

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

287

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE 8 MAI 1945 GUELMA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES DE LA TERRE ET DE
L'UNIVERS
DEPARTEMENT DE SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE



12/612

Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie

Spécialité/Option : Biologie moléculaire et cellulaire ; Biologie moléculaire des procaryotes

Thème : Application de la méthode de fluidification-concentration à
l'hypochlorite de sodium dans le diagnostic de la
tuberculose pulmonaire

Présenté par :

- HENDAQUI Ahlem
- SALAH-SALAH Karima

Devant le jury composé de :

Président : BOUMAAZA . A

(M.A.B Univ .Guelma)

Examineur : KHENAKA . K

(M.A.B Univ.Guelma)

Examineur : YOUNSI .M

(M.A.B Univ.Guelma)

Promoteur : BENOURETH .D.E

(Pr. Univ Guelma)

Membres invités

: Dr NAAMOUNE

(Médecin UCTMR Guelma)

: Dr HAMLAOUI

(Médecin EPH IBN ZOHR service de
Pneumologie)

Juin 2012

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier Professeur BENOUARETH Djamel Eddine pour nous avoir encadré, soutenu et conseillé tout au long de ces années, veuillez trouver l'expression de nos reconnaissances les plus sincères pour tous les efforts et les précieux conseils sans lesquels ce travail n'aurait jamais vu le jour.

Nos remerciements s'adressent également aux membres du jury qui ont bien voulu accepté de nous honorer et de valoriser ce travail ainsi que Docteur Naamane.B et Docteur Hamlaoui

Nous tenons à remercier : Dr.Salah Salah Mahmoud Yassine, Dr Nigri, Pr Amora, qui ont bien voulu nous accorder de leur temps pour des renseignements qui nous ont été bénéfiques pour la mise au point de ce travail.

On exprime notre gratitude à tous les employés de l'UCTMR de la wilaya de Guelma qui nous ont accueillis et qui ont mis à notre disposition leur laboratoire.

On tient à exprimer nos reconnaissances envers Pr Salah-Salah Houria chercheur à l'institut Pasteur, Alger, pour les documents très précieux ainsi que les moyens matériels qu'elle nous a fourni pour la réalisation de ce travail.

On remercie aussi tous ceux qui nous ont enseignés et nous ont permis d'arriver là où nous sommes. Ainsi que toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Melles : Salah Salah Karima et Hendacou Ahlem.

Dédicace

Je dédie ce travail :

- *A la mémoire de ma grand mère*
- *A mes chers parents.*
- *A mes frères mes sœurs et ma belle sœur.*
- *A tous les membres de ma famille.*
- *A tous mes Amis.*

KARIMA

Produced with Scantopdf

Dédicace

Je dédie ce travail :

- *A la mémoire de ma sœur lilya*
- *A mes chers parents.*
- *A mes frères mes sœurs et ma belle sœur.*
- *A tous les membres de ma famille.*
- *A tous mes Amis.*

AHLEM

Produced with Scantopdf

Table des matières	Pages
Introduction	1
Chapitre I : Généralité sur la tuberculose	
I.1 Définition.....	3
I.2 Historique.....	3
I.3 Epidémiologie descriptive.....	4
I.3.1 La tuberculose dans le monde en l'an 2009.....	4
I.3.2 La tuberculose en Algérie en l'an 2010.....	6
Chapitre II : Agent causal de la tuberculose	
II.1 Les mycobactéries.....	9
II.1.1 Taxonomie et classification.....	9
II.1.2 Mycobacterium tuberculosis.....	11
II.1.2.1 Caractéristiques de Mycobacterium tuberculosis.....	11
Chapitre III : L'infection tuberculeuse	
III.1 Transmission et développement de la maladie.....	15
III.2 Primo-infection.....	15
III.3 Tuberculose maladie.....	17
III.3.1 Les différents types de la tuberculose.....	17
III.3.1.1 La tuberculose pulmonaire.....	17
III.3.1.2 Autre formes de tuberculose pulmonaires.....	18
III.3.1.2 Tuberculose extra-pulmonaire.....	19
Chapitre IV : Dépistage, diagnostic et traitement	
IV.1 Dépistage de la tuberculose latente (primo-infection).....	21
IV.2 Diagnostic de la tuberculose active.....	22
IV.2.1 Examen radiologique.....	22

IV.2.2 Examen bactériologique	23
IV.2.2.1 Diagnostic direct.....	24
IV.2.2.2 Culture en milieu solide.....	26
IV.2.2.3 Culture en milieu liquide.....	26
IV.3 L'antibiogramme	27
IV.3.1 Les antibiotiques antituberculeux.....	27
IV.4 Typages moléculaires de M. tuberculosis.....	28
IV.4.1 Les méthodes de typage moléculaire des bacilles de la tuberculose	28
IV.4.1.1 La première méthode de référence.....	29
IV.4.1.2 La méthode « SPOLIGOTYPING ».....	30
IV.4.1.3 La nouvelle méthode de référence :Le typage MIRU.....	31
IV.5 Traitement de la tuberculose.....	32
IV.5.1 Traitement de la tuberculose latente	32
IV.5.2 Traitement de la tuberculose active.....	33

Partie pratique

Objectif	36
I. Matériel et méthodes	36
I.1 Méthodologie	36
I.2 Site d'étude	36
I.3 Population étudiée.....	36
I.4 Protocole technique.....	36
I.4.1 Préparation du frottis d'expectoration pour l'examen direct.....	36
I.4.2 Préparation du frottis après traitement d'expectoration par l'hypochlorite de sodium (NaOCl).....	37
I.4.3 Coloration de Ziehl-Neelsen à chaud)	38
I.4.4 Evaluation de la sensibilité de la méthode à l'hypochlorite de sodium par rapport à la mise en culture.....	40

II. Résultats :	43
II.1 Résultats de l'évaluation de la densité bacillaire avant et après traitement des expectorations par l'hypochlorite de sodium à 3,94% (NaOCl) dans le diagnostic de la tuberculose pulmonaire.....	47
II.1.1 Interprétation des Résultats de l'examen microscopique.....	49
II.1.2 Résultats de l'évaluation de la sensibilité par la mise en culture sur milieu solide.....	53
III. Discussion	51
Conclusion :	56

Références bibliographiques

Annexes

Produced with ScanTOPDF

Liste des figures

Pages

Figure 1: Incidence Estimée de la tuberculose par pays en l'an 2009.....	5
Figure 2: Cas de tuberculose par région OMS, 2009.....	5
Figure 3 : Incidence de la tuberculose de 1962 à 2010.....	8
Figure 4 : Taxonomie des mycobactéries.....	10
Figure 5: Image de <i>M. tuberculosis</i> par microscopie électronique à balayage (21228x).....	11
Figure 6 : Photo de la colonie de BK sur milieu de Lowenstein Jensen.....	12
Figure 7: La paroi cellulaire de <i>M.tuberculosis</i>	13
Figure 8 : La contamination par voie aérienne.....	15
Figure 9: Localisation des alvéoles dans le poulmon.....	16
Figure 10: Caverne tuberculeuse.....	18
Figure 11 : La tuberculose miliaire : Dissémination régulière des petites lésions blanchâtres de même taille.....	19
Figure 12: Intradermoréaction à la tuberculine.....	21
Figure 13 : Radiographie d'un tuberculeux pulmonaire.....	22
Figure 14: Image de <i>M. tuberculosis</i> au microscope après coloration de Ziehl-Neelsen (100x).....	25
Figure 15: schéma thérapeutique standard.....	34
Figure 16 : Prélèvement avec l'anse une parcelle du matérielle purulent.....	37
Figure 17: Etalement de la parcelle purulente sur la lame.....	37
Figure 18 : Culot après sédimentation 18h.....	38
Figure 19 : Première étape de coloration de Ziehl-Neelsen à chaud.....	39
Figure 20 : Etape de décoloration par l'acide sulfurique dilué au ¼ et l'alcool 90%.....	39
Figure 21: Etape de Contre coloration par la solution de bleu de méthylène.....	40
Figure 22: Frottis d'expectorations après coloration de Ziehl-Neelsen à chaud.....	40
Figure 23 : Culot après centrifugation 3000 tours par minute pendant 15minute.....	41
Figure 24 : Ensemencement du culot dans un tube de Löwenstein-Jensen.....	41
Figure 25 : Répartition des cas des malades de TPM+ aux années 2008 à 2011.....	43
Figure 26 : Répartition mensuelles des cas de la tuberculose pulmonaire à microscopie positive aux années 2008 à 2011.....	45
Figure 27 : Répartition des cas de TPM+ selon l'âge et le sexe aux années 2008-2011.....	46

Figure 28: Répartition selon le sexe.....	48
Figure 29 : Répartition selon l'âge.....	48
Figure 30: Répartition selon le motif de prélèvement.....	49
Figure 31: Comparaison des résultats de la microscopie (100x) de <i>M.tuberculosis</i> sans (NaOCl-) et avec (NaOCl+)	50
Figure 32: Représentation graphique de l'étude comparative.....	51
Figure 33 : Culture positif sur milieu solide apres 28 jour.....	52

Produced with ScanTOPDF

Liste des tableaux

Pages

Tableau 1: estimations de l'incidence, de la prévalence et de la mortalité de la tuberculose en l'an 2009.....	6
Tableau 2: Incidence de la tuberculose en Algérie, 2001-2010 (taux pour 100 000).....	7
Tableau 3 : Test d'identification des mycobactéries.....	13
Tableau 4 : répartition des cas des malades aux années 2008 à 2011.....	43
Tableau 5 : Répartition mensuelles des cas de la tuberculose pulmonaire à microscopie positive aux années 2008 à 2011.....	44
Tableau 6 : Répartition des cas de tuberculose pulmonaire à microscopie positive selon l'âge et le sexe aux années 2008 à 2011.....	46
Tableau 7: Origine des échantillons de crachat.....	47
Tableau 8 : Comparaison des résultats de la microscopie sans (NaOCl-) et avec (NaOCl+).....	50
Tableau 9: Comparaison des résultats de la culture faite à partir des échantillons non traités par le NaOCl par rapport à la méthode à l'hypochlorite de sodium	52
Tableau 10: Comparaison des résultats de la culture faite à partir des échantillons non traités par le NaOCl par rapport à la méthode directe.....	52

Produced with ScanTopdf

Liste des abréviations

- ADN** : Acide désoxyribonucléique.
- BAAR** : Bacille- acido -alcool- résistant.
- BCG** : Vaccin Bilié de Calmette et Guérin.
- BK** : Bacille de Kokh.
- C** :Le Cyclosérine.
- DOTS** : Directly Observed Treatment Short-course .
- DR** : Direct Repeat.
- E-P** : Extra pulmonaire.
- EMB ou E** : Ethambutol.
- IDR** : Intradermoréaction à la tuberculine.
- IFN- γ** :Interféron- γ .
- INH** : Isoniazide.
- ITL** : Infection tuberculeuse latente.
- KAN ou K** :Le Kanamycine .
- LCR** : Liquide céphalo-rachidien.
- MIRU** : Mycobacterial Interspersed Repetitive.
- NaOCl** : Hypochlorite de sodium (Eau de Javel).
- OMS** : Organisation mondiale de la santé.
- PAS** : Acide para-aminosalicylique.
- PNB** : Polynucléaires basophiles.
- PNLT** : Programme National de Lutte contre la Tuberculose.
- PPD** : Purified Protein Derivative.
- R** : Rifampicine.
- RD** : Régions de différence.
- RFLP**: Polymorphisme de longueur des fragments de restriction.
- SIDA** : Le syndrome de l'immunodéficience acquise.
- SM ou S** : Streptomycine.
- TBP** : Tuberculose pulmonaire.
- TCH** : Hydrazide de l'acide Thiophèle Carboxilique.
- TPM+** : Tuberculose à microscopie positive.
- UCTMR** :l'unité contre la tuberculose et les maladies respiratoires.

UICTMR : l'union internationale contre la tuberculose et les maladies respiratoires.

VIH : Virus d'immunodéficience humaine.

ZN : Ziehl-Neelsen.

Z : Pyrazinamide .

OFL ou O :L'Ofloxacin.

Produced with ScanTOPDF

Introduction

Produced with ScantOPDF

Introduction

La tuberculose est une maladie infectieuse, contagieuse et demeure un problème de santé publique, c'est l'une des maladies, dues à un agent infectieux unique, les plus meurtrières au monde, elle se situe en seconde position juste après le VIH/sida.

Selon l'organisation mondiale de la santé OMS, chaque année, 8 à 10 millions de nouveaux cas de tuberculose sont déclarés dans le monde et 2 millions de personnes en meurent.

La stratégie Halte à la tuberculose du Programme National de Lutte contre la Tuberculose (PNLT) vise à assurer le diagnostic par un examen bactériologique de qualité garantie, réduire les sources de contamination par le dépistage des malades contagieux et leur traitement selon un protocole de courte durée sous contrôle direct (DOTS). (1)

Le diagnostic bactériologique de la tuberculose repose dans une large mesure sur l'examen microscopique direct des frottis d'expectoration après coloration selon Ziehl-Neelsen (ZN). Cette méthode est rapide et spécifique mais sa sensibilité n'est pas optimale lorsqu'elle est utilisée dans les programmes antituberculeux, mais comme elle est susceptible de diagnostiquer la plupart des patients contagieux, l'OMS la recommande néanmoins pour le dépistage des patients dont la toux dure plus de deux semaines pour déceler la tuberculose. (Ångeby et al., 2004)

Les cultures mycobactériennes sur milieux solides sont sensibles et spécifiques, mais elles demandent des semaines et exigent des laboratoires dont la sécurité atteint le niveau III.

De nouvelles techniques moléculaires bien que rapides, sont trop coûteuses pour être utilisées en routine dans les contextes où surviennent la plupart des cas de tuberculose.

L'examen microscopique a évidemment de nombreux avantages en ce qui concerne la rapidité et la faisabilité et si sa sensibilité pouvait être améliorée, il pourrait devenir un outil encore plus valable pour les Programmes Nationaux de lutte contre la Tuberculose (PNLT) dans le monde entier.

Au cours de la dernière décennie, de nombreux chercheurs ont suggéré qu'il est possible d'améliorer significativement les performances de l'examen microscopique des frottis d'expectoration si celle-ci est traitée avec un réactif chimique.

Le procédé le plus largement étudié est la liquéfaction de l'expectoration par l'hypochlorite de sodium (NaOCl) habituellement connu sous le nom d'eau de Javel. (Bonnet et al., 2010).

Dans cette étude nous allons essayer d'évaluer l'amélioration induite par la solution d'hypochlorite de sodium (NaOCl) 3,94% sur la densité bacillaire à l'examen microscopique direct des frottis d'expectoration pulmonaire. Egalement, nous allons déterminer la situation épidémiologique de la tuberculose pulmonaire à microscopie positive TPM+ dans la région de Guelma.

Produced with ScanTOPDF

Chapitre I

Généralité sur

la tuberculose

Produced with ScantPDF

1.1 Définition

La tuberculose est une maladie infectieuse causée par une mycobactérie. L'agent causal de la Tuberculose humaine est, en général, *Mycobacterium tuberculosis*, également appelé BK pour « Bacille de Koch » (Enarson *et al.*, 2000).

1.2 Historique

Le caractère microbien de la tuberculose a été soupçonné dès 1865 par Villemin en inoculant des broyats de lésion tuberculeuses, celui-ci reproduit chez le lapin et le cobaye une maladie identique à la phtisie humaine.

- **En 1873:** le médecin Norvégien G. Armani Hansen découvre que lepre était causée par un bacille fin.
- **En 1882:** Robert Koch découvre le bacille de Koch BK *Mycobactérium tuberculosis* (Crofton *et al.*, 2001).
- **En 1883:** Ziehl et Neelsen mettent au point la coloration du bacille tuberculeux par la fuchsine phéniquée. Cette coloration du B.K résiste à la décoloration par l'acide et l'alcool.
- **En 1889:** les travaux de Rivolta, puis de Maffuci en 1890, conduisent à différencier le bacille aviaire du bacille humain.
- **En 1891:** Koch décrit le phénomène immunologique de Koch et prépare la première tuberculine.
- **En 1902:** Découverte du *M.bovis*, agent de la tuberculose bovine.
- **Entre 1908 et 1920:** Calmette et Guérin mettent au point un vaccin qui porte leurs noms le bacille de Calmette et Guérin BCG et qui était employé pour la première fois en 1921.
- **En 1949:** Découverte de l'acide para-amino-salicylique PAS.
- **EN 1952:** Découverte de l'isoniazide H.
- **En 1961:** Découverte de l'éthionamide EM et de l'éthambutol E.
- **EN 1966:** P.Sensi et N.Maggi découvrent la rifampicine à partir d'une préparation semi-synthétique d'une *streptomyces*.
- **En 1968:** Découverte de *mycobactérium africanum* (Grosset ,1998).

1.3 Epidémiologie descriptive

1.3.1 La tuberculose dans le monde en l'an 2009

La tuberculose représente un problème de santé mondiale majeur. Chaque année, on compte environ 9 millions de nouveaux cas de tuberculose et près de 2 millions de personnes meurent de cette maladie. Tous les pays sont touchés, mais la plupart des cas (85 %) se produisent en Afrique (30 %) et en Asie (55 %), l'Inde et la Chine comptant à elles seules 35 % de l'ensemble des cas (**Figure 1, Figure 2, Tableau 1**). Il y a 22 pays (l'Afghanistan, l'Afrique du Sud, le Bangladesh, le Brésil, le Cambodge, la Chine, l'Éthiopie, la Fédération de Russie, l'Inde, l'Indonésie, le Kenya, le Mozambique, le Myanmar, le Nigéria, l'Ouganda, le Pakistan, les Philippines, la République démocratique du Congo, la République-Unie de Tanzanie, la Thaïlande, le Viet Nam et le Zimbabwe) parmi les plus touchés qui comptent près de 80 % des cas de tuberculose du monde et dans lesquels la lutte contre la tuberculose a reçu une attention particulière depuis l'an 2000. Le nombre absolu de cas augmente lentement dans le monde, même si le nombre de cas par habitant (exprimé en général en nombre de cas pour 100 000 habitants) diminue d'environ 1 % par an.

La tuberculose représente la huitième grande cause de décès dans les pays à revenu faible et intermédiaire (la septième chez les hommes et la neuvième chez les femmes) ; chez les adultes âgés de 15 à 59 ans, elle représente la troisième cause de décès, après le VIH/ sida et la cardiopathie ischémique.

La grande majorité des cas de tuberculose et de décès dus à cette maladie surviennent dans des pays pauvres, et les plus pauvres parmi les pauvres sont ceux qui sont le plus durement touchés dans tous les pays. On l'explique par un accès aux soins plus restreint, une plus grande exposition à des conditions de vie et de travail insalubres, et dans des environnements surpeuplés, ainsi que par la malnutrition, l'infection à VIH, le diabète, le tabagisme et l'abus d'alcool et de drogues, ainsi que d'autres facteurs de risque de contracter la tuberculose.

On estime que les VIH-positifs représentent entre 11 et 13% de l'ensemble des nouveaux cas de TB, la région africaine comptant pour environ 80% de ces cas (2).

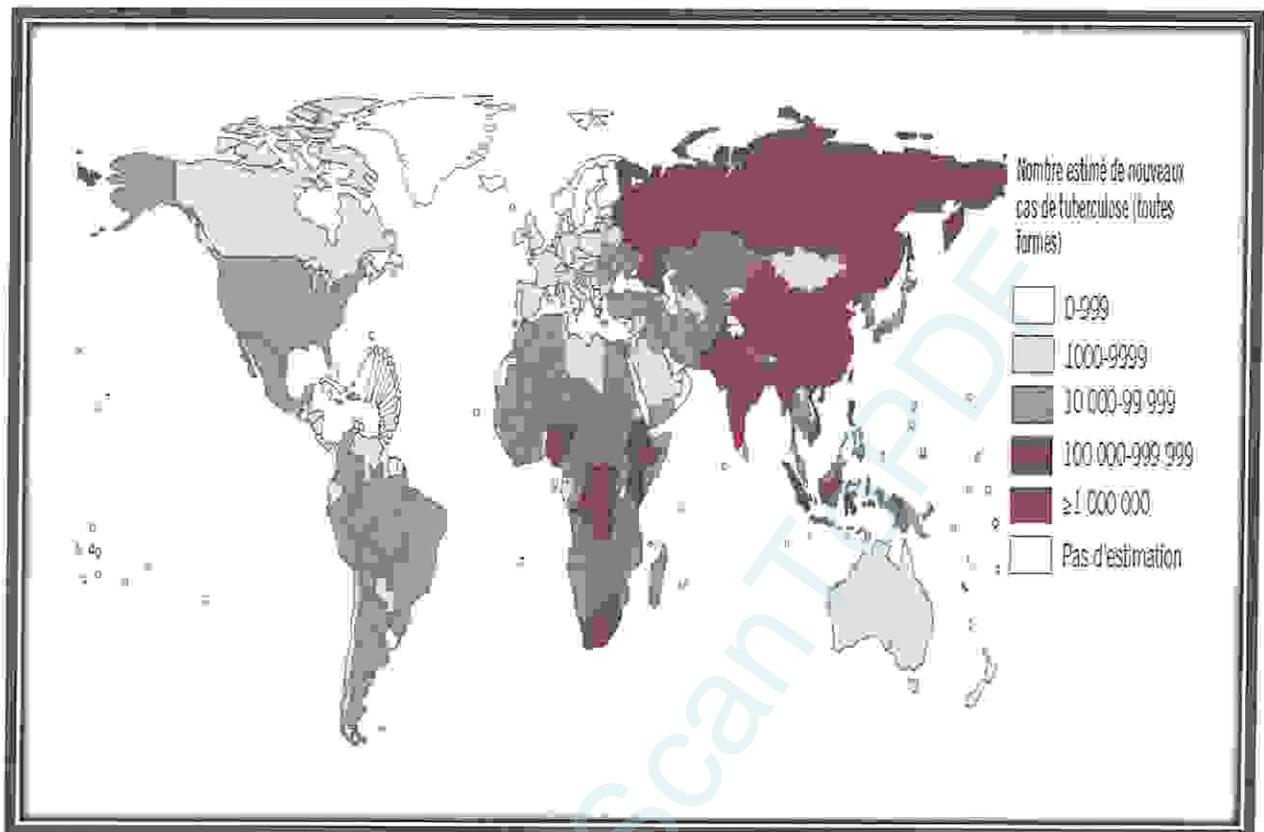


Figure 1: Incidence Estimée de la tuberculose par pays, 2009 (2).

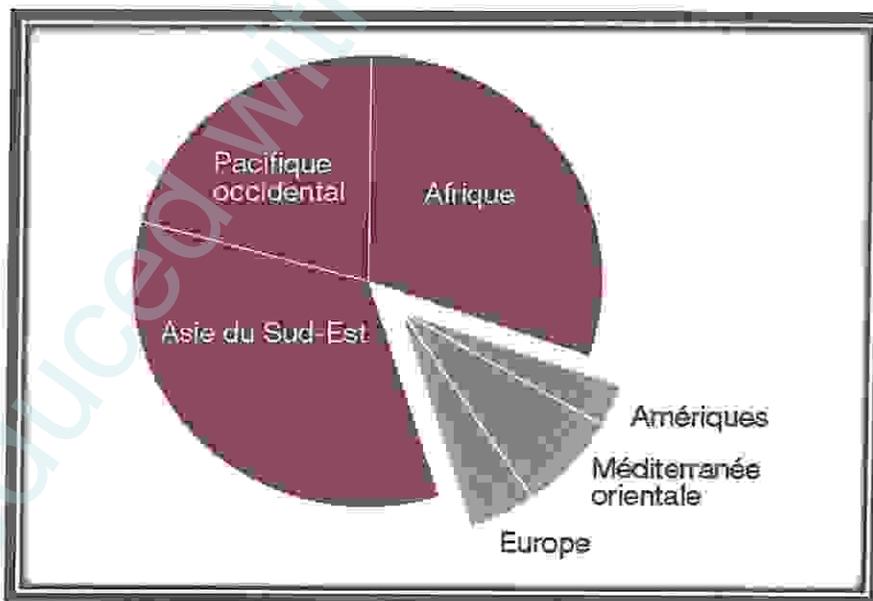


Figure 2: Cas de tuberculose par région OMS, 2009 (2).

Chapitre I : Généralité sur la tuberculose

Tableau 1: Estimations de l'incidence, de la prévalence et de la mortalité de la tuberculose en l'an 2009 (3).

Région de l'OMS	Incidence ¹		Prévalence ²		Mortalité (hors VIH)		
	Nombre en milliers	% du total mondial	Pour 100 000 habitants	Nombre en milliers	Pour 100 000 habitants	Nombre en milliers	Pour 100 000 habitants
Afrique	2 800	30%	340	3 900	450	430	50
Amériques	270	2,9%	29	350	37	20	2,1
Méditerranée orientale	660	7,1%	110	1 000	180	99	18
Europe	420	4,5%	47	560	63	62	7
Asie du Sud-Est	3 300	35%	180	4 900	280	480	27
Pacifique occidental	1 900	21%	110	2 900	160	240	13
Ensemble du monde	9 400	100%	140	14 000	164	1 300	19

¹Incidence: nouveaux cas survenant pendant une période déterminée

²Prévalence: nombre de cas existant dans la population à un moment déterminé.

1.3.2 La tuberculose en Algérie en l'an 2010

Le programme national de lutte contre la tuberculose constitue la réponse de l'état Algérien à l'endémie tuberculeuse dans le pays. En effet, dès l'indépendance, les pouvoirs publics ont mis œuvre des stratégies afin de combattre ce fléau.

Cependant, avec les années 90, les résultats de cette lutte semblent hypothéqué par tous les problèmes qu'a vécu le programme et les pays en général au cours de cette période (Figure 3).

Le programme nationale a pour objectif pour la période 2006-2015 : Stopper l'augmentation de l'incidence de la tuberculose et commencer à la réduire dans tous les secteurs sanitaires du pays il sera donc nécessaire de :

- Stabiliser l'incidence annuelle de la tuberculose pulmonaire positive à 25 cas pour 100 000 habitants (Tableau 2).

Chapitre I : Généralité sur la tuberculose

- Maintenir à moins de 5% la prévalence de la résistance et à moins de 2% la multi résistance.
- Maintenir à moins de 10% de l'ensemble des cas déclarés annuellement la proportion des cas de tuberculose chez l'enfant de moins de 15ans.
- ❖ **Les composantes de la stratégie de lutte antituberculeuse**
- La couverture vaccinale des nouveaux nés par le BCG à plus de 95%.
- La détection d'au moins de 90% des nouveaux cas de tuberculose pulmonaire contagieuse estimés.
- Le traitement avec succès au moins de 90% de ces cas (4).

Tableau 2: Incidence de la tuberculose en Algérie, 2001-2010 (taux pour 100 000) (4).

Années	Incidences		
	TPM+	TEP	TB
2001	26,2	26,9	60,1
2002	26,9	28,1	60,9
2003	27,3	28,7	62,8
2004	26,0	29,7	63,2
2005	26,6	31,3	65,5
2006	26,2	31,4	65,2
2007	25,8	31,4	63,3
2008	25,2	28,2	58,6
2009	24,5	32,4	63,3
2010	23,1	32,7	60,7

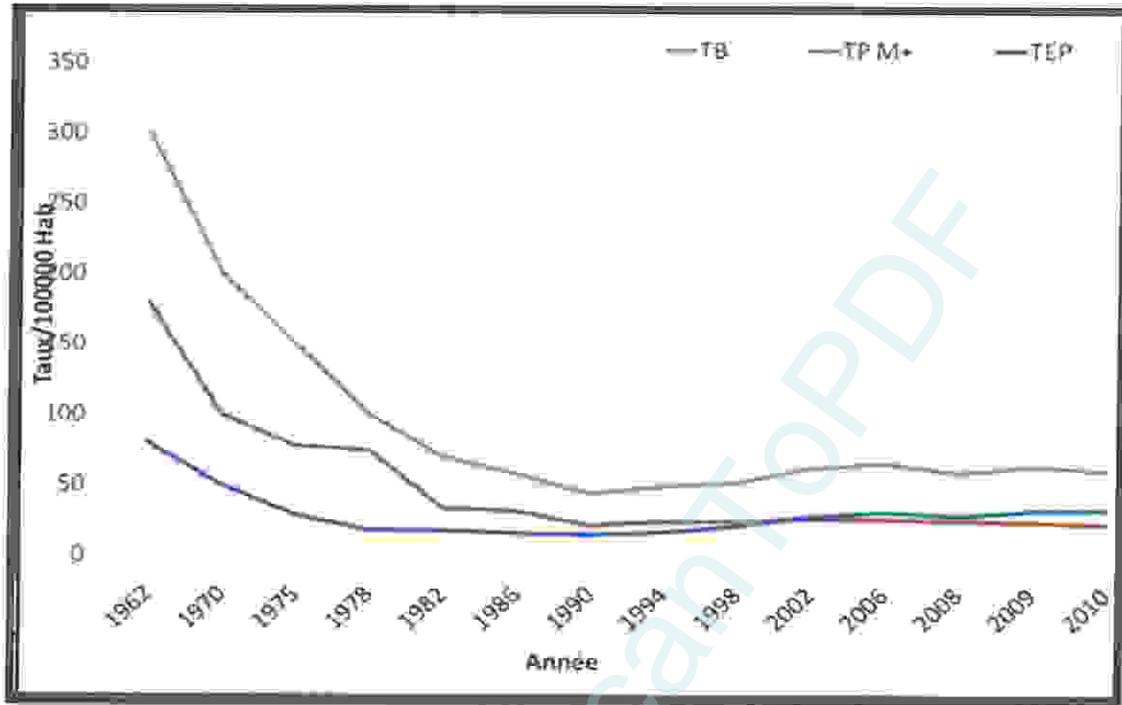


Figure 3 : Incidence de la tuberculose de 1962 à 2010 (4).

❖ Wilayas à forte incidence en Algérie

- ORAN : 124,1.
- TINDOUF : 123,1.
- MOSTAGANEM : 111,1.
- BLIDA : 108,1.
- MASCARA : 92,5.
- ATEMOUCHENT : 92,3.
- RELIZANE : 91,5.
- CHLEF : 89,1.
- ANNABA 82,2 (4).

Chapitre II
Agent causale
de la
tuberculose

II.1 Les mycobactéries

II.1.1 Taxonomie et classification

Les mycobactéries font partie de l'ordre des Actinomycétales, famille des mycobactériaceae avec un seul genre *Mycobacterium*.

Les mycobactéries peuvent être classées en trois groupes différents:

1^ogroupe: les mycobactéries responsables de tuberculose maladie transmissible. Ces bactéries appartiennent au *complexe tuberculosis*.

- ❖ ***Mycobacterium tuberculosis*** appelé aussi bacille tuberculeux ou bacille de Koch (B.K). il est responsable de la majorité des tuberculoses humaines en Algérie.
- ❖ ***Mycobacterium bovis*** responsable des tuberculoses bovines, mais l'homme peut être contaminé accidentellement.
- ❖ ***Mycobacterium africanum*** responsable de tuberculose en Afrique centrale et occidentale ; il n'a jamais été isolé en Algérie.

2^ogroupe: les mycobactéries responsables de mycobactérioses maladie non transmissible appelées mycobactéries de l'environnement; mycobactéries opportunistes ou mycobactéries atypiques. Dans ce groupes, on retrouve une centaine d'espèce tel que:

- ❖ *Mycobacterium avium* souvent responsable de mycobactériose chez l'immunodéprimé (SIDA).
- ❖ *Mycobacterium fortuitum*
- ❖ *Mycobacterium gordonae*

3^ogroupe: mycobactéries responsables de lèpre:

- ❖ *Mycobacterium leprae* ou bacille de Hansen qui est un bacille non cultivable in-vitro, responsable de la lèpre chez l'homme.
- ❖ *Mycobacterium leprae murium* responsable de la lèpre chez la souris (**Figure 4**) (Mathys, 2010).

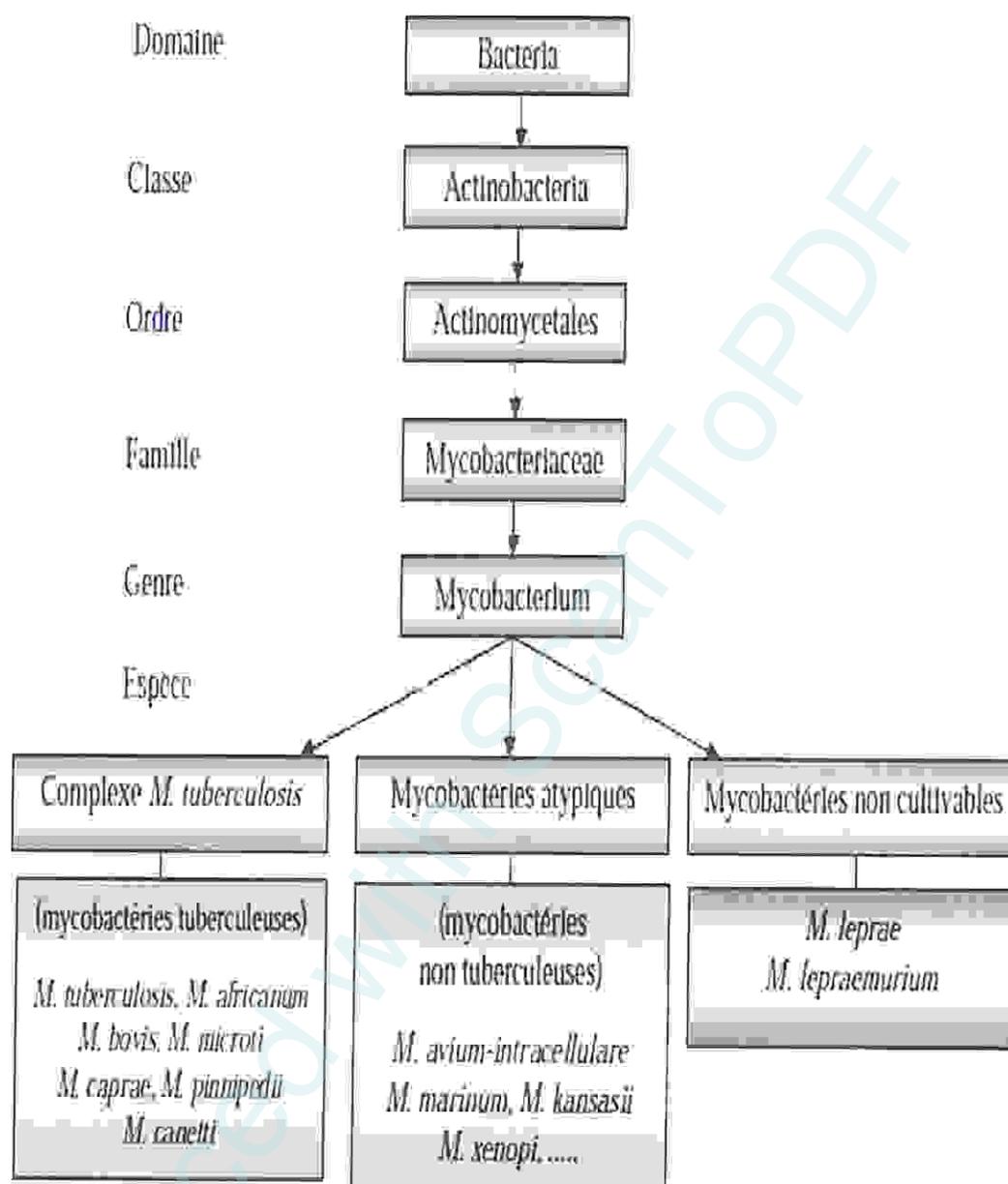


Figure 4 : Taxonomie des mycobactéries (Mathys, 2010).

III.1.2 *Mycobacterium tuberculosis*

III.1.2.1 Caractéristiques de *Mycobacterium tuberculosis*

a) Caractères bactériologiques

• Caractères morphologiques

M. tuberculosis est un bacille à extrémité arrondie de 2 à 5µ long sur 0.2 à 0.3µm de large. Il est acapsulé, asporelé et immobile, il se colore mal par les colorants usuels tel que la

coloration de Gram (Figure-5).

Coloré par la fuchine phéniquée à chaud. Le bacille tuberculeux se colore en rouge et n'est pas décoloré par l'acide sulfurique à 25 par l'alcool à 95° comme le serait toutes les bactéries autres que les mycobactéries, c'est l'acido-alcool-résistance AAR.

Ces bactéries apparaissent au microscope optique comme des bâtonnets rouges, légèrement incurvés, isolés ou en petits amas. Cette propriété important permet de différencier les mycobactéries des autres germes dans les prélèvements contaminés par la flore oropharyngée tels que les crachats (Harshay & Ramakrishnan, 1977).

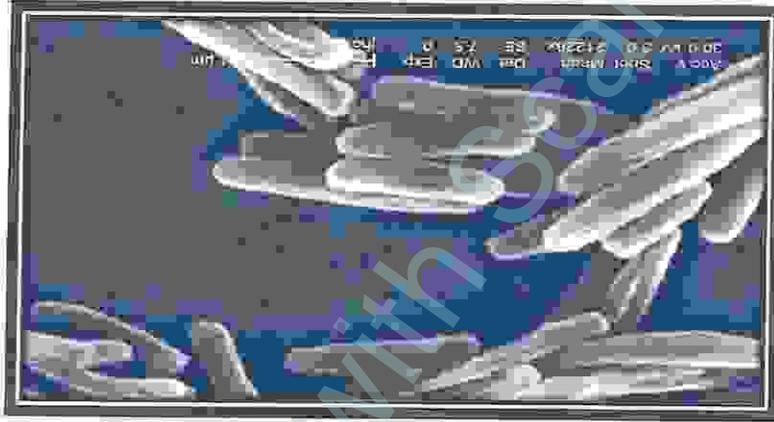


Figure 5: Image de *M. tuberculosis* par microscopie électronique à balayage (21228x)(Matyhs, 2010).

• Caractères cultureux

Mycobacterium tuberculosis se caractérise par ses exigences de culture et sa lenteur de croissance, il ne pousse pas sur les milieux de culture ordinaire. Seuls ceux qui contiennent du sérum, de la glycérine, de la pomme de terre glycéinée, de l'œuf de l'albumine bovine permettent une culture abondante.

Sur ce milieu, il donne des colonies de teinte crème beige, sèches, à surface rugueuse, en choux-fleurs (Figure 6). Le temps de division de *Mycobacterium tuberculosis* étant de 20 heures en moyenne, les cultures ne seront positives qu'après 3 à 4 semaines d'incubation à

Chapitre II : Agent causal de la tuberculose

37°C. Strictement aérobie, la température optimale de croissance est comprise entre 35° à 37°C. Au dessous de 30°C et au dessus de 41°C la croissance est totalement inhibée.

Le pH des milieux de culture peut être compris entre 6 et 8, avec optimum légèrement au dessous de la neutralisation soit entre 6,7 et 6,9 (Nouvel, 2005).



Figure 6 : Photo de la colonie de BK sur milieu de Lowenstein Jensen.(5)

• Composition de la paroi

Le squelette de base de la paroi est peptidoglycane qui est constitué par un enchainement répétitif de deux molécules la N-acetyl-glycosamine et l'acide N-glycosyl-muramique.

Sur celui-ci est attaché de façon covalente l'arabinogalactane qui est un hétéropolyoside.

Sur cette molécule sont fixés les acides mycoliques, se sont des acides gras de C76 à C90 atomes de carbone.

Les acides mycoliques seraient responsables de l'acido-alcool-résistance des mycobactéries.

D'autres molécules riches en lipides sont associées aux acides mycoliques et forment une seconde couche lipidique et des protéines couche externe.

Au sein de cet ensemble complexe se trouvent des protéines et des peptides qui ont des activités antigéniques ou physiologiques diverses « tuberculines mycobactéries» (Figure 7) (Mathys, 2010).

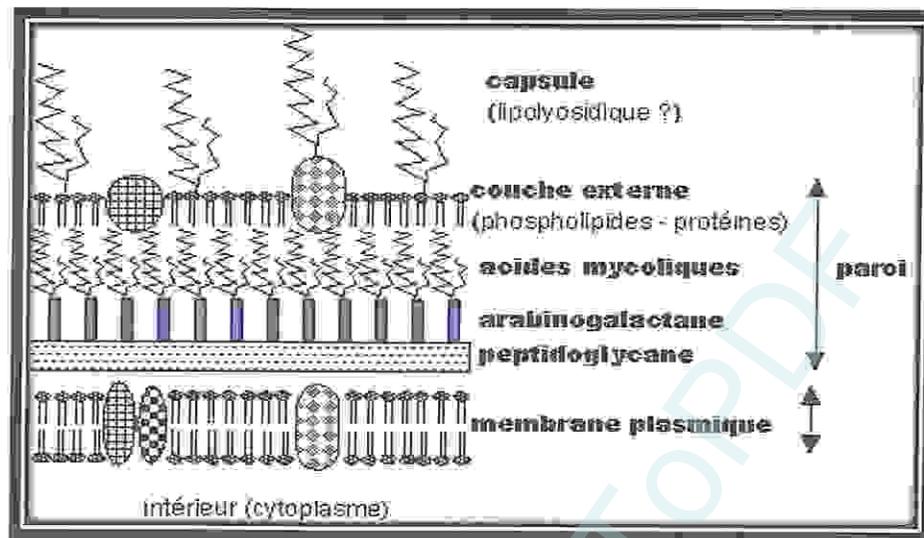


Figure 7: La paroi cellulaire de *M.tuberculosis* (6).

b) Caractères biochimiques

Les caractères biochimiques gardent toute leur importance dans l'identification des espèces des mycobactéries.

Les principaux caractères biochimiques utilisés dans l'identification sont portés sur le (Tableau 3) (Nouvel, 2005).

Tableau 3 : Test d'identification des mycobactéries.

Caractères biochimiques	<i>M.tuberculosis</i>	<i>M.bovis</i>	<i>M.atypiques</i>
Catalase 20°C	+	+	+
Catalase 68°C	-	-	+
Nitrate réductase	+	-	+/-
Niacine	+	-	+/-
TCH	+	-	+
PNB	-	-	+
PAS	-	+	+

Présence(+), Absence(-), Variabilité(+/-).

e) Caractères génétiques

Le génome de *M. tuberculosis* (souche de référence H37Rv) a été entièrement séquencé et annoté. L'analyse a débuté en 1992 et s'est terminée en 1998. Elle a été réalisée suite à une collaboration entre l'Institut Pasteur de Paris et le Centre Sanger.

Le but était de fournir des données utiles pour une meilleure compréhension de la physiopathologie de la bactérie permettant d'envisager l'identification de cibles pour la mise au point de nouveaux traitements et/ou vaccins.

Le génome de *M. tuberculosis* H37Rv consiste en un chromosome circulaire de 4.411.529 paires de bases contenant environ 4000 gènes. L'analyse de la séquence génomique a permis de mettre en évidence des particularités propres à *M. tuberculosis*. Ainsi, on observe que l'ADN présente une teneur élevée en guanine et cytosine (65.6% de GC) et qu'une grande partie des gènes (6% du génome) semblent coder pour des enzymes impliquées dans la synthèse et la dégradation des lipides (Mathys, 2010).

d) Résistance aux agents physiques et chimiques

M. tuberculosis est très sensible à la chaleur, aux rayons ultra-violets et aux rayons X. En revanche, il résiste au froid et à la dessiccation. La lyophilisation est d'ailleurs un excellent moyen de conservation.

Détruit par l'alcool en 5 minutes, *M. tuberculosis* résiste plus que les autres bactéries aux acides dilués, aux antiseptiques et aux détergents (7).

Chapitre III

L'infection

tuberculeuse

Produced with Scantopdf

Chapitre III : L'infection tuberculeuse

III.1 Transmission et développement de la maladie

La tuberculose se transmet généralement par voie aérienne. Le malade, atteint par une tuberculose pulmonaire en phase active, émet dans l'air de fines gouttelettes (1 à 5 μm) chargées de quelques bactéries, notamment lorsqu'il tousse, parle ou éternue. C'est par l'inhalation de ces gouttelettes en suspension dans l'air qu'un individu sain se contamine (Figure 8).

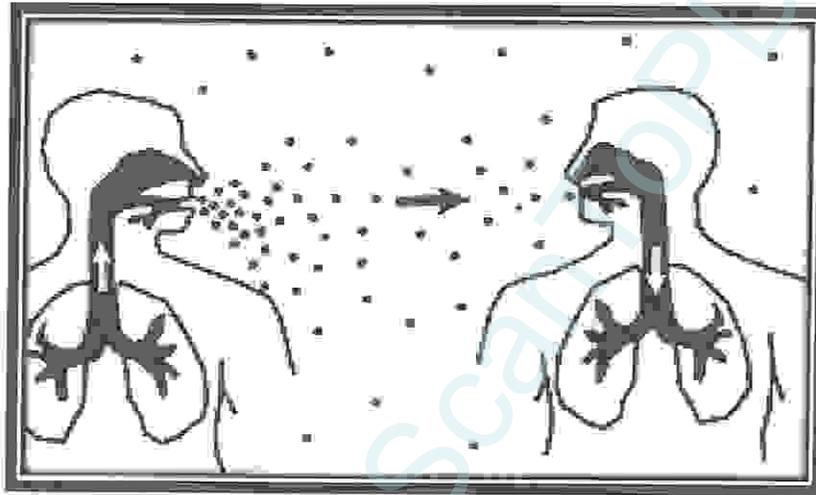


Figure 8 : La contamination par voie aérienne (8).

Les lieux de promiscuité importante (prisons, mines, manufactures,...) favorisent la contamination qui est proportionnelle au confinement de l'air.

Une contamination peut également avoir lieu suite à la formation d'aérosols lors de la manipulation de lésions tuberculeuses ou d'objets souillés dans les hôpitaux et laboratoires.

Dans la majorité des cas, les bacilles tuberculeux sont arrêtés au niveau du nez, des bronches et bronchioles. Ils sont alors entraînés par le mucus vers le pharynx puis déglutis et détruits par l'acidité de l'estomac (Mathys, 2010).

III.2 Primo-infection

Dans la minorité des cas, les bacilles atteignent les alvéoles pulmonaires (Figure 9). Là, ils entrent en contact avec les macrophages alvéolaires qui, en général, les phagocytent, les dégradent et les éliminent. Cependant, si les défenses immunitaires innées de l'individu sont réduites, si l'infection est importante (charge bactérienne élevée) ou si la bactérie est fortement virulente, il arrive que des bacilles survivent dans les macrophages et s'y multiplient. Les macrophages colonisés finissent par éclater et libérer un grand nombre de bacilles capables d'infecter, à leur tour, d'autres macrophages. Ainsi, un foyer infectieux se

Chapitre III : L'infection tuberculeuse

développe au niveau du poumon et provoque la formation d'une lésion ou « chancre d'inoculation ».

Le corps de la personne infectée réagit à cette « primo-infection » par le développement d'une réponse immunitaire cellulaire et la formation d'un granulome constitué principalement de macrophages infectés et de cellules T.

Dans 90% des cas, la maladie ne se développe pas. Le granulome se calcifie et les bacilles emprisonnés restent sous contrôle à l'état quiescent, on parle d'« infection tuberculeuse latente (ITL) ». Ces patients ne sont pas contagieux. Chez la plupart des individus, la « primo-infection » passe inaperçue. On peut cependant, parfois, observer de la fièvre, une adénopathie, une perte d'appétit,.... La primo-infection peut être mise en évidence chez un patient grâce au test d'hypersensibilité retardée (intradermoréaction à la tuberculine) (Mathys, 2010).

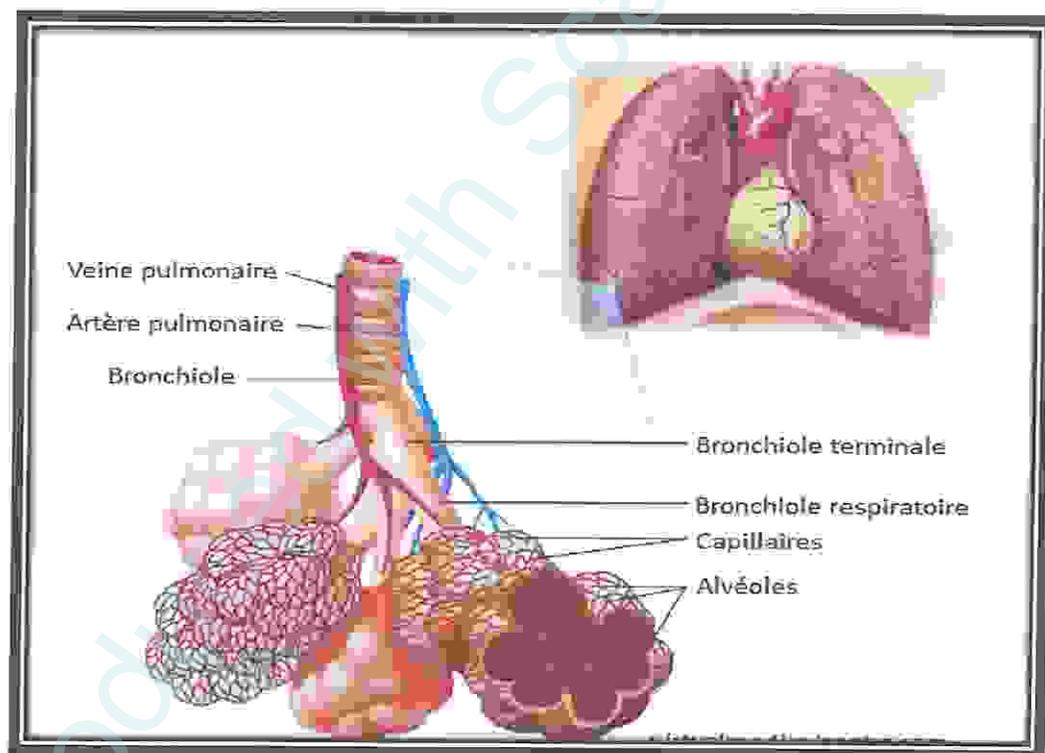


Figure 9: Localisation des alvéoles dans le poumon(9).

III.3 Tuberculose maladie

Toutes les personnes infectées par le bacille de Koch ne développent pas la maladie, seules 5 à 10% d'entre elles feront une tuberculose. Les bacilles peuvent rester dans l'organisme à l'état « dormant » pendant des années. Parfois la maladie est déclenchée par surinfection avec une nouvelle souche de bacille tuberculeux : c'est la tuberculose par surinfection.

Chez certains malades, au niveau pulmonaire, ces bacilles quiescents vont se réveiller, c'est la tuberculose par réactivation endogène : le caséum du follicule se ramollit, sous l'action de facteurs inconnus provoquant une réaction cellulaire exagérée, créant la caverne par évacuation du contenu liquide dans le poumon.

Les lymphocytes tueurs activés favorisent la destruction des macrophages infectés et accentuent la taille des cavernes. Les bacilles, retrouvant une bonne oxygénation se multiplient activement et en dehors des cellules.

La guérison est rare à ce stade (1/3 des cas où il y a guérison ou stabilisation) et le malade est extrêmement infectieux. Chez le 1/3 des malades, la mort survient en quelques années, et le dernier tiers en 10 à 15 ans.

L'immunodépression, et en particulier le SIDA, est un facteur déclenchant et aggravant.

Chez les sidéens, l'absence de réaction lymphocytaire T empêche la formation du granulome et limite l'activation des macrophages provoquant une dissémination importante du bacille (Nonvel, 2005).

III.3.1 Les différents types de la tuberculose

III.3.1.1 La tuberculose pulmonaire

le poumon est la localisation la plus fréquente de la tuberculose puisqu'il représente 80% des cas. Les lésions siègent préférentiellement dans les zones apicales et postérieures :

Segment dorsal et apical du lobe supérieur et du culmen, segment apical des lobes inférieurs.

Elles se présentent sous forme de nodules plus ou moins confluentes, d'infiltrats, de cavernes (Figure 10).

Les signes cliniques de la tuberculose pulmonaire :

- Toux persistante avec des expectorations parfois accompagnées de sang.
- Douleur thoracique et des symptômes plus généraux comme fièvre.
- Sudation nocturne.
- Fatigue.
- Perte d'appétit, et amaigrissement. (Dooley et al., 1997).

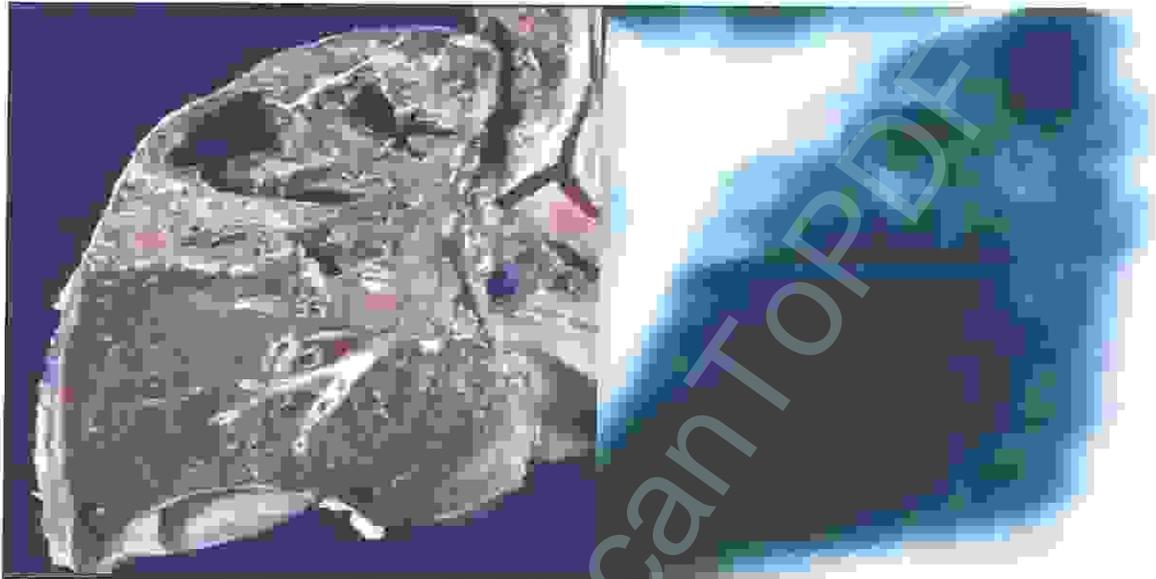


Figure 10: Caverne tuberculeuse (10).

III.3.1.2 Autre formes de tuberculose pulmonaires

a) La broncho-pneumonie tuberculeuse

Se définit par un ensemencement bronchique bronchogène diffus réalisant des foyers tuberculeux multiples disséminés dans les deux champs pulmonaires. C'est le classique « phtisie galopante », évoluant spontanément vers la mort en quelques semaines. Elle s'observe chez l'adulte jeune, plus fréquemment chez l'alcoolique, et d'une façon plus générale chez des sujets aux conditions sociales précaires.

b) La tuberculose miliaire

Ou granulé, est la forme la plus fréquemment observée de tuberculose aiguë, elle est caractérisée par des lésions tuberculeuses de petite taille (d'un grain de mil) (Figure 11) dont la diffusion est extrêmement importante, atteignant non seulement les deux poumons, mais encore tous les principaux viscères.

C'est l'examen radiologique qui permet le diagnostic en révélant une image caractéristique : semis de fines opacités de 1 à 3mm de diamètre à contours nets, disséminées dans les deux champs pulmonaires (Domart et al., 1981).

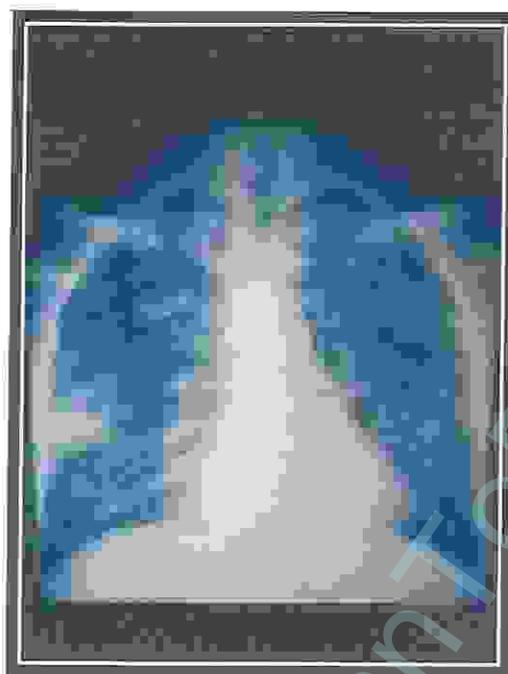


Figure 11 : La tuberculose miliaire : Dissémination régulière des petites lésions blanchâtres de même taille (11).

III.3.1.2 Tuberculose extra-pulmonaire

La tuberculose pulmonaire (ou phthisie) est la forme la plus commune de la tuberculose (85% des cas), cependant les bacilles tuberculeux peuvent, plus rarement, être transportés dans tout l'organisme, via les systèmes lymphatique et sanguin, créer de nouveaux foyers infectieux et provoquer une tuberculose extra-pulmonaire (15% des cas).

Les bacilles peuvent infecter différents organes du corps tels que les os, les reins, les ganglions lymphatique, les méninges, l'intestin, la peau, la plèvre etc...

Lorsque la tuberculose est extra-pulmonaire, les symptômes peuvent varier en fonction de la région corporelle atteinte et la radiographie pulmonaire, réalisée habituellement suite à la détection d'une IDR (Intradermoréaction à la tuberculine.) positive, n'apporte aucune information complémentaire dans ce cas.

La forme extra-pulmonaire est plus fréquemment observée chez les patients séro-positifs (VIH positifs) dont le système immunitaire ne peut contrôler l'infection.

Non traitée, la tuberculose active évolue jusqu'au décès du patient. La guérison nécessite un diagnostic précoce et l'administration d'un traitement adapté, correctement suivi jusqu'à son terme.

Certaines personnes font partie de ce que l'on appelle les sujets à risque pour le développement d'une tuberculose active:

Chapitre III : L'infection tuberculeuse

Dans les pays industrialisés, les personnes à risque sont

- Les personnes immunodéprimées (VIH, corticothérapie, diabète, cancer,...)
- Les immigrants originaires de pays à forte endémie tuberculeuse .
- Les personnes en situation précaire (sans domicile fixe, malnutrition,...)
- Les personnes ayant eu un contact rapproché avec un tuberculeux.
- Les personnes âgées et les jeunes enfants.
- Les toxicomanes.
- Les détenus.
- Les professionnels de la santé (contact avec des malades contagieux, manipulation d'échantillons,...)

Dans les pays en voie de développement, les facteurs de risque sont

- Les mauvaises conditions socio-économiques.
- Le manque d'hygiène.
- La co-infection par le VIH (Mathys, 2010).

Chapitre IV

Dépistage,

diagnostic et

traitement

Produced with Scantopdf

IV.1 Dépistage de la tuberculose latente (primo-infection)

Comme la primo-infection est souvent asymptomatique (ou peu évocatrice), un examen clinique du patient ne suffit pas. Le diagnostic d'une infection tuberculeuse latente nécessite la réalisation d'une intradermoréaction (IDR) tuberculique (ou test de Mantoux). Il s'agit d'un test d'hypersensibilité retardée. Cette épreuve consiste en l'injection intradermique (face antérieure de l'avant-bras) d'un mélange de protéines tuberculeuses purifiées appelé PPD (Purified Protein Derivative) ou tuberculine. Une réaction positive à ce test se traduit, 48 à 72 heures après l'injection, par une rougeur et une induration de la peau (> 10 mm de diamètre) au niveau du site d'injection (présence d'une immunité cellulaire contre *M. tuberculosis*) (Figure 12).



Figure 12: Intradermoréaction à la tuberculine (Matfiys, 2010).

Une réponse positive à ce test ne signifie pas que le patient présente une tuberculose active mais bien que son organisme a connu, à un moment donné, un contact avec le bacille tuberculeux (primo-infection). Ce test est également utilisé pour réaliser une surveillance des professionnels de la santé exposés à la tuberculose. Les lésions pulmonaires dues à une primo-infection ne sont, en général, pas détectables par l'examen radiographique du thorax. Chez les personnes âgées et les patients immunodéprimés, comme les malades atteints par le SIDA, il y a un risque de résultats faussement négatifs à l'IDR car ces patients sont « non répondeurs ». Des résultats faussement positifs sont également possibles notamment si le patient a été vacciné par le BCG ou infecté par une autre mycobactérie non-tuberculeuse donnant lieu à une réaction croisée.

Lorsqu'un patient présente une intradermo-réaction positive, il est nécessaire de réaliser des examens plus approfondis afin de différencier une tuberculose latente d'une tuberculose active. De même, si un patient a déjà eu une tuberculose ou une intradermo-réaction

positive, tout nouveau contrôle de son état se fera par examen radiographique (Mathys, 2010).

Des tests immunologiques (QuantiFERON-TB-Gold® et TSPOT-TB®), utilisant les lymphocytes T du patient pour mesurer la production d'interféron- γ , ont été développés, plus récemment, pour le diagnostic de l'infection tuberculeuse latente (Hadj *et al.*, 2006).

Ces tests reposent sur le principe suivant lequel des lymphocytes T préalablement sensibilisés par des antigènes tuberculeux (*in vivo*) produisent des concentrations élevées d'IFN- γ lorsqu'ils sont réexposés aux mêmes antigènes mycobactériens (*in vitro*). Ces tests présentent comme avantage de ne pas être perturbés par une vaccination antérieure au BCG ou par une infection causée par une autre mycobactérie. (Al-Orainey, 2009)

IV.2 Diagnostic de la tuberculose active

La suspicion d'une tuberculose-maladie chez un patient nécessite la réalisation d'examens médicaux plus approfondis :

IV.2.1 Examen radiologique

Permet de mettre en évidence les formes pulmonaires de la maladie. Les anomalies radiologiques peuvent être très variables. On observe en général la présence d'infiltrats (zones blanches sur la radiographie) (Figure 13).

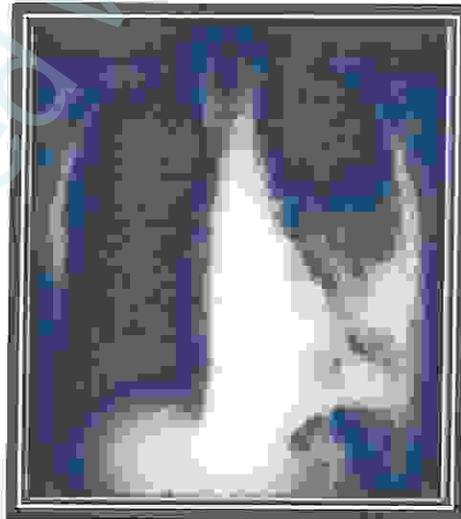


Figure 13 : Radiographie d'un tuberculeux pulmonaire(12).

IV.2.2 Examen bactériologique

Le diagnostic bactériologique de la tuberculose repose sur la mise en évidence des bacilles de la tuberculose.

Les méthodes bactériologiques à mettre en œuvre comprennent la recherche de bacilles acido-alcoolo-résistant(BAAR) par l'examen microscopique, la mise en culture sur milieux spécifiques, les tests de sensibilité aux antituberculeux (Bouvet *et al.*, 2003).

Le diagnostic se réalise à partir des prélèvements biologiques, on distingue deux types de prélèvement :

a) D'origine pulmonaire

Ces prélèvements comprennent : les crachats, le tubage gastrique, l'aspiration ou les lavages bronchiques.

• Les crachats

Les échantillons d'expectoration sont les prélèvements les plus fréquemment reçus au laboratoire.

• Tubage gastrique

Cette technique de prélèvement est utilisée chez les enfants et les malades qui n'arrivent pas à expectorer.

Dans ces cas, le tubage gastrique à jeun (le matin), pour recueillir les sécrétions bronchiques dégluties durant la nuit, est nécessaire pour retrouver le bacille de la tuberculose par l'examen direct et la culture. Cette technique nécessite une courte hospitalisation du malade (Boulaïbal *et al.*, 2007).

• Aspiration ou lavage bronchique

Les brossages et les liquides de lavages alvéolaires recueillis lors d'une fibroscopie sont aussi contributifs dans le diagnostic de tuberculose. A la suite de ces examens endoscopiques, les recherches par tubages se révèlent souvent positives.

b) D'origine extra-pulmonaire(E.P)

Il faut distinguer deux types de prélèvement:

- Les prélèvements d'origine extra-pulmonaire contaminés.
- Les prélèvements d'origine extra-pulmonaire non contaminés.
- **D'origines extra-pulmonaires contaminées**

Ils proviennent des collections purulentes s'écoulant à l'extérieur et dont la souillure est inévitable malgré les précautions aseptiques prises lors du prélèvement. On distingue :

- Les urines : les premières urines du matin sont préférées.

- Les pus d'abcès fistuleux.
- Tous les autres produits pathologiques prélevés sans précautions d'asepsie.
- **D'origine extra-pulmonaire non contaminé**

Ce sont les liquides séreux ou séropurulents se trouvant dans les cavités fermées. Ils sont recueillis par ponction dans un tube stérile après désinfection de la peau, tel que :

- Le liquide céphalo-rachidien(LCR).
- Le liquide pleural.
- Le liquide péritonéal ou péricardique.
- Les biopsies chirurgicales.

IV.2.2.1 Diagnostic direct

Le diagnostic direct repose sur :

a) Examen microscopique

L'examen microscopique d'un produit pathologique est la première étape du diagnostic bactériologique de la tuberculose. Il est effectué directement sur le frottis d'une parcelle purulente ou hémorragique du produit pathologique.

Pour mettre en évidence les mycobactéries, on utilise leur propriété d'acido-alcoolo-résistance, c'est-à-dire leur capacité à former des complexes stables avec des colorants basique, fuchsine ou fluorochromes phéniqués, qui persistent malgré la double action de l'alcool et des acides.

La fiabilité de la bacilloscopie dépend de la qualité de la préparation des lames et la lecture. Le laboratoire doit faire l'objet d'un contrôle de qualité régulier (Varaine F et al., 2010).

En pratique, deux méthodes sont bien codifiées, elles sont bien adaptées à la pratique quotidienne ou elles on fait leurs preuves. Ce sont la méthode de Ziehl-Neelsen et la méthode de coloration à l'auramine.

• Coloration de Ziehl-Neelsen

La technique d'examen est basée sur le caractère acido-alcoolo-résistant du bacille(BAAR). Traité par la coloration de ziehl-Neelsen(ZN), le bacille retient le colorant rouge(fuchsine) (Figure 14) et résiste à la décoloration à l'alcool-acide. La méthode de référence est la méthode de ZN à chaud. Comparée à la culture, cette méthode est spécifique mais peu sensible, en particulier chez les patients co-infecté par le VIH.

L'examen peut être quantifié en utilisant une classification basée sur le nombre de BK identifiés par champ.

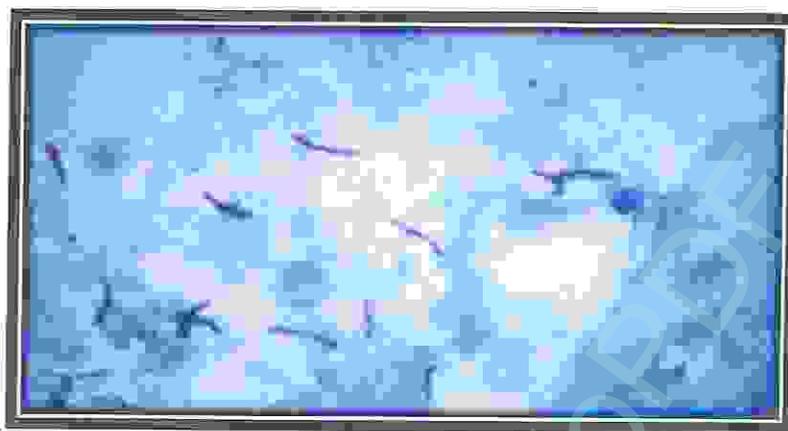


Figure 14: Image de *M. tuberculosis* au microscope après coloration de Ziehl-Neelsen (100x) (13).

- **Techniques fluidification-concentration**

Plusieurs améliorations ont été proposées pour augmenter le rendement du dépistage microscopique : l'homogénéisation et fluidification préalables des crachats par différentes préparations suivies d'une concentration par sédimentation ou par centrifugation. L'eau de Javel est utilisée depuis plus d'un siècle dans cette application. Aux concentrations de 2% à 5% de l'hypochlorite de sodium (NaOCl), elle fluidifie les produits d'expectoration tout en assurant une meilleure sécurité des manipulations car elle inactive les mycobactéries sans altérer leur structure ; tuées, elles peuvent encore être colorées et observées. Complétée par une centrifugation ou sédimentation, cette méthode concentre les BAAR dans la préparation et accroît le taux de positivité : une revue de la littérature a relevé une augmentation statistiquement significative du pourcentage de tests positifs dans 15 études sur 19 (Ongkhammy, 2009).

- b) **Coloration à l'auramine (microscopie à fluorescence)**

La coloration à l'auramine a l'avantage de permettre une lecture plus rapide de la lame.

Elle est recommandée dans les laboratoires dont l'activité est importante.

Cette technique doit être réalisée par des techniciens formés et expérimentés. Elle nécessite un microscope à ultraviolet(ou, moins coûteux, un dispositif spécifique à adapter sur un microscope standard).

L'examen peut être quantifié en utilisant une classification basée sur le nombre de BK identifiés par champ.

IV.2.2.2 Culture en milieu solide

Cette méthode, comme la microscopie directe, permet de confirmer le diagnostic de TB. Après humidification, décontamination et centrifugation, les prélèvements sont ensemencés sur un milieu spécifique Löwenstein-Jensen ou de Coletsos (milieux solides), et placés dans une étuve à 37°C.

➤ Avantages de la culture

- Plus sensible que la microscopie des crachats pour le dépistage des TBP paucibacillaires : son rendement semble être de 20 à 30% supérieur.
- Permet de confirmer le diagnostic de certaines formes EP.
- Permet d'identifier précisément l'espèce mycobactérienne en cause.
- Permet de distinguer les bacilles vivants des bacilles morts (ce qui est important pour le suivi du traitement).

➤ Inconvénients de la culture

- Technique délicate (en particulier pour la procédure de décontamination), nécessitant un personnel bien entraîné, un matériel de bonne qualité et un approvisionnement constant en électricité.
- Risque élevé de contamination du personnel ; nécessité d'utiliser une enceinte de sécurité biologique.
- Délai d'obtention des résultats 5 à 7 semaines sont nécessaires pour l'obtention d'un résultat définitif ; retarde le traitement (Varaine F et al., 2010).

IV.2.2.3 Culture en milieu liquide

- La méthode radiométrique « BACTEC 460 TB » qui consiste en la mise en culture de l'échantillon provenant du patient dans un flacon contenant de l'acide palmitique marqué au ^{14}C . La croissance mycobactérienne est détectée par mesure de la quantité de $^{14}\text{CO}_2$ produite dans le flacon, suite à l'utilisation de l'acide palmitique marqué par les bactéries en croissance. En général, un résultat positif est obtenu en 7 à 10 jours. D'autres systèmes à détection automatisée mais non radioactifs sont maintenant également disponibles.
- « BacT/ALERT 3D » : qui détecte la croissance mycobactérienne grâce à une pastille située à la base du flacon de culture. Celle-ci subit une modification colorimétrique lors de l'acidification du milieu résultant de la production de CO_2 par les bactéries en croissance.
- « BACTEC MGIT 960 » : qui utilise des flacons de culture contenant un sel de ruthénium dont la fluorescence est d'autant plus importante que la pression en O_2 est faible. Toute croissance sera donc détectée par augmentation de la fluorescence (Mathys, 2010).

IV.3 L'antibiogramme

Après isolement et identification d'une souche tuberculeuse, les laboratoires complètent leur analyse par la réalisation d'un antibiogramme. L'antibiogramme permet de déterminer la sensibilité du bacille tuberculeux aux différents antibiotiques utilisés dans le traitement de base (Heifets & Desmond, 2005).

Ce test consiste en l'observation de la croissance mycobactérienne sur milieu de Löwenstein-Jensen (milieu à l'œuf) contenant différentes concentrations d'antibiotiques testés. Ce test est long, étant donnée la lenteur de croissance de *M. tuberculosis*. Pour obtenir l'antibiogramme, il faut compter environ 4 semaines après l'identification de la bactérie. Ce délai peut être réduit de moitié par la réalisation de l'antibiogramme en milieu liquide du type BACTEC (décrit plus haut). Récemment, un test colorimétrique (REMA, resazurin microplate assay) basé sur la modification de coloration de la resazurin suite à sa réduction par les bactéries tuberculeuses, a également été proposé pour mettre rapidement (8 jours) en évidence une éventuelle croissance de *M. tuberculosis* en présence de différentes concentrations d'antibiotiques. L'antibiogramme fournit des informations importantes sur les chances de succès du traitement en cours, et s'il y a lieu de modifier celui-ci pour atteindre la guérison (Mathys, 2010).

IV.3.1 Les antibiotiques antituberculeux

Les antibiotiques antituberculeux majeurs sont :

a) Rifampicine (R)

C'est un antibiotique semi-synthétique à large spectre, isolé de *streptomyces mediterranei*. Son activité contre *M. tuberculosis* a été démontrée en 1965 *in vitro* avec une grande efficacité.

La Rifampicine inhibe l'ARN polymérase ADN dépendante. Elle est bactéricide pour les mycobactéries du complexe *tuberculosis* s'exerce aussi bien sur les bactéries extra-cellulaires que sur les bactéries intra-macrophagiques et sur les bacilles en métabolisme actif et ralenti (Boulaïbal *et al.*, 2007).

b) Isoniazide (INH)

L'isoniazide, hydrazide de l'acide isonicotinique (INH), est un médicament antituberculeux majeur synthétisé en 1912 mais dont l'activité sur les mycobactéries n'a été découvert qu'en 1952. Son intérêt réside dans son efficacité, sa faible toxicité et son faible coût.

L'INH est un antituberculeux bactéricide, il est actif sur *M. tuberculosis* autres par inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne.

c) Ethambutol(EMB ou E)

L'Ethambutol est un composé synthétique mis au point en 1961. Il est actif sur *M.tuberculosis*.

L'Ethambutol est un antituberculeux spécifiquement actif sur *M.tuberculosis* par l'inhibition de la synthèse des acides mycoliques. Il est bactériostatique surtout sur les bacilles extracellulaires et agit en inhibant une arabinosyl transférase, enzymes qui synthétise l'arabinogalactane, un des constituants de la paroi des mycobactéries (Boulabai *et al.*, 2007).

d) Streptomycine (SM ou S)

La streptomycine est le premier antibiotique à large spectre utilisé dans un traitement de la tuberculose. C'est un antibiotique bactéricide. Du fait de sa mauvaise absorption par la muqueuse intestinale, la SM est administrée par voie intramusculaire.

La SM n'est pas actif sur bacilles vivant dans le milieu intracellulaire. Par contre, elle l'est sur les bacilles présents dans la lumière et les parois des cavernes.

La SM inhibe la synthèse des protéines par fixation sur la sous unité 30S du ribosome.

e) Le pyrazinamide (Z)

Il possède la particularité d'éradiquer le *Mycobactérium tuberculosis* intramacrophagique en milieu acide ($\text{pH} < 5,5$):

Les antituberculeux mineurs

Les antituberculeux les plus utilisés sont :

- **Le Kanamycine (KAN ou K)** : C'est un aminoside et apparenté actif sur le bacille de Koch.
- **L'Ofloxacine(OFL ou O)** :Il semble performant en cas de bacilles résistants aux médicaments standard.
- **Le Cyclosérine(C)** : Est un antibiotique à spectre antibactérien étendu, active sur la majorité des mycobactéries, sur les bactéries gram positif comme *Staphylococcus aureus* et les bactéries gram négatif comme *Escherichia coli*.

IV.4 Typages moléculaires de *M. tuberculosis*

IV.4.1 Les méthodes de typage moléculaire des bacilles de la tuberculose

De nombreuses méthodes de génotypage des souches cliniques de *M. tuberculosis* ont été développées depuis une vingtaine d'années. Parmi les plus utilisées, on compte : la méthode IS6110-RFLP développée originalement, le spoligotyping et le MIRU-VNTR décrite plus

Récemment (Mathys, 2010).

IV.4.1.1 La première méthode de référence

La première méthode-la plus largement utilisé au niveau mondial- est la méthode RFLP IS6110, reposant sur la détermination du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) présentant la séquence IS6110.

IS6110 est une séquence d'insertion, soit un petit élément génétique mobile ne comportant que les gènes nécessaires à sa transposition et à sa régulation. L'élément est spécifique des bacilles de la tuberculose et absent des autres espèces mycobactériennes. Le nombre de copies IS6110 est variables d'une souche à l'autre ainsi que leur localisation sur le chromosome, avec cependant quelques régions d'insertion préférentielles.

Ce polymorphisme est le résultat de transposition ou de divers événements génétiques successifs survenus au cours de l'évolution des bacilles de la tuberculose. IS6110 peut être présent jusqu'à 26 copies par souche mais il faut noter que de rares souches en sont totalement dépourvues.

La standardisation de la méthode RFLP IS6110 a contribué à la généralisation et à la constitution de larges banques de profils génomiques. La technique consiste à digérer le génome par PvuII, une enzyme de restriction qui ne coupe qu'une fois dans IS6110, puis à séparer les fragments par électrophorèse en gel d'agarose. Par hybridation avec la séquence répétée IS6110 utilisée comme sonde, on révèle le RFLP des quelques fragments d'ADN qui portent IS6110. On génère ainsi des profils génomiques caractéristiques. Le succès de la méthode a requis le développement de logiciels d'analyse d'image sophistiqués permettant la comparaison d'un grand nombre de profils réalisés dans différents laboratoires.

Ces logiciels nécessitent des utilisateurs avertis et une vérification visuelle pour une interprétation fiable des données (doubles bandes mal reconnues, décalage,...).

Initialement la capacité de transposition d'IS6110 semblait être un obstacle à la fiabilité de la méthode pour l'étude épidémiologique d'une maladie chronique comme la tuberculose, où la stabilité des profils génomiques de souches isolées à plusieurs mois d'intervalle est requise. L'efficacité de transposition d'IS6110 est faible et les profils des souches isolées chez un même patient, ou chez les patients d'un même groupe de transmission, varient peu. Mais on observe parfois des variations correspondant au gain ou à la perte d'une ou deux copies d'IS6110. Une étude menée au Pays-Bas portant sur des isolats séquentiels

obtenus à partir de patients a montré une demie-vie de transposition (période pendant laquelle le profil RFLP reste inchangé) de IS6110 de 3 à 4ans.

La transposition serait stimulée dans un environnement micro-aérobie, caractéristique des bacilles en dormance. Ainsi s'expliqueraient les variations de profils génomiques des souches de patients impliqués dans de larges groupes d'une même chaîne de transmission ou dans les cas de rechutes éloignées du diagnostic initial. Les changements de profils de résistance aux antituberculeux sont eux sans incidence sur le profil génomique.

La méthode RFLP est lourde, lente car elle nécessite plusieurs milligrammes de culture mycobactérienne, un ADN très pur et de bonne qualité sans dommage physique. Comme sa réalisation technique (extraction de l'ADN, purification, digestion, électrophorèse, transfert sur membrane, hybridation, révélation) s'effectue sur une dizaine de jours, les délais d'analyse du RFLP IS6110 s'avèrent généralement peu adaptés aux besoins des études épidémiologiques cliniques.

Les méthodes de typage récentes qui bénéficient de la rapidité des techniques d'amplification génomique permettent l'obtention de résultats en 48h à partir de primocultures positives, sur milieu solide ou liquide.

Ces méthodes rapides peu exigeantes en quantité comme en qualité d'ADN ont le potentiel pour être utilisées sur des extraits ADN non amplifiés, des échantillons non viables, des frottis sur lames ou des prélèvements cliniques à frottis positifs.

IV.4.1.2 La méthode « SPOLIGOTYPING »

Cette méthode repose sur la détection du polymorphisme de la région DR(*Direct Repeat*), une région unique du génome des bacilles de la tuberculose qui contient des répétitions directes parfaitement conservées de 36pb (identiques pour toutes les souches de *M.tuberculosis*) séparées par des séquences variables de 35 à 41 pb. Ces séquences varient d'une souche à l'autre par leur longueur, leur séquence et leur nombre. Deux formes de réarrangements génomiques ont été identifiées, soit des variations liées à la transposition d'un élément IS6110 pratiquement toujours présent dans la région DR. Ces réarrangements ne peuvent entraîner que la perte irréversible de séquence, interdisant l'acquisition de nouvelles séquences. Une conséquence importante est que des délétions successives, indépendantes dans des souches non liées peuvent conduire à une évolution convergente, c'est-à-dire à l'apparition de spoligotypes identique chez les souches éloignées.

La méthode « spoligotyping » consiste à amplifier la région DR puis à hybrider les produits d'amplification à une membrane comportant 43 séquences oligonucléotidiques variables les plus fréquentes. Les résultats sont très reproductibles et la nature binaire de l'analyse (présence ou absence de la séquence fixée à la membrane) permet une interprétation facile des données et leur échange inter-laboratoires.

Le spoligotyping est plus discriminant que la méthode RFLP IS6110 pour les souches à faible nombre de copies d'IS6110 mais la méthode RFLP IS6110 reste plus performante pour la vaste majorité des souches. Ceci s'explique aisément puisque le spoligotyping ne s'intéresse qu'à une région unique du génome alors que le RFLP IS6110 analyse la distribution de IS6110 sur l'ensemble du génome. Cependant le spoligotyping s'avère une méthode de criblage rapide pour identifier des souches non épidémiologiquement liées. En cas d'identité de profils, une analyse moléculaire complémentaire par un marqueur indépendant est nécessaire pour conclure effectivement à l'identité génomique et donc au lien épidémiologique entre les patients. Dans les pays à faible incidence de tuberculose, où les profils génomiques des souches en circulation sont polymorphes, la méthode « spoligotyping » reste utile.

De plus la méthode permet de reconnaître facilement les familles génétiques de *M. tuberculosis*.

IV.4.1.3 La nouvelle méthode de référence : Le typage MIRU

Elle s'appuie sur le polymorphisme d'une classe d'éléments répétés identifiés chez les bacilles de la tuberculose et chez *M. leprea*. Les MIRU (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units). Le séquençage complet de *M. tuberculosis* H37Rv a révélé 41 loci d'intégration de ces éléments, constitués de séquences répétées de 51 à 77 pb, dans les régions intercistroniques de différents opérons. Les unités MIRU sont dupliquées en nombre variable selon les souches et selon les loci.

La technique consiste en l'amplification des régions flanquantes des MIRUs puis à la détermination de la taille des produits amplifiés, qui reflètent le nombre de copies de l'élément ou locus étudié. Une sélection de 15 loci identifiés comme les plus polymorphes sur une collection de souches d'origines géographiques variées a été proposée pour standardiser la méthode et pour la conduite d'études épidémiologiques fiables.

Le profil génétique de chaque souche ne correspond pas à une image, mais se réduit à un nombre à 15 chiffres (comparables à un code-barre), chaque chiffre correspondant au nombre de répétition de MIRU dans chacun des 15 loci étudiés. Le format numérique des données

est simple et reproductible et s'affranchit de l'utilisation de logiciels de gestion d'images de profils génomiques générés par la méthode RFLP IS6110.

La méthode de typage par MIRU révèle une reproductibilité et une sensibilité de 100%. Le nombre de copies MIRU des différents loci est suffisamment stable dans le temps pour permettre un suivi fiable des patients chroniques sur de longues périodes. Les profils MIRU identiques identifiés chez des souches d'un même patient, isolées jusqu'à 6 ans d'intervalle, mais à profils RFLP IS6110 différents montrent que le taux d'évolution des 12 loci MIRU est un peu plus lent que celui de IS6110. La méthode est plus performante que la méthode de référence RFLP IS6110 car elle permet de typer toutes les souches, y compris celles dépourvues ou à faible nombre de copies de IS6110. Pour les autres souches, le pouvoir discriminant de la méthode MIRU est comparable à celui de RFLP IS6110.

De grandes banques de données de profils RFLP IS6110 ont été constituées et il faut maintenant développer de telles banques avec les profils MIRU, une tâche beaucoup plus aisée et rapide. La période charnière de passage d'une technique à l'autre est difficile car cela nécessite de retyper les souches avec la nouvelle méthode de référence pour tenir compte de l'épidémiologie particulière de la tuberculose qui nécessite la comparaison de souches isolées à plusieurs années d'intervalle (Vincent .Gutierrez, 2009).

IV.5 Traitement de la tuberculose

Le traitement de la tuberculose latente et celui de la tuberculose active doivent être envisagés comme deux entités distinctes.

IV.5.1 Traitement de la tuberculose latente

Lorsqu'une tuberculose latente (primo-infection) est mise en évidence chez un patient, un traitement prophylactique peut être proposé. Ce traitement n'est pas appliqué systématiquement en cas de positivité de l'intradermoréaction mais sera conseillé chez toutes personnes à risque de développer la maladie : individus récemment contaminés, immunodéprimés (VIH positif,...), jeunes enfants, porteurs de lésions pulmonaires évoquant une tuberculose (ou autre maladie pulmonaire) antérieure (14).

Dans les pays en voie de développement, on ne traite pas les patients présentant une tuberculose latente.

Dans de rares cas, une chimioprophylaxie anti-tuberculeuse peut être proposée à un patient dont l'intradermoréaction est négative. Cette décision est indiquée, notamment, pour les patients séropositifs ou les enfants ayant eu un contact avec un tuberculeux contagieux.

Le traitement prophylactique consiste, en général, en la prescription quotidienne d'isoniazide pendant au moins 6 à 9 mois (5 mg/kg/jour). Cette monothérapie permet de réduire l'incidence de la tuberculose active avec une efficacité de 65 à 75%. Chez les sujets porteurs du VIH, le traitement est prolongé à 9 ou 12 mois. L'usage d'une monothérapie se justifie par le risque limité d'induire une résistance étant donné le faible nombre de bactéries impliquées dans la tuberculose latente. Parfois, une bithérapie (isoniazide et rifampicine ou rifampicine et pyrazinamide) est prescrite pendant 3 mois. L'administration d'un traitement prophylactique ne peut se faire qu'après avoir vérifié l'absence d'une maladie tuberculeuse par radiographie pulmonaire et examen bactériologique. En effet, si un patient atteint de maladie tuberculeuse est traité par monothérapie, le risque de sélectionner un mutant résistant sera élevé (Mathys, 2010).

IV.5.2 Traitement de la tuberculose active

Les études montrent que, lorsque les antibiotiques appropriés sont disponibles et que la thérapie combinée est gérée convenablement, le contrôle de la tuberculose est efficace.

- **Isolement**

Il convient d'isoler (avec ou sans hospitalisation) les patients contagieux pendant les 3 premières semaines du traitement afin de limiter les risques de transmission. La levée de l'isolement peut se faire après amélioration de l'état général du patient et l'obtention de trois examens microscopiques des expectorations négatifs (Bouvot *et al.*, 2003).

- **Schéma thérapeutique standard**

Le traitement standard fait appel aux antibiotiques dits de « première ligne ». Ces antibiotiques sont : l'isoniazide, la rifampicine, la pyrazinamide et l'éthambutol. Dans certains pays, la streptomycine est également utilisée comme antibiotique de première ligne à la place de l'éthambutol. La durée du traitement standard est de 6 mois et comporte 2 phases successives. La phase initiale dure 2 mois et consiste en l'administration de 4 antibiotiques : l'isoniazide, la rifampicine, la pyrazinamide et l'éthambutol. La deuxième phase, appelée aussi « phase de continuation », dure 4 mois et consiste en une bithérapie à base d'isoniazide et d'un second antibiotique, en général la rifampicine (Tattevin, 2007).

La prise des médicaments est quotidienne et orale (de préférence le matin à jeun) (Figure 15).

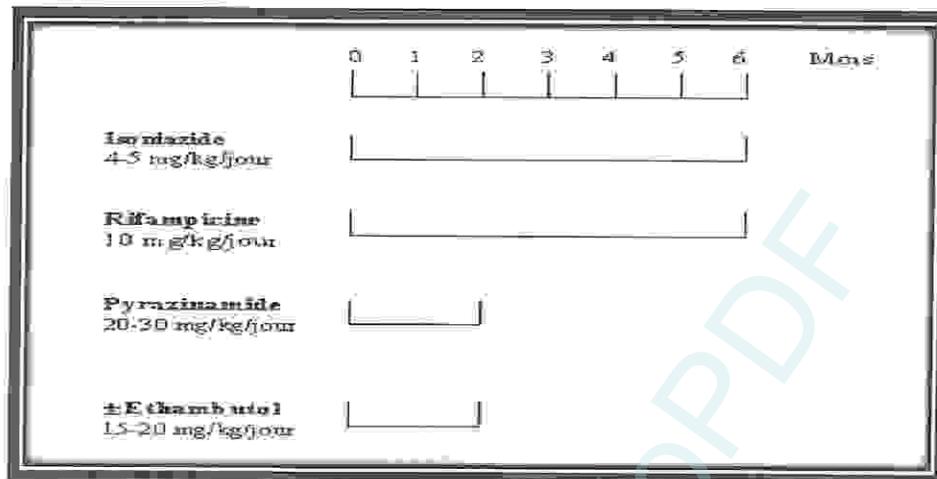


Figure 15: schéma thérapeutique standard(13).

- **Importance de la phase thérapeutique initiale**

L'administration initiale de 4 antibiotiques se justifie pour plusieurs raisons : la PZA exerce principalement son effet au cours des premiers mois de traitement et n'apporte aucun avantage en cas d'administration plus prolongée ; la diminution de la charge bactérienne importante au début du traitement est capitale car elle permet de prévenir l'apparition de mutants résistants et permet également de réduire la contagiosité du patient (en général la négativité des expectorations est obtenue après seulement quelques semaines de traitement) (Mathys, 2010).

- **Intérêt de la thérapie combinée**

Des mutations spontanées peuvent avoir lieu dans les bacilles tuberculeux et provoquer, de ce fait, la résistance à un antibiotique, qui, par pression de sélection, peut favoriser le développement de mutants résistants à cet antibiotique). Cette observation mena à la thérapie combinée, permettant de réduire l'émergence d'isolats de *M. tuberculosis* résistants durant le traitement.

En effet, un patient traité exclusivement par de l'isoniazide ou de la rifampicine peut développer une bactérie mutante résistante à l'un de ces deux antibiotiques (10^{-7} à 10^{-8} par événement), capable de se multiplier sans contrainte dans le corps du patient. Par contre, si on traite ce patient par une bithérapie, isoniazide et rifampicine, il aura peu de chance (10^{-14} à 10^{-16}) de développer un double mutant, c'est-à-dire d'acquérir deux mutations indépendantes simultanément. La thérapie combinée permet également de cibler des populations différentes de *M. tuberculosis*.

➤ Le traitement de la 2^{ème} ligne

C'est un régime de 8 mois qui associe 2SRHZE/1RHZE/5RHE, administrée pour les rechutes, les échecs et les reprises évolutives.

➤ le traitement de la 3^{ème} ligne

Il s'administre aux cracheurs de bacilles après le régime de la 2^{ème} ligne.

Sa durée est de 21 mois avec le schéma suivant : 3EthOKZC/18EthOZ) (Mathys, 2010) .

Dix médicaments antituberculeux nouveaux ou dont l'indication a été modifiée, en cours d'essais cliniques, pourraient raccourcir le traitement de la tuberculose non résistante et améliorer le traitement de la tuberculose MR.

Neuf vaccins expérimentaux font l'objet d'essais de phase I ou de phase II. On espère qu'un ou deux des vaccins expérimentaux actuellement en cours d'essai de phase II passeront en essai de phase III dans les deux à trois ans à venir, et qu'un des deux sera éventuellement homologué d'ici 2020 (15).

La Partie
pratique

Produced with ScanTOPDF

Objectif

- Évaluation de la densité bacillaire avant et après traitement des expectorations par l'hypochlorite de sodium à 3,94% (NaOCl) dans le diagnostic de la tuberculose pulmonaire.

I. Matériel et méthodes

I.1 Méthodologie

Comparaison de la méthode directe et de la méthode à l'hypochlorite de sodium lors des recherches de BAAR.

I.2 Site d'étude

L'étude pratique est réalisée au laboratoire de l'unité contre la tuberculose et les maladies respiratoires UCTMR, ex DAT, de la wilaya de Guelma, pendant 1 mois (Mars 2012).

I.3 Population étudiée

Tous les patients pour lesquels une recherche de BAAR dans les crachats est prescrite (dépistage ou contrôle en cours de traitement) sont inclus.

Lorsque des prélèvements séquentiels sont réalisés, chaque échantillon est inclus individuellement dans l'analyse comparative.

I.4 Protocole technique

Au laboratoire, les produits d'expectoration sont classés en fonction de leur aspect macroscopique. Les crachats salivaires sont éliminés d'emblée et font l'objet d'une demande de nouveau prélèvement.

I.4.1 Préparation du frottis d'expectoration pour l'examen direct

- Sur la paillasse, près d'un bec Bunsen allumé, placer le crachoir sur lequel est inscrit le nom du malade.
- Ouvrir le crachoir et prélever avec l'anse une parcelle du matériel purulent. (Figure 16)
- Le résultat de l'examen microscopique direct dépend essentiellement du choix de la particule sur laquelle se fera le frottis.
- Déposer la parcelle purulente au centre de la lame (sur face identifiée) et l'étaler sur une surface de 2cm sur 1cm par des mouvements vas et vient de l'anse. Le frottis doit être mince et régulier (Figure 17).

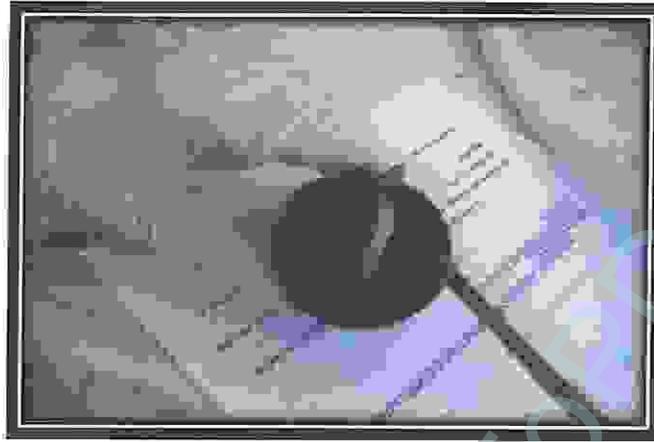


Figure 16 : Prélèvement avec l'anse d'une parcelle du matériel purulent.



Figure 17 : Etalement de la parcelle purulente sur la lame.

- Sécher le frottis en plaçant la lame à l'air, sur le porte lame. Ne pas sécher à la flamme
- Fixer le frottis en passant à trois reprises la lame sur la flamme du bec Bunsen (3 à 5 secondes)
- Le frottis est ensuite coloré par la coloration de **Ziehl-Neelsen à chaud**.

1.4.2 Préparation du frottis après traitement d'expectoration par l'hypochlorite de sodium (NaOCl).

Le reste de l'échantillon (expectoration) est concentré par l'hypochlorite de sodium (NaOCl) à 3,94%.

- Une solution de NaOCl à 3,94%, est ajoutée à volume égal à l'expectoration dans le flacon de prélèvement.
- Le mélange est homogénéisé par agitation pendant 30 secondes.

Partie pratique

- Incubation 15 minute à température ambiante puis transvaser dans un tube conique (15ml) à usage unique.
- Après une sédimentation pendant une nuit (18heurs) (**Figure 18**), une suspension du culot est étalée sur lame, séchée, et colorée comme le premier frottis (**coloration de Ziehl-Neelsen à chaud**) (*Ongkhammy et al .,2009*).

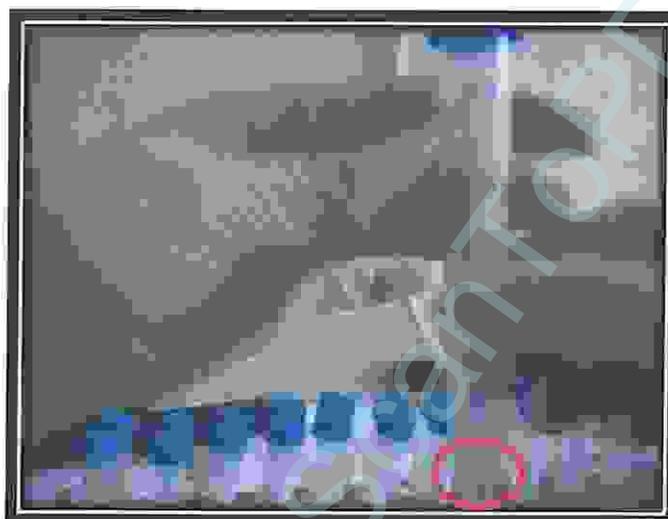


Figure 18 : Culot après sédimentation 18h.

I.4.3 Coloration de Ziehl-Neelsen à chaud)

- **Technique**

Celle-ci a lieu en trois étapes :

1^{ère} étape

➤ **Coloration**

- Placer de la lame (avec frottis séché et fixé) sur un support en métal.
- Recouvrir avec la fuchsine de Ziehl filtrée extemporanément sur papier.
- Chauffer doucement jusqu'à émission de vapeurs, au moyen d'un coton monté sur une tige métallique et imbibé d'alcool et enflammé.
- Chauffer dans ces conditions, la lame une première fois jusqu'à émission de vapeurs tout en évitant l'ébullition et le dessèchement du colorant.
- Répéter cette étape trois fois toutes les 3 minutes. Si nécessaire, ajouter de la fuchsine pour que la lame soit toujours totalement recouverte de fuchsine, l'étape de coloration doit durer 8 à 10 minutes (**Figure 19**).

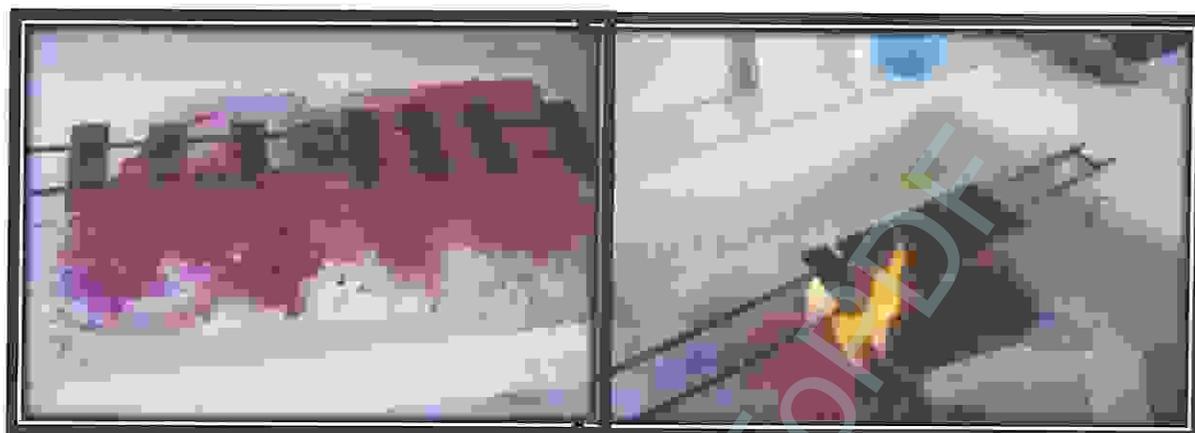


Figure 19 : Première étape de la coloration de Ziehl-Neelsen à chaud.

2ème étape

➤ Décoloration

- Rejeter la fuchsine. Laver immédiatement à l'eau ordinaire.
- Recouvrir avec l'acide sulfurique dilué au $\frac{1}{4}$ pendant 3 minutes.
- Laver avec l'eau ordinaire.
- Recouvrir avec l'alcool à 90° pendant 5 minutes.
- Laver (le frottis est alors incolore ou légèrement teinté en rose) (Figure 20).

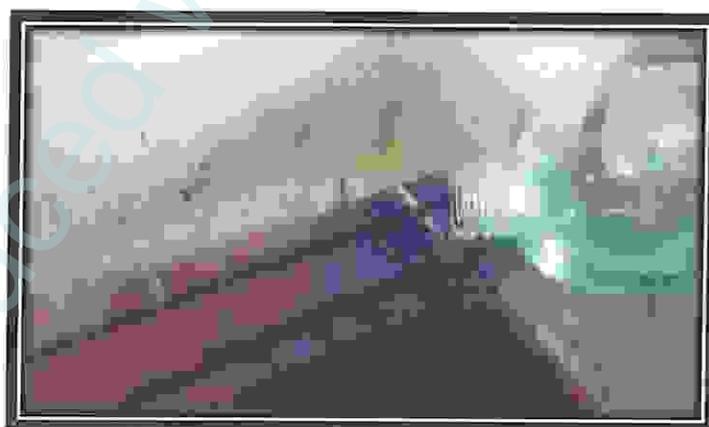


Figure 20 : Etapes de décoloration par l'acide sulfurique dilué au $\frac{1}{4}$ et l'alcool 90%

3ème étape

➤ Contre-coloration

- Recolorer pendant 30 secondes par la solution de bleu de méthylène filtrée extemporanément sur papier filtre. (Figure 21)



Figure 21: Etape de Contre coloration par la solution de bleu de méthylène.

- Laver à l'eau. Laisser sécher.
- La préparation est prête pour être examinée au microscope (**Figure 22**).

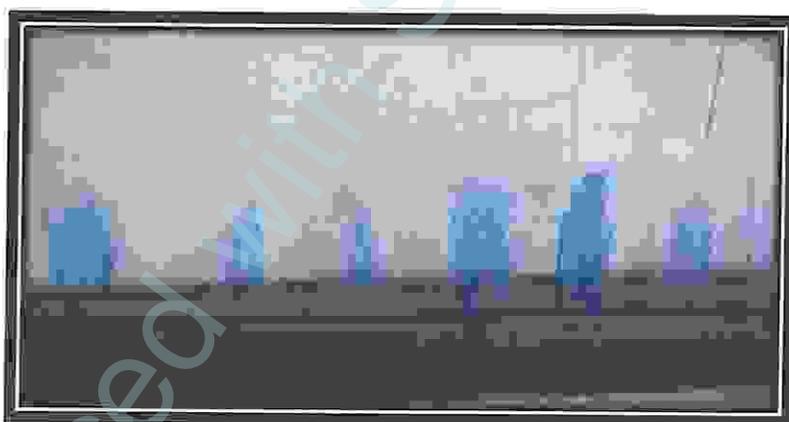


Figure 22 : Frottis d'expectorations après coloration de Ziehl-Neelsen à chaud.

Tous les frottis, préparés par la méthode directe ou par la méthode à l'hypochlorite de sodium, sont lus en double insu.

Après levée de l'insu et confrontation des résultats, les résultats concordants seront validés. Les résultats discordants feront l'objet d'une troisième lecture contradictoire.

1.4.4 Evaluation de la sensibilité de la méthode à l'hypochlorite de sodium par rapport à la mise en culture

Dans notre étude nous avons essayé d'évaluer la sensibilité de la méthode à l'hypochlorite de sodium (NaOCl) en la comparant avec une méthode de référence (gold standard) à savoir la

Partie pratique

culture. Notre étude est limitée aux échantillons dont la densité bacillaire a nettement augmenté après le traitement des expectorations à l'hypochlorite de sodium par rapport à la méthode directe. (24 échantillons).

- **Mise en culture par la Méthode de Petroff à la soude avec neutralisation**
 - Placer 2 ml d'expectoration dans un tube à centrifuger stérile, bouché à vis.
 - Ajouter 2 ml de NaOH à 4% et 3 gouttes de solution à 0,2% de bleu de bromothymol.
 - Agiter pendant 15 minutes sur agitateur de vortex
 - Porter 30 minutes à l'étuve à 37°C
 - Neutraliser jusqu'à virage au vert avec quelques gouttes de SO_4H_2 à 15 %.
 - Centrifuger à 3000 tours/minute pendant 15 minutes puis récupérer le culot (Figure 23).
 - Ensemencer le culot dans un tube de Löwenstein-Jensen (Figure 24). (Boulahbal *et al* 2007).

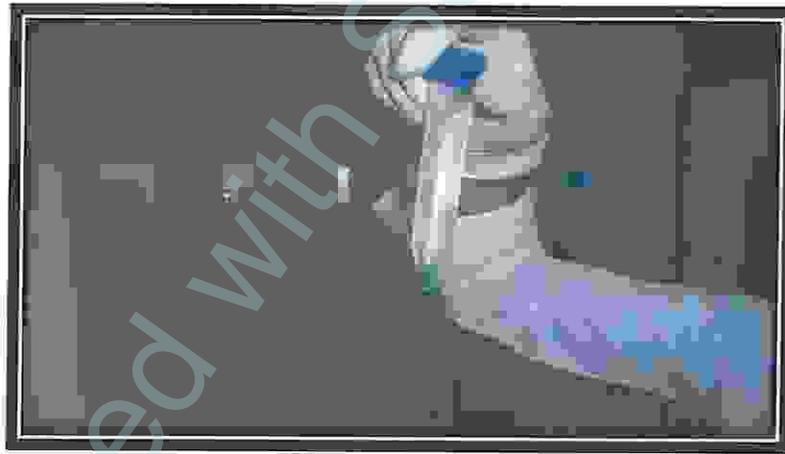


Figure 23 : Culot après centrifugation 3000 tours /minute pendant 15minute.

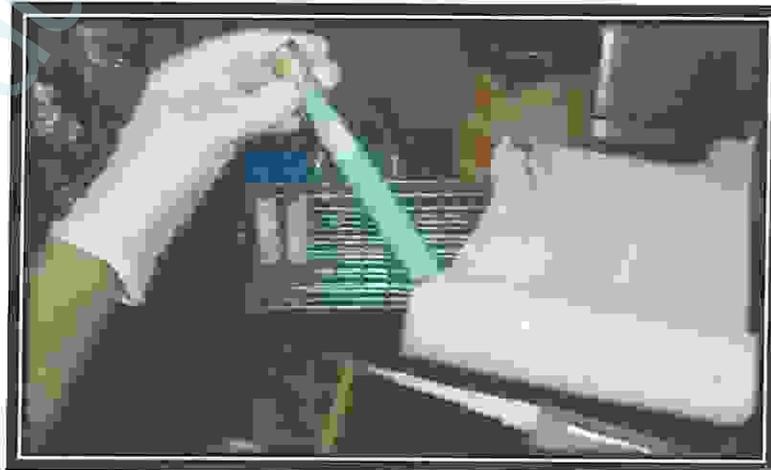


Figure 24 : Ensemencement du culot dans un tube de Löwenstein-Jensen.

Partie pratique

- Porter à l'étuve à 37°C, bouchon à vis incomplètement serré, pour laisser évaporer la partie liquide. Après 48 heures, vérifier l'évaporation puis fermer complètement les tubes.
- Examiner les tubes de culture une fois par semaine. Les colonies commencent à apparaître après 18 à 21 jours d'incubation, parfois plus tard.
- Si la culture est positive, la réponse est donnée après la lecture du 28ème jour en notant le nombre de colonies par tube.
- Les cultures négatives au 28ème jour seront remises à l'étuve et réexaminées tous les 15 jours et ceci jusqu'au 72ème jour (Boulhabal *et al.*, 2007).

II. Résultats :

Notre objectif principal étant l'évaluation de la densité bacillaire avant et après traitement des expectorations par l'hypochlorite de sodium à 3,94% (NaOCl) dans le diagnostic de la tuberculose pulmonaire, cependant nous avons jugé utile d'exposer d'abord la situation épidémiologique de la TPM+ dans la région de *Guelma*.

Il s'agit d'une enquête rétrospective de type descriptive qui va porter uniquement sur les personnes domiciliés dans la région de *Guelma* ayant présenté une tuberculose pulmonaire à microscopie positive, mentionnées sur le registre de l'unité contre la tuberculose et les maladies respiratoires UCTMR du début de l'année 2008 à la fin de l'année 2011.

Les critères étudiés : la fréquence, le sexe et l'âge.

- La fréquence :

Tableau 4 : Répartition des cas des malades aux années 2008 à 2011.

Années	Effectifs	Fréquence(%)
2008	100	23,98
2009	105	25,17
2010	105	25,17
2011	107	25,65
Total	417	100%

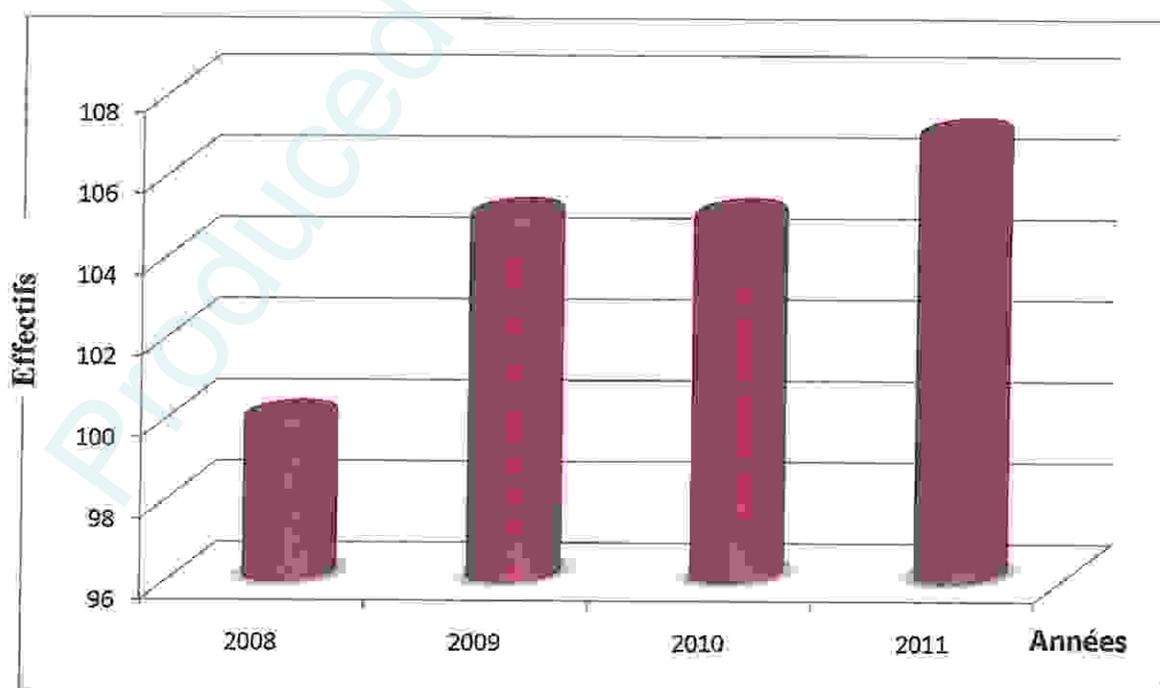


Figure 25 : Répartition des cas des malades de TPM+ aux années 2008 à 2011.

Partie pratique

Selon les résultats du **tableau 4** et la **figure 25**, notre enquête montre qu'il y a une nette progression entre les années 2008 et 2009, suivie d'une stabilité jusqu'à 2010, ensuite une reprise de la fréquence de la maladie jusqu'à 2011.

Tableau 5 : Répartition mensuelles des cas de la tuberculose pulmonaire à microscopie positive aux années 2008 à 2011.

Mois	2008		2009		2010		2011	
	Effectifs	Fréquence %						
Janvier	8	8	6	5,71	5	4,76	10	9,34
Février	8	8	6	5,71	12	11,42	7	6,54
Mars	12	12	10	9,52	8	7,61	10	9,34
Avril	11	11	12	11,42	8	7,61	15	14,04
Mai	06	6	9	8,57	7	6,66	5	4,67
Juin	8	8	5	4,76	13	12,38	8	7,47
Juillet	5	5	11	10,47	12	11,42	4	3,73
Aout	10	10	14	13,33	6	5,74	12	11,21
Septembre	9	9	9	8,57	11	10,47	13	12,14
Octobre	12	12	5	4,76	4	3,80	9	8,41
Novembre	7	7	7	6,66	8	7,61	7	6,54
Décembre	4	4	11	11,55	11	10,47	7	6,54
Total	100	100%	105	100%	105	100%	107	100%

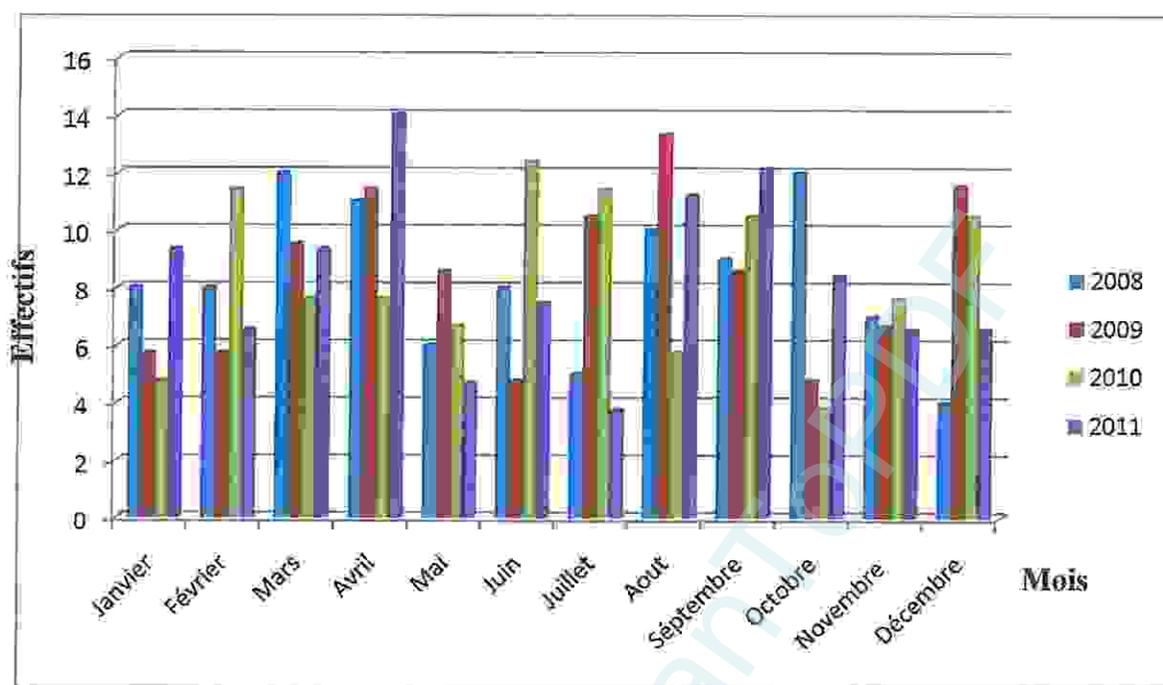


Figure 26 : Répartition mensuelles des cas de la tuberculose pulmonaire à microscopie positive aux années 2008 à 2011.

Le tableau 5 et la figure 26 montrent que la répartition mensuelle des cas de tuberculose pulmonaire à microscopie positive n'est pas régulière. On remarque que :

- En 2008, les mois de mars et d'octobre représentent la fréquence la plus élevées avec 12%.
- En 2009, le mois d'Aout représente la fréquence la plus élevée : 13,33%.
- En 2010, le mois de Juin représente la fréquence la plus élevée : 12,38%.
- En 2011, le mois d'Avril représente la fréquence la plus élevée : 14,04%

A partir de ces données, il est permis d'avancer que cette pathologie n'est pas saisonnière.

Partie pratique

- Age et sexe

Tableau 6 : Répartition des cas de tuberculose pulmonaire à microscopie positive selon l'âge et le sexe .

Tranche d'âge	Sexe masculin		Sexe féminin		Total	
	Effectifs	Fréquence %	Effectifs	Fréquence %	Effectifs	Fréquence %
<10 ans	2	0,47	1	0,23	3	0,71
10-19	29	6,95	41	9,83	70	16,78
20-29	71	17,02	56	13,42	127	30,45
30-39	48	11,50	36	8,63	84	20,14
40-49	35	8,39	19	4,55	54	12,94
50-59	15	3,59	15	3,59	30	7,19
60-69	9	2,15	9	2,15	18	4,31
≥70	17	4,07	14	3,35	31	7,43
Total	226	54,19	191	45,80	417	100%

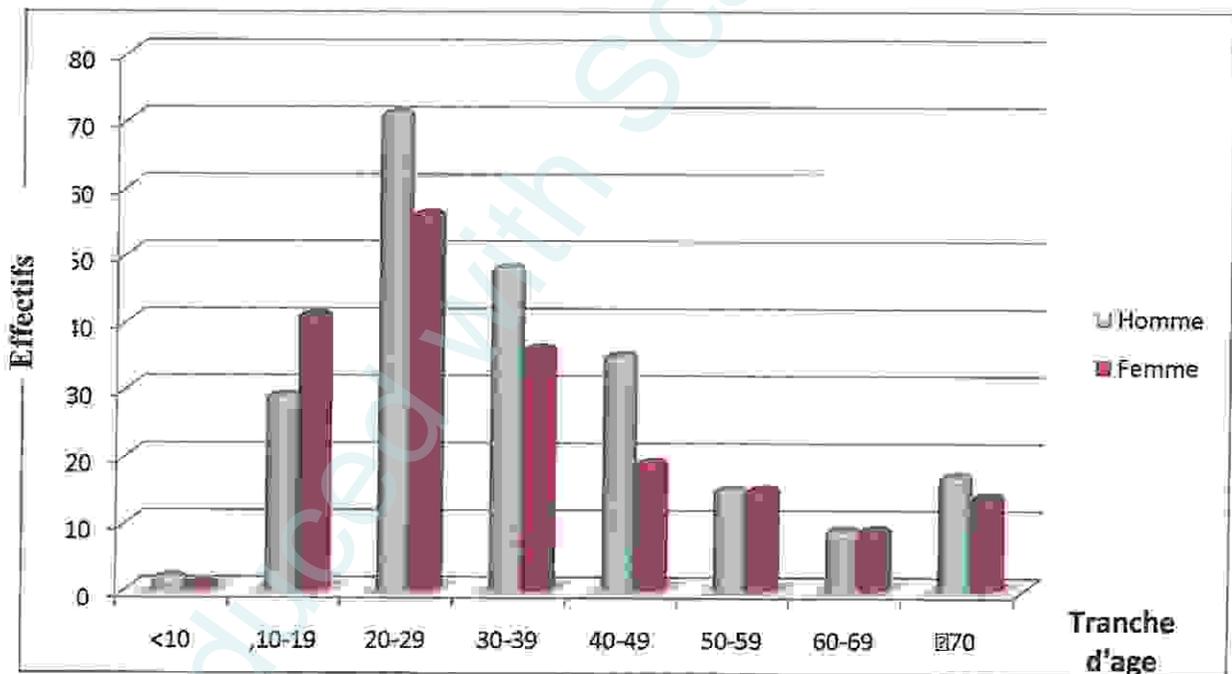


Figure 27 : Répartition des cas de TPM+ selon l'âge et le sexe aux années 2008-2011.

Selon les résultats du **tableau 6** et la **figure 27** on remarque que :

- La tranche d'âge <10ans est la moins touchée avec une fréquence de 0,71%. (Les enfants sont soumis à une surveillance rigoureuse de leur état de santé).
- La tranche d'âge la plus touchée est 20-29 avec une fréquence de 30,45%. ceci est due au fait qu'à cette tranche d'âge il ya une activité, une mobilité, et un mouvement plus fréquent.
- il ya une prédominance du sexe masculin par rapport au sexe féminin avec un sexe ratio de 1,18.

Partie pratique

II.1 Résultats de l'évaluation de la densité bacillaire avant et après traitement des expectorations par l'hypochlorite de sodium à 3,94% (NaOCl) dans le diagnostic de la tuberculose pulmonaire.

Au terme de notre étude : 110 échantillons obtenus à partir de 54 patients ont été analysés, soit une moyenne de 2 échantillons par patient.

Tableau 7: Origine des échantillons de crachat.

	Patients N= 54		Echantillons N=110	
	N	%	N	%
Sexe				
Masculin	20	37	41	37
Féminin	34	63	69	63
Tranche d'âge (années)				
<10 ans	3	5,55	7	6,36
10-19	7	13	15	13,63
20-29	9	16,66	18	16,36
30-39	7	12,96	13	13
40-49	8	14,81	16	14,54
50-59	5	9,25	10	9,09
60-69	7	12,96	14	12,72
≥70	8	14,81	17	15,45
Motif du prélèvement				
Dépistage	44	81,48	90	81,81
Contrôle après traitement	10	18,51	20	18,18

Partie pratique

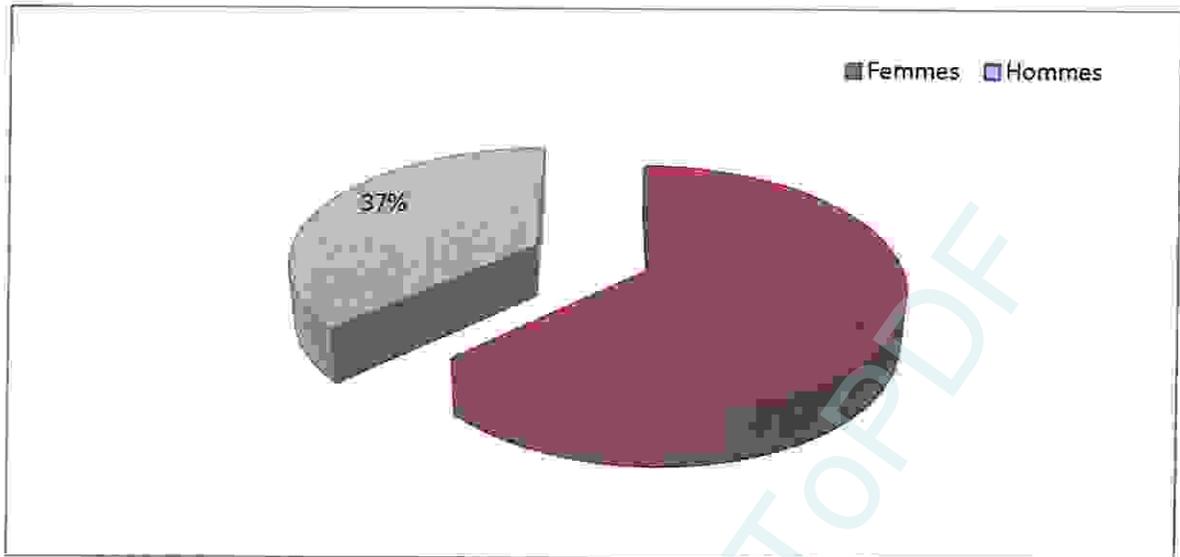


Figure 28: Répartition selon le sexe.

On remarque qu'il y a une prédominance des échantillons du sexe féminin avec 63% par rapport au sexe masculin 37%.

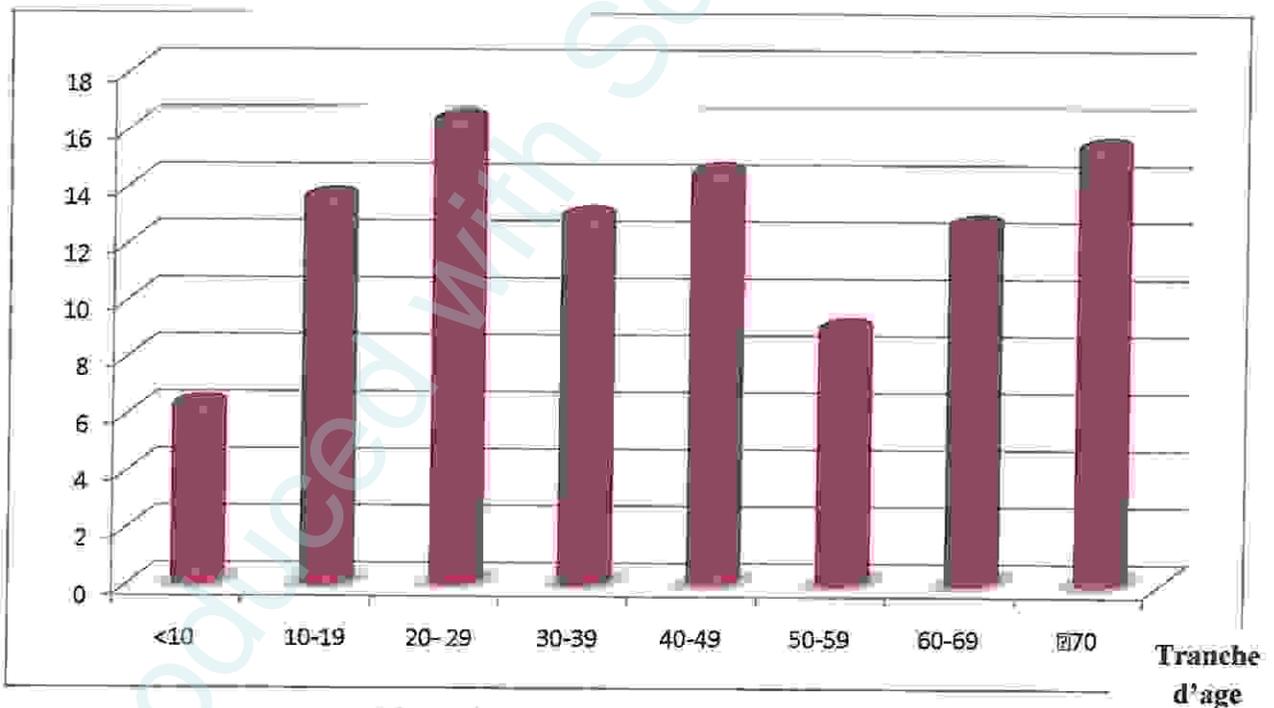


Figure 29 : Répartition selon l'âge.

- la tranche d'âge la plus concernée par cette étude est 20-29 avec 16,36%.
- La tranche d'âge <10ans est la moins concernée avec 6,36%, car les enfants sont souvent soumis à une surveillance rigoureuse de leur état de santé.
- La tranche d'âge > 70 représente une fréquence élevée avec 15,45% et ceci peut être expliqué par la fragilité du terrain (immunité affaiblie, maladies chroniques etc...)

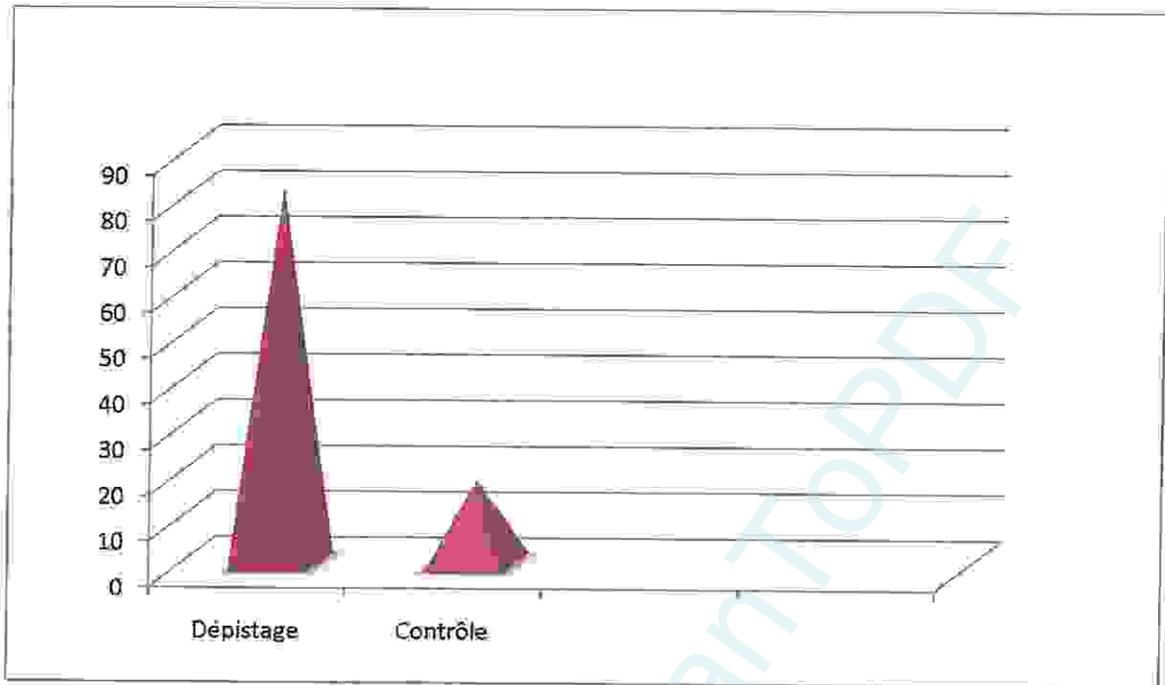


Figure 30: Répartition selon le motif de prélèvement.

La Population prélevée pour dépistage de la TB pulmonaire représente 81,81%. Ces résultats sont tout à fait logique parce que le dépistage concerne tout les cas suspect tandis que le contrôle ne concerne que les sujets malade pour surveiller l'évolution de la maladie sous traitement.

II.1.1 Interprétation des Résultats de l'examen microscopique

- Résultats qualitatifs

L'examen microscopique est effectué pendant 20 min au minimum par frottis (300 champs) (Figure31).

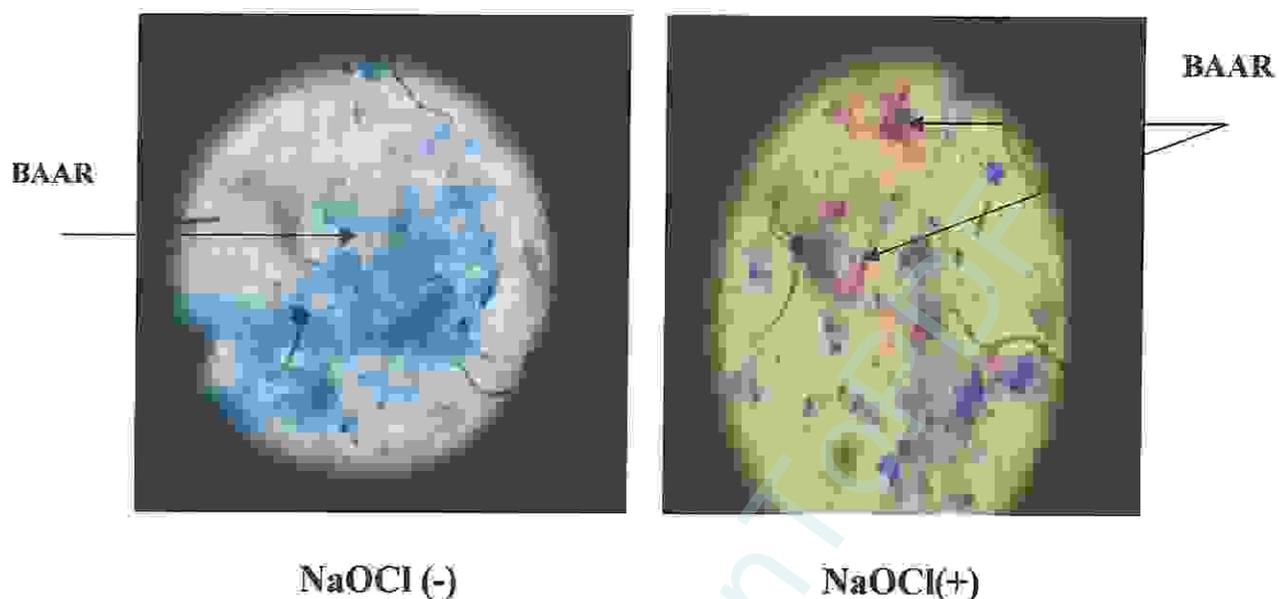


Figure 31: Comparaison des résultats de la microscopie (100x) de *M.tuberculosis* sans (NaOCL-) et avec (NaOCl +).

On remarque que la densité bacillaire s'est nettement améliorée après traitement à l'hypochlorite de sodium à 3,94 % (NaOCl +).

Le NaOCl a fluidifié les produits d'expectoration, complétée par une sédimentation, cette méthode a concentré les BAAR dans la préparation et a augmenté la densité bacillaire.

De plus, l'absence de résidus (NaOCl+) sur la lame de microscopie rend la lecture plus facile.

• **Résultats quantitatifs**

Les résultats sont exprimés suivant l'échelle quantitative de L'UICMR (**Tableau 8**).

Tableau 8 : Comparaison des résultats de la microscopie avant (NaOCl -) et après traitement des expectorations à l'hypochlorite de sodium à 3, 94% (NaOCl +).

		Méthode direct (examen 1)					Total
		Négatif	+/-	+	++	+++	
Méthode à l'eau de Javel (examen2)	Négatif	75	0	0	0	0	75
	+/-	6	1	0	0	0	7
	+	4	3	4	0	0	11
	++	1	1	4	0	0	6
	+++	1	0	3	1	6	11
Total		87	5	11	1	6	110

Partie pratique

Négatif= pas de BAAR sur au moins 100 champs ; +/- =1 à 9 BAAR sur 100 champs ;

+ = 10 à 99 BAAR sur 100 champs ; ++ = 1 à 10 BAAR sur au moins 50 champs ;

+++ => 10 BAAR par champs sur au moins 20 champs

BAAR= bacilles acido-alcool- résistants

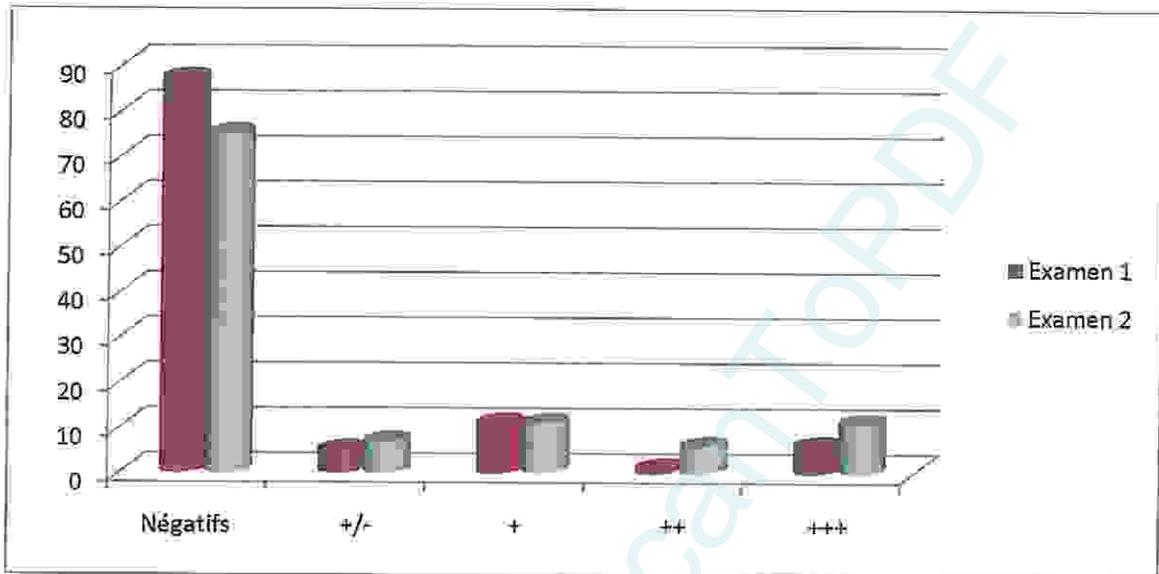


Figure 32: Représentation graphique de l'étude comparative.

Les résultats du **tableau 8** et de la **figure 32** montrent que le nombre d'expectorations sans bacilles (négatifs) en microscopie directe (NaOCl -) est plus important qu'après traitement au NaOCl 3,94% (NaOCl +), et qu'il y a un gain de positivité significatif avec la méthode à l'hypochlorite de sodium, surtout pour les frottis paucibacillaires (1-9 BAAR/100 champs) et multibacillaires (++ = 1 à 10 BAAR sur au moins 50 champs ; +++ => 10 BAAR par champs sur au moins 20 champs).

Sur un total de 110 échantillons, la recherche de BAAR est positive sur 23 frottis, soit 20,90% préparés par la méthode directe et sur 35 frottis, soit 31,81% préparés par la méthode à l'hypochlorite de sodium soit une augmentation du taux de positivité de 52,20% (**Tableau 8**)

II.1.2 Résultats de l'évaluation de la sensibilité par la mise en culture sur milieu solide

Pour cette évaluation, nous avons mis en culture uniquement 24 échantillons (manque de milieux de culture) dont la densité bacillaire a nettement augmenté après le traitement des expectorations à l'hypochlorite de sodium (**tableau 9**) par rapport à la méthode directe.

Partie pratique

Tableau 9: Comparaison des résultats de la culture faite à partir des échantillons non traités par le NaOCl par rapport à la méthode à l'hypochlorite de sodium.

Culture	Méthode à l'hypochlorite de sodium		Total
	Négative	Positive	
Négative	-	2	2
Positive	-	22	22
Total	-	24	24

Dans le **tableau 9**, on remarque que sur les 24 échantillons positifs en microscopie après traitement des expectorations par l'hypochlorite de sodium, 2 sont avérées négatifs en culture, il s'agit de bacilles non viables, et les 22 autres échantillons sont restés positifs.

En ce qui concerne l'étude comparative par rapport à la méthode directe, les résultats obtenus sont présentés dans le **Tableau 10**.

Tableau 10: Comparaison des résultats de la culture faite à partir des échantillons non traités par le NaOCl par rapport à la méthode direct

Culture	Méthode direct		Total
	Négative	Positive	
Négative	2	-	2
Positive	10	12	12
Total	12	12	24

Les résultats du **tableau 10** confirment la faible sensibilité de la bacilloscopie direct, car sur 12 échantillons négatifs en microscopie (méthode direct), 2 sont négatifs et 10 positifs en culture (**Figure 33**), les 12 échantillons positifs en microscopie sont toujours positifs en culture.

Colonies de BK

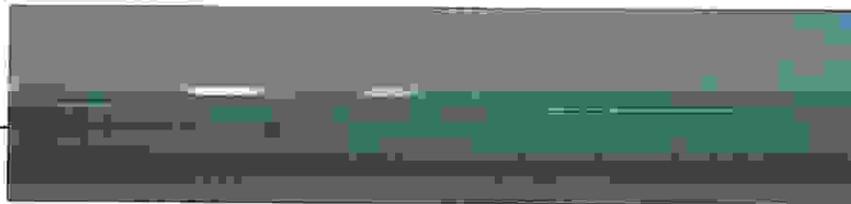


Figure 33 : Culture positif sur milieu solide après 28 jours.

III. Discussion

Pour la première fois dans la pratique du dépistage de la tuberculose pulmonaire au laboratoire de l'UCTMR à Guelma, nous avons introduit la méthode de fluidification-concentration à l'hypochlorite de sodium dans le but d'améliorer la sensibilisation de l'examen directe.

Cette méthode a un impact sur l'efficacité du diagnostic, puisqu'elle a « rattrapé » 12 échantillons trouvés BAAR négatifs par la méthode directe. Le gain de positivité le plus élevé était de (83,33%) concernant les échantillons multi-bacillaires (+++ => 10 BAAR par champs sur au moins 20 champs) (Tableau 1).

La digestion chimique des expectorations a permis de libérer les bacilles des fragments muqueux ou mucopurulents. L'élimination de la substance fluidifiante après sédimentation a concentré les bacilles dans le culot et a augmenté les degrés de positivité des frottis. (Ångeby K.A. K *et al.*, 2004).

L'application de la méthode à l'hypochlorite de sodium a apporté un gain de positivité global de 52,20%. Ce résultat confirme ceux publiés dans 15 des 19 études comparatives (gains allant de 7% à 253%). (Ångeby K.A. K *et al.*, 2004).

On se référant aux études de *Farnia et al* (2002) réalisée sur 430 échantillons et de *Gebre et al* (1995) réalisée sur 100 échantillons, nous avons essayé d'évaluer la sensibilité de la méthode à l'hypochlorite de sodium (NaOCl) en la comparant avec une méthode de référence (gold standard) « culture sur milieu solide ». Notre étude été limitée sur les 24 échantillons où la densité bacillaire a nettement augmenté et par voie de conséquence, la sensibilité et la spécificité n'ont pu être calculées; il été simplement possible d'y comparer la proportion des tests positifs. Ou sur les 24 échantillons positifs en microscopie après traitement des expectorations par l'hypochlorite de sodium, 2 sont avérées négatifs en culture, il s'agit de bacilles non viables, et les 22 autres échantillons sont restés positifs.

Le traitement des expectorations par le NaOCl 3,94 % pourrait donner une nouvelle dimension à la microscopie dans le diagnostic de la tuberculose pulmonaire. Ce procédé, simple et peu coûteux a l'avantage d'améliorer la détection des patients contagieux, et ainsi limiter la transmission du bacille tuberculeux et assurer une prise en charge thérapeutique précoce. Ceci augmente le succès du traitement et contribue à une meilleure performance des programmes de lutte contre la tuberculose.

Partie pratique

Toutefois, l'application du procédé dans les laboratoires entraînerait une charge horaire plus importante pour l'obtention des résultats et obligerait à réorganiser les tâches dans les laboratoires d'analyse.

Contrairement à des auteurs qui ont trouvé que le procédé au NaOCl était dépourvu de risques de contamination au laboratoire (*Ängeby K.A.K. et al.,2000*), nous avons noté qu'il existe des manipulations à risque qui précèdent le mélange des expectorations à ce produit, notamment le transfert des crachats dans les tubes coniques. Cependant, on a essayé de réduire ces risques en ajoutant directement la solution de NaOCl 3,94% au prélèvement dans le flacon de prélèvement. Après liquéfaction, la quantité nécessaire du mélange serait transférée dans un tube conique.

Nous avons aussi noté qu'une exposition prolongée au NaOCl (plus d'une nuit) réduit progressivement la possibilité de détecter les BAAR. Ce facteur doit être particulièrement pris en considération.

Dans les 19 études réalisées sur cette méthode, les auteurs ont ajouté dans leur test de l'eau distillée après la réaction à l'hypochlorite de sodium, car une concentration trop élevée d'hypochlorite de sodium serait susceptible d'interférer avec la coloration de ZN.

Toutefois, Comme *Yassin et al.* L'ont démontré, il est inutile d'ajouter l'eau distillée si le teste est réalisé avec du NaOCl moins concentré (2 à 5%).

Partant sur 110 échantillons et 54 patients, cette première application de la méthode à l'hypochlorite de sodium, permet sans doute de répondre à un certain nombre d'objections formulées dans la littérature à l'encontre de sa généralisation dans le dépistage de routine de la tuberculose pulmonaire. (*Van Deun et al.,2005*).

La fluidification-sédimentation à l'hypochlorite de sodium est une méthode rustique. Si elle connaît quelques adaptations techniques d'un centre à l'autre, celles-ci ne sont pas de nature à influencer les résultats à condition que les paramètres essentiels soient respectés :

- Concentration de la solution de NaOCl comprise entre 2% et 5%.
- Incubation à température ambiante pendant 15 min.
- Sédimentation pendant 18 heures ou bien centrifugation pendant 15 à 30 min (3000 tours/ minute) (*Ongkhammy et al ., 2009*).

L'assurance qualité de la bacilloscopie est une composante obligatoire de tout programme national de lutte contre la tuberculose. L'implantation de la méthode à l'hypochlorite de

sodium nécessitant une formation *in situ*, serait une excellente occasion d'en renforcer les procédures.

Produced with ScanTOPDF

Conclusion :

La tuberculose pulmonaire à microscopie positive gagne du terrain ces dernières années, et vu cette situation alarmante, des mesures alternatives plus efficaces dans le diagnostic et le traitement doivent être encouragées et appliquées sur le terrain pour une détection simple, rapide et peu coûteuse.

La méthode de fluidification-sédimentation à l'hypochlorite de sodium (NaOCl), est une méthode prometteuse, pour assurer un diagnostic bactériologique de qualité garantie, qui va dans le sens de la simplicité, rapidité et le coût réduit dans l'aire de l'économie de santé.

Cette méthode a des avantages indéniables qui sont :

- Ne nécessite pas de compétences particulières.
- Matériels et réactifs abordables et disponibles dans les pays où la tuberculose est endémique.
- Peu coûteuse, nécessite eau de Javel
- Diminue les risques de contaminations au laboratoire.
- Détecte même les échantillons paucibacillaires
- Améliore nettement la densité bacillaire.
- Utilise la microscopie directe qui reste la pierre angulaire du diagnostic de la tuberculose pulmonaire dont elle améliore la sensibilité.

Notre étude réalisée sur 110 échantillons d'expectorations confirme les avantages apportés par la méthode de fluidification-sédimentation à l'hypochlorite de sodium avec un gain de positivité de 52,20%.

Cette méthode simple et rustique peut être recommandée dans l'activité de routine des laboratoires participant au PNLT après une confirmation par des études pluri-centriques pour s'assurer que sa généralisation ait les bénéfices escomptés en renforçant utilement la stratégie DOTS en Algérie.

Pour améliorer la lutte antituberculeuse il faut tenir compte de la co-infection VIH/TB vu la recrudescence de la TB du fait de la baisse de l'immunité induite par le SIDA, et aussi cette baisse d'immunité qui augmente la virulence du Bacille. Tous ces facteurs font que cette lutte doit être au premier plan. Du fait du rendement médiocre de la bacilloscopie lors de la

co-infection VIH /TB, Il est indispensable de développer et de valider des outils de dépistage performant avant de recourir à une chimiothérapie préventive. L'apport de la méthode de concentration à l'hypochlorite de sodium a donné ces preuves dans le diagnostic de la tuberculose active chez les patients infectés par le VIH, certains travaux font état d'un gain de positivité supérieur parmi les sujets VIH+ que parmi les sujets VIH- (Ongkhammy et al., 2009). En Algérie son efficacité reste à déterminer.

Produced with ScanTOPDF

Références bibliographiques

Ouvrages et Thèses

Boulaïhbal F., Agadir F., Halassa A et al. (2007). Manuel de lutte antituberculeuse, à l'usage du personnels médicaux, institut nationale de la santé publique, Alger, 270p.

Crofton J., Home N., Miller F. (2001). Tuberculose clinique, 2ème UIC TMR. Paris, 249 p.

Enarson D.A., Ried H.L., Arnadottir T., Trebucq A. (2000). Prise en charge de la tuberculose: International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD). Paris, 127 p.

Grosset J. (1998). Histoire naturelle du bacille tuberculeux, Springer-Verlag. Paris, 230p.

Mathys V. (2010). Contribution à la compréhension des mécanismes moléculaires de résistance de *Mycobacterium tuberculosis* aux agents anti-tuberculeux. Thèse de doctorat. Université Libre de Bruxelles, 224 p.

Nouvel L. X. M. (2005). Recherche de marqueurs génétiques de souches de *Mycobacterium tuberculosis* multirésistantes aux antibiotiques en république centrafricain. Thèse de doctorat. Université Paul Sabatier, 92 p.

Varaine F., Henkens M., Grouzard V. (2010). Tuberculose : guide pratique à l'usage des médecins, infirmiers, techniciens de laboratoire et auxiliaires de santé. Médecins sans frontières. Paris, 164 p.

Articles

Al-Orainey I. O. (2009). Diagnosis of latent tuberculosis: Can we do better?. *Ann Thorac Med* .4: 5-9

Ängeby K.A.K., Alvarado-Galvez C., Pineda-Garcia L. (2000). Improved sputum microscopy for a more sensitive diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*.5(9): 684-687

Ängeby K.A.K., Hoffner S.E., Diwan V.K. et al. (2004). La méthode de microscopie à « l'eau de Javel » doit-elle être recommandée pour améliorer la détection des cas de tuberculose? Revue de la littérature et enquête auprès des personnes-clé. *Int J Tuberc Lung Dis* (Stockholm).8(7): 806-815

Van Deun A., Kim S.G., Rieder H.L. (2005). L'utilisation de l'eau de Javel tendra-t-elle ses promesses dans la bacilloscopie des frottis d'expectoration. *Int j tuberc lung dis* (Paris), **9** (6): 700-701

Bonnet M., Tajahmady A., Hepple P et al. (2010). Valeur ajoutée de l'examen microscopique après sédimentation à l'eau de Javel pour le diagnostic de la tuberculose : une étude coût-efficacité. *Int j tuberc lung dis* (Kenya), **14**(5):571-577

Bouver E., Abiteboul D., Antoun F et al. (2003). Synthèse et recommandations du groupe de travail du conseil supérieur d'hygiène publique de France: Prévention et prise en charge de la tuberculose en France. *Maladies respiratoires* **20**.

Farnia P., Mohammadi F., Zarifi Z., et al. (2002). Improving sensitivity of direct microscopy for detection of acid-fast bacilli in sputum: use of chitin in mucus digestion. *J Clin Microbiol* ; **40**: 508-511.

Hadj M., Fissah A., Nafti S. (2006). Les nouveaux tests de diagnostic de la tuberculose. *Revue des Maladie Respiratoire*. **23** :10S85-10S87

Harshey R.M., Ramakrishnan T. (1977) . Rate of ribonucleic acid chain growth in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *J Bacteriol* .**129**: 616-622

Ongkhammy S., Amstutz V., Barennes H et al. (2009). La méthode à l'eau de javel améliore le dépistage de la tuberculose pulmonaire au Laos , *Int J Tuberc Lung Dis* (Laos) . **13**(9): 1124-1129

Tattevin P.(2007) Tuberculosis treatment in 2007. *Med Mal Infect* .**37**:617-628.

Vincent V., Gutierrez M.C.(2009). Actualité sur l'épidémiologie moléculaire de *mycobacterium tuberculosis* . *Association des anciens élèves de l'institut pasteur*. **51** (201) : 157-159

Yassin M.A., Cuevas L.E., Gebrexabher H., Squire S.B. (2003). Efficacy and safety of short-term bleach digestion of sputum in case-finding for pulmonary tuberculosis in Ethiopia. *Int J Tuberc Lung Dis* .**7**: 678-683.

Sites internet :

- (1) <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/fr/index.html> ,(Consultation le 24 Février 2012).
- (2) **Tuberculose faits et chiffres sur la tuberculose**
http://www.stopb.org/assets/documents/global/plan/stopTB2011_overview_FR.pdf.
(Consultation 21 Avril 2012).
- (3) <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/fr/> . (Consultation le 26 Janvier 2012).
- (4) http://www.sapp-algeria.org/flash/tbc_2010/tbc_2010.html. (Consultation le 30 Mars 2012).
- (5) <http://unibioreims.pagesperso-orange.fr/tub.htm> (Consultation le 7 Février)
- (6) <http://2009.igem.org/Team:SupBiotech-Paris/Concept1Fr> (Consultation le 21 Avril 2012).
- (7) <http://www.chups.jussieu.fr/polys/bacterio/bacterio/POLY.Chp.12.html>.(Consultation le 14 Mai 2012).
- (8) http://www.oocities.org/tuberculose_pulmonaire/transmission.html .(Consultation le 2 Mars 2012)
- (9) http://www.futura-sciences.com/fr/definition/t/biologie-4/d/alveole-pulmonaire_4254/ .(Consultation le 27 février 2012)
- (10) http://www.pneumocourlancy.fr/popup/tuberculose_caverne.html .(Consultation le 5 Janvier 2012).
- (11) http://www.medespace.fr/Facultes_Medicales_Virtuelles/la-tuberculose-miliaire/
(Consultation le 30 Avril 2012)
- (12) **FARES, Guide théorique à l'intention des intervenants.**
http://www.fares.be/documents/guide_theorique2006.pdf.(Consultaion le 12 Février 2012)
- (13) http://www.asnom.org/fr/428_tuberculose.html. (Consultation le 27 Janvier 2012).
- (14) <http://phil.odc.gov/phil/details.asp>.(Consultation le 14 Avril 2012).
- (15) **Rapport OMS 2011 sur la lutte contre la tuberculose dans le monde.**
http://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr11_executive_summary_fr.pdf
(Consultation le 30 Janvier 2012) .

Annexes

	toute la nuit.			
Habeenzu et al.	2 échantillons d'expectoration de chacun des 488 patients consultant dans un hôpital universitaire, Zambie. Méthode à l'eau de Javel et méthode directe réalisées sur chaque expectoration.	488 patients	Non précisé	Microscopie à fluorescence
Miorner et al. (cen)18	Suspects de TP d'une polyclinique pour patients TB ambulatoires, Éthiopie. Concentration à l'eau de Javel réalisée par centrifugation.	545 échantillons	Non précisé	Aucun
Miorner et al. (acd)18	Suspects de TP d'une polyclinique pour patients TB ambulatoires, Éthiopie. Concentration à l'eau de Javel réalisée par sédimentation toute la nuit.	545 échantillons	Non précisé	Aucun
Saxena et al.	Suspects de TP en provenance d'un hôpital, Inde.	304 patients	Non précisé	Aucun
Van Deun et al	Echantillons consécutifs d'expectoration en provenance de centres ruraux TB, Bangladesh. Examens directs lus sur place. Frottis à l'eau de Javel lus au laboratoire central. Concentration réalisée par sédimentation.	3287 échantillons	ATS	Aucun
Wilkinson et Sturm	Suspects de TP consécutifs dans un hôpital de district, Afrique du Sud. On a utilisé un échantillon pour la microscopie directe et un autre pour la préparation à l'eau de Javel.	166 patients	Non précisé	Culture

Annexes

	pects de TP dans un hôpital d'enseignement, Éthiopie ; 3 examens directs faits au laboratoire de l'hôpital ; pool d'expectorations réunies à partir de 3 échantillons examiné par la méthode à l'eau de Javel dans un institut de recherche.	509 patients	OMS	Culture
Farnia et al.	Expectorations de patients référés ou hospitalisés dans un institut national de recherche en tuberculose en Iran. Concentration à l'eau de Javel par sédimentation toute la nuit.	430 échantillons	UICTMR	Culture
Gebre et al.	Suspects de TP provenant d'une polyclinique pour patients TB ambulatoires. Éthiopie.	100 échantillons.	Non précisé	Culture
Gebre et al.	Suspects de TP provenant d'une faculté de sciences médicales, Éthiopie.	500 échantillons	Non précisé	Aucun
Gebre et al.	Suspects de TP provenant d'une faculté de médecine, Inde.	103 échantillons	Non précisé	Aucun
Gebre-Selassie (cen)	1 expectoration de chaque adulte ambulatoire suspect de TP dans un hôpital universitaire, Éthiopie. Concentration à l'eau de Javel par Centrifugation.	200 patients	Non précisé	Aucun
Gebre-Selassie (sed)	1 expectoration de chaque adulte ambulatoire suspect de TP dans un hôpital universitaire, Éthiopie. Concentration à l'eau de Javel réalisée par sédimentation	200 patients	Non précisé	Aucun

Annexes

Yassin et al.	Suspects de TP consécutifs dans un centre de santé de mission en Ethiopie. 1 frottis standard vs. 1 frottis à l'eau de Javel avec concentration par sédimentation pendant 30-45 min.	200 patients	UICTMR	Aucun
---------------	--	--------------	--------	-------

Produced with ScanTOPDF

Résumé

La tuberculose est endémique en Algérie et pose un problème de santé publique. La technique fluidification/concentration à l'hypochlorite de sodium semblerait améliorer les résultats de l'examen microscopique direct qui reste la pierre angulaire du programme nationale de lutte contre la tuberculose (PNLT).

Dans ce travail réalisé sur 110 échantillons de crachats prélevés chez 54 patients, 23 (20,9%) sont trouvés BAAR positifs par méthode directe et 35 (31,81%) sont positifs par méthode à l'hypochlorite de sodium, soit une augmentation du taux de positivité de 52,2%.

La méthode à l'hypochlorite de sodium a montré sa nette supériorité sur la technique usuellement utilisé et doit être recommandée dans l'activité de routine des laboratoires participants au PNL.

Mots clés : Tuberculose ; Diagnostic; Expectoration ; Hypochlorite de sodium.

Abstract

Tuberculosis is endemic in Algeria and poses a public health problem. The liquefaction-concentration with sodium hypochloride method seems to improve the results of the direct microscopic examination which remains the most commonly used method in the national program of the fight against tuberculosis. In this study, carried out on 110 sputum samples collected from 54 patients, only 23 (20,9%) were diagnosed positive using direct microscopic examination while 35 (31,81) were diagnosed positive using the liquefaction-concentration with sodium hypochlorite, what makes an increase of 52,2% in the positivity rate. The liquefaction-concentration with sodium hypochloride method has marked its clear superiority over the commonly used method and it should be recommended in the routine activity of the laboratories that are participating in the national program of the fight against tuberculosis.

Key words: Tuberculosis; Diagnosis; Sputum; Sodium hypochloride.

المخلص

السل مرض مستوطن في الجزائر، ويعتبر من الأمراض التي تهدد الصحة العامة . ان تقنية هيبوكلوريت الصوديوم تحسن نتائج الفحص المجهرى المباشر، الذي يعتبر حجر الأساس في البرنامج الوطنى لمكافحة مرض السل .
ففي هذه الدراسة التي أجريت على 110 عينة بلغم التي تم جمعها من 54 مريض، تم العثور على 23 (20,9%) عينة ايجابية بالطريقة المباشرة و 35 (31,81%) عينة ايجابية بطريقة هيبوكلوريت الصوديوم ، هذا ما أدى الى زيادة في ايجابية الفحص المجهرى الى 52,2% .
تقنية هيبوكلوريت الصوديوم أظهرت تفوق واضح على طريقة الفحص المجهرى المباشر ، لهذا ينبغي أن تصبح طريقة روتينية في مخابر البرنامج الوطنى لمكافحة السل.

كلمات مفتاحية: السل، تشخيص ، بلغم ، هيبوكلوريت الصوديوم.