



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Projet de Fin d'Etudes
Licence Sciences & Techniques
Sciences Biologiques Appliquées et Santé
(LST - SBAS)

TUBERCULOSE

PRÉSENTÉ PAR : Mlle Barhouli Zineb

ENCADRÉ PAR : Pr Bahafid Wifak (FST Fès)

Dr Ghrissi Khalid (Laboratoire GHRISSI)

SOUTENU LE : 07/07/2021

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE :

- **Pr Bahafid Wifak**
- **Pr Benchemsi Najoua**
- **Dr Ghrissi Khalid**

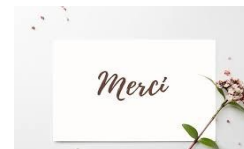
Stage effectué à : Laboratoire d'analyse médicale GHRISSI
Année universitaire 2020-2021

Remerciement :

Tous d'abord je tiens à remercier ALLAH le tout puissant de m'avoir donné courage, santé, souffre et patience pour accomplir ce travail.

- ❖ Mes remerciements vont également au Professeur SAID HALOTI coordonnateur de la LST Sciences Biologiques Appliquées et Santé, pour son travail d'organisation de la filière.
- ❖ Je remercie également le directeur du laboratoire d'analyse Ghrissi, Dr Khalid Ghrissi d'abord pour m'avoir accepté dans son laboratoire et pour tout ce qu'il m'a appris pendant la période de stage.
- ❖ Je remercie aussi Pr BAHAFID WIFAK mon encadrante pédagogique, pour avoir accepté de juger ce travail de mémoire et d'en être le rapporteur. Je vous remercie pour avoir dirigé ce travail. Je tiens à manifester ma reconnaissance pour votre gentillesse, C'est une chance inouïe d'avoir eu l'occasion de travailler sous votre direction. Vous avez tout mon respect et toute mon admiration.
- ❖ Professeur BENCHEMSI NAJOUA, je vous adresse mes remerciements pour avoir accepté de juger ce travail et je vous remercie pour votre présence lors de la soutenance de cette mémoire.
- ❖ Je remercie l'ensemble des employés de laboratoire Ghrissi pour les conseils et aussi l'aide qu'ils m'ont donné au cours de ces deux mois.

Pour tous ceux que j'ai oubliés, je vous dis merci



Dédicace :

A ma très chère mère

Votre patience, votre bienveillance, votre dévouement et votre courage sont admirables.

Vous étiez toujours présente pour nous écouter, nous réconforter et nous montrer le droit chemin.

Vous avez déployé énormément d'efforts pour que nous ne manquions de rien. Vous êtes une mère formidable. Je t'aime et je te souhaite longue vie dans la bonne santé et le bonheur

A mon très cher père

Ce modeste travail est le fruit de tous sacrifices déployés pour notre éducation.

Vous avez toujours souhaité le meilleur pour nous.

Vous avez fourni beaucoup d'efforts aussi bien physiques et moraux à notre égard.

Vous n'avez jamais cessé de nous encourager et de prier pour nous.

Vous méritez sans conteste qu'on vous décerne les prix « Père Exemplaire ».

Père : je t'aime et j'implore le tout puissant pour qu'il t'accorde une bonne santé et une vie heureuse.

A mes chers frères

Je vous remercie pour vos encouragements, votre soutien moral et votre grand Que dieu vous accorde santé, bonheur et longue vie.

A toute ma famille source d'espoir et de motivation.

A tous mes chères amies.

A vous cher lecteur.

Je dédie ce travail

Liste d'abréviations :

- **TB** : Tuberculose
- **OMS** : Organisation Mondiale de Santé
- **BAAR** : Bacilles acido-alcool résistants
- **IDR** : Intradermo-Réaction
- **M.Tuberculosis** : *Mycobacterium tuberculosis*
- **RX** : Radiographie du Thorax
- **BCG** : Bacille Calmette et Guérin

Liste des tableaux :

Tableaux	Titres	pages
1	Expression des résultats de l'examen microscopique selon le nombre de bacilles observés par champ microscopique au grossissement 1000. Propositions de l'OMS.	19

Listes des figures :

Figures	Titres	Pages
1	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	2
2	Schéma de l'enveloppe cellulaire des <i>mycobacterium</i>	4
3	Mode de transmission interhumaine de <i>Mycobacterium Tuberculosis</i>	5
4	Carte Taux d'incidences estimées de tuberculose pour 100 000, OMS, 2019	9
5	Evolution du nombre de cas de l'incidence de TB au Maroc, 2000-2015	10
6	Incidence de la TB toute forme par région au Maroc, 2015	11
7	Technique d'interprétation d'une intradermoréaction à la tuberculine	14
8	Lame à BK positif	22
9	Culture positif présence colonies de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	22
10	Lame à BK négatif	23

Sommaire :

Remerciements

Dédicace

Liste d'abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction1

Revue bibliographique :

I.	Définition de la tuberculose	2
II.	Agent pathogène responsable de la tuberculose.....	2
1.	Classification	2
2.	Caractéristiques de la bactérie.....	3
a.	Structure de l'enveloppe.....	3
b.	Caractères morphologiques	4
c.	Caractères génétiques.....	4
d.	Caractères biochimiques.....	5
3.	Mode de transmission	5
III.	Formes cliniques de la tuberculose	5
1.	Types de la tuberculose	5
a.	Tuberculose pulmonaire	5
b.	Tuberculose extra pulmonaire	6
c.	Tuberculose disséminée ou miliaire	6
2.	Résistance aux antituberculeux	7
3.	Symptômes de la tuberculose	7
a.	Symptômes généraux	7

b. Symptômes de la tuberculose pulmonaire	7
IV. Epidémiologie	8
1. Epidémiologie de la tuberculose dans le monde	8
2. Epidémiologie de la tuberculose au Maroc	9
V. Diagnostic de la tuberculose	11
1. Diagnostic de la tuberculose active ou pulmonaire	11
a. La radiographie du Thorax (RX) de face et profil	11
b. Les examens bactériologiques des expectorations	12
i. Examen microscopique direct (ED)	12
ii. Une culture avec identification suivie d'un antibiogramme	12
iii. Antibiogramme (technique phénotypique)	13
2. Diagnostic de la tuberculose latente	13
VI. Traitement	14
1. Isolement des patients contagieux	14
2. Traitement	15

Matériel et méthodes

1. Lieu et période de l'étude	16
2. Recueil de prélèvements de type crachat	16
3. Examen microscopique : bacille de Koch examen direct (BKED)	16
a. Préparation du frottis	16
b. Coloration de Ziehl Neelsen	17
i. La coloration par la fuchsine phénique	17
ii. Décoloration	18
iii. Contre coloration	18
c. Lecture des lames au microscope	18
d. Interprétation des résultats	19
4. Examen macroscopique : bacille de Koch culture (BKD)	20
A. Culture des BK	20
a. Décontamination des prélèvements.....	20
i. La décontamination à la soude 4% (méthode de Petroff)	20

b. Ensemencement	20
c. Mise à l'étuve (incubation)	21
B. Lecture et expressions des résultats	21

Résultats et discussion

❖ Résultats microscopique	22
❖ Résultats de la culture	22

Conclusion	23
-------------------------	-----------

Références bibliographiques

Présentation de la structure d'accueil

Le laboratoire d'analyse médicale GHRISSI a ouvert ses portes en 2014 à Hay Saada de Fès. Il est dirigé par le Docteur Ghrissi Khalid diplômé en biologie depuis 1984 de (faculté de pharmacie et de science biologique de NANCY et MONTREPELLIER) et ayant plus de 30 ans d'expérience évolutive.

Les différents services utilisés au laboratoire sont :

- Services d'Hématologie

- NFS (numération des GR, les GB, les plaquettes, le taux d'hémoglobine, VGM, CCMH...)
- Dosage d'hémoglobine glucosé HB1AC.
- Groupes sanguin ABO.
- Vitesse de sédimentation Vs.

- Services de sérologie

- Dosage de TSH, T3, T4, Ferritine, Vitamine D, Toxoplasmose, rubéole, BHCG quantitative, troponine.
- Hépatite A, Hépatite B, Hépatite C, VIH.
- Temps de saignement.
- Temps de prothrombine /INR.
- Fibrinogène.

- Services de biochimie

- Analyses sanguines : Dosage de glycémie, urée, créatinine, calcium, potassium, sodium, magnésium, phosphore, protide, réserve alcalin, cholestérol, triglycéride, HDL, LDL, GOT, GPT, GGT, bilirubine, fer sérique, CRP, ASLO, phosphate alcaline...
- Analyses urinaires : le débit urinaire, micro albumine, albumine, protéinurie 24h
- Recherche de BHCG
- Recherche d'anticorps irréguliers (RAI)

- Services de bactériologie :

- Examen cyto bactériologique des urines (ECBU)
- Examen mycologique des ongles et des cheveux

- Examen bactériologique des selles (Coproculture)
- Parasitologie des selles
- Spermogramme, Spermoculture
- Examen de crachat (BK)



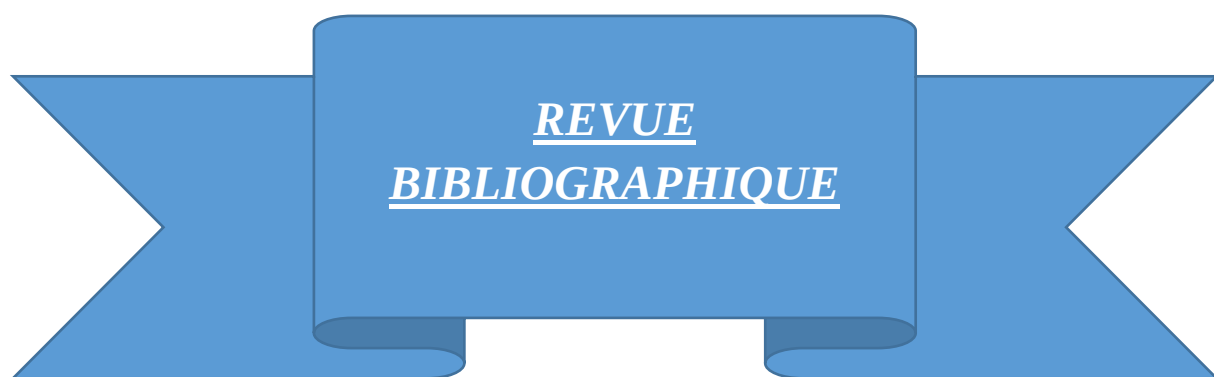
INTRODUCTION

La tuberculose, causée par *Mycobacterium tuberculosis*, connaît actuellement une résurgence inquiétante, et un rapport de l'OMS estimait à 8–9 millions, le nombre de nouveaux cas cliniques en 2011 avec environ 1,4 millions de décès dus à la maladie [1.2]. Environ un tiers de la population mondiale est exposée à *M. tuberculosis*, et après exposition, la plupart des individus, mais pas la totalité, deviennent infectés par le bacille [3]. Chez les sujets infectés, l'expression de la maladie résulte d'interactions complexes entre le bacille, des facteurs de milieu, et des facteurs propres à l'hôte [4.5]. Il est assez remarquable de noter que la grande majorité (~90%) de ces individus infectés ne présentera jamais de symptomatologie clinique [6]. Parmi les 10% qui développent la maladie, environ la moitié le fera dans les deux années suivant l'infection, ce qui est en général considéré comme une forme primaire de tuberculose ; il s'agit typiquement des formes pédiatriques qui sont souvent extra-pulmonaires [7]. Les autres patients présenteront leur maladie à distance de l'infection primaire chez l'enfant (parfois plusieurs dizaines d'années), et sont souvent définis comme des formes de réactivation ; il s'agit classiquement des formes pulmonaires de l'adulte.

Actuellement le problème de la tuberculose est loin d'être maîtrisé il se cause compliqué par plusieurs événements parmi eux l'apparition de souches de *Mycobacterium tuberculosis* résistants voire multi-résistantes, aux antituberculeux.

Les antituberculeux sont des médicaments actifs sur le BK. Mais pour différentes raisons, le BK devient de plus en plus résistant à certains de ces antituberculeux. D'où la nécessité de faire un antibiogramme avant donner un traitement.

L'objectif de ce présent travail est de modéliser les types, l'agent pathogène responsable de la tuberculose et aussi les différentes méthodes de diagnostic de la maladie.



I. Définition de la tuberculose

La tuberculose est une maladie infectieuse contagieuse, causée par une bactérie : *Mycobacterium Tuberculosis* ou Bacille de Koch, découverte en 1882 par le médecin Allemand ROBERT KOCH. Elle touche le plus souvent les poumons (75% des cas) mais peut également atteindre les os, les reins, les ganglions et le cerveau [8].

II. Agent pathogène responsable de la tuberculose

La tuberculose est provoqué par les *Mycobacterium tuberculosis* ou bacille de koch.



Figure 1 : *Mycobacterium tuberculosis*.

1. Classification

La tuberculose est une maladie consécutive à une infection par des bacilles du complexe *Mycobacterium tuberculosis* qui comprend principalement *Mycobacterium tuberculosis*

Stricto sensu (bacille de Koch décrit en 1882 par Robert Koch), *M. bovis* et *M. africanum* ainsi que d'autres espèces rarement rencontrées. Il appartient à la classe des *schizomycetes*, ordre des *actinomycetales*, famille des *Mycobacteriaceae* et genre *Mycobacterium*.

Le genre de la *Mycobacterium* comprend 150 espèces dont deux sont pathogènes de l'homme nommées *M. tuberculosis*, *M. leprae*.

Les agents étiologiques de la TB peuvent être divisés en trois groupes :

- **Les mycobactéries atypiques** : sont les bacilles acido-alcool-résistants autres que *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. paratuberculosis*, *M. leprae* et *M. leprae-murium* qui sont, eux, des parasites stricts et ont un pouvoir pathogène naturel bien établi. Responsables d'infections humaines opportunistes, elles se caractérisent par une forte activité catalasique thermostable, une absence de pouvoir pathogène pour le cobaye et une résistance à la plupart des antibiotiques antituberculeux. Bien que plus de 40 espèces mycobactériennes "atypiques" aient été identifiées, les principales espèces isolées dans le laboratoire de bactériologie clinique se réduisent à 12 potentiellement pathogènes pour l'homme et à 10 habituellement non pathogènes.
- **Mycobacteries tuberculeuse ou typique** : ce groupe comprend *M. tuberculosis*, *M. africanus*, *M. bovis*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. caprae*, *pinnipedi* et *M. Canetti*. Elles peuvent provoquer la tuberculose (TB) chez l'homme.
- **Mycobactérium leprae** : est l'agent responsable de la lèpre [9].

2. Caractéristiques de la bactérie

a. Structure de l'enveloppe

L'étude de la structure de l'enveloppe du bacille tuberculeux permet de comprendre comment l'agent responsable de la tuberculose bouleverse, contourne ou/et neutralise les mécanismes cellulaires antimicrobiens. Cette enveloppe se compose schématiquement d'une membrane plasmique, d'un squelette pariétal formé du complexe peptidoglycane-arabinogalactane-acides mycoliques et d'une couche externe (figure 2). C'est dans l'épaisseur et dans la composition moléculaire de cette dernière que l'on retrouve des différences entre *Mycobacterium*

tuberculosis et les espèces pathogènes d'une part, et les mycobactéries non pathogènes d'autre part [10].

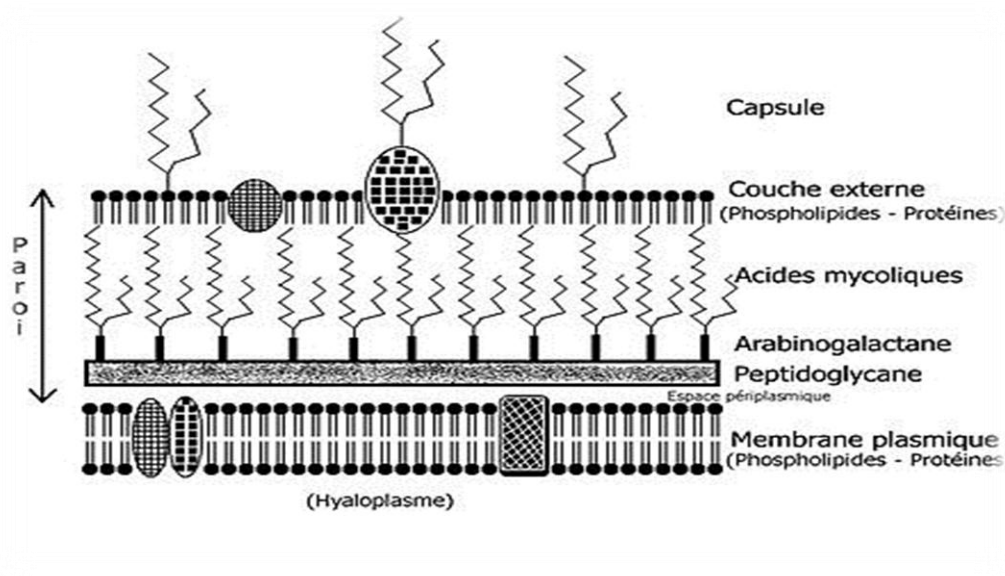


Figure 2 : Schéma de l'enveloppe cellulaire des *mycobactéries*.

b. Caractères morphologiques :

Les mycobactéries sont des bacilles droits ou légèrement incurvés, de 0,2 à 0,6 μm de diamètre sur 1,0 à 10,0 μm de longueur, présentant parfois des renflements ou des ramifications, formant occasionnellement des filaments qui se fragmentent très facilement en éléments bacillaires. Elles sont immobiles et non sporulées.

Deux colorations sont utilisées : la coloration de Ziehl-Neelsen (et ses variantes) et la coloration à l'auramine (Dugommier) [11].

c. Caractères génétiques

La puissante combinaison de la génomique et de la bio-informatique fournit une multitude d'informations sur *Mycobacterium tuberculosis*, l'agent étiologique de la tuberculose humaine, qui faciliteront la conception et le développement de nouvelles thérapies. Le point de départ du séquençage du génome a été la carte intégrée du chromosome circulaire de 4,4 Mb de la souche de référence virulente largement utilisée, *M. tuberculosis* H37Rv [12].

d. Caractères biochimiques

M.tuberculosis est aérobie strict. Il est catalase positive, nitrate positif. Au cours de sa croissance il synthétise une quantité importante d'acide nicotinique ou niacine qui peut être mise en évidence par une épreuve biochimique, le test de KONNO ou niacine-test. La positivité de cette épreuve est spécifique de *M.tuberculosis* [13].

3. Mode de transmission

La transmission de la tuberculose est interhumaine, principalement par voie aérienne par l'intermédiaire d'aérosols infectés émis dans l'environnement par un malade contagieux (figure3). Les patients infectés par le VIH sont particulièrement à risque de développer une tuberculose par réactivation d'une infection ancienne ou par évolution rapide d'une infection récente acquise au contact d'un malade contagieux.

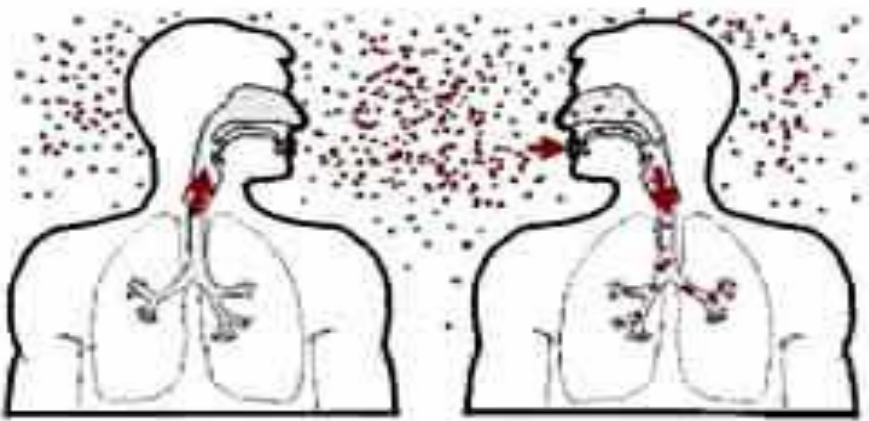


Figure 3 : mode de transmission interhumaine de *Mycobacterium tuberculosis*

III. Formes cliniques de la tuberculose

1. Types de la tuberculose

a. Tuberculose pulmonaire

La tuberculose pulmonaire survient chez un sujet précédemment infecté en cas de contagé massif et/ou de déficience immunitaire par l'un des trois mécanismes suivants :

- Soit de manière rare par aggravation progressive du foyer initial de la primo-infection ;
- Soit par réactivation endogène de bacilles restés quiescents après la primo-infection. En l'absence de traitement et d'immunodéficiency ce risque a été estimé à 5 à 10% dans les 3 à 5 ans qui suivent la primo-infection, et à 5% pour le reste de la vie ;
- Soit par réinfection exogène : les bacilles à l'origine de cette tuberculose proviennent d'une nouvelle contamination [14].

b. Tuberculose extra pulmonaire

Les tuberculoses extra-pulmonaires représentent 15 à 30 % de l'ensemble des tuberculoses. Leur incidence avait moins diminué que celle de la tuberculose pulmonaire dans les pays industrialisés avant l'apparition de l'infection à VIH. A l'heure actuelle cependant elles concernent plus particulièrement les malades contaminés par ce virus et atteints d'immunodéficiency. Les formes disséminées ou miliaries et les méningites restent encore grevées d'un taux de mortalité d'environ 20 % malgré les progrès diagnostiques et thérapeutiques. A côté de ces 2 entités qui restent graves, les 4 localisations les plus courantes sont dans l'ordre : les ganglions, la plèvre, le système génito-urinaire et l'appareil locomoteur. Compte-tenu de leur polymorphisme anatomo-clinique, des données de la littérature, il n'apparaît pas qu'actuellement les délais d'intervention thérapeutique se soient améliorés de façon évidente [15].

c. Tuberculose disséminée ou miliaire

La tuberculose miliaire est un type de tuberculose susceptible de menacer le pronostic vital qui survient lorsqu'un grand nombre de bactéries se déplacent dans et affectent un ou plusieurs organes ou se propagent dans tout l'organisme. Les poumons, le foie et la moelle osseuse sont les plus souvent touchés, mais tous les organes sont susceptibles d'être affectés, même les tissus qui recouvrent le cerveau et la moelle épinière (méninges) et la membrane à deux feuillets qui enveloppe le cœur (péricarde). La tuberculose miliaire se développe le plus souvent chez les personnes suivantes :

- Les enfants âgés de moins de 4 ans.
- Personnes dont le système immunitaire est affaibli.
- Personnes âgées [16].

2. Résistance aux antituberculeux

L'utilisation non raisonnée des antituberculeux conduit à l'émergence de souches résistantes de *Mycobacterium tuberculosis*. On compte environ 440 000 nouveaux cas par an dans le monde de tuberculose résistante aux deux antituberculeux majeurs que sont l'isoniazide et la rifampicine. Ces tuberculoses sont dites multirésistantes (TB MDR) et leur traitement repose depuis une vingtaine d'années sur l'utilisation des fluoroquinolones et des antibiotiques injectables de réserve que sont l'amikacine, la kanamycine et la capréomycine [17].

3. Symptômes de la tuberculose

a. Symptômes généraux

Au début la maladie de la tuberculose est asymptomatique, mais juste après 2 mois, la maladie se manifeste par plusieurs symptômes, notamment :

- Une perte d'appétit ;
- Un amaigrissement ;
- De la fatigue
- Une agitation nocturne ;
- Une somnolence le jour ;

- De la fièvre.

b. Symptômes de la tuberculose pulmonaire

La tuberculose pulmonaire est la plus fréquente. Elle se manifeste par :

- Une toux chronique avec des crachats épais, comportant parfois quelques filets de sang ;
- Un essoufflement ;
- Une fièvre traînante, avec souvent des sueurs nocturnes ;
- Une perte d'appétit, un amaigrissement ;
- Des douleurs dans la poitrine ;
- Un état de fatigue [18].

IV. Epidémiologie

1. Epidémiologie de la tuberculose dans le monde

La tuberculose est présente dans toutes les régions du monde. En 2019, la Région de l'OMS ayant enregistré le plus grand nombre de nouveaux cas de tuberculose était celle de l'Asie du Sud-Est (44 % de tous les nouveaux cas), suivie de la Région africaine (25 %) et de la Région du Pacifique occidental (18 %). En 2019, 87 % de tous les nouveaux cas sont survenus dans les 30 pays enregistrant la plus forte charge de tuberculose. Deux tiers des nouveaux cas étaient concentrés dans huit pays : l'Inde, l'Indonésie, la Chine, les Philippines, le Pakistan, le Nigéria, le Bangladesh et l'Afrique du Sud. (Figure 4)

L'incidence de la tuberculose régresse d'environ 2 % par an à l'échelle mondiale. La baisse cumulée entre 2015 et 2019 se chiffre à 9 %, soit moins de la moitié de la cible fixée dans la Stratégie pour mettre fin à la tuberculose, qui visait une réduction de 20 % entre 2015 et 2020.

On estime que le diagnostic et le traitement de la tuberculose ont permis de sauver 60 millions de vies entre 2000 et 2019.

Mettre un terme à l'épidémie de tuberculose d'ici à 2030 figure parmi les cibles sanitaires des objectifs de développement durable des Nations Unies [19].

FIG. 4.4

Estimated TB incidence rates, 2019

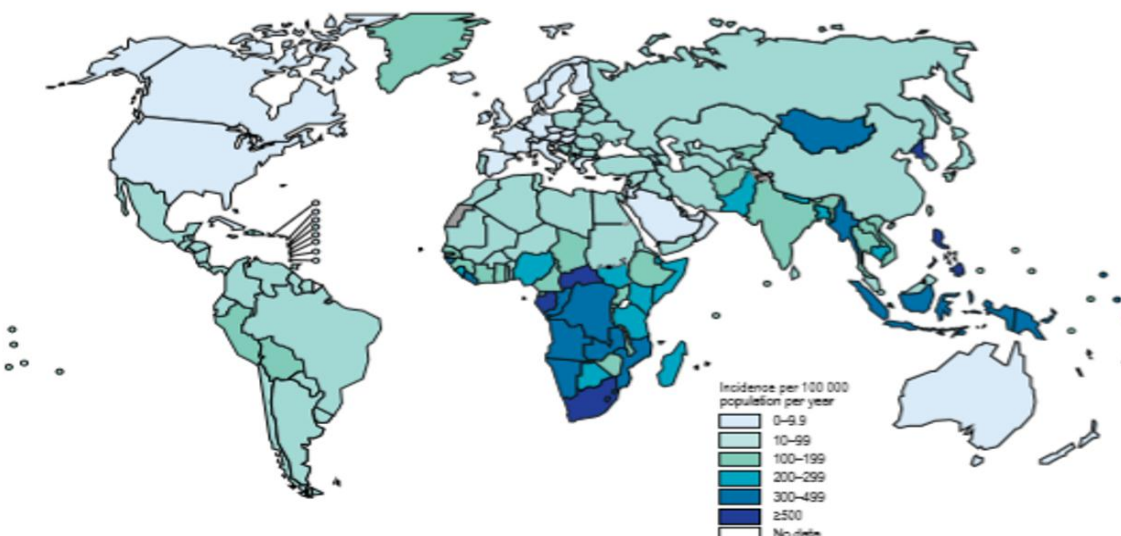


Figure 4 : Carte_Taux d'incidence estimés de tuberculose pour 100 000, OMS, 2019

2. Epidémiologie de tuberculose au Maroc :

Selon les estimations de l'OMS pour l'année 2014, le nombre annuel de cas incidents de la tuberculose au Maroc était d'environ 36 .000.

En 2015, un total de 30.636 cas de tuberculose, toutes formes confondues (28.955 nouveaux cas et 1.681 cas de rechutes), a été notifié, soit une incidence de 89 cas pour 100 000 habitants.

Le nombre de décès par TB était de 656 cas.En 2015, 160 patients ont développé une TB-Multirésistante.

Entre 2000 et 2015, l'incidence globale a régressé de 17% et celle de la forme pulmonaire à frottis positif a régressé de 20% (Figure 5).

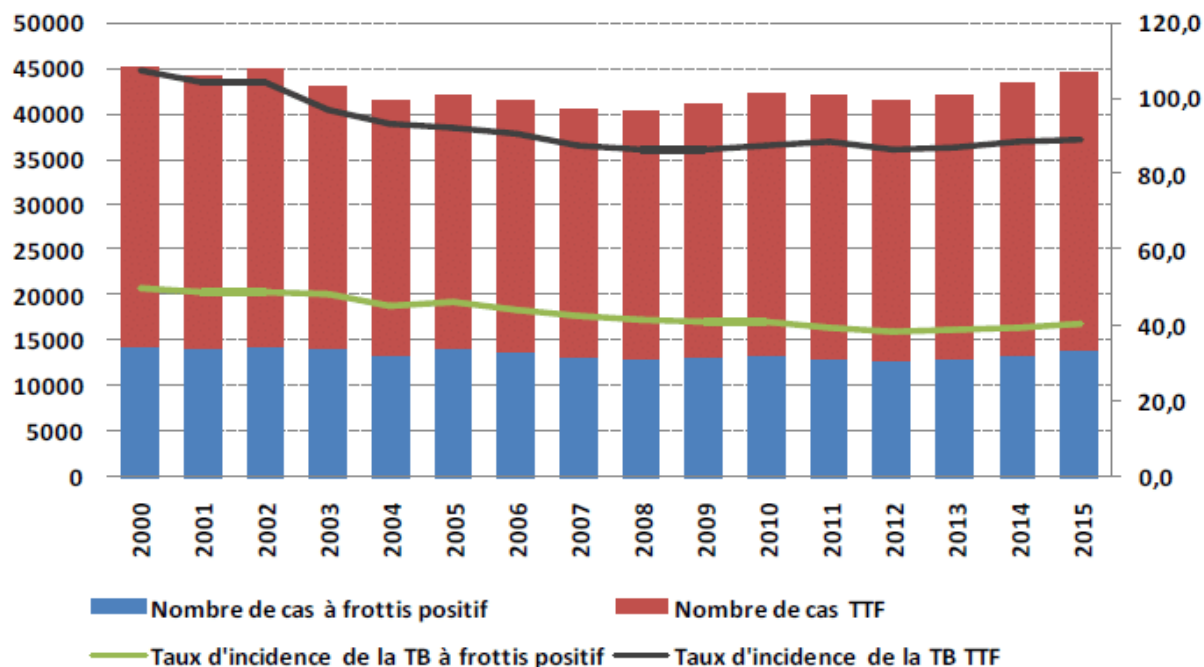


Figure 5 : Evolution du nombre de cas et de l'incidence de TB au Maroc, 2000-2015.

La proportion de la forme extra-pulmonaire (TEP) était la plus élevée en 2015, avec 52% des cas (dont 3% étaient des cas de primo-infection tuberculose), contre 48% des cas de tuberculose pulmonaire.

La distribution géographique révèle que 5 régions ont totalisé, à elles seules, 58 % des cas de tuberculose notifiés, avec une incidence dépassant la moyenne nationale. Ces régions étaient représentées par le Grand Casablanca, Tanger-Tétouan, Rabat-Salé-Zemmour-Zaër, Gharb Chrarda-Beni-Hssen et Fès-Boulemane (Figure 6).

La maladie s'est concentré en milieu urbain et a affecté plus particulièrement les quartiers défavorisés des grandes villes [20].

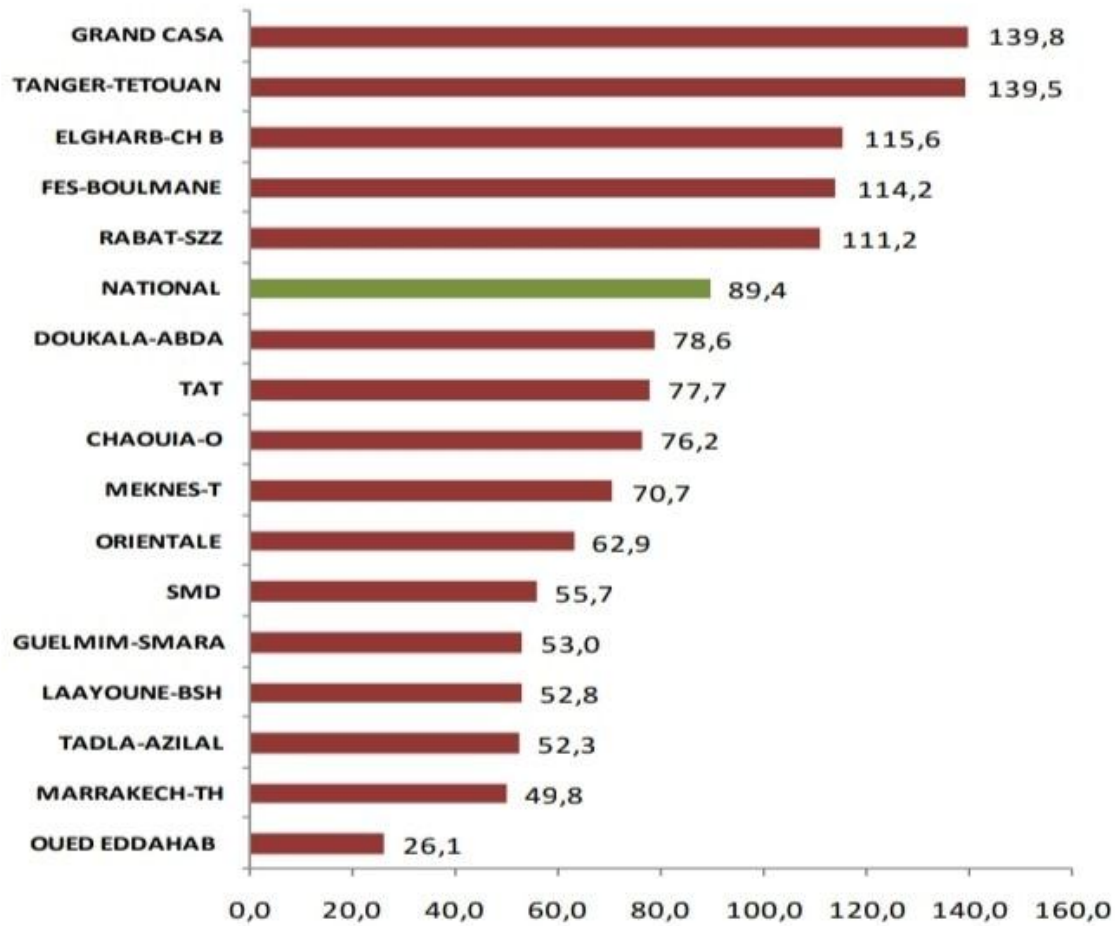


Figure 6 : Incidence de la TB toute forme par région au Maroc, 2015.

V. Diagnostic de la tuberculose

1. Diagnostic de la tuberculose active ou pulmonaire

a. La radiographie du thorax (RX) de face et profil

Chez l'adulte, les images radiologiques de la tuberculose peuvent prendre différents aspects dont certains peuvent être totalement atypiques, surtout lorsqu'il s'agit de personnes immunodéprimées. Il est recommandé, si possible, de comparer les clichés à ceux pris antérieurement.

L'algorithme de diagnostic donne une idée du suivi à assurer en cas de cliché normal ou anormal : Toute anomalie à la radiographie du thorax compatible avec une tuberculose ne

constitue qu'une suspicion de la maladie ; une confirmation par des examens bactériologiques doit toujours être demandée.

Si le protocole radiologique est peu contributif (anomalies non spécifiques) chez un patient à risque de tuberculose et cliniquement suspect, il faut toujours demander des examens bactériologiques.

Si la radiographie est normale chez un patient à risque dont la clinique est fortement suspecte, la stratégie suivante est préconisée :

- ✓ Rechercher des bacilles de Koch (BK).
- ✓ Réaliser un CT scan si la recherche de BK est négative.
- ✓ Si le CT scan est non contributif, assurer un suivi clinique et radiologique après 1 à 2 mois [21].

b. Les examens bactériologiques des expectorations

i. Examen microscopique direct (ED)

La qualité de l'examen bactériologique dépend avant tout de la qualité du prélèvement, qui doit être une expectoration en cas de TB pulmonaire ou un tubage gastrique permettant de récupérer les sécrétions bronchiques ingérés durant le sommeil, voire une aspiration bronchique par endoscopie si les examens non invasifs sont négatifs. En cas de TB extra-pulmonaire, les biopsies doivent être privilégiées et envoyées sans produit fixant pour une mise en culture.

L'examen microscopique met en évidence des bacilles acido-alcoolorésistants (BAAR) après coloration à la fuchsine phéniquée. Cet examen est peu sensible puisqu'il nécessite au moins 10 bacilles/ml pour être positif. Sa sensibilité peut être améliorée en répétant l'examen 2 ou 3 fois en veillant à la bonne qualité du prélèvement, non salivaire, de 5ml au minimum. La coloration à l'auramine augmente également sa sensibilité [21].

ii. Une culture avec identification suivie d'un antibiogramme

La culture permet de faire l'identification de la mycobactérie isolée et de mesurer sa sensibilité aux antituberculeux. Elle est deux fois plus sensible que l'examen microscopique. Elle nécessite des milieux spécifiques, solides, de type LÖWENSTEIN-JENSEN, ou liquides et automatisables de type MGIT, Bact/Alert MP. Sur milieu solide, les colonies sont détectées en 3 à 4 semaines.

Avec les milieux de culture liquides, la détection de la multiplication bactérienne est positive 1 semaine plus tôt en moyenne [21].

iii. Antibiogramme (technique phénotypique)

Les antibiogrammes phénotypiques déterminent si une souche est résistante à un médicament antituberculeux en évaluant sa croissance (ou son activité métabolique) en présence du médicament.

La fiabilité de l'antibiogramme varie d'un médicament à un autre. Pour les antituberculeux du groupe 1, l'antibiogramme est très fiable pour la rifampicine et isoniazide mais moins pour le pyrazinamide et beaucoup moins pour l'éthambutol [21].

2. Diagnostic de la tuberculose latente

✓ Intradermo réaction à la tuberculine

Le test de Mantoux, ou intradermoréaction à la tuberculine, est un examen cutané.

Il explore la réaction d'hypersensibilité retardée induite par les antigènes *mycobactériens* (*M. tuberculosis* complex, BCG et certaines mycobactéries atypiques).

La réalisation technique de l'IDR consiste en l'injection d'un volume exact de 0,1 ml de la solution liquide de tuberculine dans le derme de la face antérieure de l'avant-bras. La validité du test d'interprétation nécessite une technique parfaite. L'injection doit être strictement intradermique et exsanguine. (Figure 7)

Elle fait apparaître immédiatement une papule par soulèvement du derme prenant un aspect de peau d'orange, témoin d'une bonne réalisation de la technique. Une infiltration localisée de la peau provoquée par l'œdème et l'accumulation de lymphocytes sensibilisés apparaît dans les 24 à 72 heures suivant l'injection.

La lecture de l'IDR se fait idéalement à la 72ème heure, bien qu'elle puisse être différée jusqu'au 5ème jour chez les sujets âgés pour lesquels la réaction peut se développer plus lentement.

L'induration se développe autour du point de ponction. Ses limites sont déterminées par la palpation [22].



Figure 7 : Technique d'interprétation d'une intradermoréaction a la tuberculine.

48 à 72 heures après l'injection de tuberculine, la peau est inspectée. La réaction est dite positive si une zone rouge enflée apparaît. En fonction de la taille de l'induration, on peut déterminer si le patient est infecté :

- ✓ Si la zone d'induration est inférieure à 5 mm : l'IDR est considérée comme négatif, le patient n'a pas été en contact avec le bacille ou la vaccination n'est pas efficace dans son cas.
- ✓ Si la zone d'induration est comprise entre 5 et 10 mm : l'IDR est considéré comme positive et reflète une bonne réponse à la vaccination.

- ✓ Si la zone d'induration est supérieure à 10 mm : l'IDR est positive et se révèle en faveur d'une infection récente [22].

VI. Traitement

1. Isolement des patients contagieux

En cas de tuberculose baccifère (tuberculose pulmonaire avec présence de BAAR à l'examen direct), le patient doit être isolé, avec ou sans hospitalisation, durant la phase de contagiosité maximale. Elle persiste 1 à 3 semaines après l'initiation du traitement.

Les critères permettant la levée de l'isolement sont l'amélioration clinique (disparition de la fièvre, diminution de la toux), et/ou la négativation de l'examen direct des expectorations en microscopie [22].

2. Traitement

Le traitement standard fait appel aux antibiotiques dits de première ligne ces antibiotiques sont : l'isoniazide, la rifampicine, la pyrazinamide et l'éthambutol.

La durée de 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. la prise des médicaments est quotidienne par voie orale (de préférence le matin à jeun).

Un traitement incomplet ou mal suivi est souvent responsable de l'apparition de tuberculoses résistantes aux antibiotiques qui sont ensuite transmises dans la communauté [22].



MATERIEL ET
METHODE

1. Lieu et période de l'étude

Notre étude s'est déroulée au sein de laboratoire GHRISSI d'analyse médicale à Fès sur une période de 2 mois d'avril à juin 2021.

2. Recueil de prélèvements de type crachat

Le recueil des crachats se fait tôt le matin « à jeun ». Les chances de retrouver des BAAR dans les crachats sont plus grandes avec trois échantillons qu'avec deux ou un.

La procédure de recueil des échantillons est la suivante :

- ✓ Le premier jour : échantillon n°1 : le malade fournit sous surveillance et sur place, un échantillon lorsqu'il se présente au laboratoire et lui remet un crachoir pour l'échantillon du lendemain.
- ✓ Le deuxième jour : le malade apporte l'échantillon n° 2 au laboratoire et on lui remet un crachoir pour le 3ème échantillon
- ✓ Le troisième jour : échantillon n3.

Tous les prélèvements sont accompagnés d'une fiche de renseignements indiquant l'identité du malade et sont enregistrés dans un registre.

3. Examen microscopique : bacille de koch examen direct (BKED)

a. Préparation du frottis

- ✓ L'étalement se fait sur une lame microscopique neuve à l'aide d'une anse de platine préalablement flambée et refroidie par des mouvements de va- et- vient, permettant de dissocier les éléments.
 - Le crachoir est ouvert délicatement pour éviter la formation d'aérosols puis une particule jaune est sélectionnée à l'aide d'une anse, celle-ci a été étalée sur la partie centrale de la lame avec un mouvement de rotation continu. L'étalement doit être mince et homogène (de telle façon que l'on puisse encore lire un texte à travers l'étalement). La taille recommandée pour un étalement est de 1 cm de large sur 2 cm de

long (soit plus ou moins 100 champs microscopiques de long à l'objectif *100), ensuite refermer le crachoir (qui devra être conservé jusqu'au moment où tous les résultats auront été enregistrés et répondus).

- ✓ Le séchage se fait à l'air libre pendant 30min ou sur une plaque chauffante à température douce.
- ✓ fixation consiste à recouvrir les lames avec de l'alcool sur le support chauffant. L'alcool s'évapore en quelques minutes.

b. Coloration de Ziehl-Neelsen

La coloration de Ziehl-Neelsen est une coloration assez spécifique pour les mycobactéries. Elle repose sur une caractéristique fondamentale des mycobactéries : leur alcool-acido résistance, liée à la présence importante de lipides au niveau de leur paroi.

i. La coloration par la Fuchsine phénique

Placer les lames fixées sur le support de coloration selon leur numéro d'ordre, la face d'étalement vers le haut. Les lames devraient être séparées par un intervalle d'1 cm et ne jamais se toucher l'une l'autre.

Recouvrir les lames l'une après l'autre au moyen de la solution de travail de fuchsine phéniquée de ZIEHL à 0,3 % filtrée. En plaçant une bande de papier absorbant comme un papier filtre ou même du papier journal, on retiendra la solution de coloration et on évitera le dépôt de cristaux de fuchsine sur le frottis.

Chauffer les lames par le dessous au moyen de la flamme d'un bec Bunsen, d'une lampe à alcool ou d'un tampon d'ouate imbibé d'alcool chaque 03 min. (le flambage doit être répété trois fois), jusqu'à émission de vapeur. Il ne faut jamais aller jusqu'à l'ébullition de la solution de colorant. Ne pas laisser le colorant se dessécher.

Laisser les lames recouvertes d'une solution chaude et fumante de fuchsine phéniquée pendant 05 minutes en repassant la flamme si c'est nécessaire.

Rincer les lames délicatement à l'eau pour écarter l'excès de fuchsine phéniqué [23].

ii. Décoloration

Recouvrir les lames d'une solution d'alcool acide et laisser agir pendant 3 minutes, après cela la coloration rouge devrait avoir presque disparu. En cas de nécessité, répéter cette séquence durant deux minutes supplémentaires.

Laver délicatement l'acide sulfurique ou l'alcool-acide et l'excès de colorant à l'eau. Evacuer des lames l'excès d'eau de rinçage [23].

iii. Contre coloration

Recouvrir les lames l'une après l'autre avec la solution de contre-coloration (bleu de méthylène à 0,3 %) et laisser agir pendant 2 minute.

Rincer les lames à l'eau individuellement.

Laisser sécher à l'air libre (pas au soleil ce qui diminuerait l'intensité de la couleur rouge). Ne pas utiliser de papier pour sécher les lames (risque de transfert de bacilles d'une lame à l'autre) [23].

c. Lecture des lames au microscope

L'observation de la lame se fait au microscope optique (à l'huile d'immersion, objectif 100 x, oculaire 10 x).

A fin d'éviter les contaminations entre lames via l'huile d'immersion il est absolument nécessaire de nettoyer l'objectif à immersion entre chaque lame.

d. Interprétation des résultats

L'interprétation des résultats est mentionnée dans le tableau dessous (Tableau 1).

Tableau 1 : Expression des résultats de l'examen microscopique selon le nombre de bacilles observés par champ microscopique au grossissement 1000. Propositions de l'OMS

Nombre de BAAR	Répondre
< 1 / 100 champs	Négatif
1-9 / 100 champs	1 + examen suspect à confirmer
10-99 / 100 champs	2 + examen suspect à confirmer
1-9 / champ	3 + examen suspect à confirmer
10-99 / champ	4 + examen suspect à confirmer
>100 / champ	5 + examen suspect à confirmer

4. Examen macroscopique : bacille de koch culture (BKC)

A. Culture des BK

La culture est le moyen le plus fiable de faire le diagnostic de la tuberculose. La sensibilité de la culture est 2 à 3 fois supérieure à celle de l'examen microscopique. Elle permet aussi de pratiquer un test de sensibilité aux antibiotiques.

Le milieu utilisé est celui de LOWEENSTEIN JENSEN en raison de sa grande sensibilité.

a. Décontamination des prélèvements

La plupart des produits pathologiques, à l'exception de ceux qui viennent des lésions fermées (séreuses, articulations...), sont contaminés par d'autres bactéries. Pour détruire ces bactéries qui peuvent contaminer le milieu de culture, il est nécessaire de décontaminer le prélèvement avec des antiseptiques basiques.

i. La décontamination à la soude 4% (méthode de de Petroff)

Dans un tube à centrifuger conique :

Ajouter au produit pathologique (crachat) un volume égal de solution décontaminant.

Agiter à l'agitateur de Kahn pendant 20 mn.

Les produits pathologiques sont ensuite centrifugés, le liquide surnageant éliminé.

Le culot est ramené à pH neutre par une solution neutralisante (acide faible ou eau distillée).

Centrifuger 15 mn à 3000 g.

Jeter le surnageant et reprendre le culot.

b. Ensemencement

Le culot de centrifugation est ensemencé dans au moins deux tubes contenant un milieu de culture (LOWENSTEIN JENSEN).

c. Mise à l'étuve (incubation)

Les tubesensemencés sont placés dans une étuve à 37 C.M. tuberculosis poussant très lentement, ne donnera des colonies visibles à l'œil nu qu'après 3 à 4 semaines d'incubation.

B. Lecture et expression des résultats

Au bout de 28 jours, on observe à l'œil nu les colonies, à la surface du milieu de LOWENSTEIN JENSEN. En cas d'apparition de colonies on déclare que la culture est positive.

Si la culture est négative il faut refaire une deuxième lecture au 42ème jour d'incubation. Si c'est négatif une 3ème et dernière lecture se fera au 72ème jour d'incubation avant de déclarer la culture négative.

RESULTAT ET
DISCUSSION

Pendant les deux mois de stage, 7 crachats ont été évalués pour la recherche du BK, parmi eux deux sont positifs le résultat est confirmé par l'examen microscopique et par culture :

❖ Caractéristiques microscopique

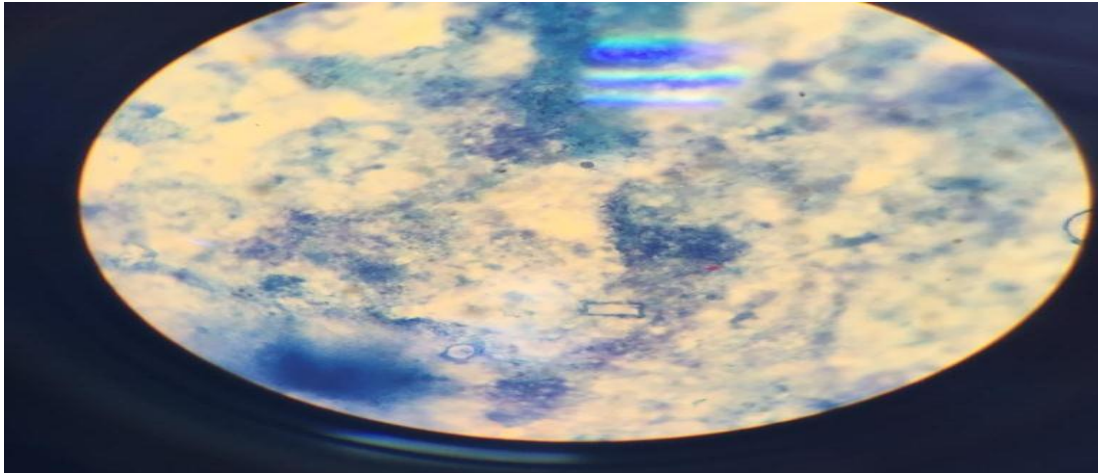


Figure 8 : Examen microscopique à BK positif

L'image (figure 9) montre la présence des bacilles acido-résistants colorés en rouge vif ou en rosé sur un fond contre coloré en bleu. Leur forme est très variable (filaments courts ressemblant à des coques ou filaments allongés). Ils peuvent être colorés de façon uniforme ou inégale et peuvent même paraître granuleux. Ils apparaissent isolément ou en amas de taille variable. Ils se présentent typiquement comme des bâtonnets incurvés, longs et effilés.

❖ Caractéristiques macroscopiques



Figure 9 : Présence colonies de MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS.

Les *Mycobacterie tuberculosis* apparaissent à la surface du milieu de culture de grosses colonies en « choux fleur », arrondies, de couleur crème-beige, à surface sèche et rugueuse (figure 10), bien individualisées ou en nappes selon la richesse du prélèvement en bacilles.

L'analyse des autres crachats n'a pas montré la présence des *Mycobacterium tuberculosis* (figure 11).

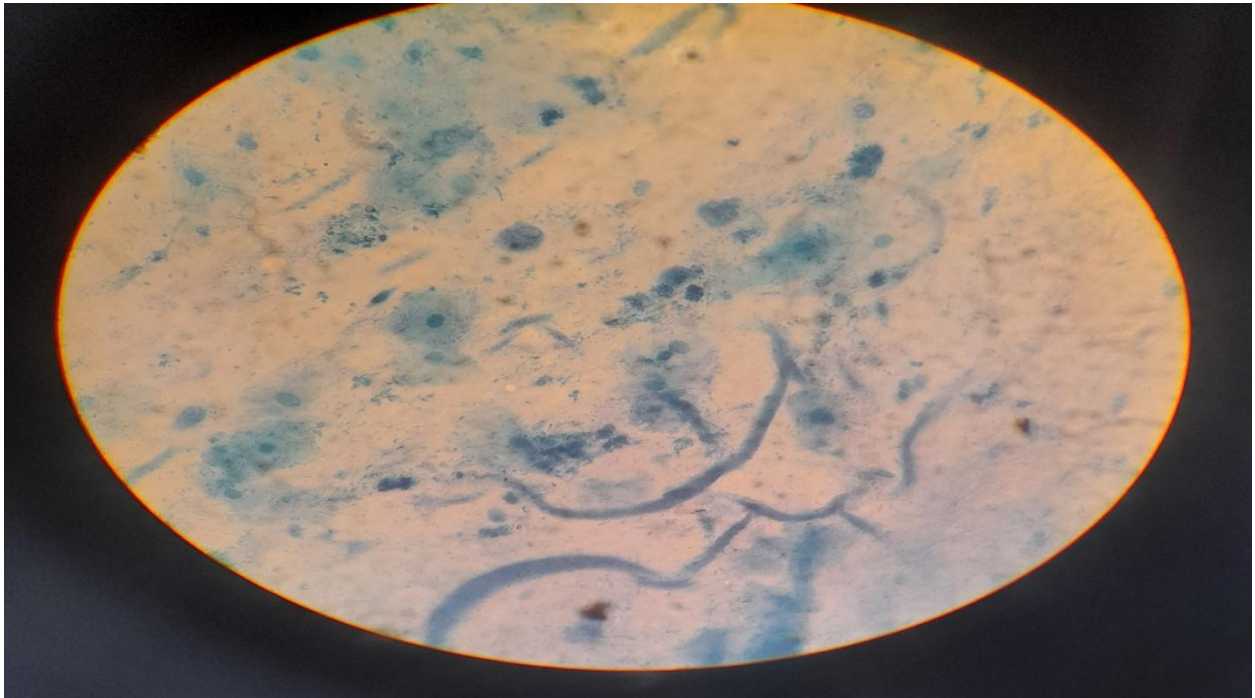


Figure 10 : Examen microscopique à BK négatif

CONCLUSION :

Malgré l'existence d'un programme de lutte antituberculeux, la tuberculose demeure un défi majeur de santé publique. Elle constitue encore un problème sérieux et courant dans les pays en voie de développement, cependant le Maroc a été l'un des pays précurseurs dans la lutte contre cette maladie infectieuse.

Au cours de ce travail nous nous sommes intéressés à faire une étude sur l'évolution de la situation épidémiologique de la TB dans le monde et aussi au Maroc, ainsi de définir les différents étapes de diagnostic de la TB et de montrer la gravité d'un traitement incomplet sur le patient et sur la communauté.

Notre étude fait apparaître que les techniques conventionnelles de l'examen microscopique et de culture demeurent indispensables pour le diagnostic de certitude de la tuberculose maladie, cependant le manque de réalisation de culture et des tests de résistances bactériens constitue les limites de cette étude.

Cependant, une suite de ces travaux est indispensable afin d'avoir une étude complète et généralisée sur cette maladie et leur agent causal *M. tuberculosis*. Il serait important d'augmenter le nombre d'échantillons afin d'établir une situation épidémiologique significative, de procéder à la culture des cas positifs pour mener à l'identification de l'espèce causale et pour mieux déterminer les résistances primaires et secondaires des souches aux antituberculeux.

Références bibliographiques :

1. Maartens G, Wilkinson RJ. Tuberculosis. *Lancet*. 2007; 370:2030–2043.
2. WHO. *Global tuberculosis control*. Geneva: WHO/HTM/TB/2011; 2011.
3. Rieder HL. *Epidemiologic basis of tuberculosis control*. 1st ed. Paris: International Union Against Tuberculosis and Lung Disease; 1999. International union against tuberculosis and lung disease.
4. Casanova JL, Abel L. Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:581–620.
5. Ernst JD. The immunological life cycle of tuberculosis. *Nat Rev Immunol*. 2012;12:581–591.
6. Bloom BR, Small PM. The evolving relation between humans and *Mycobacterium tuberculosis*. *N Engl J Med*. 1998;338:677–678.
7. Alcaïs A, Fieschi C, Abel L, Casanova JL. Tuberculosis in children and adults: two distinct genetic diseases. *J. Exp.Med*. 2005;202:1617–1621.
8. DIARRA, B. (2005). Etude des connaissances, des attitudes et pratiques comportementales de la population de BAMAKO face à la tuberculose-thèse Med. (60), 91.
9. FROTA C, C., HUNT D, M., BUXTON, R., RICKMAN, L., HINDS, J., KREMER, K., . . . COLSTON, M. (2004). Genome structure in the vole bacillus, *Mycobacterium microti*, a member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex with a low virulence for humans Microbiology.
10. Philadelphia Goren M.B., Brennan P.J. *Mycobacterial lipids: chemistry and biologic activities* G.P. Youmans (Ed.), Tuberculosis (1979), pp. 63-193
11. FLANDROIS., J. (1997). *Mycobacterium tuberculosis : Bactériologie médicale collection AZAY*. Presse universitaire de Lyon.

12. Cole, S. T., & Barrell, B. G. (1998, October). Analysis of the genome of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. In *Genetics and Tuberculosis: Novartis Foundation Symposium 217* (pp. 160-177). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.
13. KUBICA, G., GROSS, W., & HAWKINS, J. (1975). Laboratory. Services for Mycobacterial diseases.
14. Enarson D, Rieder H L, Arnadottir T, Trébucq A. Guide de la tuberculose pour les pays à faibles revenus. 4ème édition. Paris : UICMR, 1996. Maher D, Chaulet P, Spinaci S, Harries A. Le traitement de la tuberculose : principes à l'intention des programmes nationaux. (traduit de l'original en anglais WHO/TB/97.220)
15. Farer L.S., Lowell L.M., Meador M.P. Extrapulmonary tuberculosis in the United States
Am J Epidemiol, 109 (1979), pp. 205-217
16. Tuberculose miliaire (Disseminated Tuberculosis) Par Dylan Tierney, MD, MPH , Harvard Medical School; Edward A. Nardell, MD, Harvard Medical School. Dernière révision totale mai 2018 | Dernière modification du contenu juin 2018.
17. British Medical Research Council. Streptomycin treatment of pulmonary tuberculosis. *British Medical Journal* 1948 ; 2 : 769-83.
18. Qu'est-ce que la tuberculose? Quel en est le traitement?", Organisation mondiale de la santé (OMS) (accessible en ligne).
19. OMS. (2019). La lutte contre la tuberculose dans le monde. Bulletin de ville sanitaire, UNAIDS report on the global AIDS Epidemic, cire océan Indien.
20. Ministère de la Santé, Direction de l'Epidémiologie et de Lutte Contre les Maladies Situation Epidémiologique de la Tuberculose au Maroc – Année 2015
21. AMERICAN THORACIC SOCIETY (ATS). (2000). Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. (161), 1376-1395. . *Am.J.Respir.Crit Care Med*
22. Thèse de doctorat en sciences médicales Docteur Nadia Meriem LEKEHAL

Maitre Assistante à la faculté de médecine d'Oran
Diplôme d'études médicales spécialisées en
Pneumo-phtisiologie

23. Prescott's Microbiology, Joanne M. Willey, Linda M. Sherwood, Christopher J. Woolverton,
tenth edition, 2017.