



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Microbiologie

قسم : الميكروبيولوجيا

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie Générale Et Biologie Moléculaire Des Microorganismes

Intitulé :

Diagnostic bactériologique de la tuberculose. Étude prospective de trois mois au CHU Benbadis Constantine

Présenté et soutenu par : *BENGUEDOUAR Amira Rahma*

Le : 26/06/2016

ARROUF Ikram Rayene

Jury d'évaluation :

Président du jury : *AITKAKI Zahia* (Pr. – Univ3 Constantine).

Rapporteur : *OULMI Lamia* (MCB - UFM Constantine).

Examineur : *HECINI Abba* (MCB – Univ3 Constantine).

*Année universitaire
2015 - 2016*

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail de mémoire de Master, nous tenons à remercier :

Tout d'abord, Madame OULMI L., Maître de conférences à l'Université des Frères Mentouri-Constantine, l'encadreur de ce mémoire, pour son aide précieuse, ses conseils et pour le temps qu'elle a bien voulu nous consacrer.

Nous voudrions présenter, nos remerciements et notre vive gratitude à Madame AITKAKI Z., chef de l'unité de la tuberculose du laboratoire de Bactériologie de CHU Constantine pour nous avoir accueillie dans son laboratoire et d'avoir accepté de présider le jury de notre de mémoire.

Nous remercions aussi Madame, Hecini A., Maître de conférences à l'Université 3 Constantine, d'avoir accepté de superviser notre travail.

Nous tenons à remercier également le personnel de l'unité de la tuberculose, qui ont eu la gentillesse de nous accueillir les bras ouverts.

Nos remerciements s'étendent également à tous les professeurs que nous avons eu durant nos années d'études.

En fin, nous souhaitons adresser tous nos remerciements aux personnes qui nous ont apporté leur soutien et qui ont ainsi contribué à la réalisation de ce mémoire.

DEDICACE

A mes chers parents

En hommage à tous les sacrifices que vous avez consentis pour moi. Je vous remercie pour tous les précieux conseils que vous m'avez donnés.

Grace à votre présence constante à mes côtés, j'ai pu forger ma personnalité, pousser mes ambitions encore plus loin, et encore merci d'avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui.

Aucune dédicace, ne saurait exprimer réellement mon profond amour, mon respect et ma vive gratitude. Que le Tout Puissant vous donne longue vie et vous protège pour moi.

Veillez trouver dans ce travail le fruit de vos sacrifices, et j'espère être à la hauteur de vos espérances et votre fierté.

A mon frère bien aimé Mohamed Soheib, et à mes adorables sœurs : Rayene et Zeineb, merci pour m'avoir conseillé et soutenu durant ce cursus.

Aux prunelles de mes yeux : Mariah et Maram.

A ma chère amie et binôme, Ikram.

Amira Rahma

Dédicace

A ma très chère mère

Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi. Tu m'as comblée avec ta tendresse tout au long de mon parcours, tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études, tu as toujours été présente à mes côtés pour me consoler quand il fallait. En ce jour mémorable, pour moi ainsi que pour toi, reçoit ce travail en signe de ma vive reconnaissance et ma profonde estime. Puisse le tout puissant te donner santé, bonheur et longue vie afin que je puisse te combler à mon tour.

Mon cher frère « Mohamed Amine » et ma très chère sœur « Kenza » et ses poussins « Tadj El dinne et Djawad ».

Sans oublier mes très chères sœurs et fidèles amies : « Amira », « Soumia », « Yasmine », « Lina », « Rania », « Nardjess » et « Kenza ».

Ikram Rayene

Résumé

La tuberculose est une maladie infectieuse due au bacille de Koch. La forme pulmonaire de loin la plus fréquente est celle qui pose un problème de santé publique étant la forme de dissémination et de contagion de la maladie. La forme extra-pulmonaire considérée autre fois rare reste d'actualité.

Au cours de notre stage au sein du laboratoire de Bactériologie du Centre-Hospitalo-Universitaire Benbadis Constantine, notre objectif était de rechercher *M. tuberculosis* dans les produits pathologiques via des techniques conventionnelles du diagnostic bactériologique d'une tuberculose, et de réaliser une étude prospective sur une période de trois mois.

La recherche de bacilles acido-alcool-résistants par microscopie après coloration à l'auramine (confirmation par celle de Ziehl-Neelsen), et la mise en culture sur milieu Löwenstein-Jensen constituent les méthodes de référence qu'on a employée pour son diagnostic microbiologique.

À travers cette étude, nos résultats ont déclaré 40 patients différents, 80 % à localisation pulmonaire (n = 32), 20 % à localisation extra-pulmonaire (n = 8). Toutefois cette prédominance est observée chez les femmes (62,5 %) que chez les hommes (37,5 %).

Les techniques traditionnelles de microscopie et de culture restent indispensables du diagnostic de certitude de cette maladie. Toutefois, il serait plus utile d'introduire de nouveaux outils (moléculaire) dans la pratique clinique de routine afin d'optimiser la lutte contre la tuberculose en diminuant le délai du diagnostic, allant même jusqu'à la détection rapide de la résistance aux antituberculeux.

Mots clés : Tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis*, bacille de Koch (BK), diagnostic bactériologique, complexe tuberculeux

Name and surname : BENGUEDOUAR Amira Rahma –ARROUF Ikram Rayene

Title: Bacteriological diagnosis of tuberculosis. Prospective study of three months inside the CHU Benbadis Constantine.

Abstract:

Tuberculosis is an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis*. The pulmonary form is more common; it's the one that poses a public health problem being the form of dissemination and spread of the disease. Extra-pulmonary form once considered rare remains valid.

During our internship in the Bacteriology Laboratory of the University Health Centre Benbadis of Constantine, our goal was to investigate *M. tuberculosis* in pathological products by conventional techniques of bacteriological diagnosis of tuberculosis, including a study prospectively over a period of three months.

The search for acid-fast bacilli by microscopy after staining with auramine (confirmation by the Ziehl-Neelsen) and culturing on Lowenstein-Jensen medium is the reference methods we used for its microbiological diagnosis.

Through this study, the results show a clear prevalence of pulmonary tuberculosis (80%), unlike the extra-pulmonary forms, which represented only 20% of cases. However, this dominance is seen in women (57.5%) than men (37.5%), the remaining 5% are attributed to two children.

We proved through this work that the incidence of pulmonary form is much more common than extra-pulmonary form whose frequency is occasional or rare. Traditional techniques of microscopy and culture remain essentials definitive diagnosis of this disease. However, it would be useful to introduce new tools (molecular) in routine clinical practice to optimize the fight against tuberculosis by reducing the time of diagnosis, even to the rapid detection of drug resistance.

Keywords: Tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, Koch bacilli (BK), bacteriological diagnosis, *Mycobacterium tuberculosis* complex.

الاسم و اللقب: بن قديوار أميرة رحمة ، عروف إكرام ريان
عنوان البحث: تشخيص داء السل داخل المستشفى الجامعي بقسنطينة
دارسة تقديرية لمدة ثلاثة أشهر.

ملخص:

يعتبر داء السل مرضا معديا ينتج عن بكتيريا تدعى " عصيات كوخ". إن الشكل الرئوي هو الذي يسبب مشكلة بالصحة العمومية بشكله المنتشر والناقل للمرض. و يعتبر الشكل الغير الرئوي موضوع الساعة .
خلال تربصنا بمخبر البكتيريا بالمركز الجامعي الاستشفائي بن باديس بقسنطينة كان هدفنا هو التشخيص البكتيري للكشف عن *tuberculosis Mycobacterium* في العينات المرضية باستعمال التقنيات الميكروبيولوجية التقليدية من جهة ومن جهة أخرى لتحقيق دراسة تقديرية خلال مدة هذا التربص (3 أشهر).
إن البحث عن البكتيريا المقاومة للحمضيات و الكحول عن طريق المجهر بعد القيام بتلوينها بال- Auramine (يتم التحقق عن طريق تقنية Ziehl-Neelsen) والزراعة في الوسط الانتقائي Löwenstein-Jensen تشكل الطرق المرجعية التي وظفناها في التشخيص الميكروبيولوجي.
من خلال هذه الدراسة، تؤكد أغلبية النتائج أن داء السل الرئوي موجود بنسبة 80% عكس الشكل الغير الرئوي الذي لا يمثل إلا 20% من الحالات، و مع ذلك لوحظت هذه الأغلبية لدى النساء بـ 57,5% أما لدى الرجال فلا تمثل إلا 37,5% و 5% الباقية لطفلين.
لقد أثبتنا من خلال هذه الدراسة أن الشكل الرئوي متكرر الحدوث بشكل جلي مقارنة مع الشكل الغير الرئوي الذي يعتبر حدوثه عرضيا و نادرا.
من أجل دعم مقاومة مرض السل يجب التقليل من مدة التشخيص بإدخال تقنيات جزيئية الفحوصات السريرية الروتينية.

الكلمات المفتاحية: داء السل، *Mycobacterium tuberculosis*، عصيات كوخ, *complexe tuberculeux*، تشخيص بكتيري.

Table des matières

Remerciements	
Dédicaces	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Résumés	
INTRODUCTION.....	1

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

1°/ L'infection tuberculeuse.....	3
2°/ Le complexe tuberculeux	4
3°/ Propriétés générales de <i>M. tuberculosis</i>	4
3-1 Structure	4
3-2 Croissance	6
3-3 Virulence	7
3-4 Mode de transmission	8
3-5 Physiopathologie	9
4°/Diagnostic bactériologique d'une tuberculose.....	10
4-1 Méthodes conventionnelles	10
4-1-1 Examen microscopique.....	10
4-1-2 La culture	11
4-2 Systèmes automatisés de détection de la croissance mycobactérienne.....	11
4-3 Diagnostic moléculaire	12
4-3-1Détection de <i>M. tuberculosis</i> directement dans les échantillons cliniques.....	12
4-3-2 Identification des espèces mycobactériennes en culture	13
4-3-3 La spectrométrie de masse type MALDI-TOF.....	14
5°/ Traitement de la tuberculose	15
5-1 Traitement prophylactique.....	15
5-2 Traitement curatif.....	15
6°/ Résistance du complexe tuberculeux aux antibiotiques antituberculeux.....	16
6-1 Résistance naturelle	16
6-2 Résistance acquise.....	17

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1°/ Réception et traitements des échantillons biologiques.....	19
1-1 Recueil et transport des prélèvements.....	19
1-2 Fiche de renseignement.....	19
1-3 le matériel biologique.....	19
1-3-1 Les échantillons prélevés de sites non stériles.....	19

1-3-2 Les échantillons prélevés de sites stériles	20
2°/ Traitement des prélèvements (décontamination et fluidification).....	21
2-1 Traitement d'échantillon des crachats.....	22
2-2 Traitement des échantillons de pus.....	22
2-3 Traitement des échantillons des biopsies.....	22
3°/ Confection des frottis.....	22
4°/ Recherche des BAAR après coloration.....	23
4-1 Coloration de Dugommier à l'auramine.....	23
4-2 Coloration de Ziehl-Neelsen.....	24
5°/ Culture des échantillons.....	24

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

1°/ Recueil des prélèvements.....	26
2°/ Recherche des BAAR par l'examen microscopique des frottis.....	32
3°/ Recherche des colonies de <i>M. tuberculosis</i> après mise en culture.....	34
4°/ Épidémiologie descriptive.....	37
4-1 Répartition de la tuberculose selon le sexe.....	39
4-2 Répartition de la tuberculose en fonction des services.....	41
4-3 Répartition de la tuberculose selon la nature des échantillons.....	41
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	44
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	45

ANNEXES

Liste des figures

- Figure 1 :** Arbre phylogénique selon la méthode des distance NJ construit d'après les séquences du gène qui code pour le 16S rRNA qui montre la position phylogénique des espèces type du complexe tuberculeux.....4
- Figure 2 :** Représentation schématique de l'enveloppe mycobactérienne et de ses principaux constituants.....8
- Figure 3 :** schéma représentatif des principales localisations de la tuberculose extra-pulmonaire.....11
- Figure 4 :** photographies des cultures positives obtenues sur milieu Löwenstein-Jensen après 42 jours d'incubation, prises à l'aide d'un téléphone portable Samsung Galaxy S4. (a) : culture indénombrable, (b) : culture dénombrable.....35
- Figure 5 :** Représentation en histogrammes des résultats des cultures des échantillons pulmonaires sur milieu Löwenstein-Jensen.....36
- Figure 6 :** Représentation en histogrammes des résultats des cultures des échantillons extra-pulmonaires sur milieu Löwenstein-Jensen durant les trois mois36
- Figure 7 :** Représentation des cas de tuberculose pulmonaires selon le sexe durant les trois mois.....40
- Figure 8 :** Représentation des cas de tuberculose extra-pulmonaires selon le sexe durant les trois mois.....41

La liste des tableaux

Tableau 1 : répartition des échantillons recueillis selon leur nature.....	26
Tableau 2- a : Répartition des échantillons pulmonaires selon les services durant le mois de Janvier.....	27
Tableau 2-b : Répartition des échantillons pulmonaires selon les services durant le mois de Février.....	28
Tableau 2-c : Répartition des échantillons pulmonaire selon les services durant le mois de Mars.....	28
Tableau 3-a : Répartition des échantillons extra-pulmonaire selon les services durant le mois de Janvier.....	29
Tableau 3-b : Répartition des échantillons extra-pulmonaires selon les services durant le mois de Février.....	30
Tableau 3-c : Répartition des échantillons extra-pulmonaire selon les services durant le mois de Mars.....	31
Tableau 4-a : résultats de l'examen microscopique après coloration à l'auramine des échantillons pulmonaires obtenus au cours des trois mois.....	32
Tableau 4-b : Les résultats de l'examen microscopique après coloration à l'auramine des échantillons extra-pulmonaires obtenus au cours des trois mois.....	32
Tableau 5-a : résultats des cultures des échantillons pulmonaires sur le milieu Löwenstein-Jensen.....	35
Tableau 5-b : Les résultats des cultures des échantillons extra-pulmonaires sur le milieu Löwenstein-Jensen obtenus selon le mois.....	36
Tableau 6-a : les résultats de la bacilloscopie et de la culture des produits pathologiques pulmonaires durant les trois mois.....	38
Tableau 6-b : les résultats de la bacilloscopie et de la culture des produits pathologiques extra-pulmonaires durant les trois mois.....	38
Tableau 7-a : répartition des cas de tuberculose pulmonaires selon le service (patients de sexe masculin).....	39
Tableau 7-b : Répartition des cas de tuberculose pulmonaire selon le service (patients de sexe féminin).....	40
Tableau 8-a : répartition des cas de tuberculose extra-pulmonaire selon le service (patients de sexe masculin).....	40
Tableau 8-b : répartition des cas de tuberculose extra-pulmonaire selon le service (patients de sexe féminin).....	40

Introduction

Maladie contagieuse, et réputée comme étant la maladie des pauvres par excellence, la tuberculose a fait et continue à faire des dégâts considérables dans le monde entier. Elle est responsable chaque année du plus grand nombre de décès dans le monde (près de 1,5 millions par an), plus que le paludisme, le choléra, la diphtérie...et tant d'autres maladies infectieuses réunies.

L'organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime que le tiers de l'humanité (entre 1,7 à 2 milliards de personnes), est infecté par le bacille de Koch (*Mycobacterium tuberculosis*), frappant principalement la tranche d'âge 15-50 ans, c'est-à-dire la période la plus productive de la vie des individus, ce qui explique l'incidence de la maladie du point de vue économique.

C'est la forme pulmonaire, de loin la plus fréquente, et surtout celle qui pose un problème de santé publique. En diminution constante dans les pays riches, elle a reconquis un regain d'intérêt dans les pays pauvres du fait de la survenue de la pandémie du VIH, des conditions socio-économiques précaires et la résistance aux antituberculeux. Les formes extra-pulmonaires autrefois considérées comme très rares, sont revenues à l'ordre du jour avec une fréquence qui augmente d'année en année.

La tuberculose était et reste à ce jour un problème de santé publique en Algérie. Dès l'indépendance, elle s'est imposée comme une priorité sanitaire et différentes actions ont été entreprises afin de réduire la fréquence de la maladie. Actuellement l'Algérie se place en incidence "moyenne" sur le plan mondial quant à la propagation de cette infection.

À la lumière de ces informations nous avons étudié cette pathologie infectieuse, voir son diagnostic microbiologique, et son profil épidémiologique. Toutefois, nous nous sommes plus précisément intéressés à l'agent infectieux en cause afin de s'approprier avec son aspect bactériologique, sa transmission, sa virulence, son pouvoir pathogène et les techniques permettant son identification.

La première partie de ce travail est consacrée à un rappel bibliographique succinct sur l'agent causal de la maladie et ses caractéristiques où nous mettons en exergue le diagnostic bactériologique conventionnel de l'identification du bacille de Koch, les nouveaux outils (moléculaires) impliqués dans ce qui est appelé : diagnostic microbiologique « moderne » de la tuberculose maladie, son schéma prophylactique et thérapeutique, ainsi que la survenue de résistances aux antibiotiques. Quant à la seconde

partie, elle exposera notre méthodologie de travail et les résultats obtenus qui ont été confrontés aux données de la littérature.

Les objectifs de notre travail consistent à :

En premier lieu, rechercher *M. tuberculosis* dans les produits pathologiques réceptionnés au niveau de l'unité de la tuberculose du laboratoire de Bactériologie du Centre-Hospitalo-Universitaire Benbadis Constantine, en faisant appel aux méthodes conventionnelles du diagnostic bactériologique d'une tuberculose maladie.

En second lieu, réaliser une étude prospective sur une durée de trois mois (Janvier, Février, Mars 2016) afin d'estimer la prévalence de la maladie sur le total des patients suspectés d'être atteints de tuberculose durant cette période.

Partie bibliographique

1°/ L'infection tuberculeuse

Définition

La tuberculose est une infection mycobactérienne, qui est habituellement pulmonaire et peut conduire à une destruction sévère et un dysfonctionnement pulmonaire. C'est une maladie chronique souvent associée à une certaine forme de déficit immunitaire latente, comme la malnutrition ou d'un virus de l'immunodéficience humaine (VIH) appelé également le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Elle peut être observée chez les adultes et les enfants, selon l'âge à l'infection [1].

La tuberculose pulmonaire est une infection contagieuse mortelle causée par des bactéries appartenant au complexe *Mycobacterium tuberculosis* (MTC pour *Mycobacterium tuberculosis* complex) [2], principalement l'espèce *Mycobacterium tuberculosis* (bacille de Koch [BK]) mais aussi par *M. africanum* et *M. bovis*. Il s'agit de bactéries aérobies à croissance lente du genre *Mycobacterium* de la famille des *Mycobacteriaceae* [3].

La tuberculose reste dans le top 10 des priorités de santé dans de nombreux pays en développement, avec plus de 1,3 millions nouveaux cas par an ainsi que l'apparition et la propagation rapide des souches de *M. tuberculosis* multirésistantes et ultrarésistantes dans ces pays [2].

La tuberculose pulmonaire a été reconnue comme une entité clinique grave et répandue depuis des siècles, et son incidence a augmenté probablement par les conséquences sociales de la révolution industrielle. Cependant, sa nature transmissible n'était pas reconnue jusqu'à ce que Villemin produise une maladie similaire chez le lapin, en 1868, par injection de matériel provenant des lésions tuberculeuses de l'homme ; et en 1882, Koch découvre le bacille tuberculeux, accomplissant de manière impressionnante les critères qu'il avait développés (postulats de Koch) pour identifier l'agent étiologique d'une maladie infectieuse. Depuis, la tuberculose a été l'une des maladies infectieuses la plus étudiée [4].

Par leurs aspects cliniques et épidémiologiques, les infections dues à des mycobactéries sont divisées en trois grandes entités : la lèpre causée par *Mycobacterium leprae*, la tuberculose dont les agents étiologiques sont les bacilles tuberculeux (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*) et les mycobactérioses provoquées par les mycobactéries commensales dites « atypiques » [5].

2°/ Le complexe tuberculeux

La famille des *Mycobacteriaceae* contient le genre type *Mycobacterium*. Au moment de l'écriture de la dernière édition du Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2012), il y avait 129 espèces et sous-espèces avec des noms valablement publiés et classés dans le genre.

L'espèce type du genre est *Mycobacterium tuberculosis*, souche H₃₇R_V, ATCC 27299 et dont le génome est maintenant complètement séquencé.

Le complexe tuberculeux comprend sept espèces du genre *Mycobacterium*, de la famille *Mycobacteriaceae*, et de l'ordre des *Actinomycetales*, qui sont les causes de la tuberculose humaine et de zoonose. Les espèces du complexe tuberculeux partagent 99,9 % d'identité entre leurs séquences d'ARNr 16S et ont probablement évolué à partir d'un seul ancêtre clonal (figure 1) [6].

L'espèce *M. tuberculosis* provoque la grande majorité de la tuberculose humaine. *Mycobacterium bovis* cause la tuberculose chez les bovins et se propage aux humains par contact avec l'animal et la consommation de lait non pasteurisé [6].

Mycobacterium africanum et *M. Canetti* sont les responsables d'une forme rare de tuberculose en Afrique [6].

Mycobacterium caprae, un autre agent pathogène bovin, *M. microti*, un agent pathogène pour les rongeurs, et *M. pinnipedii*, un pathogène pour les phoques, ont été signalés à causer la tuberculose zoonotique chez l'homme [6].

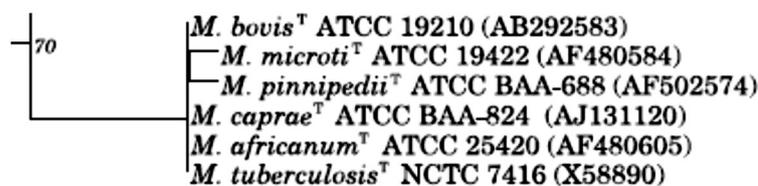


Figure 1 : Arbre phylogénétique selon la méthode des distances NJ construit d'après les séquences du gène qui code pour le 16S rRNA qui montre la position phylogénétique des espèces type du complexe tuberculeux. (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2012).

3°/ Propriétés générales de *Mycobacterium tuberculosis*

3-1 Structure

Le Bergey's manual of systematic bacteriology (2012) a consacré tout le volume cinq (V) au phylum *Actinobacteria* où figurent les propriétés essentielles de l'espèce *Mycobacterium tuberculosis*. Il s'agit de bâtonnets (0,3-0,6 × 1-4 μm) fortement acido-

alcoolo-résistants, droits ou légèrement incurvés, immobiles, ne formant pas de spores, qui se présentent seuls et occasionnellement filiformes.

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

Les colorations peuvent être uniformes ou irrégulières, montrant souvent des formes groupés ou perlés. Sur la plupart des milieux solides, les colonies sont rugueuses, soulevées, et épaisses, avec une surface nodulaire ou ridée et un bord mince irrégulier ; qui peut devenir un peu pigmentée (blanc cassé à une couleur chamois pale, ou même jaune).

La température optimale pour la croissance est de 37 °C, une certaine croissance se produit à 30-34 ° C. Le pH optimal est de 6,4 à 7,0.

Le génome comprend 4 411 529 paires de bases (pb), contient environ 4 000 gènes, et a un contenu très élevé en guanine + cytosine (GC % : 65,6). Cela représente la deuxième plus grande séquence bactérienne d'un génome actuellement disponibles (après celle de *Escherichia coli*) [10].

Le génome est riche en ADN répétitif, en particulier des séquences d'insertion et de gènes de ménage dupliquées. La teneur en G + C est relativement constante tout au long du génome qui indique que les îlots de pathogénicité transférés horizontalement sont probablement absents [10].

L'opéron ribosomique (*rrn*) unique de *M. tuberculosis* est situé exceptionnellement tel qu'il apparait à environ 1500 kilobases (kb) de la présumé *oriC* ; cette disposition peut être liée à la croissance lente de *M. tuberculosis* [10].

De la séquence du génome, il est clair que le bacille tuberculeux a le potentiel de synthétiser tous les acides aminés essentiels, des vitamines et d'enzymes co-facteurs, bien que certaines des voies impliquées peuvent différer de ceux trouvés dans d'autres bactéries.

M. tuberculosis peut métaboliser une variété d'hydrates de carbone, des hydrocarbures, des alcools, des cétones et des acides carboxyliques. Il ressort de l'inspection du génome qui, en plus de nombreuses fonctions impliquées dans le

métabolisme des lipides, les enzymes nécessaires à la glycolyse, la voie des pentoses phosphates et le cycle du glyoxylate sont tous présents [10].

La microscopie électronique révèle une paroi assez épaisse, et de grands mésosomes lamellaires sont fréquents. Des granules de glycogène et organes de polymétaphosphates sont également considérés. Ces corps d'inclusion contribuent à la coloration fréquemment perlée, irrégulière du bacille tuberculeux [4].

3-2 Croissance

Contrairement à la plupart des autres bactéries pathogènes, qui sont aérobies facultatives ou anaérobies, le bacille tuberculeux est un aérobie strict. Il peut se développer dans des milieux synthétiques simples, avec du glycérol ou d'autres composés comme seule source de carbone et de sels d'ammonium comme source d'azote ; ainsi que des acides aminés mélanges sont généralement ajoutés pour promouvoir l'initiation de la croissance et de l'améliorer [4].

Dans des milieux liquides synthétiques ordinaires, les bacilles croissent en touffes adhérentes qui forment une pellicule de surface. (Cette propriété ressemblant aux moisissures est responsable du nom *Mycobacterium* qui signifie *Myco* : de *mukès* un champignon et ; *bacterium* : bactérie *Mycobacterium* : un champignon en petits bâtonnets [4].

Les mycobactéries montrent généralement une préférence marquée pour les lipides nutritionnels ; le jaune d'œuf a été un constituant important des milieux riches utilisé pour le diagnostic des cultures. Ainsi, bien que le bacille tuberculeux soit très sensible à l'inhibition par des acides gras à chaîne longue, il est stimulé par eux à des concentrations très faibles. Une concentration satisfaisante est maintenue en ajoutant au milieu de l'albumine sérique, qui se lie aux acides gras ayant une affinité suffisante pour maintenir une faible concentration [4].

Les mycobactéries produisent des chélateurs de fer (mycobactines), dont la concurrence avec les chélateurs de l'hôte (transférines) peut jouer un rôle dans la pathogénèse et la résistance [4].

La croissance des bacilles tuberculeux dans les milieux de culture est typiquement lente : le plus court temps de dédoublement observé, dans les milieux riches, est d'environ 12 heures. Les mycobactéries saprophytes croissent plus rapidement, mais pas aussi rapidement que la plupart des autres bactéries (qui ont un temps de dédoublement aussi court que 20 minutes) [4].

En fonction de leur vitesse de croissance, les mycobactéries sont séparées en deux groupes (mycobactéries à croissance lente et les mycobactéries à croissance rapide). La présence d'une seule copie du gène codant l'ARN ribosomique 16S (croissance lente) ou deux copies (croissance rapide) est corrélée à la vitesse de croissance. La croissance et le métabolisme lents des mycobactéries concourent certainement à leur capacité de s'adapter aux conditions environnementales [5].

3-3 Virulence

La paroi mycobactérienne présente une architecture caractéristique et particulièrement complexe (figure 2). Son squelette est composé de trois éléments majeurs associés de manière covalente : le peptidoglycane, l'arabino-galactane et les acides mycoliques. Ces derniers sont de longues chaînes d'acides gras (de 60 à 90 atomes de carbone) insérées parallèlement les unes par rapport aux autres et formant un arrangement compact perpendiculaire au plan de la membrane plasmique. Ainsi, ils constituent une enveloppe lipidique très peu perméable aux composés hydrophiles et en particulier à bon nombre d'antibiotiques [7].

Les acides mycoliques, sont en effet associés covalentiellement au peptidoglycane par l'intermédiaire de polysaccharides (arabino-galactane). La teneur de la paroi en lipides est encore accrue par la présence de molécules de dimycolate de tréhalose et de sulfatides, qui sont exposées à la surface de la bactérie. Le dimycolate de tréhalose est responsable de la croissance en amas ou en corde des mycobactéries virulentes cultivées en milieu liquide [7].

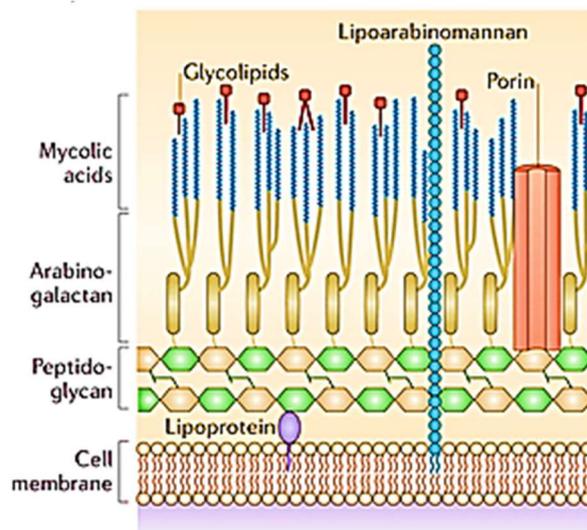


Figure 2 : Représentation schématique de l'enveloppe mycobactérienne et de ses principaux constituants

Ne libérant au cours de sa multiplication aucune substance toxique, la virulence de *M. tuberculosis* (considéré comme un parasite intracellulaire obligatoire) est liée à sa capacité de se multiplier dans les macrophages en résistant à l'activité bactéricide de ces cellules. Le mécanisme le plus important semble être l'inhibition de la fusion phagolysosomiale, pour laquelle les sulfatides ont été incriminés. Le bacille est ingéré par les cellules macrophagiques, mais les lysosomes ne peuvent déverser leur contenu microbicide dans la vacuole de phagocytose (inhibition de la fusion membranaire). Il faut ajouter que la richesse en lipides de la paroi permet une certaine résistance des bacilles aux enzymes lysosomiales elles-mêmes. Comme cela a été démontré pour *M. bovis*, *M. tuberculosis* pourrait également échapper au phagosome et se trouver ainsi libre dans le cytoplasme, hors d'atteinte des substances bactéricides produites par la cellule. Enfin, les bacilles ingérés seraient capables de résister à l'action toxique des dérivés oxygénés, grâce à la présence d'enzymes bactériennes telles la catalase et la superoxyde dismutase et peut être du fait de la richesse de la paroi en lipides insaturés, qui seraient des substrats pour les réactions de peroxydation [7].

Les glycolipides et protéines qui sont localisés dans une couche externe fortement attachée à la paroi représentent le caractère hydrophobe des cellules [4], cette propriété confère également une résistance naturelle :

- aux désinfectants (dérivés oxydants, dérivés chlorés, glutaraldéhyde),
- aux agents chimiques (bases, acides, détergents).

Les bacilles tuberculeux sont très sensibles à la lumière solaire, à la chaleur humide (éliminer à 65°C pendant 30 minutes, ou à 121 °C pendant au moins 15 minutes), aux rayons Ultra-Violets (UV) et aux radiations ionisantes. Le sang, le sérum et autres protéines protègent les bacilles contre les rayons UV. Par contre, ils sont moyennement résistants au froid et à la dessiccation [5].

3-4 Mode de transmission

Le bacille de la tuberculose est un bacille non tellurique ayant pour réservoir essentiel les malades atteints de tuberculose pulmonaire. En effet de tels malades ont souvent des 'cavernes pulmonaires' riches en bacilles (100 millions de bacilles pour une caverne d'environ 2 cm de diamètre).

Au moment où un malade atteint de tuberculose pulmonaire parle, et surtout lorsqu'il tousse ou éternue, il disperse autour de lui un aérosol fait de gouttelettes de

sécrétions bronchiques muco-purulentes, chacune d'entre elles contenant quelques bacilles : ce sont les gouttelettes infectantes. Le nombre de gouttelettes infectantes projetées dans l'atmosphère par un malade est très élevé au cours d'un effort de toux (3500) ou d'un éternuement (1 million).

Au contact de l'air ces gouttelettes se dessèchent en surface et deviennent des particules très légères contenant toujours les bacilles vivants qui restent quelque temps en suspension dans l'air. Dans un local fermé, les gouttelettes peuvent rester longtemps en suspension dans l'air et les bacilles restés vivants plusieurs heures dans l'obscurité : ce sont des « particules infectantes ». Lorsque des personnes vivent ou dorment à proximité d'un malade, elles sont exposées à inhaler des « particules infectantes » [8].

Le risque de contagion est d'autant plus important que le contact est étroit, car il est lié à la densité des bacilles dans l'air ambiant, de la virulence des micro-organismes, de la durée d'exposition et de la réceptivité individuelle de la personne en contact.

On admet qu'un séjour de plusieurs heures dans un espace insuffisamment aéré est nécessaire pour qu'une transmission puisse avoir lieu. Chez les personnes immunodéprimées, il est possible que l'infection puisse avoir lieu après un contact de courte durée avec un malade.

Toutefois, les patients atteints de formes exclusivement extra-pulmonaires de tuberculose ne sont (pratiquement) jamais contagieux.

Vu la rareté de la maladie, le risque d'exposition est faible dans la population générale. Par contre, ce risque augmente nettement pour les personnes en contact fréquent avec d'autres personnes atteintes de tuberculose non encore diagnostiquée ni traitée. Ce risque concerne avant tout les proches d'un malade atteint de tuberculose dont les expectorations contiennent des mycobactéries visibles à l'examen microscopique direct. Le risque est également élevé pour les professionnels de la santé, par exemple dans les services d'urgence des hôpitaux, pour le personnel pratiquant des endoscopies bronchiques, ainsi que pour le personnel de laboratoire et les collaborateurs des instituts de pathologie participant aux autopsies. Le personnel et les travailleurs sociaux des institutions de transit et d'accueil des immigrants sont aussi concernés, car ils peuvent entrer en contact avec des tuberculeux dont l'infection n'est pas encore connue [3].

3-5 Physiopathologie

Les particules qui véhiculent les bacilles tuberculeux, une fois inhalées, vont parvenir au niveau de l'alvéole pulmonaire où elles vont être phagocytées par un

macrophage. Après cette primo-infection qui associe une lésion pulmonaire à une adénoopathie satellite, l'hôte réagit à cette primo-infection en initiant une réponse immunitaire innée immédiate et une immunité spécifique adaptative en 4 à 6 semaines. Pour la plupart des personnes, l'infection s'arrête à ce stade. Cependant, les bacilles peuvent rester vivants sous forme latente (bacilles dormants) pendant des années [5].

Si la mise en place de l'immunité adaptative est trop longue, une dissémination dans l'organisme des macrophages infectés par voie sanguine et lymphatique va provoquer le développement de lésions secondaires pulmonaires (nodules, tuberculomes et cavernes) ou extra-pulmonaires (ganglionnaires, ostéoarticulaires, rénales, péricardiques, méningites,...) rappelées schématiquement en figure 3. An niveau de ces localisations, l'infection peut être contrôlée par la réaction immunitaire ou évoluer si celle-ci n'est pas mise en place ou si les défenses immunitaires sont amoindries [5].

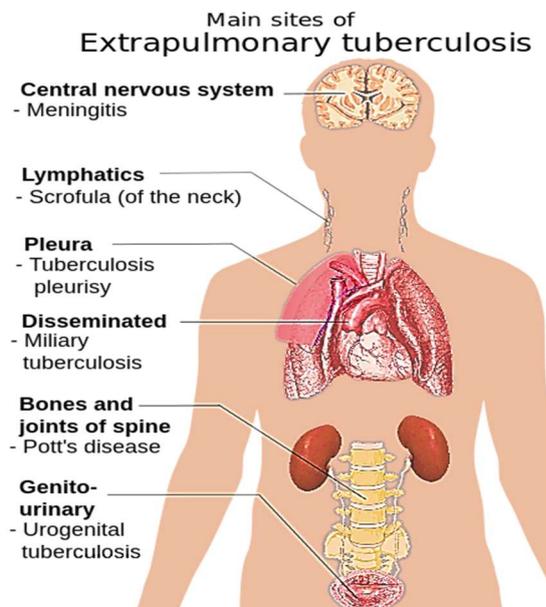


Figure 3 : schéma représentatif des principales localisations de la tuberculose extra-pulmonaire.

4°/ Diagnostic bactériologique d'une tuberculose

4-1 Méthodes conventionnelles

4-1-1 Examen microscopique

La première étape du diagnostic bactériologique est la mise en évidence de bacilles acido-alcool-résistants (BAAR) dans le produit pathologique. Elle est primordiale. Simple et rapide, c'est parfois la seule méthode de diagnostic disponible dans les pays en voie de développement [5].

La recherche microscopique du bacille tuberculeux se fait après coloration. Toutes les méthodes de colorations employées sont basées sur le caractère fondamental des mycobactéries, leur acido-alcool-résistance [5].

Les frottis sont réalisés directement ou, surtout à partir du culot de centrifugation, où les germes sont concentrés. La plupart des espèces sont difficiles à colorer par la méthode de Gram, mais sont généralement considérés comme coloration de Gram-positive. Les frottis sont colorés par la fuchsine phéniquée à chaud (méthode de Ziehl-Neelsen), les mycobactéries retiennent en effet le colorant malgré l'action conjointe des acides dilués et de l'alcool. Ils apparaissent alors sur les frottis comme de fins bâtonnets rosés, isolés ou en petits amas. La fuchsine phéniquée à chaud peut être remplacée par un fluorochrome tel l'auramine, ce qui facilite la recherche des BAAR dans les prélèvements paucibacillaires car la lecture est plus aisée, ils apparaissent alors sous forme de bacilles jaunes fluorescents sur fond noir. Les résultats de l'examen microscopique doivent être exprimés de façon semi-quantitative pour apprécier les risques de contagiosité et pour suivre l'évolution sous traitement [5].

4-1-2 La culture

Trois types de milieux peuvent être utilisés pour la culture de mycobactéries : milieu solide à base d'œuf (par exemple, Löwenstein Jensen), milieu solide à base d'agar (par exemple, Middlebrook 7H11) et le bouillon liquide (par exemple Middlebrook 7H12). Les milieux sont faits pour être sélectifs pour les mycobactéries en ajoutant des antibiotiques. Les milieux non sélectifs, sur lesquels la croissance est plus rapide, sont disponibles. La croissance est plus rapide dans 5% à 10% de dioxyde de carbone. Les bouillons de culture liquide ont besoin de 1 à 3 semaines d'incubation pour la détection d'organismes, par comparaison avec des milieux solides, qui nécessitent de 3 à 8 semaines. Cependant, les milieux solides permettent l'examen de la morphologie des colonies, la détection des cultures mixtes, et la quantification de la croissance. En outre, les souches occasionnelles de mycobactéries ne peuvent croître sur des milieux solides. Pour ces raisons, les experts suggèrent d'utiliser des milieux liquides et solides en conjonction avec l'inoculation d'au moins un milieu de culture solide [6].

4-2 Systèmes automatisés de détection de la croissance mycobactérienne

Une évolution en termes de rapidité de diagnostic a déjà été amorcée avec la mise sur le marché de systèmes automatisés de détection de la croissance mycobactérienne.

Nous prendrons l'exemple de la détection radiométrique en milieu liquide par le système Bactec® (Becton Dickinson). Cette méthode radiométrique utilise un milieu liquide contenant de l'acide palmitique marqué au carbone 14 et l'automate mesure le CO₂ radioactif produit par le métabolisme mycobactérien. Ce système permet de réduire le temps d'obtention des premiers résultats à un délai de 7 à 10 jours comparativement aux 2 à 4 semaines nécessaires au développement d'une culture sur milieu solide. Cependant, elle est coûteuse et ne peut être utilisée en routine dans tous les laboratoires [9].

4-3 Diagnostic moléculaire

Les mycobactéries sont des bactéries difficiles à cultiver et constituaient donc d'excellents candidats pour le développement de techniques de diagnostic moléculaire. Ces méthodes ont connu un essor important au cours de la dernière décennie avec deux voies de développement principales : diagnostic direct sans culture et identification après culture [9].

4-3-1 Détection de *M. tuberculosis* directement dans les échantillons cliniques

Trois principaux types de techniques fondées sur l'amplification génique peuvent actuellement être appliqués à la détection directe et rapide de *M. tuberculosis* directement dans les prélèvements cliniques. Les tests suivants sont actuellement commercialisés :

– l'Amplacor *Mycobacterium tuberculosis* Test (Amplacor, Roche Diagnostic Systems) : ce test est basé sur le principe de la PCR rappelée schématiquement en figure 4.

– l'AMTDT ou Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test (Gen-Probe®, bioMérieux). Ce test repose sur une méthode d'amplification isotherme (à 42 °C) d'une séquence spécifique de l'ARNr.

– le LCx Probe System (Abbott) est fondé sur le principe de l'amplification de sonde par LCR (*Ligase Chain Reaction*).

Quelle que soit la méthode d'amplification utilisée, les produits d'amplification éventuellement générés seront, dans un second temps, détectés par des méthodes diverses (colorimétriques ou chimiluminescentes).

Ces diverses techniques augmentent considérablement la rapidité du diagnostic puisque les résultats peuvent être obtenus en 4 à 6 heures environ. Elles ne peuvent toutefois en aucun cas remplacer l'examen direct, et la culture. De plus, elles ne peuvent distinguer les mycobactéries mortes des organismes vivants ni servir à suivre l'évolution

d'une infection mycobactérienne sous traitement. Leurs principaux inconvénients sont un manque de sensibilité pour les prélèvements à examen direct négatif, et la possibilité d'obtention de résultats faussement positifs par contamination des prélèvements [9].

4-3-2 Identification des espèces mycobactériennes en culture

Plusieurs techniques sont actuellement disponibles parmi lesquelles :

a/ des méthodes sans amplification utilisant des sondes nucléiques :

Les trousse actuellement commercialisées permettent l'identification des principales espèces de mycobactéries impliquées en pathologie humaine (AccuProbe®, Gen-Probe®, bioMérieux).

Ces tests utilisent des sondes d'ADN et leur principe est fondé sur l'hybridation de deux séquences complémentaires d'acides nucléiques. La séquence cible détectée dans l'échantillon à tester est une portion de l'acide ribonucléique ribosomal 16S (ARNr 16S) bactérien.

Cette technique associée aux cultures en milieu liquide permet donc une réponse rapide au clinicien de type "présence ou absence de bacilles du complexe tuberculeux" (7 à 10 jours en moyenne). Les sondes commercialisées à ce jour ne permettent pas la distinction entre les différentes espèces au sein du complexe tuberculeux et ne sont disponibles que pour un nombre restreint de mycobactéries atypiques.

b/ des méthodes d'identification après amplification d'une portion définie du génome :

Ces méthodes font appel à une première étape d'amplification génique par PCR dont les cibles préférentielles sont les gènes codant soit pour l'ARNr 16S, soit pour la protéine de choc thermique de 65 kDa (Heat Shock Protein 65 ou Hsp 65) ou encore pour la région séparant les gènes codant pour l'ARNr 16S et l'ARNr 23S (appelée ITS pour Internal Transcribed Spacer). Des amorces spécifiques du genre *Mycobacterium* sont actuellement disponibles. Une fois l'amplification obtenue, plusieurs possibilités peuvent alors être envisagées pour permettre l'identification de l'espèce :

– détermination de la séquence d'acides nucléiques du fragment amplifié par séquençage automatique et comparaison de la séquence obtenue à celles déposées dans des banques de données informatisées.

– analyse des produits d’amplification par restriction enzymatique et comparaison à des profils obtenus pour des souches d’espèces connues, cette technique est appelée analyse du polymorphisme des fragments de restriction (Restriction Fragment Length Polymorphism ou RFLP).

–hybridation des produits d’amplification sur une bandelette de nitrocellulose à la surface de laquelle ont été préalablement adsorbées des sondes spécifiques des différentes espèces mycobactériennes principalement rencontrées en pathologie humaine [9].

4-3-3 La spectrométrie de masse type MALDI-TOF

Plusieurs études ont fourni la validation du concept de la spectrométrie de masse type MALDI-TOF pour identifier les mycobactéries dans la pratique clinique de routine.

En effet, cette technique a émergé au cours des dernières années en tant que technique révolutionnaire pour l'identification systématique des isolats bactériens. La spectrométrie de masse type MALDI-TOF a été établie pour donner des résultats précis en quelques heures à un prix inférieur à toute autre méthode couramment utilisée dans les laboratoires de microbiologie clinique.

Afin de simplifier l'identification précise des isolats de mycobactéries en laboratoire de routine. Le docteur A. El Khéchine et ses collaborateurs, en premier lieu, ont optimisé un protocole d’inactivation des cellules mycobactérienne afin de pouvoir les manipulées en toute sécurité hors du laboratoire P3. En second lieu, ils ont mis au point un protocole détaillé de l'utilisation de la spectrométrie de masse type MALDI-TOF, en association avec un logiciel bioinformatique spécifique, comme outil d’identification et de différenciation entre les membres du complexe tuberculeux par le séquençage des répétitions directes en tandem, du complexe *Mycobacterium avium* et les autres mycobactéries non-tuberculeuses par séquençage du gène *rpob*. Ensuite cette technique a été appliquée avec succès sur les cultures des mycobactéries à partir du milieu liquide Middlebrook 7H10 système automatisé.

Le protocole décrit par A. El Khéchine et ses collaborateurs, a permis de réduire l'inoculum nécessaire de détection des mycobactéries jusqu'à 10^5 UFC/ml, ce qui est le plus faible inoculum rapporté pour l'identification efficace des mycobactéries par la spectrométrie de masse type MALDI-TOF [2].

5°/ Traitement de la tuberculose

5-1 Traitement prophylactique

L'injection du vaccin de bacilles de Calmette et Guérin (fabriqué à partir de bacille bovin vivant atténué par repiquages successifs en culture) permet à l'organisme d'acquérir une immunité contre le bacille de Koch équivalente à celle qui est obtenue après une primo-infection.

La protection apportée par le BCG est de 50%. Les études effectuées dans de nombreuses régions du globe montrent que la vaccination par le B.C.G. des nouveau-nés et des enfants d'âge préscolaire permet, lorsqu'elle est bien pratiquée, de les protéger efficacement contre toutes les formes de la tuberculose infantile et spécialement contre les formes graves et parfois mortelles de la maladie (méningite ou miliaire tuberculeuses).

Toutefois, il ne protège pas de façon fiable contre la tuberculose pulmonaire, qui représente la plus grande part de la charge de la maladie dans le monde. Par ailleurs, les conditions d'utilisations du BCG, exclusivement chez les enfants, ne permettent pas d'explorer son efficacité à l'adulte [14].

5-2 Traitement curatif

Le traitement de la tuberculose est basé sur l'application d'une chimiothérapie basée sur l'association de plusieurs antibiotiques antituberculeux. La durée de cette chimiothérapie est actuellement de 6 mois et constitue « la chimiothérapie de courte durée » [13].

Le régime 2SRHZ / 4RH, est un traitement standard qui fait appel aux antibiotiques dits de « **première ligne** ». Il comporte une phase initiale intensive de deux mois avec administration quotidienne de streptomycine (S), rifampicine (R), isoniazide (H) et pyrazinamide (Z), qui est suivie d'une phase de continuation de quatre mois avec administration quotidienne de rifampicine et d'isoniazide [13].

- L'isoniazide et la rifampicine sont les plus puissants et représentent des médicaments majeurs, hautement bactéricides.

- La streptomycine est très active sur les bacilles extracellulaires qui se multiplient très rapidement.

- Le pyrazinamide est essentiellement actif sur les bacilles intracellulaires qui se multiplient lentement [13].

Les antibiotiques de **seconde ligne** utilisés en Algérie sont au nombre de quatre (ethionamide, kanamycine, ofloxacine, cyclosérine). Ils sont destinés au seul traitement des cas chroniques, (cas de tuberculose à bacilles multi-résistants, à l'isoniazide et la rifampicine au moins). Ces médicaments sont moins actifs et généralement plus toxiques que les médicaments de première ligne [13].

6°/ Résistance du complexe tuberculeux aux antibiotiques antituberculeux

La propagation de bactéries pathogènes résistantes aux antibiotiques est une des menaces les plus sérieuses pour le traitement efficace d'une maladie et constitue un problème majeur de santé publique [15].

Selon l'OMS, la tuberculose multirésistante (TB-MR) est une forme de tuberculose causée par un bacille qui résiste à au moins l'isoniazide et la rifampicine, les 2 médicaments antituberculeux de première ligne (ou standard) les plus efficaces.

La tuberculose multirésistante résulte avant tout d'un traitement inadapté. L'utilisation inappropriée ou incorrecte des antituberculeux, ou l'utilisation de médicaments de médiocre qualité, peuvent entraîner une résistance aux médicaments.

Dans certains cas, une résistance encore plus grave aux médicaments peut se développer. La tuberculose ultrarésistante, TB-UR, est une forme de tuberculose multirésistante qui répond à un nombre encore plus restreint de médicaments disponibles, y compris les médicaments antituberculeux de seconde ligne les plus efficaces [11].

6-1 Résistance naturelle

Certaines espèces présentent une résistance naturelle ou intrinsèque à un ou plusieurs antibiotiques. Les informations qui codent ce comportement habituel d'une souche font partie du patrimoine génétique de l'espèce [15].

Les mycobactéries du complexe tuberculeux sont naturellement résistantes aux principales familles d'antibiotiques comme les β -lactamines, les macrolides, les cyclines, les sulfamides et les glycopeptides. Les mycobactéries non-tuberculeuses présentent également une résistance naturelle à ces antibiotiques usuels. La faible perméabilité de la paroi mycobactérienne est, en général, mise en cause pour expliquer le haut niveau de résistance naturelle des mycobactéries. La structure de la paroi n'est pas la seule responsable de la haute résistance naturelle de *M. tuberculosis*. La production d'enzymes modifiant les antibiotiques a également été décrite chez *M. tuberculosis* comme, par exemple, la β -lactamase responsable de la résistance naturelle aux β -lactamines ou

l'aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase impliquée dans la résistance aux aminoglycosides [12].

6-2 Résistance acquise

Contrairement aux autres bactéries pathogènes qui acquièrent en général leur résistance aux antibiotiques par transfert horizontal de plasmides ou transposons portant des gènes de résistance, l'acquisition de résistance chez *M. tuberculosis* provient, presque toujours, d'altérations spontanées de gènes chromosomiques spécifiques sous la forme de mutations ponctuelles non-synonymes, de délétions ou insertions. En effet, aucun plasmide ou transposon de résistance n'a été décrit chez les mycobactéries. Par conséquent, la résistance n'est pas transférable entre les mycobactéries présentes chez un même patient, mais elle se transmet à toute la descendance de la bactérie mutée [12].

Les mutations impliquées dans la résistance de *M. tuberculosis* aux antibiotiques ont été mises en évidence :

- dans les gènes codant les protéines cibles de l'antibiotique, diminuant l'affinité de la cible pour cet antibiotique (Rifampicine, Éthambutol, Fluoroquinolones,...).
- dans un gène codant une enzyme impliquée dans l'activation de l'antibiotique, empêchant son passage de la forme pro-drogue à la forme active (Isoniazide, Pyrazinamide,...).
- dans une région génomique régulatrice provoquant la surexpression de la cible de l'antibiotique [12].

Les altérations génétiques responsables des différents types de résistances aux antibiotiques chez *M. tuberculosis* ont été en partie définies pour plusieurs antibiotiques, de première et seconde ligne, utilisés communément [12].

L'augmentation de la fréquence d'apparition des souches résistantes est liée aux conditions d'utilisation des antibiotiques. Ils ne créent pas la résistance mais ils exercent une pression de sélection en éliminant les cellules sensibles et en sélectionnant les bactéries résistantes. L'utilisation extensive et abusive des antibiotiques, l'interruption trop rapide d'un traitement sont des facteurs qui favorisent l'émergence de souches résistantes [15].

Matériels et méthodes

L'étude a été réalisée entre le 1^{er} Janvier et le 31 Mars 2016, sur des prélèvements provenant de patients suspectés d'être atteints de tuberculose. Les prélèvements sont réceptionnés au niveau de l'unité de la tuberculose du laboratoire de Bactériologie du Centre Hospitalo-Universitaire Benbadis Constantine.

1°/ Réception et traitements des échantillons biologiques

1-1 Recueil et transport des prélèvements

Le type de récipient utilisé, pour le recueil du prélèvement, est très important et contribue à la qualité de ce dernier ; il doit être en matière plastique, transparent et résistant à l'écrasement, avec une large ouverture et un capuchon à vis afin d'éviter les fuites. Les prélèvements, quand ils ne sont pas emmenés directement au laboratoire, doivent être conservés au froid (+4 ° C) mais durant une période ne dépassant pas les 3 à 4 jours.

1-2 Fiche de renseignement

Les prélèvements sont accompagnés d'une liste identifiant les échantillons à analyser (nom du patient, âge, date, service) ainsi que le formulaire de demande d'examen pour chacun des échantillons où les agents de la santé indiquent clairement sur la demande s'il s'agit d'un examen pour la recherche du bacille de Koch ou pour le suivi bactériologique du traitement.

Toute information exigée dans le registre du laboratoire doit être reportée. Le numéro d'ordre du registre du laboratoire commence à 1 le 1^{er} janvier de chaque année et augmente de 1 à chaque patient jusqu'au 31 décembre de même année. Le personnel du laboratoire inscrit pour chacun des échantillons le code du laboratoire, le numéro d'ordre du registre du laboratoire ainsi qu'un identificateur de la séquence des échantillons, c'est-à-dire 1 pour le premier, 2 pour le deuxième et 3 pour le troisième prélèvement.

1-1 Matériel biologique

1-3-1 Les échantillons prélevés de sites non stériles

- Les crachats

Il s'agit de crachats et / ou expectorations recueillis de préférence le matin au réveil, trois jours de suite. Ils devraient être prélevés à l'air libre, et aussi loin que possible d'autres personnes. L'agent responsable de santé chargé du recueil de l'expectoration devrait rassurer les sujets et leur donner des indications sur la manière de tousser qui permet de produire une expectoration provenant de la profondeur du thorax afin d'obtenir

des crachats bronchiques, purulents et non salivaires. Il devrait s'assurer que le volume de l'échantillon est suffisant (3ml au moins).

- Tubage gastrique

Réalisé en particulier chez les personnes qui généralement crachent peu ou ne savent pas cracher, au réveil, chez des sujets alités depuis la veille. Il permet de recueillir les sécrétions bronchiques dégluties pendant le sommeil. Il consiste à recueillir à l'aide d'une sonde naso-gastrique et d'une seringue introduit par voie nasale 5 à 10 ml de liquide dans un tube stérile qui sera adressé rapidement au laboratoire. Par la suite, ils seront traités comme des crachats.

- Urines

Après restriction hydrique la veille, la totalité des urines du matin, de 3 jours consécutifs, recueillis stérilement.

- Autres prélèvements

Ce sont : les pus d'abcès ouverts et d'adénite suppurée, de collection inguinale, de sperme et de sang de règles.

1-3-2 Les échantillons prélevés de sites stériles

Provenant de cavités fermées, ils doivent être recueillis dans des tubes stériles sous des conditions rigoureuses d'asepsie pour éviter toute contamination.

- Prélèvements sous fibroscopie bronchique

Ils sont réalisés lorsque les crachats ou le tubage gastrique ne permettent pas le diagnostic. Ce sont des aspirations bronchiques, des brossages bronchiques ou encore des liquides de lavage broncho alvéolaire réalisés sous fibroscopie et sont issus de la zone visualisée comme pathologique sur la radiographie. C'est une technique réalisée en milieu hospitalier chez des patients hospitalisés.

- Liquides d'épanchements

Les liquides pleuraux, les liquides céphalo-rachidiens, liquides d'ascites, liquides articulaires et les liquides cervicaux sont recueillis par ponction dans un tube stérile pour être analysés. Un volume de 3 ml est nécessaire à l'étude cyto bactériologique de ces prélèvements et doivent être rapidement acheminés au laboratoire.

- Biopsies et pièces opératoires

Ces prélèvements peuvent être réalisés au niveau de la poitrine, des bronches, des os, du foie, des ganglions, des reins et même du cerveau. Ils sont acheminés rapidement au laboratoire, immergés dans du sérum physiologique stérile, dilacérés et broyés stérilement.

- Autres prélèvements

▪ Les ponctions d'abcès

Le prélèvement à la seringue doit être privilégié et la seringue est adressée directement au laboratoire. Les prélèvements à l'écouvillon sont déposés dans un flacon stérile et humidifiés avec quelques gouttes d'eau distillée stérile ou d'eau physiologique.

▪ Le sang

La recherche de mycobactéries dans le sang est pratiquée à partir d'une ponction veineuse, le sang est recueilli dans un tube anticoagulant liquide (SPS, citrate, héparine).

2°/ Traitement des prélèvements (décontamination et fluidification)

En fonction du caractère polybactérien ou monobactérien, les prélèvements vont faire l'objet ou non d'une décontamination. Cette étape a pour but d'éliminer la flore commensale des échantillons qui envahirait les milieux de culture avant la détection des mycobactéries qui sont des bactéries à croissance lente. Les mycobactéries sont plus résistantes à l'action des antiseptiques, des acides et des bases diluées que les bactéries commensales. Les prélèvements considérés comme polybactériens (tubages, expectorations, liquides d'aspiration bronchique, urines, abcès, etc.) sont soumis à une méthode de fluidification-décontamination cette dernière à une double action : la décontamination d'une part et la fluidification de l'échantillon d'une autre part.

Les liquides de ponction, les ponctions de collections fermées ou les biopsies prélevées stérilement sont ensemencées sans décontamination après centrifugation.

La décontamination-fluidification, le plus généralement, est réalisée en utilisant la N-acétyle-L-cystéine comme mucolytique dans la solution d'hydroxyde de sodium de 1%. Les mycobactéries sont relativement protégées pendant cette procédure par une paroi cellulaire riche en acide gras.

2-1 Traitement d'échantillon de crachats

La méthode la plus fréquemment répandue et actuellement utilisée en laboratoire est celle de Petroff, utilisant la soude. Deux volumes d'échantillon d'expectorations sont mis dans un tube conique stérile, auxquels sont ajoutés deux volumes de solution de NaOH à 4% en présence de bleu de bromothymol comme indicateur de pH coloré. Après agitation puis incubation dans une étuve à 37°C pendant 30 minutes, l'action de la solution de décontamination est stoppée par l'addition d'une solution d'acide sulfurique (H₂SO₄ à 15%) jusqu'à neutralisation. Le mélange est ensuite centrifugé à 3000 rpm pendant 15 minutes afin d'obtenir une élimination des contaminants sans altérer la viabilité des mycobactéries. Le culot est utilisé pour l'examen direct et la mise en culture.

2-2 Traitement des échantillons de pus

Dans les tubes à écouvillon de pus d'abcès ouvert, 4 ml d'acide sulfurique à 4 % sont ajoutés pour la décontamination. Après dix minutes d'action, une neutralisation est réalisée par addition de 3,5 ml de NaOH à 6 %.

2-3 Traitement des biopsies

Elles sont dilacérées et broyées stérilement dans un mortier avec du sable stérile. La moitié du prélèvement est écrasée entre deux lames neuves afin de réaliser un frottis qui est coloré par la technique de coloration de Ziehl-Neelsen, l'autre moitié soumise à une décontamination par fluidification par l'ajout de 2ml d'acide sulfurique à 4% et 2 gouttes de bleu de bromothymol comme indicateur de pH coloré. On laisse agir en incubant le mélange dans l'étuve à 37°C pendant 10 minutes ensuite, on neutralise avec une solution de soude à 6 % jusqu'au virage de la préparation au vert. Onensemence le tout sur 4 tubes de milieu Löwenstein-Jensen.

3°/ Confection des frottis

Les prélèvements sont disposés l'un derrière l'autre de sorte que les numéros d'ordre du laboratoire coïncident avec les numéros attribués sur le formulaire de demande d'examen qui les accompagne.

En travaillant obligatoirement sous une hotte à flux laminaire, nous ouvrons soigneusement le flacon de l'échantillon correspondant au numéro de la lame préalablement graver au diamant, pour éviter qu'il ne soit effacé après la décoloration par les bases et acides forts lors des colorations.

Le frottis ou l'étalement du crachat s'effectue sur des lames en verre neuves que l'on jette après usage. Les lames doivent être bien dégraissées. On prélève avec une anse de platine rigide, préalablement flambée et refroidie, une parcelle purulente ou une parcelle hémorragique de crachat. Du choix de la parcelle dépend en grande partie le résultat de l'examen microscopique. Les bacilles se trouvent en effet beaucoup plus fréquemment dans le matériel opaque du crachat que dans le matériel transparent (mucus).

Le contenu de l'anse est étalé en couche mince par des mouvements de va-et-vient et de façon homogène. L'étalement doit s'effectuer en rectangle sur la totalité des deux tiers de la lame, soit une dimension de 20 mm sur 10 mm car une longueur de 20 mm correspond à environ 100 champ, ce qui permet une lecture optimale. Pour obtenir un film uniforme, couvrant régulièrement les deux tiers de la lame, il est souvent nécessaire de prélever deux parcelles de crachats. L'étalement terminé, l'anse de platine est immédiatement stérilisée.

Pour les urines et les liquides de ponctions, le culot est utilisé. Seul le LCR souvent en volume réduit est étalé sous forme de gouttes déposées et séchées sur le même endroit.

Avant la fixation par la chaleur, le frottis est laissé à l'air pour sécher, sans toutefois être exposé à la lumière du soleil. Il est déconseillé de chauffer à la flamme un frottis humide car cela peut altérer les BAAR et entraîner un échauffement excessif.

Une fois séchée les lames sont fixées sur une plaque chauffante électrique pour améliorer la sécurité au cours de l'étalement (éviter l'éjection d'éclaboussures). La lame refroidie est alors prête pour la coloration.

4°/ Recherche des BAAR après coloration

Deux méthodes de coloration sont principalement utilisées : coloration fluorescente à l'auramine de Dugommier et coloration à la fuchsine à chaud d'après la méthode de Ziehl-Neelsen. Le principe des colorations est basé sur le caractère d'acido-alcool-résistance des mycobactéries.

4-1 Coloration de Dugommier à l'auramine

Nous avons coloré les bacilles acido-alcool-résistants par une solution d'auramine phéniquée à froid pendant 10 minutes. Après rinçage avec de l'eau distillée, une décoloration pendant 4 minutes a été réalisée par le mélange acide-alcool. Une contre

coloration est effectuée avec une solution de permanganate de potassium (30 secondes) après un nouveau rinçage à l'eau distillée. Une fois les lames séchées, l'observation est faite à l'aide d'un microscope muni d'un diapositif à fluorescence à l'objectif x 40.

4-2 Coloration de Ziehl-Neelsen

Après avoir placé la lame sur un support en métal, et l'avoir recouverte de fuchsine de Ziehl filtrée extemporanément sur papier filtre. Nous l'avons chauffé doucement (trois fois) jusqu'à émission de vapeurs blanches au moyen de la flamme d'un coton imbibé d'alcool. Nous avons laissé agir durant 10 minutes, tout en évitant l'ébullition et le dessèchement du colorant. Si nécessaire nous rajoutons de la fuchsine pour que la lame en soit toujours recouverte.

En second lieu, l'excès du colorant est rejeté, la lame est immédiatement rincée à l'eau distillée. Par la suite, nous avons recouvert la lame d'acide sulfurique dilué à 25% pendant 3 minutes. Après rinçage, la lame est recouverte d'alcool à 95° que nous avons laissé agir pendant 5 minutes. Une fois rincer le frottis est incolore ou légèrement teinté en rose.

Dernière étape, la contre-coloration, nous avons recolorer le frottis pendant 30 secondes par la solution de bleu de méthylène filtré également sur papier filtre. Un dernier rinçage est réalisé. Une fois séchée, la préparation est prête à l'examen microscopique.

La lecture microscopique des frottis se fait selon une procédure systématique et standardisée qui débute de l'extrémité gauche du frottis, se poursuit sur une ligne du frottis en déplaçant la lame de gauche à droite, puis en la déplaçant d'arrière en avant on lit une deuxième ligne parallèle de droite à gauche, puis si nécessaire une autre ligne est examinée en allant de gauche à droite. Il y a environ 100 champs microscopiques dans l'axe longitudinal d'un frottis de 2 cm. Trois lignes de frottis examinés correspondent à 300 champs microscopiques contrôlés. La lecture commence à la périphérie du champ et se termine au centre.

5°/ Culture des échantillons

La culture des mycobactéries nécessite le recours à des milieux spécifiques et complexes comme le milieu à l'œuf de Löwenstein-Jensen.

Les milieux sont présentés sous forme de tubes fermés à vis. Nous avons adopté la technique d'inondation comme technique d'ensemencement afin d'augmenter la probabilité de croissance des bactéries dans l'échantillon.

Un seul tube estensemencé pour les prélèvements pulmonaires et deux tubes pour les prélèvements extra-pulmonaires. Les tubes sont incubés dans une étuve chauffée à 37°C en position inclinée et incomplètement vissés afin de permettre l'évaporation de l'excès du liquide de l'échantillon (les premières 48 heures).

Au bout de 48 heures d'incubation nous avons contrôlé la qualité de la décontamination par la recherche de colonies de germes banals et/ou le changement de couleur du milieu de culture. Ainsi les tubes contaminés sont éliminés tout en les notant dans le registre. Si tous les tubes du même patient sont contaminés un nouveau prélèvement est demandé.

L'examen des cultures est réalisé une fois par semaine pendant au moins 8 semaines. La longue durée d'incubation est justifiée par la croissance lente des mycobactéries (temps de division de *M. tuberculosis* égale à 20 heures).

Au bout du 28^{ème} jour, date de la 1^{ère} lecture, nous avons recherché à l'œil nu des colonies à la surface du milieu de culture.

En cas d'apparition de colonies caractéristiques des mycobactéries, un frottis à partir d'une parcelle de colonie est effectué par la méthode de Ziehl-Neelsen pour vérifier la présence de BAAR afin de déclarer la positivité de la culture, ainsi qu'un résultat quantitatif est donné, par comptage de leur nombre par tube de Löwenstein-Jensen.

Si la culture est négative les tubes sont remis à l'étuve et sont examinés lors de la 2^{ème} lecture après 42 jours d'incubation.

Une 3^{ème} et dernière lecture est faite au 72^{ème} jour d'incubation car certaines mycobactéries (3 à 4 mois pour les échantillons extra-pulmonaire) mettent beaucoup plus de temps à pousser, avant de déclarer que la culture est négative en cas d'absence de colonies.

Résultats et discussions

L'objectif principal de notre travail est de mettre en évidence la présence du bacille de Koch ou *Mycobacterium tuberculosis* dans les produits pathologiques de patients qu'on suspecte atteints d'une tuberculose maladie, toutes formes confondues, afin de définir qu'il s'agit effectivement d'une infection tuberculeuse ou pas, de plus, estimer la contagiosité d'un malade tuberculeux ainsi que la gravité de son cas.

1- Recueil des prélèvements

Les échantillons de patients suspectés d'être atteints de tuberculose sont récupérés au niveau de l'unité de la tuberculose (laboratoire de Bactériologie du Centre-Hospitalo-Universitaire Benbadis de Constantine). Notre travail a porté sur un total de 1758 échantillons de nature différente (22 échantillons différents) dont 1436 pulmonaires et 322 extra-pulmonaires, recueillis durant les trois mois de notre stage, avec en première position les crachats (78,83%), suivi des urines (8.70%) et en troisième position le liquide du tubage gastrique (2,04%). Le tableau 1 résume le nombre et la nature des échantillons récoltés.

Tableau 1 : répartition des échantillons recueillis selon leur nature.

Type de prélèvements	Nature des échantillons	Nombre d'échantillons
Prélèvements pulmonaires	Crachats	1386
	Tubage gastrique	36
	Aspirations bronchiques	14
Prélèvements extra-pulmonaires	Urines	153
	Liquides pleural	32
	Pus	31
	Liquide d'ascites	25
	Liquide Céphalo-Rachidien	23
	Abcès	15
	Biopsies	14
	Liquide synovial	11
	Liquide cervical	3
	Épanchement péricardique	3
	Ponction ganglionnaire	2
	Liquides de collections	2
	Écoulement mammaire	2
	Épanchement abdominale	1
	Moelle osseuse	1
	Lésion cutanée	1
	Ponction lombaire	1
Sang de règles	1	
Sperme	1	
Total		1758

Étant donné que la tuberculose est essentiellement une maladie des poumons les échantillons pulmonaires sont été les plus prédominants (81,68 %) à raison de 478 échantillons par mois, avec principalement les échantillons de crachats (78,84%) puisqu'ils sont plus faciles à recueillir (la population étudiée est majoritairement composée d'adulte).

Nous avons enregistré seulement 18,32 % échantillons de nature extra-pulmonaire, à raison de 107 échantillons par mois, où les échantillons d'urines ont été les plus répandus (8,70%), suivi par le liquide pleural et les échantillons de pus (1,80% et 1,76%).

Nos échantillons proviennent de plusieurs services, en grande partie de patients ayant consultés au traitement ambulatoire à raison de 48,93 % pour les deux formes confondues. Concernant les patients hospitalisés au CHU Benbadis de Constantine, nous avons enregistré pour les échantillons de type pulmonaire (28,62 %) essentiellement colligés du service de pneumophtisiologie, cependant à propos des échantillons de type extra-pulmonaires, la plupart (16,15 %) ont été envoyé du service d'infectiologie.

Les tableaux 2-a,b,c, résumant la répartition des échantillons pulmonaires réceptionnés selon leur provenance des différents services internes ou externes. Les tableaux 3-a,b,c, quant à eux, résumant la répartition des échantillons extra-pulmonaires.

Tableau 2- a : Répartition des échantillons pulmonaires selon les services durant le mois de Janvier.

Services	Échantillons			Total
	Crachats	Tubage gastrique	Aspirations bronchiques	
Traitement ambulatoire	186	1	2	189
Pneumophtisiologie	124	2	2	128
Pédiatrie	32	4	0	36
Infectiologie	22	0	0	22
Médecine interne	20	1	0	21
Médecine du travail	12	0	0	12
Endocrinologie	6	0	0	6
Cardiologie	5	0	0	5
Dermatologie	4	0	0	4
Gastrologie	2	0	0	2
Total	413	8	4	425

Tableau 2-b : Répartition des échantillons pulmonaires selon les services durant le mois de Février.

Services	Échantillons			Total
	Crachats	Tubage gastrique	Aspirations bronchiques	
Traitement ambulatoire	227	11	6	244
Pneumophtisiologie	131			131
Infectiologie	31			31
Médecine interne	17			17
Pédiatrie	16		1	17
Rhumatologie	13			13
Réanimation	11			11
Cardiologie	6			6
Neurologie	4			4
Hématologie	3			3
Endocrinologie	3			3
Gastrologie	2	1		3
Médecine du travail	2			2
Ophtalmologie	2			2
Médecine légale	2			2
Chirurgie	1			1
Laboratoire de Physiologie	1			1
Total	472	12	7	491

Tableau 2-c : Répartition des échantillons pulmonaire selon les services durant le mois de Mars.

Services	Échantillons			Total
	Crachats	Tubage gastrique	Aspirations	
Traitement ambulatoire	247	12	2	261
Pneumophtisiologie	151		1	152
Médecine interne	30	2		32
Pédiatrie	22	1		23
Infectiologie	20	1		21
Laboratoire de physiologie	6			6
Rhumatologie	5			5
Chirurgie	4			4
Gastrologie	3			3
Cardiologie	3			3
Hématologie	3			3
Urgences médicales	3			3
Ophtalmologie	2			2
Orthopédie	1			1
Réanimation	1			1
Total	501	16	3	520

Tableau 3-a : Répartition des échantillons extra-pulmonaire selon les services durant le mois de Janvier.

Services	Échantillons stériles							Échantillons contaminés			Total
	Liquide pleural	Biopsies	Liquide Céphalo-Rachidien	Liquide synovial	Liquide d'ascites	Moelle osseuse	Épanchement péricardique	Urines	Pus	Abcès	
Traitement ambulatoire	1	2		2	2	1		27	2		37
Pédiatrie	3		1	1				6			11
Infectiologie			3	1				4		2	10
Gastrologie	1	5						2	1		9
Pneumophtisiologie	4	2									8
Médecine interne	1	1	1		2			1	2		8
Chirurgie	1	1					1				3
Hématologie								3			3
Neurologie			1						1		2
Urgences médicales	1										1
Rhumatologie									1		1
Endocrinologie									1		1
Total	12	11	6	4	4	1	1	43	9	2	93

Tableau 3-b : Répartition des échantillons extra-pulmonaires selon les services durant le mois de Février

Service	Échantillons stériles									Échantillons contaminés					Total	
	Liquide pleural	Liquide d'ascites	Liquide synovial	Liquide- Céphalo- Rachidien	Liquide cervicale	Biopsies	Épanchement péricardique	Ponction ganglionnaire	Liquides de collections	Urines	Pus	Abcès	Écoulement mammaire	Épanchement abdominal		Sperme
Traitement ambulatoire			3		1			1	1	38	3	3			1	51
Infectiologie	2			1						9	2	5	2			21
Médecine interne	3	3	1							1	1					9
Gastrologie		4				1				1						6
Chirurgie				1			1		1			1		1		5
Pneumophtisiologie	5															5
Pédiatrie										4						4
Oto-rhino-laryngée					2						2					4
Médecine du travail										3						3
Rhumatologie											1					1
Hématologie											1					1
urgences médicales	1															1
Neurologie				1												1
Orthopédie																1
Total	12	7	4	3	3	1	1	1	2	56	11	9	2	1	1	113

Tableau 3-c : Répartition des échantillons extra-pulmonaire selon les services durant le mois de Mars.

Service	Échantillons stériles							Échantillons contaminées						Total
	Liquide d'ascites	Liquide Céphalo-Rachidien	Liquide pleural	Liquide synovial	Biopsie	Liquide péricardique	Ponction ganglionnaire	Urines	Pus	Abcès	Lésion cutanée	Sang de règles	Ponction lombaire	
Traitement ambulatoire			3	1			1	33	2	2		1		43
Infectiologie	4	3						9	3	1			1	21
Médecine interne	6			1	1			7						15
Pneumophtisiologie			4		1	1		1	1					8
Neurologie		8												8
Gastrologie	3							2	1					6
Pédiatrie	1	1	1					1						4
Rhumatologie				2				1						3
Urgences médicales		1	1											2
Cardiologie									1	1				2
Dermatologie									1		1			2
Oto-rhino-laryngée									1					1
Réanimation		1												1
Orthopédie									1					1
Total	14	14	9	3	2	1	1	54	11	4	1	1	1	116

2- Recherche des BAAR par l'examen microscopique des frottis

Après coloration à l'auramine, l'examen microscopique des frottis à l'objectif x 40 a révélé (pour les échantillons positifs) la présence de bacilles jaunes fluorescents sur un fond noir. En effet, les BAAR retiennent le colorant d'auramine malgré l'action conjointe de l'acide dilué et de l'alcool. Cette propriété est utilisée pour la détection au microscope des BK sur des frottis de produits pathologiques. L'acido-alcool-résistance des bacilles (BAAR) est l'un des critères de définition du genre *Mycobacterium*, il leur est conférée par leur paroi dont la composition est particulièrement complexe (riche en lipides ; principalement les acides mycoliques). Les résultats de cet examen sont résumés dans les tableaux 4-a et 4-b.

Tableau 4-a : résultats de l'examen microscopique après coloration à l'auramine des échantillons pulmonaires obtenus par mois.

Bacilloscopie \ Mois	Janvier	Février	Mars	Total
Positive	18	17	33	68
Négative	403	474	486	1363
Douteuse	4	0	1	5
Total	425	491	520	1436

La bacilloscopie a montré la présence de BAAR pour seulement 4,74% des échantillons pulmonaires durant ces trois mois (exclusivement des crachats puisque, d'une part, ils sont les plus riches en BK émié suite à un effort de toux, d'autre part ce prélèvement est réalisé trois fois durant trois jours consécutifs en raison de l'émission intermittente des BK). Cependant, ce taux de positivité varie selon le mois ; il est de 4,24 % et de 3,46 % durant le mois de Janvier et février respectivement, alors qu'en mois de Mars le taux de positivité en bacilloscopie augmente à 6,35 %.

Il est important de noter que la présence de BAAR à l'examen direct dans des prélèvements respiratoires indique que le patient est « bacillifère » et contagieux.

Tableau 4-b : Les résultats de l'examen microscopique après coloration à l'auramine des échantillons extra-pulmonaires obtenus par des trois mois.

Bacilloscopie \ Mois	Janvier	Février	Mars	Total
Positive	0	0	1	1
Négative	93	113	115	321
Total	93	113	116	322

Les frottis d'échantillons extra-pulmonaires n'ont révélé qu'une seule lame positive (d'un abcès d'adénite suppurée), ceci peut être expliqué par la nature paucibacillaire de ces échantillons.

Les lames douteuses ont fait l'objet de 0,86 % sur le total des échantillons, elles correspondent à la présence de 1 à 10 BAAR/300 champs par frottis examiné. Ces lames ont été recolorées une deuxième fois par la technique de Ziehl-Neelsen pour confirmer s'il s'agit bien de BAAR, mais le résultat fut négatif. Ceci prouve qu'il ne s'agissait pas de BAAR mais de Bacille acido-alcoolo-résistant partiel comme c'est le cas des bactéries du genre *Nocardia*, *Tsukamurella* et autre bactérie Actinomycétales. Toutefois le prélèvement doit être repris pour reprendre l'examen microscopique.

En pratique, la coloration à l'auramine est très utilisée dans les laboratoires qui doivent examiner quotidiennement de nombreux frottis. Facilitant la coloration de grandes séries, elle réduit considérablement le temps passé à l'examen d'un frottis, améliore la sensibilité de détection des BAAR compte tenu de sa lecture aisée (le champ observé est plus grand qu'à l'immersion x100), permettant ainsi l'élimination rapide des frottis négatifs, en outre elle facilite leur recherche dans les prélèvements paucibacillaires. Toutefois, elle manque de spécificité comparée à la méthode de Ziehl-Neelsen qui est une méthode de coloration caractéristique des bactéries du genre *Mycobacterium*, utilisée pour la confirmation de la présence de BAAR lors de l'apparition de colonies caractéristiques sur milieu Löwenstein-Jensen ou encore dans le cas de lames douteuses. Cependant celle-ci prend beaucoup plus de temps d'observation des frottis (une tache assez épuisante) nous obligeons à y recourir que pour une confirmation.

Un frottis est considéré comme négatif (absence de BAAR) après au moins 15 minutes d'observation de la lame par la méthode de Ziehl-Neelsen (300 champs) et au moins 5 minutes par la méthode à l'auramine.

L'examen microscopique direct ne permettant pas de distinguer les espèces du genre *Mycobacterium*, le rendu des résultats signalera la présence ou l'absence de BAAR et exprimera en cas de positivité la densité bacillaire. Par exemple, les réponses seront du type : présence de 10 BAAR/champ, ou rapportées selon un système communément utilisé (Tableaux 9 et 10 cités en annexes).

De ce fait, ce ne sont pas des méthodes de coloration spécifiques du bacille tuberculeux, mais des mycobactéries en général (des faux positifs peuvent être observés

si les prélèvements contiennent des *Nocardia* ou des bactéries apparentées). Le bacille tuberculeux étant cependant ; et de loin, la mycobactérie la plus fréquemment rencontrée dans les crachats, la mise en évidence de bacilles acido-alcool-résistants dans les échantillons est un élément de très forte présomption, mais non de certitude absolue, et le bactériologiste devra indiquer qu'il a vu des BAAR, et non des bacilles tuberculeux, c'est-à-dire n'importe quelle mycobactérie.

D'autre part, la sensibilité de ces techniques est relativement faible : le prélèvement doit contenir 10^5 BAAR/ml pour que la probabilité de positivité de l'examen soit supérieure à 95%, en outre elles ne peuvent distinguer entre les bacilles morts ou vivants. Néanmoins, l'examen microscopique demeure une étape incontournable dans le diagnostic, particulièrement en cas de suspicion de tuberculose. Mais le diagnostic de certitude ne peut être apporté que par la culture.

3- Recherche des colonies de *M. tuberculosis* après mise en culture

La culture reste la méthode de référence la plus sensible pour l'isolement en culture du bacille de Koch à partir des échantillons cliniques. Associée à une étape initiale de décontamination-fluidification pour les échantillons de crachat ou ceux prélevés de sites contaminés qui permet l'accès des décontaminants aux organismes non-mycobactériens à croissance rapide afin de pouvoir les éliminer et libérer ainsi les bacilles tuberculeux de la matrice muco-purulente.

L'examen macroscopique des milieux de cultures est réalisé après 48 heures, une semaine, un mois et deux mois afin de contrôler : la qualité de la décontamination, l'absence de colonies de mycobactéries atypiques à croissance rapide, vérifier l'aspect morphologique caractéristique des colonies qui sont apparus pour confirmer qu'il s'agit bien de celle du BK, faire le dénombrement de ces colonies afin d'estimer la densité bacillaire et par conséquent la contagiosité du malade. Le résultat est inscrit dans le registre du laboratoire tout en notant le numéro du tube positif correspondant au nom du patient ainsi que le nombre de colonies, si elles sont dénombrables ou pas. Lorsqu'une culture est positive, une coloration de Ziehl-Neelsen est réalisée sur un frottis confectionné à partir d'une colonie prélevée en conditions d'asepsie, et vérifie qu'il s'agit de BAAR.

Comme *M. tuberculosis* ne pousse pas sur un milieu ordinaire, pour cela, on utilise un milieu enrichi ; le milieu de Löwenstein-Jensen (L-J) : c'est un milieu gélosé à l'œuf, contenant du vert de malachite (inhibe la croissance des germes d'accompagnement qui

ont pu échapper à la décontamination), de sels minéraux, de féculé de pomme de terre et de glycérol. Les conditions optimales pour la croissance de *M. tuberculosis* sont :

Une excellente aération des milieux (bactérie aérobie stricte), un pH proche de la neutralité (6,7) et une température d'incubation de 37 °C.

En raison de la croissance lente de *M. tuberculosis* (le temps de division est de 15 à 20 heures) les colonies n'apparaissent qu'après 2 à 3 semaines d'incubation, pour certains prélèvements paucibacillaires ou provenant de malades traités, la culture ne peut être positive qu'après 2 à 3 mois d'incubation.

Tout d'abord petites, arrondies, lisses et crèmes, les colonies de *M. tuberculosis* se développent sur le milieu L-J atteignant plus de 5 mm de diamètre et deviennent beiges, rugueuses à bords irréguliers en chou-fleur dites « eugoniques » (figure 4).

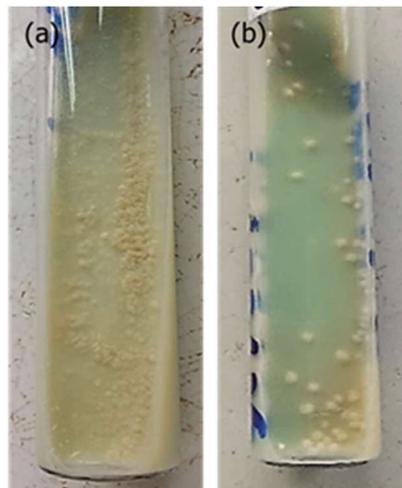


Figure 4 : photographies des cultures positives obtenues sur milieu Löwenstein-Jensen après 42 jours d'incubation, prises à l'aide d'un téléphone portable Samsung Galaxy S4. (a) : culture indénombrable, (b) : culture dénombrable.

Les résultats de la culture des 1758 échantillons réceptionnés sur le milieu L-J ont révélé la présence de colonies caractéristiques de *M. tuberculosis* chez 5,23% des échantillons. Ces résultats sont mentionnés dans les tableaux 5-a et 5-b (figure 5,6) :

Tableau 5-a: résultats des cultures des échantillons pulmonaires sur le milieu Löwenstein-Jensen.

Cultures \ Mois	Janvier	Février	Mars	Total
Positives	16	24	44	84
Négatives	392	409	415	1216
Contaminées	17	58	61	136
Total	425	491	520	1436

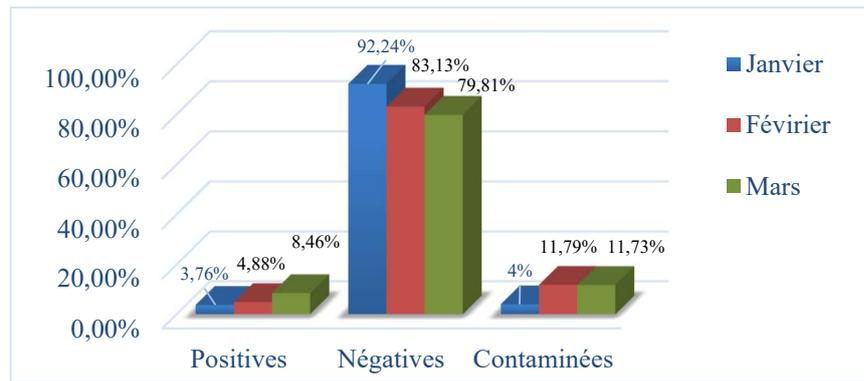


Figure 5 : Représentation en histogrammes des résultats des cultures des échantillons pulmonaires sur milieu Löwenstein-Jensen durant les trois mois.

Les échantillons pulmonaires ont fait l’objet de 4,78 % des cultures positives, dont principalement des crachats, puisque ce sont les échantillons de référence qui permettent de recueillir grâce à une toux productive une quantité suffisante de bacilles tuberculeux qui ont été isolé par la suite sur le milieu L-J confirmant ainsi le diagnostic d’une infection tuberculeuse pulmonaire. Nous avons également enregistré deux échantillons d’aspirations bronchiques qui ont été recueillis en raison de l’absence de sécrétions.

Tableau 5-b : Les résultats obtenus des cultures des échantillons extra-pulmonaires sur le milieu Löwenstein-Jensen obtenus selon le mois.

Mois \ Cultures	Janvier	Février	Mars	Total
Positives	0	4	4	8
Négatives	89	95	94	278
Contaminées	4	14	18	36
Total	93	113	116	322

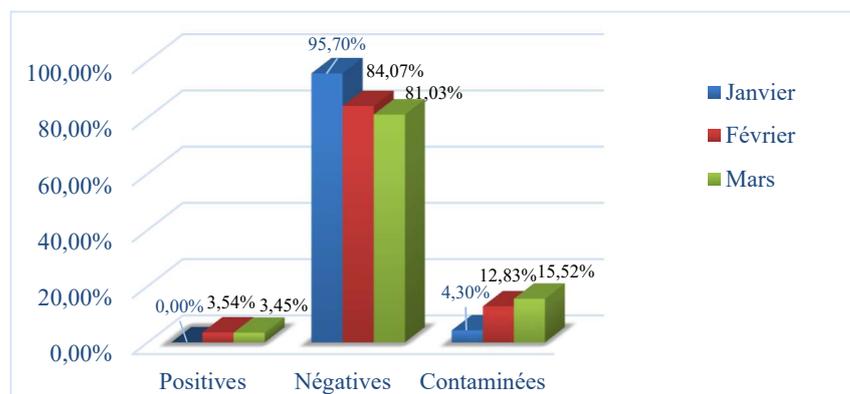


Figure 6 : Représentation en histogrammes des résultats des cultures des échantillons extra-pulmonaires sur milieu Löwenstein-Jensen durant les trois mois.

Les échantillons de nature extra-pulmonaire ont fait l'objet de de 0,46 % de cultures positives. Ce taux s'explique par la courte durée du rendu des résultats de positivité des cultures (42 jours), il faut noter que les échantillons extra-pulmonaires nécessitent généralement un temps d'incubation beaucoup plus long (2 à 3 mois) en raison de la pauvreté de l'échantillon en bacilles tuberculeux.

Les résultats de notre étude sont tout à fait concordants avec ce qu'on peut trouver en littérature. Effectivement la tuberculose pulmonaire reste la forme prédominante de la maladie étant donné qu'elle touche principalement les poumons. Malgré sa constante diminution en Algérie depuis l'an 2001, l'infection tuberculeuse reste une pathologie qui persiste et toujours d'actualité.

Les 84,98 % des échantillons restants, des deux formes confondues ont déclaré une culture négative, ceci nous renseigne sur l'absence d'une infection tuberculeuse chez ces patients.

- Qualité du prétraitement :

Nos résultats indiquent qu'un taux de souillure des cultures de 9,78 % a été enregistré sur le total des 1758 échantillons mis en culture (tableaux 5-a et 5-b).

D'autant que le taux de souillure des prélèvements pulmonaire, principalement des crachats (7,73 %) est nettement plus élevé que celui des prélèvements extra-pulmonaires (2,05 %). Ceci s'explique par la richesse des prélèvements de crachats en germes commensaux (flore oro-pharyngée) responsables de ce taux élevé en contaminations, contrairement aux prélèvements extra-pulmonaires qui pour la plupart sont prélevés de cavités stériles estompes de germes contaminants.

Ce taux de souillure (dû au développement de bactéries à croissance rapide) est légèrement supérieur aux normes admises (3 à 5 %), ceci peut être dû, d'une part, à la forte contamination des échantillons par la flore d'accompagnement, cette dernière peut résister à l'action des réactifs décontaminants et de ce fait envahir les milieux de culture entravant la croissance des BK. D'autre part, bien que les BK soient plus résistants que les autres bactéries aux procédures de décontamination, ils sont en partie altérés en raison de décontaminations trop prolongées ou effectuées dans de mauvaises conditions, conduisant à l'apparition de colonies non-caractéristiques.

4- Épidémiologie descriptive

Afin de déterminer la présence ou l'absence d'une infection tuberculeuse chez ces patients, nous avons combiné les résultats de l'examen microscopique des frottis après

coloration à l'auramine et l'examen macroscopique des cultures sur le milieu L-J, pour les deux formes de la tuberculose. Ces derniers sont illustrés dans les tableaux 6-a et 6-b.

Tableau 6-a : les résultats de la bacilloscopie et de la culture des produits pathologiques pulmonaires durant les trois mois.

Résultats \ Mois	Janvier	Février	Mars	Total
Microscopie(+) /culture(+)	8	9	21	38
Microscopie(+) /culture(-)	13	6	8	27
Microscopie(-) /culture(+)	8	15	23	46
Microscopie(-) / culture(-)	379	403	407	1189
Cultures contaminées	17	58	61	136
Total	425	491	520	1436

(+) : positive ; (-) : négative.

Tableau 6-b : les résultats de la bacilloscopie et de la culture des produits pathologiques extra-pulmonaires durant les trois mois.

Résultats \ Mois	Janvier	Février	Mars	Total
Microscopie(+) /culture(+)	0	0	0	0
Microscopie(+) /culture(-)	0	0	1	1
Microscopie(-) /culture(+)	0	4	4	8
Microscopie(-) / culture(-)	89	95	94	278
Cultures contaminées	4	14	18	36
Total	93	113	116	322

(+) : positive ; (-) : négative.

Sur les 84 cultures positives d'échantillons pulmonaires, 38 ont présenté une microscopie positive et pour les 46 autres elle fut négative. Cependant, les échantillons de nature extra-pulmonaires ont fait l'objet de seulement 8 cultures positives.

Ceci confirme la meilleure efficacité et sensibilité de la culture. Puisque d'une part, elle optimise considérablement les résultats de la microscopie qui a été chez certains cas négative (les lésions tuberculeuses de certains patients ne permettent pas d'émettre suffisamment de bacilles qui ne seront pas par la suite détectés par l'examen microscopique, par conséquent cet apport de bacilles est récupéré grâce à la culture) et d'autre part, elle améliore considérablement le dépistage des formes extra-pulmonaires de la tuberculose dont les prélèvements sont pauvres en bacilles tuberculeux.

Le dénombrement des colonies qui sont apparues lors de l'examen macroscopique des cultures positives, et surtout la forte charge de ces dernières nous renseigne sur la contagiosité et la virulence des patients, ou encore estimer l'évolution de la maladie chez les patients sous traitement antituberculeux.

Les résultats où seule la microscopie est positive (27 échantillons) seraient, peut-être, liés à la présence de bacilles morts dans le cas où le patient est sous traitement, en effet le patient continu à excréter des bacilles par la toux afin de nettoyer les lésions tuberculeuses. De plus, une décontamination trop drastique (une concentration élevée de la soude ou de l'acide, un temps de contact entre l'échantillon avec les réactifs plus longs que prévu) peut conduire à l'élimination d'une partie des bacilles présents.

La nécessité de combiner le résultat des deux examens (microscopique et macroscopique) a pour but de faire ressortir, d'une part, les cas dangereux de la tuberculose, dits « bacillifère » correspondants aux patients dont le résultat de la bacilloscopie ainsi que de la culture est positif. D'autre part, mettre en exergue les cas dont la bacilloscopie a révélé l'absence de BAAR mais que la culture s'est avérée positive déclarant ainsi la maladie.

Grâce à ces résultats, nous avons pu démontrer les cas non tuberculeux, des cas atteints d'une infection tuberculeuse.

5- Paramètres épidémiologiques

- Répartition de la tuberculose selon le sexe :

Bien que le plus souvent, la tuberculose fait le terrain chez les hommes plus que les femmes (en raison d'antécédents de tabagisme, de maladies professionnelles respiratoires...etc.), les résultats de notre étude font état d'une prédominance de la prévalence de la tuberculose, toutes formes confondues, chez le sexe féminin (71,43 % des cultures positives obtenues), correspondant à 25 patientes, 23 d'âge adulte et 2 enfants. Contrairement à ceux de sexe masculin, qui ont fait l'objet de 38,10% des cultures positives, soit 15 patients enregistrés.

La répartition selon le sexe et le service des patients pour lesquels la culture a été positive est illustrée dans les tableaux 7-a,b et 8-a,b (figure 7,8).

Tableau 7-a : répartition des cultures positives des échantillons pulmonaires selon le service (patients de sexe masculin)

Hommes				
Services \ Mois	Janvier	Février	Mars	Total
Traitement ambulatoire	3	14	3	20
Pneumophtisiologie	2	3	4	9
Chirurgie thoracique	2	0	0	2
Total	7	17	7	31

Tableau 7-b: Répartition des cultures positives des échantillons pulmonaires selon le service (patients de sexe féminin)

Femmes				
Services \ Mois	Janvier	Février	Mars	Total
Pneumophtisiologie	6	3	22	16
Traitement ambulatoire	0	4	10*	12
Pédiatrie	0	0	5	5
Cardiologie	3	0	0	3
Total	9	7	37	53

* : 2 échantillons d'aspirations bronchiques.

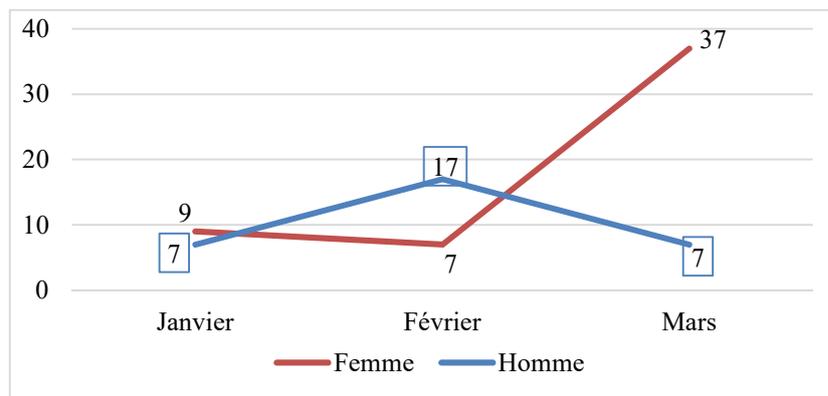


Figure 7: Représentation des cultures positives des échantillons pulmonaires selon le sexe durant les trois mois.

Tableau 8-a: répartition des cultures positives des échantillons extra-pulmonaires selon le service (patients de sexe masculin)

Hommes				
Service \ Mois	Janvier	Février	Mars	Total
Traitement ambulatoire	0	1	0	1

Tableau 8-b: répartition des cultures positives des échantillons extra-pulmonaires selon le service (patients de sexe féminin)

Femmes				
Services \ Mois	Janviers	Février	Mars	Total
Traitement ambulatoire	0	2	0	2
Infectiologie	0	1	1	2
Médecine interne	0	0	1	1
Orthopédie	0	0	1	1
Pédiatrie	0	0	1	1
Total	0	3	4	7

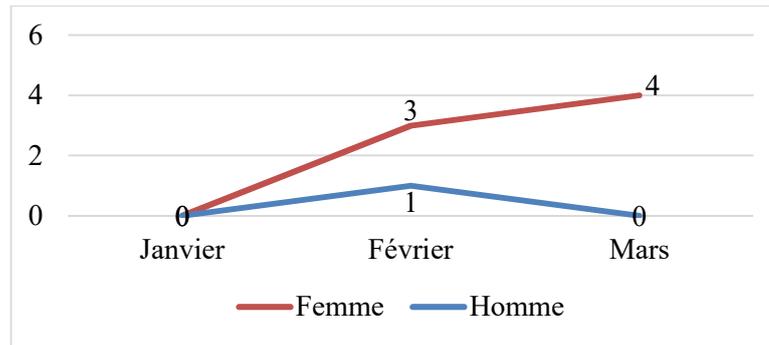


Figure 8: Représentation des cultures positives des échantillons extra-pulmonaires selon le sexe durant les trois mois.

- Répartition de la tuberculose en fonction des services

Durant les trois mois, la majorité des cas de tuberculose pulmonaire enregistrés, ont été des patients résidents au niveau du service de Pneumophtisiologie (16 patients), dont 12 femmes et 4 hommes. Les patients externes (ayant consultés au service de traitement ambulatoire du CHU de Constantine), ont été au nombre de 13, à raison de 9 hommes et 4 femmes.

Les services de cardiologie et de chirurgie thoracique ont révélé chacun un seul cas, avec respectivement une femme et un homme.

Pour la tuberculose extra-pulmonaires nous avons enregistré des cultures positives chez 7 cas à raison de 6 femmes et un seul homme, la plupart ont été des résidents au niveau des services internes du CHU : le service d'infectiologie (n = 2), le service de médecine interne (n = 1) et d'orthopédie (n = 1). Pour les patients de traitement ambulatoire (n = 3) nous avons enregistré un homme et deux femmes.

Pour sa part, le service de pédiatrie a recensé deux patientes.

- Répartition de la tuberculose selon la nature des échantillons

Les crachats sont les échantillons pulmonaires les plus prédominants (97,62%), puisque la tuberculose touche essentiellement les poumons. Bien que le liquide d'aspirations bronchiques fût de faible prévalence, il a fait l'objet de deux cultures positives (2,38%). Quant au liquide de tubage gastrique, n'a présenté aucune culture positive.

En ce qui concerne les échantillons de nature extra-pulmonaire ; les échantillons d'urines ont été les plus répandus parmi les échantillons envoyés, néanmoins nous n'avons isolé aucune souche mycobactérienne à partir de ce type de prélèvement.

Il s'est avéré donc, que les échantillons qui étaient moins fréquents sont ceux qui ont démontré un résultat positif en culture, ces derniers sont : liquide Céphalo-Rachidien, abcès d'adénite suppurée, pus, liquide d'ascites, abcès et liquide de ponction ganglionnaire.

Par ailleurs, nous avons constaté également, que les échantillons restants, envoyés à partir des services indiqués dans les tableaux (2-a,b,c, 3-a,b,c) cités plus haut, n'ont dévoilé aucun cas positifs.

Bien que les chiffres déclarés en 2015 au niveau du CHU de Constantine (169 cas de tuberculose pulmonaire et 554 autres de la tuberculose extra-pulmonaire) ont indiqué clairement la forte prévalence de la forme extra-pulmonaire. Durant notre étude, et qui se réfère au 1^{er} trimestre de l'an 2016, nous avons enregistré 32 cas atteints d'une tuberculose pulmonaire et 8 cas de tuberculose extra-pulmonaire, témoignant ainsi de la faible fréquence de la tuberculose durant cette période, principalement des formes extra-pulmonaires de la maladie.

L'augmentation du nombre des cas de tuberculose à localisation extra-pulmonaire est en partie due au long délai du rendu des résultats du diagnostic bactériologique qui retarde ainsi le délai de déclaration de ces cas.

En effet, contrairement à la tuberculose pulmonaire qui peut être maîtrisable du point de vue diagnostic et suivi (un diagnostic présomptif le plus souvent peut être établi reposant sur un faisceau d'arguments cliniques et radiologiques). La tuberculose extra pulmonaire demeure difficile à diagnostiquer ; puisqu'elle ne touche pas le poumon en lui-même et rend son diagnostic moins aisé dépendant de la difficulté d'obtention de matériel par geste invasif (biopsie osseuse, liquide céphalorachidien, biopsie hépatique, etc.), mais aussi d'une documentation bactériologique parfois difficile (inoculum bactérien moindre) où l'examen microscopique direct des prélèvements révèle rarement la présence des BAAR. Ainsi le diagnostic de la tuberculose extra pulmonaire ne peut être posé avec certitude qu'après positivité de la culture, bien que celle-ci reste parfois négative ou n'est positive qu'après 3 à 4 mois d'incubation, retardant ainsi le délai de déclaration de la maladie chez les patients.

Même si l'Algérie a connu une diminution de la prévalence de la maladie (2001-2014), cette dernière continue d'être l'une des infections contagieuses posant un grand problème de santé publique.

Conclusion

Malgré l'existence de traitements antibiotiques contre la tuberculose, cette maladie reste l'une des principales causes de morbidité et de mortalité à l'échelle mondiale par rapport aux autres maladies infectieuses. On assiste même à la résurgence de cette dernière, dont les causes seraient étroitement liées à l'émergence de souches multirésistantes (MDR-TB) et ultrarésistantes (XDR-TB) aux antibiotiques.

L'objectif principal de ce travail était la mise en évidence de la présence de *Mycobacterium tuberculosis* (agent étiologique de la tuberculose) par des techniques conventionnelles du diagnostic bactériologique de la tuberculose (examen microscopique des frottis colorés à l'auramine et mise en culture sur le milieu L-J). Cette étude a été réalisée au niveau de l'unité de la tuberculose, laboratoire de bactériologie CHU Benbadis sur 1758 échantillons pathologiques (1436 échantillons pulmonaire et 322 extra-pulmonaire) de vingt-deux natures différentes chez les patients hospitalisés (53,07 %) et externes (46,93 %).

Sur une période de trois mois (1^{er} Janvier au 31 Mars 2016), 40 patients différents ont présenté une infection tuberculeuse, 80 % à localisation pulmonaire (84 échantillons positifs) et 20 % à localisation extra-pulmonaire (8 échantillons positifs). Nos résultats ont fait part d'une prédominance féminine (62,5 %) que masculine avec une fréquence de 37,5 %, d'autant que la maladie a touché les différentes tranches d'âge.

Notre étude fait apparaître clairement que les techniques conventionnelles de microscopie et de culture demeurent indispensables pour le diagnostic de certitude de la tuberculose maladie. Néanmoins, l'avènement de nouveaux outils qui utilisent des techniques moléculaires, dans la pratique clinique de routine, en complémentarité avec les techniques phénotypiques, permettra de réduire considérablement le délai du diagnostic bactériologique, d'accélérer la prise en charge des patients allant même à la détection rapide des résistances aux antituberculeux.

Références bibliographiques

- [1] **Bezuidenhout J. and Schneider J.W. in Grange J.M. ; Raviglione M.C. ; Yew W.W. ; Starke J.R. ; Pai M and Donald P.R. (2009)** Pathology and pathogenesis of tuberculosis in Tuberculosis. A Comprehensive Clinical Reference. Edition : Saunders Elsevier.
- [2] **El khéchine A. ; Couderc C. ;Flaudrops C. ; Raoult D and Drancourt M. (2011)** Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of- Flight Mass Spectrometry. Identification of Mycobacteria in Routine Clinical Practice. Plose one, Volume 6, issue 9, e24720. p : 1-7.
- [3] **Ligue pulmonaire Suisse (2007)** Manuel de la tuberculose.
- [4] **Wolinsky E. in Davis B.D. ; Dulbecco R. ; Eisen H.N and Ginsberg H.S. (1990)** chapter : Mycobacteria in Microbiology. Edition : J. B. Lippincott Company. p : 647-663.
- [5] **Denis F. Martin C. dans Denis F. ; Ploy M.C. ; Martin C. ; Bingen E. et Quentin R. (2011)** Chapitre : Mycobactéries dans Bactériologie médicale. Edition : Elsevier Masson. p : 507-535.
- [6] **Fitzgerald D.W. ; Sterling T.R. and Haas D.W. in Mandell G.L. ; Bennett J.E. and Dolin R. (2010)** Chapter : *Mycobacterium tuberculosis* in Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Edition : Churchill Livingstone Elsevier. Seventh edition. Volume 1. p: 3129-3163.
- [7] **Berche P. ; Gaillard J.L. et Simonet M. (1988)** Chapitre : Les mycobactéries de la tuberculose dans Bactériologie. Edition : Flammarion Médecine-Sciences. p : 407-429.
- [8] **Ait-Khaled N. et Enarson D. (1999)** Tuberculose manuel pour les étudiants en médecine.
- [9] **Godreuil S. ; Carrière C. ; Jumas-Bilak E. ; Terru D. et Marchandin H. (2003)** Diagnostic moléculaire des infections à mycobactéries. La Lettre du Pneumologue - Volume VI – n°2.
- [10] **Cole S.T. and Brosch R. (1998)** Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature Vol : 393. p : 537-544.
- [11] **Organisation Mondiale de la Santé (OMS).**
Site web :<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/fr/>

[12] Mathys V. (2010) Contribution à la compréhension des mécanismes moléculaires de résistance de *M. tuberculosis* aux agents antituberculeux. Thèse en vue de l'obtention du titre de docteur en Science Biomédicales et Pharmaceutiques. Université Libre de Bruxelles.

[13] Comité médical national de lutte contre la tuberculose et les maladies respiratoires (2011) Manuel de la lutte antituberculeuse.

[14] Dautzenberg B. et Bouvet E. dans Aubier M. ; Fournier M. et Pariente R. (2003) Chapitre : Tuberculose et infections à mycobactéries atypiques (SIDA exclu) dans Pneumologie. Edition : Ellipses Édition Marketing. p : 349-363.

[15] Canu A. dans Gazengel J.M. et Orecchioni A.M. (2013) Chapitre : Microbiologie dans Le préparateur en pharmacie 2^{ème} édition. Edition : Editions Lavoisier. p : 273-360.

Annexes

Annexe 1

Tableau 9 : Code de lecture de frottis colorés à l'auramine recommandée par l'Union Internationale Contre la Tuberculose et les Maladies Respiratoires

NOMBRE DE BAAR	CODE UTILISÉ
Pas de BAAR sur la lame	0
1 à 10 BAAR sur la lame	douteux (faire Ziehl)
Moins de 1 BAAR par champ mais plus de 10 sur la lame	+
1 à 9 BAAR par champ	++
10 à 99 par champ	+++
Plus de 10 BAAR par champ	++++

Tableau 10 : code de lecture des frottis colorés par la méthode de Ziehl-Neelsen recommandée par l'Union Internationale Contre la Tuberculose et les Maladies Respiratoires

NOMBRE DE BARR	CODE UTILISÉ
Pas de BAAR pour 100 champs	0
1 à 9 BAAR pour 100 champs	nombre exact de BAAR
10 à 99 BAAR pour 100 champs	+
1 à 10 BAAR par champ	++
Plus de 10 BAAR par champ	+++

Annexes 2

Traitement des prélèvements polymicrobiensL'acide sulfurique H₂SO₄ à 15% :H₂SO₄ 150 mlH₂O distillée 850 ml

Stériliser par autoclavage

La soude NaOH à 6% :

NaOH 60 g

H₂O distillée 1000 ml

Stériliser par autoclavage

La soude NaOH à 4% :

NaOH 40 g

H₂O distillée 1000 ml

Stériliser par autoclavage

Recherche du BAAR à l'examen direct**Coloration à l'auramine**

Acide-alcool:

Alcool 90° 1500 ml

H₂O distillée 500ml

NaCl 20 g

HCl (acide chloridrique) 20 ml

Auramine :

Auramine 3g

Acide phéniqué 10 ml

H₂O distillée 1000 ml

Permanganate de potassium :

KMnO₄ 1gH₂O distillée 1000 ml**Technique**

Couvrir la lame avec la solution d'auramine 10 minutes. Rincer à l'eau.

Couvrir avec le mélange acide-alcool 4 minutes. Rincer.

Contre-colorer avec une solution de permanganate de potassium 30 secondes-1minutes.

Laisser sécher et examiner à l'aide d'un microscope à fluorescence.

Les BAAR apparaissent en jaune fluorescent sur fond noir.

Coloration de Ziehl Nelsen

Phénol :

Phénol	94 g
H ₂ O distillée	1000 ml

Acide sulfurique 25% :

H ₂ O distillée	750 ml
H ₂ SO ₄	250 ml

Technique

Recouvrir le frottis de fuchsine phéniquée.

Chouffer très doucement jusqu'à l'émission de vapeur.

Le colorant doit agir 10 minutes sans ébullition ni dessèchement. Rincer.

Couvrir le frottis d'acide sulfurique à 25%, 3 minutes. Rincer à l'eau distillée.

Couvrir le frottis d'alcool 5 minutes. Rincer.

Couvrir le frottis avec la solution de bleu de méthylène, 2 minutes.

Rincer la lame, laisser sécher à l'air et examiner le frottis à l'immersion.

Les BAAR apparaissent rosés sur le fond bleu de la préparation.

Annexes 3**Milieu de culture****Composition de Löwenstein-Jensen**

Purée de pomme de terre	30 g
Asparagine	3,6 g
KH ₂ PO ₄	2,4 g
Citrate de magnésium	0,6 g
Vert de malachite	0,4 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,24 g
Œuf entier homogénéisé	1.0 ml
Glycérol	12.0 ml

Technique

Gélose inclinée en tubes. Milieu Prêt à l'emploi.

**Diagnostic bactériologique de la tuberculose.
Étude prospective de trois mois au CHU Benbadis Constantine**

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Microbiologie générale et biologie moléculaire des microorganismes.

La tuberculose est une maladie infectieuse due au bacille de Koch. La forme pulmonaire de loin la plus fréquente est celle qui pose un problème de santé publique étant la forme de dissémination et de contagion de la maladie. La forme extra-pulmonaire considérée autre fois rare reste d'actualité.

Au cours de notre stage au sein du laboratoire de Bactériologie du Centre-Hospitalo-Universitaire Benbadis Constantine, notre objectif était de rechercher *M. tuberculosis* dans les produits pathologiques via des techniques conventionnelles du diagnostic bactériologique d'une tuberculose, et de réaliser une étude prospective sur une période de trois mois.

La recherche de bacilles acido-alcoolo-résistants par microscopie après coloration à l'auramine (confirmation par celle de Ziehl-Neelsen), et la mise en culture sur milieu Löwenstein-Jensen constituent les méthodes de référence qu'on a employée pour son diagnostic microbiologique.

À travers cette étude, nos résultats ont déclaré 40 patients différents, 80 % à localisation pulmonaire (32 cas), 20 % à localisation extra-pulmonaire (8 cas). Toutefois cette prédominance est observée chez les femmes (62,5 %) que chez les hommes (37,5 %).

Les techniques traditionnelles de microscopie et de culture restent indispensables du diagnostic de certitude de cette maladie. Toutefois, il serait plus utile d'introduire de nouveaux outils (moléculaire) dans la pratique clinique de routine afin d'optimiser la lutte contre la tuberculose en diminuant le délai du diagnostic, allant même jusqu'à la détection rapide de la résistance aux antituberculeux.

Mots clés : Tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis*, bacille de Koch (BK), complexe tuberculeux, diagnostic bactériologique.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de génie microbiologique et applications

Jury d'évaluation :

Président du jury : AITKAKI Zahia (Pr. – Univ3 Constantine).
Rapporteur : OULMI Lamia (MCB - UFM Constantine).
Examineur : HECINI Abba (MCB – Univ3 Constantine).

Date de soutenance : 26/06/2016