et à l'incidence de base de la TB (331) (334). En particulier, les auteurs présents ont précédemment trouvé que la performance du test Cobas dépend du statut de frottis (331), le test Cobas présente une sensibilité plus élevée dans les échantillons à frottis-positif que dans ceux à frottis-négatif.

1.2.3. Test Real time MTB

Récemment, Abbott Molecular (Des Plaines, IL) a introduit un test PCR RealTime MTB (RT MTB) automatisé à des fins de diagnostic in vitro). Les échantillons d'expectoration ou de LBA (préparés ou non par le N-acétyl-L-cystéine) sont inactivés pendant au moins une heure avec un tampon d'inactivation à base d'isopropanol (Abbott) avant l'extraction de l'ADN. Ce test de diagnostic in vitro (le test porte le marquage CE-IVD) comprend une étape d'extraction automatisée, qui peut gérer un maximum de 96 échantillons dans un seul lot et une amplification dans le m2000rt basée sur la RT-PCR qui cible spécifiquement deux gènes du MTBC, la séquence d'insertion 6110 (IS6110) et l'antigène protéique b (Pab) en une seule réaction (337) (338). L'amplification peut être réalisée manuellement en utilisant le m2000sp. L'extraction automatisée prend environ sept heures pour traiter et analyser 96 échantillons (339).

La sensibilité analytique est de 17 UFC/mL. En termes d'évaluation clinique, la sensibilité globale et la spécificité du test RT MTB à ce jour sur des échantillons cliniques prospectivement collectés varient respectivement de 93% à 100% et de 97% à 100% (340) (341), bien qu'une étude rapporte une sensibilité réduite de 81% dans les échantillons à frottis négatif (342). Une sensibilité similaire (92% sur une gamme de types d'échantillons respiratoire et non respiratoire et 93,5% pour les échantillons respiratoires seulement) et une spécificité (100%) ont été rapportées sur des échantillons cliniques résiduels, avec une sensibilité réduite de 76,1% dans les échantillons à frottis négatif (343).

1.3. Amplification isotherme induite par boucle

Dans la réaction LAMP, la séquence d'ADN cible est amplifiée avec une haute sensibilité et spécificité liées à l'utilisation de 6 amorces (344). Le tout se fait dans des conditions isothermales et en une heure environ (345). Comme pour la PCR, il existe plusieurs déclinaisons de cette méthode : la LAMP classique, la LAMP en temps réel, la RT-LAMP ou encore la RT-LAMP en temps réel. Cependant le test LAMP a plusieurs avantages par rapport à la PCR conventionnelle, il ne comporte pas d'étape de purification et de dénaturation de la séquence nucléique cible, il ne nécessite pas de thermocycleur, il est effectué à une température fixe de 60-65°C et les produits amplifiés peuvent être visualisés au point final à l'œil nu en ajoutant un indicateur. Un essai moléculaire commercial et manuel pour détecter le MTBC basé sur les techniques LAMP (TB-LAMP) a été développé par Eiken Chemical Company (Tokyo, Japon) et recommandée par l'OMS en 2016 (346). Les tests TB-LAMP actuels sont basés sur l'amplification de l'ADN génomique des mycobactéries MTBC ciblant les gènes *gyrB* et *IS6110*.

Le tableau 14 regroupe quelques études évaluant l'apport clinique de TB-LAMP dans le diagnostic de la TB sur des échantillons pulmonaire et extra pulmonaire. L'étude portée par Ou et ses collègues a démontré que la sensibilité de TB-LAMP basée sur des expectorations frottis négatifs a été de 53,81%, avec une sensibilité globale de 70,67% et une spécificité de 98,32% (347); ces résultats sont presque similaires à ceux de Gray et ses collègues (348). D'excellents résultats ont été rapportés par N'guessan et al. La sensibilité et la spécificité ont été de 92% et de 94% respectivement (349). Une méta-analyse récente de l'exactitude diagnostique du LAMP pour la TP a révélé une sensibilité de 80,0% et une spécificité de 96,0% (350). De nombreuses études ont utilisé une approche multi-cible pour évaluer la sensibilité et la spécificité du test pour le diagnostic de méningite tuberculeuse et de lymphadénite tuberculeuse, visualisant ainsi des chiffres encourageants (351) (352). Malheureusement, LAMP est connu pour donner de faux résultats négatifs (353).

Après avoir examiné les dernières données probantes, l'OMS recommande que TB-LAMP puisse être utilisé en remplacement de la microscopie pour le diagnostic de la TP chez les adultes présentant des signes et des symptômes de TB. Il peut également être considéré comme un test de suivi de la microscopie chez les adultes présentant des signes et des

symptômes de TP, en particulier lorsque des tests plus poussés sur des échantillons de frottis d'expectoration négatifs sont nécessaires (346).

Tableau 14 : Les données d'études publiées récemment décrivant la performance de TB-LAMP.

Référence	Pays	Nombre d'échantillons	Type du prélèvement	Sensibilité %	Spécificité %
Gray et al. (348)	Inde	1745	Expectorations	84.4	96.6
	Uganda				
	Pirou				
Ou et al. (347)	Chine	1519	Expectorations	70.67	98.32
N'guessan et al. (349)	Côte d'Ivoire	469	Expectorations	92	94
Modi et al. (351)	Inde	150	LCR	82.7	100
Sharma et al. (352)	Inde	170	Cytoponction à l'aiguille fine	84.7	100

1.4. Amplification transcriptionnelle de l'ARN par TMA

La TMA ou Transcription Mediated Amplification (amplification utilisant la transcription inverse de l'ARN) amplifie des segments cibles d'ARN ribosomal par la reverse transcriptase. L'ADN complémentaire est ensuite transcrit en ARN par l'ARN polymérase. Cet amplicon est hybridé à une sonde ADN conjuguée à un marqueur chimio luminescent. Le signal lumineux émis par les hybrides ARN-ADN est mesuré à l'aide d'un luminomètre (354). L'ensemble du processus est réalisé manuellement. Les thermocycleurs ne sont pas nécessaires et toute l'étape d'amplification est réalisée sur un bloc chauffant à 42 ° C. Le temps d'exécution est de 2,5 heures. Aucun contrôle interne n'est fourni dans le kit pour surveiller la présence d'inhibiteurs. La méthode est approuvée par l'Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (US FDA) pour tester les échantillons respiratoires à frottis positif et à frottis négatif.

L'avantage essentiel de cette technique, est que le nombre de copies d'ARN transcrites dans la bactérie à partir d'une séquence d'ADN donnée est environ 1 000 fois plus élevé que le nombre de copies de cet ADN. Théoriquement parlant, ce nombre de copies confère à la TMA une sensibilité supérieure à la PCR (355). De plus la présence d'ARN est mieux corrélée avec le caractère viable des bactéries. En revanche, l'ARN est très fragile et facilement dégradable que l'ADN lorsqu'il est libéré à l'extérieur de la bactérie. Ceci minimise à la fois le risque de contamination et l'incidence des résultats faussement positifs suite à la persistance d'ADN des bactéries non viables.

Cette méthode est développée et commercialisée par GenProbe et BioMérieux dans la trousse Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct Test® (AMTD® GenProbe, BioMérieux ; GenoQuick®, Hain Lifescience).

L'analyse des échantillons respiratoires rapporte des taux de sensibilité et de spécificité de 80-97.8% et 98.7-100% respectivement (356) (357) (358) (359). La sensibilité du test sur des frottis à microscopie négatif varie de 50 à 75% (356) (358) (359) (360), de meilleurs résultats (sensibilité de 80%) ont été obtenus sur des échantillons prélevés par bronchoscopie (361). Quant à la performance du test AMTDT sur les échantillons extra respiratoires, une étude française portant sur 1538 échantillons montre des performances très importantes (sensibilité et spécificité de 89, 99% respectivement) pour les prélèvements comme les pus, les adénopathies et les biopsies diverses (362). Une autre étude analysant l'apport de cette technique sur 197 prélèvements des ponctions ganglionnaires, rapporte une sensibilité de 93% et une spécificité de 100% (363).

1.5. Amplification par LCR

La LCR ou Ligase Chain Reaction (réaction de ligature en chaîne) permet, comme la PCR, l'amplification d'ADN. Cependant, la LCR amplifie la molécule sonde plutôt que de produire un amplicon par polymérisation de nucléotides.

La méthode a été développée et commercialisée par les laboratoires Abbott dans la trousse LCx M. tuberculosis. Dans son principe, ce test fait intervenir deux paires de sondes nucléotidiques étant complémentaire d'un brin de l'ADN cible dénaturé (364). Il utilise à la fois une enzyme ADN polymérase et une enzyme ADN ligase pour conduire la réaction. La séquence d'ADN code pour la protéine « Antigène B », qui est spécifique pour les membres

du MTBC. Dans un premier temps, une ADN polymérase thermostable comble les espaces entre les amorces, ensuite une ligase également thermostable réunit les fragments les uns aux autres, l'amplicon est alors constitué. Il sera reconnu par une paire de sondes oligonucléotidiques, l'une permet la capture de l'hybride et le fixe dans le milieu réactif, l'autre permet ensuite la mise en évidence de la fixation par réaction immunoenzymatique (354). Comme la PCR, LCR nécessite un thermocycleur pour conduire la réaction et chaque cycle entraîne un doublement de la molécule d'acide nucléique cible. La LCR permet d'obtenir de l'ordre de 10^6 copies d'ADN après 20 à 40 cycles d'amplification (365). Le test est recommandé par le fabricant pour une utilisation avec des échantillons respiratoires, il ne comprend pas un système de contrôle interne d'amplification et à partir d'un échantillon digéré et décontaminé, il peut être complété en 5 à 6 heures. Cette méthode n'est pas approuvée par la FDA pour être utilisée aux États-Unis et, en 2002, elle a également été retirée du marché européen.

Dans les études publiées (Tableau 15), la sensibilité du test (comparée à la culture et à la corrélation clinique) varie de 69,7 à 96,8% dans l'ensemble et de 81,8 à 100% pour les échantillons à frottis positif mais elle baisse dramatiquement entre 35,3 et 79,2% pour les échantillons à frottis négatif et elle est encore plus décevante dans les échantillons extra pulmonaires.

Parmi les avantages spécifiques du MTB LCx, on trouve une détection plus précoce et plus spécifique des bacilles tuberculeux dans les échantillons radiométriques positifs pour la culture BACTEC par rapport à la confirmation par analyse microscopique (366).

Comme avec d'autres procédures d'amplification d'ADN, la présence d'inhibiteurs dans l'échantillon conduit souvent à des résultats faussement négatifs. Il a été rapporté que le taux d'inhibition de la LCR est d'environ 0,8% (367). Un autre inconvénient important de la détection LCR par rapport aux procédures de diagnostic MTB classiques est l'incapacité du test à différencier les organismes viables et non viables chez les patients suivant un traitement médicamenteux. Donc la détermination de la progression du patient ne peut pas être faite par LCR (368) (369).

Tableau 15: Evaluation du test LCx M. tuberculosis pour la détection du MTB sur des échantillons respiratoires et extra respiratoires.

Référence de l'étude	Nombre/type des échantillons	Nombre de cultures/ nombre de frottis positifs	Etalon d'or utilisé		Sensibilité %	Spécificité %
Gamboa et al. (368)	526/E	130/33	Culture, clinique	corrélacion	78.5	100
Alonso et al. (370)	322/R+E	11/8	Culture, clinique	corrélacion	76.5	95.8
Palacios et al. (371)	235/E	18/0	Culture, clinique	corrélacion	90.4	98.5
Fadda et al. (372)	622/R+E	124/71	Culture, clinique	corrélacion	96.8	100
Moore and Curry (369)	493/R	34/13	Culture, clinique	corrélacion	77	99
Garrino et al. (373)	737/R+E	61/46	Culture, clinique	corrélacion	78	100
Lumb et al. (374)	2,347/R+E	152/79	Culture, clinique	corrélacion	69.7	99.9
Viinanen et al. (375)	247/R	31/24	Culture, clinique	corrélacion	83.9	97.7
Ribeirro et al. (376)	297/R	297/124	Culture		92.7	93
R: respiratoire ; E: extra respiratoire						

1.6. Amplification par SDA

L'amplification par déplacement de brin (SDA) est un processus enzymatique isotherme qui amplifie l'ADN de façon exponentielle, en mettant en jeu l'action simultanée de deux enzymes thermorésistantes, une enzyme de restriction (BsoBI ou BsrI) et une ADN polymérase dépourvue d'activité exonucléasique (377). Cette méthode a été développée et commercialisée par Becton-Dickinson pour le diagnostic de la TB sous la forme de la trousse The BD ProbeTec ET.

Cette méthode comporte deux temps : la génération d'une cible puis son amplification. L'amplification est basée sur la capacité de l'enzyme de restriction à couper un site de reconnaissance modifié, suite à l'incorporation d'un désoxyribonucléotide modifié dATP. Cette coupure crée une nouvelle « amorce » à partir de laquelle l'ADN polymérase va synthétiser un nouveau brin et déplacer le brin coupé (378). Le brin déplacé est une copie supplémentaire de la séquence cible et sert de matrice pour une nouvelle étape d'hybridation-élongation. Le SDA a été utilisé pour amplifier une seule espèce cible dans chaque mélange réactionnel (379). Des avancées récentes ont permis d'étendre la capacité d'une telle technique à permettre une amplification simultanée et efficace de deux séquences cibles couplées à une molécule de contrôle interne destinée à agir comme standard (technique SDA Multiplex) qui présente l'avantage de permettre l'utilisation d'une seule paire d'amorces d'amplification sur une paire de cibles différentes, assurant ainsi que l'amplification se déroule à des vitesses comparables et minimisant les réactions d'amplification de fond à la suite d'événements d'amorçage erronés. La méthode multiplex SDA permet d'amplifier la séquence IS6110 en fournissant une spécificité de niveau d'amplification pour les souches MTBC tandis que l'autre cible est le gène ribosomique 16S commun à toutes les espèces mycobactériennes cliniquement pertinentes permettant la spécificité mycobactérienne au niveau d'amplification. Le SDA a l'inconvénient d'avoir des fonds accrus dus à la digestion d'ADN non pertinent contenu dans l'échantillon, mais il nécessite également l'utilisation de nucléotides modifiés coûteux comme substrat, ce qui rend impossible la mise en œuvre dans les pays défavorisés (378).

L'ADN cible est dénaturé par la chaleur en présence de tous les réactifs sauf l'enzyme de restriction et la polymérase, après quoi l'amplification se poursuit à environ 40°C après l'étape de refroidissement et l'ajout des enzymes (enzyme de restriction et polymérase) (380).

L'essai est recommandé par le fabricant pour une utilisation avec des échantillons respiratoires et peut être complété en 3,5 à 4 h à partir d'un échantillon digéré et décontaminé. Un système de contrôle interne, conçu pour détecter la présence de substances inhibitrices, est utilisé avec chaque échantillon. Actuellement, cette méthode n'est pas approuvée par la FDA pour une utilisation aux États-Unis.

En général, le test offre plusieurs avantages aux laboratoires cliniques qui effectuent des tests d'amplification commercialisés de routine. Le plus important est l'inclusion d'un système de contrôle interne dans le même puits que le spécimen du patient. De plus, la contamination par les amplicons est minimisée, car le micropuit scellé dans lequel l'amplification se produit ne subit aucune réouverture. Après l'inactivation mycobactérienne, qui se produit pendant le traitement initial de l'échantillon, la procédure restante n'a pas besoin d'être effectuée dans une enceinte de sécurité biologique. Enfin, le traitement initial et l'amplification des échantillons peuvent être effectués dans la même pièce (comme suggéré par le fabricant) et tous les réactifs peuvent être stockés à température ambiante. La préparation des échantillons est la plus laborieuse et représente la principale lacune du système ; par la suite, le test est presque entièrement automatisé (381).

Les données tirées de la littérature (Tableau 16) donnent un taux de sensibilité sur des échantillons respiratoires (comparé à la culture plus ou moins la corrélation clinique) allant de 81,8 à 100% globalement et de 96.3 à 100% pour les échantillons à frottis positif. Bien que toutes les études publiées aient signalé des sensibilités plus faibles pour les échantillons à frottis négatif et extra pulmonaire (allant de 33,3 à 100% et de 60.7 à 100% respectivement), cette différence semble moins importante que celle observée avec d'autres méthodes. L'amélioration de la sensibilité était principalement due à la disponibilité du système de contrôle interne, qui permet la détection facile des échantillons inhibiteurs. La spécificité globalement s'est révélée très bonne.

Tableau 16: Evaluation du test BD ProbeTec (DTB) pour la détection de la tuberculose sur les échantillons cliniques.

Référence de l'étude	Nombre/type des échantillons	Nombre de cultures/ nombre de frottis positifs	Etalon d'or utilisé	Sensibilité %	Spécificité %
Bergmann and Woods (382)	523/R	24/15	Culture et corrélation clinique	100	99.2
Bergmann et al. (383)	600/R	16/12	Culture et corrélation clinique	93.8	99.8
Johansen et al. (384)	351/R	150/85	Culture et corrélation clinique	82.7	99
	372/E	192/67	Culture et corrélation clinique	60.7	98.9
Barrett et al. (385)	200/R	104/101	Culture et corrélation clinique	97.1	96
Maugein et al. (386)	547/R	69/43	Culture et corrélation clinique	89.5	98.2
	74/E	8/4	Culture et corrélation clinique	I	I
Mazzarelli et al. (387)	537/R	184/135	Culture et corrélation clinique	91.3	98.1
	294/E	68/28	Culture et corrélation clinique	77.8	97.7
C. Bismen et al. (388)	4716/R	4716/99	Culture et corrélation clinique	81.8	98.3
	167/E	167/0	Culture et corrélation clinique	100	96.2
A.M. Somily et al. (389)	118/R	118/33	Culture	97	96
	148/E	148/15	Culture	80	88

E : extra respiratoire	I : indisponible	R : Respiratoire
------------------------	------------------	------------------

En raison de l'utilisation croissante des TAG et de l'impact potentiel sur les soins dédiés aux patients et la santé publique, le Centre de Contrôle des maladies (Center Disease Control ou CDC) et l'association des laboratoires de santé publique aux états unis suggèrent des recommandations pour l'utilisation des TAG pour la confirmation de la TB en laboratoire.

Dans les formes avec une forte charge bactérienne, la conjonction d'un frottis positif avec un TAG positif indique une TB active alors qu'un frottis positif avec un TAG négatif obtenus sur de deux échantillons en l'absence d'inhibiteurs indiquera une maladie mycobactérienne non

tuberculeuse (400). Si la culture est positive dans les cas si-dessus, le patient est considéré comme un cas bactériologiquement confirmé de TB (162). Un TAG peut déterminer si les patients à frottis positif ont ou non une TB (401). De plus, si le résultat du TAG est positif mais le frottis est négatif, la décision de commencer un traitement antituberculeux reposera sur le jugement clinique en attendant les résultats de culture (402). Selon le CDC, si les expectorations sont à frottis négatif et le TAG négatif, un échantillon supplémentaire devrait être testé avec TAG (403). Cependant, si les résultats de culture sont revenus positifs, alors le patient pourra également être classé comme bactériologiquement confirmé pour avoir une TB. Enfin, si le frottis, le TAG et la culture MTB ont montré des résultats négatifs, le médecin pourra classer le patient comme un cas de TB cliniquement diagnostiqué ou envisager un autre diagnostic.

Dans les endroits où le taux de cultures positives pour la TB est faible, il pourra être plus efficace de limiter le TAG aux cas avec des résultats de frottis positifs ; d'autre part, dans les endroits où les cas de TB sont élevés, un TAG devrait être utilisé dans les cas de frottis négatifs (404). Une méta-analyse comprenant 125 études a montré qu'un TAG commercial ne devrait pas remplacer les tests conventionnels de diagnostic de la TB pulmonaire (405).

En conclusion, les méthodes d'amplification génique constituent une alternative potentielle des méthodes bactériologiques classiques qui présentaient plusieurs limites (399). L'obtention des résultats dans un délai rapide avec les TAG facilite le dépistage et l'initiation du traitement et par conséquent la non perte de vue des patients infectés.

Les TAG ont montré une sensibilité très élevée pour détecter les souches de MTB dans les échantillons cliniques. Actuellement, le TAG de deuxième génération -basé sur l'amplification par PCR- approuvé par l'OMS est le test Xpert / RIF MTB. Ce dernier présente une sensibilité similaire ou supérieure à celle des TAG de première génération pour le diagnostic de la tuberculose pulmonaire et extrapulmonaire chez les différentes catégories de cas notamment les enfants et les VIH-séropositifs. TB-LAMP encore est une des TAG basée sur l'amplification isotherme induite par boucle qui a bénéficié de la validation de l'OMS. Son intérêt est prouvé surtout dans la détection de MTB sur les échantillons pulmonaires.

2. Identification par hybridation moléculaire

L'hybridation moléculaire désigne l'ensemble des applications qui reposent sur la reconnaissance d'une séquence d'acide nucléique (ADN et ARN) spécifique, par une autre séquence qui lui est complémentaire. Lorsque cette dernière est marquée, on l'appelle sonde moléculaire. Le duplex formé est détectable et le signal obtenu offre des informations qualitatives et quantitatives sur la séquence cible détectée (390).

Les mycobactéries obtenues en culture sont traditionnellement identifiées par des techniques phénotypiques. Cependant, l'identification moléculaire devient de plus en plus indispensable. Celle-ci peut être mise en œuvre à partir de cultures en milieu solide ou liquide et donne des résultats rapides et fiables. Aujourd'hui l'hybridation avec des sondes moléculaires constitue le moyen le plus utilisé pour identifier les mycobactéries.

Actuellement on dispose de trois Kits commerciaux et qui seront exposé ultérieurement.

2.1. Technique INNO-LiPA Mycobacteria (Innogenetic)

Ce test a été le premier test de sonde d'ADN commercialisé, capable d'identifier différentes espèces mycobactériennes en parallèle (391) (392) (393) (394). Bien qu'il est extrêmement couteux (200 à 400 MAD / test), le protocole du test INNO-LiPA Mycobacteria est rapide (5-6 heures), fiable, spécifique, simple et adapté aux tests de laboratoire de routine. L'identification des mycobactéries est faite à partir d'une culture liquide ou solide (395). Cependant, des tentatives d'identification directe sur des prélèvements pulmonaires et extra pulmonaires ont été rapportées en littérature (396).

Le test LiPA est basé sur le principe de l'hybridation inverse. Le matériel d'ADN biotinylé, obtenu au moyen d'une amplification par PCR de la région cible, est hybridé avec 14 sondes oligonucléotidiques spécifiques immobilisées en bandes parallèles sur des bandelettes de nitrocellulose (figure 21) (397). Le nombre et l'emplacement des signaux d'hybridation colorés permettent la détermination du génotype, selon la brochure d'interprétation du test fournie avec le kit. La cible de la technique Inno-LiPA version 2 est l'inter espace 16S-23S codant pour l'ARN ribosomal du genre *Mycobacterium*. Ceci permet l'identification au niveau de l'espèce 22 groupe ou sous-groupes de mycobactéries potentiellement pathogènes y compris le MTBC (395). Cependant, le test LiPA n'identifie pas les espèces au sein du

MTBC. Ce test manque de système de contrôle interne et il n'est pas autorisé par l'administration fédérale des médicaments aux états unis (398).

Le test a été évalué par Tortoli et son équipe (394) sur 238 souches isolées dans sept laboratoires italiens. Le kit a correctement identifié 99,6% des souches testées et le résultat discordant était pour une souche MAC non résolue identifiée par le test LiPA en tant qu'intermédiaire MAC. Deux ans plus tard, une nouvelle étude gérée par Tortoli (399) utilisant la seconde version : INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2 sur 197 mycobactéries appartenant à 81 taxons, a révélé une sensibilité et une spécificité globales de 100% et 94,4% respectivement. Miller et al. (400) ont examiné la performance du test LiPA, démontrant des identifications correctes pour 59 des 60 isolats de Mycobacterium. Il est à noter que cette étude s'est concentrée sur des cultures reçues dans un seul laboratoire aux États-Unis, dont la moitié était MTB. Une autre étude française (401) montre que l'identification d'espèce ou de complexe est obtenue d'emblée pour 1865/2123 isolats (88 %) avec la technique InnoLiPA, tout en permettant l'identification de toutes les mycobactéries du MTBC. L'étude de Padilla et son équipe (398) trouve que le test InnoLiPA confère une sensibilité de 100% pour l'identification du genre Mycobacterium et qu'il a pu identifier correctement 109 des 110 échantillons (99,1%) directement à partir des flacons MB/Bact T®.

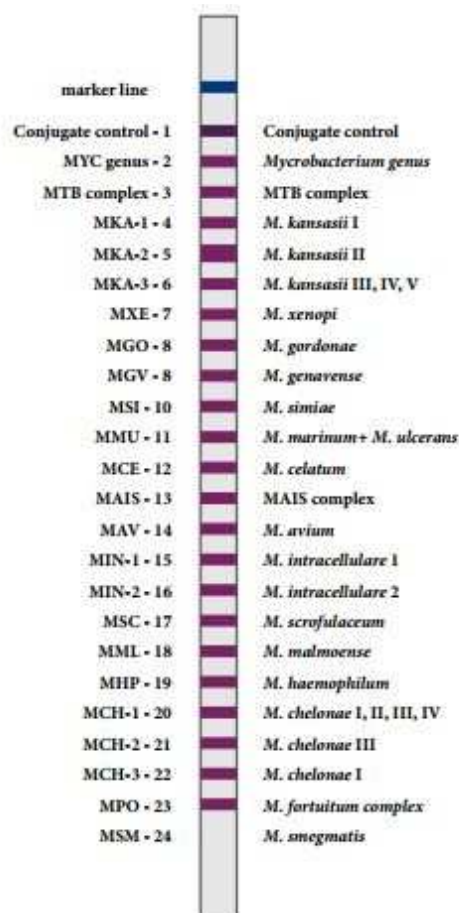


Figure 21: Conception d'un test d'hybridation inverse sur bandelette : Le test INNO-LiPA® MYCOBACTERIA v2 (402)

Sur la bande sont attachés de manière covalente, en lignes parallèles, 23 sondes d'oligonucléotides, représentant des régions d'ADN spécifiques à l'espèce de 16 espèces de MNT différentes et des souches du MTBC. Certaines espèces comme *M. kansasii* et *M. chelonae* ont plus d'une sonde sur la bande parce que ces espèces ont plus d'un type de séquence de sonde. Un produit de PCR marqué de la mycobactérie testée est incubé avec la bandelette et laissé s'hybrider contre des séquences homologues provoquant une bande d'hybridation visible sur la bandelette.

2.2. Test Accuprobe (GenProbe)

L'Accu Probe (GenProbe, Inc., San Diego, CA, États-Unis) est la première méthode moléculaire d'identification mycobactérienne mise sur le marché et qui ne nécessite pas une amplification préalable (403). L'Accuprobe est basée sur des sondes d'ADN spécifiques

d'espèce qui s'hybrident au gène cible codant pour l'ARNr 16S. Les sondes d'ADN sont couplées à un marqueur luminescent, l'ester d'acridinium (402). Des tests séparés sont disponibles pour l'identification des mycobactéries les plus fréquemment rencontrées en médecine, à savoir le MTBC, complexe *M. avium-intracellulare* (MAC), *M. kansasii* et *M. gordonae*. Le test d'identification Accuprobe du complexe *Mycobacterium tuberculosis* ne fait pas la distinction entre les membres du MTBC ni entre les membres du complexe *M. avium*. Les résultats du test sont lus avec un luminomètre à partir d'une culture positive en milieu solide ou liquide. D'ailleurs, le test montre d'excellentes sensibilités avec les cultures non radiométriques MGIT 960 (96,8%) et MB / BacT (100%) (404). Le test AccuProbe ne peut pas être utilisé pour la détection directe de mycobactéries dans des échantillons cliniques. En général, les tests AccuProbe sont très fiables, simples à réaliser et permettent des identifications rapides (en 2 heures environ) (402) (405). Cependant, la méthode est coûteuse et techniquement exigeante, nécessitant des quantités relativement importantes de spécimens (2 à 3 ml) (406). Leur utilisation est largement limitée aux États-Unis, où ils sont la seule méthode approuvée par la FDA pour l'identification des mycobactéries (407).

Dans des études récentes, le test d'identification des mycobactéries du MTBC AccuProbe a été évalué en milieu clinique. Sa sensibilité et sa spécificité sur une étude néozélandaise étaient de 84,2% et de 97,3% respectivement (408). Ces chiffres sont moindres que ceux publiés sur une étude prospective portant sur 1,585 échantillon mis en culture MGIT. Celle-ci montre que le test AccuProbe a permis d'identifier 95,7% des isolats du MTBC (409). Sur des échantillons extra pulmonaires, la performance du test a été évaluée par Hui et ses collègues. L'étude montre des taux de sensibilité et de spécificité d'AccuProbe de 92,0% et de 87% (410). Bien que la performance du test déclarée par le fabricant est intéressante (sensibilité et spécificité de 99,2% et 99,9% respectivement), les résultats doivent être interprétés en fonction des autres données du laboratoire et corrélés avec les données cliniques (411).

2.3. GenoType MTBC et GenoType Mycobacterium CM/AS (Hain Lifescience)

2.3.1. Système GenoType MTBC

Le fabricant HAIN Lifescience propose deux tests d'identification qui reposent sur la technique d'hybridation.

Le premier test, GenoType MTBC utilise la technique d'ADN-Strip pour l'identification in vitro des espèces et des souches appartenant au MTBC (MTB / *M. canettii*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. bovis* subsp. *bovis*, *M. bovis* subsp. *caprae* et *M. bovis* BCG). Il s'agit d'un essai qui utilise de l'ADN extrait à partir des cultures liquides ou solides positives. La procédure s'enchaîne par la suite avec l'étude du polymorphisme mono-nucléotidique du gène gyrase B (*gyrB*) et de la délétion de la région de différence-1 (RD1) de *M. bovis*-BCG. Ces polymorphismes sont ciblés par des oligonucléotides spécifiques immobilisés sur des bandes de membrane. Les amplicons dérivés d'une PCR multiplex réagissent avec ces sondes lors de l'hybridation (412). La combinaison d'une amplification spécifique avec une hybridation subséquente offre une fiabilité diagnostique élevée (413). Ce test 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 cinq heures (414).

Puisque ce test est une technique basée sur l'amplification, la différenciation peut être effectuée avec des cultures liquides sans nécessiter de culture supplémentaire sur des milieux solides (413). Le test GenoType a l'avantage de cibler l'ADN stable et ne nécessite pas donc une quantité importante de bactéries viables (415). Comparé à d'autres techniques génétiques, ce test ne nécessite pas de compétences techniques spéciales, ni le travail avec des substances toxiques et potentiellement mutagènes comme le bromure d'éthidium, permettant alors aux laboratoires d'effectuer ce test en diagnostic de routine. Il n'est pas sensible aux changements de température ce qui rend son interprétation facile (415). De plus, les conditions d'amplification et d'hybridation sont identiques à celles du test GenoType Mycobacterium CM/AS pour l'identification de plusieurs espèces de mycobactéries, permettant ainsi une performance parallèle des deux tests en une seule opération de travail (412). Les bandelettes possèdent deux zones de contrôle de qualité qui assurent le bon déroulement du test et le bon fonctionnement des différents composants du kit. Le coût du test GenoType (130 MAD / test) est légèrement inférieur à celui du test LiPA (200 MAD / test) (415).

Bien que la pratique du test Génotype MTBC soit intéressante, elle n'est pas sans inconvénients. Le test ne peut en aucun cas être appliqué directement sur l'échantillon biologique (413). La performance du test n'a pas été validée avec toutes les méthodes d'extraction d'ADN en dehors de celles recommandées par le fournisseur. L'ADN cible doit

être correctement amplifié. Le test fonctionne seulement dans la limite des régions génomiques choisies pour la différenciation. Le séquençage ou l'analyse des résistances aux antibiotiques doivent être réalisés séparément.

Ce test fournit une méthode directe fiable pour l'identification des membres du MTBC, avec une excellente spécificité dans de nombreuses études. Richter et ses collègues ont évalué l'utilité du test GenoType MTBC pour différencier les espèces du MTBC sur 77 cultures positives. L'identification des espèces a été identique aux résultats des méthodes conventionnelles. La sensibilité a été légèrement plus élevée pour ce test que pour le test AccuProbe (416). Ensuite le test a été évalué par l'équipe de Somoskovi. En plus de 35 souches de référence et de 157 isolats cliniques, la performance de ce test a été testée directement sur 79 échantillons cliniques à frottis positif. Le test s'est avéré aussi précis que le test de référence (Analyse de délétion génomique par PCR) pour tous les 192 isolats et les membres du MTBC détectés et identifiés dans 93,2% des échantillons contenant le MTBC (417). Dans une étude grecque, le test GenoType MTBC a démontré un accord à 100% avec l'identification préalable des souches sur 120 isolats cliniques (418). Un autre travail publié par Romero et son équipe indique que le test GenoType MTBC a été capable d'identifier correctement 102 des 103 souches (99,03%) étudiées. Les résultats ont été comparés à ceux obtenus en utilisant les techniques moléculaires RFLP-PCR et multiplex PCR, les tests biochimiques et les tests de sensibilité (419).

2.3.2. Système GenoType Mycobacterium

GenoType Mycobacterium (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Allemagne) est un test de bandelette d'ADN fabriqué et commercialisé pour la détection et l'identification des espèces des mycobactéries obtenues à partir des cultures positives liquides ou solides (420). Il comprend deux kits : le test GenoType® Mycobacterium CM (Common Mycobactéria) pour les mycobactéries communes / AS (Additional Species) pour les espèces supplémentaires (HAIN Lifescience, Nehren Allemagne). HAIN Lifescience propose un autre Kit, le GenoType CM direct qui permet l'identification du MTBC et de plus de 20 espèces mycobactériennes directement à partir de l'échantillon clinique (421).

Le protocole GenoType est basé sur la PCR et la technologie DNA-STRIP. La région du gène ARNr 23S de l'ADN mycobactérien est extraite du matériel cultivé, amplifiée spécifiquement

par PCR. Elle est détectée par la suite grâce à des sondes oligonucléotidiques spécifiques immobilisées sur des bandes de membrane en utilisant une hybridation inverse et une réaction de coloration enzymatique (421).

GenoType CM permet l'identification de plus de 20 espèces mycobactériennes à savoir : *M. avium*, *M. chelonae*, *M. abscessus* complex, *M. fortuitum* group, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. interjectum*, *M. szulgai*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. marinum*-*M. ulcerans*, le MTBC et *M. xenopi* (421). Tandis que le kit GenoType AS vise à différencier 19 autres espèces MNT moins communes disponibles pour la différenciation, à savoir, *M. simiae*, *M. mucogenicum*, *M. goodii*, *M. cellatum* I et III, *M. smegmatis*, *M. genavense*, *M. lentiflavum*, *M. heckeshornense*, *M. szulgai*/ *M. intermedium*, *M. phlei*, *M. hemophilum*, *M. kansasii*, *M. ulcerans*, *M. gastri*, *M. asiaticum* et *M. shimoidei* (421).

L'avantage de l'utilisation du test GenoType® Mycobacterium CM / AS est l'identification rapide (en cinq heures) et précise d'une large gamme d'espèces de Mycobacterium sur le même échantillon, ce qui élimine le besoin d'effectuer différents tests pour chaque espèce ou d'attendre la croissance en milieu solide pour guider l'algorithme d'identification (422). Le test GenoType identifie les coïnfections par différentes mycobactéries et il permet la détection de cultures faiblement positives (423). Le système renferme plusieurs contrôles de qualité qui permettent une grande précision diagnostique. Les résultats sont simples et faciles à interpréter sans beaucoup d'expertise comme celle requise pour le séquençage de l'ADN (424). Le test GenoType® Mycobacterium CM / AS peut facilement être mis en œuvre dans le travail de routine pour la différenciation des espèces mycobactériennes dans le cadre clinique. Selon les coûts du kit, le prix de détection par le test GenoType est d'environ 500 MAD (Septembre 2005) (425). Le prix est considéré intéressant pour un test qui peut identifier plus de 19 souches de mycobactéries et les coïnfections par différentes espèces de mycobactéries (423).

Le test GenoType® Mycobacterium CM / AS est un test très précis et fiable pour l'identification des espèces mycobactériennes, qui nécessitent une installation spécialisée et un personnel de laboratoire formé. Le test nécessite une extraction, une amplification et une hybridation, qui demandent plus de travail (422). Il ne peut pas détecter toutes les espèces des

mycobactéries non tuberculeuses (NTM) car il n'a que les sondes pour les espèces les plus courantes et cliniquement importantes (422).

Une rapide recherche sur PubMed montre que ce test a déjà été validé dans plusieurs études pour la différenciation rapide de espèces mycobactériennes (426). Parmi ces études, une a été menée auprès d'un panel de 197 souches appartenant à 86 taxons différents. La sensibilité et la spécificité a été de 97,9% et 92,4% pour le kit CM et de 99,3% et 99,4% pour le kit AS (427). Une étude de Richter et son équipe effectuée sur 151 souches, montre que le test CM a permis d'identifier 137 (92,6%) des 148 souches mycobactériennes, alors que 133 (89,9%) des 148 souches mycobactériennes ont été identifiées avec le test AS (428). Une nouvelle étude évalue la capacité du Kit AS à identifier 219 isolats de mycobactéries en combinaison avec le test GenoType Mycobacterium CM. Le test a donné des résultats concordants avec 211 (96%) des 219 isolats par rapport aux résultats de séquençage classique de l'ADNr 16S. Une plus récente étude effectuée à Lucknow sur 219 isolats clinique a montré que le test GenoType® Mycobacterium CM / AS est sensible à 99,3% et spécifique à 98,3% (422). La performance du test pour l'identification des MNT tuberculeuses a fait l'objet de plusieurs études (429) (430) (431).

Pour conclure, les techniques d'hybridation moléculaires après (ou sans) amplification sont une alternative rapide pour l'identification des mycobactéries à partir de la culture. L'hybridation moléculaire ne doit être effectuée que sur des cultures pures liquides ou solides. Les tests d'hybridation nucléiques permettent de détecter les membres du MTBC ainsi que plusieurs espèces de NTM couramment rencontrées. La sensibilité et la spécificité de ces techniques sont généralement hautes et les résultats sont disponibles en 2-6 heures. Cependant, les résultats doivent être concordants avec ceux des techniques phénotypiques. En dehors du test Accuprobe, aucun test d'hybridation moléculaires n'est actuellement approuvés par la FDA ni par l'OMS pour l'identification des mycobactéries.

3. Typage Moléculaire

Le typage bactérien est un système qui permet la discrimination des différentes souches bactériennes au sein d'une même espèce (432).

Depuis de nombreuses années, les méthodes phénotypiques ont été les seules disponibles pour ce faire, mais elles se révèlent longues et peu discriminantes. Aujourd'hui la biologie

moléculaire offre de nouveaux outils qui rendent possible le typage bactérien aussi bien dans la prise en charge clinique que dans les études épidémiologiques de la TB (à côté des enquêtes classiques autour des cas de TB).

Actuellement, de nombreuses méthodes moléculaires basées sur les techniques de polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP), d'hybridation et/ou de l'amplification PCR sont disponibles pour typer MTB.

Les méthodes génotypiques fréquemment utilisées pour le typage de MTB seront ultérieurement décrites en fonction de leurs principes, avantages, inconvénients et performance.

3.1. Méthode de IS6110-RFLP

La méthode « étalon or » utilisée pour le génotypage correspond à l'étude du polymorphisme de longueur des fragments de restriction qui porte aussi le nom de RFLP (Restriction Fragment Long Polymorphism) (434) (435). Cette technologie s'appuie sur la détection des variations d'une séquence d'insertion selon le nombre des copies et leur position. Le génotypage des MTB fait appel à la séquence IS6110. Cette dernière est une séquence dispersée dont le nombre et l'emplacement diffèrent en fonction de la souche. L'IS6110 est utilisée pour l'identification par RFLP si et seulement si les souches comportent au moins 6 copies d'IS6110 (436) (437) (438).

Cette technique consiste à digérer le génome bactérien à l'aide d'une enzyme de restriction Pvu II qui ne coupe qu'une fois dans la séquence IS6110. Les centaines de fragments générés sont séparés par électrophorèse sur un gel. L'étape de différenciation des souches de MTB par hybridation non radioactive «Southern Blot» consiste à transférer les fragments sur une membrane. Le Southern blot utilise une sonde marquée spécifique de l'IS6110. De différents profils de bandes sont ainsi observés, en fonction du nombre de copies et de la mobilité électrophorétique de la séquence IS6110 (439). La comparaison des profils génomiques obtenus peut être réalisée visuellement sur un film d'autoradiographie, ou par analyse informatique et de permettre alors l'établissement des grappes de souches apparentées (437).

La stabilité du profil génomique au cours du temps, la spécificité et la capacité discriminante de l'IS6110- RFLP font de cette technique un bon outil épidémiologique pour étudier la dynamique de transmission et la parenté des isolats de MTB. Dans les études portant sur la

TB récidivante, les souches présentant un profil de bandes identique à l'épisode infectieux primaire indiquent une rechute de la TB, alors qu'une réinfection et une transmission récente sont impliquées lorsque des profils de bandes distincts sont obtenus (440).

La méthode a été standardisée en 1993 par la communauté internationale pour faciliter la comparaison inter et intra laboratoire (441). Malgré cette tentative, les données obtenues dans des études indépendantes sont difficiles à comparer en raison du manque de portabilité des résultats entre les différents laboratoires (442) (443).

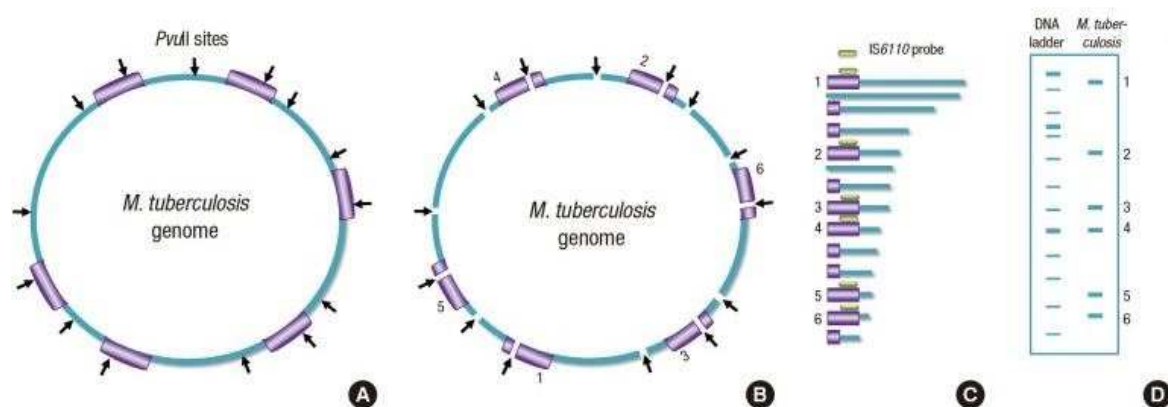


Figure 22 : Principes de RFLP (444).

- (A) le génome de MTB contenant le segment d'insertion IS6110 avec les sites de clivage PvuII.
 (B) Digestion du génome entier avec PvuII.
 (C) des segments d'ADN de différentes tailles après avoir couru dans le gel sont transférés sur une membrane.

La RFLP-IS6110 est techniquement exigeante car elle nécessite des logiciels informatiques sophistiqués et coûteux ainsi que du personnel qualifié possédant une expertise technique élevée pour son fonctionnement (445). La technique demande des quantités importantes d'échantillon d'isolat viable (2-3 µg d'ADN de haute qualité), ce qui allonge par conséquent le temps d'identification (3-6 semaines) et pose des soucis de biosécurité (446). D'autre part, la capacité de discrimination de la technique est liée au nombre de bandes IS6110, donc les souches contenant un faible nombre (moins de 6 copies) ne sont pas correctement identifiées. Ces souches à faible nombre de copies ont été fréquemment isolées en Asie, en Asie du Sud-est et dans certains pays africains (447) (448) (449). A cet égard des marqueurs secondaires tels que PGRS et CRISPR sont utilisés pour augmenter le pouvoir discriminant de la

technique (446) (442) (450). Enfin, certaines espèces de MNT ont des copies multiples de séquences qui sont similaires à IS6110 et peuvent ainsi s'hybrider avec la sonde IS6110 (451). Malgré ses limitations, la RFLP-IS6110 est toujours utilisée comme un outil rétrospectif pour les analyses épidémiologiques y compris pour l'identification des groupes à risque de transmission de la TB et la confirmation ou la détection rétrospective de l'éclosion (454). Par ailleurs, cette méthode de génotypage n'est effectuée qu'en deuxième intention, pour une plus grande différenciation des grappes de souches ayant un profil génomique similaire, mis en évidence par les techniques de spoligotypage et MIRU-VNTR (455).

Certes le typage RFLP a été abandonné comme étalon d'or dans l'épidémiologie moléculaire, mais récemment DuPont Molecular Diagnostics a introduit le kit IS6110-PvuII pour le typage semi-automatique de MTB en utilisant le système de caractérisation microbienne RiboPrinter (452). L'évaluation de la nouvelle version semi-automatique qualifie sa performance globale comme excellente. En outre le système RFLP semi-automatique est techniquement simple et significativement plus rapide que la méthode manuelle RFLP (8 h contre 5 jours). L'analyse est entièrement automatisée et les empreintes digitales peuvent être facilement échangées entre les laboratoires (453).

3.2. Spoligotypage

Le spoligotypage (de l'anglais SPacer OLIGOnucleotide TYPING, typage oligonucléotidique des espaceurs) a été la première méthode de génotypage basée sur la PCR utilisée à grande échelle pour le MTBC (456). Cette méthode cible le locus « DR » (locus à répétition directe) des mycobactéries du MTBC (457). Ce locus est un membre de la famille d'ADN répétitifs, plus fréquemment désignée sous le nom de CRISPR. Ce dernier est l'acronyme de « Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats » ou « Courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées » (458). Le locus contient des répétitions directes de 36 paires de bases identiques, séparées par plusieurs séquences d'espaceurs de 34 à 41 paires de bases variables. Ces séquences inter-DR varient d'une souche à l'autre par leur longueur, leur séquence et leur nombre, ce qui confère un important polymorphisme entre les isolats cliniques de MTBC. Dans la méthode de spoligotypage, le locus DR entier est amplifié par PCR, en utilisant une paire d'amorce inversement orientées complémentaires de la séquence des DR. Les produits de PCR, de différentes tailles, sont hybridés à une membrane

avec 43 oligonucléotides espaceurs -provenant de MTB H37Rv (espaceurs 1-19, 22-32 et 37-43) et M. bovis BCG P3 (entretoises 20-21 et 33-36)- pour révéler la présence ou l'absence de chaque espaceur de référence dans la souche testée. La membrane peut être réutilisée. Les produits de PCR hybridés sont ensuite incubés avec un conjugué streptavidine-peroxydase, puis détectés par un système de chimiluminescence et visualisés par autoradiographie (456).

Pour chaque isolat de MTB, le test de spoligotypage produit une série de bandes un peu comme un code à barres. La bande indique la présence d'un espacement, dans le cas contraire son absence. Le motif est converti en un système de code binaire à 43 chiffres fait d'une succession de « 1 » (la bande est présente) et « 0 » (la bande est absente). Ensuite, le code binaire à 43 chiffres est converti en un nombre octal à 15 chiffres. Chaque désignation octale est unique et représente un motif de bandes spécifique.

Le spoligotypage est une méthode relativement simple, rentable et à haut débit, dont les résultats sont précis et reproductibles et sont obtenus en deux jours. La fiabilité des résultats est liée à une grande stabilité du locus DR (459). Un autre avantage important du spoligotypage est sa sensibilité estimée à 10 fg d'ADN chromosomique (équivalent à l'ADN de 2 à 3 cellules bactériennes), ce qui est considérablement inférieur à ce qui est nécessaire pour le RFLP (460). Grâce à la présence de la phase d'amplification, cette méthode peut être appliquée directement sur des échantillons cliniques, sans nécessiter de culture préalable, ce qui peut être très utile lors d'une suspicion d'infection nosocomiale par exemple. Néanmoins, les échantillons contaminés et les infections mixtes peuvent ne pas être détectés (461) (87). De plus, le spoligotypage s'est avéré utile pour le typage de cultures non viables, de lames de frottis de Ziehl-Neelsen ou de coupes de tissus inclus en paraffine (462). Malgré sa reproductibilité, certaines séquences peuvent manquer et perturber la phase de révélation.

Les résultats du spoligotypage peuvent être facilement interprétés et informatisés. Les spoligotypes observés sont comparés à la base de données internationale SITVIT, qui est une version mise à jour de la base de données SpolDB4.0 publiée (463) et elle est disponible sur <http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVITDemo> . La base de données décrit un total de 7104 modèles de spoligotypes (correspondant à 58 187 isolats cliniques), regroupés en 2747 types partagés contenant 53 830 isolats cliniques et 4 357 modèles orphelins, provenant de 102 pays.

Le spoligotypage permet de classer les isolats du MTBC chez les taxons ou les sous-espèces (464). Par exemple, les spoligotypes de MTB sont caractérisés par l'absence d'espaces 33-36, alors que la plupart des souches de *M. bovis*, mais pas toutes, manquent d'espaces 39-43 et les spoligotypes de *M. bovis* BCG manquent d'espaces 3, 9 et 16 (465). Cependant, le spoligotypage ne permet pas une discrimination efficace au sein des souches du génotype «Beijing», car ce dernier ne réagit qu'avec les 9 derniers espaces (35-43) du panel de 43 (464).

L'application du spoligotypage sur les MNT, ne produit aucun signal, ce qui prouve la spécificité de la méthode uniquement pour le MTBC. Les marqueurs d'espacement DR sont présents en plusieurs exemplaires dans ces souches et sont donc des cibles précieuses pour la détection, l'identification et le typage des souches du MTBC (466) (467).

Bien que le test de spoligotypage est robuste et reproductible ($> 90\%$) (87) (468), sa reproductibilité en utilisant le test membranaire peut être affectée par la détermination subjective du signal d'hybridation, qui devient plus difficile avec l'utilisation répétée de la membrane. Des erreurs peuvent également survenir lors de l'enregistrement du résultat à 43 chiffres (469). Afin d'aider à surmonter certains de ces problèmes, Cown et ses collègues proposent le système Luminex (Austin, Texas). Ce dernier est une alternative intéressante aux hybridations par transfert inverse, pour les laboratoires qui effectuent des spoligotypages sur une échelle à haut débit ou pour ceux qui nécessitent fréquemment un délai d'exécution rapide pour seulement quelques isolats par cycle (469).

Le spoligotypage a un pouvoir de discrimination plus faible que le typage RFLP IS6110. Ceci peut être due au fait qu'il ne cible qu'un seul marqueur génétique couvrant moins de 0,1% du génome du MTBC. Cependant, le spoligotypage peut différencier les souches de MTB ayant de faibles nombres de copies IS6110 (≤ 5 bandes dans les profils RFLP). Le spoligotypage pourrait être effectué en tant que test de dépistage de première intention, suivi d'une autre méthode de typage ayant un pouvoir discriminatoire plus grand si nécessaire (470) (467).

Il a été prévu que l'utilisation de séquences d'espaces provenant de souches en dehors de H37Rv et BCG P3 renforcera le pouvoir discriminant du spoligotypage (471). Malheureusement, ce n'est pas le cas : les 51 nouvelles séquences d'espacement qui ont été

ajoutées à l'ensemble de 43 actuellement utilisés semblent contribuer peu à l'optimisation de cette technique (472).

3.3. *MIRU-VNTR*

C'est une technique qui cible un certain nombre de loci qui contiennent des séquences d'ADN répétées en tandem de type « Interspersed » spécifiques du génome du MTBC, dites les MIRUs (Mycobacterial Interspersed repetitive units ou les unités mycobactériennes répétitives dispersées ; d'où le terme de MIRU-VNTR ; VNTR est lui-même l'acronyme de Variable Number of Tandem Repeats ou répétition en tandem polymorphe). Les MIRU ont été initialement décrits par Supply et al. (473) comme des répétitions en tandem de 46-101 paires de base dispersés dans 41 emplacements dans tout le génome de MTB H37Rv. Parmi ces 41 loci, 12 présentent des variations dans le nombre de VNTR qu'ils comportent, donc ils ont été initialement sélectionnés pour le génotypage des isolats de MTB (474) (475). A noter que le pouvoir discriminant de l'analyse MIRU-VNTR augmente avec le nombre de locus évalués.

L'analyse MIRU-VNTR par la méthode maison consiste en l'amplification PCR de chaque locus MIRU d'intérêt, suivie de la détermination de la taille des amplicons par électrophorèse sur gel d'agarose ; ou par l'exécution de PCR multiplex, sur un séquenceur capillaire automatisée (476) (477). Evans et ses collègues ont proposé d'encore améliorer l'utilité de cette méthode en combinant le MIRU-VNTR avec la non-dHPLC (la chromatographie liquide à haute performance non dénaturante). Cette dernière est réalisée par le biais de la plate-forme WAVE® (Transgenomic - D-HPLC) (478). D'autre part, Genoscreen commercialise un kit de génotypage MIRU-VNTR qui utilise le format à 24 loci. En général, la méthode in-house est considérée simple, car elle possède moins de risque biologique et elle est techniquement facile et moins coûteuse. Néanmoins, Le processus conventionnel est long et encombrant -surtout quand il s'agit d'une étude phylogénique ou épidémiologique nécessitant l'analyse de 24 et 15 loci respectivement- et est associé à plusieurs sources d'erreur (les nombreuses étapes manuelles de pipetage, lecture de gel et interprétation, etc.) (479). En plus, certains des 24 loci peuvent ne pas être amplifiés par PCR multiplex et doivent ainsi être amplifiés avec une PCR à un seul locus ; Cela vaut aussi bien pour le kit de typage MIRU-VNTR (Genoscreen, Lille, France) que pour les méthodes maison (480). En pratique, cela implique une augmentation

significative de la charge de travail et du temps d'exécution et une méthode alternative est ainsi nécessaire, en particulier dans les zones à moyenne et haute prévalence de TB. Dans ce sens la société Qiagen offre une alternative efficace basée sur un automate d'électrophorèse capillaire à haut débit. Il s'agit ici de la plate-forme QiAxcel, qui a démontré son aptitude dans le génotypage systématique de MTB, sauf pour certains allèles avec un grand nombre de répétitions (479) (481) (482).

Comme les longueurs des unités répétées dans les différents marqueurs sont connues, le nombre de répétitions dans chaque cible peut être tout simplement déduit de la taille des amplicons, à l'aide d'un tableau contenant l'allèle correspondant à chaque locus VNTR (483) (484). Le résultat final est un code numérique (le code MIRU-VNTR) dans lequel chaque chiffre représente le nombre de répétitions de chaque locus analysé (485) (483). Ce système de codage permet le dépôt des données dans les bases de données mondiales via Internet pour des études épidémiologiques et génétiques à grande échelle, à savoir SITVIT / SpolDB4 et MIRU-VNTR plus (<http://www.miru-vntrplus.org/MIRU/index.faces> ; <http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVITDemo>) (486) (487) (463) . Contrairement à SITVIT, MIRU-VNTRplus est entièrement conçu pour le format standard à 24 locus et intègre plusieurs fonctionnalités pour faciliter l'analyse des locus MIRU-VNTR (et spoligotypes) des souches d'utilisateurs. Les modèles MIRU-VNTR identiques sont considérés comme appartenant à un cluster.

Les minisatellites MIRU-VNTR sont actuellement utilisés aux formats 12, 15 ou 24 loci selon l'objectif envisagé (épidémiologie ou phylogénie) (488). Il est suggéré d'utiliser l'analyse MIRU-VNTR à 12 locus en combinaison avec d'autres méthodes de génotypage (489) (490). Du fait que le pouvoir discriminant du système de typage MIRU-VNTR à 24 localisations est équivalent à celui de l'IS6110-RFLP (487) (491) (492), en 2006 Supply et al ont proposé de normaliser ce format au niveau international (483). L'équipe d'étude a choisi 15 locus comme nouveau standard pour la discrimination épidémiologique de MTB ainsi que 24 loci comme outil de haute résolution pour les études phylogénétiques. Ceci a rendu le locus MIRU-VNTR à 24 locus en train d'emporter le nouvel étalon-or dans le typage moléculaire des mycobactéries du MTBC. Le typage MIRU-VNTR normalisé utilisant les nouveaux ensembles de 15 et 24 locus a été reconnu comme hautement discriminatoire dans une

population dominée par les souches de la famille de Beijing (493), ce qui a été le principal inconvénient de la méthode de typage originale à 12 locus MIRU-VNTR. Une nouvelle approche qualifiée comme complémentaire a été proposée par la société Genoscreen sous format de kit (MIRUVNTR Hypervariable kit®). Ce kit qui repose sur l'analyse de 4 loci MIRU hypervariables supplémentaires (VNTR 1982, 3232, 3820 et 4120) a permis d'améliorer significativement l'identification des cas de transmission de TB liée aux souches Beijing (494) (493).

La technique MIRU-VNTR est une méthode de génotypage rapide, sensible, hautement discriminante et spécifique pour les isolats du MTBC (495). Pour une discrimination supérieure, une facilité de comparaison des résultats et un coût inférieur, le typage MIRU-VNTR devrait être l'outil de typage basé sur la PCR préféré (496). Un avantage particulier du génotypage VNTR, comparé au typage IS6110-RFLP, est sa portabilité du fait de la génération de résultats au format numérique, facilitant ainsi la comparaison des profils en intra- et inter-laboratoire et leur inclusion dans des bases de données internationales sur le web. Théoriquement, la reproductibilité de la méthode est supposée bonne, en raison de la stabilité génétique des locus ciblés. Cependant, les chiffres de la reproductibilité intra- et inter-laboratoire décrite dans la deuxième étude de compétence mondiale de la technique restent moyennement convaincantes (respectivement de 88% et 79% par rapport à 72% et 62% au cours de la première étude de 2012) (497). Cette étude souligne la nécessité d'un effort continu de contrôle de la qualité dans le typage VNTR (497). Par ailleurs, la capacité de stabilité de la séquence MIRU-VNTR fait que son taux d'évolution est lent, de sorte que la méthode est appropriée pour des analyses épidémiologiques à long terme (498) (499) (488). La technique MIRU-VNTR repose sur l'amplification PCR et donc elle ne nécessite que des quantités minimales de bactéries viables.

Cependant, des inquiétudes ont été soulevées quant à l'absence des produits de PCR, les allèles doubles dans un locus, les profils de PCR non interprétables et la probable faible stabilité dans les investigations épidémiologiques à long terme (493). Comme montré dans plusieurs études (483) (500), l'échec de la PCR a été trouvé pour certains locus. Ces échecs de PCR ont été répétés même si les tests ont été effectués dans différentes conditions de PCR et avec différents ensembles d'amorces. De manière intéressante, des échecs de PCR cohérents

ont été observés dans certaines souches épidémiologiquement liées. Bien que la cause des échecs de PCR n'ait pas pu être déterminée, la présence d'un nombre étonnamment grand d'unités répétées ou la suppression de la région à amplifier sont suspectes. Dans certains cas, les profils MIRU-VNTR présentent des allèles doubles en un seul locus, reflétant le plus souvent une microévolution clonale de la même souche (501). Cette dernière est modulée par divers facteurs (une infection prolongée, une réactivation de l'infection, la transmission active impliquant plusieurs hôtes, la transition de la latence à l'infection active, le phénotype hypermutateur de certaines souches et la mauvaise adhérence au traitement), responsables d'une variabilité marquée entre les modèles VNTR des souches impliquées (502) (503). Pourtant dans d'autres cas les allèles doubles sont trouvés à deux locus ou plus du même isolat, ceci alors peut être en rapport avec une infection mixte (504) (505) (502).

Le développement de cette méthode a été utilisé pour différencier la rechute de la réinfection, détecter les événements de contamination croisée au laboratoire, le traçage en temps réel de la transmission, la comparaison des données inter-laboratoires et la construction de bases de données globales (506) (507). La voie de la surveillance épidémiologique mondiale de la TB a donc été ouverte.

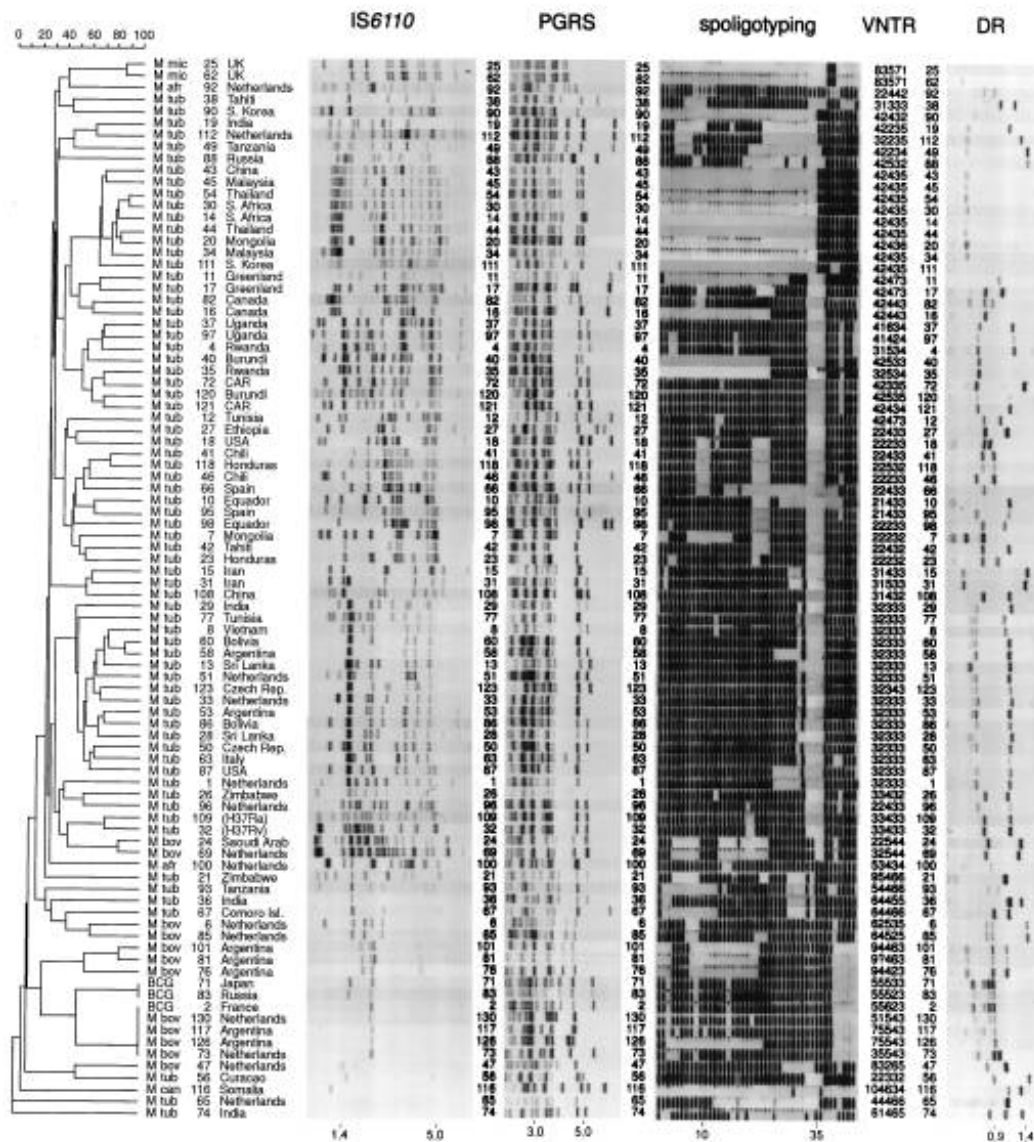


Figure 23 : profil de 90 souches du complexe *M. tuberculosis* obtenus en utilisant divers marqueurs génétiques (450).

3.4. Rep-PCR

En 1991 Versalovic et ses collègues ont décrit pour la première fois l'utilité de l'amplification PCR des séquences extragéniques palindromiques répétées (repetitive extragenic palindromic [REP]-PCR) dans le typage des eubactéries (508). Ces séquences non codantes (généralement de 30-500 pb), occupant un espace extragénique supérieur à 0,5%, sont dispersées dans tout le génome bactérien (509). Les REP sont situées généralement entre des gènes convergents, ce

qui explique clairement l'apport de cette technique dans la classification et l'identification des espèces et des souches bactériennes (508) (509). L'amplification par PCR des REP produit plusieurs amplicons de différentes tailles. Les amplicons sont ensuite analysés par électrophorèse sur gel, générant ainsi des bandes spécifiques (510). L'identification est assurée par comparaison des bandes pour refléter des différences en nombre, en taille et en position des éléments répétitifs dans le génome bactérien (511). Cependant, il est difficile d'obtenir une bonne reproductibilité par le système manuelle. Pour plus de commodité, un système rep-PCR semi-automatisé est présent sur le marché sous le nom de DiversiLab (bio Mérieux, Marcy-l'Etoile, France).

Un kit DiversiLab® Mycobacterium est disponible pour fournir une discrimination des souches au niveau des espèces de Mycobacterium. De plus, le kit DL M. tuberculosis peut fournir un niveau de discrimination plus élevé spécifiquement pour les échantillons de MTB. En général, le système a besoin de 5 h pour assurer l'ensemble des processus d'extraction de l'ADN, amplification PCR, la séparation électrophorétique, la détection d'amplicons marqués par fluorescence sur des puces microfluidiques automatisées et l'impression des résultats générée par ordinateur (codes à barres bactériens) (512). La collecte des données, le suivi du processus, l'analyse statistique des données et la comparaison des profils sont soumis à un logiciel hébergé sur internet nommé DiversiLab® (513) (510) (444). Le logiciel fournit à l'opérateur un système de stockage des données, ce qui facilite l'accès et l'utilisation des données à distance (514) (515). Le logiciel offre, en outre, une bibliothèque de profils connus facilitant l'identification et la comparaison des souches en inter- et intra- laboratoire (516).

Une étude menée par Cangelosi et ses collègues montre que ce système a un pouvoir discriminant qui est égal ou supérieur à celui de RFLP aussi bien pour MTB que pour les souches de M. avium (MAC) (512). L'étude propose que le système Rep-PCR puisse remplacer IS6110-RFLP en tant qu'adjuvant final des méthodes basées sur PCR pour le typage à haute résolution de MTB. La technique a aussi prouvée sa rentabilité et sa rapidité au cours d'une investigation faite à Seattle, Washington, autour d'une épidémie de TB chez les sans-abri (517). L'étude rapporte la possibilité d'analyser l'ADN directement extrait des cultures MGIT, la chose qui permet d'optimiser le délai de rendu de résultat (517). Quant au typage après culture, le système ne nécessite qu'un petit volume d'échantillon (75 ng), ce qui

permet de suivre les résultats en temps réel (512). La disponibilité des kits et du format automatisé de cette procédure sur le marché facilite la mise en œuvre du typage des souches dans les laboratoires qui n'ont pas un personnel qualifié pour exécuter les techniques les plus exigeantes en main-d'œuvre, telles que le PFGE (511).

En plus, le système est hautement discriminatoire et fournit à haut débit des empreintes génétiques de plusieurs espèces de *Mycobacterium*, y compris les souches de la famille de Beijing (513) et les MNT (518) (512). Le système DiversiLab a été évalué sur des isolats de *M. abscessus* et il a montré un pouvoir discriminant supérieur à la PFGE (519) (520) (521). Pour *M. avium*, cette méthode a fourni un niveau de discrimination plus élevé que le typage MIRU-VNTR (522) et a permis de révéler la source de l'infection chez des patients présentant une pneumopathie d'hypersensibilité à mycobactéries atypiques (523).

Cependant, REP-PCR a des inconvénients similaires à d'autres tests basés sur la PCR, à savoir le potentiel de contamination, les artefacts et le besoin de contrôles multiples (524). En plus c'est une technique qui s'avère coûteuse et qui nécessite l'utilisation à la fois de tous les puits des puces de la micro électrophorèse pour diminuer le prix de revient par échantillon car les puces ne peuvent pas être réutilisées (516).

3.5. Séquençage du génome complet (SGC)

Pour des fins phylogénique et épidémiologique, les techniques de séquençage à haut débit de la totalité du génome bactérien (whole genome sequencing, WGS) supplantent peu à peu les autres techniques de génotypage.

La technique repose sur la détermination de la séquence complète du génome de la bactérie (525). Après l'extraction et la purification de l'ADN génomique, le génome est généralement fragmenté en morceaux courts, qui sont ensuite séquencés par un séquenceur. Ce dernier fournit des millions voire des milliards de séquences courtes d'une longueur variant entre 100 et 500 pb, chacune de ces séquences est nommée «lectures» ou « reads » (526). Certes les positions et l'orientation des lectures sont inconnues, mais théoriquement il est possible d'utiliser les répétitions et donc le chevauchement entre les fragments pour assembler le génome (527). Sinon c'est grâce à un génome de référence qu'on peut aligner les lectures et assembler alors une partie ou la totalité du génome séquencé en fonction de la technologie utilisée. Cette dernière approche permet la détection des variants (variant calling) des

polymorphismes nucléotidiques (SNP), des insertions, des délétions, des inversions, des réarrangements et des variations du nombre de copies de toute taille. Diverse plates-formes de séquençage sont disponibles sur le marché, dont le choix dépend principalement du besoin clinique (528) (529) (530). Pour identifier un organisme inconnu ou pour caractériser une nouvelle bactérie, le séquençage à longues lectures, qui est proposé par la technologie PacBio (RS II par Pacific Biosciences de California, Inc., Menlo Park, CA, USA) (528) paraît le plus adapté. Mais si le but est de spécifier le microorganisme, de déterminer la pharmacorésistance ou de retracer la transmission, des séquenceurs produisant des lectures courtes peuvent être utilisés tel que l'Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, Californie, États-Unis) (528) (531).

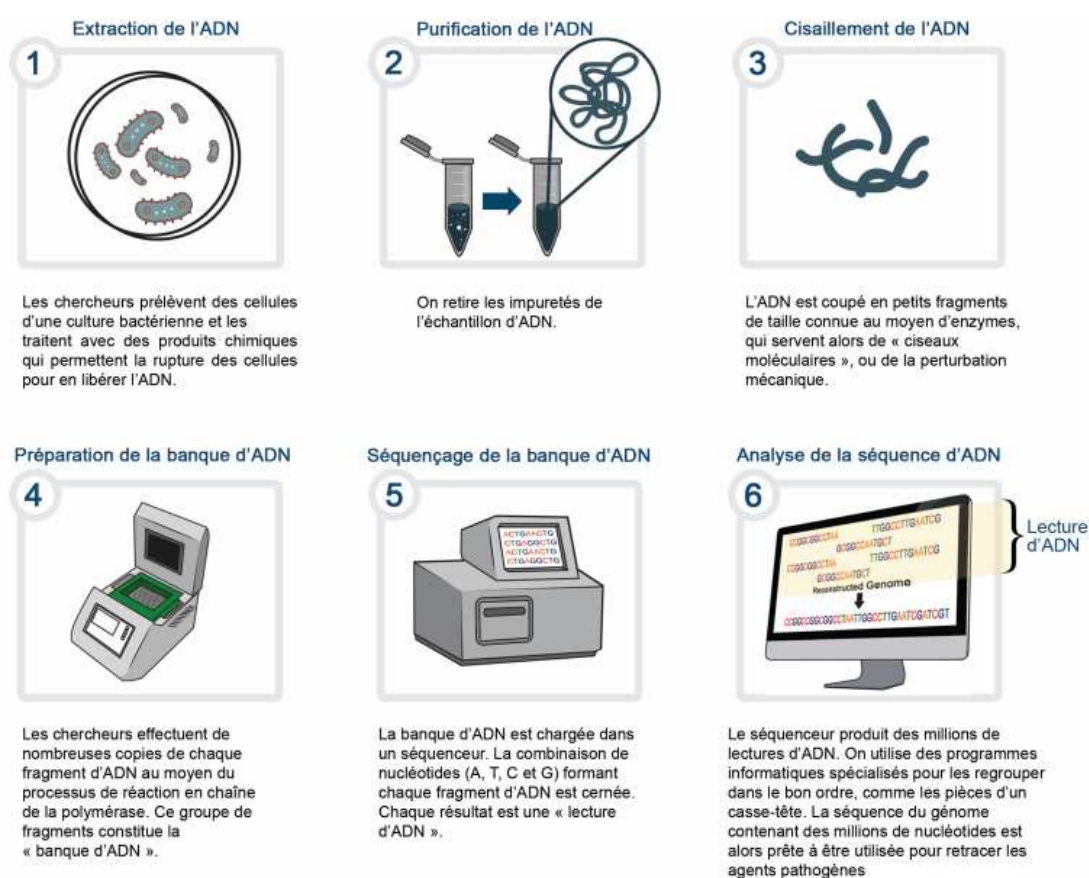


Figure 22: Fonctionnement du séquençage du génome complet (SGC) (532)

Le séquençage complet du génome est une technique idéale pour l'analyse de MTB, vu l'absence de transfert horizontal de gènes chez cette espèce et l'existence de génomes de référence complets et bien annotés (526). Une fois que les lectures ont été attribuées à l'identité « MTB », le processus s'enchaîne par la détection de variants (le calling) par un mapping sur séquence de référence (527). La technique est également utilisée pour délimiter les réseaux de transmission (533), pour exclure la contamination croisée en laboratoire, ou pour déterminer devant une récurrence de TB s'il s'agit d'une rechute ou d'une réinfection exogène. Dans les différentes situations le SGC a révélé une résolution plus élevée que les méthodes standards de typage (le spoligotypage, le MIRU-VNTR et IS6110-RFLP) (534) (535) (536) (537) (538).

L'utilité théorique de SGC pour le diagnostic de MTB est représentée essentiellement par l'obtention rapide de divers polymorphismes. Le SGC est le plus souvent appliqué sur de l'ADN enrichi obtenu à partir d'une culture bactérienne pure. Ceci demandera alors beaucoup de temps et le patient sera déjà diagnostiqué. Donc générer des informations directement à partir d'échantillons de patients et éviter le besoin de culture, sera transformateur. Plus récemment, des études ont examiné la faisabilité du séquençage de MTB directement sur l'échantillon clinique (531) (539). En séquençant huit échantillons d'expectorations à frottis positif, Doughty et ses collègues n'ont obtenu que 0,002-0,7X de profondeur de couverture pour MTB, avec 20-99% de génome humain plutôt que du génome de MTB (531). Dans une seconde étude, Brown et ses collègues ont appliqué une méthode d'enrichissement de la cible SureSelect (Agilent, États-Unis) pour capturer l'ADN de MTB avant le SGC. 20/24 échantillons à frottis positif ont atteint 90% de couverture du génome avec ≥ 20 fois la profondeur ; suffisant pour la prédiction des espèces et la sensibilité aux antibiotiques. Cependant, le protocole était lent (2-3 jours) et peut être prohibitif pour une utilisation dans les milieux à faible revenu (539). En somme, ces études fournissent une preuve de principe que SGC de MTB directement à partir des échantillons cliniques est faisable, mais le coût du protocole d'enrichissement (3500 MAD par échantillon), l'exigence d'expertise technique et d'équipement et la nécessité de bioinformatique en temps réel pour convertir les fichiers de séquence en rapports de laboratoire cliniquement significatifs, sont tous des défis actuels du SGC pour supplanter les tests phénotypiques et les tests d'amplification génique (526). Dans

ce cas, SGC peut offrir une opportunité différente, qui est une identification plus rapide de la résistance aux antibiotiques.

Tableau 17: Tableau comparatif des principales méthodes moléculaires de typage de *M.tuberculosis*.

Méthode	Avantage	Inconvénient
IS6110-RFLP	Méthode de référence Haute capacité discriminante Reproductible Stable (utilité dans les études épidémiologiques rétrospectives)	Moindre discrimination pour les souches contenant moins de 5 bandes d-IS6110 Nécessité d'une importante quantité d'ADN Manque de portabilité et comparaison inter-laboratoire difficile Lourde à mettre en œuvre et lente Nécessite un logiciel informatique sophistiqué et coûteux et un personnel expérimenté avec une expertise technique considérable
Spolgotypage	Test de première intention Simple Rapide (2 jours) Nécessité d'une petite quantité d'ADN Directement applicable sur les échantillons Application possible pour le typage de cultures non viables, de lames de frottis de Ziehl-Neelsen ou de coupes de tissus inclus en paraffine Rentable et utilisé pour le séquençage à haut débit Résultats facilement interprétés Utilisation possible sur les souches à faible nombre de bande IS6110 Spécifique de MTBC (pas de signal pour les MNT) Comparaison inter-laboratoire possible par le biais d'une base de données en ligne	Moins discriminant que RFLP Inefficace pour la discrimination des souches Beijing Les séquences manquent parfois et perturbent la phase de révélation Erreurs d'enregistrement du résultat à 43 chiffres sont possibles Les infections mixtes passent inaperçues
MIRU-VNTR	Simple à réaliser, peu exigeant en main d'œuvre, rapide et moins coûteux Stable et le taux d'évolution est légèrement plus lent que celui de IS6110-RFLP	12 locus et 15 locus MIRU VNTR a un pouvoir discriminatoire inférieur à IS6110-RFLP d'où la nécessité de le coupler à d'autres méthodes de génotypage

	Besoin seulement d'une petite quantité d'ADN Plus facile pour gérer un grand nombre de souches par comparaison de codes numériques Discrimination de MIRU-VNTR à 24 loci est comparable à la RFLP-IS6110 100% reproductible Spécifique de MTBC Discrimination des souches Beijing Traçage en temps réel des souches Système de codage numérique facilitant la portabilité et la comparaison des résultats Un outil web gratuit est disponible pour comparer les souches au niveau international	Analyse de l'ADN par l'électrophorèse est encombrant, long et moins reproductible que celle réalisée par séquenceur. Ce dernier est coûteux Nécessité d'un contrôle de qualité continu
Rep-PCR	Simple à réaliser, rapide et peu exigeante en main d'œuvre (kits et format automatisé) Pouvoir de discrimination des souches de M.avium et MTB est comparable à RFLP Rentable et utilisé pour le séquençage à haut débit Nécessité d'une petite quantité d'ADN ADN peut être extrait directement à partir des cultures Générer des résultats de typage des souches en temps réel L'analyse peut être effectuée avec un logiciel basé sur le Web Très discriminatoire pour les souches de Beijing Largement applicable à différentes souches de mycobactéries	Relativement moins reproductible (un bon pouvoir discriminant est obtenu par les kits) Soucis de contamination, artefacts, contrôles multiples, etc. Coûteuse
SGC	Pouvoir discriminant maximal Des informations génétiques précises peuvent être obtenues Reproductibilité parfaite	Coûteux Nécessite de l'ADN enrichi à partir des cultures pures Difficulté de standardisation des données Ne pas avoir de base de données facilement accessible et extensible Lent Exigence technique et en main d'œuvre qualifié

3.6. Autres techniques

En dehors des méthodes sus-décrites, de nombreuses autres méthodes basées sur des séquences répétitives ont été rapportées en littérature pour le typage de MTB. Cependant, elles sont moins fréquemment utilisées. L'une d'entre eux est la méthode répétitive PGRS-RFLP qui utilise les séquences répétitives polymorphes riches en GC (PGRS) comme marqueur génétique pour le typage de MTB. Cette méthode suit la même procédure de IS6110-RFLP, à l'exception de l'utilisation d'une enzyme de restriction différente et d'un plasmide recombinant pTBN12 pour la sonde. Généralement, cette méthode est utilisée pour optimiser le pouvoir discriminant de IS6110-RFLP dans les isolats à moins de 5 bandes (540). La méthode d'empreinte digitale pTBN12 présente des limitations similaires à celles du typage IS6110-RFLP. Toutefois, la PGRS-RFLP produit beaucoup plus de bandes avec des intensités différentes, ce qui complique sa lecture (541).

Avant le développement de SGC, des méthodes basées sur des séquences non répétitives sont également utilisées pour le génotypage de MTB. Parmi ces méthodes on peut citer l'analyse de l'ADN polymorphe amplifié au hasard (RAPD), qui est une méthode basée sur l'amplification par PCR de segments d'ADN en utilisant une amorce de petite taille (généralement 10 nucléotides) avec une séquence nucléotidique arbitraire. Bien que cette méthode soit rapide, peu coûteuse et hautement discriminatoire, elle souffre de plusieurs limitations. Parmi ces limitations, la mauvaise reproductibilité est la plus importante (445) (542).

L'électrophorèse en champ pulsé (PFGE), dans laquelle l'ensemble du génome bactérien est utilisé pour la digestion enzymatique, est un outil particulièrement puissant en épidémiologie pour la détermination de l'identité clonale des bactéries fournissant des informations pour comprendre et contrôler la propagation de la maladie (543). Cette technique s'est avérée utile et très discriminante pour le typage des MNT (544) (545). Cependant, l'application du PFGE pour étudier les maladies mycobactériennes a été limitée car l'isolement de l'ADN génomique de haute qualité à partir des mycobactéries s'est avéré problématique. De plus de l'absence d'un protocole standard pour l'analyse des profils de MTB. Des rapports publiés

antérieurement ont présenté des points de vue contradictoires sur la capacité du PFGE lors du génotypage de MTB (546) (547).

Le polymorphisme de longueur de fragments amplifiés (AFLP) peut être utilisé en complément du RFLP car AFLP peut différencier les clusters identifiés par RFLP (548) (549). La méthode AFLP radioactive conventionnelle a un potentiel discriminatoire inférieur au typage IS6110-RFLP, mais l'AFLP fluorescent amélioré (fAFLP) fournit une plus grande capacité discriminante et ces méthodes sont largement utilisées pour la différenciation des espèces d'isolats de MNT (550) (551).

En 1998, Maiden et al (552) ont proposé un schéma de typage pour les micro-organismes pathogènes appelé MLST (multilocus sequence typing) qui permet la portabilité électronique des données de séquences de nucléotides pour la caractérisation des micro-organismes. La méthode MLST s'est révélée utile dans les études de MTB lorsque sept locus de gènes de haute discrimination (*rec X*, *rps L*, *rmlC*, *rpmG1*, *mprA*, *gcvH*, *ideR*) ont été choisis (553). Étant donné le faible degré de polymorphisme de séquence dans le MTBC, la MLST standard est peu informative et inefficace. Cependant, la technique s'est avérée utile pour détecter les MNT en laboratoire (554).

Les SNP sont des marqueurs idéaux pour le génotypage de MTBC, car ils sont robuste (stables) et ne montrent pratiquement pas d'homoplasie (555) (556). Plusieurs études ont rapporté l'utilisation de SNP pour la classification phylogénétique de MTBC (557) (558) (559). Cependant, les méthodes disponibles pour la détection de SNP (la PCR allèle-spécifique, la RT-PCR, le séquençage de Sanger, le séquençage SNaPshot, iPlex Gold (SEQUENOM Inc.) et MLPA (560)), nécessitent encore beaucoup de main-d'œuvre et nécessitent une infrastructure de laboratoire complexe, ce qui ne convient pas à l'utilisation dans des environnements à ressources limitées (561).

Le choix de la technique la plus appropriée en fonction du degré d'urgence du résultat attendu, le degré de discrimination nécessaire, le coût économique, des conditions existantes du laboratoire (techniques disponibles et expérience du laboratoire) et des caractéristiques spécifiques de la région géographique est important (450)

L'intérêt des techniques de typage moléculaire ne s'est limité pas seulement à la gestion clinique des patients par l'identification du type de souches du bacille de la TB, mais son

champ d'utilisation s'est étendu aujourd'hui à la compréhension des aspects épidémiologiques de la maladie. Plusieurs applications du typage moléculaire sont disponibles dans le domaine de l'épidémiologie dite « moléculaire ». Le premier rôle important des études de génotypage est le retraçage des éclosions par l'identification des cas groupés alors qu'ils apparaissent sporadiques d'après l'enquête d'entourage (ou l'inverse). L'étude génotypique permet de confirmer une épidémie communautaire suspectée à l'issu des données de l'épidémiologie classique, de tracer les infections nosocomiales, de distinguer en cas d'une TB récidivante entre réinfection exogène et rechute, de mettre en évidence une infection mixte (plusieurs souches distinctes de bacilles tuberculeux) chez un même patient au cours d'une TB, d'étudier la dynamique de la transmission des souches notamment résistante dans une population, de caractériser les populations les plus à risque et d'identifier les cas de TB faussement positifs dus à des contaminations croisées liées à la fibroscopie ou à la manipulation au laboratoire (433) (454).

Le champ d'application très vaste des techniques de typage moléculaire dans les études épidémiologiques, fait de ces techniques des compléments indispensables à la menée des enquêtes épidémiologiques classiques. Ceci-ci contribuera alors à faire évoluer les stratégies de LAT.

B. Apport dans l'étude de la résistance aux anti-bacillaires

La TB multi résistante (TB-MR) est une menace mondiale importante. La détection précise et rapide des souches pharmaco-résistantes de TB est essentielle pour l'initiation précoce du traitement et pour limiter la transmission de la maladie. Ceci fait alors un objectif fondamental des programmes de lutte contre la TB-MR.

Pour répondre à l'objectif suscité, des progrès récents dans les outils diagnostiques basés sur la biologie moléculaire ont conduit à l'élaboration des tests moléculaires. Ici, nous allons détailler les tests moléculaires les plus utilisés en routine pour la détection rapide de la résistance aux antituberculeux.

1. Test Xpert MTB/RIF (Cepheid)

La détection rapide de MTB chez les sujets infectés est essentielle pour la prise en charge de la maladie (562). Le GeneXpert MTB / RIF qui est un test automatisé à système fermé et à RT-PCR (282), cible une région de 81 pb du gène *rpoB* de l'ADN de MTB. Ce gène

renferme un très grand nombre de mutations responsables de la résistance à la RIF (563). Ce système a été approuvé par l'OMS comme une plate-forme de diagnostic moléculaire, largement utilisée pour la détection rapide de la TB et de la résistance à la RIF dans plusieurs pays (564) (565).

L'apport du test Xpert MTB / RIF dans la détection de la résistance à la RIF sur des échantillons pulmonaires, a été évalué par différentes études. Le tableau 17 regroupe 4 études récentes menées dans ce sens. La comparaison des résultats, montre que ce test est sensible (de 93.8 à 100%) et spécifique (de 97.8 à 100%) pour la détection de la résistance à la RIF. Une métaanalyse publiée par « the cochrane library » incluant 27 études et impliquant environ 9500 personnes, retrouve presque les mêmes résultats que ceux figurés sur le tableau (sensibilité de 95% et spécificité de 98%) (566). Toutefois, une légère hétérogénéité des résultats peut être décelée. Elle est expliquée par la variabilité de l'incidence de la résistance à la TB entre les populations étudiées, par le « Gold standard » utilisé (MTBDR*plus*, la méthode phénotypique SIRE MGIT 960, la méthode phénotypique sur milieu solide de LJ, le séquençage du gène *rpoB*) et par la méthode de traitement des échantillons (la centrifugation des expectorations par exemple).

Tableau 18 : Performance du test GeneXpert MTB / RIF pour la détection de la résistance à la rifampicine dans les échantillons pulmonaires.

Référence de l'étude	Pays	Nombre de prélèvement	Test de référence	Sensibilité %	Spécificité %	VPP %	VPN %
Kawkitinarong et al. (567)	Thailand	355	Test de résistance phénotypique (MGIT) +/- séquençage du gène rpoB	93.8	100	100	99.5
Rice (568)	États-Unis (Comté de San Diego)	751	Test de résistance phénotypique +/- séquençage du gène rpoB	100	99,2	75	100
Huanh et al. (569)	Chine (Wuhan)	2910	Test de résistance phénotypique	96.71	98.25	90.18	99.45
Tadesse et al. (570)	Éthiopie	67	GenoType MTBDRplus	100	97.8	95.7	–

En outre, peu de recherches ont évalué l'apport du test Xpert MTB / RIF dans la détection de la résistance à la RIF sur des échantillons extra pulmonaires. Parmi ces études, on peut mentionner celle de Sharma et ses collègues (571), où l'équipe rapporte que le test GeneXpert MTB / RIF représente un pourcentage de concordance de 100% avec le test d'hybridation inverse sur bandelette. L'étude note que les taux de sensibilité et de spécificité du test de résistance génotypique utilisé dans ce travail sont de 92.7% et 99.3% respectivement. Une autre étude publiée par Li et ses collègues (572) trouve que Xpert MTB/RIF est une bonne alternative pour la détection rapide de la résistance à la RIF sur des échantillons extra pulmonaires (sensibilité de 91.7%, spécificité de 100.0%, VPP de 100.0% et VPN de 97.9%) et recommande alors l'extension de son utilisation dans la pratique clinique. Quant au rapport

de Saeed et ses collègues, le test Xpert MTB/RIF a été aussi sensible que l'antibiogramme pour le diagnostic de la TB et dans un plus court délai d'exécution (de près de 2 heures) (573). La sensibilité, la spécificité, la VPP et la VPN du test dans cette étude ont été quantifiés respectivement à 98.3%, 99.1%, 94.7% et 99.4%. Contrairement à ce qui a été mentionné, une étude réalisée à DAKAR (299) recommande avant tout traitement antituberculeux de confirmer les cas détectés résistants à la RIF par l' Xpert MTB/RIF par l'utilisation d'autres techniques moléculaires plus efficaces tel que le séquençage. L'étude se justifie devant cette recommandation par les résultats de l' Xpert MTB/RIF, qui montrent que seul 95,34% des échantillons cliniques analysés étaient sensibles à la RIF, devant 100% d'échantillon sensible par la méthode phénotypique SIRE MGIT 960. Pour les cas de discordance observés, la technique MTBDRplus a confirmé les résultats obtenus par la méthode phénotypique.

Des résultats de résistance à la RIF faussement positifs obtenus par le test MTB / RIF ont été décrits dans des rapports récents. Cayci et ses collègues suggèrent que ce phénomène est dû à la présence des infections mixtes par des mycobactéries du MTBC (574). Dans une autre étude, le test Xpert MTB/RIF a assigné incorrectement la résistance à la RIF chez 31% des cas et signale que les résultats faussement positifs sont plus susceptibles de se produire lorsque le test est utilisé sur des échantillons extra pulmonaires (575). Quant à la détection de la résistance sur des échantillons à faible charge bactérienne (coïnfection TB-VIH ou chez l'enfant), à frottis négatif et qui sont détectées en faible quantité "Very low" par l' Xpert MTB/RIF lors de l'étape diagnostic de la TB, une confirmation des résultats par un examen phénotypique basé sur la culture paraît incontournable (576). Contrairement aux résultats de ces études, les données de Blaich et Frei à partir d'une étude qui a porté sur 94 échantillons du MTBC (48 pulmonaires et 17 non pulmonaires) indiquent que le test Xpert a détecté avec précision la résistance à la RIF aussi bien dans les échantillons pulmonaires que dans les prélèvements non pulmonaires, malgré des niveaux d'ADN faibles ou très faibles, ainsi que sur des cultures liquides et solides (577). Ceci est en accord avec les résultats d'autres auteurs (578) (579).

Le Xpert® MTB / RIF continue d'être évalué, mais, comme déjà mentionné, il a ses limites. En ce sens, Cepheid a développé 2 nouveaux produits : GeneXpert® Omni, appareil portable avec moins de dépendance énergétique et Xpert® MTB / RIF Ultra, avec une sensibilité plus

élevée que Xpert® MTB / RIF, en particulier pour les individus dont les échantillons sont fréquemment pauci bacillaires (580). En pratique médicale, Xpert Ultra présentait une sensibilité supérieure pour la détection de la TB chez les patients infectés par le VIH, chez les enfants et pour le diagnostic des formes extra pulmonaires de la TB (notamment du LCR) et chez des participants atteints de TP à microscopie négative (581) (582).

Les recommandations actuelles de l'OMS pour l'utilisation de Xpert MTB / RIF s'appliquent également à l'utilisation d'Ultra comme test diagnostique initial pour tous les adultes et les enfants présentant des signes et des symptômes de TB et pour tester les échantillons extra pulmonaires sélectionnés (LCR, ganglions lymphatiques et spécimens de tissus) (583).

Certes, le GeneXpert est capable de détecter de façon rapide la résistance à la RIF dans les échantillons pulmonaires et extra pulmonaires, l'utilisation de Xpert MTB / RIF n'élimine pas le recours à la microscopie, la culture et l'antibiogramme, qui sont nécessaires pour suivre la progression du traitement et détecter la résistance aux agents antituberculeux autres que la RIF. Pour gérer l'utilisation de ce test lors de la détection de la résistance à la RIF, l'OMS a introduit quelques recommandations dans son guide de « MISE EN ŒUVRE DES TECHNOLOGIES DIAGNOSTIQUES DE LA TUBERCULOSE » (584). Chez les patients sans risque de pharmaco-résistance mais qui sont initialement testés positifs pour la résistance à la RIF par Xpert MTB / RIF, un second test Xpert MTB / RIF doit être réalisé pour contrôler les erreurs pré analytiques et post analytiques et améliorer la confiance du clinicien dans le diagnostic. Finalement, dans les cas où des résultats discordants sont obtenus avec Xpert MTB / RIF et les tests phénotypiques ou les tests d'hybridation inverse sur bandelette, l'isolat de culture doit être référé à un laboratoire de référence pour le séquençage de l'ADN ; En attendant les résultats, il faut décider si le traitement de TB-MR doit se poursuivre.

2. Bandelette INNO-LiPA Rif. TB

Parmi les premiers tests d'hybridation LiPA commercialisés, on trouve l'InnoLiPA Rif® (Innogenetics, Belgique). Celui-ci permet une détection rapide et facile de MTBC et de la résistance à la RIF par la mise en évidence des quatre mutations les plus fréquentes du gène *rpoB* (D516V, H526Y, H526D et S531L) (585). Les mutations conférant une résistance à la RIF sont localisées dans une région de 81 paires de bases de la RRDR (« Rifampicin Resistance-Determining Region ») localisée au centre du gène *rpoB* entre les codons 507 et

533, l'approche moléculaire peut être limitée à cette zone. L'InnoLiPA Rif® repose sur l'hybridation inverse (reverse-blot) sur bandelette des fragments amplifiés de l'ADN de MTB. Les amplicons subissent ensuite une biotinylation suivie d'une hybridation avec dix sondes oligonucléotidiques : une est spécifique au MTBC, cinq sont des sondes sauvages et quatre sondes sont spécifiques aux amplicons portant les mutations génomiques. La révélation des hybrides ainsi formés se fait par colorimétrie. La présence d'une mutation est détectée par l'absence d'hybridation au niveau des sondes de type sauvage (rpoB WT1 à WT8 et katG-WT et inhAWT1 et 2), avec un éventuel signal d'hybridation positif au niveau des sondes mutantes.

Le fabricant préconise l'utilisation du test INNO-LiPA Rif TB sur des isolats de culture solide. Cependant, des tentatives de son application directement sur des échantillons d'expectoration ou sur des frottis positifs sont mentionnées dans la littérature (604)(586). INNO-LiPA a une sensibilité supérieure à 95 % et une spécificité de 100 % quand elle est appliquée sur les isolats de culture. Par contre, si la recherche de la résistance à la RIF est faite directement sur le prélèvement, la sensibilité est moindre (80 à 100 %) avec une spécificité de 100% (587). Bien que l'INNO-LiPA Rif. TB soit un test sensible et spécifique pour la détection de la résistance à la RIF dans les isolats du MTBC, la méthode reste coûteuse et ne permet pas de détecter les mutations impliquant plusieurs gènes, ce qui est le cas pour les mutations de la résistance à l'INH.

3. GenoType MTBDR plus et MTBDRsl (Hain Lifescience GmbH, Allemagne)

Les tests GenoType MTBDRplus et GenoType MTBDRsl sont deux versions du même test d'hybridation inverse sur bandelette commercialisé par son fabricant Hain Lifescience. Celui-ci propose les tests GenoType MTBDRplus et GenoType MTBDRsl pour la détection rapide de MTB et sa résistance associée à plusieurs médicaments antituberculeux.

GenoType MTBDRplusVER 1.0 suit la version originale de GenoType MTBDR, qui intègre la détection de la résistance à l'INH et au RIF. Il peut être utilisé à partir des échantillons pulmonaires à microscopie positive. Quant aux prélèvements pulmonaires non bacillifères (frottis à microscopie négative) et les isolats de culture ils peuvent être analysés par la nouvelle version du test GenoType®MTBDRplus 2.0. Le test détecte des mutations dans le

gène *rpoB* pour la résistance à la RIF, le gène *katG* pour la résistance à l'INH à haut niveau et le gène de la région régulatrice *inhA* pour la résistance à l'INH à bas niveau (588).

Comme le test INNO-LIPA Rif TB, GenoType MTBDRplus et MTBDRsl sont basés sur la technologie DNA-STRIP ou bande d'ADN, où une amplification par PCR est suivie d'une hybridation à des sondes d'ADN immobilisées sur une bande.

De nombreuses études ont évalué l'apport des tests GenoType MTBDRplus et GenoType MTBDRsl dans la détection de la résistance aux antituberculeux, dont quelques-unes figurent sur le tableau 18.

Tableau 19 : La performance des tests MTBDRplus et MTBDRsl pour la détection de la tuberculose pharmaco résistante directement sur des échantillons pulmonaires en comparaison avec l'étalon d'or.

Référence de l'étude	Pays	Genotype MTBDRplus (Se/Sp en %)			Genotype MTBDRsl (Se/Sp en %)		
		RIF	INH	Fluoroquinolones	AMK	KAN	EMB
Tomasicchio et al. (589)	Afrique du Sud	97.7 / 91.8	95.4 / 89	58.9 / 100	61.6 / 100	–	–
Simons et al. (590)	Pays-Bas	100 / 99	88 / 100	100 / 99	86 / 99	–	62 / 71
Lu et al. (591)	Chine	100/50	86.11/ 47.06	94.74/92.5 9	–	62.50/9 8.81	58.82/91.67
Liu et al. (592)	Chine	97.7/6 6.7	69.9/6 9.2	90.9/ 95.2	–	77.8/ 99.5	63.7/ 86.4
Javaid et al. (593)	Pakistan	90.2	88.8	72.9	81.8	–	56.6

Se: Sensibilité; Sp: Spécificité

La sensibilité du test GenoType MTBDRplus 1.0 pour la détection de la résistance à la RIF varie de 90,2% à 100% tandis que celle de détection de la résistance à l'INH est de 69,9 à 95.4%. La plus faible sensibilité de détection de la résistance à la Rif a été rapportée par une étude menée à Pakistan (593), les auteurs expliquent que ceci est dû aux souches de TB isolées dans cette cohorte d'étude. Cette dernière inclut des échantillons de patients

susceptibles d'être sous traitement (approprié ou inapproprié) ou non compliant. Dans de telles circonstances la possibilité d'accumulation de nouvelles mutations / délétions conférant une pharmaco-résistance est courante en raison de la pression sélective exercée par les antibiotiques.

Comme les mutations qui causent la résistance à l'INH sont localisées dans plusieurs gènes et régions, la sensibilité pour détecter la résistance à l'INH est le plus souvent faible par GenoType MTBDRplus (592). Ceci, fait pour ce dernier une limitation principale qu'il faut signaler. Les populations qui comprennent un nombre relativement élevé de résistance à l'INH dite « à bas niveau », expriment une faible sensibilité génotypique de détection de la résistance à l'INH par MTBDRplus (592). Alors que les études portant sur les isolats hautement résistants aux médicaments révèlent une bonne sensibilité de détection de la résistance à l'INH (594) (595). La sensibilité du GenoType MTBDRplus 1.0 dépend également de la concentration bacillaire mise en évidence par l'examen microscopique direct (596), ce qui sous-entend que le test n'est pas alors utile sur les échantillons d'expectoration avec une charge bacillaire inférieure et des prélèvements de TEP pauci bacillaire. Contrairement à l'étude de Dorman et al. , une étude récente affirme que le test MTBDRplus a une bonne sensibilité pour la détection de la résistance à la RIF et l'INH aussi bien dans les échantillons à microscopie positive que dans celles à microscopie négative (589). On outre, des études antérieures montrent que les sensibilités et les spécificités trouvées dans les échantillons de culture, sont supérieures à celles des frottis à microscopie positive (597) (598). Le Document d'orientation en matière de politiques de l'OMS sur « L'utilisation des tests d'hybridation inverse sur bandelettes pour la détection de la résistance à l'isoniazide et à la rifampicine », a été publié en 2016. Pour les personnes ayant un frottis d'expectoration positif ou un isolat de culture de MTBC provenant de sites pulmonaires et extrapulmonaires, GenoType MTBDRplus VER 1 and 2 peut être utilisé comme test initial au lieu de l'antibiogramme pour détecter la résistance à la rifampicine et à l'isoniazide. Ces recommandations n'éliminent pas le besoin d'un antibiogramme conventionnel basé sur la culture, qui sera nécessaire pour déterminer la résistance à d'autres agents antituberculeux et pour surveiller l'émergence d'une pharmacorésistance supplémentaire. Dans les populations

ayant une forte probabilité de résistance à l'isoniazide, un test GenoType MTBDRplus qui ne détecte pas la résistance à l'isoniazide doit être complété par un antibiogramme.

L'autre version, GenoType MTBDRsl (Hain Life Sciences, Allemagne), permet de détecter la résistance aux médicaments de deuxième ligne : Fluoroquinolones, amikacine (AMK), kanamycine (KAN), capréomycine (CAP) et aussi éthambutol (EMB), en recherchant les mutations les plus courantes dans les gènes *gyrA*, *rrs* et *emb13* (599).

Les études rapportées sur le tableau 17 montrent que la sensibilité du test GenoType MTBDRsl se situe entre 58,9% et 100% pour détecter la résistance aux Fluoroquinolones, 61.6-86% pour détecter la résistance à l'AMK, 62.5-77.8% pour détecter la résistance KAN, 50-81.8% pour détecter la CAP et 56.6-63,7% pour détecter la résistance à l'EMB. Généralement, le test GenoType MTBDRsl a une excellente sensibilité pour détecter la résistance aux Fluoroquinolones, sauf deux études qui rapportent de bas chiffres. Pour les Fluoroquinolones, les auteurs supposent que les échantillons inclus puissent porter des mutations dans le gène *gyrB* (600). Ces mutations ne sont pas détectées par le test de génotypage MTBDRsl 1.0, par manque de sondes contre *gyrB* (593). D'autres facteurs sont impliqués dans ces résultats, à savoir la petite taille de l'étude (601) et l'inclusion des frottis à microscopie négative pour lesquels MTBDRsl est connu d'avoir une médiocre performance (589). De la même manière que pour les Fluoroquinolones, la faible sensibilité de détection de la résistance de l'AMK chez Tomasicchio et al. peut être attribuée à l'inclusion des échantillons à microscopie négative dans l'étude (589). Sinon, dans les deux autres études le taux de détection de MTBDRsl pour la mutation AMK s'est avéré satisfaisant (593) (590). Quant aux faibles sensibilités mises en évidence pour la détection de la résistance à la KAN, elles sont dues à la prévalence des mutations en dehors de la région *rrs* (telles que *tlyA*, *eis* et *gidB*) (602), qui semble être plus prononcée pour la KAN par rapport aux autres antituberculeux injectables de deuxième ligne (AMK et CAP).

Pour la résistance à l'EMB, globalement de faibles taux de détection sont observés dans les isolats de toutes les études figurées au tableau 17. De la même manière que pour les Fluoroquinolones et la KAN, cette faible sensibilité peut être attribuée à des échantillons portant des mutations au niveau des positions de codons autres que le codon 306 d'*embB* et qui ne sont pas couvertes par les sondes du test. Une étude a rapporté que la mutation du

codon 306 (couverte par MTBDRsl) a été isolée dans des souches résistantes et sensibles à l'EMB (603). Ce fait implique que la mutation emb306 n'est pas un marqueur stable et unique pour détecter la résistance aux médicaments EMB. Par conséquent, la fiabilité du diagnostic basé sur le MTBDRsl pour la détection de la résistance à l'EMB nécessite une validation supplémentaire phénotypique, en particulier avant son utilisation dans un pays hautement endémique.

GenoType®MTBDRsl appartient à une catégorie de tests génétiques moléculaires appelés les tests d'hybridation inverse sur bandelette pour la détection de la résistance aux médicaments antituberculeux de deuxième intention (SL-LPA pour Molecular **L**ine-**P**robe Assay for the Detection of Resistance to Second **L**ine Anti-TB Drug.). Cette dernière a fait l'objet du document d'orientation en matière de politiques de l'OMS sur « L'utilisation des tests d'hybridation inverse sur bandelettes pour la détection de la résistance aux médicaments antituberculeux de deuxième intention » publié en 2016. Chez les patients atteints de TB résistante à la RIF ou de TB-MR confirmée, l'utilisation de SL-LPA comme test initial, au lieu de l'antibiogramme basé sur la culture phénotypique, est possible. Ceci permet de détecter directement sur les échantillons d'expectoration ou indirectement sur les isolats de culture la résistance aux Fluoroquinolones et aux médicaments injectables de seconde intention (606).

Le Genotype MTBDRplus 1.0 et GenoType MTBDRsl 1.0 sont spécifiques pour le diagnostic de la TB-MR et –UR, bien qu'il y ait toujours place à l'amélioration en ce qui concerne la sensibilité. GenoType MTBDRsl VER 2.0 est repensé sur la base du GenoType MTBDRsl VER 1.0 et accepte des mutations supplémentaires pour la détection moléculaire de la résistance aux Fluoroquinolones (gyrA et gyrB) et les antituberculeux injectables de deuxième ligne (rrs et la région promotrice du gène eis) dans le MTBC. Le test peut être effectué sur un isolat de culture ou directement sur l'échantillon, ce qui élimine les retards associés à la culture. La version 1.0 nécessite un échantillon pulmonaire à frottis positif, tandis que la version 2.0 peut utiliser un échantillon pulmonaire à frottis positif ou négatif. La deuxième version du test a montré sa supériorité sur la première version pour la détection des mutations impliquées dans la résistance aux Fluoroquinolones et aux antituberculeux injectables de 2ème ligne (AMK, KAN, CAP). Le test MTBDRsl confère une meilleure sensibilité pour la

détection de la résistance aux Fluoroquinolones (94,8 contre 89,6%) et à KAN (90,5 contre 59,5%), mais similaire pour la détection de la résistance à AMK (91,3%) et CAP (83,0%). La sensibilité et la spécificité ont été supérieures à celles de l'ancienne version pour la détection des souches pré-UR (83,3 vs 75,0% et 88,6 vs 67,1%, respectivement). Le MTBDRsl 2.0 offre une meilleure sensibilité pour la détection de la forme ultra résistante (XDR) (83,0 vs 49,1%) (605).

Tableau 20 : Caractéristiques des versions 1.0 et 2.0 du génotype MTBDRsl selon le fabricant (606)

	Version 1.0	Version 2.0
Détection	MTBC et la résistance aux Fluoroquinolones, antituberculeux injectables de 2ème ligne et l'éthambutol	MTBC et la résistance aux Fluoroquinolones, antituberculeux injectables de 2ème ligne
Les échantillons	Frottis à microscopie positive et cultures	Frottis à microscopie positive et à microscopie négative et cultures
Résistance aux Fluoroquinolones	Mutations dans la région déterminant la résistance du gène gyrA	Mutations dans la région déterminant la résistance du gène gyrA et gyrB
Résistance aux antituberculeux injectables de 2ème ligne	Mutations dans la région déterminant la résistance du gène rrs	Mutations dans la région déterminant la résistance du gène rrs et du promoteur de gène eis
Résistance à l'éthambutol	Mutations du gène embB	Non inclus

4. Séquençage du génome

Le séquençage du génome entier est une approche de haute valeur dans la recherche moléculaire. Elle est de plus en plus répandue pour la détection de la résistance aux antituberculeux de première et de deuxième intention, ce qui permettra un traitement personnalisé et optimisé des patients.

Pour la détection de la résistance à la RIF la sensibilité du test est estimée à 98% avec une spécificité équivalente, quant à l'INH la sensibilité et la spécificité du test sont de 97 % et 93% respectivement (607). Pour les autres médicaments de première intention, les sensibilités et les spécificités varient significativement. C'est probablement en raison d'un manque de données sur les mécanismes moléculaires et les gènes impliqués dans le développement de la résistance à la SM, EMB et PZA, ainsi que de l'absence de standardisation des méthodes et des concentrations des médicaments utilisées dans les tests phénotypiques pour la PZA (607). Une meilleure performance du SGC pour les Fluoroquinolones par rapport aux aminoglycosides et aux peptides cycliques (médicaments injectables) pourrait s'expliquer par la bonne compréhension des mécanismes et du petit nombre de gènes associés à la résistance aux Fluoroquinolones (*gyrA* et *gyrB*) par rapport aux drogues injectables (*rrs*, *eis*, *gidB* et *tlyA*) (607).

Cependant, l'utilisation du séquençage d'ADN pour la détection précise des mutations nécessite beaucoup de temps, beaucoup de travail, un haut niveau d'expertise du personnel ainsi qu'un équipement coûteux. Grâce à l'utilisation d'automates de séquençage, il est devenu possible d'analyser des grandes régions d'ADN dans la présence toujours de la contrainte financière (le coût élevé du matériel) (240).

Les tests phénotypiques restent l'approche de laboratoire la plus fiable pour déterminer la résistance et la sensibilité aux antibacillaires, ses avantages étant la présence des réseaux de contrôle de la qualité et la bonne corrélation clinique (626). Certes, les méthodes génotypiques sont capables de détecter facilement et rapidement la résistance, mais l'exactitude des résultats et la corrélation avec le traitement et les résultats cliniques restent limités, car il a été démontré que seules certaines mutations confèrent de façon constante et fiable un haut niveau de résistance (627). La divergence observée dans certains antibiotiques et isolats, entre les approches génotypique et phénotypique des tests de sensibilité (628) (629), doit être résolue par davantage de recherches sur les mécanismes de résistance.

En 2018, l'OMS s'attend à évaluer la performance des tests génotypiques de sensibilité aux médicaments y compris le séquençage du génome par rapport aux normes de référence phénotypiques actuelles et à développer une liste des mutations prioritaires (mutations dites de confiance élevée) pour faciliter le développement des tests. L'OMS examinera également

la possibilité de l'utilisation du séquençage moléculaire comme examen de référence pour les tests de sensibilité aux anti-tuberculeux, au moins pour certains médicaments clés tels que la rifampicine et le pyrazinamide (626)

Dans les conditions actuelles, il est important de combiner les méthodes phénotypiques et génotypiques pour déterminer les profils de résistance aux antibacillaires et traiter les patients atteints de TB-MR et -UR.

CONCLUSION

Le management de la tuberculose est lié en premier lieu à la disponibilité des méthodes de diagnostic précis. Les tests phénotypiques dont l'examen microscopique, la culture et l'antibiogramme ont été les premiers à être disponibles et restent toujours d'actualité pour le diagnostic de la tuberculose et l'étude de la résistance. Le manque de sensibilité (l'examen microscopique direct) et le long délai de rendu des résultats (la culture et l'antibiogramme) font de la mise en place d'un outil performant et rapide une urgence notamment en présence d'une recrudescence de la pharmacorésistance.

Pour répondre à ce besoin des efforts soutenus de l'OMS et de nombreuses organisations internationales ont été investis dans le développement et la mise en place des techniques de la biologie moléculaire. Ces techniques sont très sensibles et permettent un diagnostic rapide.

Les tests d'amplification génique offrent cet avantage car ils s'affranchissent du temps de multiplication des mycobactéries du complexe tuberculis. Aujourd'hui, l'automatisation et la PCR en temps réel ont supplanté les techniques in-house, mais ces tests doivent toujours être complétés par une culture et un antibiogramme par méthode phénotypique. Le test d'Xpert MTB/RIF est le seul outil dans cette catégorie recommandé par l'OMS aussi bien pour le diagnostic rapide de la tuberculose que pour la détection de la résistance à la rifampicine.

Les techniques d'hybridation moléculaires après (ou sans) amplification sont une autre alternative rapide pour l'identification des mycobactéries obtenus en culture. Elles remplacent avantageusement l'étude des caractères culturels et biochimiques et permettent de détecter avec une haute sensibilité les membres du MTBC ainsi que plusieurs espèces de MNT couramment rencontrées. Aujourd'hui le principal intérêt de ce type de techniques se présente par leur capacité à détecter la résistance aux antibacillaires. Genotype MTBDRplus et Genotype MTBDRsl constituent les deux tests d'hybridation inverse sur bandelette validés par l'OMS pour la détection de la résistance à la rifampicine et à l'isoniazide et de la résistance aux fluoroquinolones et aux médicaments antituberculeux injectables respectivement.

Le typage quant à lui permet l'identification du type de souche du bacille de la TB d'une manière précise et relativement rapide. En dehors de son apport dans la détection de la résistance aux antibacillaires, le typage moléculaire s'avère aujourd'hui un complément

indispensable à la menée des enquêtes épidémiologiques classiques. Le séquençage du génome est une approche de haute valeur dans la recherche moléculaire, son application contribuera certainement à faire évoluer les stratégies de LAT.

RESUMES

RESUME

-Titre : L'APPORT DES TECHNIQUES DE LA BIOLOGIE MOLECULAIRE EN MATIERE DU DIAGNOSTIC, D'EVALUATION DE LA RESISTANCE AUX ANTIBACILLAIRES ET D'ETUDE DES MARQUEURS EPIDEMIOLOGIQUES

-Auteur : OUSGUINE Asmae

-Rapporteur : Professeur ZOUHDI Mimoune

-Mots clés : Tuberculose – biologie moléculaire – diagnostic – Résistance -Marqueur épidémiologique

Avec plus de 10 millions de nouveaux cas de tuberculose survenus chaque année, la tuberculose continue d'être l'une des plus importantes menaces infectieuses. La coïnfection avec le VIH, l'émergence de formes de tuberculose multi-résistante, puis ultra-résistante et totalement résistante ne fait que compliquer encore plus la situation. Par conséquent, la prise en charge des patients devient beaucoup plus difficile et la nécessité d'un diagnostic sensible et rapide s'avère encore plus urgente.

Récemment, le développement des méthodes de biologie moléculaire, leur standardisation et leur automatisation a révolutionné le diagnostic de la tuberculose. L'application de ces tests pour le diagnostic de la tuberculose pulmonaire active est prometteuse. Toutefois leur sensibilité est limitée pour le diagnostic de la tuberculose à frottis négatif, extra pulmonaire, de l'enfant et de l'immunodéprimé. Les tests moléculaires doivent être alors appliqués en parallèle avec les méthodes conventionnelles pour le diagnostic de la tuberculose ou pour l'étude de la résistance aux antituberculeux.

Basé sur la littérature, le présent rapport fournit une enquête complète sur les derniers progrès réalisés dans le diagnostic bactériologique de la tuberculose. En outre, nous allons faire un tour d'horizon des différentes techniques génotypiques actuellement présentes pour le diagnostic de la tuberculose, détailler leur performance et discuter leur intégration pour l'évaluation de la résistance et l'étude des marqueurs épidémiologiques.

ABSTRACT

-Title: The contribution of molecular biology techniques in diagnosis, evaluation of antibacillary resistance and study of epidemiological markers

-Author : OUSGUINE Asmae

-Rapporteur : Professor ZOUHDI Mimoune

-Key words: Tuberculosis - molecular biology - diagnosis - Resistance - Epidemiological marker

With more than 10 million new TB cases occurring each year, TB continues to be one of the most important infectious threats. Co-infection with HIV, the emergence of multidrug-resistant (MDR), then ultra-resistant (XDR) and fully resistant (TDR) forms of TB only complicate the situation further. As a result, the care of patients becomes much more difficult and the need for a sensitive and rapid diagnosis is even more urgent.

Recently, the development of molecular biology methods, their standardization and their automation revolutionized the diagnosis of tuberculosis. The application of these tests for the diagnosis of active pulmonary tuberculosis is promising. However, their sensitivity is limited for the diagnosis of smear-negative, extra-pulmonary tuberculosis, childhood and immunocompromised tuberculosis. Then, molecular tests must be applied in parallel with conventional methods for the diagnosis of tuberculosis or for the study of resistance to antituberculosis.

Based on the literature, this report provides a comprehensive survey of the latest advances in the bacteriological diagnosis of tuberculosis. In addition, we will review the various genotypic techniques currently available for the diagnosis of tuberculosis, detail their performance and discuss their integration for the evaluation of resistance and the study of epidemiological markers.

ملخص

عنوان: مساهمة تقنيات البيولوجيا الجزيئية في تشخيص السل، تقييم المقاومة للأدوية المضادة لهذا المرض وفي دراسة المؤشرات الوبائية.

الكاتبة: أسماء أوسكين

المشرف: الأستاذ مامون زهدي

الكلمات الرئيسية: السل -البيولوجيا الجزيئية -التشخيص -المقاومة -المؤشر الوبائي

مع وجود أكثر من 10 مليون حالة جديدة من حالات السل سنوياً، لا يزال يشكل هذا المرض أحد أهم التهديدات المعدية. إن الترابط الوبائي بين السل وفيروس العوز المناعي البشري، وظهور مرض السل المقاوم للأدوية المتعددة، ثم أشكال السل الشديد المقاومة للأدوية والسل المقاوم تماماً للأدوية، تزيد من تعقيد الوضع. ونتيجة لذلك، تصبح رعاية المرضى أكثر صعوبة، والحاجة إلى تشخيص حساس وسريع أكثر إلحاحاً.

في الآونة الأخيرة، أحدث تطور أساليب البيولوجيا الجزيئية وتوحيدها ومكنتها ثورة في تشخيص داء السل. حيث يعد تطبيق هذه الاختبارات لتشخيص السل الرئوي النشط أمراً واعداً. ومع ذلك، فإن حساسيتها محدودة لتشخيص السل السلبي اللطاخة، السل خارج الرئوي، سل الأطفال وسل ذوي نقصان المناعة. استناداً لذلك يجب تطبيق الاختبارات الجزيئية بالتوازي مع الطرق التقليدية لتشخيص مرض السل أو لدراسة مقاومة السل للأدوية.

انطلاقاً من مجموعة من البحوث، يقدم هذا التقرير دراسة شاملة لأحدث التطورات في تشخيص الجرثومي لمرض السل. بالإضافة إلى ذلك، سنقوم بمراجعة مختلف الأساليب الجينية المتوفرة حالياً لتشخيص مرض السل، وتفصيل أدائها ومناقشة ادماجها لتقييم المقاومة ودراسة المؤشرات الوبائية.

BIBLIOGRAPHIE

1. *les moyens diagnostiques de la tuberculose*. **H. Jabri, et al.** 2016, revue de pneumologie clinique, pp. 320-325.
2. **World Health Organisation.** *Global tuberculosis report (GTR)*, 2016.
3. *Nouvelles méthodes de diagnostic de la tuberculose*. **L.Slim-Saidi, et al.** 2015, Revue Pneumologique Clinique .
4. **JAMES, H. KERR et TERRY, L. BARETT.** *MALADIES MYCOBACTERIENNES ATYPIQUES*. USA : MANUEL DE DERMATOLOGIE MILITAIRE, 1994. p. 401.
5. *The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis*. **N. Rastogi, E. Legrand & C. Sola.** May 2001, Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics), pp. 21-54.
6. *Taxonomie des mycobactéries*. **V.Vincent.** 25 juillet 1994, Revue française des laboratoires, pp. 27-31.
7. *Mycobacterial Taxonomy*. **T.M.Shinnick, R.C.Good.** November 1994, European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, pp. 884-901.
8. **J. P. Euzeby.** List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. *mycobacterium*. [En ligne] 24 avril 2017. <http://www.bacterio.net/mycobacterium.html>.
9. *Microbiological Features and Clinical Relevance of New Species of the Genus Mycobacterium*. **Enrico, Tortoli.** 2014, Clinical Microbiology Reviews, pp. 727-752.
10. *Les bacilles de la tuberculose bovine une évolution aux dépens de la transmissibilité chez l'homme*. **C.Guilhot, R.Brosch et.** 2015, Med Sci, pp. 123-126.
11. *Elevation of Mycobacterium tuberculosis subsp.caprae Aranaz et al. 1999 to species rank as Mycobacterium caprae comb. nov., sp. nov.* **Alicia Aranaz, Debby Cousins and al.** 2003, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, pp. 1785-1789.
12. *Novel Mycobacterium tuberculosis Complex Pathogen, M. mungi.* **al., Kathleen A. Alexander and.** 2010, emerging infectious diseases, pp. 1296–1299.
13. *Mycobacterium leprae and Mycobacterium lepraemurium infections in domestic and wild animals*. **M.Lovik, O.Rojas-Espinosa and.** 2001, the Scientific and Technical Review, pp. 219-251.
14. *Identification moléculaire des mycobactéries et détection de la résistance aux antibiotiques*. **V.Cattoir.** 2004, les annales de la biologi clinique , pp. 405-413.
15. *Les mycobactéries non tuberculeuses*. **C.Chouaid.** 2007, revue des maladies respiratoires, pp. 61-64.

16. *diagnostic et traitement des mycobactérioses atypiques d'expression respiratoire*. **C.Andréjak, F.-X. Lescure, and al.** 2011, revue des maladies respiratoires, pp. 1293-1309.
17. *Petite histoire illustrée de la tuberculose*. **G.Dutau.** 2005, Archives de pédiatrie 12, pp. S88-S95.
18. *La tuberculose en ancienne Egypte*. **B.Ziskind, B.Halioua.** 2007, Revue des Maladies Respiratoires, pp. 1277-83.
19. *a brief history of tuberculosis in Iran during the 19th and 20th centuries*. **M.Bahadori, M.H.Azizi et.** 2011, achives of Iranian medicine, p. 215.
20. *La tuberculose ou l'histoire d'une urgence mondiale*. **Blic, J.de.** 2005, Archives de pédiatrie, p. S73.
21. *HISTOIRE DE LA TUBERCULOSE ANIMALE :DONNNEES ECRITES ET TRACES ARCHEOLOGIQUES*. **J.Peters, Y.Lignereux et.** 1999, Bulletin du Centre d'études d'Histoire de la Médecine, pp. 21-34.
22. *The history of tuberculosis*. **M.Daniel, Thomas.** 2006, Respiratory Medicine ELSEVIER, pp. 1862-1870.
23. *La tuberculose, une histoire toujours d'actualité*. **Locht, Camille.** 2016, médecine/sciences, pp. 535-536.
24. *HISTOIRE DES EPIDEMIES AU MAROC :PROGRAMMES ET STRATEGIES DE CONTROLE*. **AOUAD, pr.Rajae EL.** RABAT: Actes de la session plénière solennelle, 2010. PANEL:VEILLE,INFORMATION ET RECHERCHE EN SANTE. pp. 55-60.
25. *Epidémiologie de la tuberculose. france, Groupe de travail du conseil supérieur d'hygiène publique de.* 2004, Médecine et maladies infectieuses , pp. 344-349.
26. *Ce que le génome de Mycobacterium tuberculosis nous a appris*. **C.Gutierrez.** 2008, Revue des Maladies Respiratoires, pp. 23-26.
27. *La tuberculose chez l'homme et chez l'animal : vue d'ensemble*. **P. A.Lobue, D. A.Enarson et C. O.Thoen.** 2010, The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, pp. 1075-1078.
28. **G.HUCHON.** *tuberculose*. paris : Editions ESTEM, 1994.
29. *Etat actuel de la classification des mycobactéries*. **Geurden, L.M.G.** 1964, Annales de la société belge médecine tropicale, pp. 459-466.
30. *Rate of Ribonucleic Acid Chain Growth in Mycobacterium tuberculosis H37Rv*. **T.Ramakrishnan, R.M.Harshey et.** 1977, journal of bacteriology, pp. 616-622.

31. **A.Decoster.** mycobactéries. *cours de bactériologie*. [En ligne] 03 mai 2017. <http://anne.decoester.free.fr>.
32. *Role of the Clinical Mycobacteriology Laboratory in Diagnosis and Management of Tuberculosis in Low-Prevalence Settings.* **C.Caroll, N. M.Pattrish and K.** 2011, journal of clinical microbiology, pp. 772-776.
33. *Efficacies of Selected Disinfectants against Mycobacterium tuberculosis.* **M.Best, S.A.Sattar et al.** 1990, Journal of Clinical Microbiology, pp. 2234-2239.
34. *PREMIERS ISOLEMENTS DE MYCOBACTÉRIES TUBERCULEUSES CHEZ L'HOMME ET L'ANIMAL AU TCHAD.* **C.Diguimbaye, E.Schelling et al.** 2004, Médecine tropicale, pp. 482-485.
35. **Madkour, M.Mounir.** *Tuberculosis*. Germany : Springer, 2003.
36. *Pyrazinamide Susceptibility and Amidase Activity of Tubercle Bacilli.* **K.Konno, F. M.Feldmann and W. McDermott.** 1966, American Review of Respiratory Disease, pp. 461–469.
37. **Groupe Azay Mycobactéries.** GBEA les mycobactéries. *campus de microbiologie médicale*. [En ligne] 04 mai 2017. <http://www.microbes-edu.org/professionnel/GBEA/MO005.htm>.
38. *The capsule of Mycobacterium tuberculosis and its implications for pathogenicity.* **M.Daffé, G.Etienne.** 1999, Tubercle and Lung Disease, pp. 153-169.
39. *Mycobacterium tuberculosis and the Macrophage: Maintaining a Balance.* **J.Pieters.** 2008, Cell host and microbes review, pp. 399-407.
40. *Toll-like receptor pathways in the immune responses to mycobacteria.* **V. Quesniaux, C. Fremond et al.** 2004, Microbes and Infection 6, pp. 946–959.
41. *Structure de l' enveloppe de Mycobacterium tuberculosis.* **M.Daffé.** 1996, Medecine des Maladies Infectieuses, pp. 891-897.
42. *Critical roles for lipomannan and lipoarabinomannan in cell wall integrity of mycobacteria and pathogenesis of tuberculosis.* **Fukuda T, Matsumura T and al.** 2013, mBio.
43. *Le lipoarabinomannane :structure et fonctions d'un glycolipide impliqué dans la pathogénie tuberculeuse.* **L.Kremer, G. S. Besra, and al.** 1999, médecine/science, pp. 842-850.

44. *Intact molecular characterization of cord factor (trehalose 6,6'-dimycolate) from nine species of mycobacteria by MALDI-TOF mass spectrometry.* **Y.Fujita, T.Naka and al.** 2005, Microbiology , pp. 3403-3416.
45. *Trehalose 6,6'-Dimycolate (Cord Factor) of Mycobacterium tuberculosis Induces Foreign-Body- and Hypersensitivity-Type Granulomas in Mice.* **H. YAMAGAMI, T. MATSUMOTO and al.** 2001, Infection and Immunity, pp. 810-815.
46. *Immunological Properties of Trehalose Dimycolate (Cord Factor) and Other Mycolic Acid-Containing Glycolipids-A review.* **R. Ryll, V. Kumazawa, and I. Vano.** 2001, Microbiology and Immunology, pp. 801-811.
47. *Production of phthiocerol dimycocerosates protects Mycobacterium tuberculosis from the cidal activity of reactive nitrogen intermediates produced by macrophages and modulates the early immune response to infection.* **Rousseau C, Winter N, and al.** 2004, Cellular Microbiology, pp. 277-287.
48. *Role of the pks15/1 Gene in the Biosynthesis of Phenolglycolipids in the Mycobacterium tuberculosis Complex.* **P. Constant, E. Perez, and al.** 2002, Journal of Biological Chemistry, pp. 38148–38158.
49. *A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response.* **Reed MB1, Domenech P, and al.** 2004, Nature, pp. 84-87.
50. *Biogenesis of the cell wall and other glycoconjugates of Mycobacterium tuberculosis.* **D. Kaur, M. E. Guerin and al.** 2009, Adv Appl Microbio, pp. 23-78.
51. *Sulfolipid-1 Biosynthesis Restricts Mycobacterium tuberculosis Growth in Human Macrophages.* **S. A. Gilmore, M. W. Schelle and al.** 2012, ACS Chemical Biology, p. 863–870.
52. *Prevention of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages by sulfatides of Mycobacterium tuberculosis.* **M. B. GOREN, P. D. HART and al.** 1976, Proc.Nat.Acad.Sci.USA, pp. 2510-2514.
53. *Inhibition of macrophage priming by sulfatide from Mycobacterium tuberculosis.* **M J Pabst, J M Gross and al.** 1988, The Journal of Immunology, pp. 634-640.
54. *Deciphering sulfoglycolipids of Mycobacterium.* **E. Layre, D. Cala-De Paepe et al.** 2011, Journal of Lipid Research Volume 52, pp. 1098-1110.
55. *Biosynthesis and translocation of unsulfated acyltrehaloses in Mycobacterium tuberculosis.* **Belardinelli JM, Larrouy-Maumus G and al.** 2014, The Journal of Biological chemistry, pp. 27952-27965.

56. *Mycobacterial glycolipids di-O-acylated trehalose and tri-O-acylated trehalose downregulate inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production in macrophages.* **P. Espinosa-Cueto, M. Escalera-Zamudio et al.** 2015, BMC immunology, pp. 1-6.
57. *Wax D, peptido-glycolipid of Mycobacterium tuberculosis: further purification and study of an adjuvant arthritis-inhibiting subfraction.* **P. Jollès, D. Migliore, and F. Bonhomme.** 1968, Immunology, pp. 159-163.
58. *Sur la structure chimique des cires D, peptidoglycolipides macromolkculaires des souches humaines de Mycobacterium tuberculosis .* **Judit MARKOVITS, Erna VZKAS et Edgar LEDERE.** 1971, European Journal of Biochemistry 18, pp. 287-291 .
59. *L'IMMUNITE DANS LA TUBERCULOSE.* **CHAPARAS, S. D.** 1982, Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé, pp. 827-844 .
60. *Enhanced control of Mycobacterium tuberculosis extrapulmonary dissemination in mice by an arabinomannan-protein conjugate vaccine.* **Prados-Rosales R, Carreño L et al.** 2017, PLoS pathogens 13.
61. *Suppression of lymphocyte responses by tuberculous plasma and mycobacterial arabinogalactan. Monocyte dependence and indomethacin reversibility.* **M E Kleinhenz, J J Ellner and al.** 1981, The journal of Clinical Investigation, pp. 153-162.
62. *Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in Mycobacterium smegmatis.* **Kilburn., K Takayama and J O.** 1989, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, pp. 1493-1499.
63. **L. J. Alderwick, J. Harrison, and al.** The Mycobacterial Cell Wall—Peptidoglycan and Arabinogalactan. *Tuberculosis.* 27 mars 2015, pp. 1-15.
64. *Scrutiny of Mycobacterium tuberculosis 19 kDa antigen proteoforms provides new insights in the lipoglycoprotein biogenesis paradigm.* **J.Parra, J. Marcoux et al.** 2017, Scientific Reports 7, p. 43682.
65. *The 19 kDa Mycobacterium tuberculosis Lipoprotein (LpqH) Induces Macrophage Apoptosis through Extrinsic and Intrinsic Pathways: A Role for the Mitochondrial Apoptosis-Inducing Factor.* **A.Sánchez, P. Espinosa, T. García, and R. Mancilla.** 2012, Clinical and Developmental Immunology, vol., p. 11.
66. *The M. tuberculosis antigen 85 complex and mycolyltransferase activity.* **Kremer L, Maughan WN, Wilson RA et al.** 2002, Letters in Applied Microbiology 34, pp. 233-237.
67. *The 38-kDa Protein of Mycobacterium tuberculosis: A Review.* **H.Wiker., M. Harboe et.** November 1992, The Journal of Infectious Diseases 166(4), pp. 874-884.

68. 45/47 kilodalton (APA) antigen capture and antibody detection assays for the diagnosis of tuberculosis. **Chanteau S, Rasolofo V et al.** 2000, The International Journal for Tuberculosis and Lung Disease, pp. 377-383.
69. **Service de bactériologie.** ressources en bactériologie. *FACULTÉ DE MÉDECINE Pierre et Marie Curie.* [En ligne] 11 Mai 2017. <http://www.chups.jussieu.fr/polys/bacterio/bacterio/POLY.Chp.12.html>.
70. **David, B. Pham et D. J.** *TEST DE DÉTECTION DE LA PRODUCTION D'INTERFÉRON γ POUR LE DIAGNOSTIC DES INFECTIONS TUBERCULEUSES.* Saint-Denis : HAS (Haute Autorité de santé) Service de communication, 2006.
71. *Drugs that Inhibit Mycolic Acid Biosynthesis in Mycobacterium tuberculosis.* **E.K. Schroeder, O. N. de Souza and al.** 2002, Current pharmaceutical biotechnology, pp. 197-225.
72. *Structural and functional features of enzymes of Mycobacterium tuberculosis peptidoglycan biosynthesis as targets for drug development.* **G. L. Moraes, G. C. Gomes,** 2015, Tuberculosis, pp. 95-111.
73. *Survival strategy of intracellular bacteria in macrophages.* **K.Tsuchiya, I.Kawamura and M.Mitsuyama.** 2009, Tanpakushitsu Kakusan Koso, pp. 996-1001 .
74. *Properties of the mycobacterial antigen complex a60 and its applications to the diagnosis and prognosis of tuberculosis.* **CG., Cocito.** 1991, chest 100, pp. 1687–1693.
75. *Evaluation of Serological Tests Using A60 Antigen for Diagnosis of Tuberculosis.* **H. E. Kochak, , S. SeyedAlinaghi, et al.** s.l. : Acta Medica Iranica, 2008, Acta Medica Iranica Vol. 48, No. 1, pp. 21-26.
76. *A Mycobacterium tuberculosis operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular mass culture filtrate protein (CFP-10).* **F.X. Berthet, P.B. Rasmussen et al.** 1998, Microbiology 144, pp. 3195–3203.
77. *A mycobacterial virulence gene cluster extending RD1 is required for cytolysis, bacterial spreading and ESAT-6 secretion.* **Gao, L. Y., Guo, S., McLaughlin, B., Morisaki, H., Engel, J. N., and Brown, E. J.** 2004, Molecular Microbiology 53, pp. 1677–1693.
78. **Genomic Data. TB Database.** [En ligne] 27 05 2017. <http://genome.tdbb.org/annotation/genome/tbdb/GenomesIndex.html>.
79. **Lew JM, Kapopoulou A, Jones LM, Cole ST.** *tuberculist. Mycobacterium tuberculosis H37Rv.* [En ligne] 27 05 2017. <http://tuberculist.epfl.ch/#updates>.
80. **Genome. NCBI.** [En ligne] 27 05 2017. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/166?>.

81. *Structure of a PE-PPE-EspG complex from Mycobacterium tuberculosis reveals molecular specificity of ESX protein secretion.* Ekiert DC, Cox JS. 2014, Proceedings of the National Academy of Sciences, pp. 14758–14763.
82. *Le génome des mycobactéries* : D.labie. mars 2003 , Médecine/Science n° 3, pp. 275-277.
83. Le Centre d'expertise collective de l'Inserm. *Approches moléculaires de la tuberculose*. Paris : Les Editions INSERM, 2004.
84. *Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence.* S. T. Cole, R. Brosch et al. 1998, Nature, pp. 537-544.
85. *Comparative genomics of the mycobacteria* . R. Brosch, S. V. Gordon et al. 2000, International Journal of Medical Microbiology, pp. 143-152.
86. *Genetic markers, genotyping methods & next generation sequencing in Mycobacterium tuberculosis.* Narayanan, S. Desikan and S. 6, s.l. : Indian J Med Res., 2015, Vol. 141. 761–774.
87. *Genomics,biology,and evolution of the Mycobacterium tuberculosis complex.* Brosch RG, Gordon SVet al. 2000, American Society for Microbiology Press, pp. 19-36.
88. *Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of Mycobacterium tuberculosis complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility.* Kremer K, van Soolingen D et al. 1999, Journal of Clinical Microbiology, pp. 2607-18.
89. *Integration and excision of the Mycobacterium tuberculosis prophage-like element,phiRv1.* Hatfull., L. A. Bibb & G. F. 2002, Molecular Microbiology, pp. 1515–1526.
90. *Distribution and function of prophage phiRv1 and phiRv2 among Mycobacterium tuberculosis complex.* Xiangyu Fanab, Abu Algasim Elgaili Abd Allaa & Jianping Xie. 2015, Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, pp. Pages 233-238.
91. C.Locht. Inserm. *Tuberculose*. [En ligne] 31 05 2017. <https://www.inserm.fr/thematiques/immunologie-inflammation-infectiologie-et-microbiologie/dossiers-d-information/tuberculose>.
92. Jürg Barben, Christoph Berger , Thomas Bodmer ,Jean-Marie Egger , Giorgio Merlani , Peter Helbling , Jean-Paul Janssens , David Nadal , Laurent Nicod , Alexander Turk ,Jean-Pierre Zellweger, Stefan Zimmerli, Branka Vukmirovic. *Le manuel de la tuberculose*. Berne : Ligue pulmonaire suisse, 2012.

93. *Ecologie des mycobacteries et mode de contamination humaine*. LEVY-FREBAULT, V. VINCENT. 1991, Médecine et Maladies Infectieuses, pp. 16-25 .
94. Direction de l'épidémiologie et de lutte contre les maladies. *Guide de la Lutte Antituberculeuse*. Rabat : Ministère de la Santé ROYAUME DU MAROC, Avril 2011.
95. *The transmission of tuberculosis in confined spaces:an analytical review of alternative epidemiological models*. C. B. Beggs, C. J. Noakes, P. A. Sleigh, L. A. Fletcher, K. Siddiqi. 2003, The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, pp. 1015–1026.
96. Mitscherlich E, Marth E. *Microbiol survival in the environment : Mycobacterium tuberculosis*. Berlin : Springer, 1984.
97. *Laboratory-acquired mycobacterial infection*. H.E, Müller. 1988, Lancet, p. 331.
98. *Mycobacterium tuberculosis at autopsy—exposure and protection: an old adversary revisited*. R J Flavin, N Gibbons, and D S O'Briain. 2007, Journal of Clinical Pathology, pp. 487–491.
99. *Transmission of Mycobacterium tuberculosis by a fiberoptic bronchoscope. Identification by DNA fingerprinting*. Michele TM, Cronin WA, Graham NM, Dwyer DM, Pope DS, Harrington S, Chaisson RE, Bishai WR. 1997, JAMA, pp. 1093-5.
100. *A twenty-five year review of laboratory acquired human infections*. Miller C.D., Songer J.R., Sullivan J.F. Am Ind Hyg Assoc J , 1987, pp. 271-275.
101. RECOMMANDATIONS POUR LA PREVENTION DE L'INFECTION TUBERCULEUSE DANS LES INSTITUTIONS DE SOINS. *Ministère des Affaires Sociales, de la Santé Publique et de l'Environnement*. [En ligne] 31 05 2017. <http://www.md.ucl.ac.be/didac/hosp/cours/prehtub.htm>.
102. *DC-SIGN Is the Major Mycobacterium tuberculosis Receptor on Human Dendritic Cells*. Ludovic Tailleux, Olivier Schwartz, Jean-Louis Herrmann, Elisabeth Pivert, Mary Jackson, Ali Amara, Luc Legres, Donatus Dreher, Laurent P. Nicod, Jean Claude Gluckman, Philippe H. Lagrange, Brigitte Gicquel, and Olivier Neyrolles. 2003, J Exp Med, pp. 121–127.
103. *Ce que l'on sait de la réponse immunitaire antituberculeuse chez l'homme*. Neyrolles., O. France : Elsevier Masson, 2008. Le bacille tuberculeux et son hôte. pp. 27-30.
104. *Constrained intracellular survival of Mycobacterium tuberculosis in human dendritic cells*. Tailleux L, Neyrolles O, Honoré-Bouakline S, Perret E, Sanchez F, Abastado J-P, Lagrange PH, Gluckman JC, Rosenzwajg M, Herrmann JL. 2003, J Immunol, pp. 1939-48.

105. Lagrange PH, Wargnier A, Herrmann JL. Physiopathologie et immunité de l'infection tuberculeuse. [auteur du livre] Perronne C. Denis F. *Infections à Mycobactéries*. Paris : Elsevier-Coll Medi/Bio, 2004, pp. 19-46.
106. *Lack of acidification in Mycobacterium phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase*. Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Chakraborty P, Haddix PL, Collins HL, Fok AK, Allen RD, Gluck SL, Heuser J, Russell DG. 1994, Science , pp. 678-81.
107. *Mycobacterium-containing phagosomes are accessible to early endosomes and reflect a transitional state in normal phagosome biogenesis*. Sturgill-Koszycki S, Schaible UE, Russell DG. 1996, EMBO J, pp. 6960-8.
108. *Mycobacterium avium- and Mycobacterium tuberculosis-containing vacuoles are dynamic, fusion-competent vesicles that are accessible to glycosphingolipids from the host cell plasmalemma*. Russell DG, Dant J, Sturgill-Koszycki S. 1996, J Immunol , pp. 4764-73.
109. *Rôle des cellules dendritiques humaines dans la tuberculose : protecteur ou non protecteur ?* J. L. Herrmann, L. Tailleux , J. Nigou , B. Giquel , G. Puzo , P. H. Lagrange , O. Neyrolles. 2006, Revue des Maladies Respiratoires, pp. 6S21-6S28.
110. *Dendritic cells and the control of immunity*. . Banchereau J, Steinman RM. 1998, Nature, pp. 245-52.
111. *LE MACROPHAGE: CHEF D'ORCHESTRE DE L'IMMUNITE ANTI-TUBERCULEUSE*. ESSAFI, M. HAOUES ET M. 2012, Archs. Inst. Pasteur Tunis, pp. 1-4.
112. Expertise Collective Inserm. Tuberculose et autres pathologies. [auteur du livre] Expertise Collective Inserm. *Tuberculose Place de la vaccination dans la maîtrise de la maladie*. PARIS : Les Editions Inserm, 2004, pp. 1-24.
113. *Démarches diagnostique et thérapeutique devant un contage tuberculeux*. P.Fraisse. 2008, Traité de Médecine Akos de l'EMC, pp. 6-0730.
114. *A prospective study of the risk of tuberculosis among intravenous drug users with human immunodeficiency virus infection*. SELWYN PA, HARTEL D, LEWIS VA, SCHOENBAUM EE, VERMUND SH et coll. 1989, N Engl J Med, pp. 545-550.
115. *Miliary tuberculosis: new insights into an old disease*. Sharma SK, Mohan A, Sharma A, Mitra DK. 2005, Lancet Infect Dis, pp. 415–430.
116. *Latent tuberculosis: mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection*. Tufariello JM, Chan J, Flynn JL. 2003, Lancet Infect Dis, pp. 578-590.

117. *On the nature of Mycobacterium tuberculosis-latent bacilli*. Cardona PJ, Ruiz-Manzano J. 2004, The European Respiratory Journal, pp. 1044–1051.
118. *Risk factors for developing tuberculosis: a 12-year follow-up of contacts of tuberculosis cases*. Moran-Mendoza O, Marion SA, Elwood K, Patrick D, FitzGerald JM. 2010, Int J Tuberc Lung Dis, pp. 1112–9.
119. *Priorities for the treatment of latent tuberculosis infection in the United States*. CR, Horsburgh. 2004, N Engl J Med, pp. 2060-2067.
120. Direction de l'Epidémiologie et de Lutte Contre les Maladies. *Situation Epidémiologique de la Tuberculose au Maroc – Année 2015*. Rabat : Ministère de la Santé, 2015.
121. *Extrapulmonary tuberculosis: an overview*. M Ramirez-Lapausa, A Menendez-Saldana, A Noguerado-Asensio. 2015, Rev Esp Sanid Penit , pp. 3-11.
122. *CLINICAL PROFILE OF EXTRAPULMONARY TUBERCULOSIS CASES ADMITTED AND DIAGNOSED IN A TERTIARY GOVERNMENT HOSPITAL FROM JANUARY 2006 TO JUNE 2010*. Santos., Regie S. 2013, PIDSP Journal Vol 13 No.2 , pp. 77-84.
123. *Tuberculose, la porte vers la dissémination extra-pulmonaire*. Kevin Pethe, Franco D. Menozzi et Camille Locht. 2001, médecine/sciences, pp. 1220-1.
124. Bourkadi, J. E. Communications SMMAD 2015. *Société Marocaine des Maladies de l'Appareil Digestif*. [
125. *La tuberculose abdominale pseudo-tumorale*. Rachid El Barni, Mohamed Lahkim, et Abdessamad Achour. 2012, Pan African Medical Journal., pp. 1-16.
126. *Les atteintes extrapulmonaires de la tuberculose de l'enfant*. P. Le Roux, K. Quinque , A.S. Bonnel , B. Le Luyer. 2005, Archives de pédiatrie 12, pp. s 122-s 126.
127. *Identification of risk factors forextrapulmonary tuberculosis*. . Yang Z, Kong Y, Wilson F, et al. 2004, Clin Infect Dis, pp. 199-205.
128. *Association between Mycobacterium tuberculosis Beijing/W lineage strain infection and extrathoracic tuberculosis: Insights from epidemiologic and clinical characterization of the three principal genetic groups of M.tuberculosis clinical isolates*. Kong Y, Cave MD, Zhang L, et al. 2007, J Clin Microbiol, pp. 409-14.
129. *La tuberculose extrapulmonaire*. J. Mazza-Stalder, L. Nicoda et J.-P. Janssens. 2012, Revues des maladies respiratoires , pp. 566-578.

130. *Performance of purified antigens for*. Steingart, K.R., Dendukuri, N., Henry, M., Schiller, I., Nahid, P., Hopewell, P.C., Ramsay, A., Pai, M., and Laal, S. 2009, Clin. Vaccine Immunol, pp. 260-276.
131. *Correlation between the kinetics of Th1, Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis*. Hernandez-Pando R, Orozco H, Sampieri A et al. 1996, Immunology, pp. 26-33.
132. *Th1/Th2 profiles in tuberculosis based on proliferation and cytokine response of blood lymphocytes to mycobacterial antigens*. Surcel H-M, Troye-Blomberg M, Paulie S et al. 1994, Immunology, pp. 171-176.
133. *Les nouveaux tests immunologiques dans le diagnostic de la tuberculose (TB or not TB)*. P.H. Lagrange, N. Simonney, J.L. Herrmann. 2007, Revues des maladies respiratoires, pp. 453-472.
134. *Immunodiagnosis of tuberculosis: a dynamic view of biomarker discovery*. Kunnath-Velayudhan, S., and Gennaro, M.L. 2011, Clin. Microbiol. Rev. 24, pp. 792–805.
135. *Antibody-Mediated Immunity against Tuberculosis : Implications for Vaccine Development*. Casadevall, Jacqueline M. Achkar and Arturo. 2013, Cell Host & Microbe, pp. 250-262.
136. *Induction of nonspecific acquired resistance and delayed-type hypersensitivity, but not specific acquired resistance in mice, inoculated with killed mycobacterial vaccines*. Orme, I. M. 1988, Infect. Immun. 56, pp. 3310-3312.
137. *Protection against Mycobacterium tuberculosis infection by adoptive immunotherapy*. Orme, I. M., and F. M. Collins. 1983, J. Exp. Med. 158, pp. 74-83.
138. *Interferon-Gamma Responses to Mycobacterial Antigens Protect Against Subsequent HIV-associated Tuberculosis*. Timothy Lahey, Siddharth Sheth, Mecky Matee, Robert Arbeit, C. Robert Horsburgh, Lillian Mtei, Todd MacKenzie, Muhammad Bakari, Jenni M. Vuola, Kisali Pallangyo and C. Fordham von Reyn. 2011, J Infect Dis, pp. 1265-1272.
139. *L'intradermo-réaction à la tuberculine (IDR) ou test à la tuberculine*. 2003, Revue des Maladies Respiratoires, pp. 7S27-7S33.
140. *Mycobacterium tuberculosis enhances human immunodeficiency virus-1 replication in the lung*. Nakata K, Rom WN, Honda Y, Condos R, Kanegasaki S, Cao Y. 1997, Am J Respir Crit Care Med, pp. 996–1003.
141. PNLT. TUBERCULOSE ET VIH/SIDA. *Le Programme Nationale de Lutte contre la Tuberculose du Cameroun*. [En ligne] 06 06 2017. <http://www.pnlt.cm/index.php/le-pnlt/activites/26-pnlp/blogpnlt/bon-a-savoir/63-tuberculose-et-vih-sida>.

142. *Tuberculosis as an endemic and nosocomial infection among the elderly in nursing homes.* Stead, W. W., J. P. Lofgren, E. Warren, and C. Thomas. 1985, N. Engl. J. Med. 312, pp. 1483-1487.
143. L'OMS. *Rapport sur la lutte contre la tuberculose dans le monde.* s.l. : Organisation mondiale de la santé., 2015.
144. WHO. *Global Tuberculosis Report.* Geneva : World Health Organization., 2015.
145. PNLAT. *Lutte Antituberculeuse au Maroc : progrès, défis et perspectives.* Rabat : Ministère de la santé royaume du Maroc. , 2016.
146. *Prevalence, incidence and mortality associated with tuberculosis in HIV-infected patients initiating antiretroviral therapy in rural Uganda.* Moore D, Liechty C, Ekwaru P, et al. 2007, AIDS, pp. 713-9.
147. Palmero, Domingo J. Tuberculosis and HIV/AIDS. [auteur du livre] S.C.Leao , and V. Ritacco J.C. Palomino. *Tuberculosis 2007.From basic science to patient care.* s.l. : [Disponible sur : www.TuberculosisTextbook.com]., 2007, pp. 559-591.
148. *Tuberculosis and HIV in the Caribbean: approaches to diagnosis, treatment, and prophylaxis.* JW., Pape. 2004, Top HIV Med , pp. 144-9.
149. *Mycobacterium tuberculosis infection among HIV/AIDS patients in Thailand: clinical manifestations and outcomes.* Putong NM, Pitisuttithum P, Supanaranond W, et al. 2002, SouthEast Asian J Trop Med Public Health, pp. 346-51.
150. *HIV-TB co-infection: epidemiology, diagnosis & management.* Sharma SK, Mohan A, Kadiravan T. 2005, Indian J Med Res, pp. 550-67.
151. *New tuberculosis therapeutics: a growing pipeline.* . M.K., Spigelman. 2007, J Infect Dis.196 Suppl 1, pp. S28-34.
152. *Résistance primaire de Mycobacterium tuberculosis aux anti-tuberculeux à Kinshasa, République Démocratique.* M.J. Kabedi, M. Kashongwe, J.M. Kayembe, D. Mumba Ngoyi, P. Mampasi, P. Mbaya. 2007, Biologie clinique, pp. 275-276.
153. *Place des fluoroquinolones dans le traitement des tuberculoses à bacilles résistants.* A. Fillion, A. Pantel et A. Aubry. 2012, La Lettre du Pneumologue , pp. 12-16.
154. *La tuberculose multirésistante : extension, menace et solutions.* Zellweger, J.-P. 2010, Revue des maladies respiratoires, pp. 1025-1033.
155. *Halte à la tuberculose Maladies transmissibles. Stratégie DOTS :un cadre élargi pour lutter efficacement contre la tuberculose.* efficacement contre la tuberculose : Organisation mondiale de la santé, 2003.

156. *Facteurs de risque de développement de la tuberculose :un suivi des sujets-contact de cas de tuberculose pendant 12 années.* O. Morán-Mendoza, S. A. Marion, K. Elwood, D. Patrick, J. M. FitzGerald. 2010, INT J TUBERC LUNG DIS, pp. 1112–1119.
157. C.Lienhardt. LA TUBERCULOSE DANS LE MONDE AUJOURD'HUI : ENJEUX,RECHERCHE ET PERSPECTIVES. [auteur du livre] Dominique Kerouedan. *Santé internationale: Les enjeux de santé au Sud.* s.l. : Presses de Sciences Po (P.F.N.S.P.) « Hors collection », 2011, pp. 59-74.
158. *La lutte antituberculeuse dans le monde.* A. El Kamel , S. Joobeur , N. Skhiri ,S. Cheikh Mhamed , H. Mribah , N. Rouatbi. 2014, Rev Pneumol Clin, pp. 1-7.
159. Stop TB partnership. *Plan mondial Halte à la tuberculose 2011-2015: Transformer la lutte VERS L'ÉLIMINATION DE LA TUBERCULOSE TOUR D'HORIZON.* s.l. : Organisation mondiale de la Santé, 2010.
160. Un nouveau plan d'action jette les bases pour l'élimination de la tuberculose. *Témoignages* . [En ligne] Témoignages , 15 10 2010. [Citation : 27 04 2018.] <https://www.temoignages.re/sante-vie-pratique/un-nouveau-plan-d-action-jette-les-bases-pour-l-elimination-de-la-tuberculose,46131>.
161. ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ . *SOIXANTE-SEPTIÈME ASSEMBLÉE MONDIALE DE LA SANTÉ : RÉOLUTIONS ET DÉCISIONS* . GENÈVE : s.n., 2014.
162. OMS. *Mise en oeuvre de la stratégie pour mettre fin à la tuberculose : points essentiels* . Genève : Organisation mondiale de la santé, 2016.
163. WHO. *Global tuberculosis report* . Geneva : World Health Organization,, 2014.
164. Expertise Collective INSERM. Vaccins actuels et efficacité vaccinale. [auteur du livre] Expertise Collective INSERM. *Tuberculose : Place de la vaccination dans la maîtrise de la maladie.* Paris : Les Editions INSERM, 2004, pp. 133-148.
165. *Does the efficacy of BCG decline with time since vaccination?* Sterne JAC, Rodrigues LC, Guedes IN. 1998, Int J Tuberc Lung Dis, pp. 200-7.
166. *History of BCG vaccine.* . Luca S, Mihaescu T. 2013, Maedica, pp. 53-8.
167. *Mycobacterium tuberculosis infection and vaccine development.* Jiansong Tang, Wing-Cheong Yam , Zhiwei Chen. 2016, Tuberculosis 98, pp. 30-41.
168. WHO. Immunization, Vaccines and Biologicals: Tuberculosis vaccine development. WHO. [En ligne] 11 06 2017. <http://www.who.int/immunization/research/development/tuberculosis/en/>.

169. *Treatment of tuberculosis: present status and future prospects.* Onyebujoh P, Zumla A, Ribeiro I, et al. 2005, Bull World Health Organ, pp. 857-65.
170. Aínsa., P. A. d. Silva and J. A. Drugs and Drug Interactions. [auteur du livre] S. C. Leão and V. Ritacco J. C. Palomino. *Tuberculosis 2007 from Basic science to patient care.* s.l. : www.TuberculosisTextbook.com, 2007, pp. 593-633.
171. Ministère de la santé au royaume du Maroc et le fonds mondial. *Plan national d'accélération de la réduction de l'incidence de la tuberculose, 2013-2016.*
172. *Aspects cliniques et thérapeutiques de la tuberculose chez l'enfant et l'adulte.* C. Billy, C. Perronne. 2004, EMC-Maladies Infectieuses 1, pp. 81-98.
173. Billy., C. Infections à mycobactéries :tuberculose, mycobactéries atypiques. *Traité de Médecine Akos.* Paris : EMC (Elsevier Masson SAS), 2011, pp. 4-1090.
174. F.Varaine, M. L. Rich. *Tuberculose: Guide pratique à l'usage des médecins, infirmiers, techniciens de laboratoires et auxiliaires de santé.* Paris : Médecins sans frontières, 2014.
175. *Update on the diagnosis and treatment of pulmonary tuberculosis.* Lunaa., J.A. Caminero. 2016, Rev Clin Esp., pp. 76-84.
176. Smart fiche médecine. tuberculose. *Smart fiche médecine.* [En ligne] 12 06 2017. <http://smartfiches.fr/pneumologie/item-155-tuberculose/examens-paracliniques>.
177. *Complications des tuberculoses disséminées.* M. Underner, J. Perriot. 2013, Revue des maladies respiratoires., pp. 8-12.
178. médecine., SMARTfiches de. Miliaire tuberculeuse et tuberculose extra-pulmonaire. *Smart fiches de médecine.* [En ligne] 2017 06 13. <http://smartfiches.fr/pneumologie/item-155-tuberculose/miliaire-tuberculeuse-et-tuberculose-extra-pulmonaire>.
179. *Tuberculose ganglionnaire: aspects épidémiologiques, diagnostiques et thérapeutiques, à propos de 357 cas.* Ghizlane Hamzaoui, & Lamyae Amro, Hafsa Sajiai, Hind Serhane, Nezha Moumen, Abdellah Ennezari, et Abdelhaq Alaoui Yazidi. 2014, Pan African Medical Journal, pp. 157-160.
180. *Tuberculous Pleurisy: An Update.* D.Jeon. 2014, Tuberc Respir Dis (Seoul)., pp. 153-159.
181. *Tuberculose ostéo-articulaire vertébrale à propos de 10 cas.* J.Bourkadi., S.Hammi et. Lille : s.n., 2016, Revue des Maladies Respiratoires, p. A172.

182. *Tuberculose uro-génitale. Expérience de 10 ans.* K. EL KHADER, M. H. LRHORFI, J. EL FASSI, K. TAZI, M. HACHIMI, A. LAKRISSA. 2001, Progrès en urologie 11, pp. 6-67.
183. *Prise en charge diagnostique et thérapeutique de la tuberculose urogénitale.* A. Filliona, N. Koutlidis, A. Froissart , B. Fantin. 2014, La Revue de médecine interne 35, pp. 808–814.
184. *Forme pseudotumorale d'une tuberculose urinaire.* R. RABII, K. MOUFID, Abdenbi JOUAL, A. MAANI, S. BENNANI, M. EL MRINI. 2002, Progrès en urologie, pp. 1284-1287.
185. A. El midaoui, O. messouak, O. El Ouali ouarda et MF. belahsen. La tuberculose du système nerveux central :Étude clinique et neuroradiologique de 22 cas. *RMNSCI.NET*, Numéro 5. [En ligne] 09 Décembre 2012. <http://www.rmnscl.info/document.php?id=894..>
186. *Particularités de la tuberculose chez l'enfant.* Delacourt, D. avril 2011, Revue des Maladies Respiratoires, pp. 529-541.
187. *Particularités de la tuberculose pédiatrique.* france., Prévention et prise en charge de la tuberculose en. 2003, Revue des maladies respiratoires, pp. 7S52-7S55.
188. *Tuberculose de l'enfant : à propos de 285 cas.* S. Khatib, M. Bricha, S. Hammi, J. Benamor , J. Bourkadi. 2016, Revue des maladies respiratoires, p. A161.
189. *Test de Mantoux : quel seuil ? Pour quel but ?* I. Nayme, M. Soualhi, I. Idahmed,A. Jniene,R. Zahraoui et G. Iraqui. 2012, La Revue de Santé dela Méditerranée orientale, pp. 870-874.
190. PNLT. La tuberculose de l'enfant. *Le programme national de lutte contre la tuberculose au Cameroun.* [En ligne] 2017 06 18. <http://www.pnlt.cm/index.php/le-pnlt/le-mot-du-secretaire-permanent/26-pnlp/blogpnlt/bon-a-savoir/56-la-tuberculose-de-l-enfant>.
191. Expertise Collective Inserm. Tuberculose et autres pathologies. [auteur du livre] Expertise Collective Inserm. *Tuberculose: Place de la vaccination dans la maîtrise de la maladie.* Paris : Les éditions Inserm, 2004, pp. 13-14.
192. *Prise en charge de la tuberculose multirésistante.* F. Tritar, H. Daghfousa, S. Ben Saada, L. Slim-Saidi. 2015, Revue de Pneumologie clinique 71, pp. 130-139.
193. *Le profil radiologique des patients porteurs de tuberculose multirésistante.* S. Jridi, S. Hammi et J. Bourkadi. 2017, revue des maladies respiratoires, p. Page A219.

194. *Quand ne pas appliquer le traitement standard de la tuberculose maladie ?* B. Dautzenberg, M. Frechet-Jachym, J.-P. Maffre, E. Cardot, J.-P. Grignet. 2004, *Revue des Maladies Respiratoires*, pp. 75-97.
195. *Traitement de la tuberculose-maladie*. Groupe de travail du conseil supérieur d'hygiène publique, France. 2004, *Médecine et maladies infectieuses* 34 , pp. 375–381.
196. LEMAITRE, P. HINDLET et F. Antituberculeux. [auteur du livre] M. Vaubourdolle. *Le Moniteur internat*. Paris : Rueil-Malmaison Wolters Kluwer impr, août 2013, pp. 943-967.
197. *Les effets indésirables des antituberculeux ; prise en charge*. J. Perriot, É. Chambonnet et A. Eschalier. 2011, *Revue des Maladies Respiratoires*, pp. 542-555.
198. *Les nouveaux antituberculeux*. Perronne., D. Marigot-Outtandy et C. 2009, *Réanimation* 18, pp. 334-342.
199. HAS. Evaluations et recommandations. *Hute Autorité de Santé*. [En ligne] 22 06 2017. https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_2598638/fr/deltyba.
200. OMS. *RAPPORT SUR LA LUTTE CONTRE LA TUBERCULOSE DANS LE MONDE*. Genève : OMS, 2015.
201. *Les nouveaux médicaments antituberculeux ne sont pas là où l'on a besoin d'eux*. Nau., J-Y. 2015, *Rev Med Suisse*, pp. 2408-2409.
202. Nouette-Delorme., S. Hanryon et C. Le point sur l'utilisation de la bédaquiline et du délamanide, nouveaux médicaments contre la tuberculose. *Médecins Sans Frontières*. [En ligne] 22 06 2017. <http://www.msf.fr/presse/communiques/msf-fait-point-sur-utilisation-bedaquiline-et-delamanide-nouveaux-medicaments-con>.
203. *Delamanid in the treatment of multidrug-resistant tuberculosis*. R. Gupta, C. D. Wells, N. Hittel, J. Hafkin, L. J. Geiter. 2016, *INT J TUBERC LUNG DIS* 20(12), pp. S33–S37.
204. *In Vitro and In Vivo Activities of the Nitroimidazole TBA-354 against Mycobacterium tuberculosis*. A. M. Upton, S. Cho, T. J. Yang, Y. Kim, Y. Wang, Y. Lu, B. Wang, J. Xu, K. Mdluli, Z. Ma, S. G. Franzblaub. January 2015, *the ASM Journals*, pp. 136-144.
205. *La place de la chirurgie dans le traitement de la tuberculose*. Bakdach., H. 2006, *Revue des maladies respiratoires*, pp. 88-91.
206. *Corticothérapie adjuvante dans le traitement de la tuberculose pulmonaire*. Critchley JA, Orton LC, Pearson F. 2014, *Cochrane Database of Systematic Reviews*, Issue 11.

207. *Neuropathie toxique induite par l'isoniazide : pensez à la prévention*. O. Steichen, L. Martinez-Almoyna et T. De Broucker. 2006, *Revue des Maladies Respiratoires*, pp. 157-160.
208. M. Jost, B. Merz et al. *Tuberculose dans le cadre professionnel : Risques et prévention*. Lucerne : Suva pro, 2010.
209. *Executive Summary: Official American Thoracic Society/Centers for Disease Control and Prevention/Infectious Diseases Society of America Clinical Practice Guidelines: Treatment of Drug-Susceptible Tuberculosis*. P. Nahid, S. E. Dorman and al. 2016, *Clin Infect Dis*, pp. 853-867.
210. *Diagnostic clinique et bactériologique de la tuberculose*. Prévention et prise en charge de la tuberculose en France. 2003, *Revue des maladies respiratoires*, pp. 7S34-7S40.
211. Group, Members of the Guidelines. Standard treatment regimens. [auteur du livre] WHO/HTM/TB. *Treatment of tuberculosis: guidelines – 4th ed*. Geneva : World Health Organization, 2010, pp. 29-51.
212. A. El midaoui, O. messouak, O. El Ouali ouarda et MF. belahsen. La tuberculose du système nerveux central :Étude clinique et neuroradiologique de 22 cas. *RMNSCI.NET*. [En ligne] 06 07 2017. <http://www.rmnscli.info/document.php?id=894>.
213. *Recommandations de la Société de Pneumologie de Langue Française sur la prise en charge de la tuberculose en France*. Française, Société de Pneumologie de Langue. 2004, *Rev Mal Respir* 2004 ; 21 , pp. 3S5-3S11.
214. *Prise en charge de la tuberculose pulmonaire à bacilles multirésistants au Burkina-Faso : traitement court versus traitement long*. G. Badoum, K. Boncounou et al. 2017, *Revue des Maladies Respiratoires*, Volume 34, Supplement, p. A18.
215. Global TB Programme of the WHO. *WHO treatment guidelines for drug-resistant tuberculosis, 2016 update*. Geneva : World Health Organization 2016, 2016.
216. WHO. Un test de diagnostic rapide et un traitement plus court et moins cher donnent un nouvel espoir aux patients atteints de tuberculose multirésistante. *Organisation Mondiale de la Santé*. [En ligne] 08 07 2017. http://www.who.int/tb/Short_MDR_regimen_factsheet.pdf?ua=1.
217. Coalition antituberculeuse pour l'assistance technique(TBCTA). *Standards internationaux pour le traitement de la tuberculose (SITT)*. s.l. : TBCTA : Coalition antituberculeuse pour l'assistance technique, 2006.

218. Direction de l'Epidémiologie et de Lutte contre les Maladies. *MANUEL DE REFERENCE DU SYSTEME D'INFORMATION SANITAIRE DUPROGRAMME NATIONAL DE LUTTE ANTITUBERCULEUSE*. Rabat : Ministère de la santé, 2016.
219. the WHO Guidelines Development Group. *Guidelines on the management of latent tuberculosis infection*. Geneva : World Health Organization, 2015.
220. *L'éradication de la tuberculose : progrès et obstacles*. C.PERRONNE. 2016, Académie nationale de médecine.
221. *Dans quelles circonstances et comment traiter une infection tuberculeuse latente ?* A. Deschildre, C. Poirier, J. Cadranel. 2004, *Revue des Maladies Respiratoires*, pp. 25-34.
222. *Treatment of Latent tuberculosis infection*. HALE, C. A. 2016, *Microbiol Spectrum*, pp. 1-32.
223. *L'infection tuberculeuse latente : un aperçu*. Kiazyk S, Ball TB. 2017, *Relevé des maladies transmissibles au Canada*, pp. 68-72.
224. *Recommandations de la Société de Pneumologie de Langue Française sur la prise en charge de la tuberculose en France*. La Société de Pneumologie de Langue Française (SPLF). 2004, *Rev Mal Respir* , pp. 3S5-3S11.
225. *Deux vs. trois échantillons de crachats pour la détection microscopique de la tuberculose dans une population à prévalence élevée du VIH ?* J. Noeske, E. Dopico and al. 2009, *INT J TUBERC LUNG DIS*, pp. 842–847.
226. *Diagnostic clinique et bactériologique de la tuberculose*. Groupe de travail du conseil supérieur de l'hygiène publique de France. 2003, *Revue des Maladies Respiratoires*, pp. 7S34-7S40.
227. *Sputum smear microscopy in tuberculosis: Is it still relevant?* Desikan, P. March 2013, *Indian J Med Res* 137, pp. 442-444.
228. Goursaud, R. La tuberculose. *Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie*. [En ligne] 06 06 2012. <http://www.institutpasteur.nc/la-tuberculose/>.
229. PAUL, G. MYCOBACTERIUM. *cours de bactériologie médicale*. [En ligne] 28 02 2004. <http://www.microbes-edu.org/etudiant/mycobacterium1.htm>.
230. *Present position of microscopy and of culture in diagnostic mycobacteriology*. Urbanczik, R. 1985, *Zentralblatt Für Bakteriologie Mikrobiologie Hygiene Ser Med Microbiol Infect Dis Virol Parasitol* , pp. 81-87.
231. *Les nouveaux outils de diagnostic microbiologique de la tuberculose maladie*. C.Guillet-Carubaa, V.Martinez and al. 2014, *revue de médecine interne*, pp. 794-800.

232. the World Health Organization's Stop TB Department (WHO/STB). *Early detection of tuberculosis: An overview of approaches, guidelines and tools* . Geneva : World Health Organization, 2011.
233. *Role of the clinical mycobacteriology laboratory in diagnosis and management of tuberculosis in low-prevalence settings*. Parrish NM, Carroll KC. 2011, J Clin Microbiol, pp. 772–6.
234. *Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis: Recent Advances and Diagnostic Algorithms*. Ryu, Y. J. 2015, Tuberc Respir Dis (Seoul), pp. 64–71.
235. G. Leyral, J-N Joffin et J. Figarella. *Microbiologie technique : 2, Documentation technique* . Bordeaux : biologie technique, 1998.
236. *La résistance bactérienne la nouvelle guerre froide*. Weiss, K. mars 2002, Le Médecin du Québec, volume 37, numéro 3, pp. 41-49.
237. *Résistance aux antituberculeux*. N. Veziris, E. Cambau and al. 2005, Archives de pédiatrie 12, pp. S 102-S 109.
238. Lemahieu, A. Decoster et J-C. *RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES. cours de bactériologie*. [En ligne] 2008 09 21. <http://anne.decoستر.free.fr/atb/resab.htm>.
239. *Fiches conseils pour la prévention du risque infectieux – Infections associées aux soins*. LOZNIEWSKI A., RABAUD C. 2010, CCLIN Sud-Est , p. Juillet 2010.
240. *Mécanismes de la résistance aux médicaments chez Mycobacterium tuberculosis*. Y. Zhang, W. W. Yew. 2009, The union, pp. 1320–1330.
241. The WHO/IUATLD Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance . *ANTI-TUBERCULOSIS DRUG RESISTANCE IN THE WORLD Fourth Global Report* . Geneva : World Health Organization, 2008.
242. *La résistance de Mycobacterium tuberculosis aux antituberculeux : méthodes diagnostiques*. C. Loïez-Durocher, A. Vachée, N. Lemaitre. 2000, Annales de Biologie Clinique, pp. 291-7.
243. *souche de Mycobacterium tuberculosis résistante à cet antituberculeux*. Robert, N. Veziris et J. 2003, La Lettre de l'Infectiologue - Tome XVIII - n° 5 , pp. 186-191.
244. *The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of Mycobacterium tuberculosis*. Zhang Y, Heym B, Allen B, et al. 1992, Nature , pp. 591–593.
245. *InhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in Mycobacterium tuberculosis*. Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, et al. 1994, Science, pp. 227–230.

246. *Effects of overexpression of the alkyl hydroperoxide reductase AhpC on the virulence and isoniazid resistance of Mycobacterium tuberculosis.* Heym B, Stavropoulos E, Honore N, et al. 1997, *Infect Immun*, pp. 1395–1401.
247. *Rifampicin resistance mutations in the 81 bp RRDR of rpoB gene in Mycobacterium tuberculosis clinical isolates using Xpert MTB/RIF in Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan: a retrospective study.* I.Ullah, A.A. Shah and al. 2016, *BMC Infectious Diseases*, p. 413.
248. *Molecular genetic analysis of nucleotide polymorphisms associated with ethambutol resistance in human isolates of Mycobacterium tuberculosis.* Ramaswamy S V, Amin A G, Goksel S, et al. 2000, *Antimicrob Agents Chemother* , pp. 326–336.
249. *pncA mutations as a major mechanism of pyrazinamide resistance in Mycobacterium tuberculosis: spread of a monoresistant strain in Quebec, Canada.* Cheng S J, Thibert L, Sanchez T, et al. 2000, *Antimicrob Agents Chemother*, pp. 528–532.
250. OMS. Tuberculose (TB): Populations vulnérables et lutte antituberculeuse. *Organisation mondiale de la santé.* [En ligne] 2017 08 08. <http://www.who.int/tb/challenges/mdr/faqs/fr/>.
251. *Extensively Drug-Resistant Tuberculosis in California, 1993–2006.* Banerjee R, Allen J, Westenhouse J, Oh P, Elms W, Desmond E, et al. 2008, *Clin Infect Dis*, pp. 450-7.
252. *Mycobacteria : laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance.* Canetti G, Froman S, Grosset J, et al. 1963, *Bull WHO* , pp. 565-79.
253. *Mycobacterial growth indicator tube versus the proportion method on Löwenstein-Jensen medium for antibiotic susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis.* Cambau E, Truffot-Pernot C and al. 2000, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, pp. 938-42.
254. *Discordance across Phenotypic and Molecular Methods for Drug Susceptibility Testing of Drug-Resistant Mycobacterium tuberculosis Isolates in a Low TB Incidence Country.* Ahmad S, Mokaddas E and al. 2016, *Plos One*, pp. 1-16.
255. *Les nouveaux tests diagnostiques de la tuberculose maladie : de la théorie à la pratique dans les pays du Sud.* Bonnet, M. 2011, *Revue des Maladies Respiratoires*, pp. 1310-1321.
256. *Evaluation of Etest for susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis.* Joloba ML, Bajaksouzian S, Jacobs MR. 2000, *J Clin Microbiol*, pp. 3834-6.
257. *Rapid diagnosis of tuberculosis and multidrug resistance by the microscopic-observation drug-susceptibility assay.* Shah NS, Moodley P and al. 2011 , *Am J Respir Crit Care Med*, pp. 1427-33.

258. *Diagnostic Accuracy and Reproducibility of WHO-Endorsed Phenotypic Drug Susceptibility Testing Methods for First-Line and Second-Line Antituberculosis Drugs.* David J. Horne, Lancelot M. Pinto and al. 2013, *Journal of Clinical Microbiology*, pp. 393– 401.
259. *Nitrate Reductase Assay for Rapid Detection of Isoniazid, Rifampin, Ethambutol, and Streptomycin Resistance in Mycobacterium tuberculosis: a Systematic Review and Meta-Analysis.* A. Yilmaz Coban, A. Deveci and al. 2014, *J Clin Microbiol*, pp. 15–19.
260. *Current Methods in the Molecular Typing of Mycobacterium tuberculosis and Other Mycobacteria.* JAGIELSKI, Tomasz, VAN INGEN, Jakko, RASTOGI, Nalin, et al. s.l. : BioMed research international, 2014. 645802.
261. *Apports des marqueurs moléculaires dans l'analyse des mécanismes d'acquisition et dans le suivi des infections nosocomiales.* BINGEN, P. BIDEET et É. 1, s.l. : Médecine thérapeutique/Pédiatrie, 2002, Vol. 15. 46-61.
262. *Mycobacteriophages and phage typing.* Engel, H. W. 1, s.l. : Annales de Microbiologie, 1978, Vol. 129. 75–90.
263. *Phage-typing and drug-resistance patterns as tools in mycobacterial epidemiology.* H. Gruft, R. Johnson, R. Claflin, and A. Loder. 1, s.l. : The American Review of Respiratory Disease, 1984, Vol. 130. 96–97.
264. *World Health Organization studies in bacteriophage typing of mycobacteria: subdivision of the species Mycobacterium tuberculosis.* T. A. Rado, J. H. Bates, and H. W. B. Engel. 4, s.l. : The American Review of Respiratory Disease, 1975, Vol. 111. 459–468.
265. *Sputum smear microscopy in tuberculosis: Is it still relevant?* Desikan, Prabha. 2013, *Indian J Med Res*, pp. 442–444.
266. *Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis: Recent Advances and Diagnostic Algorithms.* Ryu, Yon Ju. 2015, *Tuberc Respir Dis (Seoul)*, pp. 64-71.
267. Membres du « Groupe du dictionnaire » de l'ANM. Dictionnaire médical de l'Académie de Médecine – version 2016-1. *L'académie nationale de médecine*. [En ligne] 06 10 2017. <http://dictionnaire.academie-medecine.fr/>
268. *Diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by PCR.* Promod K. Mehta, nkush Raj, Netrapal Singh, Gopal K. Khuller. 2012, *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, pp. 20–36.
269. *Biologie moléculaire et microbiologie clinique en 2007, Généralités - Partie 1.* J. Lamorila, M. Bogardc, N. Ameziane, J.-C. Deybach, P. Bouizegarène. 2007, *REVUE GÉNÉRALE ET ANALYSE PROSPECTIVE*, pp. 5-18.

270. *La PCR ou réaction en chaîne par polymérase, une révolution en biologie médicale.* Éric., Leroy-Terquem. 2008 Octobre 20, OptionBio., pp. 9-13.
271. “OpenLAB”: A 2-Hour PCR-Based Practical for High School Students. al., Caroline Bouakaze and. 2010, The International Union of Biochemistry and Molecular Biology, pp. . 296–302.
272. *La technique d'amplification génique (PCR) :principe et applications en microbiologie* . Agut, H. 1991, Immunoanal Biol Spec, pp. 19-23.
273. *PCR longue :progrès récents et application à l'étude des délétions de l'ADN mitochondrial.* Pascal Reynier, Yves Malthiery. 1996, médecine/sciences, pp. 1011-6.
274. RN'Bio. PCR (optimisation de la réaction PCR). *Ressources Numériques pour l'enseignement en licence de Biologie (RN'Bio).* [En ligne] 13 10 2017. https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=8&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjJ86_r8e3WAhUKtxQKHet0C1gQFghOMAc&url=https%3A%2F%2Ffnbio.upmc.fr%2Fbio-mol_pcr2&usg=AOvVaw2awoEbnpSlrGhid2ov_b2V.
275. *The PCR plateau phase – towards an understanding of its limitations.* P.Kanz. 2000, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression, pp. 23-27.
276. *Comparison of Roche Cobas Amplicor Mycobacterium tuberculosis Assay with In-House PCR and Culture for Detection of M. tuberculosis.* al., Bodo R. Eing et. 1998, J Clin Microbiol., pp. 2023–2029.
277. *Comparison of a DNA Based PCR Approach with Conventional Methods for the Detection of Mycobacterium tuberculosis in Morocco.* Zakham, F., Lahlou, O., Akrim, M., Bouklata, N., Jaouhari, S., Sadki, K., ... Elaouad, R. 2012, Mediterranean Journal of Hematolog, p. e2012049.
278. *Use of conventional PCR and smear microscopy to diagnose pulmonary tuberculosis in the Amazonian rainforest area.* Carniel, F., Dalla Costa, E.R., Lima-Bello, G., Martins, C., Scherer, L.C., & Rossetti, M.L. 2014, Brazilian Journal of Medical and Biological Research, pp. 1016-1020.
279. *Comparison of PCR with the Routine Procedure for Diagnosis of Tuberculosis in a Population with High Prevalences of Tuberculosis and Human Immunodeficiency Virus.* Kivihya-Ndugga, L., van Cleeff, M., Juma, E., Kimwomi, J., Githui, W., Oskam, L., ... Klatser, P. 2004, J Clin Microbiol., pp. 1012–1015.
280. *Comparison of Amplicor, in-house polymerase chain reaction, and conventional culture for the diagnosis of tuberculosis in children.* Gomez-Pastrana, D., R. Torronteras, P. Caro, M. L. Anguita, A. M. Lopez-Barrio, A. Andres, and J. Navarro. 2001, Clin. Infect. Dis, pp. 17-22.

281. *Rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by PCR: Impact of sample preparation and DNA extraction.* Honore-Bouakline S, Vincensini JP, Giacuzzo V, Lagrange PH, Herrmann JL. 4, s.l. : J Clin Microbiol, 2003. 2323 – 2329.
282. *Nucleic acid amplification tests for tuberculosis.* Prevention, Center for Disease Control and. 49, s.l. : MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2000. 593 – 594.
283. *Comparison of the AMPLICOR MYCOBACTERIUM Test with Microscopy and Culture for Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis.* Chun-Kai Huang, Tsi-Shu Huang, Hsi-Hsun Lin, Susan Shin-Jung Lee, and Yung-Ching Liu. 2010, 科學誌, pp. 117-124.
284. *Detection of Mycobacterium tuberculosis DNA in respiratory and nonrespiratory specimens by the AmpliCor® MTB PCR.* MICHOS, Athanasios G., DAIKOS, George L., TZANETOU, Konstantina, et al. 2, s.l. : Diagnostic microbiology and infectious disease, 2006, Vol. 54.
285. *Comparative study of AmpliCor Mycobacterium PCR and conventional methods for the diagnosis of pleuritis caused by mycobacterial infection.* Mitarai, S., H. Shishido, A. Kurashima, A. Tamura, and H. Nagai. 2000, Int. J. Tuberc. Lung Dis., pp. 871-876.
286. *Polymerase Chain Reaction Detection of Mycobacterium tuberculosis From Fine-Needle Aspirate for the Diagnosis of Cervical Tuberculous Lymphadenitis.* BAEK, Chung-Hwan, KIM, Sun-Il, KO, Young-Hyeh, et al. 1, s.l. : The Laryngoscope , 2000, Vol. 110. 30-34.
287. *Update: Nucleic acid amplification tests for tuberculosis.* Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2000, MMWR Morb Mortal Wkly Rep, pp. 593-4.
288. *Molecular Detection of Mycobacterium tuberculosis: Impact on Patient Care.* Kaul, Karen L. 2001, Clinical Chemistry, pp. 1553–1558.
289. *La PCR en temps réel : principe et application en infectiologie.* al., V. Mathys et. 2007, Antibiotiques, Elsevier Masson SAS, pp. 205-11.
290. *La PCR en temps réel: principes et applications .* Houde, Elyse Poitras et Alain. 2002, Reviews in Biology and Biotechnology , pp. 2-11.
291. *Quantification des acides nucléiques par PCR quantitative en temps réel.* J. Capeau, C. Tse et. 2003, Ann Biol Clin, pp. 279–93.
292. *Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance.* Boehme C.C., P. Nabeta, D. Hillemann, M.P. Nicol, S. Shenai, F. Krapp, J. Allen, R. Tahirli, R. Blakemore, R. Rustonjee, A. Milovic, M. Jones, S.M. O'Brien, D.H. Persing, S. Ruesch-Gerdes, E. Gotuzzo, C. Rodrigues, D. Alland, M.D. Perkins. 2010, N Engl J Med, pp. 1005-1015.

293. WHO/HTM/TB. Informations générales. *technique automatisée d'amplification de l'acide nucléique en temps réel pour la détection rapide et simultanée de la tuberculose et de la résistance à la rifampicine : système Xpert MTB/RIF*. GENEVE : Organisation mondiale de la Santé, 2011, p. 2.

294. *Le test Xpert® MTB/RIF pour les programmes nationaux contre la tuberculose dans les pays à faibles revenus : quand, où et comment?* A. Trébucq, D. A. Enarson, C. Y. Chiang, A. Van Deun, A. D. Harries, F. Boillot, A. Detjen, P. I. Fujiwara,. 2011, INT J TUBERC LUNG DIS, pp. 1567–1571.

295. Souleymane Mboup, Guy-Michel Gershy-Damet, Coumba Touré Kane, Laurent Bélec. *Biologie appliquée de l'infection à VIH et de ses comorbidités en Afrique*. Paris : John libbey Eurotext, 2015.

296. OMS. *Manuel de mise en œuvre du test Xpert MTB/RIF : guide technique et opérationnel : considérations*. Genève : OMS, 2014.

297. *Evaluation of Xpert MTB/RIF Versus AFB Smear and Culture to Identify Pulmonary Tuberculosis in Patients With Suspected Tuberculosis From Low and Higher Prevalence Settings*. Luetkemeyer, A. F., Firnhaber, C., Kendall, M. A., Wu, X., Mazurek, G. H., Benator, D. A., ... Alland, D. 2016, Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America, pp. 1081-1088.

298. *Comparison of TB-LAMP, GeneXpert MTB/RIF and culture for diagnosis of pulmonary tuberculosis in The Gambia*. Adama L. Bojang, Francis S. Mendy, Leopold D. Tientcheu, Jacob Otu, Martin Antonio, Beate Kampmann, Schadrac Agbla, Jayne S. Sutherland. 2016, Journal of Infection, pp. 332-337.

299. *The Xpert® MTB/RIF assay in routine diagnosis of pulmonary tuberculosis: A multicentre study in Lithuania*. Edita Pimkina, Rolandas Zablockis , Vladyslav Nikolayevskyy , Edvardas Danila, Edita Davidaviciene. 2015, Respiratory Medicine 109, pp. 1484-1489.

300. *Evaluation of GeneXpert MTB/RIF assay for direct diagnosis of pulmonary tuberculosis*. Hussein Sh. Moussa, Faten S. Bayoumi, Ahmed M. Ali. 2016, Saudi Med J Vol. 37, pp. 1076-1081.

301. *Evaluation of the GeneXpert MTB/RIF Assay for Rapid Diagnosis of Tuberculosis and Detection of Rifampin Resistance in Pulmonary and Extrapulmonary Specimens*. Arzu N. Zeka, Sezai Tasbakan, and Cengiz Cavusoglu. 2011, JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, pp. 4138-4141.

302. *Comparative Study of GeneXpert with ZN Stain and Culture in Samples of Suspected Pulmonary Tuberculosis*. Monika Agrawal, Ashish Bajaj, Vinay Bhatia, Sarjana Dutt. 2016, Journal of Clinical and Diagnostic Research, pp. DC09-DC12.

303. *Three Year Evaluation of Xpert MTB/RIF in a Low Prevalence Tuberculosis Setting: a Scottish Perspective.* Benjamin J. Parcell, Anna Jarchow-MacDonald, Amie-Louise Seagar, Ian Laurenson, Gordon J. Prescott , Michael Lockhart. 2017, Journal of Infection.
304. *Advances in tuberculosis diagnostics: the Xpert MTB/RIF assay and future prospects for a point-of-care test.* Lawn SD, Mwaba P, Bates M, Piatek A, Alexander H, Marais BJ, et al. 2013, Lancet, pp. 349–61.
305. *Rapid diagnosis of pleural tuberculosis by Xpert MTB/RIF assay using pleural biopsy and pleural fluid specimens.* Du, J., Huang, Z., Luo, Q., Xiong, G., Xu, X., Li, W., ... & Li, J. 2015, Journal of research in medical sciences, pp. 26-31.
306. *Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis: a systematic review and meta-analysis.* Claudia M. Denkinger, Samuel G. Schumacher, Catharina C. Boehme, Nandini Dendukuri, Madhukar Pai and Karen R. Steingart. 2014, Eur Respir J, pp. 435–446.
307. *Rapid and effective diagnosis of tuberculosis and rifampicin resistance with Xpert MTB/RIF assay: a meta-analysis.* Chang K, Lu W, Wang J, et al. 2012, J Infect. , pp. 580–88.
308. *Evaluation of molecular detection of extrapulmonary tuberculosis and resistance to rifampicin with GeneXpert® MTB/RIF.* C. Marouane, S. Smaoui, S. Kammoun, L. Slim, F. Messadi-Akrout. 2016, Médecine et maladies infectieuses, pp. 20–24.
309. *Performance du GeneXpert MTB/RIF® dans le diagnostic de la tuberculose extrapulmonaire à Dakar: 2010-2015.* Diallo, A. B., Kollo, A. I., Camara, M., Lo, S., Ossoga, G. W., Mbow, M., ... Diallo, A. G. 2016, The Pan African Medical Journal,, p. 129.
310. *Rapid Molecular Detection of Extrapulmonary Tuberculosis by the Automated GeneXpert MTB/RIF System.* Doris Hillemann, Sabine Ru'sch-Gerdes, Catharina Boehme, and Elvira Richter. 2011, JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, pp. 1202–1205.
311. *Comparison of Two Molecular Methods for Rapid Diagnosis of Extrapulmonary Tuberculosis.* Manuel Causse, Pilar Ruiz, Juan Bautista Gutierrez-Aroca and Manuel Casal. 2011, JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, pp. 3065–3067.
312. *Clinical validation of Xpert MTB/RIF for the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis.* Enrico Tortoli, Cristina Russo, Claudio Piersimoni, Ester Mazzola, Paola Dal Monte, Michela Pascarella, Emanuele Borroni, Alessandra Mondo, Federica Piana, Claudio Scarparo, Luana Coltella, Giulia Lombardi, Daniela M. Cirillo. 2012, European Respiratory Journal, pp. 442–447.

313. *Evaluation of the GeneXpert MTB/RIF assay for rapid diagnosis of tuberculosis and detection of rifampin resistance in pulmonary and extrapulmonary specimens.* Zeka, A. N., Tasbakan, S., & Cavusoglu, C. 2011, *Journal of clinical microbiology*, pp. 4138-4141.
314. *Evaluation of rapid GeneXpert MTB/RIF method using DNA tissue specimens of vertebral bones in patients with suspected spondylitis TB.* M. N. Massi, K.T. Biatko, I. Handayani, M. Y. Pratama, S. Septriani, G. M. Nurdin, M. B. Ali. 2017, *Journal of Orthopaedics*, pp. 189–191.
315. *Friedrich SO, Von Groote-Bidlingmaier F, Diacon AH. 2011, JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, pp. 4341–4342.*
316. *Diagnosis of lymph node tuberculosis using the GeneXpert MTB/RIF in Tunisia.* Ghariani, A., Jaouadi, T., Smaoui, S., Mehiri, E., Marouane, C., Kammoun, S., ... & Slim-Saidi, L. 2015, *International journal of mycobacteriology*, pp. 270-275.
317. *The Diagnostic Accuracy of Urine-Based Xpert MTB/RIF in HIV-Infected Hospitalized Patients Who Are Smear-Negative or Sputum Scarce.* Jonathan G. Peter, Grant Theron, Tapuwa E. Muchinga, Ureshnie Govender, Keertan Dheda. 2012, *PLoS ONE*, p. e39966.
318. *Defining the needs for next generation assays for tuberculosis.* Denkinger CM, Kik SV, Cirillo DM, Casenghi M, Shinnick T, Weyer K, et al. 2015, *J Infect Dis*, pp. S29-38.
319. *Assessment of the Xpert MTB/RIF assay for diagnosis of tuberculosis with gastric lavage aspirates in children in sub-Saharan Africa: a prospective descriptive study.* Bates M, O'Grady J, Maeurer M, et al. 2013, *Lancet infect Dis*, pp. 36-42.
320. *Accuracy of the Xpert MTB/RIF test for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in children admitted to hospital in Cape Town, South Africa: a descriptive study.* Nicol MP, Workman L, Isaacs W, et al. 2011, *Lancet Infect Dis*, pp. 819–24.
321. *Contribution of XpertW MTB/RIF to the diagnosis of pulmonary tuberculosis among TB-exposed children in The Gambia.* T. O. Togun, * U. Egere,* A. K. Sillah,* A. Ayorinde,* F. Mendy, L. Tientcheu, J. Otu, M. Antonio, J. Sutherland, P. C. Hill, B. Kampmann. 2015, *INT J TUBERC LUNG DIS*, pp. 1091-1097.
322. *Xpert® MTB/RIF assay for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in children.* Singh, M., Sethi, G. R., Mantan, M., Khanna, A., & Hanif, M. 2016, *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, pp. 839-843.
323. *Increased and expedited case detection by Xpert MTB/RIF assay in childhood tuberculosis: a prospective cohort study.* Rachow A, Clowes P, Saathoff E, et al. 2012, *Clin Infect Dis*, pp. 1388–96.

324. *Rapid molecular diagnosis of pulmonary tuberculosis in children using nasopharyngeal specimens.* Zar HJ, Workman L, Isaacs W, et al. 2012, *Clin Infect Dis*, pp. 1088–95.
325. *Clinical validation of Xpert MTB/RIF for the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis.* Tortoli E, Russo C, Piersimoni C, et al. 2012, *Eur Respir J*, pp. 442–47.
326. *Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in children: a systematic review and meta-analysis.* Anne K Detjen, Andrew R DiNardo, Jacinta Leyden, Karen R Steingart, Dick Menzies, Ian Schiller, Nandini Dendukuri, Anna M Mandalakas. 2015, *The Lancet*, pp. 451–461.
327. *WHO. Roadmap for rolling out Xpert MTB/RIF for rapid diagnosis of TB and MDR TB.* Geneva, Switzerland : OMS, 2010.
328. *Screening for HIV-associated tuberculosis and rifampicin resistance before antiretroviral therapy using the Xpert MTB/RIF assay: a prospective study.* Lawn, S. D., Brooks, S. V., Kranzer, K., Nicol, M. P., Whitelaw, A., Vogt, M., ... & Wood, R. 2011, *Plos Medicine*, p. e1001067.
329. *Evaluation of the Xpert MTB/RIF Assay for the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in a High HIV Prevalence Setting.* Theron, G., Peter, J., van Zyl-Smit, R., Mishra, H., Streicher, E., Murray, S., ... & Pai, M. 2011, *American journal of respiratory and critical care medicine*, pp. 132-140.
330. *Evaluation of the Xpert MTB/RIF assay at a tertiary care referral hospital in a setting where tuberculosis and HIV infection are highly endemic.* O’Grady J, Bates M, Chilukutu L, et al. 2012, *Clin Infect Dis*, pp. 1171–78.
331. *Comparison of diagnostic yield of GeneXpert MTB/RIF assay and ZN (Ziehl-Neelsen) staining in serosal fluids from HIV and non-HIV patients with extra-pulmonary tuberculosis.* Kumar, M. Mittal et R. 2017, *International Journal of Research in Medical Sciences*, pp. 2952-2955.
332. *Organization, World Health. HIV-TB. WHO. [En ligne] octobre 2014.* http://www.who.int/tb/challenges/hiv/Xpert_TBHIV_Information_Note_final.pdf.
333. *Clinical utility of a novel molecular assay in various combination strategies with existing methods for diagnosis of HIV-related tuberculosis in Uganda.* Ssengooba, W., Nakiyingi, L., Armstrong, D. T., Cobelens, F. G., Alland, D., Manabe, Y. C., ... & Joloba, M. L. 2014, *Plos One*, p. e107595.
334. *Comparison of Xpert MTB/RIF with other nucleic acid technologies for diagnosing pulmonary tuberculosis in a high HIV prevalence setting: a prospective study.* Scott, L. E., McCarthy, K., Gous, N., Nduna, M., Van Rie, A., Sanne, I., ... & Stevens, W. 2011, *Plos Medicine*, p. e1001061.

335. *Intensified Tuberculosis Case-Finding in HIV-Positive adults managed at Ethiopian health centers: diagnostic yield of Xpert MTB/RIF compared wit.* Balcha, T. T., Sturegård, E., Winqvist, N., Skogmar, S., Reepalu, A., Jemal, Z. H., ... & Björkman, P. 2014, *Plos One*, p. e85478.
336. *Rapid molecular detection of pulmonary tuberculosis in HIV-infected patients in Santiago, Chile.* M. E. Balcells, P. García, L. Chanqueo, L. Bahamondes, M. Lasso, A. M. Gallardo, L. Cifuentes. 2012, *INT J TUBERC LUNG DIS*, pp. 1349–1353.
337. *A diagnostic accuracy study of Xpert(R)MTB/RIF in HIV-positive patients with high clinical suspicion of pulmonary tuberculosis in Lima, Peru.* . Carriquiry G, Otero L, Gonzalez-Lagos E, et al. 2012, *Plos One*, p. e44626.
338. *UNITAID. Tuberculosis: Diagnostics Technology and Market Landscape (4th ed.). Geneva : World Health Organization, 2015.*
339. *Roche Diagnostics. Cobas TaqMan Mycobacterium tuberculosis test:instruction manual. Germany : Roche Diagnostics, 2009.*
340. *Performance evaluation of the Cobas TaqMan MTB assay on respiratory specimens according to clinical application.* Park, J. E., Huh, H. J., Koh, W. J., Song, D. J., Ki, C. S., & Lee, N. Y. 2017, *International Journal of Infectious Diseases*, pp. 42-46.
341. *Evaluation of the Cobas TaqMan MTB test for the detection of Mycobacterium tuberculosis complex according to acid-fast-bacillus smear grades in respiratory specimens.* Huh, H. J., Koh, W. J., Song, D. J., Ki, C. S., & Lee, N. Y. 2015, *Journal of clinical microbiology*, pp. 696-698.
342. *Evaluation of the Cobas TaqMan MTB real-time PCR assay for direct detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory specimens.* Lee, M. R., Chung, K. P., Wang, H. C., Lin, C. B., Yu, C. J., Lee, J. J., & Hsueh, P. R. 2013, *Journal of medical microbiology*, pp. 1160-1164.
343. *Evaluation of the Cobas TaqMan MTB test for direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex in respiratory specimens.* Yang, Y. C., Lu, P. L., Huang, S. C., Jenh, Y. S., Jou, R., & Chang, T. C. 2011, *Journal of clinical microbiology*, pp. 797-80.
344. *Evaluation of the Cobas TaqMan MTB test for detection of Mycobacterium tuberculosis complex.* Jönsson, B., Lönnemark, E., & Ridell, M. 2015, *Infectious Diseases*, pp. 231-236.
345. *Evaluation of Cobas TaqMan MTB for direct detection of the Mycobacterium tuberculosis complex in comparison with Cobas Amplicor MTB.* Bloemberg, G. V., Voit, A., Ritter, C., Deggim, V., & Böttger, E. C. 2013, *Journal of clinical microbiology*, pp. 2112-2117.

346. Sensitivity and specificity of Cobas TaqMan MTB real-time polymerase chain reaction for culture-proven *Mycobacterium tuberculosis*: meta-analysis of 26999 specimens from 17 Studies. N. Horita, M. Yamamoto, T. Sato, T. Tsukahara, H. Nagakura, K. Tashiro, et al. 2015, *Sci Rep*, p. 18113.
347. IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. Thierry D, Cave MD, Eisenach KD, Crawford JT, Bates JH, Gicquel B, Guesdon JL. 1990, *Nucleic Acids Res*, p. 188.
348. Structure and mapping of antigenic domains of protein antigen b, a 38,000-molecular-weight protein of *Mycobacterium tuberculosis*. Andersen AB, Hansen EB. 1989, *Infect Immun*, pp. 2481-2488.
349. Performance of the Abbott RealTime MTB and MTB RIF/INH assays in a high TB and HIV coinfection setting in South Africa. Scott, L., David, A., Noble, L., Nduna, M., Da Silva, P., Black, A., ... & Stevens, W. 2017, *Journal of Clinical Microbiology*, pp. JCM-00289.
350. Performance of the new automated Abbott RealTime MTB assay for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens. Chen JH, She KK, Kwong TC, Wong OY, Siu GK, Leung CC, Chang KC, Tam CM, Ho PL Cheng VC, Yuen KY, Yam WC. 2015, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, pp. 1827-1832.
351. Performance characteristics Performance characteristics of the new Abbott Real Time MTB assay for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens. Vinuesa V, Navarro D, Poujois S, Zaragoza S, Borrás R. 2016, *Diagn Microbiol Infect Dis*, pp. 212-214.
352. Analytical and clinical performance of Abbott RealTimeMTB, an assay for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in pulmonary specimens. . Tang N, Frank A, Pahalawatta V, Lampinen J, Coblenz-Korte A, Dunn C, Li C, Cloherty G, Abravaya K, Leckie G. 2015, *Tuberculosis (Edinb)*, pp. 613-619.
353. Abbott RealTime MTB and RealTime MTB INH/RIF Assays for Direct Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex and Resistance Markers in Respiratory and Extrapulmonary Specimens. Hofmann-Thiel S, Molodtsov N, Antonenka U, Hoffmann H. 2016, *J Clin Microbiol*, pp. 3022-3027.
354. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Notomi T, et al. 2000, *Nucleic Acids Res*, p. E63.
355. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. Notomi, T., Mori, Y., Tomita, N. et al. 2015, *J Microbiol*, pp. 1-5.

356. WHO. *The use of loop-mediated isothermal amplification (TB-LAMP) for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. Policy guidance.* Geneva: World Health Organization, 2016.
357. *Diagnostic accuracy of the PURE-LAMP test for pulmonary tuberculosis at the county-level laboratory in China.* Ou, X., Li, Q., Xia, H., Pang, Y., Wang, S., Zhao, B., ... & Zhang, Z. 2014, *Plos One*, p. e94544.
358. *Feasibility and operational performance of TB LAMP in decentralized setting : Results from a Multicenter Study.* Gray, C. M., Katamba, A., Narang, P., Giraldo, J., Zamudio, C., Joloba, M., ... & Amisano, D. 2016, *J Clin Microbiol*, pp. 1984-1991.
359. *Clinical Performances of Pure TB-Lamp Kit for M. tuberculosis Complex Detection in Sputum Samples.* N'guessan, K., Adegbele, J., Coulibaly, I., Kouame-N'takpé, N., Seck-Angu, H., Guei, A., ... & Dosso, M. 2017, *Journal of Tuberculosis Research*, pp. 129-138.
360. *Rapid and effective diagnosis of pulmonary tuberculosis with novel and sensitive loopmediated isothermal amplification (LAMP) assay in clinical samples: a meta-analysis.* Yuan LY, Li Y, Wang M, Ke ZQ, Xu WZ. 2014, *J Infect Chemother*, pp. 86-92.
361. *Multitargeted loop-mediated isothermal amplification for rapid diagnosis of tuberculosis meningitis.* Modi, M., Sharma, K., Sharma, M., Sharma, A., Sharma, N., Sharma, S., Ray, P., Varma, S. 2016, *Int J Tuberc Lung Dis*, pp. 625-630.
362. *Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for speedy diagnosis of tubercular lymphadenitis: The multi-targeted 60-minute approach.* Sharma, M., Sharma, K., Sharma, A., Gupta, N., Rajwanshi, A. 2016, *Tuberculosis (Edinb)*, pp. 114-117.
363. *PURE-LAMP Procedure for the Diagnosis of Extrapulmonary Tuberculosis: A Case Series.* Kouzaki, Y., Mikita, K., Maeda, T., Ishihara, M., Kawano, S., Fujikura, Y., ... & Miyahira, Y. 2015, *Internal Medicine*, pp. 1447-1450.
364. *Groupe Azay Mycobactéries. Identification par amplification génique. microbe éducation. [En ligne] 28 10 2017. <http://www.microbes-edu.org/professionnel/GBEA/MOBM002.htm#AMTDT>.*
365. *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 ?* V. Jarlier, E. Cambau, W. Sougakoff. 2004, *Revue des Maladies Respiratoires*, pp. 36-43.
366. *Comparison of the Real-Time PCR Method and the Gen-Probe Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct Test for Detection of Mycobacterium tuberculosis in Pulmonary and Nonpulmonary Specimens.* N. Lemaître, S. Armand,..., and R. J. Courcol. 2004, *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, pp. 4307–4309.

367. *Performance Assessment of Two Commercial Amplification Assays for Direct Detection of Mycobacterium tuberculosis Complex from Respiratory and Extrapulmon.* Piersimoni, C., Scarparo, C., Piccoli, P., Rigon, A., Ruggiero, G., Nista, D., & Bornigia, S. 2002, *Journal of clinical microbiology*, pp. 4138-4142.
368. *Evaluation of Gen-Probe Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test by Using Respiratory and Nonrespiratory Specimens in a Tertiary Care Center Laboratory.* . O'Sullivan, C. E., Miller, D. R., Schneider, P. S., & Roberts, G. D. 2002, *Journal of Clinic*, pp. 1723-1727.
369. *Use of the amplified Mycobacterium tuberculosis direct test in a public health laboratory - Test performance and impact on clinical care.* Guerra, R. L., Hooper, N. M., Baker, J. F., Alborz, R., Armstrong, D. T., Maltas, G., ... & Dorman, S. E. 2007, *CHEST Journal*, pp. 946-951.
370. *Comparison of Performances of MTD Gene-Probe® Test, BACTEC 960™ System and Löwenstein-Jensen Culture Methods in the Diagnosis of Smear-Negative Tuberculosis Cases .* Ayperen KUNDURACIOĞLU, Işıl KARASU, Can BİÇMEN, Ayşe ÖZSÖZ, Ahmet Emin ERBAYCU. 2013, *Mikrobiyol Bul*, pp. 417-431.
371. *Nucleic acid amplification test and bronchoscopy improve the diagnostic accuracy of smear-negative tuberculosis.* P-C. Chou, C-H. Wang, C-D. Huang, Y-L. Lo, K-Y. Lee, C-T. Yu, S-M. Lin, H-C. Lin, H-P. Kuo. 2012, *INT J TUBERC LUNG DIS*, pp. 1674–1679.
372. *Performances du test « Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test » sur les échantillons extrarespiratoires (étude sur 1538 échantillons).* M. Fabre, R. Vong, A. Zrara, P. Saint-Blancard, F. Mechai, P. Gérome, F. Janvier. 2011, *Pathologie Biologie*, pp. 29–31.
373. *Clinical Evaluation of the Gen-Probe Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test for Rapid Diagnosis of Tuberculosis Lymphadenitis.* Kerleguer, A., Fabre, M., Bernatas, J. J., Gerome, P., Nicand, E., Herve, V., & Koeck, J. L. 2004, *Journal of Clinic*, pp. 5921-5922.
374. C., Osiowy. *Ligase Chain Reaction.* [auteur du livre] Rapley R Walker J.M. *Medical Biomethods Handbook.* Totowa : Humana Press, 2005, pp. 167-181.
375. *Nucleic acid amplification: Alternative methods of polymerase chain reaction.* Fakruddin, M., Mannan, K. S. B., Chowdhury, A., Mazumdar, R. M., Hossain, M. N., Islam, S., & Chowdhury, M. A. 2013, *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, p. 245.
376. *Early identification of Mycobacterium tuberculosis complex in BACTEC cultures by ligase chain reaction.* Wang, L. and Tay, L. 2002, . *J. Med. Microbiol.*, pp. 710–712.
377. *Method for reduction of inhibition in a Mycobacterium.* Leckie, G. W., Erickson, D. D., He, Q., et al. 1998, *J. Clin. Microbiol.*, pp. 764–767.

378. *Rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by ligase chain reaction amplification.* Gamboa, F., J. Dominguez, E. Padilla, J. M. Manterola, E. Gazapo, J. Lonca, L. Matas, A. Hernandez, P. J. Cardona, and V. Ausina. 1998, *J. Clin. Microbiol.*, pp. 1324-1329.
379. *Detection and identification of Mycobacterium tuberculosis directly from sputum sediments by ligase chain reaction.* Moore, D. F., and J. I. Curry. 1998, *J. Clin. Microbiol.*, pp. 1028-1031.
380. *Clinical evaluation of a commercial ligase-based gene amplification method for detection of Mycobacterium tuberculosis.* . Alonso, P., A. Orduña, M. A. Bratos, A. San Miguel, and A. Rodriguez Torres. 1998, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, pp. 371-376.
381. *Comparison of the ligase chain reaction with solid and liquid culture media for routine detection of Mycobacterium tuberculosis in nonrespiratory specimens.* Palacios, J. J., J. Ferro, N. Ruiz Palma, S. G. Rocés, H. Villar, J. Rodriguez, and P. Prendes. 1998, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, pp. 767-772.
382. *Evaluation of the Abbott LCx Mycobacterium tuberculosis assay in comparison with culture methods in selected Italian patients.* Fadda, G., F. Ardito, M. Sanguinetti, B. Posteraro, L. Ortona, C. Chezzi, L. Polonelli, G. Dettori, S. Conti, F. Fanti, and C. Galli. 1998, *Microbiologica*, pp. 97-103.
383. *Evaluation of the Abbott LCx Mycobacterium tuberculosis assay for direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex in human samples.* Garrino, M. G., Y. Glupczynski, J. Degraux, H. Nizet, and M. Delmee. 1999, *J. Clin. Microbiol.*, pp. 229-232.
384. *Multicenter evaluation of the Abbott LCx Mycobacterium tuberculosis ligase chain reaction assay.* Lumb, R., K. Davies, D. Dawson, R. Gibb, T. Gottlieb, C. Kershaw, K. Kociuba, G. Nimmo, N. Sangster, M. Worthington, and I. Bastian. 1999, *J. Clin. Microbiol.*, pp. 3102-3107.
385. *Ligase chain reaction assay is clinically useful in the discrimination of smear-positive pulmonary tuberculosis from atypical mycobacterioses.* . Viinainen, A. H., H. Soini, M. Marjamäki, K. Liippo, and M. K. Viljanen. 2000, *Ann. Med.*, pp. 279-283.
386. *Evaluation of a commercial test based on ligase chain reaction for direct detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory specimens.* Ribeiro, F. K. C., Dettoni, V. D. V., Peres, R. L., Vinhas, S. A., C6, T. R., Dietze, R., & Palaci, M. 2004, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, pp. 431-435.
387. *FRAPERIE, M. MAYE-LASSERRE et P. Amplification génique par SDA (Strand Displacement Amplification).* microbiologiemedicale.fr. [En ligne] 31 10 2017. <http://outils.microbiologiemedicale.fr/plan-amplification-genique/amplification-genique-par-sda-strand-displacement-amplification-2/>.

388. *Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products.* Tomita N, Mori Y, Kanda H, Notomi T. 2008, *Nat. Protoc.*, pp. 877–882.
389. *Roberts, G. D., L. Hall, and D. M. Wolk. Mycobacteria. [auteur du livre] W. J. Martin. Manual of commercial methods in clinical microbiology. Washington : A. Truant (ed.), 2002, pp. 256-273.*
390. *Nucleic Acid Isothermal Amplification Technologie: A Review . Gill, P. and A. Ghaemi. 2008, Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, pp. 224-243.*
391. *Relevance of Commercial Amplification Methods for Direct Detection of Mycobacterium tuberculosis Complex in Clinical Samples. C. Piersimoni, and C. Scarparo. 2003, J. Clin. Microbiol, pp. 5355-5365.*
392. *Clinical evaluation of the BDProbe-Tec strand displacement amplification assay for rapid diagnosis of tuberculosis. Bergmann, J. S., and G. L. Woods. 1998, J. Clin. Microbiol, pp. 2766-2768.*
393. *Clinical evaluation of the BDProbeTec ET system for rapid detection of Mycobacterium tuberculosis. Bergmann, J. S., W. E. Keating, and G. L. Woods. 2000, J. Clin. Microbiol, pp. 863-865.*
394. *Evaluation of a new commercial assay for diagnosis of pulmonary and non pulmonary tuberculosis. . Johansen, I. S., V. Ø. Thomsen, A. Johansen, P. Andersen, and B. Lundgren. 2002, Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., pp. 455-460.*
395. *An evaluation of the BDProbeTec ET system for the direct detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory samples. . Barrett, A., J. G. Magee, and R. Freeman. 2002, J. Med. Microbiol., pp. 895-898.*
396. *Evaluation of the BDProbeTec™ ET DTB assay for direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex from clinical samples. Maugein, J., J. Fourche, S. Vacher, C. Grimond, and C. Bebear. 2002, Diagn. Microbiol. Infect. Dis., pp. 151-155.*
397. *Evaluation of the BDProbeTec ET system for direct detection of Mycobacterium tuberculosis in pulmonary and extrapulmonary samples: a multicenter study. Mazzarelli, G., L Rindi, P. Picccoli, C. Scarparo, C. Garzelli, and E. Tortoli. 2003, J. Clin. Microbio, pp. 1779-1782.*
398. *Five Years' Evaluation of the BD ProbeTec System for the Direct Molecular Detection of Mycobacterium tuberculosis Complex in Respiratory and Nonrespiratory Clinical Samples. Bicmen, C., Karaman, O., Gunduz, A. T., Erer, O. F., Coskun, M., Kaftan, O., ... & Ozsoz, A. 2015, Polish journal of microbiology, pp. 391-394.*

399. *Performance of the BD ProbeTec ET direct detection assay for the analysis of Mycobacterium tuberculosis in respiratory and non-respiratory clinical specimens.* Somily, A. M., Habib, H. A., Sarwar, M. S., Al-Beeshi, N. Z., Alohal, R. M., & Shakoar, Z. A. 2017, *Journal of Taibah University Medical Sciences*, pp. 364-368.
400. *Molecular diagnostics in tuberculosis.* Cheng VC, Yew WW, Yuen KY. 11, s.l. : *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* , 2005 , Vol. 24. 711-20.
401. *Performance of nucleic acid amplification tests for diagnosis of tuberculosis in a large urban setting.* Laraque F, Griggs A, Slopen M, Munsiff SS. 1, s.l. : *Clin Infect Dis*, 2009, Vol. 49. 46-54.
402. *Updated guidelines for the use of nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculosis.* (CDC), Centers for Disease Control and Prevention. 1, s.l. : *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2009, Vol. 58. 7-10.
403. *Update: Nucleic acid amplification tests for tuberculosis.* (CDC), Centers for Disease Control and Prevention. 26, s.l. : *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2000 , Vol. 49. 593-4.
404. *Nucleic Acid amplification testing for the diagnosis of tuberculosis: not for all.* J, Dylewski. 9, s.l. : *Clin Infect Dis.*, 2009 , Vol. 49. 1456-7.
405. *Commercial nucleic-acid amplification tests for diagnosis of pulmonary tuberculosis in respiratory specimens: meta-analysis and meta-regression.* Ling DI, Flores LL, Riley LW, Pai M. 2, s.l. : 2008 , 2008, Vol. 3. e1536.
406. *Identification and evaluation of a new nucleic acid amplification test target for specific detection of Mycobacterium tuberculosis.* Qin L, Zheng R, Fan C, Cai J, Liu Z, Wang J, Lu J, Jin R, Yang H, Cui Z, Feng Y, Hu Z. 10, s.l. : *Clin Chem Lab Med*, 2010, Vol. 48. 1501-5.
407. *Tagu, L Damier et D. Hybridation moléculaire. [auteur du livre] D. Tagu et C. Moussards. Principes des technique de biologie moléculaire. Paris : INRA, 2003, pp. 32-35.*
408. *Use of INNO-LIPA assay for rapid identification of mycobacteria. .* Lebrun, L. N. Go`nu`llu`, N. Boutros, A. Davoust, M. Guibert, D. Ingrand, J. C.Ghnassia, V. Vincent, F. Doucet-Populaire. 2003, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, pp. 151-153.
409. *Evaluation of a commercial line probe assay for identification of Mycobacterium species from liquid and solid culture.* Mijs, W., K. De Vreese, A. Devos, H. Pottel, A. Valgaeren, C. Evans, J.Norton, D. Parker, L. Rigouts, F. Portaels, U. Reischl, S. Watterson, G.Pfyffer, and R. Rossau. 2002, *Eur.J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, pp. 794–802.
410. *Rapid identification of mycobacteria to the species level using INNO-LiPA Mycobacteria, a reverse hybridization assay.* Suffys, P. N., A. da Silva Rocha, M. de

Oliveira, C. E. Dias Campos, A. M. Werneck Barreto, F. Portaels, L. Rigouts, G. Wouters, G. Jannes, G. van Reybroeck, W. Mijs, and B. Vanderborght. 2001, *J. Clin. Microbiol.*, pp. 4477–4482.

411. Performance assessment of new multiplex probe assay for identification of mycobacteria. Tortoli, E., A. Nanetti, C. Piersimoni, P. Cichero, C. Farina, G. Mucignat, C. Scarparo, L. Bartolini, R. Valentini, D. Nista, G. Gesu, C. Passerini Tosi, M. Crovatto, and G. Brusarosco. 2001, *J. Clin. Microbiol.*, pp. 1079–1084.

412. HAYETTE, Marie-Pierre. Identification de *Mycobacterium tuberculosis* complexe. Interspace 16S-23S codant pour l'ARN ribosomal du genre *Mycobacterium*. Référentiel des examens réalisés par l'Unilab Lg. [En ligne] 09 11 2017. http://www.chu.ulg.ac.be/jcms/c_695598/identification-de-mycobacterium-tuberculosis-complexe-interespace-16s-23s-codant-pour-l-arn-ribosomal-du-genre-mycobacterium.

413. Evaluation of INNO-LiPA assay for direct detection of mycobacteria in pulmonary and extrapulmonary specimens. F. Perandin, G. Pinsi, C. Signorini, N. Manca. 2006, *NEW MICROBIOLOGICA*, pp. 133-138.

414. Use of the INNO-LiPA-MYCOBACTERIA assay (version 2) for identification of *Mycobacterium avium*-*Mycobacterium intracellulare*-*Mycobacterium scrofulaceum* complex isolates. Lebrun, L., Weill, F. X., Lafendi, L., Houriez, F., Casanova, F., Gutierrez, M. C., ... & Herrmann, J. L. 2005, *Journal of clinical microbiology*, pp. 2567-2574.

415. Comparative Evaluation of the New Version of the INNO-LiPA Mycobacteria and GenoType Mycobacterium Assays for Identification of Mycobacterium Species from MB/BacT Liquid Cultures Artificially Inoculated with Mycobacterial Strains. E. Padilla, V. Gonzalez, J. M. Manterola, A. Pérez, M. D. Quesada, S. Gordillo, C. Vilaplana, M. A. Pallares, S. Molinos, M. D. Sánchez, and V. Ausina. 2004, *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, pp. 3083–3088.

416. Evaluation of INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2: Improved Reverse Hybridization Multiple DNA Probe Assay for Mycobacterial Identification. E. Tortoli, A. Mariottini and G. Mazzarelli. 2003, *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, pp. 4418–4420.

417. Evaluation of the LiPA MYCOBACTERIA assay for identification of mycobacterial species from BACTEC 12B bottles. Miller N., Infante S., Cleary T. 2000, *J. Clin. Microbiol.*, pp. 1915-1919.

418. Comparaison de deux techniques d'hybridation moléculaire dans l'identification de mycobactéries en pratique courante. Trombert-Paolantoni, S., Poveda, J. D., & Figarella, P. 2004, *Pathologie Biologie*, pp. 462-468.

419. Recent advances in the laboratory diagnosis of tuberculosis. Waard, R. Teran et J. H. de. 2015, *JIFCC*, pp. 295-309.

420. *Molecular detection, identification and drug resistance detection in Mycobacterium tuberculosis*. Palomino, J. C. 2009 , immunology and medical microbiology, pp. 103-111.
421. *Evaluation of the BACTEC MGIT 960 and the MB/BacT Systems for Recovery of Mycobacteria from Clinical Specimens and for Species Identification by DNA AccuProbe*. F. Alcaide, M. A. Benítez, J. M. Escribà, and R. Martín. 2000, *J Clin Microbiol*, pp. 398–401.
422. *The new diagnostic mycobacteriology laboratory*. Salfinger, M., & Pfyffer, G. E. 1994 , *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, pp. 961-979.
423. *Rapid diagnosis of mycobacterial diseases, and their implications on clinical management*. S., Johansen I. 2006, *Dan. Med. Bull*, pp. 28–45.
424. Ingen, Jakko van. *Mycobacteria*. [auteur du livre] William G Powderly and Steven M. Opal Jonathan Cohen. *Infectious Diseases (Fourth Edition)*. s.l. : Elsevier, 2017, pp. 1645-1659.
425. *Comparison of the MGIT TBc immunochromatographic assay with the Accuprobe Gen-Probe TB assay for identification of Mycobacterium tuberculosis complex: results from* . Roberts, S. A., Lowe, O., Pandey, S., Williamson, D. A., Newton, S., & Vaughan, R. 2012, *Diagnostic microbiology and infectious disease*, pp. 415-416.
426. *Use of Molecular Methods To Identify the Mycobacterium tuberculosis Complex (MTBC) and Other Mycobacterial Species and To Detect Rifampin Resistance in MTBC Isolates following Growth Detection with the BACTEC MGIT 960 System*. Somoskovi, A., Song, Q., Mester, J., Tanner, C., Hale, Y. M., Parsons, L. M., & Salfinger, M. 2003, *Journal of clinical microbiology*, pp. 2822-2826.
427. *Rapid identification of Mycobacterium tuberculosis complex from Bactec 12B broth cultures originating from non-respiratory secretion specimens: comparison between Accuprobe and in-house polymerase chain reaction*. Hui, SW Cheung, CY Chan, Augustine FB Cheng, M. 2001, *Pathology*, pp. 61-65.
428. Hologic. *AccuProbe culture identification tests. Hologic the science of sure*. [En ligne] 24 11 2017. http://www.hologic.com/sites/default/files/package%20inserts/102896F-01-IFU-PI_002_01.pdf.
429. *Evaluation of Genotype MTBC Assay for Differentiation of Clinical Mycobacterium tuberculosis Complex Isolates*. E. Richter, M. Weizenegger, S. Rüsche-Gerdes and S. Niemann. 2003, *JCM*, pp. 2672-2675.
430. Hain Lifescience . *tuberculosis*. Hain Lifescience . [En ligne] 12 12 2017. file:///C:/Users/asmae/Downloads/MTBC_1012_301-09-03.pdf.

431. Nouveaux tests pour le diagnostic de la tuberculose. B. Ninet, P. Roux-Lombard, J. Schrenzel, J.-P. Janssens. 2010, *Revue des Maladies Respiratoires*, pp. 823-833.
432. Evaluation of GenoType and LiPA MYCOBACTERIA Assays for Identification of Finnish Mycobacterial Isolates. Mäkinen, J., A. Sarkola, M. Marjamäki, M. K. Viljanen, and H. Soini. 2002, *J. Clin. Microbiol.*, pp. 3478-3481.
433. Usefulness of the GenoType MTBC Assay for Differentiating Species of the Mycobacterium tuberculosis Complex in Cultures Obtained from Clinical Specimens. E. Richter, M. Weizenegger, A-M. Fahr and S. Rüscher-Gerdes. 2004, *J. Clin. Microbiol.*, pp. 4303-4306.
434. Direct Comparison of the GenoType MTBC and Genomic Deletion Assays in Terms of Ability To Distinguish between Members of the Mycobacterium tuberculosis Complex in Clinical Isolates and in Clinical Specimens. A. Somoskovi, J. Dormandy, J. Rivenburg, M. Pedrosa, M. McBride and M. Salfinger. 2008, *J. Clin. Microbiol.*, pp. 1854-1857.
435. Evaluation of the GenoType MTBC assay for differentiating 120 clinical Mycobacterium tuberculosis complex isolates. Spandidos, I. K. Neonakis & Z. Gitti & E. Petinaki & S. Maraki & D. A. 2007, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, pp. 151–152.
436. Comparison of GenoType® MTBC with RFLP-PCR and multiplex PCR to identify Mycobacterium tuberculosis complex species. M. P. Romero Gómez, L. Herrera-León, M. S. Jiménez & J. García Rodríguez. 2007, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, pp. 63–66.
437. Use of the GenoType Mycobacterium CM and AS Assays To Analyze 76 Nontuberculous Mycobacterial Isolates from Greece. Z. Gitti, I. Neonakis, G. Fanti, F. Kontos, S. Maraki, and Y. Tselentis. 2006, *J Clin Microbiol.*, pp. 2244–2246.
438. Hain Lifescience. GenoType Mycobacterium CM VER 2.0. Hain Lifescience. [En ligne] 21 12 2017. <https://www.hain-lifescience.de/en/products/microbiology/mycobacteria/ntm/genotype-mycobacterium-cm.html>.
439. Role of GenoType® Mycobacterium Common Mycobacteria/Additional Species Assay for Rapid Differentiation Between Mycobacterium tuberculosis Complex and Different Species of Non-Tuberculous Mycobacteria. A. K. Singh, A. K. Maurya, J. Umrao, S. Kant, R. A. Singh Kushwaha, V.L. Nag, and T. N Dhole. 2013, *J Lab Physicians.*, pp. 83–89.
440. GenoType Mycobacterium Assay for Identification of Mycobacterial Species Isolated from Human Clinical Samples by Using Liquid Medium. P. Ruiz, J. Gutierrez, F. J. Zerolo and M. Casal. 2002, *J. Clin. Microbiol.*, pp. 3076-3078.
441. Identification of non-tuberculous mycobacteria: utility of the GenoType Mycobacterium CM/AS assay compared with HPLC and 16S rRNA gene sequencing. A. S. Lee, P. Jelfs, V. Sintchenko and G. L. Gilbert. 2009, *Journal of Medical Microbiology*, pp. 900–904.

442. *Evaluation of a novel strip test, GenoType Mycobacterium CM/AS, for species identification of mycobacterial cultures.* J.Mäkinen, M.Marjamäki, H.Marttil, H.Soinia. 2006, *Clinical Microbiology and Infection*, pp. 481-483.
443. *GenoType Mycobacterium Assay for Identification of Mycobacterial Species Isolated from Human Clinical Samples by Using Liquid Medium.* P. Ruiz, J. Gutierrez, F. J. Zerolo and M. Casal. 2002, *J. Clin. Microbiol.* , pp. 3076-3078.
444. *Evaluation of the New GenoType Mycobacterium Assay for Identification of Mycobacterial Species.* C. Russo, E. Tortoli and D. Menichella. 2006, *J Clin Microbiol.*, pp. 334–339.
445. *Evaluation of the GenoType Mycobacterium Assay for Identification of Mycobacterial Species from Cultures.* E. Richter, S. R-Gerdes, and D. Hillemann. 2006, *J Clin Microbiol.*, pp. 1769–1775.
446. *Use of the GenoType Mycobacterium CM and AS Assays To Analyze 76 Nontuberculous Mycobacterial Isolates from Greece.* Z. Gitti, I. Neonakis, G. Fanti, F. Kontos, S. Maraki, and Y. Tselentis. 2006, *J Clin Microbiol.* , pp. 2244–2246.
447. *Identification of non-tuberculous mycobacteria: utility of the GenoType Mycobacterium CM/AS assay compared with HPLC and 16S rRNA gene sequencing.* A. S. Lee, P. Jelfs, V. Sintchenko, Gwendolyn L. Gilbert. 2009, *Journal of Medical Microbiology* , pp. 900-904.
448. *Comparative evaluation of the AdvanSure Mycobacteria GenoBlot assay and the GenoType Mycobacterium CM/AS assay for the identification of non-tuberculous mycobacteria.* Mina Yang, Hee Jae Huh, Hyeon Jeong Kwon, Ji-Youn Kim, Dong Joon Song, Won-Jung Koh, Chang-Seok Ki, N. Yong Lee. 2016, *Journal of Medical Microbiology* , pp. 1422-1428.
449. C. J. Figueroa, Y-W Tang, Y. Taur. *Principles and Applications of Genomic Diagnostic Techniques.* [auteur du livre] M. Sussman, D. Liu, I. Poxton and J. Schwartzman Y-W Tang. *Molecular Medical Microbiology (Second Edition).* San Diego : Academic Press, 2015.
450. (1990). *Characterization of a Mycobacterium tuberculosis insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis.* Thierry, D., Brisson-Noël, A., Vincent-Levy-Frebault, V., Nguyen, S., Guesdon, J. L., & Gicquel, B. 1990, *Journal of clinical microbiology*, pp. 2668-2673.
451. *Strain identification of Mycobacterium tuberculosis by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology.* J D van Embden, M D Cave, J T Crawford, J W Dale et al. 1993, *J Clin Microbiol.*, pp. 406–409.

452. IS6110, a *Mycobacterium tuberculosis* complex-specific insertion sequence, is also present in the genome of *Mycobacterium smegmatis*, suggestive of lateral gene transfer among mycobacterial species. A. Coros, E. DeConno & K. M. Derbyshire. 9, New York : *Journal of bacteriology*, 2008, Vol. 190. PMID: PMC2347380.
453. Tuberculosis. FRAISSE, Ph. 6, Strasbourg Cedex : *Revue des Maladies Respiratoires*, 2002, Vol. 19.
454. FOXMAN, B. *Molecular Tools. Molecular tools and infectious disease epidemiology*. Burlington : Academic Press, 2010.
455. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. VAN EMBDEN, J. D., CAVE, M. Donald, CRAWFORD, Jack T., et al. 2, Bilthoven : *Journal of clinical microbiology*, 1993, Vol. 31. PMID: 262774.
456. Relapse, re-infection and mixed infections in tuberculosis disease. A. McIvor, H. Koornhof, B. D. Kana. 2017, *Pathogens and Disease*, p. ftx020.
457. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. J D van Embden, M D Cave et al. 1993, *J Clin Microbiol*. 31(2), pp. 406–409.
458. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. KREMER, K., VAN SOOLINGEN, D., FROTHINGHAM, R., et al. 8, Bilthoven : *Journal of clinical microbiology*, 1999, Vol. 37. 2607-2618.
459. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. . E. MAZARS, S. LESJEAN, A-L. BANULS et al. 4, Boston : *Proceedings of the national academy of Sciences*, 2001, Vol. 98. 1901-1906.
460. Molecular Strain Typing of *Mycobacterium tuberculosis*: a Review of Frequently Used Methods. EI, Phyu Win, AUNG, Wah Wah, LEE, Jong Seok, et al. 11, Yangsan : *Journal of Korean medical science*, 2016, *J Korean Med Sci*, Vol. 31, pp. 1673–1683. 1673-1683.
461. Methodological and clinical aspects of the molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacteria. T. JAGIELSKI, A. MINIAS, J. VAN INGEN et al. 2, Warsaw : *Clinical microbiology reviews*, 2016, Vol. 29. 239-290.
462. Apports du génotypage des souches de *Mycobacterium bovis* à l'analyse de l'épidémiologie de la tuberculose bovine en Belgique (1995-2005). WALRAVENS, K., ALLIX, C., SUPPLY, P., et al. bruxelle : 3R–13èmes Rencontres Recherches Ruminants, Paris, France; actes du colloque. [Institut de l'Elevage], 2006.

463. *DNA fingerprinting and phenotyping of Mycobacterium tuberculosis isolates from human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive and HIV-seronegative patients in Tanzania.* Yang ZH, Mtoni I et al. 1995 , *J Clin Microbiol.* 33(5):, pp. 1064-9.
464. *IS6110 restriction fragment length polymorphism typing of clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis from patients with pulmonary tuberculosis in Madras, south India.* Das S, Paramasivan CN et al. 1995, *Tuber Lung Dis.* 76(6), pp. 550-4.
465. *Restriction fragment length polymorphism analysis of Mycobacterium tuberculosis isolated from countries in the western pacific region.* Park YK, Bai GH, Kim SJ. 2000, *J Clin Microbiol.* 38(1), pp. 191-7.
466. *Spoligotyping and Polymorphic GC-Rich Repetitive Sequence Fingerprinting of Mycobacterium tuberculosis Strains Having Few Copies of IS6110.* Z.H YANG, K. IJAZ, J.H. BATES et al. 10, Little Rock : *Journal of clinical microbiology*, 2000, Vol. 38.
467. *IS6110 homologs are present in multiple copies in mycobacteria other than tuberculosis-causing mycobacteria.* T. D. MCHUGH, L. E. NEWPORT et S. H. GILLESPIE. 7, London : *Journal of clinical microbiology*, 1997, Vol. 35. 1769-1771.
468. Merker M., Kohl T. A., Niemann S. & Supply P. *The Evolution of Strain Typing in the Mycobacterium tuberculosis Complex.* [auteur du livre] S. Ganieux. *Strain Variation in the Mycobacterium tuberculosis Complex: Its Role in Biology, Epidemiology and Control.* Cham : Springer International Publishing AG, 2017, pp. 43-78.
469. *National TB Controllers Association / CDC Advisory Group on Tuberculosis Genotyping. Guide to the Application of Genotyping to Tuberculosis Prevention and Control.* Atlanta : US Department of Health and Human Services, CDC, 2004.
470. *24-locus MIRU-VNTR genotyping is a useful tool to study the molecular epidemiology of tuberculosis among Warao Amerindians in Venezuela.* M. MAES, K. KREMER, D. VAN SOOLINGEN et al. 5, Caracas : *Tuberculosis*, 2008, Vol. 88. 490-494.
471. *Evaluation of Semiautomated IS6110-Based Restriction Fragment Length Polymorphism Typing for Mycobacterium tuberculosis in a High-Burden Setting.* Said, H. M., Krishnamani, K., Omar, S. V., Dreyer, A. W., Sansom, B., Fallows, D., & Ismail, N. A. 2016, *Journal of clinical microbiology*, 54(10), pp. 2547-2552.
472. *Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium tuberculosis for diagnosis and epidemiology.* Kamerbeek J., Schouls L. E. O. et al. 1997, *Journal of clinical microbiology*, pp. 907–914.
473. *Insertion element IS987 from Mycobacterium bovis BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in Mycobacterium tuberculosis .* Hermans P. W., Van Soolingen D., et al. 1991, *Infection and Immunity* 59(8), pp. 2695–2705.

474. *An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems.* Makarova, K. S., Wolf, Y. I et al. 2015, *Nature Reviews Microbiology* 13(11), p. 722.
475. *Stability of Mycobacterium tuberculosis IS6110 restriction fragment length polymorphism patterns and spoligotypes determined by analyzing serial isolates from patients with drug-resistant tuberculosis.* S. Niemann, E. Richter, and S. Rüsç-Gerdes. 1999, *Journal of Clinical Microbiology* , pp. 409–412.
476. *Spoligotyping of Mycobacterium tuberculosis isolates from patients with pulmonary tuberculosis in Mumbai, India.* S. Kulkarni, C. Sola, I. Filliol, N. Rastogi, and G. Kadival. 2005, *Research in Microbiology*, vol., pp. 588–596.
477. *Mycobacterium tuberculosis spoligotypes that may derive from mixed strain infections are revealed by a novel computational approach.* Lazzarini L. C. O., Rosenfeld J. et al. 2012, *Infection, Genetics and Evolution* 12(4), pp. 798-806.
478. *DNA typing of a nonviable culture of Mycobacterium tuberculosis in a homeless shelter outbreak.* J. R. Driscoll, M. A. McGarry, and H. W. Taber. 1999, *Journal of Clinical Microbiology*, pp. 274-275.
479. *Mycobacterium tuberculosis complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology.* Brudey K, Driscoll et al. 2006, *BMC Microbiology*, p. 23.
480. *Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements.* . Soolingen, D.Van. 2001, *Journal of internal medicine*, pp. 1-26.
481. *Usefulness of spoligotyping To discriminate IS6110 low-copy-number Mycobacterium tuberculosis complex strains cultured in Denmark.* . Bauer J, Andersen AB, Kremer K, Miorner H. 1999, *J Clin Microbiol*, pp. 2602-606.
482. *Pulmonary tuberculosis in Harare, Zimbabwe: analysis by spoligotyping.* Heyderman RS, Goyal M, Roberts P et al. 1998, *Thorax*, pp. 346-50.
483. *Evaluation of spoligotyping in a study of the transmission of Mycobacterium tuberculosis.* De La Salmoniere Y. G., Li H. M. et al. 1997, *Journal of clinical microbiology*, 35(9), pp. 2210-2214.
484. *Improvement of differentiation and interpretability of spoligotyping for Mycobacterium tuberculosis complex isolates by introduction of new spacer oligonucleotides.* van der Zanden, A. G. M., K. Kremer, L. J. Schouls, K. Caimi, A. Cataldi, A. Hulleman, N. J. D. Nagelkerke, and D. van Soolingen. 2002, *J. Clin. Microbiol.* 40, pp. 4628-4639.

485. *Transfer of a Mycobacterium tuberculosis Genotyping Method, Spoligotyping, from a Reverse Line-Blot Hybridization, Membrane-Based Assay to the Luminex Multianalyte Profiling System.* L. S. Cowan, L. Diem, M. C. Brake, and J. T. Crawford. 2004, *J Clin Microbiol.* 42(1), pp. 474–477.
486. *Comparison of variable number tandem repeat and IS6110-restriction fragment length polymorphism analyses for discrimination of high-and low-copy-number IS6110 Mycobacterium tuberculosis isolates.* Barlow, R. E., Gascoyne-Binzi, D. M., Gillespie, S. H., Dickens, A., Qamer, S., & Hawkey, P. M. 2001, *Journal of clinical microbiology*, 39(7), pp. 2453-2457.
487. *Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium tuberculosis for diagnosis and epidemiology.* Kamerbeek J., Schouls L. E. O. et al. 1997, *Journal of clinical microbiology*, pp. 907–914.
488. *Genetic variation and evolutionary origin of the direct repeat locus of Mycobacterium tuberculosis complex bacteria.* Van Embden JD, Van Gorkom T, Kremer K et al. 2000, *J Bacteriol*, pp. 2393-401.
489. *Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component system operon.* P. Supply, J. Magdalena, S. Himpens, and C. Locht. 1997, *Molecular Microbiology* 26(5), pp. 991-1003.
490. *Variable human minisatellite-like regions in the Mycobacterium tuberculosis genome.* P. Supply, E. Mazars, S. Lesjean, V. Vincent, B. Gicquel, and C. Locht. 2000, *Molecular Microbiology* 36(3), pp. 762–771.
491. *High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of Mycobacterium tuberculosis molecular epidemiology.* E. Mazars, S. Lesjean, A.-L. Banuls et al. 2001, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (4), pp. 1901–1906.
492. G., Muyldermans. *Génotypage des souches du complexe Mycobacterium tuberculosis . Centres Nationaux de Référence en Microbiologie Humaine. [En ligne] 01 04 2015.* https://nrchm.wiv-isp.be/fr/centres_ref_lab/mycobacterium_spp/Lists/Demandes%20de%20test/DispForm.aspx?ID=10.
493. P., Supply. *Multilocus variable number tandem repeat genotyping of Mycobacterium tuberculosis. Technical Guide.* Lille : INSERM U629, 2005.
494. *Automated High-Throughput Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit Typing of Mycobacterium tuberculosis Strains by a Combination of PCR and Nondenaturing High-Performance Liquid Chromatography.* J. T. Evans, P. M. Hawkey et al. 2004, *J Clinical Microbiology* 42(9), pp. 4175–4180.

495. *High-Throughput Mycobacterial Interspersed Repetitive-Unit-Variable-Number Tandem-Repeat Genotyping for Mycobacterium tuberculosis Epidemiological Studies*. M. Gauthier, F. Bidault et al. 2015, *J Clin Microbiol* 53(2), pp. 498–503.
496. *Optimization of Standard In-House 24-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Typing for Mycobacterium tuberculosis and Its Direct Application to Clinical Material*. J. L. de Beera, O. W. Akkerman et al. 2014, *J. Clin. Microbiol* 52(5), pp. 1338-1342.
497. *MIRU-VNTR Genotyping of Mycobacterium tuberculosis Strains Using QIAxcel Technology: A Multicentre Evaluation Study*. V. Nikolayevskyy, A. Trovato et al. 2016, *PLoS One* 11(3), p. e0149435.
498. *A novel approach to automated genotyping of Mycobacterium tuberculosis using a panel of 15 MIRU VNTRs*. T. Matsumoto, Y. Koshii et al. 2013, *Journal of Microbiological Methods* 93(3), pp. 239-241.
499. *Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of Mycobacterium tuberculosis*. P. Supply, C. Allix, S. Lesjean et al. 2006, *Journal of Clinical Microbiology* 44(12), pp. 4498–4510.
500. *miru-vntrplus. background/protocols. miru-vntrplus*. [En ligne] 27 02 2017. <http://www.miru-vntrplus.org/MIRU/miruinfo.faces;jsessionid=EAFD6C9B070CF4B8E2B31FE7845E8916>.
501. *Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of Mycobacterium tuberculosis based on mycobacterial interspersed repetitive units*. P. Supply, S. Lesjean, E. Savine, K. Kremer, D. van Soolingen, and C. Locht. 2001, *Journal of Clinical Microbiology* 39(10), pp. 3563–3571.
502. *MIRU-VNTRplus: a web tool for polyphasic genotyping of Mycobacterium tuberculosis complex bacteria*. Weniger T, Krawczyk J, Supply P, Niemann S, Harmsen D. 2010, *Nucleic Acids Res* 38 Suppl, pp. W326-331.
503. *Evaluation and user-strategy of MIRU-VNTRplus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of Mycobacterium tuberculosis complex isolates*. Allix-Béguec C, Harmsen D, Weniger T, Supply P, Niemann S. 2008, *J Clin Microbiol*, 46(8), pp. 2692-2699.
504. *La mise en place de bases de données des génotypes circulants du complexe Mycobacterium tuberculosis et des outils web permettant de mieux surveiller, comprendre et contrôler l'épidémie de la tuberculose dans le monde*. Couvin, D., & Rastogi, N. 2014, *EuroReference-Les Cahiers de la Référence* 2014(12), p. 40.
505. *Application of mycobacterial interspersed repetitive unit typing to Manitoba tuberculosis cases: can restriction fragment length polymorphism be forgotten?* K. S.

Blackwood, J. N. Wolfe, and A. M. Kabani. 2004, *Journal of Clinical Microbiology* 42 (11), pp. 5001–5006.

506. Evaluation of a two-step approach for large-scale, prospective genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the United States. L. S. Cowan, L. Diem, T. Monson et al. 2005, *Journal of Clinical Microbiology* 43(2), pp. 688–695.

507. Evaluation of the new advanced 15-loci MIRU-VNTR genotyping tool in *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology studies. N. Alonso-Rodríguez, M. Martínez-Lirola, M. Herránz et al. 2008, *BMC Microbiology* 8 (1), p. 34.

508. Assessment of an optimized mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat typing system combined with spoligotyping for population-based molecular epidemiology studies of tuberculosis. M. C. Oelemann, R. Diel, V. Vatin et al. 2007, *Journal of Clinical Microbiology* 45(3), pp. 691–697.

509. Hypervariable loci that enhance the discriminatory ability of newly proposed 15-loci and 24-loci variable-number tandem repeat typing method on *Mycobacterium tuberculosis* strains predominated by the Beijing family. Iwamoto T, Yoshida S et al. 2007, *FEMS Microbiol Lett.* (270), pp. 67–74.

510. Prediction of Local Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates of a Predominantly Beijing Lineage by Use of a Variable-Number Tandem-Repeat Typing Method Incorporating a Consensus Set of Hypervariable Loci. Y. Murasea, K. Izumi et al. 2018, *J. Clin. Microbiol.* 56 (1), pp. e01016-17.

511. Lineage-specific SNPs for genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. Dou H. Y., Lin C. H. et al. 2017, *Scientific reports* 7(1), p. 1425.

512. Molecular characterization of Sardinian *Mycobacterium tuberculosis* isolates by IS6110 restriction fragment length polymorphism, MIRU-VNTR and rep-PCR. S. Masala, P. Molicotti et al. 2010, *NEW MICROBIOLOGICA* 33, pp. 155-162.

513. Second worldwide proficiency study on variable number of tandem repeats typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex. J. L. de Beer, C. K Kodmon et al. 2014, *INT J TUBERC LUNG DIS* 18(5), pp. 594-600.

514. Dix années d'épidémiologie moléculaire de la tuberculose bovine en Belgique. Walravens K, Allix C, Supply P, Rigouts L, Godfroid J, Govaerts M, et al. 2006, *Epidémiologie et Santé Animale* 49, pp. 103-11.

515. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology . Mazars E, Lesjean S, Banuls AL, Gilbert M, Vincent V, Gicquel B, Tibayrenc M, Locht C, Supply P. 2001, *Proc Natl Acad Sci USA*. 98, pp. 1901–1906.

516. Optimization of variable number tandem repeat typing set for differentiating *Mycobacterium tuberculosis* strains in the Beijing family. W.S., Kam K.M. Yip C.W. Tse L.W. Leung K.L. Wong K.L. Ko W.M. Wong. 2006, *FEMS Microbiol Lett* 256, pp. 258–265.
517. Microevolution of *Mycobacterium tuberculosis* in a Tuberculosis Patient. AL-HAJOJ S. AM, AKKERMAN O. et al. 2010 , *J Clin Microbiol.*, pp. 3813–3816.
518. Occurrence and Nature of Double Alleles in Variable-Number Tandem-Repeat Patterns of More than 8,000 *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates in The Netherlands. Jajou R, Kamst M, van Hunen R, de Zwaan CC, Mulder A, Supply P, Anthony R, van der Hoek W, van Soolingen D. 2018, *J Clin Microbiol* 56, pp. e00761-17.
519. *Mycobacterium tuberculosis* Acquires Limited Genetic Diversity in Prolonged Infections, Reactivations and Transmissions Involving Multiple Hosts. Herranz M, Pole I, Ozere I, Chiner-Oms Á, Martínez-Lirola M, Pérez-García F, Gijón P, Serrano MJR, Romero LC, Cuevas O, Comas I, Bouza E, Pérez-Lago L and García-de-Viedma D. 2018, *Front. Microbiol.* 8, p. 2661.
520. Genotypic and phenotypic heterogeneity among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from pulmonary tuberculosis patients. Shamputa IC, Rigouts L, Eyongeta LA, El Aila NA, van Deun A, Salim AH, Willery E, Loch C, Supply P, Portaels F. 2004, *J Clin Microbiol.* 42, pp. 5528–5536.
521. Mixed infection and clonal representativeness of a single sputum sample in tuberculosis patients from a penitentiary hospital in Georgia. Shamputa IC, Jugheli L, Sadradze N, Willery E, Portaels F, Supply P, Rigouts L. 2006, *Respir Res.* 7, p. 99.
522. Utility of mycobacterial interspersed repetitive unit typing for differentiating *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Wuhan, China. Han H, Wang F, Xiao Y, Ren Y, Chao Y, Guo A, Ye L. 2007 , *J Med Microbiol.* 56(Pt 9), pp. 1219-23.
523. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. Frothingham R, Meeker-O'Connell WA. 1998, *Microbiology.* 144 (Pt 5), pp. 1189-96.
524. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. J Versalovic, T Koeuth, and J R Lupski. 1991, *Nucleic Acids Res.* 19(24), pp. 6823–6831.
525. REP code: defining bacterial identity in extragenic space. Tobes, R. & Ramos, J. L. 2005, *Environ Microbiol* 7, pp. 225–228.
526. Microbial DNA typing by automated repetitive-sequence-based PCR. Healy M, Huong J, Bittner T, Lising M, Frye S, Raza S, Schrock R, Manry J, Renwick A, Nieto R, et al. 2005, *J Clin Microbiol* 43, pp. 199–207.

527. J.Hafkin, L. Chandler et J. Maslow. *Molecular typing systems*. [auteur du livre] K. F. Woeltje et P. N. Malani E. Lautenbach. *Practical Healthcare Epidemiology: Third Edition*. London : The university of Chicago press, 2010, p. 97.

528. *Evaluation of a High-Throughput Repetitive-Sequence-Based PCR System for DNA Fingerprinting of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium avium Complex Strains*. G. A. Cangelosi, R. J. Freeman et al. 2004, *J Clin Microbiol*. 42(6), pp. 2685–2693.

529. *Comparison of an Automated Repetitive Sequence-based PCR Microbial Typing System with IS6110-Restriction Fragment Length Polymorphism for Epidemiologic Investigation of Clinical Mycobacterium tuberculosis Isolates in Korea*. M. H. Jang, G. E. Choi et al. 2011, *Korean J Lab Med.*, pp. 282–284.

530. *DNA fingerprinting of Mycobacteria using automated repetitive sequenced-based PCR*. Lising, M., Freeman, R., Shah, K., Cangelosi, G., & Healy, M. 2004, *Clinical Microbiology & Infection Supplement 10*, p. 30.

531. *Microbial DNA typing by automated repetitive-sequence-based PCR*. Healy, M., Huang, J. et al. 2005, *J Clin Microbiol* 43, pp. 199–207.

532. MATRAY, J. *Évaluation d'une technique de rep-PCR semi-automatisée pour le génotypage de souches du complexe Pseudallescheria boydii/Scedosporium apiospermum au cours de la mucoviscidose*. ROUEN : Sciences pharmaceutiques, 2013.

533. *Use of Rapid Genomic Deletion Typing To Monitor a Tuberculosis Outbreak within an Urban Homeless Population*. Freeman R., Kato-Maeda M. et al. 2005, *Clin Microbiol* 43, pp. 5550–5554.

534. *Comparison of repetitive-sequence-based polymerase chain reaction with random amplified polymorphic DNA analysis for rapid genotyping of nontuberculosis mycobacteria*. Sara Christianson, Joyce Wolfe, Hafid Soualhine, Meenu K. Sharma. 2012, *Canadian Journal of Microbiology*, 58(8), pp. 953-964.

535. *Cohort study of molecular identification and typing of Mycobacterium abscessus, Mycobacterium massiliense, and Mycobacterium bolletii*. Zelazny AM, Root JM, Shea YR, Colombo RE, Shamputa IC, Stock F, Conlan S, McNulty S, Brown-Elliott BA, Wallace RJ, Olivier KN, Holland SM, Sampaio EP. 2009, *J Clin Microbiol* 47, pp. 1985–1995.

536. *Respiratory outbreak of Mycobacterium abscessus subspecies massiliense in a lung transplant and cystic fibrosis center*. Aitken ML, Limaye A, Pottinger P, Whimbey E, Goss CH, Tonelli MR, Cangelosi GA, Dirac MA, Olivier KN, Brown-Elliott BA, McNulty S, Wallace RJ. 2012, *Am J Respir Crit Care Med* 185, pp. 231–232.

537. *Mycobacterium abscessus* isolated from municipal water—a potential source of human infection. Thomson R, Tolson C, Sidjabat H, Huygens F, Hargreaves M. 2013, *BMC Infect Dis* 13, p. 241.
538. Comparison of repetitive-sequence-based polymerase chain reaction with random amplified polymorphic DNA analysis for rapid genotyping of nontuberculosis mycobacteria. Christianson S, Wolfe J, Soualhia H, Sharma MK. 2012, *Can J Microbiol* 58, pp. 953–964.
539. Hypersensitivity pneumonitis caused by *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* in a hot tub, as proven by IS1245 RFLP and rep-PCR typing. van der Zanden RJC, Magis-Escurra C, de Lange WCM, et al. 2012, *International Journal of Mycobacteriology*. 1(3), pp. 152–154.
540. Bacterial strain typing in the genomic era. Wenjun Li, Didier Raoult & Pierre-Edouard Fournier. 2009, *FEMS microbiology reviews*, 33(5), pp. 892-916.
541. Imberechts, P. Wattiau et H. Le typage bactérien : une étape incontournable dans le suivi épidémiologique des maladies infectieuses d'origine alimentaire. *Labinfo*. 13 04 2015, pp. 4-6.
542. The implications of whole-genome sequencing in the control of tuberculosis. Lee, R. S. 2016, *Ther Adv Infect Dis*. 3(2), pp. 47–62.
543. Peterlongo, P. Lire les lectures : analyse de données de séquençage. . Rennes : Université rennes1, 2016.
544. High-throughput bacterial genome sequencing: an embarrassment of choice, a world of opportunity. Loman NJ, Constantinidou C, Chan JZ, Halachev M, Sergeant M, Penn CW, Robinson ER, Pallen MJ. 2012, *Nat Rev Microbiol*.10(9), pp. 599-606.
545. Whole genome sequencing in clinical and public health microbiology. Kwong JC, McCallum N, Sintchenko V, Howden BP. 2015, *Pathology* 47(3), pp. 199-210.
546. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. Heather JM, Chain B. 2016, *Genomics* 107(1), pp. 1-8.
547. Culture-independent detection and characterisation of *Mycobacterium tuberculosis* and *M. africanum* in sputum samples using shotgun metagenomics on a benchtop sequencer. Doughty EL, Sergeant MJ, Adetifa I, Antonio M, Pallen MJ. 2014, *PeerJ* 2, p. e585.
548. ACIA. Fiche d'information scientifique : Recourir à la science de l'ADN pour lutter contre les maladies d'origine alimentaire. Agence canadienne d'inspection des aliments. [En ligne] 24 11 2017. [Citation : 20 3 2018.] http://www.inspection.gc.ca/DAM/DAM-aboutcfia-sujetacia/STAGING/text-texte/dna_science_1495211893518_fra.pdf.

549. *Tracking a tuberculosis outbreak over 21 years: strain-specific single-nucleotide polymorphism typing combined with targeted whole-genome sequencing.* Stucki D, Ballif M, Bodmer T et al. s.l. : *J Infect Dis.* 2015 Apr 15; 211(8);, 2015, *J Infect Dis*, pp. 1306-16.
550. *Whole Genome Sequencing versus Traditional Genotyping for Investigation of a Mycobacterium tuberculosis Outbreak: A Longitudinal Molecular Epidemiological Study.* Roetzer A, Diel Ret al. 2013, *PLoS Med* 10(2), p. e1001387.
551. *Reemergence and Amplification of Tuberculosis in the Canadian Arctic .* Lee R., Radomski N., Proulx J., Manry J., McIntosh F., Desjardins F., et al. 2015, *J Infect Dis* 211, pp. 1905–1914.
552. *Whole-genome sequencing and social-network analysis of a tuberculosis outbreak.* Gardy JL, Johnston JC, Ho Sui SJ, Cook VJ, Shah L, Brodtkin E, Rempel S, Moore R, Zhao Y, Holt R, Varhol R, Birol I, Lem M, Sharma MK, Elwood K, Jones SJ, Brinkman FS, Brunham RC, Tang P. 2011 , *N Engl J Med* 364(8), pp. 730-9.
553. *Whole-genome sequencing to delineate Mycobacterium tuberculosis outbreaks: a retrospective observational study.* Walker TM, Ip CL, Harrell RH, Evans JT, Kapatai G, Dedicoat MJ, Eyre DW, Wilson DJ, Hawkey PM, Crook DW, Parkhill J, Harris D, Walker AS, Bowden R, Monk P, Smith EG, Peto TE. 2013, *Lancet Infect Dis* 13(2), pp. 137-46.
554. *Rapid, comprehensive, and affordable mycobacterial diagnosis with whole-genome sequencing: a prospective study.* al., L. J Pankhurst et. 2016 , *Lancet Respir Med.*4(1), pp. 49–58.
555. *Rapid Whole-Genome Sequencing of Mycobacterium tuberculosis Isolates Directly from Clinical Samples.* Brown AC, Bryant JM et al. 2015 , *J Clin Microbiol.* 53(7), pp. 2230-7.
556. *Use of multiple markers in population-based molecular epidemiologic studies of tuberculosis.* Rhee, J. T., M. M. Tanaka, M. A. Behr, C. B. Agasino, E. A. Paz, P. C. Hopewell, and P. M. Small. 2000, *Int. J. Tuber. Lung Dis.* 4, pp. 1111-1119.
557. *Comparison of Restriction Fragment Length Polymorphism with the Polymorphic Guanine-Cytosine-Rich Sequence and Spoligotyping for Differentiation of Mycobacterium tuberculosis Isolates with Five or Fewer Copies of IS6110.* al., L. Flores et. 2010, *J. Clin. Microbiol.* vol. 48 no., pp. 575-578.
558. *Genetic diversity & drug sensitivity profiles of Mycobacterium tuberculosis isolates from two slums of Jaipur city, Rajasthan, India.* al., B. Malhotra et. 2017, *Indian J Med Res.* 145(1), pp. 74–83.
559. *Improved preparation of high molecular weight DNA for pulsed-field gel electrophoresis from mycobacteria.* Hughes VM, Stevenson K, Sharp JM. 2001, *J Microbiol Methods.*44(3), pp. 209-15.

560. *Five-year outbreak of community- and hospital-acquired Mycobacterium porcinum infections related to public water supplies.* Brown-Elliott BA, Wallace RJ Jr, Tichindelean C, Sarria JC, McNulty S, Vasireddy R, Bridge L, Mayhall CG, Turenne C, Loeffelholz M. 2011, *J Clin Microbiol.*49(12), pp. 4231-8.

561. *Emergence of nosocomial Mycobacterium massiliense infection in Goiás, Brazil.* Cardoso AM, Martins de Sousa E, Viana-Niero C, Bonfim de Bortoli F, Pereira das Neves ZC, Leão SC, Junqueira-Kipnis AP, Kipnis A. 2008, *Microbes Infect.*10(14-15), pp. 1552-7.

562. *Comparison of PFGE, IS6110-RFLP, and 24-Locus MIRU-VNTR for Molecular Epidemiologic Typing of Mycobacterium tuberculosis Isolates with Known Epidemic Connections.* al., S. Jeon et. 2018, *J. Microbiol. Biotechnol.*28(2), pp. 338–346.

563. *Application of Pulsed Field Gel Electrophoresis for Study of Genetic Diversity in Mycobacterium tuberculosis Strains Isolated From Tuberculosis Patients.* al., A. D. Khosravi et. 2014, *Jundishapur J Microbiol.* 7(5), p. e9963.

564. *Amplified-fragment length polymorphism as a complement to IS6110-based restriction fragment length polymorphism analysis for molecular typing of Mycobacterium tuberculosis.* Ruiz M, Rodríguez JC, Rodríguez-Valera F, Royo G. 2003, *J Clin Microbiol.*41(10), pp. 4820-2.

565. *Combined use of Amplified Fragment Length Polymorphism and IS6110-RFLP in fingerprinting clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis from Kerala, South India.* Krishnan MY, Radhakrishnan I, Joseph BV, Madhavi Latha GK, Ajay Kumar R, Mundayoor S. 2007 , *BMC Infect Dis.* 7(), p. 86.

566. *Genome-sequence-based fluorescent amplified-fragment length polymorphism analysis of Mycobacterium tuberculosis.* Goulding JN, Stanley J, Saunders N, Arnold C. 2000 , *J Clin Microbiol.*38(3), pp. 1121-6.

567. *Experimental versus in silico fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis of Mycobacterium tuberculosis: improved typing with an extended fragment range.* Sims EJ, Goyal M, Arnold C. 2002 , *J Clin Microbiol.* 40(11), pp. 4072-6.

568. *Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms.* Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG. 1998 , *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(6), pp. 3140-5.

569. *A new multilocus sequence analysis scheme for Mycobacterium tuberculosis.* Lu B, Dong HY, Zhao XQ, Liu ZG, Liu HC, Zhang YY, Jiang Y, Wan KL. 2012, *Biomed Environ Sci.*25(6), pp. 620-9.

570. *Multiphasic approach reveals genetic diversity of environmental and patient isolates of Mycobacterium mucogenicum and Mycobacterium phocaicum associated with an outbreak*

of bacteremias at a Texas hospital. Cooksey RC, Jhung MA, Yakrus MA, Butler WR, Adékambi T, Morlock GP, Williams M, Shams AM, Jensen BJ, Morey RE, Charles N, Toney SR, Jost KC Jr, Dunbar DF, Bennett V, Kuan M, Srinivasan A. 2008, Appl Environ Microbiol.74(8), pp. 2480-7.

571. A robust SNP barcode for typing Mycobacterium tuberculosis complex strains. al., F. Coll et. 2014, Nature Communications 5, p. 4812 .

572. Genotyping of genetically monomorphic bacteria: DNA sequencing in Mycobacterium tuberculosis highlights the limitations of current methodologies. Comas I, Homolka S, Niemann S, Gagneux S. 2009, PLoS One 4(11), p. e7815.

573. PERFORMANCE OF DIFFERENT SETS OF SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS (SNP) FOR TYPING MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS(MTB) STRAINS LINEAGE AND MODERN/ANCIENT BEIJING SUBLINEAGE. al., K.M. KAM et. 2017, Respirology 22 (Suppl. 3), p. AO066: 32.

574. Global Phylogeny of Mycobacterium tuberculosis Based on Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Analysis: Insights into Tuberculosis Evolution, Phylogenetic Accuracy of Other DNA Fingerprinting Systems, and Recommendations for a Minimal Standard SNP Set†. al., I. Filliol et. 2006 , J. Bacteriol., pp. 759-772.

575. Lineage-specific SNPs for genotyping of Mycobacterium tuberculosis clinical isolates. al., H-Y Dou et. 2017, Sci Rep. 7, p. 1425.

576. Two New Rapid SNP-Typing Methods for Classifying Mycobacterium tuberculosis Complex into the Main Phylogenetic Lineages. al., D. Stucki et. 2012, PLoS One. 7(7), p. e41253.

577. An application of competitive reporter monitored amplification (CMA) for rapid detection of single nucleotide polymorphisms (SNPs). al., J. Havlicek et. 2017, PLoS One, 12(8), p. e0183561.

578. Apports des marqueurs moléculaires dans l'analyse des mécanismes d'acquisition et dans le suivi des infections nosocomiales. Bingen, P. Bidet et E. (supplement 1) , Paris : mt pédiatrie , 2012 , Vol. 15. 46-61.

579. PRINCIPE ET INTERET DU TYPAGE MOLECULAIRE APPLIQUE A MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS . Gutierrez, V. Vincent et M.-C. 320 , Paris : Revue française des laboratoires, 2000, Vol. 2000. 25-30.

580. A study to evaluate pattern of rifampicin resistance in cases of sputum positive pulmonary tuberculosis. Ganguly J., Ray S., Nandi S., Halder S., Kundu S., Mandal A. 2015, J Evol Med Dent Sci 4, pp. 4762–4768.

581. *La résistance de Mycobacterium tuberculosis aux antituberculeux : méthodes diagnostiques.* C. Loïez-Durocher, A. Vachée, N. Lemaitre. 2000, *Annales de Biologie Clinique* 58(3), pp. 291-7.
582. *Evaluation of direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex in respiratory and non-respiratory clinical specimens using the Cepheid Gene Xpert® system .* Al-Ateah S.M., Al-Dowaidi M.M., El-Khizzi N.A. 2012, *Saudi Med J.*, pp. 1100–1105.
583. *Rapid molecular detection of extrapulmonary tuberculosis by the automated GeneXpert MTB/RIF system.* Hillemann D., Rusch-Gerdes S., Boehme C., Richter E. 2011, *J Clin Microbiol.*, pp. 1202–1205.
584. *Xpert MTB/RIF test for diagnosing pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults.* Steingart KR, Schiller I, Horne DJ, Pai M, Boehme CC, Dendukuri N. 2014, *Cochrane Database of Systematic Reviews Issue 1.* Art. .
585. *Real-Life Clinical Practice of Using the Xpert MTB/RIF Assay in Thailand.* K. Kawkitinarong, G. Suwanpimolkul et al. 2017, *Clinical Infectious Diseases* 64(suppl_2), pp. S171-S178.
586. *Performance of the Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of pulmonary tuberculosis and rifampin resistance in a low-incidence, high-resource setting.* Rice J. P., Seifert M., Moser K. S., & Rodwell T. C. 2017, *PloS one* 12(10), p. e0186139.
587. *Rifampicin Resistance and Multidrug-Resistant Tuberculosis Detection Using Xpert MTB/RIF in Wuhan, China: A Retrospective Study.* Huang, H., Zhang, Y., Li, S., Wang, J., Chen, J., Pan, Z., & Gan, H. 2017, *Microbial Drug Resistance*, pp. 1-5.
588. *Xpert MTB/RIF for rapid detection of rifampicin-resistant Mycobacterium tuberculosis from pulmonary tuberculosis patients in Southwest Ethiopia.* Tadesse M., Aragaw D., Dimah B., Efa F., & Abebe G. 2016, *International journal of mycobacteriology* 5, pp. S48-S49.
589. *Drug resistance patterns among extra-pulmonary tuberculosis cases in a tertiary care centre in North India .* Sharma, S. K., Chaubey, J., Singh, B. K., Sharma, R., Mittal, A., & Sharma, A. 2017, *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 21(10), pp. 1112-1117.
590. *Rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis with Xpert Mycobacterium tuberculosis/rifampicin assay.* al., Li Yan et. 2017, *Journal of medical microbiology* 66 (7), pp. 910-914.
591. *GeneXpert: A new tool for the rapid detection of rifampicin resistance in mycobacterium tuberculosis.* al., M. Saeed et. 2017, *The Journal of the Pakistan Medical Association* 67(2), pp. 270-274.

592. *An evaluation of false-positive rifampicin resistance on the Xpert MTB/RIF*. Cayci, Y. T., Bilgin, K., Coban, A. Y., Birinci, A., & Durupinar, B. 2017, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 112(11), pp. 756-759.
593. *An evaluation of the Xpert MTB/RIF assay and detection of false-positive rifampicin resistance in Mycobacterium tuberculosis*. Williamson, D. A., Basu, I., Bower, J., Freeman, J. T., Henderson, G., & Roberts, S. A. 2012, *Diagnostic microbiology and infectious disease* 74(2), pp. 207-209.
594. *False-positive rifampin resistant results with Xpert MTB/RIF version 4 assay in clinical samples with a low bacterial load*. Ocheretina, O., Byrt, E., Mabou, M. M., Royal-Mardi, G., Merveille, Y. M., Rouzier, V., ... & Pape, J. W. 2016, *Diagnostic microbiology and infectious disease* 85(1), pp. 53-55.
595. *Performance of the Xpert MTB/RIF Assay on Nonrespiratory Specimens and Accuracy of This Assay for Detection of Rifampin Resistance in a Low-Prevalence Setting*. Frei, A. Blaiç et R. 2014 , *J Clin Microbiol*. 52(2), p. 706.
596. *Rapid and effective diagnosis of tuberculosis and rifampicin resistance with Xpert MTB/RIF assay: a meta-analysis*. al., K. Chang et. 2012, *J Infect*. 64(6), pp. 580-588.
597. *Comparison of two molecular methods for rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis*. al, M. Causse et. 2011 , *J Clin Microbiol*.49(8), pp. 3065-7.
598. *Xpert® MTB/RIF: Usefulness for the diagnosis of tuberculosis and resistance to rifampicin*. al., A. V. Gómez et. 2017, *Medicina Clínica (English Edition)*, pp. 399-405.
599. *Xpert MTB/RIF Ultra for detection of Mycobacterium tuberculosis and rifampicin resistance: a prospective multicentre diagnostic accuracy study*. SE Dorman, SG Schumacher et al. 2017, *The Lancet Infectious Diseases* 18(1), pp. 76-84.
600. *Test diagnostique rapide pour la méningite tuberculeuse*. al., Bahr NC et. *Relevé des maladies transmissibles au Canada (RMTC) 44-3/4, ACTUALITÉS SUR LES MALADIES INFECTIEUSES*, p. 106.
601. WHO. *TB detection and diagnosis*. World Health Organization. [En ligne] 20 January 2017. [Citation : 07 04 2018.] <http://www.who.int/tb/areas-of-work/laboratory/en/>.
602. —. *Implementing tuberculosis diagnostics: policy framework*. Geneva : World Health Organization , 2015.
603. *Evaluation of the INNO-LiPA Rif. TB assay, a reverse hybridization assay for the simultaneous detection of Mycobacterium tuberculosis complex and its resistance to rifampin*. Rossau R, Traore H, De Beenhouwer H, Mijs W, Jannes G, De Rijk P, Portaels F. 1997 , *Antimicrob Agents Chemother*.41(10), pp. 2093-8.

604. *Direct Application of the INNO-LiPA Rif.TB Line-Probe Assay for Rapid Identification of Mycobacterium tuberculosis Complex Strains and Detection of Rifampin Resistance in 360 Smear-Positive Respiratory Specimens from an Area of High Incidence of MDR-TB.* al., M. Viveiros et. 9, s.l. : J Clin Microbiol., 2005, Vol. 43. 4880–4884.
605. *Use of the INNO LiPA Rif.TB for detection of Mycobacterium tuberculosis DNA directly in clinical specimens and for simultaneous determination of rifampin susceptibility.* E. Tortoli, F.Marcelli. 2007, *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 26(1), pp. 51–55.
606. *EXPERT GROUP. MOLECULAR LINE PROBE ASSAYS FOR RAPID SCREENING OF PATIENTS AT RISK OF MULTI-DRUG RESISTANT TUBERCULOSIS (MDR-TB).* Geneva : WHO, 2008.
607. *Performance assessment of the GenoType MTBDRplus test and DNA sequencing in detection of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis.* Huang WL, Chen HY, Kuo YM, Jou R. 2009, *J Clin Microbiol.*47, pp. 2520-4.
608. *The diagnostic accuracy of the MTBDRplus and MTBDRsl assays for drug-resistant TB detection when performed on sputum and culture isolates.* M. Tomasicchio, G. Theron, E. Pietersen, E. Streicher, D. Stanley-Josephs, P. v. Helden, R. Warren & K. Dheda. 2016, *Scientific Reports* volume 6, p. 17850 .
609. *Molecular drug susceptibility testing in the Netherlands: performance of the MTBDRplus and MTBDRsl assays.* Simons, S. O., Van der Laan, T., De Zwaan, R., Kamst, M., Van Ingen, J., Dekhuijzen, P. N. R., ... & van Soolingen, D. 2015, *The international journal of tuberculosis and lung disease* 19(7), pp. 828-833.
610. *Evaluation of MTBDRplus and MTBDRsl in Detecting Drug-Resistant Tuberculosis in a Chinese Population.* al., Wei Lu et. 2016, *Disease Markers*, p. 9 .
611. *Diagnostic Performance of the GenoType MTBDRplus and MTBDRsl Assays to Identify Tuberculosis Drug Resistance in Eastern China.* al., Q. Liu et. 2017, *Chin Med J (Engl)* 130(13), pp. 1521–1528.
612. *Diagnostic Plausibility of MTBDRplus and MTBDRsl Line Probe Assays for Rapid Drug Susceptibility Testing of Drug Resistant Mycobacterium tuberculosis Strains in Pakistan.* al., M. Javaid and. 2016, *Int J Infect.* 3(3), p. e34903.
613. *GenoType MTBDRplus assay for molecular detection of rifampin and isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis strains and clinical samples.* Lacoma A, Garcia-Sierra N, Prat C, Ruiz-Manzano J, Haba L, Rosés S, et al. 2008, *J Clin Microbiol.*46, pp. 3660-7.

614. *Evaluation of the GenoType MTBDR assay for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis isolates.* Cavusoglu C, Turhan A, Akinci P, Soyler I. 2006, *J Clin Microbiol.*44, pp. 2338-42.
615. *Genotype MTBDRplus for direct detection of Mycobacterium tuberculosis and drug resistance in strains from gold miners in South Africa.* Dorman SE, Chihota VN, Lewis JJ, van der Meulen M, Mathema B, Beylis N, et al. 2012, *J Clin Microbiol.*50, pp. 1189-94.
616. *Comparative evaluation of GenoType MTBDR plus line probe assay with solid culture method in early diagnosis of multidrug resistant tuberculosis (MDR-TB) at a tertiary care centre in India.* Yadav RN, Singh BK, Sharma SK, Sharma R, Soneja M, Sreenivas V, et al. 2013, *PLoS One* 8, p. e72036.
617. *Performance of the GenoType® MTBDRPlus assay in routine settings: A multicenter study.* Mironova S, Pimkina E, Kontsevaya I, Nikolayevskyy V, Balabanova Y, Skenders G, et al. 2012, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*31, pp. 1381-7.
618. *Feasibility of the GenoType MTBDRsl Assay for Fluoroquinolone, Amikacin-Capreomycin, and Ethambutol Resistance Testing of Mycobacterium tuberculosis Strains and Clinical Specimens.* D. Hillemann, S. Rüscher-Gerdes and E. Richter. 2009, *J Clin Microbiol.* 47(6), pp. 1767-1772.
619. *Mutations in gyrA and gyrB among fluoroquinolone-and multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates.* Chien, J. Y., Chiu, W. Y., Chien, S. T., Chiang, C. J., Yu, C. J., & Hsueh, P. R. 2016, *Antimicrobial agents and chemotherapy* 60(4), pp. 2090-2096.
620. *Diagnostic Plausibility of MTBDRplus and MTBDRsl Line Probe Assays for Rapid Drug Susceptibility Testing of Drug Resistant Mycobacterium tuberculosis Strains in Pakistan.* al, M. Javaid et. 2016, *Int J Infect.* 3(3), p. e34903.
621. *Evaluation of genetic mutations associated with Mycobacterium tuberculosis resistance to amikacin, kanamycin and capreomycin: a systematic review.* Georgiou SB, et al. 2012, *PLoS One.*7(3), p. e33275.
622. *Association between embB mutations and ethambutol resistance in Mycobacterium tuberculosis isolates from Cuba and the Dominican Republic: reproducible patterns and problems.* Guerrero E., et al. 2013 , *Rev Argent Microbiol.*45(1), pp. 21-6.
623. WHO. *The use of molecular line probe assays for the detection of mutations associated with resistance to.* Geneva : World Health Organization, 2016.
624. *Performance of the New Version (v2.0) of the GenoType MTBDRsl Test for Detection of Resistance to Second-Line Drugs in Multidrug-Resistant Mycobacterium tuberculosis Complex Strains.* Brossier F, et al. 2016, *J Clin Microbiol.*54(6), pp. 1573-80.

625. *Whole genome sequencing of Mycobacterium tuberculosis for detection of drug resistance: a systematic review.* Papaventsis, D., Casali, N., Kontsevaya, I., Drobniewski, F., Cirillo, D. M., & Nikolayevskyy, V. 2017, *Clinical Microbiology and Infection* 23(2), pp. 61-68.
626. *Multidrug-resistant tuberculosis around the world: what progress has been made?* D. Falzon, F. Mirzayev, F. Wares, I.G. Baena, M. Zignol, N. Linh, et al. 45, s.l. : *Eur Respir J.*, 2015. 150-160.
627. *Clinical implications of molecular drug resistance testing for Mycobacterium tuberculosis: a TBNET/RESIST-TB consensus statement.* J. Dominguez, E.C. Boettger, D. Cirillo, F. Cobelens, K.D. Eisenach, S. Gagneux, et al. 20, s.l. : *Int J Tuberc Lung Dis.*, 2016. 24-42.
628. *Rifampin drug resistance tests for tuberculosis: challenging the gold standard.* A. Van Deun, K.J. Aung, V. Bola, R. Lebeke, M.A. Hossain, W.B. de Rijk, et al. s.l. : *J Clin Microbiol.*, 2013, Vol. 51. 2633-2640.
629. *Discordance across phenotypic and molecular methods for drug susceptibility testing of drug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates in a low TB incidence country.* S. Ahmad, E. Mokaddas, N. Al-Mutairi, H.S. Eldeen, S. Mohammadi. 11, s.l. : *PLoS One*, 2016. e0153563.
630. *Global tuberculosis report.* Organization, World Health. s.l. : *World Health Organization* , 2017.
631. O.LAHLOU. *Diagnostic moléculaire de la tuberculose et structure génotypique de la population du complexe Mycobacterium tuberculosis au Maroc.* rabat : université mohammed V, 2016.
632. *Characterization of Mycobacterium orygis as M.tuberculosis complex subspecies. al,* J.V.Ingen and. 2012, *Emerging Infectious Diseases* , pp. 653-655.
633. *Effects of infection and disease with Mycobacterium tuberculosis on serum antibody to glucan and arabinomannan: two surface polysaccharides of this pathogen.* W. A Keitel, ZhongDong Dai et al. 2013, *Bio Med Central*, p. 276.
634. *Tuberculosis transmission by patients with smear-negative pulmonary tuberculosis in a large cohort in the Netherlands.* Tostmann A, Kik SV, Kalisvaart NA, Sebek MM, Verver S, Boeree MJ, van Soolingen D. 2008, *clinical infectious diseases*, pp. 1135-42.
635. *Épidémiologie de la tuberculose . Groupe de travail du conseil supérieur d'hygiène publique de France.* 2004, *Médecine et maladies infectieuses* 34, pp. 344–349.

636. *Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliary tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of cost-effectiveness.* . Trunz BB, Fine P, Dye C. 2006, *Lancet*, pp. 1173-80.
637. *Current perspective in tuberculosis vaccine development for high TB.* A. A. Husain, H. F. Daginawala, L. Singh, R. S. Kashyap. 2016, *Tuberculosis* 98, pp. 149-158.
638. *La tuberculose multirésistante: extension, menace et solutions.* Zellweger, J. P. 2011, *Revue des maladies respiratoires* 28, pp. 1025-1033.
639. *La résistance de Mycobacterium tuberculosis aux antituberculeux : méthodes diagnostiques.* C. Loïez-Durocher, A. Vachée, N. Lemaitre. 2000, *Annales de Biologie Clinique*, pp. 291-7.
640. *Performance of an IS6110-based PCR assay and the Cobas Amplicor MTB PCR system for detection of Mycobacterium tuberculosis complex DNA in human lymph node samples.* Rimek, D., S. Tyagi, and R. Kappe. 2002, *J. Clin. Microbiol.*, pp. 3089-3092.
641. *XpertW MTB/RIF assay for tuberculosis diagnosis: evaluation in an Indian setting.* V. P. Myneedu, D. Behera, A. K. Verma, M. Bhalla, N. Singh, J. Arora, R. Singhal, M. Mathur, P. Lal, R. Sarin. 2014, *INT J TUBERC LUNG DIS* 18, pp. 958–960.
642. *Diagnosis of lymph node tuberculosis using the GeneXpert MTB/RIF in Tunisia.* Ghariani, A., Jaouadi, T., Smaoui, S., Mehiri, E., Marouane, C., Kammoun, S., ... & Slim-Saidi, L. 2015, *International journal of mycobacteriology*, pp. 270-275.
643. *The Diagnostic Performance of a Single GeneXpert MTB/RIF Assay in an Intensified Tuberculosis Case Finding Survey among HIV-Infected Prisoners in Malaysia.* H. A. A. Al-Darraj, H. Abd Razak, K. Peng Ng, F. L. Altice, A. Kamarulzaman. 2013, *Plos One*, p. e73717.
644. *Recent advances in the laboratory diagnosis of tuberculosis.* R. Teran, J. H. de Waard. 2015, *JFCC*, pp. 295-309.
645. [En ligne] http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/index.jsp.
646. *High genetic diversity among Mycobacterium tuberculosis strains in Tehran, Iran.* T. Azimi, M. J. Nasiri et al. 2018, *Journal of Clinical Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases* 11, pp. 1-6.
647. *Comparison of an Automated Repetitive Sequence-based PCR Microbial Typing System with IS6110-Restriction Fragment Length Polymorphism for Epidemiologic Investigation of Clinical Mycobacterium tuberculosis Isolates in Korea.* M. H. Jang, G. E. Choi et al. 2011, *Korean J Lab Med.* 31(4), pp. 282–284.

648. *[Evaluation of the Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of pulmonary and extrapulmonary tuberculosis in an intermediate-prevalence setting]. S., Ozkutuk N et Surucüoglu. 2014, Mikrobiyol Bul., pp. 223-232.*

649. *Performance du GeneXpert MTB/RIF® dans le diagnostic de la tuberculose extra-pulmonaire à Dakar: 2010-2015. al, Diallo A. B.et. 2016, The Pan African Medical Journal, pp. 1-10.*

650. *The diagnostic accuracy of the MTBDRplus and MTBDRsl assays for drug-resistant TB detection when performed on sputum and culture isolates. Tomasicchio, M. et al. 2015, Sci. Rep. 6, p. 17850.*

651. *Rich, F. Varaine et M. L. Tuberculose. s.l. : Médecins Sans Frontières et Partners In Health, 2014.*

Serment d'Hippocrate

Au moment d'être admis à devenir membre de la profession médicale, je m'engage solennellement à consacrer ma vie au service de l'humanité.

- *Je traiterai mes maîtres avec le respect et la reconnaissance qui leur sont dus.*
- *Je pratiquerai ma profession avec conscience et dignité. La santé de mes malades sera mon premier but.*
- *Je ne trahirai pas les secrets qui me seront confiés.*
- *Je maintiendrai par tous les moyens en mon pouvoir l'honneur et les nobles traditions de la profession médicale.*
- *Les médecins seront mes frères.*
- *Aucune considération de religion, de nationalité, de race, aucune considération politique et sociale ne s'interposera entre mon devoir et mon patient.*
- *Je maintiendrai le respect de la vie humaine dès la conception.*
- *Même sous la menace, je n'userai pas de mes connaissances médicales d'une façon contraire aux lois de l'humanité.*
- *Je m'y engage librement et sur mon honneur.*

قسم أبقراط

بسم الله الرحمن الرحيم

أقسم بالله العظيم

في هذه اللحظة التي يتم فيها قبولي عضوا في المهنة الطبية أتعهد علانية:

- أنا أكرس حياتي لخدمة الإنسانية.
 - وأن أحترم أساتذتي وأعترف لهم بالجميل الذي يستحقونه.
 - وأن أمارس مهنتي بوانع من ضميري وشر في جاعلا صحة مريض هدي في الأول.
 - وأن لا أفشي الأسرار المعهودة إلي.
 - وأن أحافظ بكل ما لدي من وسائل على الشرف والتقاليد النبيلة لمهنة الطب.
 - وأن أعتبر سائر الأطباء إخوة لي.
 - وأن أقوم بواجبي نحو مرضاي بدون أي اعتبار ديني أو وطني أو عرقي أو سياسي أو اجتماعي.
 - وأن أحافظ بكل حزم على احترام الحياة الإنسانية منذ نشأتها.
 - وأن لا أستعمل معلوماتي الطبية بطرق يضر بحقوق الإنسان مهما لاقيت من تهديد.
 - بكل هذا أتعهد عن كامل اختياري ومقسما بالله.
- والله على ما أقول شهيد .

**مساهمة تقنيات البيولوجيا الجزيئية في تشخيص السل، تقييم
المقاومة للأدوية المضادة لهذا المرض وفي دراسة
المؤشرات الوبائية.**

أطروحة:

.....قدمت ونوقشت علانية يوم.....

من طرف

الآنسة: أسماء أوسكين

المزودة في 15 يناير 1991 بسلا

لنيل شهادة الدكتوراه في الطب

الكلمات الأساسية: السل - البيولوجيا الجزيئية - التشخيص - المقاومة - المؤشر الوبائي.

تحت إشراف اللجنة المكونة من الأساتذة:

رئيس

السيد: أحمد كوزي

أستاذ في طب الأطفال

مشرف

السيد: ميمون زوهدي

أستاذ في علم البكتيريا

السيدة: مريمة الشادلي

أستاذة في علم البكتيريا

السيدة: سكيمة الحمزاوي

أستاذة في علم البكتيريا

السيد: ياسين سخسوح

أستاذ في علم البكتيريا

أعضاء