

# LES TUBERCULOSES CHEZ L'ANIMAL ET L'HOMME : ACTUALITES EPIDEMIOLOGIQUE ET DIAGNOSTIQUE

---

THESE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2002  
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

*par*

**Mélanie, Françoise, Sophie DUBOIS**

Née, le 16 novembre 1975 à BOULOGNE-SUR-MER (Pas-de-Calais)

---

Directeur de thèse : **M. le Professeur Dominique-Pierre PICALET**

---

## JURY

PRESIDENT :

**M. Henri DABERNAT**

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :

**M. Dominique-Pierre PICALET**

**Mlle Marie-Christine CADIERGUES**

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

**A Monsieur le Professeur Henri DABERNAT**

Professeur des Universités

Praticien hospitalier

*Bactériologie-Virologie*

*Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury.*

*Hommages respectueux.*

**A Monsieur le Professeur Dominique-Pierre PICALET**

De l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

*Pathologie infectieuse*

*Qui a accepté de diriger notre travail et ne nous a ménagé ni son temps, ni ses conseils.*

*Qu'il trouve ici l'expression de notre gratitude et de notre profond respect.*

**A Mademoiselle le Docteur Marie-Christine CADIERGUES**

Maître de conférences De l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

*Dermatologie*

*Qui nous a fait l'immense plaisir et l'honneur d'accepter de participer à notre jury de thèse.*

*Pour sa gentillesse, sa disponibilité, ses conseils précieux et sa patience,*

*Qu'elle trouve ici l'expression de notre respect et de notre amitié.*

Page 6 : blanche

Page 7 et 8 et 9 : dédicaces personnelles

Page 10 : blanche

Page 11 : dédicace super perso

1<sup>ère</sup> page de plan : 13

**A Monsieur le Professeur Henri DABERNAT**

Professeur des Universités

Praticien hospitalier

*Bactériologie-Virologie*

*Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury.*

*Hommages respectueux.*

**A Monsieur le Professeur Dominique-Pierre PICALET**

De l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

*Pathologie infectieuse*

*Qui a accepté de diriger notre travail et ne nous a ménagé ni son temps, ni ses conseils.*

*Qu'il trouve ici l'expression de notre gratitude et de notre profond respect.*

**A Mademoiselle le Docteur Marie-Christine CADIERGUES**

Maître de conférences De l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

*Dermatologie*

*Qui nous a fait l'immense plaisir et l'honneur d'accepter de participer à notre jury de thèse.*

*Pour sa gentillesse, sa disponibilité, ses conseils précieux et sa patience,*

*Qu'elle trouve ici l'expression de notre respect et de notre amitié.*



**A mes parents,**

Pour leur patience, les sacrifices consentis et leur amour.

*A ma mère,*

Qui a toujours cru en moi. Son soutien et son amour m'ont permis de réaliser un rêve.

*A mon père,*

Ces années d'études nous ont rapprochés malgré la distance qui nous séparait.

**A ma sœur Stéphanie,**

Pour notre connivence, nos longues conversations peu scientifiques et nos fous rires. Sans oublier nos vacances passées ensemble ( !).

**A mon frère Mathieu,**

Qui partage mon amour des sciences médicales.

**A mes grands-parents maternels,**

*A mon grand-père Marcel,*

Pour l'amour de la terre et le gène de la persévérance (voire de l'obstination) qu'il m'a transmis, sa confiance en moi, son soutien et notre complicité.

*A ma grand-mère Odette,*

Pour sa force de caractère, son courage et sa jeunesse d'esprit.

La porte de votre maison est toujours ouverte, j'y ai mes meilleurs souvenirs et Nasca aussi.

**A mes grands-parents paternels,**

*A ma grand-mère ( ), j'espère que tu es fière de moi.*

*A mon grand-père.*

**A mes amis,** Céline, Séverine et François, Elodie et tous les autres...



**A Monsieur le Professeur Michel FRANC,**  
De l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

*En témoignage de notre reconnaissance pour les conseils qu'il nous a prodigués, sa disponibilité, sa confiance et cette année de T1 Pro Dermatologie-Parasitologie.*

**A tous ceux qui m'ont aidée à traverser la tempête...**



**LES TUBERCULOSES CHEZ L'ANIMAL ET**  
**L'HOMME: ACTUALITÉS EPIDEMIOLOGIQUE ET**  
**DIAGNOSTIQUE**

**TABLE DES MATIERES**

INTRODUCTION.....	23
<b>PARTIE I : RAPPELS SUR LA TUBERCULOSE.....</b>	<b>25</b>
<b>Chapitre I : Les agents responsables de la tuberculose.....</b>	<b>25</b>
<b>1. La phylogénie.....</b>	<b>25</b>
<b>2. Caractéristiques des mycobactéries .....</b>	<b>25</b>
2.1 Morphologie générale.....	25
2.2 La paroi.....	25
2.3 Le génome.....	26
<b>3. L'importance de la différenciation des mycobactéries du complexe <i>M. tuberculosis</i>..</b>	<b>26</b>
3.1 Importance de <i>M. bovis</i> .....	26
3.2 Importance de <i>M. bovis BCG</i> .....	27
3.3 Importance de <i>M. tuberculosis</i> .....	27
3.4 Importance de <i>M. africanum</i> .....	27
<b>4. Les classifications .....</b>	<b>27</b>
4.1 Les mycobactéries responsables de la tuberculose des mammifères .....	29
4.2 Les mycobactéries non pathogènes pour l'homme mais cultivables <i>in vitro</i> .....	31

## **Chapitre II : La pathogénie .....33**

### **1. L'étape primaire : la primo-infection .....33**

1.1 Localisation du complexe primaire .....33

1.2 Stabilisation du complexe primaire .....35

1.3 Guérison du complexe primaire .....35

1.4 Généralisation du complexe primaire .....35

### **2. La tuberculose secondaire .....36**

2.1 La forme ouverte .....36

2.2 La forme inapparente .....36

### **3. La période d'incubation .....37**

## **Chapitre III : La symptomatologie .....36**

## **Chapitre IV : Le tableau de la tuberculose en anatomie-pathologique .....39**

### **1. Les différentes lésions .....39**

### **2. L'analyse histologique .....39**

### **3. Les prélèvements de choix .....39**

### **4. La localisation des lésions .....40**

## **Chapitre V : L'épidémiologie**

### **1. L'Office International des Epizooties (OIE) .....40**

1.1 Définition .....40

1.2 L'organisation de l'OIE .....42

1.3 La hiérarchisation des maladies par l'OIE .....42

1.4 Les missions de l'OIE .....42

### **2. Les autres organisations .....44**

2.1 Le recueil des données .....44

2.2 L'analyse des données .....46

2.3 L'interprétation .....46

### **3. L'évaluation des systèmes de surveillance .....46**

<b>4. L'épidémiologie analytique</b> .....	47
4.1 Les tuberculoses .....	47
4.1.1 Les sources de mycobactéries .....	49
4.1.2 Les matières virulentes et les modalités de la contamination .....	49
4.2 Les facteurs de sensibilité et de spécificité .....	50
4.2.1 L'importance de la virulence de la souche .....	50
4.2.2 L'importance de l'hôte .....	50
4.2.2.1 Le sexe .....	51
4.2.2.2 L'âge .....	51
4.2.2.3 Les facteurs génétiques .....	51
4.2.3 Les facteurs sociaux .....	52
4.2.4 La fréquence des contacts et la dose inoculée .....	52
4.2.5 L'environnement .....	52
<b>5. La situation actuelle</b> .....	53
5.1 Les données actuelles sur la tuberculose humaine .....	53
5.1.1 La tuberculose et la mortalité humaine .....	53
5.1.1.1 Estimation de la prévalence de la tuberculose humaine .....	53
5.1.1.2 Les données de l'OMS .....	55
5.1.2 La tuberculose et la morbidité humaine .....	57
5.1.2.1 Les estimations .....	57
5.1.2.2 Les données de l'OMS .....	57
5.2 La répartition géographique de la tuberculose humaine dans le monde .....	57
5.2.1 Dans les pays industrialisés .....	57
5.2.2 En Europe .....	58
5.2.3 Aux Etats-Unis .....	58
5.2.4 En Afrique .....	59
5.2.5 Dans les autres pays .....	59
5.3 Les tendances de l'évolution de la tuberculose humaine .....	60
5.3.1 La pyramide des âges .....	60
5.3.2 L'augmentation de la population .....	60
5.3.3 La tuberculose humaine en France .....	60
5.3.3.1 La morbidité humaine .....	60
5.3.3.2 La mortalité humaine .....	63
5.3.3.3 Les régions les plus touchées .....	63

5.3.3.4 Les populations les plus touchées .....	64
5.3.3.4.1 L'âge .....	64
5.3.3.4.2 Le sexe .....	64
5.3.3.4.3 La nationalité .....	64
5.3.3.4.4 La catégorie socioprofessionnelle .....	64
5.4 L'interprétation de l'augmentation de cette incidence .....	64
<b>6. L'épidémiologie de la tuberculose associée au Sida .....</b>	<b>65</b>
6.1 L'effet direct du VIH .....	65
6.2 L'effet indirect du VIH .....	66
6.2.1 Définition du ARTI .....	66
6.2.2 L'évolution du ARTI .....	67
6.2.3 Le ARTI et le VIH .....	67
6.3 Les données épidémiologiques .....	68
6.4 Les interactions entre la tuberculose et le VIH .....	68
<b>7. La tuberculose bovine .....</b>	<b>68</b>
<b>8. La tuberculose zoonotique .....</b>	<b>72</b>
8.1 Les facteurs de risque .....	73
8.1.1 Les populations animales .....	73
8.1.2 Les populations humaines .....	73
8.1.3 Les habitudes d'hygiène alimentaire .....	74
8.1.4 Le VIH et la tuberculose zoonotique .....	74
8.2 Les particularités de l'infection à <i>M. bovis</i> .....	74
8.3 L'épidémiologie de la tuberculose zoonotique .....	74

## **PARTIE II: LE DIAGNOSTIC DE LA TUBERCULOSE**

### **Chapitre I : Diagnostic clinique et allergique de la tuberculose.....77**

<b>1. L'anamnèse et l'examen clinique .....</b>	<b>77</b>
<b>2. L'intradermoréaction .....</b>	<b>77</b>
2.1 Les objectifs .....	77
2.2 Historique de la tuberculination .....	78
2.3 La réalisation .....	78
2.3.1 Les qualités de la tuberculine utilisée .....	78
2.3.2 Les différentes tuberculines utilisées en médecine humaine .....	78
2.3.2.1 La tuberculine historique ou la tuberculine brute de Copenhague .....	78
2.3.2.2 Les tuberculines purifiées .....	78
2.3.2.3 La tuberculine PPD-S .....	79
2.3.2.4 La tuberculine PPD-RT23 de Copenhague .....	79
2.3.2.5 La tuberculine PPD de Mérieux .....	79
2.3.2.6 La tuberculine Pasteur IP48 .....	79
2.3.3 Les présentations de tuberculine en France .....	79
2.3.3.1 L'intradermo-réaction : le test de Mantoux .....	80
2.3.3.2 Le timbre tuberculinique ou Percuti Réaction .....	80
2.3.3.2.1 Le Néotest Mérieux .....	80
2.3.3.2.2 Le test par multipuncture : le monotest Mérieux .....	80
2.3.4 Comparaison des différentes présentations disponibles en France .....	80
2.4 Les indications de la tuberculination chez l'homme .....	81
2.4.1 Le contrôle de l'allergie pré-vaccinale .....	81
2.4.2 Le contrôle post-vaccinal .....	81
2.5 Le diagnostic avec les IDR .....	81
2.5.1 Cas d'un individu non vacciné .....	82
2.5.2 Cas d'un individu vacciné .....	82
2.6 Les IDR chez les animaux : les IDS et les IDC .....	82

## Chapitre II : Les méthodes de différenciation

<b>1. Les méthodes classiques .....</b>	<b>85</b>
1.1 Les caractéristiques morphologiques .....	85
1.1.1 La morphologie .....	85
1.1.1.1 <i>M. tuberculosis</i> .....	85
1.1.1.2 <i>M. bovis</i> .....	85
1.1.1.3 <i>M. bovis</i> BCG .....	85
1.1.1.4 <i>M. africanum</i> .....	85
1.1.2 La coloration .....	86
1.1.2.1 La coloration de Ziehl-Neelsen .....	86
1.1.2.2 La coloration à l'auramine phéniquée .....	87
1.2 La culture des mycobactéries .....	87
1.2.1 Les caractéristiques des milieux de culture .....	87
1.2.1.1 Le milieu de Lowenstein-Jensen .....	87
1.2.1.2 Les milieux gélosés .....	87
1.2.1.3 Les milieux liquides .....	88
1.2.1.4 Le milieu de Sauton .....	88
1.2.1.5 Le milieu de Youmans .....	88
1.2.1.6 Le milieu BACTEC .....	89
1.2.1.7 Les milieux de culture commerciaux .....	91
1.2.2 Les particularités de culture de <i>M. tuberculosis</i> .....	91
1.2.2.1 L'oxygénation .....	91
1.2.2.2. La température .....	92
1.2.2.3 Le pH .....	92
1.2.3 Les particularités de culture de <i>M. bovis</i> .....	92
1.3 Identification des mycobactéries par les caractères biochimiques .....	92
1.3.1 La respirométrie radiométrique .....	92
1.3.2 Etude de l'association BACTEC-inhibiteurs .....	93
1.3.3 Délais de culture .....	93
1.4 La chromatographie .....	93
1.5 Les inoculations .....	94

<b>2. Les méthodes sérologiques .....</b>	<b>96</b>
2.1 L'immunité contre la tuberculose .....	96
2.2 Les tests envisageables .....	98
2.2.1 Le test utilisant les anticorps anti P-90 et A-60 .....	98
2.2.2 Le test de recherche des anticorps anti ESAT-6 et CFP-10 .....	100
2.2.2.1 Définition des anticorps .....	100
2.2.2.2 Principe du test .....	100
2.2.2.3 Les sensibilité et spécificité des tests .....	100
2.3 Avantages et inconvénients des sérologies .....	101
<b>3. Les méthodes de biologie moléculaire .....</b>	<b>101</b>
3.1 Le génome des mycobactéries du complexe <i>M. tuberculosis</i> .....	102
3.2 Les enzymes de restriction .....	103
3.3 Enzymes de restriction et électrophorèse en champ pulsé .....	105
3.4 Les techniques utilisant une partie du génome .....	105
3.4.1 Les répétitions de séquences spécifiques répétées non en tandem .....	106
3.4.1.1 L'élément d'insertion IS 6110 .....	106
3.4.1.2 Utilisation de IS 6110 .....	106
3.4.1.3 L'élément d'insertion IS 1081 .....	107
3.4.2 La région directe répétée : spoligotyping .....	107
3.4.3 Séquences répétées riches en guanine et cytosine et polymorphisme de..... restriction .....	110
3.5 Les techniques utilisant la totalité du génome .....	110
3.5.1 Loci de répétitions en tandem à grand polymorphisme : les minisatellites..... disséminés (ou VNTR) .....	110
3.5.2 Les microsatellites .....	112
3.5.3 Autre technique utilisée .....	112
3.6 Choix de la technique .....	113
3.6.1 Techniques standardisées pour typer les mycobactéries .....	113
3.6.2 Techniques de typage de <i>M. bovis</i> .....	113
3.7 Les trousse de détection des séquences nucléiques .....	116
3.8 Les difficultés de typage des mycobactéries .....	117

## **PARTIE III : LES APPORTS DE LA BIOLOGIE MOLECULAIRE**

### **Chapitre I : L'élucidation d'étapes clés du cycle infectieux.....118**

1. Les gènes et les sources d'énergie des bacilles .....118
2. Détermination des protéines d'adhésion .....118

### **Chapitre II : L'épidémiologie moléculaire.....119**

1. Identification ou confirmation d'une chaîne de transmission .....119
2. La lutte contre l'infection .....120
3. Biologie moléculaire et nouveaux traitements .....122

### **Chapitre III : Les gènes et la résistance aux antibiotiques.....122**

1. Définition de la résistance .....122
2. La multirésistance .....122
3. Etiologie de la résistance .....123
  - 3.1 Les gènes responsables .....123
  - 3.2 Génétique et sensibilité à la tuberculose .....124
4. Importance de la résistance .....124

### **Chapitre IV : Les limites de la biologie moléculaire.....126**

### **Chapitre V : La découverte de vaccins plus performants.....126**

1. L'immunopathologie de la tuberculose .....127
2. Le vaccin actuel : le BCG .....127
  - 2.1 Son historique .....127
  - 2.2 Ses caractéristiques .....128
  - 2.3 Son efficacité .....128

<b>3. Les vaccins “candidats”</b> .....	129
3.1 Les qualités requises pour un vaccin humain .....	129
3.2 Les qualités requises pour un vaccin animal .....	129
3.3 Les vaccins auxotrophes .....	130
3.4 Les vaccins recombinants .....	131
3.5 Les vaccins à ADN .....	132
3.6 Les vaccins sous unités .....	132
<b>4. Les modèles animaux</b> .....	133

<b>CONCLUSION</b> .....	135
-------------------------	-----

<b>Bibliographie</b> .....	137
----------------------------	-----

## **ANNEXES**

<b>Annexe 1</b> : Taux de notification des cas de tuberculose humaine, par région en France du 31 janvier 2001 au 1er février 2002	143
<b>Annexe 2</b> : Taux de notification des cas de tuberculose humaine par département en 1999.	144
<b>Annexe 3</b> : Taux de prévalence de la tuberculose bovine en France en 1999.	145
<b>Annexe 4</b> : Tests in vitro de différenciation des principales mycobactéries.	146
<b>Annexe 5</b> : Estimation de la prévalence de la tuberculose humaine dans le monde entre 1990 et 1999.	147
<b>Annexe 6</b> : Estimation de la mortalité humaine due à la tuberculose dans le monde entre 1990 et 1999.	148
<b>Annexe 7</b> : Liste des abréviations.	149

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

<b>Tableau 1:</b> classification de Runyon	30
<b>Tableau 2:</b> localisation du complexe primaire	34
<b>Tableau 3:</b> recensement des états membres de l'OIE en mai 2001	41
<b>Tableau 4:</b> cas déclarés d'animaux sauvages contaminés par la tuberculose	48
<b>Tableau 5:</b> tuberculose et mortalité humaine	54
<b>Tableau 6:</b> incidence de la tuberculose humaine dans le monde en 1990	56
<b>Tableau 7:</b> morbidité tuberculeuse en France	61
<b>Tableau 8:</b> tuberculose et mortalité humaine	62
<b>Tableau 9:</b> répartition des cas de tuberculose humaine en France	69
<b>Tableau 10:</b> évolution de l'incidence et de la prévalence annuelles de la tuberculose bovine en France	71
<b>Tableau 11:</b> évolution de l'incidence et de la prévalence annuelles de la tuberculose bovine ainsi que des taux de prévalence et d'incidence	90
<b>Tableau 12:</b> nombre de copies d'IS 6110 chez différentes mycobactéries	108
<b>Tableau 13:</b> nombre d'espaceurs selon les mycobactéries	109
<b>Tableau 14:</b> points positifs et négatifs des différentes techniques pour typer <i>M. bovis</i>	111
<b>Figure 1:</b> La classification médicale des mycobactéries	29
<b>Figure 2:</b> Schéma de la pathogénie	32
<b>Figure 3:</b> Photo de <i>M. bovis</i> après coloration de Ziehl-Neelsen	86
<b>Figure 4:</b> Réponse à médiation humorale lors de la tuberculose	95
<b>Figure 5:</b> Réponse à médiation cellulaire lors de la tuberculose	97
<b>Figure 6:</b> Mécanisme de la cytolyse	98
<b>Figure 7:</b> Protocole d'utilisation des enzymes de restriction	104
<b>Figure 8:</b> Localisation sur la carte génomique de <i>M. tuberculosis H37Rv</i> de séquences d'insertion	108
<b>Figure 9:</b> Localisation sur la carte génomique de <i>M. tuberculosis H37Rv</i> des PGRs	109
<b>Figure 10:</b> Localisation sur la carte génomique de <i>M. tuberculosis H37Rv</i> des séquences répétées	111

## **Introduction**

La tuberculose est une maladie infectieuse, contagieuse, virulente et inoculable dont les agents étiologiques sont des mycobactéries. C'est Robert Koch qui a décrit en 1882 le bacille tuberculeux. Cette infection est commune à l'homme, à toutes les espèces d'animaux domestiques et à certaines espèces sauvages. C'est également une zoonose.

Connue depuis la préhistoire, la tuberculose s'est largement répandue dans le monde. La première description précise connue de la maladie est celle des livres hippocratiques. La tuberculose est alors appelée « Phtisis ». En revanche, la première description scientifique de la tuberculose chez le bœuf date de 1649 (Kepler) et de 1702 (Florini). On parle alors de la « maladie des français ». La tuberculose a pourtant longtemps été jugée exceptionnelle chez les animaux.

Cependant, la tuberculose n'est toujours pas éradiquée. Au contraire, elle est de nos jours cosmopolite (les pays industrialisés ne sont pas épargnés) et connaît une recrudescence engendrée par la pression démographique, la pauvreté et par le SIDA. Huit à dix millions de personnes sont atteintes de tuberculose dans le monde chaque année. Les populations animales touchées sont nombreuses.

L'objectif de ce travail est, après quelques rappels sur la tuberculose, de réaliser une synthèse des connaissances épidémiologiques actuelles tant sur la tuberculose animale que sur la tuberculose humaine. Une seconde partie recense les méthodes de diagnostic de la maladie. Enfin, il nous est apparu essentiel d'exposer les apports de la biologie moléculaire et les perspectives qu'elle offre.



# PARTIE I : RAPPELS SUR LA TUBERCULOSE

## Chapitre I : Les agents responsables de la tuberculose

### 1. La phylogénie

Les agents de la tuberculose appartiennent à la classe des Corynebacterinae, à l'ordre des Actinomycétales et à la famille des Mycobacteriaceae. L'unique genre de cette famille est *Mycobacterium*. Ce genre comprend 85 espèces connues. Seules 30 de ces espèces sont aujourd'hui associées à des maladies humaines et 3 sont divisées en sous-espèces.

### 2. Caractéristiques des mycobactéries

#### 2.1 Morphologie générale

Les mycobactéries appartiennent à l'ordre des Actinomycétales; ce sont des pseudomycéliums rudimentaires. Elles se présentent habituellement sous la forme de petits bacilles immobiles non sporulés avec parfois des éléments renflés cunéiformes ou ramifiés.

#### 2.2 La paroi (34)

La paroi des mycobactéries est constituée de 3 couches, successivement de l'intérieur vers l'extérieur, du squelette pariétal, de la couche intermédiaire et de la matrice de phospholipides. La paroi est très riche en lipides (60% des constituants) d'un poids moléculaire élevé (entre 60 et 90 atomes de carbone). Ce sont pour la plupart des acides mycoliques. Ces derniers constituent une barrière hydrophobe, empêchent l'action décolorante des acides et des alcools. Ils sont également responsables de la résistance des mycobactéries à certains agents chimiques. Certaines espèces du genre *Mycobacterium* synthétisent des acides mycoliques porteurs de fonctions oxygénées supplémentaires (méthoxyl, cétone, époxyde, carboxylique).

- *Le squelette pariétal* est formé de peptidoglycanes sur lesquels sont fixés des polymères d'arabino-galactane (= un arabinose et un galactose), eux-mêmes reliés par une liaison ester à la couche d'acides mycoliques.

- *La couche intermédiaire* est composée de ces acides mycoliques.

- *La couche externe* est une couche de phospholipides dans laquelle sont intercalées des molécules amphiphiles et des protéines (porines et mycosines). Chez certaines souches, la couche externe est très épaisse et forme une pseudocapsule.

La paroi est traversée par des molécules de lipo-arabinomananne qui joueraient un rôle antigénique, notamment le lipo-polysaccharide des cires D. La paroi est responsable de la couleur rouge obtenue après coloration par la méthode dite de Ziehl-Neelsen. Ce sont des bacilles acido-alcoolrésistants.

### 2.3 Le génome

Le génome des agents de la tuberculose (ADN et ARN) présente des caractères communs à toutes les espèces du complexe *M. tuberculosis*. Ces caractères seront développés ultérieurement.

## **3. L'importance de la différenciation des mycobactéries du complexe *M. tuberculosis***

En 1990, sur 674 cas de tuberculose humaine diagnostiqués à l'Institut Pasteur, 654 étaient dûs à *M. tuberculosis*, 12 à *M. bovis* et 8 à *M. africanum*. La différenciation est fondamentale pour l'épidémiologie, le traitement et la prévention de la maladie. Elle se fait entre autre par examen direct au microscope après coloration de Ziehl Neelsen. Cette coloration sera développée au chapitre III, 1.1.2.1.

### 3.1 Importance de *M. bovis*

Les infections humaines à *M. bovis* ne sont pas fréquentes dans les pays industrialisés mais les études épidémiologiques montrent qu'elles ne sont pas éradiquées. *M. bovis* est encore responsable dans ces pays de la tuberculose dans des groupes d'immigrants et chez les personnes âgées. Ainsi, malgré la disparition plus ou moins complète de la tuberculose bovine dans de nombreux pays d'Europe, l'aspect zoonotique de la maladie est toujours considéré comme une priorité dans l'Union Européenne.

### 3.2 Importance de *M. bovis* BCG

*M. bovis* B.C.G. est utilisé dans des vaccins et comme agent thérapeutique. Lamm et al (1992) ont montré que l'instillation intra-vésicale de *M. bovis* B.C.G. comme traitement de tumeurs superficielles et de carcinomes est plus efficace que la plupart des agents thérapeutiques.

### 3.3 Importance de *M. tuberculosis*

*M. tuberculosis* est responsable de la tuberculose humaine à travers le monde. Les hôtes possibles sont les hommes, les canidés, les canaris et les psittacidés.

### 3.4 Importance de *M. africanum*

*M. africanum* est un parasite strict de l'homme. Il est responsable de pathologies en Afrique Occidentale et Centrale.

Ces différents points montrent l'importance des différentes mycobactéries appartenant au complexe de *M. tuberculosis* et donc l'intérêt de différencier *M. bovis* B.C.G., *M. tuberculosis*, *M. bovis* et *M. africanum*. Les différenciations symptomatique et histopathologique des tuberculoses à *M. bovis* et à *M. tuberculosis* sont impossibles, la différenciation ne peut être faite qu'au laboratoire.

## 4. Les classification (15)

On distingue deux types de classifications des mycobactéries :

- L'une différencie les bactéries parasites stricts de l'homme et des animaux (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. leprae*, *M. lepraemurinum*, *M. paratuberculosis* et *M. microti*) des bactéries plus nombreuses saprophytes ou commensales telle que *M. avium intracellulare*.

- L'autre est médicale et distingue trois grandes catégories de mycobactéries (*fig.1*):

- celles responsables de la tuberculose des mammifères
  - celles non responsables de la tuberculose elles-mêmes divisées en

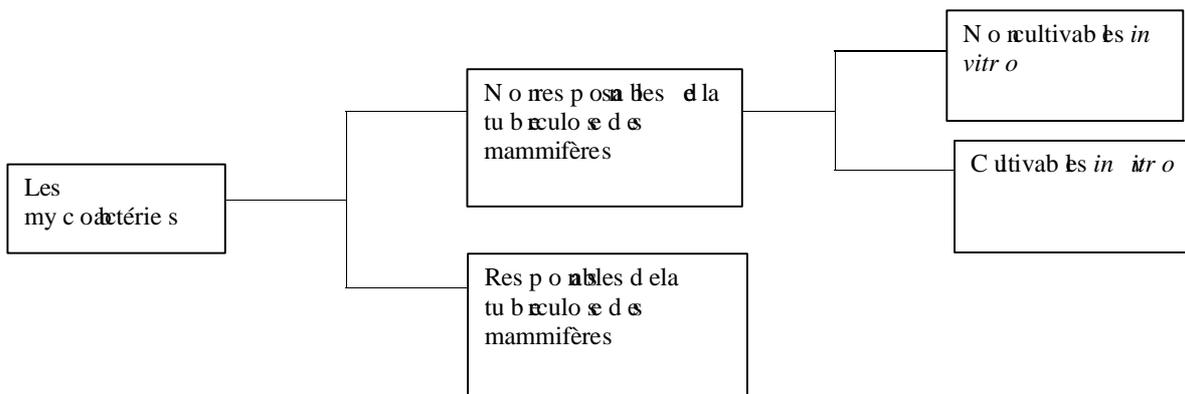
deux groupes :

\*les cultivables in vitro (les mycobactéries atypiques)

\*les non cultivables in vitro comme *M. leprae* (Hansen 1879) ou

bacille de Hansen.

Figure 1 la classification clinique des mycobactéries.



#### 4.1 Les mycobactéries responsables de la tuberculose des mammifères.

Jusqu'en 1997, elles étaient au nombre de quatre :

*M. tuberculosis* (Zopf, Lehman et Neuman, 1896) également appelé bacille de Koch ou bacille tuberculeux humain, est l'espèce-type ; *M. bovis* (Karlson et Lessol, 1970) le bacille tuberculeux bovin. *M. bovis* BCG (Calmette et Guérin, 1921) correspond à la variété *avium* utilisée pour le vaccin BCG. *M. africanum* (Castets, Rist et Boisvert, 1969) est le bacille tuberculeux africain et *M. microti* (Wells, 1937) le bacille du campagnol, non pathogène chez l'homme.

En 1981, Runyon introduit la notion de “ complexe *M. tuberculosis* ” qui regroupe *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti* et *M. africanum*. Ces 4 espèces constituent en fait une unique espèce. J.P Euzéby sur son site internet (15) écrit que « ces taxons devraient donc être considérés comme des sous-espèces (ou des biovars) d'une unique espèce de *M. tuberculosis*... ». De nombreux auteurs partagent cet avis et considèrent ces mycobactéries comme étant une seule espèce à variantes humaine et bovine. Deux autres taxons ont été identifiés depuis. De ce fait, le complexe comprend en plus depuis 1999 *M. tuberculosis subsp caprae* (isolé et identifié en Espagne sur des chèvres) et *M. tuberculosis subsp. canetti*.

L'étude taxonomique et des acides nucléiques des différentes mycobactéries du complexe montre peu de différences. La différenciation des mycobactéries est donc difficile.

#### 4.2 Les mycobactéries non pathogènes pour l'homme mais cultivables *in vitro*.

Ce groupe rassemble les “ mycobactéries atypiques ” ou “ mycobactéries non tuberculeuses ” ou “ Mycobacteria Others Than Tuberculosis (MOTT) ”, donc les bacilles tuberculeux aviaires et les anciens bacilles paratuberculeux.

Tableau 1 : classification de Runyon.

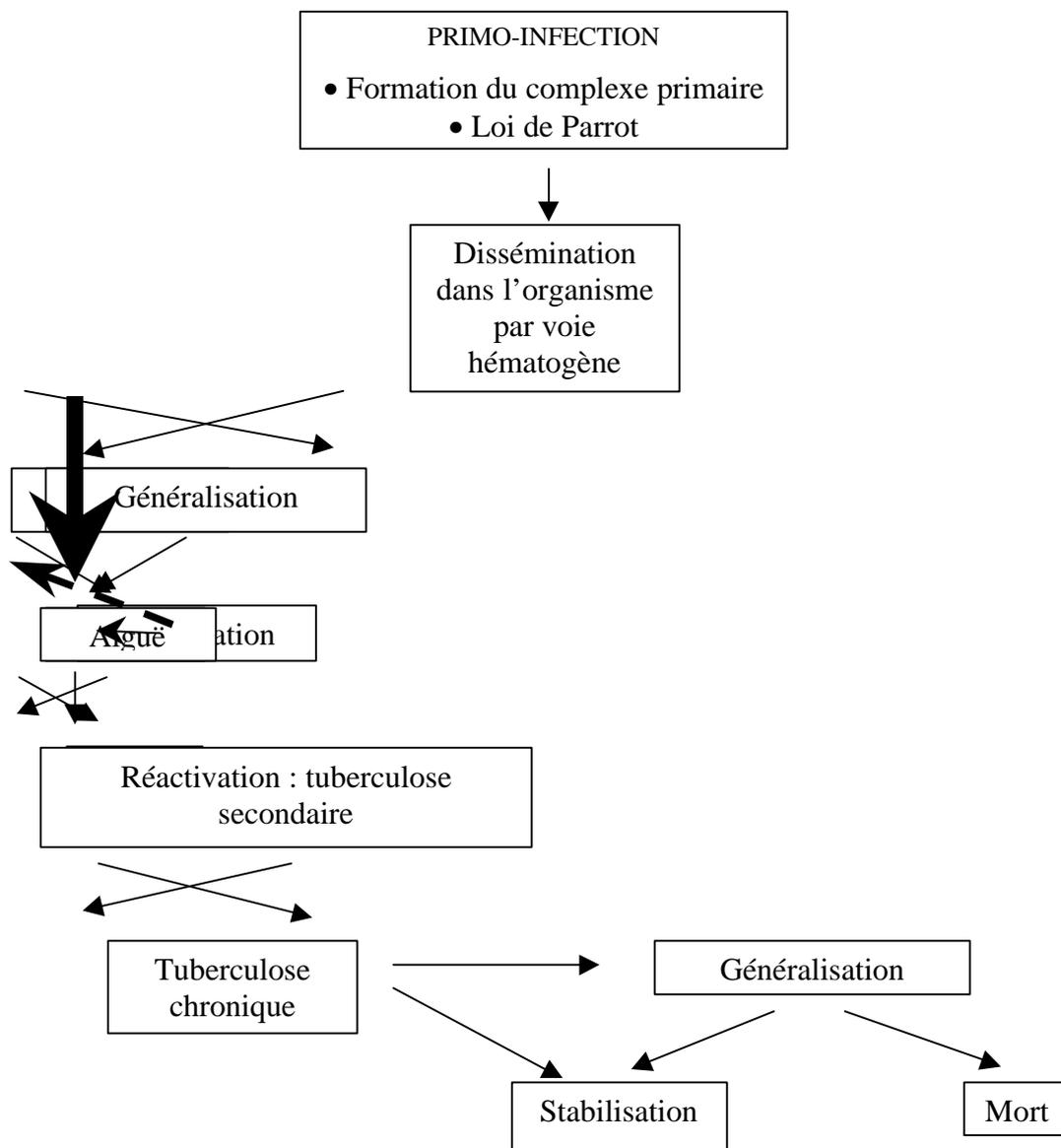
	<b>Pigmentation des colonies</b>	<b>Caractères des colonies</b>	<b>Exemples de mycobactéries</b>
<b>Groupe I</b>	Mycobactéries photochromogènes	Colonies non pigmentées à l'obscurité, elles se pigmentent en jaune après exposition à la lumière. Leur caroténogénèse est photo-inductible.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>M. kansasii</i> (bétail, cerfs, porcs)</li> <li>• <i>M. simiae</i> (humains et singes)</li> <li>• <i>M. marinum</i> (poissons marins, mammifères aquatiques et amphibiens)</li> <li>• <i>M. vaccae</i> (saprophytes)</li> </ul>
<b>Groupe II</b>	Mycobactéries scotochromogènes	Colonies à croissance lente, non pigmentées à l'obscurité, se pigmentant parfois à la lumière ou avec l'âge en jaune ou en rose	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>M. scrofulaceum</i> (porcs sauvages et domestiques, bétail...)</li> </ul>
<b>Groupe III</b>	Mycobactéries non chromogènes : Elles regroupent trois complexes : -complexe aviaire -complexe terrae -autres espèces	Les colonies sont à croissance lente, pigmentées en jaune-orangé à l'obscurité, plus intensément à la lumière (caroténogénèse constitutive)	<p>Complexe aviaire :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>M. avium</i> (poules, oiseaux sauvages, porcs, chevaux...)</li> <li>• <i>M. intracellulare</i> (oiseaux sauvages, poules, primates non humains)</li> <li>• <i>M. ulcerans</i> (chat)</li> <li>• <i>M. xenopus</i> (chat)</li> </ul>
<b>Groupe IV</b>	Mycobactéries à croissance rapide : les colonies apparaissent en moins d'une semaine.	La pigmentation varie suivant les espèces	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>M. fortuitum</i> est pigmentée</li> <li>• <i>M. phlei</i> est pigmentée (chat)</li> <li>• <i>M. smegmatis</i> (chat et bétail) est pigmentée</li> <li>• <i>M. chelonae</i> (poissons, tortue, chat et porcs) est non pigmentée.</li> </ul>

La classification de E. Runyon (1959) divise les mycobactéries atypiques en quatre groupes (*tabl. 1*) :

- le groupe I des mycobactéries photochromogènes ;
- le groupe II des mycobactéries scotochromogènes ;
- le groupe III des mycobactéries non chromogènes ;
- le groupe IV des mycobactéries à croissance rapide.

Certaines mycobactéries sont considérées comme des bactéries opportunistes pouvant occasionnellement provoquer des affections humaines appelées mycobactérioses pulmonaire, ganglionnaire...

Fig 2 : Schéma de la pathogénie



## Chapitre II : La pathogénie (fig.2)

La pénétration dans l'organisme des bacilles aboutit à la phagocytose d'une partie de ces derniers. La partie phagocytée non détruite se multiplie dans les phagocytes. Cette multiplication conduit à la formation d'une lésion initiale ou **chancre d'inoculation** en 8 à 15 jours. Le drainage lymphatique de mycobactéries est à l'origine de lésions dans les nœuds lymphatiques locorégionaux selon la « **loi d'adénopathie satellite de Parrot** ». Le chancre d'inoculation et l'adénopathie satellite forment le complexe primaire. Lorsqu'il manque l'un des deux éléments (l'adénite ou le chancre), le **complexe** est dit **incomplet ou dissocié**.

### 1. L'étape primaire : la primo-infection

#### 1.1 Localisation du complexe primaire

Les localisations du complexe primaire peuvent être très différentes (*tabl.2*). Les organes les plus souvent atteints sont les poumons, le tube digestif, le foie, les organes génitaux, la mamelle et l'œil (la conjonctive). Entre 1988 et 1995, dans le département du Tarn et Garonne, les formes digestives représentaient 3,8% des cas de tuberculose (22). Lors d'une co-infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et par le bacille de la tuberculose, une modification de la physionomie de la maladie est observée. Le complexe primaire a alors une localisation essentiellement digestive ou multiviscérale. L'atteinte digestive stricte est cependant rare.

En 1996, sur 327 patients dont 32 enfants du centre antituberculeux de Bouaké, 61,1% des tuberculeux séropositifs pour le VIH présentaient une tuberculose pulmonaire et 22,6% une forme extra-pulmonaire. 64,3% des patients séronégatifs avaient une forme pulmonaire et 20,6% une tuberculose extra-pulmonaire (20). La part de la forme extra-pulmonaire est plus grande chez les séropositifs.

La formation du complexe primaire est suivie d'une dissémination dans l'organisme par voie lymphogène. Il n'y a pas ou peu de germes dans le sang, donc pas de septicémie. La dissémination peut aboutir à trois phénomènes :

Tableau 2 : localisation du complexe primaire (19)

	<b>veaux</b>	<b>Autres bovins</b>	<b>chèvres</b>	<b>moutons</b>	<b>chevaux</b>	<b>porcs</b>	<b>chiens</b>	<b>chats</b>
<b>Pou- mons</b>	38%	90-95%	100%	100%	+	+	-	50%
<b>Organes digestifs</b>	13%	5-10%	+	+	100%	100%	100%	50%
<b>Foie</b>	49%	-	-	-	-	-	-	-
<b>Géni- taux</b>	-	+	-	-	-	+	-	+
<b>Mamelle</b>	-	+	-	-	-	-	-	-
<b>Œil (conjonc- -tive)</b>	-	-	-	-	-	-	-	+

*Légende :*

+ : Localisation parfois observée.  
 - : Localisation jamais observée.

**- La guérison :**

La réaction immunitaire, de bonnes défenses spécifiques et non spécifiques conduisent à une élimination des mycobactéries.

**- La stabilisation :**

Elle résulte d'un équilibre entre les mycobactéries et les défenses de l'organisme.

**- La généralisation précoce :**

Elle peut être ralentie ou aigüe. La mort ou la stabilisation sont les deux suites possibles.

### 1.2 Stabilisation du complexe primaire

La réaction immunitaire de type cellulaire provoque des lésions de nécrose de caséification. L'anoxie provoquée par cette nécrose caséuse aboutit à un arrêt de la multiplication des bacilles. Le nombre de bacilles dans la lésion diminue, mais ceux qui survivent restent virulents. Les lésions se rétractent, se calcifient ou s'enkystent.

Chez l'homme et les bovins, la stabilisation du complexe primaire est relativement fréquente mais elle est rare chez les carnivores.

Une réactivation de type allergique est possible à tout moment. On parle de **tuberculose secondaire**. La conséquence est une tuberculose chronique d'organe ou une généralisation tardive.

### 1.3 Guérison du complexe primaire

Elle correspond à une cicatrisation des lésions après une résorption du caséum. Les bacilles sont détruits. Sur le plan immunitaire, l'hypersensibilité disparaît quelques mois plus tard. Cette guérison du complexe primaire est fréquente chez les bovins lors d'une infection par *M. avium* ou *M. tuberculosis*.

### 1.4 Généralisation du complexe primaire

La généralisation correspond au passage de l'infection à la maladie. Cette généralisation n'est pas systématique. Lorsqu'elle se produit, elle correspond à une multiplication des bacilles et à leur dissémination dans l'organisme par voie sanguine ou lymphatique. Il y a alors formation de lésions dans tous les organes atteints. Il existe deux types de généralisation; aiguë précoce et précoce ralentie.

- Dans la ***généralisation aiguë précoce***, la dissémination est intense et simultanée dans l'ensemble des organes. Les lésions qui se forment sont toutes au même stade évolutif.

- Dans la ***généralisation précoce ralentie***, la dissémination se fait par vagues successives. Les lésions sont à des stades évolutifs différents.

La généralisation précoce ralentie est la forme la plus fréquente chez les carnivores, le cheval, le porc et la poule.

## **2. La tuberculose secondaire**

Les lésions initiales renferment des bacilles vivants qui se multiplient. Les lésions peuvent donc s'étendre mais restent localisées à l'organe d'origine. La tuberculose est dite chronique d'organe. On l'observe chez les bovins. Deux formes de tuberculose chronique d'organe doivent être différenciées, les formes ouverte et fermée.

### 2.1 La forme ouverte

La forme est ouverte lorsque les lésions, suite à un ramollissement, s'ouvrent dans une voie de drainage naturelle (tube digestif, bronches et trachée...). Les lésions observées sont des ulcères ou des cavernes.

### 2.2 La forme inapparente

Dans ce cas, les lésions restent caséuses et ne provoquent pas de symptôme ou de signe clinique. L'existence de l'une ou de l'autre forme a des conséquences différentes.

Les porteurs sains atteints d'une forme ouverte ne sont pas identifiés. Ils jouent un rôle important dans la transmission de la maladie. Chez l'homme, en général, 30% des personnes qui ont été en contact avec des patients dont les expectorations contenaient des bacilles (forme ouverte) développent une infection tuberculeuse après une IDR positive. Moins de 10% des personnes qui ont été en contact avec des patients dont les expectorations ne contenaient pas de bacilles tuberculeux (forme fermée) développent l'infection.

### **3. La période d'incubation**

La période d'incubation correspond au temps qui s'écoule entre l'introduction d'un agent infectieux dans un organisme et l'apparition des premiers symptômes. En fonction des conditions de mesure (conditions expérimentales ou naturelles), elle est comprise entre 3 semaines et plusieurs mois. Dans les conditions naturelles, elle n'est que rarement inférieure à deux mois mais peut durer plusieurs années.

## **Chapitre III : La symptomatologie**

La symptomatologie dépend de la localisation des lésions (mammaire, pulmonaire, autres...) et de la mycobactérie incriminée. La tuberculose se caractérise donc par une grande diversité de manifestations chez toutes les espèces, ce qui peut conduire à un diagnostic tardif.

Il existe cependant des symptômes fréquents. Le début de la maladie est souvent sans retentissement sur l'état général. Puis, elle est associée à une atteinte de l'état général (asthénie, anorexie, anémie, oscillations thermiques ou troubles locaux).

Une lymphadénopathie loco-régionale est toujours présente.

- *La localisation pulmonaire* se traduit par une bronchite ou une bronchopneumonie chronique. La toux sèche, sonore, quinteuse, non associée à du jetage peut laisser la place à une toux grasse, plus forte et plus fréquente. Du jetage muco-purulent peut apparaître. La respiration devient ensuite dyspnéique avec de la polypnée. La dyspnée peut devenir intense et la toux fréquente est forte ou rare et avortée. Le jetage purulent et d'odeur fétide est souvent strié de sang. Les râles muqueux et crépitants entendus à l'auscultation au début de l'évolution s'accompagnent progressivement de souffles tubaires et caverneux.

- *La localisation pleurale* se traduit par une pleurésie exsudative caractérisée à l'inspection par une respiration discordante, à la percussion de la cage thoracique par une matité et à l'auscultation par un souffle pleurétique. Le liquide recueilli lors de la ponction intrapleurale est séreux et ambré. La pleurésie tuberculeuse qui accompagne la localisation pulmonaire est souvent associée à une péricardite exsudative.

- *La localisation viscérale* ne provoque pas de symptômes pathognomoniques. L'anorexie, les vomissements, la constipation et la diarrhée sont peu indicateurs de l'étiologie. La péritonite tuberculeuse exsudative conduit à de l'ascite. Le liquide recueilli par ponction est séreux, brun, ambré clair ou légèrement opalescent et contient peu d'hématies. L'hypertrophie du foie et des nœuds lymphatiques mésentériques les rend parfois palpables .

- *La localisation osseuse et articulaire* conduit à des ostéomyélites suppurées, à des fistules, à des polyarthrites. L'acropathie ou ostéopériostite diffuse provoque la formation d'exostoses. L'atteinte des os de la face entraîne une déformation de cette dernière. Par exemple chez le chat, on peut être confronté au « bec de perroquet » qui est une répercussion cutanée (un granulome) d'une tuberculose des os nasaux.

- *La localisation cutanée* provoque des lésions variables. Les lésions rencontrées peuvent être des ulcères, des abcès, des plaques ou des nodules. Les nodules peuvent eux-même être cutanés, donc mobilisables ou adhérents aux tissus sous-jacents. Les lésions peuvent être simples ou multiples, le pus qui s'en écoule est de jaunâtre à vert et a une odeur désagréable. La localisation cutanée est variable. La tête, le cou et les membres sont le plus souvent touchés chez les carnivores domestiques.

- *La localisation génitale* aboutit chez le mâle à une vaginalite ou vaginalo-orchite à évolution lente. La palpation des testicules révèle parfois des oedèmes et des nodules durs. Chez la femelle une métrite tuberculeuse peut être interne ou externe. Elle conduit à une métrite chronique sèche puis purulente accompagnée de stérilité. Un écoulement mucopurulent d'abord discret puis abondant est un signe d'appel. La palpation transrectale met en évidence des cornes volumineuses, dures, indolores avec une hypertrophie des nœuds lymphatiques lombo-iliaques. La localisation mammaire est possible.

D'autres localisations existent : les séreuses, le foie, la rate, le système nerveux, l'œil... Les infections tuberculeuses dont le point d'entrée est cutané provoquent en général des lésions cutanées, tendineuses et des nœuds lymphatiques qui drainent la ou les régions concernées. L'ingestion d'aliments contaminés (source principale de bacilles) provoque des formes extrapulmonaires localisées aux nœuds lymphatiques du cou, comme les pré-auriculaires, et moins souvent aux nœuds lymphatiques axillaires. On parle de lymphadénopathie. Cette localisation se rencontre préférentiellement chez les enfants. Les

principales infections tuberculeuses chez le chien et le chat sont respiratoires, digestives et éventuellement cutanées. Chez le chat, les signes peuvent être insidieux.

Chez l'homme, l'infection par la tuberculose est le plus souvent latente. Sans prophylaxie offensive ou défensive, 8 à 10% des personnes infectées développeront la maladie, dont 3 à 5% dans les deux premières années et 5% dans les années qui suivent, souvent quand elles sont âgées suite à une réactivation de la tuberculose.

## **Chapitre IV : Le tableau de la tuberculose en anatomie-pathologique**

### **1. Les différentes lésions**

Dans le cadre de la tuberculose, la pathologie résulte essentiellement de l'action forte et persistante de la réponse du système immunitaire à l'infection par les bacilles. Les lésions sont des granulomes résultant d'une hypersensibilité de type IV ou retardée. L'immunité sera étudiée dans la deuxième partie.

### **2. L'analyse histologique**

Les lésions sont formées d'une zone centrale regroupant des bacilles, des cellules mononuclées et des cellules géantes avec souvent un phénomène de nécrose. Cette zone est entourée de fibroblastes et de lymphocytes. L'infiltration par des cellules mononuclées, des cellules géantes et des lésions granulomateuses est caractéristique de la tuberculose.

### **3. Les prélèvements de choix**

La tuberculose extra-pulmonaire pose des problèmes diagnostique et thérapeutique importants. En présence d'une tuberculose active, des symptômes confirmés par un test de laboratoire donnent un résultat assez clair. Le diagnostic peut être plus problématique chez des patients avec une tuberculose extra-pulmonaire si les patients sont des enfants, des personnes âgées, ou des individus immunodéprimés. L'analyse radiographique de tuberculose extra-pulmonaire n'est pas concluante et le test cutané est considéré par beaucoup de cliniciens comme inutilisable. Les bactéries dans le cas d'une tuberculose extra-pulmonaire peuvent être présentes en faible quantité ou dans des sites inaccessibles. Des techniques

invasives sont alors nécessaires pour confirmer le diagnostic. De plus, l'épidémie de Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) a changé la proportion de tuberculose extra-pulmonaire par rapport à la tuberculose pulmonaire.

#### **4. La localisation des lésions**

En 1993, dans 68,5% des cas la maladie était une forme pulmonaire. 57% des formes pulmonaires étaient à frottis positif. Dans 1 à 2% des cas, la forme était méningée. Les autres localisations (extra-pulmonaire, extra-méningée, multiples) représentaient 21% des cas.

## **Chapitre V : L'épidémiologie**

L'amélioration de la santé publique humaine est indissociable de celle de la santé publique vétérinaire (l'aspect zoonotique). La protection et le bien-être de l'homme nécessitent l'utilisation de connaissances et de ressources associées à tous ceux qu'intéressent les divers problèmes dans lesquels la santé de l'homme peut être mise en cause; notamment l'état des animaux. Un ensemble cohérent et efficace d'organismes permet de recueillir et de concentrer les connaissances épidémiologiques s'intéressant aux problèmes de santé animale et humaine. Des organismes internationaux ou non (L'Office International des Epizooties, la Organisation Mondiale de la Santé...) sont en liaison permanente avec les différents états. Leur fonction est d'assurer entre autre une épidémiosurveillance de la tuberculose au plan international.

### **1. L'Office International des Epizooties (41)**

#### **1.1 Définition**

L'Office International des Epizooties (OIE) a été créée le 25 janvier 1924 par l'Arrangement International. L'OIE fait partie de l'Organisation Mondiale de la Santé Animale. C'est une organisation intergouvernementale. En 1924, l'OIE comptait 28 pays membres, en mai 2001 elle en comptait 158 (*tabl.3*).

Tableau 3: recensement des états membres de l'OIE en mai 2001.

Afghanistan	Chine (Rép. Pop. De)	Guyane	Maurice	Singapour
Afrique du Sud	Chypre	Hä ti	Mauritanie	Slovaquie
Albanie	Colombie	Honduras	Mexique	Slovénie
Algérie	Comores	Hongrie	Moldavie	Somalie
Allemagne	Congo	Inde	Mongolie	Soudan
Andorre	Congo (Rép. Dém. Du)	Indonésie	Mozambique	Sri Lanka
Angola	Corée (Rép. De)	Irak	Myanmar	Suède
Arabie Saoudite	Corée (Rép Dém. Pop. De)	Iran	Namibie	Suisse
Argentine	Costa Rica	Irlande	Népal	Swaziland
Arménie	Côte d'Ivoire	Islande	Nicaragua	Syrie
Australie	Croatie	Israël	Niger	Tadjikistan
Autriche	Cuba	Italie	Nigeria	Taipeichina
Azerbä djan	Danemark	Jamä que	Norvège	Tanzanie
Bahrä n	Dominicaine (Rép)	Japon	Nouvelle-Calédonie	Tchad
Bangladesh	Egypte	Jordanie	Nouvelle-Zélande	Tchèque (Rép.)
Barbade	El Salvador	Kazakhstan	Oman	Thä lande
Bélarus	Emirats Arabes Unis	Kenya	Ouganda	Togo
Belgique	Equateur	Kirghizistan	Ouzbékistan	Trinité-et-Tobago
Bénin	Erythrée	Kowä t	Pakistan	Tunisie
Bhoutan	Espagne	Laos	Panama	Turkménistan
Bolivie	Estonie	Lesotho	Paraguay	Turquie
Bosnie-Herzégovine	Etats-Unis D'Amérique	Lettonie	Pays-Bas	Ukraine
Botswana	Ethiopie	Liban	Pérou	Uruguay
Brésil	Ex-Rép. Youg. De Macédoine	Libye	Philippines	Vanuatu
Bulgarie	Finlande	Lituanie	Pologne	Venezuela
Burkina Faso	France	Luxembourg	Portugal	Vietnam
Burundi	Gabon	Madagascar	Qatar	Yémen
Cambodge	Géorgie	Malawi	Roumanie	Zambie
Cameroun	Ghana	Malaisie	Royaume-Uni	Zimbabwe
Canada	Grèce	Mali	Russie	
Centrafricaine (Rép.)	Guatemala	Malte	Sénégal	
Chili	Guinée	Maroc	Sierraléone	

Chaque Etat membre nomme des "délégués officiels auprès de l'OIE". Les Etats membres et les coordonnées de leurs délégués sont disponibles sur le site Web de l'OIE.

## 1.2 L'organisation de l'OIE

L'OIE est organisée en Comité International, en Bureau Central et en Commissions.

- *Le Comité international* est composé de Délégués désignés par les gouvernements des Etats membres de l'OIE.

- *Le Bureau central* dont le siège se trouve à Paris (France) assure son fonctionnement sous la direction d'un Directeur général élu par le Comité international.

- *Des Commissions* élues (administratives régionales -5-, techniques spécialisées -4-) élaborent les résolutions du Comité appliquées par le bureau.

Des coordinateurs régionaux présents sur les 5 continents et les relations permanentes avec 20 autres organisations internationales permettent un travail à l'échelle mondiale. Les contributions annuelles et les contributions volontaires des Etats membres constituent l'essentiel des ressources de l'OIE.

## 1.3 La hiérarchisation des maladies par l'OIE

L'OIE a créé 3 listes officielles de maladies les listes A, B et C qui regroupent :

- *la liste A* les maladies transmissibles à grand pouvoir de diffusion et de gravité particulière "susceptibles de se propager au delà des frontières" et donc à conséquences économiques majeures.

- *la liste B* les maladies moins contagieuses mais cependant "importantes pour les économies nationales ou la santé humaine". La tuberculose appartient à cette liste.

- *la liste C* les autres maladies importantes.

Ces listes sont consultables sur le site Web de l'OIE.

L'appartenance à l'une ou l'autre des listes a des conséquences différentes.

## 1.4 Les missions de l'OIE

Les différentes missions de L'OIE recensées (41) sont de garantir la transparence de la situation des maladies animales dans le monde, de collecter, analyser et diffuser l'information scientifique vétérinaire, d'apporter son expertise, stimuler la solidarité internationale pour contrôler les maladies animales et garantir la sécurité sanitaire du commerce mondial.

- *garantir la transparence de la situation des maladies animales dans le monde* : chaque Etat membre s'engage à déclarer les cas de tuberculose détectés. Cette information est transmise à tous les pays qui peuvent alors prendre les mesures adéquates. La diffusion des informations se fait grâce au site Web de l'OIE, au Bulletin de l'OIE publié tous les deux mois, au recueil annuel «Santé animale mondiale» et au périodique hebdomadaire « Informations sanitaires ».

L'OIE regroupe l'ensemble des informations sur la tuberculose et les autres maladies dans une base de données appelée HandiSTATUS pour Help with World Animal Disease Status ( aide à l'information sur la situation zoosanitaire mondiale). Ces données sont mises à jour régulièrement. Actuellement un prototype est développé. Il s'appellera HandiSTATUS II et sera consultable sur internet. Il comprendra un « module d'aide à la décision sanitaire en matière d'importation d'animaux et de produits d'origine animale » en rapport avec le *CODE ZOOSANITAIRE INTERNATIONAL*.

- *collecter, analyser et diffuser l'information scientifique vétérinaire* : les découvertes scientifiques qui concernent l'amélioration de la lutte contre la tuberculose sont collectées, analysées puis diffusées. Ces informations sont disponibles dans “ la Revue scientifique et technique ” de l'OIE publiée trois fois par an. Pour permettre une meilleure coopération entre les pays, l'OIE publie un «manuel des normes de l'OIE pour les tests de diagnostic et les vaccins ». Ce manuel a pour objectif «de contribuer à l'harmonisation internationale des méthodes de surveillance et de contrôle des principales maladies animales ». Il est unique et « a été entièrement approuvé par tous les Pays membres de l'OIE ». Cette harmonisation facilite l'analyse des informations scientifiques sanitaires.

- *apporter son expertise et stimuler la solidarité internationale pour contrôler les maladies animales* : l' OIE et ses différents Etats membres apportent une aide scientifique et technique aux pays membres qui le souhaitent. Cela concerne notamment les pays les plus pauvres. Le communiqué de presse du 9 novembre 1998 (42) donne un exemple de cette solidarité : un “ séminaire sur l'épidémiosurveillance des maladies animales en Afrique ” s'est tenu à Dakar dans le cadre de la formation aux méthodes de surveillance épidémiologique. Les séminaires sont l'occasion de dresser un bilan, de donner des conseils aux pays en retard dans la lutte contre la tuberculose et d'organiser des formations sous la forme d'exposés et de travaux pratiques. Ils sont organisés conjointement par des

responsables de pays où le contrôle de la tuberculose est opérationnel. Le but est d'apporter des connaissances techniques et scientifiques à des pays qui en ont besoin.

- *garantir la sécurité sanitaire du commerce mondial en élaborant des règles sanitaires pour les échanges internationaux des animaux et de leurs produits* : la tuberculose est une maladie qui peut avoir des conséquences sur les échanges et le commerce des animaux. L'importance est économique en plus d'être sanitaire et hygiénique. La reconnaissance d'un pays comme indemne de tuberculose animale par l'OIE a des conséquences économiques très importantes, notamment depuis 1995, date de l'établissement de l'Organisation Mondiale du Commerce (OMC) et depuis l'Accord sur l'application des mesures sanitaires et phytosanitaires. Les normes de l'OIE sont reconnues par l'OMC comme règles sanitaires internationales de référence.

## **2. Les autres organisations**

La première unité de surveillance épidémiologique au sein de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a été créée en 1965. L'importance de la tuberculose a été reconnue très tôt par OMS; le premier rapport date de 1950 (14).

- *La « Division of Emerging and Other Communicable Diseases Surveillance and Control »* (EMC) fait partie de OMS et siège à Genève. L'EMC a un rôle de surveillance épidémiologique et de contrôle. Il effectue des recherches sur la tuberculose zoonotique par l'intermédiaire de ses groupes d'experts disséminés dans le monde.

- *Le « Regional Office for the Americas, Pan American Health Organization (PAHO/HCV)* forme des spécialistes pour le diagnostic, les systèmes de surveillance et aide à l'organisation et à la mise en place de programmes nationaux de contrôle de l'infection.

- *La « Food and Agriculture Organization of the United Nations »* (FAO) et l'OIE révisent, mettent à jour les connaissances sur les vaccins humains et animaux contre la tuberculose .

### **2.1 Le recueil des données (14)**

Les informations récoltées concernent la cinétique de l'infection, les agents infectieux, les réservoirs, les vecteurs, le ou les modes de transmission, l'extension de l'infection et les

limites dans une population donnée. La surveillance épidémiologique permet de connaître à un moment donné la prévalence et l'incidence de l'infection tuberculeuse et de déterminer les populations, les facteurs de risque et les expositions à risque.

Les enquêtes réalisées par les réseaux de surveillance ont pour but de mettre en place des plans de surveillance, de prévention et de contrôle de la tuberculose. Des enquêtes ultérieures permettent une évaluation des mesures de prévention et de contrôle des infections. Les rapports sont rédigés par des investigateurs désignés par la World Health Organisation.

Les sources potentielles de données sont multiples. Pour l'homme par exemple, les experts consultent les registres de décès, les rapports médicaux, les rapports épidémiologiques rédigés par des agents officiels de surveillance de santé publique, les rapports de laboratoires et peuvent envoyer des équipes d'investigation.

- *le registre des décès* : c'est la source d'information la plus anciennement utilisée.

Le principal inconvénient de cette source est que les données de mortalité ne reflète l'incidence que lorsque le ratio mort/naissance est assez constant. Se pose aussi un problème de latence. Le délai entre l'analyse et la mort et/ou le temps de latence entre l'analyse et la publication des données de mortalité sont parfois longs.

Sur un certificat de décès, plusieurs hypothèses diagnostiques sur les causes de la mort sont notées. Il existe des règles internationales de hiérarchisation des hypothèses et les causes infectieuses sont généralement les dernières probables.

- *les rapports médicaux* : dans la plupart des pays la rédaction de rapports médicaux est obligatoire. Ils sont souvent assez complets et permettent de recueillir des données sur la santé locale. La qualité des données est généralement bonne pour la tuberculose car c'est une maladie assez rare et grave.

- *les rapports épidémiologiques rédigés par des agents officiels de surveillance de santé publique* : toute épidémie de tuberculose entraîne la rédaction d'un rapport.

- *les rapports de laboratoires* : les techniques utilisées sont codifiées, sensibles et spécifiques. La mise en évidence de la mycobactérie est une preuve diagnostique.

- *l'envoi d'équipes d'investigation* : des enquêtes peuvent être réalisées par des équipes d'investigation à partir de symptômes comme marqueurs épidémiologiques, de tests, de résultats sérologiques quand la symptomatologie n'est pas spécifique.

- *les autres sources de données* : hôpitaux et dispensaires, laboratoires de santé publique, registre des décès, absentéisme à l'école et au travail, enquêtes de populations, médias, consommation des médicaments...

## 2.2 L'analyse des données

La collecte et le traitement des questionnaires sur la santé animale communs à l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO), à l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et à l'OIE sont réalisés et diffusés par l'OIE. Les données sont classées par catégories en fonction du moment, du lieu et des individus (âge, sexe...).

## 2.3 L'interprétation

Elle dépend des données récoltées et de leur analyse, d'où l'importance d'une harmonisation des rapports des différents pays.

## 3. L'évaluation des systèmes de surveillance

Les qualités requises par les systèmes de surveillance sont (14) :

- *la simplicité* : le système de surveillance de la tuberculose doit pouvoir être mis en place par tous les pays .

- *la flexibilité* : chaque pays possède des particularités qui lui sont propres, des spécificités économiques, culturelles, sociales....

- *une bonne perception* par le public et les professionnels de la santé animale et humaine du système de surveillance. Il doit y avoir une prise de conscience de l'importance du contrôle et de l'éradication de la tuberculose. Différentes voies sont utilisables, la presse, la radio...

Il faut noter l'importance du rôle des médecins et des vétérinaires et de leur coordination en rapport avec l'aspect zoonose.

- *les sensibilité et spécificité des méthodes et des techniques de dépistage et de diagnostic.*

Il existe un manuel des normes de l'OIE pour les tests de diagnostic et de vaccin.

L'objectif de ce manuel est de contribuer à une « harmonisation internationale des méthodes de surveillance et de contrôle des principales maladies animales » dont la tuberculose.

Il rassemble les normes pour le diagnostic de laboratoire, pour le contrôle des produits à usage vétérinaire (notamment les vaccins) mentionnés dans le Code Zoosanitaire International (41).

- *les collecte des données et publication des résultats rapides* : une grande amélioration a été faite grâce à l'informatisation pour le rassemblement et la centralisation des données, et grâce à internet pour la transmission, la collecte et la rapidité de publication.

Pour les maladies de la liste A, chaque état-membre de l'OIE adresse un rapport mensuel de la situation zoosanitaire. Pour la tuberculose (liste B), la collecte des données se fait une fois par an.

#### **4. L'épidémiologie analytique**

##### 4-1 Les tuberculoses

Lorsqu'on étudie la tuberculose, il faut en différencier 2 types.

La tuberculose dont l'agent étiologique est *Mycobacterium tuberculosis* et la tuberculose dont l'agent étiologique est *Mycobacterium bovis*. Ce dernier est le principal agent de la tuberculose zoonotique. Ces 2 tuberculoses sont différentes non seulement pour leur pathogénie et pour les lésions qu'elles provoquent mais aussi pour leur épidémiologie.

Tableau 4 : cas déclarés d'animaux sauvages contaminés par la tuberculose (40).

<b>pays</b>	<b>Espèces sauvages</b>
Afrique Du Sud	Buffles et contamination accidentelle de : <ul style="list-style-type: none"> <li>- babouins</li> <li>- lions</li> <li>- guépards</li> <li>- léopards</li> </ul> dans deux parcs
Ouganda	Nouvelles contaminations de buffles
Zambie	- Gnous
Europe : Espagne	- Daims - Cerfs - Sangliers - Lynx
Royaume-Uni	- blaireaux - chevreuils - daims - cerfs
Etats-Unis	- cerfs de Virginie - coyotes - renards roux - rats laveurs - ours noirs - lynx
Hawaii	Porcs sauvages ( ?)
Canada	- Endémie dans une sous population de bisons - un cas chez un wapiti

#### 4.1.1 Les sources de mycobactéries

*M. tuberculosis* a longtemps été un agent spécifique de la tuberculose humaine. On observe désormais des cas de tuberculose animale à *M. tuberculosis*, *M. bovis* est l'agent des tuberculoses animale et humaine. Les cibles animales pouvant être contaminées sont domestiques et sauvages. Les troupeaux d'animaux de rente constituent le réservoir principal à *M. bovis*. Par animaux de rente, on entend les bovins en particulier mais aussi les chèvres, les moutons, les chameaux, les dromadaires et les rennes (42).

La contamination croissante de populations d'animaux sauvages (tabl.4) est une préoccupation majeure. Les effets potentiels de la maladie sont inquiétants pour la conservation des espèces. Ce sont des réservoirs infectieux sauvages qu'il faut prendre en compte dans les programmes d'éradication. Les Etats-Unis font en conséquence des tentatives de lutte chez les cervidés. Ils diminuent la densité de population et interdisent la distribution de nourriture par l'homme.

#### 4.1.2 Les matières virulentes et les modalités de la contamination

Il existe différentes voies de contamination : la voie principale (respiratoire) et des voies secondaires (orale ou génitale). Pour la tuberculose à *M. tuberculosis*, les matières virulentes sont essentiellement la salive, les fines gouttelettes rejetées lors de toux, les expectorations. La contamination se fait par contact direct. Les matières virulentes contenant *M. bovis* sont en plus de celles de *M. tuberculosis* le lait, la viande et les viscères contaminés, l'urine, les fèces et la semence. La contamination par *M. bovis* peut se faire par contact direct avec les animaux atteints d'une forme respiratoire et/ou par ingestion de lait ou de viande lors de forme extra-pulmonaire. Plus rarement, du matériel contaminé ou un contact avec des carcasses peuvent être à l'origine de la contamination. Un bovin contaminé excrète des bacilles tuberculeux quand il a des lésions pulmonaires ouvertes, pendant la période initiale de l'infection et au début de la maladie.

*M. avium* se retrouve dans les fèces.

## 4.2 Les facteurs de sensibilité et de spécificité

### 4.2.1 L'importance de la virulence de la souche

Lors d'une infection tuberculeuse, il peut y avoir une altération et une destruction des macrophages dans lesquels les bacilles se multiplient. Les lésions sont surtout dues à des mécanismes indirects résultant de la réponse immunitaire. Les différences de virulence dépendent de l'intensité et de la nature des réactions immunitaires induites par les souches (cf chapitre suivant).

Aucune toxine connue n'est libérée par les bacilles tuberculeux, aucun antigène ou autre composant connu n'est responsable de la virulence. Les déterminants de la virulence sont en cours d'étude à travers le décryptage du génome. La dose inoculée, la voie et la fréquence d'inoculation sont très importantes. Les différentes mycobactéries responsables de la tuberculose chez les mammifères sont plus ou moins pathogènes. Cette différence de pathogénicité varie avec l'espèce et la souche.

Deux types de lésions peuvent être différenciés, les lésions étendues et caséuses et celles peu étendues rarement caséifiées qui aboutissent à une sclérose rapide. La différence est définie par le caractère plus ou moins virulent des espèces et des souches de mycobactéries.

### 4.2.2 L'importance de l'hôte

Pour tous les représentants du complexe *M. tuberculosis*, la spécificité d'hôte n'est pas totale ; il existe des différences de sensibilité interspécifiques (8,15,19).

- *Les petits ruminants* sont assez susceptibles mais moins sensibles que les bovins. Quand la maladie survient chez les petits ruminants, elle est généralement due à *M. bovis*. *M. avium* a été décrit comme produisant progressivement des lésions.

- *Les chats* sont peu sensibles à *M. tuberculosis* et à *M. avium* mais sensibles à *M. bovis* responsable d'une tuberculose généralisée.

- *Les chiens* sont, quant à eux, sensibles à *M. tuberculosis* et à *M. bovis*. La tuberculose est généralisée. Par contre, ils sont résistants à *M. avium*. Il existe des infections peu fréquentes causées par des mycobactéries autres que les espèces classiques.

- *La tuberculose cutanée du bétail* peut être causée par des mycobactéries non cultivables, bien que *M. tuberculosis* et *M. avium* soient les plus fréquentes (8).

- *Le porc* est sujet aux infections à *M. bovis*, *M. avium* et *M. tuberculosis*. *M. avium* est responsable dans cette espèce de lésions surtout localisées au tractus intestinal et aux nœuds lymphatiques (surtout les sous maxillaires et les cervicaux). *M. bovis* provoque souvent des formes généralisées.

- *Chez les chevaux*, la tuberculose à *M. bovis* est la plus fréquente et atteint les vertèbres cervicales.

#### 4.2.2.1 Le sexe

Les jeunes femmes sont plus sensibles que les jeunes hommes. Cette différence peut être expliquée par le rôle des hormones sur le système immunitaire. Cette différence de sensibilité n'est pas connue chez les animaux.

#### 4.2.2.2 L'âge

Les enfants notamment en bas âge et les personnes âgées sont plus sensibles dans les pays industrialisés. Chez ces individus, les lésions sont fréquentes et graves.

Une expérience menée en 1926 par Lubeck sur l'homme montre la plus grande sensibilité des jeunes. Des bacilles tuberculeux virulents et vivants ont été administrés à 249 bébés à la place de vaccins par inadvertance. 76 bébés sont morts et les autres ont développé des lésions mineures. Ils ont survécu et étaient toujours vivants 12 ans après. Pour toutes les injections le matériel, les conditions et les doses étaient les mêmes.

Dans les pays en voie de développement, c'est la catégorie des 15-40 ans la plus infectée.

#### 4.2.2.3 Les facteurs génétiques

Toujours dans l'expérience précédente, 87% des vrais jumeaux infectés ont déclaré la maladie contre 26% des faux jumeaux infectés. Chez les vrais jumeaux, la clinique de la maladie était en plus identique. La pathogénie est donc sous l'influence de la génétique. Cette plus ou moins grande sensibilité peut être expliquée par le type de réponse immunitaire et par la nature des protéines du CMH présentatrices de peptides étrangers aux lymphocytes T (CMH

de classe I ou de classe II). Ces protéines sont codées par des gènes. La réponse immunitaire est donc elle aussi sous contrôle génétique. Cet aspect sera développé dans le 2.1 du chapitre II de la partie II.

#### 4.2.3 Les facteurs sociaux

La tuberculose est une maladie de la pauvreté et de la malnutrition aussi bien dans les pays en voie de développement que dans les pays industrialisés. Dans les pays industrialisés, ce sont particulièrement les immigrants et les réfugiés, les groupes de minorités indigènes, les Sans Domicile Fixe (SDF) et les prisonniers qui ont longtemps été les plus touchés. En Russie, les prisons sont appelées des “ fermes à tuberculose ”. Les conditions d’hygiène et la densité sont propices à un “ élevage de bacilles ”. La disponibilité et la qualité de l’eau sont des facteurs de sensibilité. Un manque d’eau ne permet pas d’avoir une hygiène correcte et une eau de mauvaise qualité rend la population sensible aux épidémies de tuberculose.

Actuellement, on observe une recrudescence des cas de tuberculose liée à l’épidémie du SIDA. Les vagues de co-infection VIH/SIDA et tuberculose favorisent la transmission de *M. bovis* qui conduit rapidement à la déclaration de la maladie.

Les métiers pour lesquels la prévalence est la plus élevée sont les métiers de l’élevage, des abattoirs et les vétérinaires.

#### 4.2.4 La fréquence des contacts et la dose inoculée

La dose minimale infectieuse est variable selon l’espèce hôte et la voie de pénétration. Par contre, il n’existe pas de dose maximale. La pénétration par voie sous-cutanée de 5 à 10 bacilles viables chez le cobaye, de quelques centaines chez les bovins, de plusieurs milliers chez les ovins est obligatoire pour provoquer une infection tuberculeuse.

La fréquence du contact avec des bacilles tuberculeux est aussi importante. L’inoculation d’une dose unique peut provoquer des lésions minimales mais celle répétée d’une dose plus faible peut conduire à l’apparition de la maladie (19).

#### 4.2.5 L’environnement

La balance entre les réponses immunitaires Th1 et Th2 peut être modifiée par des facteurs de l’environnement (5). L’équilibre initial est obtenu avec les infections virales de

l'enfance et les mycobactéries environnementales pour Th1 et les parasites pour Th2. Dans les pays en voie de développement, le stress, les allergènes et les immunisations augmentent l'importance de Th2. L'ajout de *M. tuberculosis* pour Th1 ne permet pas de rétablir l'équilibre.

## **5. La situation actuelle**

### 5.1 Les données actuelles sur la tuberculose humaine

#### 5.1.1 La tuberculose et la mortalité humaine (*tabl.5*)

La tuberculose humaine a une répartition mondiale avec de grandes variations selon le pays et la région. Il y a une concentration de la tuberculose dans les pays en voie de développement et dans les zones les plus pauvres des pays industrialisés. En 1997, 95% des cas et 98% des individus morts de tuberculose étaient dans les pays en voie de développement. 70% des cas de mortalité appartenaient à la tranche des 15-40 ans.

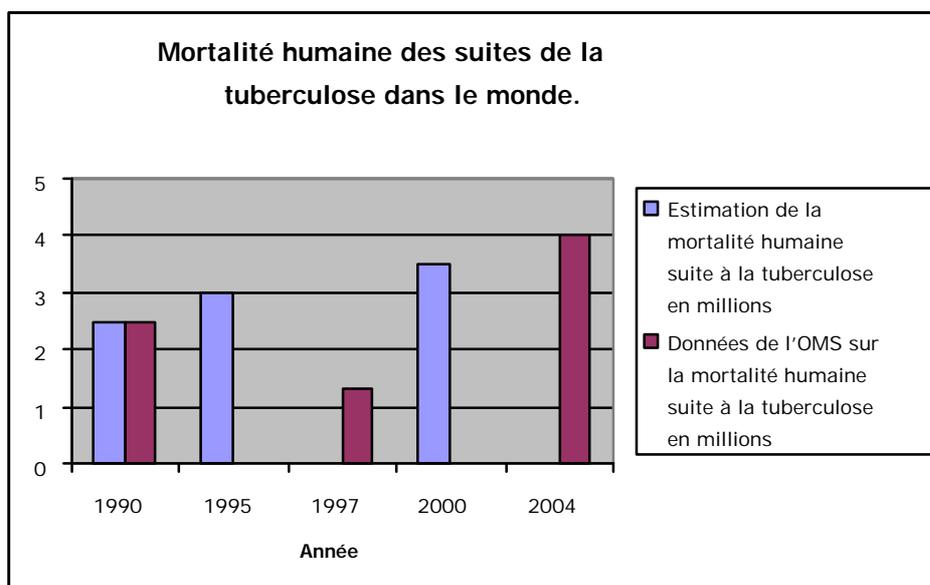
##### 5.1.1.1 Estimation de la prévalence de la tuberculose humaine

Pour beaucoup de pays les données sont incomplètes. Il n'y a pas de transmission des données aux instances internationales ou pas d'enregistrement des décès. Une autre raison est le non diagnostic à cause d'un manque de laboratoires, d'appareils radiographiques ou de personnel qualifié. Seuls 30% des frottis positifs seraient détectés.

Lorsque des pays ne disposent pas de données chiffrées, une estimation est faite. Une région dont les données ne sont pas connues est divisée en quatre zones. Les données des régions de pays voisins les plus proches géographiquement et socio économiquement leur sont affectées. Ainsi, on extrapole les données de la République Unie de Tanzanie à l'Afrique de l'Est, les données de l'Afrique du Sud à l'Afrique méridionale, et ceux de la Côte d'Ivoire à l'Afrique de l'Ouest.

Tableau 5 : Tuberculose et mortalité humaine (17, 53)

	1990	1995	1997	2000	2004
<b>Estimation d'après Dolin et al (17) de la mortalité humaine suite à la tuberculose en millions</b>	2,5	3	?	3,5	?
<b>Données de l'OMS sur la mortalité humaine suite à la tuberculose en millions</b>	2,5	?	1,3	?	4



Une autre méthode a été utilisée pour estimer la prévalence de la tuberculose en 1990 (17). L'incidence a été calculée en tenant compte du risque d'infection annuel sans tenir compte du facteur taille de population (mais on sous-estime l'incidence), des facteurs démographiques (la taille et l'âge des populations) et épidémiologiques. Le calcul de la prévalence de la tuberculose en tenant compte de ces facteurs est réalisable et le résultat applicable aux populations des régions divisées.

Le taux de mortalité humaine a été estimé en 1990, 1995 et 2000 en utilisant la méthode décrite plus haut. Il était de 7% pour les pays industrialisés et de 15% pour les pays d'Europe de l'est. Des consultations, une mise en place du traitement trop tardives et un défaut de diagnostic peuvent expliquer en partie ces chiffres.

En Amérique Centrale et du Sud, 20% des hommes tuberculeux devaient mourir. Pour les autres régions les taux de mortalité étaient estimés à 35-40%, dont 15% pour ceux qui suivaient un traitement et 55% pour les non traités. Pour les pays membres de OMS, il était admis pour l'estimation que tous les cas étaient sous traitement et 5% des patients traités n'ont pas été pris en compte. Pour les pays d'Asie du Sud est et les pays du Pacifique Ouest, il a été admis que 40% des patients avaient reçu un traitement en 1990. Les estimations de 1990 ont été reprises pour calculer celles de la période 1990-mi 1992, celles de 1995 pour mi 1992- mi 1997, celles de 2000 pour mi 1997-1999. Les calculs ont abouti à : en 1990, 2,5 millions de personnes devaient mourir de la tuberculose ; en 1995, 3 millions de personnes et en 2000, 3,5 millions.

#### 5.1.1.2 Les données de l'OMS

En 1990, 2,5 millions des 1,7 milliards de personnes infectées par l'agent de la tuberculose sont décédées (36, 54).

En 1994, 7% des morts dont 18,5% des 15-59 ans sont imputables à la tuberculose (31). En 1997, 1,9 millions d'humains sont décédés de la tuberculose : 98% dans des pays pauvres dont 70% entre 15 et 40 ans. En 1998, il a été publié que si le taux de mortalité continuait à ce rythme, entre 1990 et 1999 plus de 30 millions d'individus allaient mourir et le taux de mortalité atteindre 3,5 millions par an jusqu'en 2000. L'OMS a calculé que si des mesures efficaces ne sont pas prises rapidement, le nombre de décès dus à la maladie pourrait atteindre 4 millions par an en 2004.

*Tableau 6 : Prévalence de la tuberculose humaine dans le monde en 1990.*

	<b>Prévalence de la tuberculose en 1990</b>
Asie du Sud Est	4,9 millions
Afrique sub-saharienne	1 million
Europe de l'Est	0,2 million
Europe de l'Ouest	0,2 million
Inde	2,1 millions
Indonésie	0,4 million
Chine	1,3 million

## 5.1.2 La tuberculose et la morbidité humaine (tabl.6)

### 5.1.2.1 Les estimations

30 à 50% de la population mondiale est infectée. La tuberculose est un fléau majeur dont la répartition est inégale (17).

En 1990, la prévalence était de 7 537 000 cas de tuberculose humaine symptomatique dont 4,9 millions de cas (soit 65%) en Asie du Sud Est et dans les régions du Pacifique Ouest, 1 million en Afrique sub-saharienne, 0,2 million en Europe de l'Est et dans les états indépendants anciens membres de l'URSS, 0,2 millions en Europe de l'Ouest et dans les autres pays industrialisés. Ce qui fait 2,1 millions en Inde, 1,3 millions en Chine et 0,4 millions en Indonésie(17). La prévalence devait passer de 7,5 millions (soit 143 cas pour 100 000 personnes) en 1990, à 8,8 millions (soit 152 cas pour 100 000 personnes) en 1995 et à 10,2 millions (soit 163 cas pour 100 000 personnes) en 2000.

### 5.1.2.2 Les données de l'OMS (54)

L'estimation de 3,3 millions de cas en 1994 ne correspondrait qu'à un tiers de la réalité. En 1997, il y a eu entre 8 et 10 millions de nouveaux cas de tuberculose humaine contagieuse, dont 95% dans des pays pauvres, et environ 16 millions de cas si on compte les formes non contagieuses et les formes extra-thoraciques. En 1998 aux Etats-Unis, l'incidence était de 6,8 pour 100 000 habitants par an. Il y a donc eu une baisse de l'incidence moyenne de la tuberculose humaine dans ce pays de 31% entre 1992 et 1997. Chez les immigrants des Etats-Unis, cette dernière a augmenté. Elle est passée de 27% en 1992 à 42% en 1998. En 1998 en Afrique, l'incidence de la tuberculose humaine était de 259 cas pour 100 000 personnes par an contre 50 pour 100 000 en Europe. Le nombre de cas a été multiplié par 2 ou 3 dans les pays d'Afrique depuis 1985.

## 5.2 La répartition géographique de la tuberculose humaine dans le monde

### 5.2.1 Dans les pays industrialisés (53)

Depuis le début du XIXème siècle jusqu'à la fin de la Seconde Guerre Mondiale, l'incidence de la tuberculose humaine a régulièrement diminué, la mortalité également. Cette diminution va de pair avec l'amélioration des conditions de vie, les connaissances et découvertes scientifiques concernant les agents étiologiques, les modes de transmission, la vaccination avec le BCG et les traitements efficaces. Les Etats-Unis, le Canada et l'Europe de l'Ouest

sont les pays où l'incidence de la tuberculose est la plus faible depuis le milieu des années 80 et le début des années 90. Les taux sont stables ou déclinent.

#### 5.2.2 En Europe (53, 17)

Entre 1974 et 1991, l'incidence a diminué de 5,4% par an. Le taux d'infection est passé de 31,9 cas pour 100 000 habitants en 1974 à 14 cas pour 100 000 habitants en 1991. L'évolution est cependant hétérogène. Seuls trois pays européens présentent une diminution de l'incidence : c'est l'Allemagne, la Belgique et la Finlande. Le Portugal et la Suède ont une incidence constante. Celle-ci ne cesse d'augmenter au Danemark depuis 1984, en Suisse depuis 1986, aux Pays-Bas depuis 1987, en Irlande, Italie et Norvège depuis 1988 et en Autriche depuis 1989. L'Angleterre a présenté une incidence constante ces dernières années. Cependant en 2000, environ 7 300 cas ont été recensés. C'est le chiffre le plus haut depuis 1962. Il est important de souligner que les critères épidémiologiques varient d'un pays à l'autre et que les données ne peuvent pas toujours être comparés. En 1994, le taux de mortalité était de 3 cas par million d'habitants aux Pays-Bas et de 28 par million au Portugal.

#### 5.2.3 Aux Etats-Unis (53,17)

Après un siècle de décroissance régulière de l'incidence, en 1986 il y a eu une inversion de la courbe. Une réémergence de la tuberculose est en cours. Les causes de cette réémergence sont l'absence de traitement ou le mauvais suivi du traitement prescrit (d'où l'apparition de souches résistantes), la population importante de SDF (ils font partie des premiers touchés), la présence et l'arrivée d'immigrants de pays en voie de développement, un défaut de diagnostic et une détérioration voire une absence d'infrastructures de santé publique (apparition de micro épidémies hospitalières). Ces causes contrecarrent les progrès et la diminution du nombre de cas qui avait été obtenue par une amélioration de la surveillance, du diagnostic et de la thérapie. Entre 1953 et 1986, l'incidence a régulièrement diminué de 6,7% par an. 28 500 cas en 1978, 22 000 cas en 1984, 27 500 en 1991 et 26 673 en 1992 ont été dénombrés (53). EN 1998, l'incidence avoisinait 6,8 pour 100 000 habitants par an. Le programme d'éradication et de contrôle avait permis de la diminuer de 31% depuis 1992. Chez les immigrants, elle est passée de 27% en 1992 à 42% en 1998. Les causes de cette augmentation sont mal connues. L'origine semble être multifactorielle (pauvreté, malnutrition, dénutrition et co-infection avec le VIH...).

#### 5.2.4 En Afrique (31)

L'incidence de la tuberculose humaine est de 259 cas pour 100 000 personnes par an. Pour comparaison, en Amérique et en Europe, elle est de 50 pour 100 000. En Afrique Subsaharienne, elle est supérieure à celle des régions d'Asie du sud est. Le nombre total de cas est supérieur chez ces dernières. L'Afrique Subsaharienne regroupe le Nigéria, le Kenya, le Zimbabwe, l'Ouganda, la Tanzanie, l'Afrique du Sud et la République Démocratique du Congo. Cette partie du Globe est pauvre. Les formations politiques n'ont pas instauré de contrôle de l'infection, les conflits politiques se succèdent et la co-infection VIH/tuberculose ne cesse de prendre de l'ampleur. Depuis 1985, le nombre de cas de tuberculose humaine a été multiplié par 2 voire 3 dans ces pays d'Afrique.

#### 5-2-5 Dans les autres pays (53)

La Chine fait partie des 22 pays qui souffrent d'épidémies sévères de tuberculose. Le vice-ministre de la santé Yin Dakui espère mettre en place un système médical efficace. L'objectif est de guérir 4 millions de tuberculeux d'ici 2010. Le risque annuel d'infection connaît une diminution lente de 1 à 2% en Afrique et en Asie, les deux « bastions » de la maladie.

L'Afghanistan et le Pakistan font également partie des 22 pays. Ces deux pays concentrent 80% des cas mondiaux de la maladie déclarée par an. Leur incidence est supérieure à 350 000 cas par an. Les événements actuels (représailles des Etats-Unis contre les Talibans) représentent un risque majeur. La concentration de réfugiés dans un espace restreint à la frontière entre l'Afghanistan et le Pakistan est propice aux contagions. Un camp est un « incubateur de maladies ». L'objectif de OMS est de prévenir ces épidémies par la mise en place de plans sanitaires.

En Moldavie (pays de 4,29 millions d'habitants), le nombre de nouveaux cas a flambé depuis le début des années 1990. L'OMS estime à environ 5 800 personnes le nombre de nouveaux cas par an. Le manque d'antibiotiques appropriés et de bonne qualité est incriminé.

Ces exemples montrent la multiplicité et la diversité des situations. Chacune requiert un plan de contrôle et de traitement de la maladie approprié.

### 5.3 Les tendances de l'évolution de la tuberculose humaine

Les chiffres, stables depuis une vingtaine d'années, ont tendance à augmenter.

Les facteurs responsables de l'évolution sont pour 77% des facteurs démographiques (augmentation de la population et pyramide des âges).

#### 5.3.1 La pyramide des âges (17)

L'incidence spécifique de l'âge augmente en Afrique Subsaharienne suite à l'infection par le VIH. Les patients co-infectés représenteront 23% des nouveaux cas prévus dans les années à venir. Les régions aidées par l'OMS en Asie du Sud Est, en Amérique centrale et du sud devraient voir l'incidence spécifique de l'âge diminuer mais plus lentement que les années précédentes.

#### 5.3.2 L'augmentation de la population

Dans les pays du Pacifique Occidental et de la Méditerranée Orientale, le taux spécifique d'âge devrait diminuer. En revanche, le nombre de cas nouveaux devrait augmenter suite à l'expansion démographique.

#### 5.3.3 La tuberculose humaine en France

##### 5.3.3.1 La morbidité humaine (53)

Entre 1970 et 1988, le taux de morbidité a diminué de 4% par an. La morbidité est passée de 31 248 cas par an en 1970 à 9 191 cas par an en 1988. Celui-ci est ensuite resté stable pendant deux ans. En 1992, il était de 9 220 nouveaux cas par an soit 15,8 cas pour 100 000 habitants. En 1993, il était de 9 500 nouveaux cas de tuberculose par an (*tabl.7*).

L'institut de veille sanitaire (19) a publié des données montrant que la tendance à la diminution de la morbidité tuberculeuse humaine en France se poursuit depuis 1970. En 1993, 9670 nouveaux cas ont été comptabilisés en France, en 1994, 9050, en 1995, 8698, 7656 en 1996 et 6832 en 1997 (*tabl.7*).

Tableau 7 : La morbidité tuberculeuse humaine en France (17,53).

	<b>1970</b>	<b>1988</b>	<b>1992</b>	<b>1993</b>
<b>Morbidité tuberculeuse humaine ( 17, 53)</b>	31248	9191	9220	9500

La morbidité tuberculeuse humaine en France

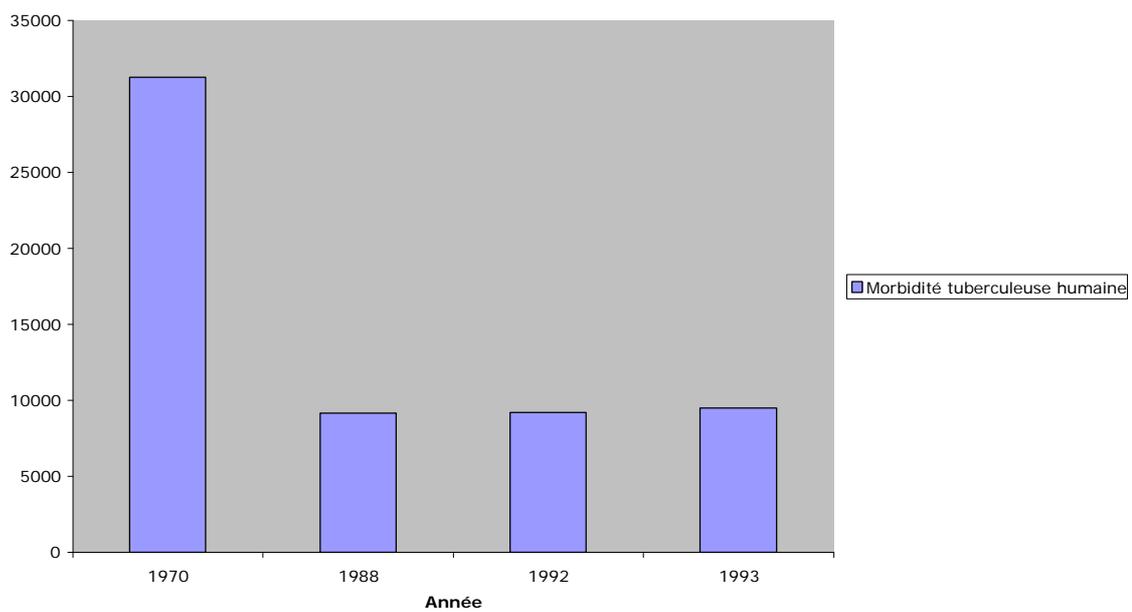


Tableau 8 : Répartition des cas de tuberculose humaine en France

	1993	1994	1995	1996	1997
<b>Alsace</b>	231	198	196	227	194
<b>Aquitaine</b>	223	187	235	205	241
<b>Auvergne</b>	130	118	124	219	70
<b>Basse-Normandie</b>	111	148	113	93	92
<b>Bourgogne</b>	169	175	174	139	121
<b>Bretagne</b>	462	420	366	371	361
<b>Centre</b>	264	263	262	213	212
<b>Champagne-Ardennes</b>	161	138	142	126	92
<b>Corse</b>	0	0	0	17	25
<b>France-Outre-Mer</b>	274	225	240	224	149
<b>Franche-Comté</b>	100	87	65	82	72
<b>Haute-Normandie</b>	185	201	198	181	125
<b>Ile-de-France</b>	4064	4143	3878	3371	2939
<b>Languedoc-Roussillon</b>	219	144	176	149	151
<b>Limousin</b>	63	56	52	60	50
<b>Lorraine</b>	233	176	187	163	165
<b>Midi-Pyrénées</b>	175	148	205	161	122
<b>Nord-Pas-de-Calais</b>	551	463	491	288	270
<b>Pays de la Loire</b>	368	366	259	230	253
<b>Picardie</b>	178	152	147	146	129
<b>Poitou-Charentes</b>	158	178	149	104	88
<b>Provence-Alpes-Côtes d'Azur</b>	726	570	525	496	483
<b>Rhône-Alpes</b>	625	494	514	391	428

### 5.3.3.2 La mortalité humaine (53)

Contrairement à la morbidité humaine, la mortalité décroît. En 1992, 805 décès des suites de la tuberculose ont été répertoriés. Le taux de létalité correspondant est de 9,1%.

### 5.3.3.3 Les régions les plus touchées (53,29)

En 1992, la tuberculose était très présente en Provence-Alpes-Côtes d'Azur avec 17 cas pour 100 000 habitants, en Nord-Pas de Calais avec 14 cas pour 100 000 habitants, en Haute-Normandie avec 12,7 cas pour 100 000 habitants et en Bretagne avec 12,3 cas pour 100 000 habitants.

Entre février 2001 et février 2002, les régions les plus touchées étaient : **Annexe 1**

- la région parisienne
- les territoires d'Outre Mer
- la Bretagne
- l'Alsace
- les Rhône-Alpes
- la Provence-Alpes-Côtes d'Azur.

Le taux de notification dans ces régions était compris entre 7,139 et 26,744 cas pour 100 000 habitants par an durant cette période. Les régions les moins atteintes étaient l'Aquitaine, le Limousin, les Pays de la Loire, les Poitou-Charentes et l'Indre et Loire. Le taux de notification dans ces régions était compris entre 3,459 et 5,250 cas pour 100 000 habitants par an pour la même période.

La carte de l'**annexe 1** illustre cette inégale répartition régionale et l'**annexe 2** les différences départementales. Les chiffres recueillis pour chaque région (*tabl.8*) illustrent la tendance à une diminution de la morbidité humaine.

Cette inégale répartition est géographique et également sociale. Différents facteurs de sensibilité interindividuelle interviennent.

#### 5.3.3.4 Les populations les plus touchées

##### 5.3.3.4.1 L'âge (53)

En 1993, 3 millions de personnes sont décédées des suites de la tuberculose, parmi lesquelles 100 000 enfants de moins de 5 ans. La tuberculose a été responsable cette année là de 7% de la mortalité totale des adultes, de 5,5% de celle des moins de 15 ans, de 47% de celle des 15-44 ans, de 24,5% de celle des 44-64 ans, de 24% de celle des plus de 65 ans. Parmi ces décès, la moitié des moins des 35 ans étaient vaccinés. Les plus de 65 ans forment la tranche d'âge à l'incidence la plus élevée, 24,4 nouveaux cas pour 100 000 habitants.

##### 5.3.3.4.2 Le sexe

68% des décédés précédents étaient de sexe masculin et 38% de sexe féminin.

##### 5.3.3.4.3 La nationalité

63,5% étaient d'origine française et 25% d'origine étrangère dont 68% d'origine africaine.

##### 5.3.3.4.4 La catégorie socioprofessionnelle

Les ouvriers sont les plus touchés.

#### 5.4 L'interprétation de l'augmentation de cette incidence

Plusieurs hypothèses sont émises, parmi lesquelles l'amélioration de la déclaration des cas de la maladie. Depuis 1964, la tuberculose est une maladie à déclaration obligatoire. Les médias semblent également avoir joué un rôle dans la prise de conscience de la recrudescence de la maladie. Les médecins sont plus sensibilisés. Une autre hypothèse repose sur une augmentation de l'immunodépression acquise liée à la pollution.... Et surtout au VIH.

## 6. L'épidémiologie de la tuberculose associée au Sida (26)

L'infection par le VIH a deux effets sur la tuberculose, un effet direct et un indirect (36).

L'effet direct est une diminution de la résistance immunitaire, soit une augmentation de la sensibilité à la maladie. Le VIH est donc responsable d'une augmentation de l'incidence de la tuberculose chez les individus infectés par le VIH. L'effet indirect est une augmentation de la transmission de la tuberculose dans des groupes à haut risque (les individus infectés par le VIH). Cet effet indirect dépend de différents paramètres comme la probabilité de contact, la durée du contact, la dose infectante, la présence ou l'absence de traitement, les caractéristiques de la population à risque. Le VIH augmente le risque de voir une augmentation du nombre de cas à la suite d'une réactivation ou d'une infection.

### 6.1 L'effet direct du VIH

Les stades précoces de la pathologie VIH sont à l'origine d'une susceptibilité accrue à l'agent de la tuberculose. Le risque de développer une tuberculose clinique augmente chez les individus séropositifs pour le VIH et infectés par *M. tuberculosis*. Trois mécanismes peuvent se produire :

- *premier mécanisme* : il y a réactivation d'une infection latente.

- *second mécanisme* : les résistances acquises après une première tuberculose sont diminuées à cause du VIH. Les individus co-infectés par la tuberculose et le VIH sont donc plus vulnérables à une réinfection par *M. tuberculosis*.

- *Troisième mécanisme* : dans des pays de l'Ouest, des personnes VIH positives infectées par la tuberculose avec une forte baisse de l'immunité, exposées à *M. tuberculosis* sont susceptibles de présenter une rapide progression de tuberculose clinique. Le taux de cas grave est élevé et les mycobactéries parfois résistantes dans cette population.

Une personne séropositive pour le VIH, infectée ou réinfectée par le bacille de Koch a presque 100% de risque de déclarer une tuberculose clinique. En comparaison, une personne séronégative pour le VIH a 10% de risque de développer la maladie.

Des études menées à San Francisco et à New-York ont révélé qu'au moins un tiers des cas de tuberculose étaient dus à une infection récente. Le risque de développer une maladie suite à une réactivation ou à une infection récente a augmenté d'un facteur variant entre 6 et 26 selon la population et le pays. En Afrique, la tuberculose est la première des infections opportunistes et la première cause infectieuse de mortalité au cours du SIDA (31). En Afrique, les séropositifs pour le VIH ont 30 fois plus de risque de déclencher une réactivation de la tuberculose. La maladie est alors un processus de progression de l'infection par le VIH. Ils sont aussi plus sensibles à une réinfection exogène et susceptibles de déclencher la maladie. Le fort taux d'infection par le VIH dans une population à forte prévalence d'infection par *M. tuberculosis* et de tuberculose active accélère le dynamisme naturel de l'épidémie de tuberculose.

Le pourcentage de cas de tuberculose directement attribuable à l'infection par le VIH était en 1997 de 16% en Guinée Bissau et de 87% au Rwanda dans les villes. Ces données reposent sur l'hypothèse que le VIH et l'infection par la tuberculose sont distribués indépendamment. En réalité, la co-infection est plus fréquente chez certaines populations comme les toxicomanes utilisant la même seringue, les prisonniers, les individus au niveau socio-économique bas. Malgré cette hypothèse importante, les données obtenues donnent une idée du travail énorme de contrôle de ces deux infections par l'OMS (36).

## 6.2 L'effet indirect du VIH

### 6.2.1 Définition du ARTI

Le risque de transmission de la tuberculose au sein d'une population est mesurée classiquement par le ARTI (Annual Risk of Tuberculosis Infection). Le ARTI estime la probabilité que dans une population donnée un individu soit infecté ou réinfecté par *M. tuberculosis* dans un délai d'un an. Différents facteurs influencent la transmission du bacille au sein d'une population. Il s'agit entre autre de l'intensité et de la durée de l'exposition à *M. tuberculosis*, de l'âge, des statuts immunologique et nutritionnel de l'individu et de la présence d'une infection intercurrente. Une technique a été développée. Elle permet de convertir les données d'études répétées de tuberculine en ARTI. ARTI varie en fait avec l'âge et la période. Des méthodes ont été mises au point pour évaluer l'évolution du ARTI indépendamment de l'âge.

### 6.2.2 L'évolution du ARTI

Quand le ARTI ne diminue pas, la part de la population infectée par *M. tuberculosis* à un certain âge ne varie pas. Le nombre de cas augmente en parallèle de l'augmentation de la population, démontrant la capacité de *M. tuberculosis* à persister dans une population. Des études ont permis de montrer l'existence d'un lien entre le ARTI et le nombre de sources d'infection dans une population. Toute augmentation du ARTI de 1% correspond à 49 nouveaux cas de tuberculose pour 100 000 habitants (avec un intervalle de confiance de 95% pour les 39-59 ans). Si le ARTI diminue chaque année, cela signifie que la prévalence de l'infection chez les enfants et les jeunes adultes diminue. Le nombre de cas diminue donc avec le temps. Dans une population donnée, le nombre moyen d'infections dues à un cas de tuberculose dépend du nombre de cas où il y a des bacilles dans les expectorations (même dans un passé récent) et de la durée moyenne de contagiosité de l'individu initial au contact de la population concernée. Dans le cas d'un ARTI stable, le nombre de nouvelles infections est fonction du nombre de cas où il y a des bacilles dans les expectorations. Toute augmentation du nombre d'expectorations positives aboutira à une augmentation proportionnelle du nombre de nouvelles infections.

Dans les pays industrialisés, en 1997, le ARTI était compris entre 0,1 et 0,3% et diminuait d'environ 10% par an. Il était plus élevé en Afrique Sub-saharienne où il variait entre 1,5 et 2,5%. En Asie du Sud Est, il était de 1 à 2%.

### 6.2.3 Le ARTI et le VIH

Dans les pays industrialisés, il n'y a pas une augmentation proportionnelle du nombre de cas nouveaux et du nombre de co-infectés VIH/tuberculose. Les tuberculoses résultant d'une séropositivité au VIH semblent donc moins infectieuses. Chez les VIH positifs, la proportion de formes extra-pulmonaires est plus grande que chez les VIH séronégatifs. Une étude a été réalisée à Bouaké en Côte d'Ivoire, ville située à 385 kilomètres d'Abidjan et seconde ville du pays par son importance démographique et économique. Sur 327 patients dont 32 enfants, une recherche de la localisation de la tuberculose a été menée (20). 61,1% des VIH séropositifs avaient une tuberculose pulmonaire et 22,6% une forme extra-pulmonaire. 63,4% des séronégatifs présentaient une forme pulmonaire et 20,6% une extra-pulmonaire. Les formes extra-pulmonaires sont moins contagieuses. Les HIV séropositifs pulmonaires sont aussi moins contagieux que les séronégatifs car leurs sécrétions contiennent moins de bacilles.

### 6.3 Les données épidémiologiques

En 1997, selon l'OMS, plus de 4 millions de personnes étaient co-infectées par le HIV et la tuberculose. En 1990, le nombre de tuberculoses dues au VIH était estimé à 300 000, soit 4% du nombre total. L'estimation est de 1,4 millions en l'an 2000, soit 14% des cas. En 1988, 33,4 millions de personnes dans le monde étaient séropositives pour le VIH et un tiers suspectées d'être infectées par *M. tuberculosis*. Dans ce tiers, 10% ont développé la forme ouverte. En 1992, en France, 6,8% des tuberculeux étaient séropositifs. En Afrique Subsaharienne, pour 20 à 70% des nouveaux cas adultes de tuberculose et pour 10 à 40% des cas d'enfants il y a une co-infection avec le VIH. 32% des décès chez les patients atteints du SIDA sont dus à la tuberculose (20).

### 6.4 Les interactions entre la tuberculose et le VIH (31)

Elles sont complexes. Chez les personnes VIH séropositives, la tuberculose est associée à une augmentation de la réplication du VIH. Cette augmentation est peut-être causée par une expression provoquée de cytokines pro-inflammatoires comme facteurs de nécrose des tumeurs. Une autre hypothèse est que le parasitisme par des helminthes communs dans les pays en voie de développement est associé à une activation chronique de l'immunité et à une réponse de type Th2. Cette dernière peut affecter les défenses immunitaires contre le VIH et la tuberculose.

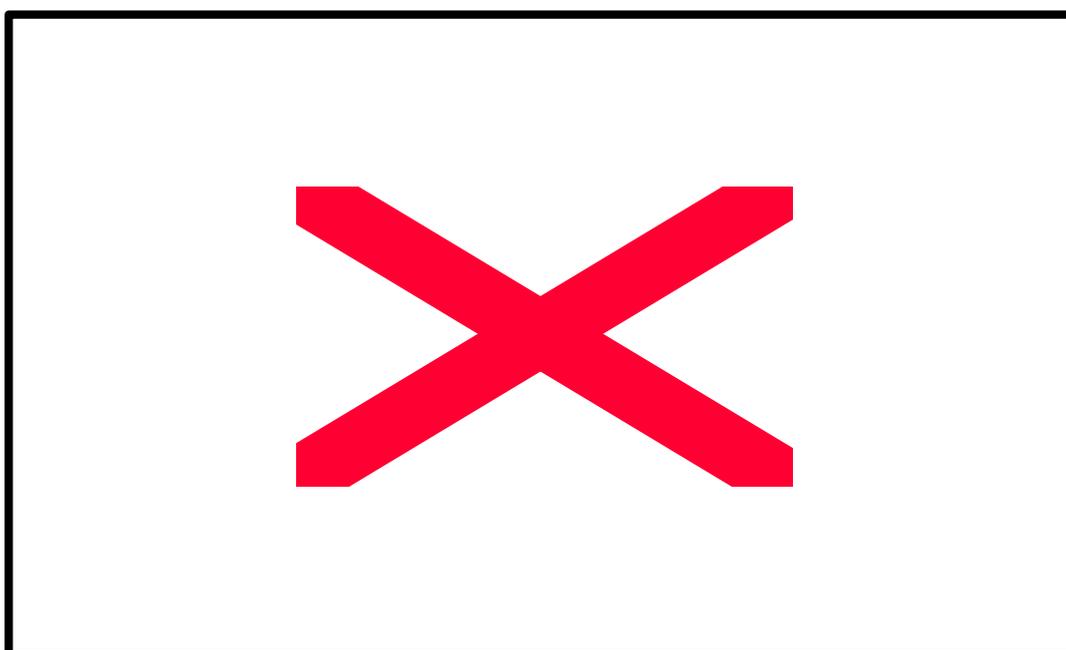
## 7. La tuberculose bovine

La tuberculose animale est largement répandue dans les pays en voie de développement. Elle existe dans 94 des 136 pays tropicaux. Dans ces derniers, les mesures de contrôle ne sont pas appliquées ou ne le sont que sporadiquement. La pasteurisation est peu réalisée. Les données concernant la tuberculose bovine dans les pays en voie de développement sont peu connues.

En Afrique, sur 55 pays, 25 rapportent des cas de tuberculose bovine sporadique, 6 pays une enzootie, 4 aucun cas (cela ne veut pas dire que l'infection n'existe pas). 2 pays, le Mali et la Malawi n'ont pas communiqué de données et 18 n'en ont pas. Dans ces 55 pays, 7 appliquent des mesures de contrôle, 48 font des contrôles partiels ou aucun. Ceux-ci, concentrent 85% du bétail et 82% de la population humaine.

*Tableau 9 : Evolution de l'incidence et de la prévalence annuelles de la tuberculose bovine en France*

	1993 (1)	1994 (2)	1995 (3)	1996 (4)	1997 (5)	1998 (6)
Incidence	461	336	271	268	196	149
Prévalence	1007	807	609	541	439	323



En Afrique du Sud en 1981, la prévalence de la tuberculose bovine était de 0,17%. En 1992, elle n'était plus que de 0,04% (13).

En Asie, 16 pays sur les 36 ont des cas sporadiques, le Bahrain a une enzootie, 10 n'ont pas transmis de rapport sur la tuberculose bovine et 9 n'ont pas de données. 7 pays appliquent des mesures de contrôle strictes (test et abattage) et 29 des partielles. Les pays où la tuberculose est notifiée et les tests et les abattages réalisés concentrent 6% du bétail et moins de 1 % de la population humaine. 94% de la population humaine, 94% du bétail et plus de 99% de la population des buffles en Asie ne sont que partiellement contrôlés pour la tuberculose bovine ou pas du tout.

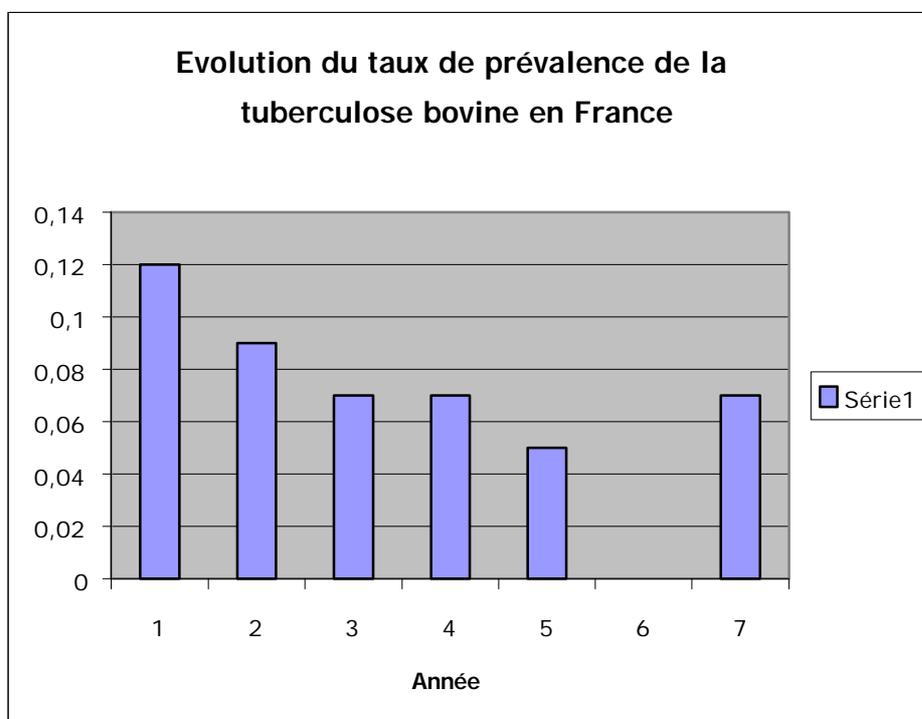
En Amérique latine et dans les régions des Caraïbes, 12 pays sur 34 ont une tuberculose sporadique et/ou une très faible présence de l'infection, 7 une enzootie. En République Dominicaine la tuberculose est très présente. 12 pays ne rapportent pas de cas et 2 autres n'ont pas de données disponibles. Des mesures de contrôle et une politique de dépistage avec abattage sont appliquées dans 12 pays. Dans 22 pays d'Asie la maladie est partiellement ou pas du tout contrôlée. La prévalence régionale est estimée à 1% ou plus pour 67% du bétail, entre 0,1 et 0,9% pour 7% de la population bovine et 26% de cette population est saine. 60% de la population humaine vit dans un pays où le bétail n'est pas contrôlé ou alors partiellement.

En Europe, 6 pays sont officiellement indemnes (Danemark, Finlande, Suède, Pays-Bas, Luxembourg et Allemagne). En Grèce, seule une partie du territoire bénéficie d'un programme d'éradication subventionné par la Commission. En 1988, l'Espagne avait un taux de prévalence de 34,4%. L'Irlande, l'Italie et le Portugal ont encore une proportion d'élevages infectés inquiétante.

En France, la prévalence des élevages infectés a régulièrement diminuée entre 1955 et 1997. Les diminutions de la prévalence et de l'incidence annuelles ont également été constantes (tabl.9).

Tableau 10 : Evolution du taux de prévalence de la tuberculose bovine en France (source Enquête statistique annuelle 1999 DGAL).

	1993 (1)	1994 (2)	1995 (3)	1996 (4)	1997 (5)	1998 (6)	1999 (7)
<b>Taux de prévalence (%)</b>	0,12	0,09	0,07	0,07	0,05	Non disp.	0,07



La connaissance de la prévalence annuelle de l'infection tuberculeuse des cheptels et du nombre annuel de cheptels pris en charge permet de calculer le taux de prévalence défini comme suit :

$$\text{Taux de prévalence} = (\text{prévalence annuelle}) / (\text{nombre de cheptels pris en charge})$$

L'évolution de ce taux est favorable. Depuis 1994, le taux de prévalence annuel en France est inférieur à 0,1% (*tabl.10*). Le taux d'incidence est défini de la même manière :

$$\text{Taux d'incidence annuel} = (\text{incidence annuelle}) / (\text{nombre de cheptels pris en charge})$$

La répartition géographique des élevages infectés de tuberculose en France est comme celle de la tuberculose humaine inégale (**Annexe 3**). En effet, le taux de prévalence présente une variabilité inter-régionale. Les régions les mieux « placées » présentent un taux de prévalence inférieur à 0,1% et les moins bien placés un taux supérieur à 1%. En 1999, 10 régions ont un taux de prévalence annuelle supérieur à 1%.

### **8. La tuberculose zoonotique (37, 10)**

On définit par inter-transmissibilité la possibilité de passage des mycobactéries d'une espèce à une autre. *M. bovis* est l'agent responsable de la tuberculose zoonotique.

Trois catégories de pays sont distinguées :

- **la première catégorie** regroupe des pays qui ont développé un programme d'éradication de la tuberculose chez les animaux. Le programme consiste en un test et un abattage systématiques des animaux infectés. Le résultat est une diminution significative du nombre de cas. Ils sont sporadiques.

- **la deuxième** rassemble des pays où un programme est en route : Australie, Nouvelle-Zélande, Europe de l'est, Israël, Japon, certains pays d'Amérique centrale et du Sud.

- **la troisième catégorie** n'a pas développé de programme d'éradication. Dans ces pays l'incidence est élevée, la maladie de gravité majeure. La tuberculose est un problème de santé publique.

Dans les pays où la tuberculose bovine n'est pas contrôlée, les cas de tuberculose humaine sont plus nombreux chez les jeunes. La contamination se fait surtout par la manipulation et la consommation de lait contaminé. Les signes observés lors d'une tuberculose zoonotique sont une lymphadénopathie cervicale, des lésions intestinales, des lésions cutanées chroniques (lupus vulgaris), des formes pulmonaires et des formes extra-pulmonaires. Mais ces signes peuvent aussi être causés par *M. tuberculosis*. Cliniquement, les tuberculoses à *M. bovis* et à *M. tuberculosis* sont indistinguables. Seules les techniques décrites dans la deuxième partie permettent de les différencier.

## 8.1 Les facteurs de risque (24)

### 8.1.1 Les populations animales

Les animaux domestiques et les animaux sauvages forment un grand réservoir de bacilles. La tuberculose des animaux sauvages pose problème pour les programmes de contrôle et d'élimination de la tuberculose animale. L'augmentation de la consommation humaine de lait a conduit les pays en voie de développement à intensifier la production laitière. En Afrique subsaharienne la demande en lait a augmenté de 2,5% par an de 1970 à 1988. Le nombre d'animaux producteurs a lui aussi augmenté et des races laitières améliorées plus productrices ont été introduites dans ces pays. Ces dernières sont plus touchées par la tuberculose bovine que les troupeaux de zèbres indigènes et les bœufs croisés.

Les conditions et les méthodes d'élevage sont très importantes dans la dissémination de la maladie (points d'eau communs, marchés, ventes d'animaux...). Ces différents facteurs expliquent que les prévalences soient plus élevées dans les régions où la production laitière est intensive. Le manque de surveillance vétérinaire des cheptels dans beaucoup de pays en voie de développement aggrave la situation.

### 8.1.2 Les populations humaines

Les contacts physiques entre les animaux et les hommes potentiellement infectés sont plus étroits dans les pays en voie de développement. En Afrique, le bétail fait partie intégrante de la vie sociale et familiale. Les éleveurs sont très nombreux. 65% des Africains, 70% des Asiatiques et 26% des Américains latins et des Caraïbes travaillent dans l'agriculture. Les

agriculteurs et autres personnes en contact avec les animaux peuvent s'infecter en inhalant des particules expulsées dans la toux du bétail infecté. Ils développent alors une tuberculose pulmonaire typique. Ces malades peuvent ensuite contaminer les animaux encore sains.

### 8-1-3 Les habitudes d'hygiène alimentaire

La consommation de lait contaminé a longtemps été considérée comme la principale source de transmission de la tuberculose de l'animal à l'homme. Les règles d'hygiène alimentaire peuvent considérablement faire baisser la prévalence de la tuberculose zoonotique mais elles sont difficiles à mettre en place. Le plus souvent, dans les régions d'Afrique Subsaharienne, il y a vente directe de lait au consommateur par les éleveurs. Le lait n'est pas pasteurisé ni bouilli. De plus, même si le lait est bouilli, il n'y a pas toujours destruction de *M. bovis*.

### 8.1.4 Le VIH et la tuberculose zoonotique (37)

L'OMS a estimé, en 1996, à 9,4 millions le nombre de personnes co-infectées par le VIH et la tuberculose. Parmi ces derniers, 6,6 millions soit 70% vivaient en Afrique Subsaharienne. En France, *M. bovis* est l'agent de 1,6% des cas de tuberculose chez les séropositifs pour le VIH. Dans tous les cas les souches sont résistantes à l'isoniazide.

### 8.2 Les particularités de l'infection à *M. bovis*

Trois constatations sont faites lors d'infection par *M. bovis*. La transmission d'homme à homme du bacille conduit à la maladie, la période d'incubation est courte et il y a dissémination de *M. bovis* résistant. Cette forme de contamination reste cependant limitée et anecdotique.

### 8.3 L'épidémiologie de la tuberculose zoonotique (37)

Dans les années 1930-1940, la tuberculose bovine était considérée comme une zoonose majeure. *M. bovis* était l'agent principal de la tuberculose humaine. Dans les pays industrialisés, la zoonose à *M. bovis* était très importante avant le contrôle et l'élimination de la tuberculose, grâce entre autre à la pasteurisation du lait. Dans les pays d'Afrique, il y a peu de données disponibles sur la tuberculose à *M. bovis*. On sait que la distribution est large et la

prévalence élevée, mais la distribution, l'épidémiologie et l'impact zoonotique de cette zoonose sont peu connus.

Les données épidémiologiques des tuberculoses ne sont pas complètes car tous les pays n'ont pas mis en place, de façon systématique, le dépistage de celles-ci. Les méthodes de diagnostic disponibles sont multiples et certaines nécessitent peu de moyens financiers et techniques.



## PARTIE II: LE DIAGNOSTIC DE LA TUBERCULOSE

Le diagnostic de certitude de la tuberculose humaine et/ou animale repose sur l'observation, l'isolement et l'identification de l'agent responsable.

### Chapitre I :Le diagnostic clinique et allergique de la tuberculose

#### 1. L'anamnèse et l'examen clinique

Les éléments en faveur d'un diagnostic de suspicion sont:

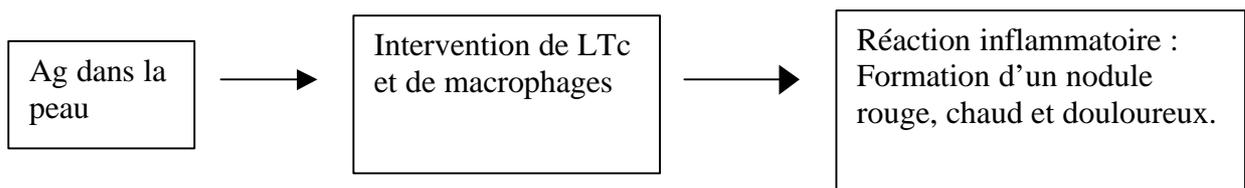
- *dans l'anamnèse* : l'âge, l'habitat, la contagiosité, la vaccination préalable....
- *au cours de l'examen clinique*: une émaciation progressive, une asthénie, de la toux, une respiration dyspnéique avec polypnée, anorexie et amaigrissement, tachycardie, des plaies ulcéreuses, des problèmes oculaires, des abcès...
- *à l'auscultation*: des bruits pulmonaires surajoutés, des bruits d'épanchement, des épanchements pleuraux et/ou péricardiques et un signe du flot positif (ascite)
- *examen complémentaire*: la radiographie pulmonaire.....

#### 2. L'intradermoréaction

##### 2.1 Les objectifs

L'objectif de l'intradermoréaction est de révéler ou non un état spécifique d'hypersensibilité tuberculinique. La réaction tuberculinique et la tuberculose pulmonaire sont des expressions différentes de l'hypersensibilité de type IV (HS IV). La première correspond à une expression localisée et la seconde est une réaction pathologique du système immunitaire.

##### Mécanisme de la réaction tuberculinique :



L'état d'hypersensibilité résulte de la présence d'antigènes spécifiques contenus dans le bacille tuberculeux, dans le BCG ou dans d'autres mycobactéries (atypiques surtout) ayant une parenté antigénique. La réaction d'hypersensibilité à la tuberculine est de type retardée à médiation cellulaire, elle atteint son maximum après 48 à 72 heures (*fig. 4*). Sa présence signifie qu'il y a infection de l'organisme par des mycobactéries vivantes. Si ces mycobactéries sont pathogènes, on est en présence d'une infection par la tuberculose.

## 2.2 Historique de la tuberculation (2)

L'intradermoréaction a été mise au point en 1908 par Mantoux sur les bovins et testé pour la première fois sur les chiens en 1909 par Roussel.

## 2.3 La réalisation (33)

La tuberculine a été découverte en 1890 par Koch. C'est un extrait stérile protéique glycéринé de bacilles de Koch.

### 2.3.1 Les qualités de la tuberculine utilisée

La tuberculine doit être capable de révéler la tuberculose chez des animaux infectés à des doses inopérables sur sujets sains et elle ne doit pas sensibiliser le sujet sain. La tuberculine est titrée et de qualité stable, c'est-à-dire que le titre ne doit pas diminuer avec le temps. Au cours du temps, plusieurs tuberculines ont été utilisées.

### 2.3.2 Les différentes tuberculines utilisées en médecine humaine

#### 2.3.2.1 La tuberculine historique ou la tuberculine brute de Copenhague

Elle est préparée selon une méthode voisine de celle de Koch. Des bacilles sont cultivés sur du bouillon, tués puis concentrés. Cette tuberculine peut provoquer de fausses réactions liées à certains composants du bacille ou du milieu de culture. La tuberculine de Copenhague sert cependant toujours d'étalon de mesure : 1 mL de tuberculine brute représente arbitrairement 100 000U.

#### 2.3.2.2 Les tuberculines purifiées

Elles sont uniquement constituées par les PROTEINES BACILLAIRES : ce sont des tuberculo-protéines. Les tuberculines purifiées sont obtenues après culture de bacilles sur des

milieux synthétiques puis ajout d'une molécule faisant précipiter les protéines. Les tuberculines purifiées obtenues diffèrent par la molécule de précipitation utilisée.

#### 2.3.2.3 La tuberculine PPD-S

La technique de purification est basée sur du sulfate d'ammonium. Cette tuberculine sert également actuellement de mesure-étalon. Pour le dosage, 1 unité PPDS= 1 unité tuberculine brute=1/100mg de tuberculine brute.

#### 2.3.2.4 La tuberculine PPD-RT23 de Copenhague

La molécule utilisée pour faire précipiter les protéines est l'acide trichloracétique. Pour le dosage, 1 unité de PPD-RT23= 3 unités PPD-Standard.

#### 2.3.2.5 La tuberculine PPD de Mérieux

C'est la seule tuberculine disponible en France. Pour le dosage, 1 unité de PPD-RT23= 3 unités PPD-Standard.

#### 2.3.2.6 La tuberculine Pasteur IP48

Elle n'est plus disponible.

### 2.3.3 Les présentations de tuberculine en France

#### 2.3.3.1 L'intradermo-réaction : le test de Mantoux

Une aiguille intradermique à biseau court est utilisée pour faire une injection à l'avant-bras par voie intradermique stricte. La tuberculine se présente avant utilisation sous la forme d'une ampoule de lyophilisat et d'une ampoule de solvant. La tuberculine doit être conservée à température ambiante ou à 4°C tant que la solution n'est pas faite. Dès la mise en solution, l'utilisation doit être immédiate. Lorsque l'injection de tuberculine est bien réalisée, il y a apparition d'une papule d'environ 2 mm de diamètre. Le test de Mantoux est la méthode de référence. La lecture est faite bout de 72 heures en appréciant et en chiffrant le diamètre de l'induration palpée au doigt. L'IDR est positive en pratique quand le diamètre de l'induration est supérieur ou égal à 6mm.

### 2.3.3.2 Le timbre tuberculinique ou Percuti Réaction

#### 2.3.3.2.1 Le Néotest Mérieux

Il se présente sous la forme d'un sparadrap avec deux disques. Un disque supporte les tuberculo-protéines et l'autre disque sert de témoin. Le Néotest doit être appliqué en région sternale sur une peau saine après un nettoyage préalable de la zone à l'éther et la totale évaporation de l'éther. Le timbre est enlevé au bout de 48 heures et la lecture est faite encore 48 heures après, soit 4 jours après la pose du test.

- *La réaction est positive* si le nombre de vésicules formées est supérieur à trois.
- *La réaction est faible* si le nombre de vésicules est compris entre trois et dix ; elle est moyenne si les vésicules sont confluentes et elle est forte s'il y a de nombreuses vésicules confluentes avec un œdème dermique en placard d'un diamètre supérieur à 1,5cm.

#### 2.3.3.2.2 Le test par multipuncture : le monotest Mérieux

Le test se présente sous la forme d'un applicateur muni de 9 pointes recouvertes de tuberculine PPD Mérieux. Après nettoyage à l'éther, l'avant-bras est empoigné de façon à tendre la peau de la face antérieure et une pression ferme de l'applicateur est exercée pendant deux secondes. L'empreinte circulaire de l'applicateur et des neuf pointes doivent apparaître nettement. La lecture est faite à la 72<sup>ème</sup> heure.

Le résultat est positif quand une induration est perçue à la palpation, soit à partir de 2mm. Le Néotest Mérieux et le Monotest Mérieux sont les tests indiqués chez l'enfant car la peau est plus tendre et la peur plus grande.

Ces deux tests sont des tests d'approche pour un contrôle pré ou post vaccinal.

### 2.3.4 Comparaison des différentes présentations disponibles en France

Le monotest est au moins aussi sensible que l'IDR mais le pourcentage de faux positifs est important. Le monotest doit donc être confirmé par une IDR dans un cadre diagnostique.

- Les tuberculines sont utilisables pour les intradermoréactions simples et comparées.

## 2.4 Les indications de la tuberculination chez l'homme

Il y a deux indications de la tuberculination, le contrôle de l'allergie pré et post vaccinale par le BCG.

### 2.4.1 Le contrôle de l'allergie pré-vaccinale

Ce contrôle est nécessaire car une infection tuberculeuse préalable pourrait ne pas être connue. La vaccination serait alors inutile, et l'apparition d'une tuberculose ultérieure considérée comme consécutive à la vaccination. Mais ce contrôle est inutile chez le nouveau-né.

#### **Il existe un problème :**

Lors d'une infection tuberculeuse les réactions adénopathiques précoces sont fréquentes mais vite régressives. Il y a donc des faux négatifs à ce contrôle.

Les sujets infectés présentent alors un profil particulier de la lésion vaccinale :

Il y a une apparition précoce et importante de la lésion vaccinale au 4<sup>ème</sup> jour, puis une diminution de la réaction. Chez les non infectés, il y a une augmentation progressive de la lésion vaccinale, elle atteint son diamètre maximal la 8<sup>ème</sup> semaine (10mm en moyenne).

### 2.4.2 Le contrôle post-vaccinal

Il doit être réalisé entre 3 et 12 mois après la vaccination.

## 2.5 Le diagnostic avec les IDR (33)

Le degré de l'hypersensibilité est d'autant plus important et durable que le nombre d'organismes viables injectés est grand. Mais il n'y a pas de rapport avec le degré d'immunité conféré. Le délai nécessaire à l'apparition d'une hypersensibilité varie de trois semaines à deux mois après une infection par le bacille de Koch. Le délai est plus long avec le BCG chez un individu anergique, il peut atteindre deux à trois mois et parfois plus. La durée de l'hypersensibilité est variable. Elle est en moyenne d'une dizaine d'années après un BCG en l'absence de contact tuberculeux ou de revaccination. La diminution voire une disparition de l'allergie tuberculique (= anergie tuberculique) s'observe au cours de certaines maladies notamment lors d'une infection par le VIH.

### 2.5.1 Cas d'un individu non vacciné

C'est le cas le plus simple : si l'IDR est positive, l'individu est infecté.

### 2.5.2 Cas d'un individu vacciné

Deux cas sont possibles :

\* soit on possède une IDR chiffrée et fiable de référence : si le diamètre de l'induration est de 10mm en pratique, l'infection tuberculeuse est très probable.

\* soit on ne possède pas d'IDR de référence : si la vaccination date de plus d'un an et que l'IDR provoque une lésion de diamètre supérieur ou égal à 14mm, l'infection tuberculeuse est très probable et encore plus si la lésion est phlycténulaire.

Des IDR trop répétées peuvent avoir l'effet de rappel et augmenter la réaction. Une lésion d'IDR de diamètre compris entre 6 et 12mm chez un individu non immunodéprimé peut aller de pair avec une tuberculose évolutive. Une intradermoréaction négative n'élimine pas le diagnostic de la tuberculose.

## 2.6 Les IDR chez les animaux : les IDS et les IDC

### • Les tuberculines :

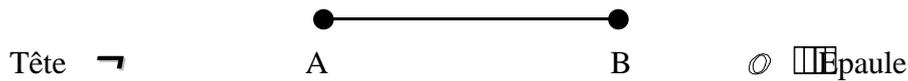
La CEE a défini une « tuberculine Standard Communautaire » dont le titre est exprimé en « Unités Communautaires de tuberculine » par mL (UCT/mL). Deux tuberculines sont utilisées. Ce sont la tuberculine bovine normale ou Tuberculine bovine PPD (titre : 20 000UCT/mL) et la tuberculine bovine forte (titre : 100 000UI/mL). La dernière est réservée au dépistage en milieu infecté; la sensibilité est meilleure.

• **Méthode** : Les intradermoréactions simples (IDS) avec les tuberculines bovines ou faibles sont réalisées de la même manière que les intradermoréactions comparatives (IDC) : injection de 0,1mL de tuberculine. Elle se fait avec une seringue. Le dosage est précis et la pénétration strictement intradermique et complète. L'injection est précédée d'une coupe à ras des poils et de la mesure du pli de peau au point d'injection à l'aide d'un cutimètre.

• **Localisation :**

Les IDS sont faites au tiers moyen d'une des faces de l'encolure et à mi hauteur. Les autres lieux ne sont pas autorisés en France car la sensibilité est inférieure.

Pour les IDC, 2 tuberculines différentes, aviaire et bovine sont injectées à 2 points distants d'environ 15 cm, au même moment, sur la face latérale de l'encolure.



*Légende :*

A : site d'injection de tuberculine aviaire

B : site d'injection de tuberculine bovine

AB=15 cm

• **Lecture :**

Elle est faite dans les heures qui suivent la 72<sup>ème</sup> heure (Point de réaction maximale). La réaction allergique est tardive, progressive et durable. L'inflammation aboutit à une tuméfaction chaude, rouge et douloureuse, circulaire ou elliptique. Lorsque la réaction est très forte, un exsudat suintant, entouré par une zone hémorragique (c'est une zone de nécrose) peut être observée. Son dessèchement aboutit à un escarre. Une lymphangite tronculaire et/ou une adénite des ganglions pré scapulaires peuvent être associés.

**Les schémas décisionnels sont les suivants:**

**- Pour les IDS :**

La réaction est positive si l'augmentation d'épaisseur du pli cutané atteint ou dépasse 4 mm. Entre 2 et 4 mm, elle est douteuse et en dessous elle est négative.

**- Pour les IDC :**

• Si  $B > 2$  mm.

Deux cas se présentent :

- \*  $B - A > 4$  mm, la réaction est positive
- \*  $B - A$  entre 2 et 4 mm, la réaction est douteuse
- \*  $B - A < 1$  mm, la réaction est négative
- \*  $B = 2$  mm, la réaction est négative

Pour un cheptel, un diagramme est réalisé. A chaque point correspond la distance pour un animal. La dispersion du nuage de points permet de conclure.

### - Comparaison des IDS et IDC

La sensibilité des IDC est plus faible que celle des IDS. Leur spécificité est par contre plus Grande ; de 0,98 à 0,96 contre 0,70 à 0,95.

## Chapitre II : Les méthodes de différenciation (Annexe 4)

La mise en évidence de la présence de mycobactéries se fait par l'examen direct au microscope du prélèvement (par exemple du mucus provenant du tractus respiratoire d'un patient) après coloration de Ziehl-Neelsen.

### 1. Les méthodes classiques

Les techniques les plus couramment utilisées dans les laboratoires de microbiologie sont l'identification des mycobactéries par les caractéristiques morphologiques, leurs conditions de croissance et des tests biochimiques (7).

#### 1.1 Les caractéristiques morphologiques

##### 1.1.1 La morphologie

###### 1.1.1.1 *M. tuberculosis*

*M. tuberculosis* est un bacille fin légèrement incurvé de 2 à 5µm de long sur 0,2 à 0,3µm de large et aux extrémités arrondies. Il est immobile, acapsulé et asporulé.

Dans les produits pathologiques, *M. tuberculosis* se présente sous différentes formes: isolé, en amas, sous forme de corde ou de torsade. Parfois, on observe des formes cocccï des ou très longues mais cela reste exceptionnel. Enfin, on peut observer des formes en L ou des sphéroplastés.

###### 1.1.1.2 *M. bovis*

*M. bovis* est habituellement plus court et plus trapu que *M. tuberculosis*.

###### 1.1.1.3 *M. bovis* BCG

*M. bovis* BCG a les mêmes caractéristiques que *M. bovis*. C'est une souche particulière de *M. bovis*.

###### 1.1.1.4 *M. africanum*

*M. africanum* a les mêmes caractéristiques morphologiques que *M. tuberculosis*.

## 1.1.2 La coloration

### 1.1.2.1 La coloration de Ziehl-Neelsen

La méthode de Ziehl est la méthode de référence. *M. tuberculosis* est difficilement colorable par les colorants usuels (gram et bleu). Coloré en rouge à chaud par la fuchsine phéniquée de Ziehl ou à froid par la fuschine phéniquée de Kinyoun, il garde la coloration malgré les actions décolorantes de l'alcool et de l'acide. Le fond de la préparation est coloré au bleu de méthylène. Les bacilles apparaissent alors rouges sur un fond bleu (*Fig.3*). Cette propriété tinctoriale est commune à toutes les mycobactéries et repose sur la présence d'acides mycoliques. Après une coloration de Ziehl-Neelsen de colonies âgées de *M. bovis*, on observe souvent deux granulations subpolaires rouge foncé. Il faut noter la particularité de *M. tuberculosis*, il y a une acquisition du caractère acido-alcoolrésistance au cours de la maturation des mycobactéries. Les formes jeunes de *M. tuberculosis* ne sont pas acido-alcoolrésistantes alors que les formes matures le sont. Sous l'action de certains antibiotiques ce caractère peut disparaître, par exemple sous l'action d'isoniazide, d'éthionamide, de pénicilline à forte concentration. Les mycobactéries du complexe *M. tuberculosis* peuvent également être colorées par de l'auramine phéniquée.

*Figure 3 : Photographie de M. bovis après coloration de Ziehl-Neelsen (Photo Pr Picavet).*

### 1.1.2.2 La coloration à l'auramine phéniquée

L'auramine se fixe à froid sur les mycobactéries et les rend fluorescentes lors d'une exposition à la lumière U.V, malgré les actions décolorantes de l'acide et de l'alcool. La coloration à l'auramine permet une lecture de la lame au faible grossissement et donc, une exploration plus rapide et sur une plus grande surface qu'à l'immersion. Cette technique est plus sensible que la coloration de Ziehl-Neelsen. Quand l'examen microscopique est positif, c'est la méthode la moins coûteuse et la plus rapide. Cependant, cette méthode est peu spécifique ( toutes les mycobactéries sont acido-alcoolorésistantes) et peu sensible (il faut plus de 10000 bacilles/mL de produit pathologique pour les mettre en évidence). La valeur prédictive positive de cette coloration est de 50%. Le manque de sensibilité explique le recours à la culture des mycobactéries.

## 1.2 La culture des mycobactéries

La culture est l'élément de référence auquel sont comparées les autres méthodes. Cette technique d'identification est dépendante des conditions de culture et du milieu. Dans de bonnes conditions, tout bacille viable donne naissance à une colonie. Les mycobactéries peuvent être classées en fonction de leur temps de génération, qui varie de 2 à plus de 200 heures. Elles peuvent aussi être classées en fonction de leur vitesse de croissance ; on distingue alors les mycobactéries à croissance lente (formation de colonies après 7 jours de culture et mycobactéries incapables de former des colonies sur des milieux standards) et les mycobactéries à croissance rapide (formation de colonies en moins de 7 jours et à croissance possible sur gélose nutritive ou peptonée).

### 1.2.1 Les caractéristiques des milieux de culture

#### 1.2.1.1 Le milieu de Lowenstein-Jensen

Il a comme composition des sels minéraux, de l'asparagine, de la glycérine (0,75%), du vert malachite (un antiseptique) et de l'œuf. Il est solidifié par coagulation à 85°C pendant 50 minutes.

Dans un milieu de Lowenstein-Jensen, le temps de division de *M. tuberculosis* est de 20 heures pour une incubation à 37°C. La méthode d'ensemencement de *M. tuberculosis* dans ce milieu dépend du produit pathologique que l'on veut mettre en culture:

- Dans le cas de produits non contaminés comme du liquide pleural, du liquide céphalo-rachidien, l'ensemencement est direct sur tube.

- Dans le cas où il y a une flore associée, une décontamination préalable du produit est nécessaire. Cette décontamination est liée au fait que d'autres germes poussent sur les mêmes milieux.

#### 1.2.1.2 Les milieux gélosés

Ce sont des milieux gélosés semi-synthétiques (Middle brook) nommés 7H10 et 7H11. Ils sont composés de sels minéraux, de glucose, de la fraction V d'albumine bovine, d'acides aminés, de pyruvate de sodium, de catalase...

Les milieux gélosés sont rarement utilisés pour la bactériologie de routine. La croissance des colonies de *M. tuberculosis* est bonne sur ces milieux gélosés dans une atmosphère contenant 10% de CO<sub>2</sub>.

Les cultures sur milieu solide sont lentes mais spécifiques.

#### 1.2.1.3 Les milieux liquides

Il existe 4 milieux liquides. Ce sont le milieu de Sauton, le milieu de Youmans, le milieu de Dubos et le dispositif MB Check.

#### 1.2.1.4 Le milieu de Sauton

C'est un milieu de culture totalement synthétique. Ses constituants principaux sont des sels minéraux, de l'asparagine et de la glycérine. Ce milieu est utilisé pour la production du B.C.G. et pour la préparation de la tuberculine.

#### 1.2.1.5 Le milieu de Youmans

Il a la même composition que le milieu de Sauton avec en plus 10% de sérum de boeuf. 10<sup>e</sup>-6 mg de bacilles donneront de nouvelles colonies au bout de 5 à 7 jours, avec un maximum de 3 semaines. Ces colonies présenteront la particularité d'être composées de bacilles accolés les uns aux autres. On obtient des amas en torsade ou en corde (Les bacilles se multiplient en restant accolés).

Il est composé de sels minéraux, d'hydrolysate de caséine, de glucose, de fraction V, d'albumine bovine et d'un agent mouillant, le tween 80. La culture n'est pas granuleuse mais homogène.  $10^6$ -6 mg de bacilles donneront en 5 à 7 jours un dépôt blanchâtre, en 7 à 10 jours 50 millions de cfu (1mg/mL), en 3 semaines 2 mg de bacilles/ mL mais il y aura une grande proportion de morts. On obtient des bacilles isolés en amas de 4 à 10 bacilles. Le dérivé moderne du milieu de Dubos est le milieu 7H9.

Les milieux 7H9 et de Dubos sont des milieux de choix pour la préparation de suspensions homogènes de *M. tuberculosis* pour des travaux expérimentaux.

Les avantages et les inconvénients des différents milieux de culture sont présentés dans le tableau 12.

#### 1.2.1.6 Le milieu BACTEC (23)

##### •Description :

Il s'agit d'un liquide contenant de l'acide palmitique marqué au carbone 14 comme source de nutriments.

##### •Intérêts du BACTEC :

Le marquage permet de vérifier l'absence d'inhibiteurs de croissance des mycobactéries et de mesurer la croissance mycobactérienne en mesurant le volume de CO<sub>2</sub> marqué. En effet, cette libération de gaz est proportionnelle à la croissance bactérienne. Cette mesure est quantifiée et permet de définir un index de croissance compris entre 0 et 999.

Des courbes de référence ont été tracées pour différentes mycobactéries par mesure automatique de l'index. La comparaison d'une courbe avec celles de référence permet de mettre en évidence la présence d'inhibiteurs ou de médicaments dans le prélèvement.

Tableau 11 : Avantages et inconvénients des différents milieux de culture.

	<b>Avantages</b>	<b>Inconvénients</b>
<b>Lowenstein-Jensen</b>	- grande sensibilité.	- sa sensibilité varie avec le produits utilisés pour sa préparation, notamment les œufs.
	- aspect caractéristiques des colonies obtenues.	- préparation relativement longu et difficile.
	- prix de revient relativement faible.	- conservation de courte durée (1 3 mois). - conservation à +4°C.
<b>Milieux gélosés</b>	- la sensibilité est un peu supérieure à celle du milieu de Lowenstein-Jensen.	- prix de revient élevé.
	- parfaitement transparents, ils permettent un repérage à l'œil nu des colonies.	
<b>Milieu de Youmans</b>	- netteté de la culture.	
	- précocité des résultats.	

### 1.2.1.7 Les milieux de culture commerciaux

#### **Principe :**

Il existe différents systèmes de culture commerciaux. Par exemple le BD Probe Tec ET System commercialisé par BD Biosciences (4).

L'efficacité du BD Probe Tec ET System pour la détection directe de mycobactéries du complexe *M. tuberculosis* a été testée chez des patients atteints d'une forme respiratoire. Les résultats ont été comparés à ceux obtenus avec les méthodes de culture conventionnelles sur le système BACTEC 460 TB et Middlebrook 7H11 biplates.

#### **•Description du BD Probe Tec ET System :**

Il s'agit d'un système semi-automatisé produit et commercialisé par le laboratoire Sparks Md. L'indication est la détection rapide des mycobactéries dans des échantillons respiratoires. Ce système associe une amplification d'acides nucléiques et la détection d'un transfert d'énergie fluorescente. La sensibilité obtenue à partir d'échantillons d'expectorations, de salive, d'aspiration trachéale, de fluides de lavage broncho-alvéolaire ou bronchique est de 87,5%, la spécificité de 99%, la Valeur Prédictive Positive de 70% et la Valeur Prédictive Négative de 99,7%. Ces données sont issues d'une étude indépendante. Les mycobactéries identifiées par ce système sont les mycobactéries du complexe *M. avium*, *M. kansasii* et *M. goodii*.

La contamination minimale pendant la manipulation dans le BD Probe, la conservation à température ambiante, au réfrigérateur ou au congélateur du matériel, les réactifs prêts et le fait que les manipulations peuvent être faites dans la même pièce, sont des avantages non négligeables. Par contre, il peut y avoir une contamination croisée pendant la préparation des échantillons.

## 1.2.2 Les particularités de culture de *M. tuberculosis*

### 1.2.2.1 L'oxygénation

*M. tuberculosis* est aérobic stricte. Toute diminution de la concentration en oxygène entraîne un ralentissement de la culture. C'est ce qui arrive dans les lésions caséeuses.

#### 1.2.2.2. La température

La température de croissance optimale de *M. tuberculosis* est comprise entre 35 et 37°C. Si la température est inférieure à 30°C ou supérieure à 41°C, la croissance est totalement inhibée.

#### 1.2.2.3 Le pH

Le pH optimum est de 6,7. La culture est possible pour un pH compris entre 4,8 et 8.

#### 1.2.3 Les particularités de culture de *M. bovis*

La glycérine a un effet défavorable sur la croissance de *M. bovis*. Cette particularité est d'ailleurs utilisée pour identifier *M. bovis*. 4% de glycérine dans le milieu inhibe la croissance des colonies de *M. bovis*, alors que 0,75% (concentration du milieu de Lowenstein- Jensen) n'a pas d'effet néfaste. La culture sur milieux solides est spécifique mais lente. Elle nécessite plus de 3 semaines. La culture en milieu liquide nécessite la moitié de ce temps.

### 1.3 Identification des mycobactéries par les caractères biochimiques (Annexe 1)

L'étude de la croissance des mycobactéries sur différents milieux de culture permet de dresser un tableau de caractéristiques biochimiques permettant leur identification. L'identification de la souche isolée et l'antibiogramme nécessitent sensiblement les mêmes délais. Le diagnostic de certitude de la tuberculose, qui comprend l'observation, l'isolement et l'identification nécessite des délais assez longs.

#### 1.3.1 La respirométrie radiométrique

Cette méthode utilise deux critères, l'IG et l'effet des inhibiteurs.

Avec cette méthode, la source d'énergie fournie aux mycobactéries est de l'acide palmitique dont les atomes de carbone sont radioactifs ( $^{14}\text{C}^*$ ). Le métabolisme du substrat marqué aboutit au rejet de  $\text{CO}_2$  marqué. La connaissance du volume de  $\text{CO}_2$  permet d'évaluer la croissance des mycobactéries, en comparant la courbe radiométrique obtenue à celles de référence.

• **étude de l'effet des inhibiteurs:** la présence ou l'absence de croissance des mycobactéries en présence de diverses substances dépend des spécificités d'espèces (23). Si on ajoute dans le milieu (par exemple 7H12) des antibiotiques, la sensibilité est mesurée par

l'inhibition de croissance. Quand une souche est sensible à l'antibiotique ajouté, la croissance microbienne est inférieure à celle du témoin.

La comparaison d'une courbe avec les courbes de références obtenues dans les mêmes conditions de culture permet de différencier et de faire une identification sommaire des mycobactéries.

### 1.3.2 Etude de l'association BACTEC-inhibiteurs (23)

L'ajout d'inhibiteurs dans le milieu de BACTEC permet, toujours en comparant à des courbes de référence, de différencier les espèces *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis* et *M. bovis* BCG à l'intérieur du complexe *M. tuberculosis*.

5 microgrammes par mL de p-nitro-alpha-acétyl-amino-beta-hydroxypropionone peuvent être utilisés comme inhibiteur. L'étude de la croissance de *M. tuberculosis* (H37RV), *M. bovis* (ATCC 19210), *M. africanum* (ATCC 25420), de neuf lots de souches de BCG, deux isolats cliniques, dix ou plus d'isolats cliniques identifiés par les méthodes conventionnelles ont abouti à la conclusion suivante : cette méthode permet un début d'identification mais les méthodes conventionnelles restent les seules à pouvoir confirmer l'identification. L'utilisation de ce système repose sur la connaissance des caractéristiques de croissance des mycobactéries.

### 1-3-3 Délais de culture

Les méthodes citées ci-dessus sont lentes et complexes. Depuis une quinzaine d'années, de nouvelles techniques de biologie moléculaire se sont développées. Il s'agit de techniques basées sur l'amplification du génome et sur la recherche de fragments génomiques spécifiques d'espèce (cf partie III).

### 1.4 La chromatographie

Elle est basée sur l'analyse des acides mycoliques ou la recherche d'acide tuberculostéarique. L'analyse des acides mycoliques est très peu sensible. La recherche d'acide tuberculostéarique est sensible mais pas spécifique. La méthodologie est *LOURDE et TRES COUTEUSE*.

## 1.5 Les inoculations

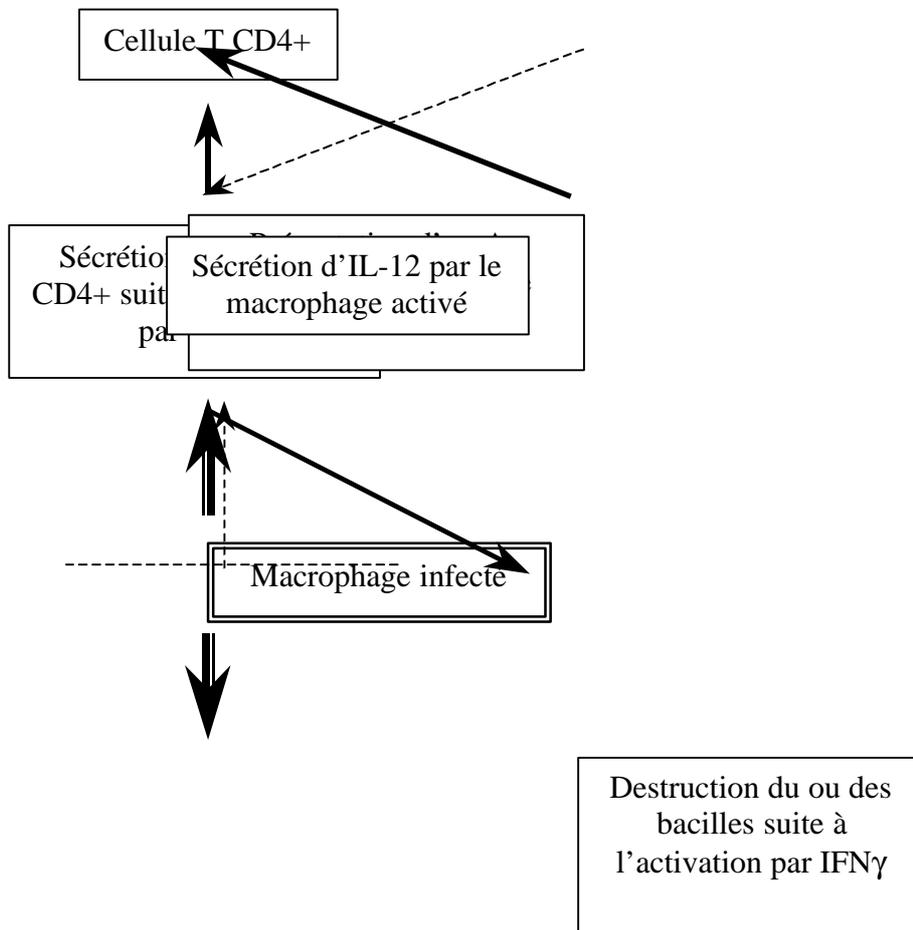
Les mycobactéries *M. tuberculosis* et *M. bovis* inoculées à un cobaye provoquent une infection systémique et *M. avium* (bacille de type aviaire) une localisée. Les résultats obtenus avec *M. tuberculosis* et *M. bovis* sont les suivants:

- en 8 à 10 jours, il y a apparition d'un nodule, puis ulcération (ulcère à fond caséeux).
- enfin, une réaction généralisée des nœuds lymphatiques provoque la mort du cobaye (mort au bout de quelques mois).

A l'autopsie, on observe des lésions caractéristiques d'adénite caséuse.

L'inoculation par voie intraveineuse à un lapin de *M. avium* et de *M. bovis* induit une infection systémique et celle de *M. tuberculosis* une infection pulmonaire seulement. L'inoculation à un poulet par voie intraveineuse de *M. tuberculosis* et de *M. bovis* ne provoque pas d'infection, celle de *M. avium* est responsable d'une infection systémique. A l'autopsie, on observe des lésions caractéristiques d'adénite caséuse chez les espèces qui ont des nœuds lymphatiques. L'inoculation présente l'inconvénient d'être lente.

Figure 4 : réponse à médiation humorale lors de la tuberculose



*Légende*

- Conséquence
- - - - -> Sécrétion
- Activation

## 2. Les méthodes sérologiques

### 2.1 L'immunité contre la tuberculose

Le système immunitaire est un système formé d'organes et de cellules dont le rôle est de défendre l'organisme contre des antigènes (Ag). On appelle un antigène (Ag) une molécule capable de provoquer une réaction immunitaire. Deux types de mécanismes sont possibles, la réponse à médiation humorale et celle à médiation cellulaire. La défense de l'organisme est assurée par différentes cellules de l'immunité parmi lesquelles les lymphocytes T, les lymphocytes B, les cellules non présentatrices d'antigènes (également appelées molécules accessoires) et les cellules présentatrices d'antigènes.

- *La réponse à médiation humorale* : Les principaux intervenants sont les lymphocytes B (LB). Ils produisent des protéines appelées anticorps ou immunoglobulines.

- *La réponse à médiation cellulaire* : Les lymphocytes T sont dans ce cas responsables d'une inflammation, de cytotoxicité et de phagocytose.

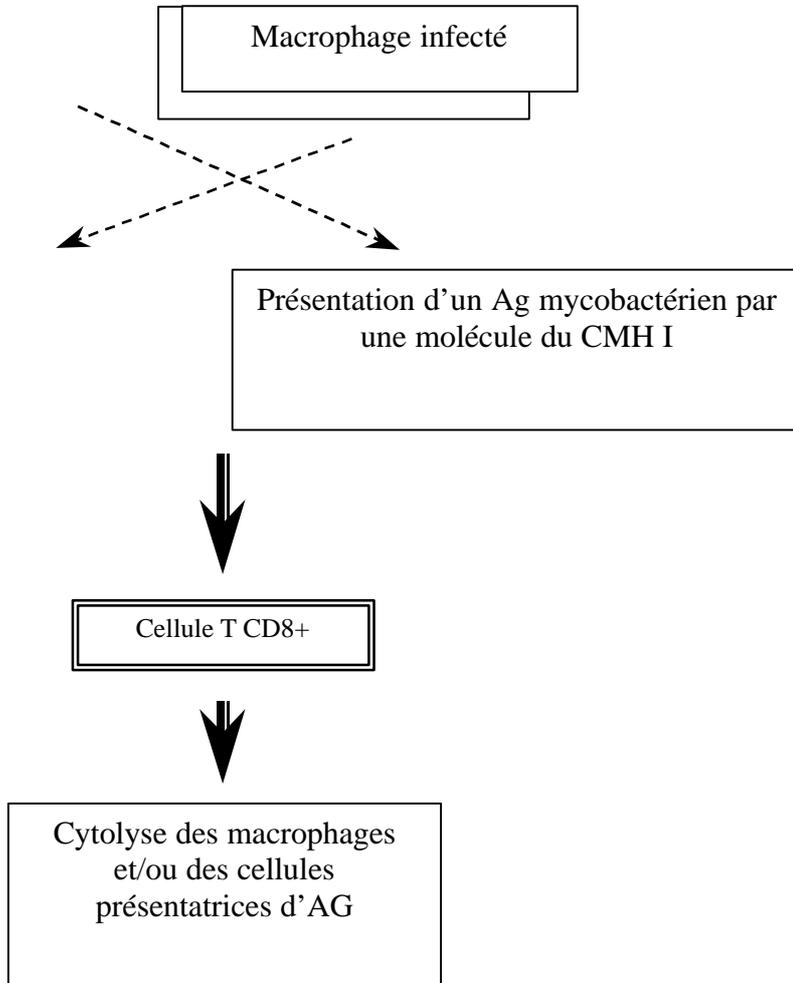
Les lymphocytes T matures à leur sortie du thymus expriment des molécules appelées CD4 ou CD8. Ces dernières reconnaissent une autre catégorie de molécules, les molécules du CMH I et/ou du CMH II. La complémentarité des molécules du CMH I/CMH II et du CD4/CD8 et leurs interactions sont essentielles.

Le CMH est le Complexe Majeur d'Histocompatibilité Les molécules du CMH I et du CMH II sont exprimées par les cellules présentatrices d'Ag (CPA) et accessoires. Un des rôles de ces molécules est de présenter des Ag mycobactériens.

Le TCR regroupe un ensemble de récepteurs appelés TCR localisés sur les lymphocytes T. Leur structure est un peu différente de celle du CMH de classe II. Ils sont associés au complexe CD3 qui a un rôle de transduction du signal. Les TCR ne reconnaissent que des Ag présentés par des cellules présentatrices d'Ag.

Les lymphocytes B reconnaissent directement les antigènes.

Figure 5: réponse à médiation cellulaire lors de la tuberculose

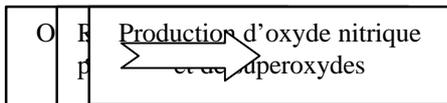


L'infection par des mycobactéries et la présentation d'Ag pathogènes par les CPA entraînent une activation des LT CD4 ou CD8. Ces LT activés sont alors détruits et des cytokines inhibitrices de la présentation d'Ag par les CPA et anti-inflammatoires sécrétées (IL10, TGFβ).

Les LT CD4+ sont des lymphocytes T auxiliaires (LTa) caractérisés par un marqueur CD4+. Celui-ci est un élément du TCR, il reconnaît l'Ag de classe II du CMH. La présentation d'un Ag provoque leur activation, leur multiplication et la production de cytokines. Les LTa activés peuvent produire deux types de cytokines correspondant au type Th1 dite de type 1 (IL2 et IFNγ sont les principales cytokines) et au type Th2 (IL4, IL13, IL5) (fig.4).

Les LTc CD8+ : Ces lymphocytes T dits cytotoxiques (LTc) portent un marqueur CD8 reconnaissant les Ag de classe I du CMH. (fig 5). Le mécanisme de cytolyse (fig 6) aboutit à la destruction des cellules activées.

Figure 6: Mécanisme de la cytolyse :



## 2.2 Les tests envisageables

### 2.2.1 Le test utilisant les anticorps anti P-90 et A-60.(1)

P-90 est un complexe antigénique commun à *M. tuberculosis* et à *M. bovis BCG*. Il induit une réponse à médiation humorale faisant intervenir les cellules CD4+ et CD8+ (fig.4).

#### • Données expérimentales :

Le complexe P-90 induit une réponse à médiation humorale chez le lapin. Les cellules de la rate et des nœuds lymphatiques de souris immunisées au préalable par voie intrapéritonéale

par le *BCG* ou par *M. leprae* montrent une augmentation de l'incorporation de thymidine tritiée quand P-90 est ajouté au milieu de culture.

• **Données cliniques :**

La synthèse d'immunoglobulines G dirigées contre P-90 a été étudiée chez des patients atteints de la lèpre et de la tuberculose. Cette synthèse est augmentée de façon importante quand il y a une infection par l'agent de la lèpre ou de la tuberculose. Une étude donne pour cette technique une VPP (Valeur Prédictive Positive) de 0,75 et une VPN (Valeur Prédictive Négative) de 0,678.

Le sérodiagnostic peut être fait en utilisant un autre antigène appelé A-60. Cette méthode est plus sensible que la méthode utilisant les anticorps anti P-90 chez les patients avec des lésions cavitaires par rapport aux lésions non cavitaires, c'est-à-dire les formes non productives. Les raisons de cette meilleure sensibilité des tests sérologiques dans le cas d'une forme ouverte ne sont pas bien connues. Une hypothèse avancée est que la forme d'immuns complexes et/ou l'inhibition de clones lymphocytaires spécifiques peut être responsable du phénomène.

Un problème se pose. Il concerne le moment du prélèvement de sang par rapport à l'arrivée des symptômes. Le titre en IgG est augmentée de façon significative chez les patients environ deux mois après l'apparition des symptômes. La sensibilité du test pourrait donc être meilleure en répétant le test quelques semaines plus tard. De plus, le taux d'IgA anti P-90 lors d'une tuberculose active est supérieure au même taux lors d'une tuberculose latente.

• **Spécificité et sensibilité :**

En ce qui concerne les Ac anti A-60 et les autres, le titre diminue avec la thérapie. Le pourcentage de sujets montrant une persistance de titre élevé après le traitement est variable selon les auteurs.

Les Ac anti P-90 ne sont pas spécifiques de la tuberculose. Il peut donc y avoir des réactions croisées avec des mycobactéries de l'environnement d'où un risque de faux négatifs. La spécificité du test utilisant P-90 est très variable et peut atteindre 97,7%. La

sensibilité, quant à elle, peut augmenter jusqu'à 45,4% avec un Odds Ratio de 0,356. De la même façon, selon le OR, la spécificité et la sensibilité des tests avec A-60 sont variables.

**•Utilisation des tests sérologiques :**

L'interprétation des tests sérologiques doit donc être soigneuse et faite en parallèle avec la finalité envisagée (traitement...).

2.2.2 Le test de recherche des anticorps anti ESAT-6 et CFP-10 (39)

2.2.2.1 Définition des anticorps

ESAT-6 (Early Secretory Antigen Target) et CFP-10 (Culture Filtrate Protein 10) font partie du complexe spécifique antigénique de *M. tuberculosis*. Les deux sont localisés dans la région chromosomique appelée RD1 et n'existent pas chez la souche BCG et chez la plupart des mycobactéries atypiques. Ces antigènes sont donc des marqueurs potentiels utilisables pour le diagnostic immunologique.

2.2.2.2 Principe du test

La stimulation des cellules mononucléées sanguines périphériques de donneurs en bonne santé vaccinés ou de patients tuberculeux (forme extra-pulmonaire ou pulmonaire) induit la production d'IFN gamma chez un grand nombre d'individus testés. La plupart des patients tuberculeux ont répondu à une stimulation avec ESAT-6 ou CFP-10, alors que la proportion de donneurs non tuberculeux ayant répondu était très faible.

- 81,8% des patients avec une forme tuberculeuse extra-pulmonaire ont répondu

- 76,2% des patients atteints d'une tuberculose pulmonaire ont répondu.

Différentes études ont confirmé que la spécificité du diagnostic de la tuberculose pulmonaire utilisant les antigènes ESAT-6 et CFP-10 est meilleure que celle basée sur des tests cutanés, alors que la sensibilité est la même.

2.2.2.3 Les sensibilité et spécificité des tests

Avec la valeur limite de 300pg/mL (IFNgamma), les tests utilisant ESAT-6 ou CFP-10 ont une sensibilité de 76% chez des patients à tuberculose extra-pulmonaire et 77% dans le cas de la tuberculose pulmonaire. La sensibilité basée sur le test cutané avec une valeur limite de 2700pg/mL est de 64% pour la tuberculose extra-pulmonaire et 86% pour la tuberculose pulmonaire. Cependant, la spécificité de ESAT-6 et CFP-10 (94%) pour des patients

donneurs vaccinés par le BCG, en bonne santé, est supérieure à celle du test cutané pour le même groupe de donneurs. Le test sanguin immunologique de diagnostic de la tuberculose contenant ESAT-6 ou CFP-10 donne de bons résultats pour les formes extra-pulmonaires ou pulmonaires de tuberculose active. Par ailleurs, la combinaison des deux (ESAT-6 et CFP-10) augmente la sensibilité du test.

### 2.3 Avantages et inconvénients des sérologies

Les techniques sérologiques sont peu coûteuses, techniquement faciles et rapides à réaliser. Par contre, le diagnostic sérologique dépend de l'antigène et de la classe d'immunoglobuline utilisée.

### 3. Les méthodes de biologie moléculaire (6, 9, 32)

Ce sont des techniques de typage des membres du complexe de *M. tuberculosis*.

Le nombre, la localisation, la variabilité des séquences flanquantes et des sites de restriction génèrent du polymorphisme dans le génome.

Les polymorphismes de l'ADN sont classés en RFLP, Minisatellites et microsatellites.

- *Les RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ou polymorphismes de restriction :*

Ce sont les premiers marqueurs génotypiques découverts (1978). Ils correspondent à des variations ponctuelles de séquence touchant un site de restriction.

- *Les minisatellites ou VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) :*

Ce sont des polymorphismes de restriction dus à des différences dans le nombre de copies de séquences répétées en tandem et dont le motif de base est d'une longueur supérieure à 10 nucléotides. Leur découverte date de 1985.

- *Les microsatellites ou STR (Short Tandem Repeats) :*

Leur découverte date de 1989, c'est une deuxième catégorie de polymorphisme de répétition où le motif de base répété en tandem est plus court (1 à 5 nucléotides).

### 3.1 Le génome des mycobactéries du complexe *M. tuberculosis* (30,50)

- **longueur :**

Le génome complet de *M. tuberculosis H37RV* est connu. Il est composé de 4411529 bp, 162 nucléotides différents ont été répertoriés. La longueur moyenne d'un gène est de 1012 bases.

- **nombre de gènes :**

Le nombre de gènes codant pour les protéines est de 3918. Le nombre d'ARN structuraux est de 54. *M. tuberculosis CDC 1551* (ou *CSU#93*) a un ADN de 280 nucléotides codant pour 4187 protéines. Le complexe de *M. tuberculosis* a un acide nucléique de 2103 nucléotides correspondant à 14580 protéines.

- **% CG :**

Toutes les mycobactéries présentent la particularité d'avoir un pourcentage de bases Guanine (G) et Cytosine (C) compris entre 61 et 71%. Seul *M. leprae* a un pourcentage de G-C compris entre 54 et 57.

Deux équipes de généticiens , celle de Stewart Cole (Institut Pasteur de Paris ) et celle de Bart Barrel (Centre Sanger au Royaume Uni) ont décrypté intégralement le génome du bacille de Koch. Ce décryptage a nécessité deux ans de travail. 4000 gènes ont été déchiffrés, soit 4 411 526 paires de bases.

Les techniques utilisant l'ensemble du génome sont les premières à avoir été développées.

Elles font intervenir l'ensemble de l'information génétique. Le principal inconvénient réside dans la difficulté d'extraction de l'ADN. C'est aussi une technique non automatisable.

### 3-2 Les enzymes de restriction

#### • **Définition :** (32)

Les enzymes de restriction sont des endonucléases. Elles coupent de façon définie et reproductible l'ADN double brin. Les gènes ou fractions de gènes obtenus sont isolables. On parle de phénomène de restriction, d'où le nom des enzymes.

Les enzymes de restriction sont scindées en trois groupes :

- Les enzymes de type I s'arrêtent 1 000 ou 5 000 paires de bases plus loin que la séquence reconnue et libèrent quelques dizaines de nucléotides.
- Celles de type II coupent l'ADN au niveau de la séquence reconnue (la séquence comprend en général 4 à 8 bases).
- Les enzymes de type III coupent une vingtaine de nucléotides plus loin que la séquence.

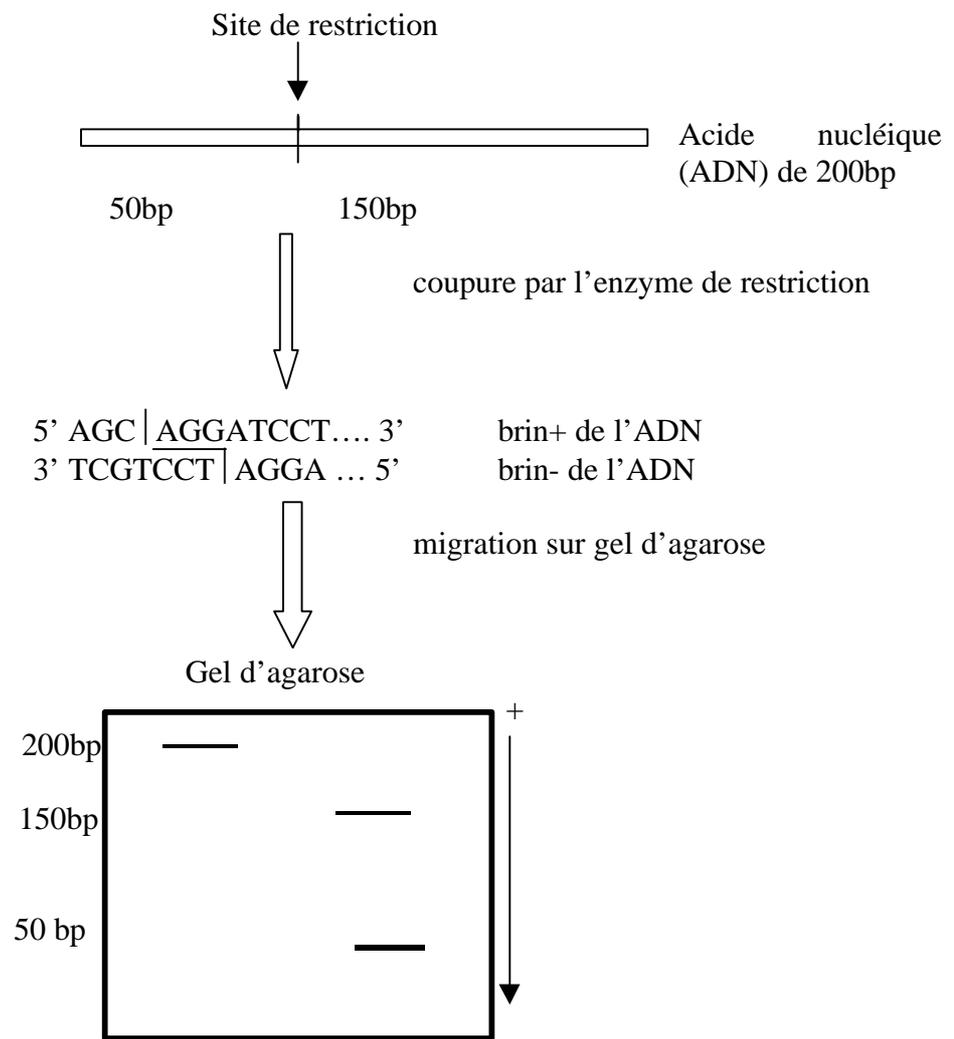
#### • **protocole** (fig.7) :

La digestion par une endonucléase du chromosome d'ADN, suivie de la séparation par électrophorèse sur gel permet de comparer la taille des différents fragments obtenus.

#### • **résultats :**

Les différentes enzymes de restriction aboutissent à l'obtention de nombreux et courts fragments. Il existe un nombre limite de fragments. Quand la digestion enzymatique aboutit à un trop grand nombre de fragments, les gels d'électrophorèse sont difficiles à interpréter et les comparaisons difficiles à faire. Une méthode utilisant un Southern blot simplifie l'analyse. La méthode de Southern a été découverte en 1975. L'hybridation d'une sonde marquée et spécifique avec des fragments de restriction d'ADN séparés au préalable par électrophorèse et transférés sur une membrane permet de les visualiser. Le Southern blot permet de révéler la présence et la taille de séquences d'ADN spécifiques. Certaines séquences, appelées séquences d'insertion, sont répétées un nombre variable de fois selon l'espèce de mycobactérie. Ce sont ces différents éléments qui peuvent être utilisés pour différencier *M. bovis* et *M. tuberculosis* ou typer différentes souches d'un même genre.

Figure 7 : Protocole d'utilisation des enzymes de restriction



### 3.3 Enzymes de restriction et électrophorèse en champ pulsé

Certaines enzymes de restriction coupent le génome peu fréquemment. On obtient peu de grands fragments (1000 kb environ). Avec cette méthode, les grands fragments obtenus sont séparés par migration sur gel. La séparation et la discrimination des fragments se fait grâce à un champ électrique alternatif. Ce procédé est appelé « électrophorèse en champ pulsé » ou PGFE (Pulse Field Gel Electrophoresis). Les enzymes utilisables pour cette technique sont par exemple : XbaI, SpeI, DraI... (21). Cette technique est rarement utilisée pour les mycobactéries du complexe *M. tuberculosis*. C'est une technique difficile.

### 3.4 Les techniques utilisant une partie du génome

Ces techniques reposent pour la plupart sur l'analyse de fragments obtenus par PCR. La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une amplification élective d'une séquence d'ADN double brin. Elle est effectuée in vitro par extension itérative de deux amorces situées de part et d'autre de la région considérée, grâce à une DNA polymérase. L'amplification est effectuée par la répétition de cycles de dénaturation/ hybridation/ extension qui assure une duplication exponentielle de chaque brin.

De nombreux gènes cibles peuvent être utilisés, mais également des séquences répétées de gènes. Des logiciels permettent de déterminer les conditions optimales d'hybridation (par exemple le logiciel oligo5...) c'est-à-dire la longueur des primers (nombre de nucléotides) et la séquence de ces primers, la température optimale d'hybridation. Les résultats obtenus par différentes équipes de chercheurs sont rassemblées dans des banques de données. Cette mise en commun des découvertes mondiales et leur mise à la disposition des chercheurs permet une avancée plus rapide des connaissances génétiques.

Des séquences d'insertion sont ainsi amplifiées spécifiquement. Les différences du nombre de répétitions des séquences selon les différentes mycobactéries du complexe de *M. tuberculosis* permettent de différencier ces mycobactéries.

La sensibilité de la PCR varie entre 86 et 100%, la spécificité entre 98 et 100%. Ces écarts-types dépendent des liquides physiologiques utilisés pour la détection des mycobactéries (49). Le seuil de détection d'ADN est de 10fg d'ADN pour *M. tuberculosis* par

réaction, soit environ 2 mycobactéries. Ce seuil est valable lors d'une combinaison PCR/hybridation.

Les PCR présentent l'inconvénient de pouvoir être inhibées par certaines substances présentes notamment dans le pus, le mucus ou dans les tissus de biopsie. Les échantillons doivent donc être au préalable traités au chloroforme phényle. La PCR permet donc non seulement la détection mais également l'identification des mycobactéries.

#### 3.4.1 Les répétitions de séquences spécifiques répétées non en tandem

Exemples de "séquences répétées cibles" pour des mycobactéries appartenant au complexe de *M. tuberculosis* : IS6110 et IS 1081

##### 3.4.1.1 L'élément d'insertion IS 6110

Il a été isolé en 1988 par Eisenach et al à partir de *M. tuberculosis*. C'est la séquence d'insertion la plus importante identifiée dans le complexe *M. tuberculosis*. IS 6110 est une séquence d'insertion (IS) de 1361 paire de bases. Cette séquence est bien caractérisée:

- elle a une homologie avec la famille IS 3 des *enterobacteriaceae*,
- elle est presque identique à IS 986,
- IS 6110 a d'abord été isolé et identifié comme IS 986 et IS 987 avant que les deux éléments ne soient reconnus comme identiques et appelés IS 6110. Son polymorphisme repose sur la localisation et le nombre de copies (*fig.8*).

##### 3.4.1.2 Utilisation de IS 6110

Les mycobactéries du complexe *M. tuberculosis* et les différentes souches d'un genre de ce complexe montrent du polymorphisme génétique (*tabl.12* et *réf.9,13*). Le nombre d'IS6110 et donc la longueur des fragments obtenus par RFLP et la position chromosomique de IS 6110 sont variables. Le polymorphisme lié au nombre en a fait l'élément d'identification des mycobactéries du complexe *M. tuberculosis*. Cette variation de nombre résulte de recombinaisons.

La comparaison de cette séquence chez plusieurs souches présentes dans une communauté permet d'identifier ou non une identité génotypique (47). La découverte d'une

identité génotypique de souches provenant d'hôtes apparemment sans lien signifie que ce sont des variants d'un même clone et d'un progéniteur commun.

Un index de similarité supérieur à 80% indique qu'il y a eu dissémination de cet ancêtre commun. Les souches les plus présentes en Asie ont des caractères retrouvés dans beaucoup de souches d'Afrique du Sud. Deux hypothèses peuvent être émises. Il y a eu deux routes d'infection dans une communauté rurale ou des modifications génomiques telles que l'ancêtre commun n'est plus reconnaissable.

L'étude de la dynamique de la maladie dans un endroit donné nécessite des échantillons nombreux et variés. L'analyse est meilleure lorsque les échantillons sont bien sélectionnés dans un lieu donné.

#### 3.4.1.3 L'élément d'insertion IS 1081 (52)

Il a été isolé chez *M. bovis* où il se trouve répété 6 fois. Le polymorphisme des IS 1081 chez les mycobactéries du complexe *M. tuberculosis* est limité. La différenciation des souches avec IS 1081 est donc impossible. Collins et Stephens ont montré en 1991 que IS1081 n'est pas utilisable pour différencier les souches de *M. bovis* quand IS 1081 est utilisé comme sonde pour analyse par RFLP.

#### 3.4.2 La région directe répétée : spoligotyping

Le spoligotyping est une recherche de polymorphisme génétique d'espaces dans les régions DR. La région DR est une répétition de segments de nucléotides de 36 paires de bases séparés par de courts espaces. Ces régions DR sont amplifiées par PCR et les segments obtenus analysés. C'est la première technique PCR à être largement acceptée par les chercheurs. Les produits amplifiés sont ensuite hybridés avec des oligonucléotides, chacun correspondant à l'un des 43 espaces uniques de séquences d'ADN présents dans les régions DR qui ont été séquencés chez les différentes mycobactéries du complexe *M. tuberculosis* (tabl. 13). Il s'agit d'une technique appelée «reverse line blot hybridation». La détection des segments d'ADN hybridés est faite par un système de chimioluminescence. En fonction de l'hybridation ou non des 43 séquences, on peut typer les mycobactéries.

Tableau 12 : nombre de copies de IS 6110 chez différentes mycobactéries.

	nombre de copies de IS6110 dans le génome
<i>M.tuberculosis</i>	10 à 20
<i>M. bovis</i>	1
<i>M. bovis BCG</i>	1

Figure 8: Localisation sur la carte génomique de *M. tuberculosis* H37Rv, des séquences d'insertion (18)

Légende :

*Mbp* : paires de Mégabases

*IS* : séquence d'insertion

Tableau 13 : nombre d'espaceurs chez les mycobactéries

	Nombre d'espaceurs entre les séquences
<i>M. tub ssp tub</i>	43
<i>M. bovis</i>	38

Figure 9 : Localisation sur la carte génomique de *M. tuberculosis* H37Rv des PGRSs. (18)

Légende :  
Mbp : paires de Mégabases

### 3.4.3 séquences riches en C-G (PGRS) et polymorphisme de restriction

PGRS est une séquence répétée riche en guanine-cytosine (G-C). Les mycobactéries ont une séquence génomique et des plasmides très riches en Guanine (G) et en Cytosine (C). Ainsi, les premières recherches développées sur les PGRS l'ont été sur le plasmide pTBN12.

Par exemple, G et C constituent 66% du génome total de *M. tuberculosis* (18). Les séquences polymorphes riches en Guanine (G) et en Cytosine (C) sont réparties dans tout le génome (fig.9). Souvent, les amorces utilisées pour les transcriptions contiennent plusieurs fois ces séquences.

## 3.5 Les techniques utilisant la totalité du génome

### 3.5.1 Loci de répétitions en tandem à grand polymorphisme : les minisatellites disséminés (ou VNTR)

Les VNTR ont été découverts en 1985 par Jeffreys. Ce sont des séquences répétitives, dispersées et très polymorphes. Ces minisatellites disséminés constituent une famille de séquences répétées en tandem. Ils présentent un motif central de 11 à 16 paires de base.

L'ADN contenant un nombre variable de séquences répétées en tandem est amplifié par PCR et la taille du produit déterminé après migration sur gel. Le polymorphisme entre souches des VNTR permet d'obtenir une empreinte génétique.

Meeker-O'Connel et al ont identifié récemment 6 loci appelés ETR-A, ETR-B, ETR-C, ETR-D, ETR-E, et ETR-F. Le polymorphisme génétique de ces loci permet de typer les mycobactéries du complexe *M. tuberculosis* (fig.10). VNTR serait moins discriminatoire que RFLP-IS 6110 pour les souches avec un grand nombre de copies, mais permettrait la discrimination des souches avec 1 ou 2 copies de IS6110. La reproductibilité de cette méthode est de 97%. La sensibilité est un peu moins bonne que celle du spoligotyping.

*Figure 10 : Localisation sur la carte génomique de M. tuberculosis H37Rv, de séquences répétées (18).*

*Légende :*

*Mbp : paires de Mégabases*

*ETR : extra-tandem repeat sequences*

### 3.5.2 Les microsatellites

Dans le cas des microsatellites, le motif de base est très court, il ne dépasse que rarement quelques nucléotides.

MPTR est une séquence en tandem de 10bp séparées par des espaces hétérogènes de 5bp. La séquence est identique dans la région DR : 10bp de régions DR séparées par un espace unique d'ADN de 5bp. Le nombre de MPTR a été estimé à 80 par génome. Les MPTR ne sont pas spécifiques au complexe *M. tuberculosis*. Ils ont été identifiés chez *M. kansasii* et *M. goodii*. Dans le complexe *M. tuberculosis*, les MPTR présentent peu de polymorphisme suite à une RFLP et la séquence seule ne permet pas le typage. Par contre, la combinaison IS6110 et MPTR appelée « ampliprinting » est une technique de typage décrite pour la première fois chez *M. tuberculosis* par Plikaytis et al. La distance entre les éléments IS6110 et les copies des séquences MPTR amplifiées par PCR sont comparées et servent au typage par « ampliprinting ».

### 3.5.3 Autre technique utilisée

C'est une technique utilisant une partie du génome mais non basée sur une PCR.

#### • **Protocole :**

-*première étape* : le génome est digéré par 2 enzymes de restriction (PvuII et AluI) et les produits de la digestion séparés par électrophorèse sur gel d'agarose.

-*deuxième étape* : réalisation d'un Southern-blot de l'ADN sur film de nitrocellulose ou de nylon.

•**Technique du Southern-blot** : Une sonde marquée et spécifique s'hybride avec des fragments de restriction d'ADN préalablement séparés, dénaturés et transférés sur une membrane.

-*troisième étape* : ajout de marqueurs ou de sondes spécifiques d'un fragment de l'ADN à isoler. Après hybridation, seuls les fragments intéressants et donc hybridés seront visualisés. La réduction du nombre de fragments à analyser facilite l'expérience.

-*quatrième étape, la visualisation* : il y a quelques années, la visualisation était rendue possible par incorporation de <sup>32</sup>P radioactif (oligonucléotides marqués au <sup>32</sup>P\*) visible lors

de l'exposition à des rayons X. Actuellement, la préférence est donnée aux méthodes non radioactives.

- **Problèmes posés par cette technique :** Le choix des éléments d'ADN qui révéleront un polymorphisme chez différentes souches est primordial.

### 3.6 Choix de la technique

Certaines techniques sont standardisées, d'autres non.

#### 3.6.1 Techniques standardisées pour typer les mycobactéries

RFLP (IS 6110) est la technique la plus utilisée, c'est la méthode standardisée. Elle est rapide, reproductible (elle permet les comparaisons de résultats entre laboratoires) et stable. En revanche, elle est onéreuse, difficile techniquement et nécessite une culture de mycobactéries.

Pour *M. tuberculosis*, l'association IS6110-RFLP est la méthode de choix. Pour *M. bovis*, le *tableau 14* présente les points positifs et les points négatifs des techniques.

- **Réalisation technique :**

Le spoligotyping est la technique la plus facilement réalisable car la plus simple. REA et PFGE requièrent de l'expérience et de l'adresse pour produire des gels de qualité. RFLP se situe entre ces deux extrêmes.

- **Interprétation des résultats :**

Les résultats du spoligotyping et du VNTR sont des résultats quantitatifs donc faciles à interpréter qui peuvent aussi être analysés par ordinateur. Les comparaisons entre laboratoires sont possibles. Les techniques de gels sont plus difficiles à interpréter. La REA demande de l'expérience pour l'interprétation. Les résultats de la RFLP dépendent de la qualité des gels. Les difficultés peuvent surgir quand les différences sont minimales.

#### 3.6.2 Techniques de typage de *M. bovis* (tabl.14)

Les techniques pour typer *M. bovis* ne sont pas standardisées. Le choix de la technique se fait surtout en fonction des circonstances (12).

- **IS 6110 :**

La possibilité de typer *M. bovis* à partir de la séquence d'insertion IS 6110 a été longuement étudiée. Le nombre de copies varie selon les espèces, et beaucoup de souches de *M. bovis* isolées chez des bovins n'en contiennent qu'une copie.

- **RFLP-IS 1081 :**

Collins et Stephens ont montré en 1991 que IS 1081 n'est pas utilisable pour différencier les souches de *M. bovis* quand IS 1081 est utilisée comme sonde pour l'analyse par RFLP.

Par contre, le polymorphisme de IS 1081-RFLP permet de faire la différence entre *M. bovis* BCG et les autres souches de *M. bovis*.

- **Séquences répétées riches en CG ou (CA)<sub>n</sub>/(GT)<sub>n</sub>:**

Ce sont les microsatellites les plus fréquents et les mieux caractérisés.

Des auteurs donnent les références de différentes études qui ont conduit à conclure que le RFLP des séquences riches en Cytosine et en Guanine est la méthode recommandée comme la méthode de choix, quand la différenciation des souches de *M. bovis* est nécessaire et que le génome comprend moins de 3 copies de IS 6110 (12). Cependant, c'est une technique difficile et la reproductibilité faible est un facteur limitant.

Les RFLP-CG doivent être menées par du personnel expérimenté (10).

- **Autres techniques possibles :**

La combinaison des résultats de plusieurs RFLP est souvent utile, à condition que les sondes ne soient pas génétiquement liées. En combinant 3 techniques (IS 6110, IS 1081 et les séquences CG), Gutierrez et al ont pu identifier 28 types RFLP différents. Il existe une autre combinaison possible, la combinaison des sondes. Herrera et al (27) ont proposé une PCR-multiplex pour différencier les mycobactéries du complexe *M. tuberculosis* des mycobactéries atypiques dans un premier temps, puis *M. tuberculosis*, *M. bovis* et *M. bovis* BCG dans un second temps. L'utilisation combinée des enzymes de restriction gr6EL et mtp40 ainsi que

Tableau 14 : présentation des points positifs et négatifs des techniques pour typer M. bovis

<b>technique</b>	<b>Points positifs</b>	<b>Points négatifs</b>
<b>REA</b>	Donne la plus grande discrimination	Problèmes d'interprétation
<b><u>Technique RFLP :</u></b> <b>PGRS-RFLP</b>	Donne la plus grande discrimination	Nombreuses sondes requises pour séparer au maximum les types
<b><u>Technique PCR :</u></b> <b>spoligotyping</b>	Discrimination modérée	
<b>VNTR</b>	Études en cours : Bons espoirs pour la discrimination	

l'étude du nombre d'IS6110 permet de déterminer les mycobactéries. De nombreuses autres combinaisons sont proposées dans la littérature, celle-ci n'est qu'un exemple.

- **ampliprinting :**

L'ampliprinting avec IS 6110 est utilisable mais les données sur la sensibilité et la reproductibilité varient beaucoup d'un article à l'autre.

- **spoligotyping et M. bovis :**

Cette technique pour la différenciation de souches de *M. bovis* a été critiquée.

Des auteurs (12) indiquent que le spoligotyping est recommandé pour un criblage rapide d'isolats et doit être suivi d'une technique plus sensible et plus spécifique comme PGRS-RFLP. Des études sont actuellement en cours pour déterminer l'efficacité de cette technique pour le diagnostic et un typage rapide après une culture radiométrique de mycobactéries.

- **microsatellites**

Des évaluations de cette méthode montrent qu'une combinaison de VNTR et du spoligotyping donne de bons résultats.

- **Coût :**

- *REA* : cette technique nécessite du matériel (une électrophorèse), elle est longue et nécessite du personnel expérimenté. RFLP : le matériel et les oligonucléotides sont onéreux. (autoradiographie, luminescence chimique).

- *Spoligotyping* : les amorces et le matériel pour la réalisation des PCR sont onéreux. La méthode sur gel VNTR est la moins coûteuse.

### 3.7 trousse de détection des séquences nucléiques

Des kits de diagnostic sont commercialisés. Ils amplifient puis hybrident les produits obtenus avec des sondes spécifiques marquées. La visualisation de l'hybridation est faite par la coloration d'un précipité, par la mesure de densité optique, par luminescence ou par de l'électro-chimiluminescence. On distingue deux types de trousse, les trousse génériques et les spécifiques. Les premières permettent « la détection de tout produit obtenu par

amplification génique quelle que soit la cible recherchée ». Les dernières identifient un agent pathogène ou un système de typage donné.

### 3.8 Les difficultés de typage des mycobactéries

Le typage est plus difficile que pour les autres bactéries à cause de leur croissance très lente et du peu d'ADN disponible rapidement (sauf par PCR). De plus, peu d'agents sont utilisables pour la multiplication de leur ADN.

Enfin, le risque de contamination du personnel de laboratoire n'est pas négligeable.

# **PARTIE III : LES APPORTS DE LA BIOLOGIE MOLECULAIRE**

Des variations génomiques restreintes et bien définies peuvent être à l'origine de grandes variations phénotypiques. La sensibilité et la spécificité des techniques de biologie moléculaire permettent d'améliorer les connaissances sur les agents étiologiques et l'infection elle-même.

## **Chapitre I : L'élucidation d'étapes clés du cycle infectieux**

### **1. Les gènes et les sources d'énergie des bacilles**

Une grande partie du génome du bacille code pour des enzymes qui détruisent les lipides. Cette découverte a conduit à émettre l'hypothèse que la source d'énergie du bacille pourrait être des lipides des membranes cellulaires du malade. Empêcher l'action de ces enzymes pourrait nuire au bacille et avoir un effet thérapeutique.

### **2. Détermination des protéines d'adhésion**

Même si les antibiotiques sont importants pour combattre l'infection, la compréhension de l'interaction entre l'hôte, les bacilles et son écologie est primordiale.

Le mécanisme de l'infection par le bacille de Koch n'est pas complètement élucidé. La biologie moléculaire en permettant la synthèse de bactéries mutantes dépourvues de certains gènes a fait progresser la recherche. Une bactérie mutante dépourvue d'une protéine appelée HBHA (Heparin-Binding Haemagglutinin Adhesine) a été mise au point (44). Cette protéine est membranaire. La comparaison de l'infection par le bacille de Koch ou par le bacille mutant a permis de déterminer le rôle de la protéine HBHA chez la souris. Elle permet l'adhésion des bacilles aux pneumocytes, leur traversée et la dissémination dans l'organisme.

## **Chapitre II : l'épidémiologie moléculaire (9, 43, 44, 51)**

Le contrôle de la transmission de la maladie est un des objectifs des plans de contrôle et d'éradication de la tuberculose (43). Les techniques de biologie moléculaire sont utilisables en épidémiologie. En identifiant les différentes souches de *M. tuberculosis* impliquées, la compréhension de la pathogenèse est meilleure. Les études utilisant ces techniques sont nombreuses. L'hybridation par Southern Blot utilisant les séquences d'insertion comme IS6110 permet de détecter du polymorphisme génétique chez des isolats cliniques. La stabilité de ces éléments dans les chromosomes des mycobactéries est élevée. Ce marqueur génétique est donc largement utilisé. Les analyses phénotypiques ne sont ni assez sensibles ni assez spécifiques pour déterminer l'individu ou l'animal initiateur d'une infection. En revanche, les marqueurs génétiques permettent de détecter une transmission de bacilles entre voisins, en prison ou dans une famille.

L'observation de patients d'une même région, infectés par une même souche de *M. tuberculosis* indique une contamination récente sauf dans le cas d'une population rurale et stable. Lorsque des patients développent une tuberculose active pour la deuxième fois, deux mécanismes sont possibles (44). Une réinfection par une souche non mise en évidence lors de l'infection initiale doit être différenciée d'une réactivation de l'infection initiale.

Jusqu'à récemment, on pensait que la majorité des cas était le résultat d'une réactivation de la maladie. L'analyse du polymorphisme de fragments génomiques a infirmé cette idée. Il s'agit souvent, chez les adultes, de primo-infections qui ont évolué en maladie. Des études par RFLP de communautés à New-York, San Francisco, Berne et au Danemark ont révélé que 25 à 40% des cas sont dus à des infections récentes. A Amsterdam, Seattle, Melbourne la transmission entre individus serait causée par des cas non détectés (9).

### **1. Identification ou confirmation d'une chaîne de transmission**

Si le nombre de copies de la séquence d'insertion IS 6110 des souches de *M. bovis* est supérieur à trois, le RFLP est utilisable pour des études épidémiologiques (10). S'il est égal à trois, il faut coupler plusieurs méthodes. L'analyse des IS 6110 seuls a permis de montrer que les *M. bovis* du bétail d'Argentine, d'Australie, d'Irlande et du Royaume-Uni ne contiennent qu'une copie de IS 6110. Les chèvres d'Espagne, les animaux exotiques de zoo et de la faune sauvage de Nouvelle-Zélande, les bisons et les cerfs d'Amérique du Nord et le bétail de

Tanzanie en contiennent plusieurs. Ces connaissances sont utilisables pour connaître approximativement l'origine des animaux infectés. Des RFLP ont également permis de confirmer la transmission nosocomiale dans de nombreuses villes. Des mesures de décontamination des hôpitaux ont pu être prises (46). La dramatique épidémie de tuberculose à souches résistantes chez des patients atteints du Sida a finalement été identifiée par des études épidémiologiques. La transmission en chaîne a été confirmée par RFLP.

## **2. La lutte contre l'infection (9, 46)**

Des études RFLP ont révélé que des réactions croisées au laboratoire sont responsables de résultats faussement positifs. Les patients concernés reçoivent alors un traitement inutile. L'Institut National de Santé Publique et de Protection Environnementale des Pays-Bas a estimé à environ 3% le pourcentage de patients traités inutilement dans ce pays à cause de ces faux positifs. La diminution du risque d'émergence de souches résistantes entre dans la lutte contre l'infection, la surveillance des populations à risque également.

La surveillance (IS 6110) de certaines populations a permis la détection de cas variés de transmission non suspectée. Une étude chez les sans domicile fixe (SDF) à Melbourne et à Amsterdam a montré la prédominance de polymorphisme particulier. A Berne, une souche unique a une prévalence élevée chez les SDF drogués. Depuis peu, celle-ci se répand dans la population générale. Le contrôle doit donc se focaliser sur la population des SDF drogués. Une chimioprophylaxie dans une population à risque (SDF drogués et VIH positifs) permettrait de réduire la propagation de la maladie. Le problème sous-jacent reste le développement d'une résistance aux antibiotiques anti-tuberculeux si le traitement n'est pas suivi.

A San Francisco, les isolats de *M. tuberculosis* multirésistants ont montré une grande diversité des souches. Il existe donc plusieurs sources primaires. Cette conclusion suggère une stratégie de traitement inadaptée ou insuffisante.

Les techniques permettent aussi de différencier les isolats d'un pays. En Tunisie, les études ont montré que les isolats provenant de Tunis, Nabeul et Jendouba présentent un haut degré de polymorphisme par rapport à celles des districts de Menzel et Bourguiba. Ces dernières sont beaucoup moins hétérogènes. Ces résultats suggèrent la persistance de micro-épidémies.

Les Isolats de Tunisie, Ethiopie et des Pays-Bas présentent peu de convergence. Cela suggère l'existence de réservoirs de mycobactéries différents dans chaque pays.

Aux Pays-Bas, les personnes âgées sont sujettes aux réactivations d'infections latentes. En Afrique, la population jeune est surtout primo ou réinfectée.

En Chine, très peu de variations génotypiques ont été observées. Des souches identiques ont été isolées dans les pays voisins, c'est-à-dire en Mongolie, en Corée du Sud et en Thaïlande. Il y aurait donc une sélection par évolution d'un génotype. Une hypothèse importante est que l'utilisation du vaccin BCG peut avoir conduit à la sélection d'un clone prédominant. En Chine et en Tunisie où le vaccin a été largement utilisé, les variations génotypiques sont moins nombreuses que dans les pays où le BCG n'a pas été administré (Ethiopie, Pays-Bas...).

Dans les pays en voie de développement, le paradigme épidémiologique établi est que l'exposition à la tuberculose est ubiquiste mais la contamination se fait d'abord au sein de la famille. Le contrôle de la maladie est focalisé sur l'identification des cas et le traitement. Les efforts sont limités pour la chimiothérapie préventive des personnes en contact et la modification des facteurs facilitant la transmission.

L'épidémiologie moléculaire peut également être utilisée pour identifier les sources primaires et les cas secondaires en terme de démographie, de comportement, de niveau social... Entre 1994 et 1996, la frontière entre le Tennessee et le Kentucky a été le siège de plusieurs micro épidémies de tuberculose. 21 cas de tuberculose active et 311 réactions positives à la tuberculine ont été dénombrés. RFLP a révélé que la source était un ouvrier infecté par une souche CDC1551 (7).

Les souches de *M. tuberculosis*, de *M. bovis* mises en évidence dans les pays, les informations cliniques et épidémiologiques des patients sont recensées et disponibles pour les autres pays. Une librairie internationale de polymorphisme génétique a été créée.

### **3. Biologie moléculaire et nouveaux traitements**

La découverte du rôle de la protéine HBHA laisse l'espoir de mettre au point un nouveau traitement prophylactique. Des Ac monoclonaux dirigés contre les protéines HBHA empêchent la fixation des bacilles aux pneumocytes. Des protéines identiques aux HBHA existent chez *M. leprae*. Le ou les gènes codant pour ces dernières sont recherchés.

## **Chapitre III : Les gènes et la résistance aux antibiotiques**

### **1. Définition de la résistance**

Il existe deux types de résistance, les résistances primaire et acquise.

La résistance primaire est une résistance à au moins une drogue anti-tuberculeuse chez un patient qui n'a jamais reçu de traitement antérieur. Il s'agit alors d'une infection par des souches transmises par un autre patient ayant reçu un traitement inadéquat.

La résistance acquise est une résistance à au moins une drogue antituberculeuse qui survient pendant ou après le traitement. Elle résulte d'un non respect du schéma thérapeutique prescrit. Le traitement de sujets malades jamais soignés conduit à entre 98 et 99% de succès définitif. L'association de plusieurs molécules aurait dû prévenir la résistance.(54)

### **2. La multirésistance**

La multirésistance correspond à la résistance d'une souche à deux ou plus des drogues actuellement utilisées en première ligne (Il s'agit de l'isoniazide, la rifampicine, l'éthambutol, la pyrazinamide et la streptomycine).

L'introduction de la streptomycine dans la thérapeutique antituberculeuse date de 1945. En 1947, les premières résistances à la streptomycine ont été observées. En 1979, les souches dites sauvages, supposées ne jamais avoir été en contact avec des antibiotiques, présentent des mutants résistants. Il existe des mutants pour tous les antibiotiques. La même année, une étude de l'efficacité relative d'associations chimiothérapeutiques dans la prévention des rechutes révèle une multirésistance. Jusqu'en 1985, la multirésistance portait sur l'association INH-streptomycine. Depuis les années 90, elle concerne l'association INH-rifampicine.

La résistance est un problème de santé publique dans le monde entier.

### 3. Etiologie de la résistance

La résistance mycobactérienne provient uniquement de mutations spontanées (49). Elle ne semble pas transférable. Le taux de mutation est faible :  $1,8 \cdot 10^{-8}$  pour INH,  $2,9 \cdot 10^{-8}$  pour la streptomycine,  $2,2 \cdot 10^{-8}$  pour la rifampicine et  $10^{-5}$  pour l'ethambutol. La résistance spontanée d'une souche à deux molécules est donc très rare.

#### 3.1 Les gènes responsables (38)

La résistance est liée à trois types de gènes :

- Les gènes à l'origine des enzymes qui détruisent les antibiotiques
- Ceux qui codent pour des protéines refoulant les antibiotiques à l'extérieur des bacilles
- Les derniers qui contribuent à épaissir la paroi du bacille, rendant difficile la pénétration des médicaments.

La résistance à la pyrazinamide est spécifique à *M. bovis* pour les mycobactéries du complexe *M. tuberculosis* (14). Ce caractère est utilisé pour les différencier. La présence d'une guanine à la place d'une cytosine en position 169 du gène *pnc A* codant la pyrazinamidase est à l'origine de cette résistance. Cette substitution conduit à la synthèse de pyrazinamidase inactive et à la résistance de *M. bovis* à cette molécule.

La combinaison de techniques de typage moléculaire a permis d'identifier et de distinguer un sous-groupe de mycobactéries de la ligne phylogénétique W (le groupe W14). Cinq techniques moléculaires ont été nécessaires (RFLP utilisant IS 6110, VNTR, PGRS et spoligotyping). Tous les isolats de ce groupe W14 étaient résistants à de fortes doses de Streptomycine (plus de 500µg/mL). Vingt étaient monorésistants et six polyrésistants. L'analyse de séquences génomiques a montré que toutes les mycobactéries présentaient une mutation du gène *rpsL* dans le codon 43. La substitution d'une lysine par une thréonine à cet endroit est une mutation décrite comme responsable de la résistance de la Streptomycine. Elle est à l'origine d'environ 53% de ces cas. En 1993 et entre 1995 et 1999 sur 295 patients à New-York, 295 isolats monorésistants ont été identifiés. 49 patients étaient nés à l'étranger. Sur 150 patients monorésistants à la Streptomycine nés aux USA, 83 ont été génotypés (55%). Parmi ces derniers, 31% appartenaient au groupe W14.

La combinaison de techniques a également permis de montrer que bien souvent les patients sont infectés par une souche résistante. Ils n'acquièrent que rarement la résistance pendant le traitement.

Plusieurs gènes responsables ont été identifiés (16). Il s'agit des gènes *inhA*, *katG* et *kasA* pour l'isoniazide, du gène *rpoB* pour la rifampicine, *pncA* pour la pyrazinamide, *rpsL*, *rrs*, *strA*, *S12* pour la streptomycine, *embA*, *B* et *C* pour l'éthambutol et *gyrA* et *B* pour l'ofloxacine. Pour la résistance à la rifampicine, dans 95% des cas, le gène incriminé est *rpoB*.

### 3.2 Génétique et sensibilité à la tuberculose

La sensibilité à la tuberculose dépend de différents facteurs dont des génétiques (4). Le polymorphisme des récepteurs à la vitamine D, le calcitriol et les gènes codant pour les protéines de fixation du mannose confèrent une résistance à la maladie. Le calcitriol active les monocytes et stimule les cellules de l'immunité. Les métabolites de la vitamine D influencent la destruction des mycobactéries par les monocytes. Une mutation du gène codant pour le récepteur de l'interféron gamma ( $IFN\gamma$ ) est responsable d'une très grande sensibilité aux mycobactéries et autres organismes intracellulaires. D'autres déficiences génétiques sont à l'origine d'une résistance primaire. Par exemple, la réponse aux cytosines est modulée par l'expression des récepteurs de celles-ci. Les cellules Th2 différenciées n'expriment plus les récepteurs aux cytosines et deviennent résistantes aux IL-12. Le polymorphisme des gènes codant pour les cytosines comme IL-4 et IL-12 ou pour leurs récepteurs pourrait être à l'origine d'une résistance primaire. Le rapport Th1/Th2 est modifié.

## 4. Importance de la résistance

La résistance aux antibiotiques antituberculeux est très importante aux Etats-Unis. Elle est en grande partie imputable au système de santé. Les patients tuberculeux ne sont pas hospitalisés mais le traitement est administré en ambulatoire. . La chimioprophylaxie par INH seul était plus pratiquée aux USA qu'en France . Actuellement, il consiste en une trithérapie et non en une quadrithérapie comme celle préconisée en France De plus, les Américains ne sont pas vaccinés par le B.C.G.

Dans les pays en voie de développement, la nature et la prévalence de la résistance au traitement ne sont pas ou peu connues (51). Les laboratoires capables d'effectuer les tests standardisés de manière correcte sont insuffisants.

En république Tchèque, au Royaume Uni et en Nouvelle-Zélande l'incidence est faible. En Estonie, Sierra Leone, République Dominicaine et dans certaines régions de Russie, l'incidence est élevée. Des études ont révélé que 16,7% des souches analysées présentent une résistance à au moins un antibiotique, parmi lesquelles 9,1% le sont à un seul antibiotique, 7,7% à deux ou trois et 4,3% sont multirésistants. La prévalence de la résistance acquise est supérieure à la primaire. Pour la résistance primaire, l'incidence varie entre 2% en République Tchèque et 41% en République Dominicaine. En Nouvelle-Zélande, la résistance acquise atteint 5,3% dans l'Ivanovo et 100% Oblast en Russie (51).

Les résistances sont présentes essentiellement chez les malades séropositifs pour le VIH. Chez un sujet séropositif pour le VIH, le tableau est dramatique. La clinique est souvent atypique dans sa présentation pulmonaire. Les intradermoréactions sont souvent négatives et les localisations extra pulmonaires très fréquentes. Ces dernières représentent 75% des cas. De plus, le diagnostic de la résistance et la mise en place du traitement adapté sont tardifs. La contagiosité est longue et très importante. Chez les tuberculeux VIH positifs à souche résistante, la mortalité est très élevée : elle oscille entre 77 et 89%. L'évolution est très courte, entre 4 et 16 semaines. Chez un sujet VIH négatif, la tuberculose multirésistante est grave également. 56 à 65% des patients guérissent, 20 à 46% meurent et 10% deviennent porteurs chroniques de bacilles multirésistants. Ces derniers sont très dangereux.

La multirésistance aux antibiotiques est un problème de santé publique. Le « Centre de Contrôle et de Prévention des maladies » (CDC) d'Atlanta a lancé en 1995 une campagne qui avait pour but de modifier le comportement des citoyens.

## **Chapitre IV : Les limites de la biologie moléculaire**

Le problème essentiel est le coût des techniques et le non développement de laboratoires fonctionnels dans les pays en voie de développement. De plus, les réactivations de tuberculoses stabilisées et les transmissions de tuberculose à des enfants par des adultes sont trop nombreuses. La biologie moléculaire doit être privilégiée pour les études épidémiologiques, surtout dans les pays en voie de développement.

Il faut garder à l'esprit que l'extrapolation de résultats obtenus à partir d'une population ou d'une région du monde peut présenter des risques. Les différences entre les pays en voie de développement et développés sont grandes.

Le manque de compréhension des variations du génome des bacilles reste la limite la plus importante de la biologie moléculaire. Seule une connaissance de l'ensemble du génome peut permettre de connaître l'écologie, de repérer des mutations et d'appréhender l'évolution des bacilles.

## **Chapitre V : La découverte de vaccins plus performants (38)**

La vaccination des animaux contre la tuberculose pourrait être une stratégie utile pour le contrôle de la maladie dans deux cas : pour les animaux domestiques dans les pays en voie de développement et pour les réservoirs sauvages de la maladie dans les pays industrialisés où le programme (test et abattage) n'a pas été efficace pour éradiquer la maladie.

Le plus important est d'obtenir un état de mémoire immunitaire. Dans le cadre de la tuberculose, c'est la circulation de cellules T CD4 pouvant sécréter des interférons (IFN) lors de la reconnaissance d'antigènes spécifiques. Ces mécanismes conduisent à une résistance acquise spécifique. La réponse accélérée obtenue empêche la dissémination des bacilles de la lésion primaire dans le reste du poumon plus oxygéné et dans d'autres organes comme la rate ou le foie quand des lésions secondaires sont possibles. Cette dissémination bacillaire peut aboutir à une tuberculose active car la génération de cellules T spécifiques prend du temps.

## 1. L'immunopathologie de la tuberculose

- Chez la souris (37)

Quelques jours après l'immunisation d'une souris avec le BCG, la détection de l'émergence de lymphocytes CD4<sup>+</sup> est possible. Ces derniers sécrètent des Interférons  $\gamma$  lors d'une stimulation ultérieure *in vitro* avec des protéines sécrétées par le bacille et purifiées. L'activation de ces cellules est à l'origine du développement d'un phénotype de cellules T mémoire. Cette population circulante a une durée de vie longue.

- L'administration sous forme d'aérosol dans les poumons d'une souris immunisée de bacilles virulents entraîne une progression lente de l'infection et une réponse granulomateuse accélérée. Ce mécanisme résulte certainement d'un rappel de la lésion primaire par les cellules T mémoire. Lors de leur passage dans le tissu, elles reconnaissent les antigènes présentés par les macrophages infectés. Il y a, en réponse, une production d'interféron  $\gamma$ . Les macrophages stimulés par ce dernier libèrent une cytokine TNF (Tumor Necrosis Factor) qui induit la production locale de chemokines. Elles sont à l'origine de l'influx de monocytes depuis le sang. La formation granulomateuse est la conclusion de cette cascade. Les mécanismes de destruction des bacilles dans les macrophages suite à l'activation par des Interférons ne sont pas connus (38). Une chute du pH dans les phagosomes et la production de composants nocifs comme des peroxy-nitrites sont probablement les facteurs les plus importants.

## 2. Le vaccin actuel : le BCG

### 2-1 Son historique (2)

Camille Guérin et Albert Calmette sont co-inventeurs du vaccin du vaccin B.C.G (Bacille Calmette Guérin). En 1905-1908, leurs études ont porté sur la tuberculose bovine et plus particulièrement sur le mécanisme de l'infection. A la suite de l'observation de la mise en place d'une réaction positive à la tuberculine chez un bovin adulte après une primo-infection, ils ont conclu que seule la présence de bacilles vivants confère une résistance. La bile de bœuf est un tensioactif naturel. Il a été utilisé comme adjuvant. Lors de son utilisation comme adjuvant, la virulence est diminuée. Le B.C.G est une souche bacillaire parfaitement inoffensive résultant de 230 passages successifs, pendant 13 ans sur milieu bilié.

La première vaccination humaine avec le BCG date de 1921. Plus de 800 000 vaccinations humaines ont été faites en France en 1950. De nos jours en France, la vaccination est conseillée au cours des premiers mois de la vie. Elle est obligatoire dès la mise en collectivité. Elle est vérifiée par le test intra-tuberculique (intradermoréaction ou bague). La première vaccination de bétail date de 1930.

## 2.2 Ses caractéristiques

La production du BCG est peu coûteuse, le vaccin est assez stable et son innocuité bonne. Il est facile d'emploi (injection en sous-cutanée, en intraveineuse...).

## 2.3 Son efficacité

Sur 450 000 enfants de 46 pays, une étude a montré que la mortalité par tuberculose est deux fois plus élevée chez les non vaccinés que chez les vaccinés.

La vaccination induit un haut niveau de protection immunitaire chez les animaux d'expérience mais elle pourrait avoir chez l'homme un effet négligeable. L'effet obtenu serait protecteur uniquement chez l'enfant. Ces hypothèses ont érodé la confiance mise dans ce vaccin d'où son abandon ou beaucoup d'interrogations. L'efficacité du BCG est variable au sein d'une population et selon les pays. (42)

Après de nombreuses années de vaccination, le Canada, les USA, l'Australie, la Grande-Bretagne, l'Afrique et d'autres pays ont décidé de suspendre les vaccinations du bétail avec le BCG. Des études ont montré une efficacité insuffisante voire son inefficacité. (41)

Plusieurs facteurs sont incriminés. (42)

- Souvent, les doses vaccinales injectées par voies sous-cutanée ou intradermique sont trop importantes.
- Le BCG s'est peut-être lui-même altéré avec le temps. La diminution d'efficacité reflèterait une perte de virulence de la souche d'où l'induction d'une immunité inefficace ou insuffisante.

- La vaccination doit être réalisée sur des animaux non infectés. Les animaux n'ont souvent pas été testés avant l'injection.
- L'exposition aux mycobactéries de l'environnement peut être responsable d'une immunité plus faible.

### **3. Les vaccins "candidats"**

#### 3.1 Les qualités requises pour un vaccin humain

Le vaccin idéal serait stable et conférerait une immunité à vie après une seule administration par voie non invasive.

#### 3.2 Les qualités requises pour un vaccin animal

Le vaccin doit être très efficace. Les résultats obtenus avec le BCG ont été très bons mais l'efficacité variable suivant les régions (8).

L'administration d'un vaccin pose peu de problèmes pour les animaux domestiques mais est quasi impossible pour les animaux sauvages. La vaccination peut fausser les tests. Le vaccin induit une hypersensibilité au test et l'obtention de faux positifs dans le programme de contrôle. Le peu de recul et le trop grand champ d'études font que l'évaluation de la protection poserait de sérieux problèmes. Des études indiquent que les cervidés seraient de très bons modèles d'étude (9). Les qualités requises pour un vaccin varient avec l'espèce animale : (48)

-Le bétail et les daims domestiques ont besoin d'un vaccin capable de prévenir une infection chez des animaux vaccinés. La protection induite doit être de haut niveau. Les animaux ne doivent pas être sensibilisés au test cutané, la réaction induite au site d'injection doit être minimale. Il doit être aussi sans danger et accepté par les pays importateurs de viande et de produits dérivés.

- Pour la faune sauvage, la priorité n'est pas d'être protégée contre l'infection. Par contre, l'infection ne doit pas être transmise aux autres animaux sauvages ou domestiques. L'immunité induite doit être bonne, longue et le coût réduit.

Les vaccins doivent stimuler des cellules T CD4. Depuis quelques années, il a été montré que les cellules T CD8 jouent aussi un rôle important dans l'immunité. La

démonstration a été faite chez les patients tuberculeux et chez les modèles animaux. Il a été suggéré également que la présentation et la reconnaissance d'Ag par le système immunitaire via le CD1 peut être importante. Les cellules T CD4 et CD8 reconnaissent les antigènes peptidiques. Ce sont les principaux intervenants dans la réponse. L'objectif est de stimuler ces deux types de cellules avec les nouveaux vaccins de façon à obtenir un équilibre Th1/Th2 adéquat. La difficulté réside dans la multitude de facteurs de régulation.

Il existe deux grands types de vaccins, les atténués ou modifiés et les inactivés. Pour les vaccins vivants, les antigènes utilisés peuvent être des mycobactéries non pathogènes ou non virulentes comme *M. vaccae*, *M. habana*, *M. w* ou *M. microti*. *M. habana* et *M. w* induisent une protection chez des modèles animaux et ont les mêmes avantages que le BCG. Ils sont simples à produire et bon marché. Ces souches ne peuvent pas vivre chez l'homme mais leur devenir chez les immunodéprimés est inconnu et aléatoire (15).

### 3-3 Les vaccins auxotrophes

Une autre approche consiste à produire et à utiliser des mutants auxotrophes dont la virulence est diminuée suite à la perte de gènes indispensables à la croissance. Les mutagenèses chimique et physique sont impossibles pour les mycobactéries. L'insertion est faite par mutagenèse. Trois auxotrophes du BCG ont été créés : deux pour la leucine et un pour la méthionine. La différenciation se fait par culture sur des milieux sélectifs. Chez un des BCG leucine autocontrôle, le gène *leu D* est interrompu par un transposon. Les vaccins BCG autocontrôles meurent chez les hôtes vaccinés, mais ils pourraient être intéressants chez les VIH positifs. Un vaccin à *M. tuberculosis* autocontrôle pourrait être plus immunogène que le BCG. Le BCG a un plus grand nombre de délétions géniques (37).

L'innocuité des vaccins autocontrôles a été montrée par injection à des souris SCID+, l'équivalent du VIH. Les BCG autocontrôles ne sont plus détectables après 16 à 32 semaines. Les souris infectées sont restées vivantes pendant plus de 230 jours. En revanche, les souris SCID+ sont mortes 8 semaines après l'injection du BCG..Même si la réplication des bacilles est inhibée, ces mutants sont à l'origine d'une protection contre une souche virulente. Ces vaccins autocontrôles représentent un vaccin utile et sans risque pour les personnes VIH positives et tuberculeuses.

### 3.4 Les vaccins recombinants (28)

Ils sont fabriqués par recombinaison homologue, il y a un échange d'allèles entre deux souches. Les gènes incorporés peuvent être des gènes présents chez *M. tuberculosis* et absents de *M. BCG* ou des antigènes d'origine non mycobactérienne. Des phages comme le L5 sont efficaces pour la formation de recombinants. Exemples de souches recombinantes

- rBCG exprimant OspA, une protéine de la surface extérieure de *Borrelia burgdorferi*
- rBCG exprimant les Ag SIV Nef, Env et Gag induisant la formation d'AC et des réponses cytotoxiques chez la souris.
- rBCG exprimant une protéine hybride toxine tétanique.
- rBCG exprimant ESAT-6.
- rBCG exprimant ESAT-6 et CFP-10.
- rBCG exprimant MPT 64. La fabrication d'un vaccin exprimant ces protéines sans retour de virulence serait un bon vaccin.

### 3.5 Les vaccins à ADN

L'information génétique utilisée dans ces vaccins est de l'ADN codant pour un ou plusieurs gènes sous le contrôle d'un promoteur. Un promoteur est une région d'ADN en amont des gènes, lieu de fixation de l'enzyme d'amplification (ARN polymérase) et site de fixation des protéines régulatrices de la transcription. Des études de l'Ag 85A mycolyl transferase comme ADN vaccinal ont montré qu'il induit une protection faible mais significative chez la souris. En revanche, chez le cobaye, aucune protection n'a été constatée. A long terme, après vaccination, les souris survivent et il n'y a pas de lésions pulmonaires nécrotiques. La même réponse a été obtenue chez la souris lors de l'utilisation de gènes codant pour des protéines du stress comme ADN vaccinal.

### 3.6 Les vaccins sous unités

Dans les années 1950 et 1960, les différentes fractions de mycobactéries ont été prélevées. Elles ont généré une protection contre *M. tuberculosis* en prolongeant la survie et en diminuant la dissémination des bacilles. Les émulsions données devaient être huileuses. La réponse induite était courte, non spécifique suite à l'induction de cytokines pro-inflammatoires.

Pour la fabrication des vaccins à sous unités, les Ag utilisés sont des protéines variées associées à un adjuvant. La synthèse débute par la sélection d'un Ag ou de quelques Ag de

forte immunogénicité. La CFP, une fraction de filtration de culture, a été très étudiée. L'injection de CFP non fractionnées ou de fractions avec différents adjuvants induit une résistance chez la souris et le cobaye. En 1999, seules deux « CFP plus IL-2 » et « AG 85 DNA3 » ont empêché à long terme la nécrose caséuse chez un cochon d'inde. Les filtrats de culture sont capables de stimuler les cellules T du CMHII à des moments précoces de l'infection. Les Ag produits par les métabolites actifs des bacilles sont des cibles pour le système immunitaire. L'efficacité est meilleure que celle des vaccins vivants.

Ces formulations sont protectrices chez tous les modèles animaux contre une infection par des bacilles vivants, mais la protection et la survie à long terme sont moins bonnes qu'avec le BCG. Les adjuvants et les formulations développées provoquent une réponse de type Th1(37).

Les adjuvants utilisés sont également très importants. Ils n'ont pas tous le même effet sur le système immunitaire. Certains induisent préférentiellement une immunité à médiation cellulaire et d'autres humorales. Pour la protection contre la tuberculose, le rapport Th1/Th2 est fondamental. Les adjuvants testés jusqu'à présent pour les vaccins sous-unités étaient sélectionnés pour stimuler les cellules T CD4+. Les microsphères de polylactide, le DDA sous forme de micelles, les LPS et les MPL stimulent les cellules CD4+. Les ISCOMs stimulent le CMHI. De plus, il existe des degrés de force des adjuvants. DTH est considéré comme un adjuvant fort. CFP associé à un adjuvant moyen (MPL, Ribi ImmunoChem) et à des IL-2 entraîne une réponse Th1. Il n'y a pas de protection initiale induite, c'est-à-dire qu'il y a dissémination de bacilles comme avec le BCG mais la survie des cobayes est prolongée. La nécrose caséuse est prévenue et les cobayes ne sont pas sensibilisés au PPD. Ag 85 B est protecteur quel que soit l'adjuvant.

#### **4. Les modèles animaux (37)**

*- la souris :*

C'est un modèle peu coûteux .Beaucoup de « candidats » peuvent donc être testés, l'immunité induite étudiée Si le vaccin est vivant une administration suffit, s'il est tué trois sont requises à quatre ou six semaines d'intervalle. Cinquante à cent bacilles doivent être pulvérisés dans les poumons si c'est la voie d'administration sélectionnée. Un mois après, le nombre de

mycobactéries dans les poumons est compté et comparé avec les contrôles non vaccinés. L'efficacité est ainsi déterminée.

*- le cobaye :*

Un test cutané est possible. Comme chez l'homme, les cobayes infectés développent graduellement une nécrose du poumon. Entre dix et quinze semaines après l'exposition, l'architecture des poumons est modifiée et parfois suffisamment pour provoquer la mort.

Chez l'homme, les lésions nécrotiques peuvent toucher tout le poumon. Les lésions sont alors visualisables aux rayons X. La liquéfaction des lésions conduit à des formations cavitaires.

L'inconvénient de ce modèle animal est qu'il faut le garder en observation 25 semaines après les aérosols pour éviter qu'ils deviennent un danger biologique. C'est très coûteux.

Chez le cobaye, le BCG réduit la charge pulmonaire d'environ 100 fois.

Les mycobactéries sont cependant difficiles à manipuler, d'où la lenteur des progrès.



## **Conclusion :**

En 2002, la pathogénèse de la tuberculose n'est pas totalement élucidée. Les recherches en cours sur cette infection sont multiples. Leur objectif commun est la découverte de cette pathogénèse, d'un traitement et d'une vaccination. Cependant, la prévention et le contrôle par les organismes nationaux et internationaux de l'infection et de la maladie sont fondamentaux.

L'épidémie du VIH/SIDA et son impact sur l'épidémiologie de la tuberculose génèrent de nouvelles inquiétudes. De nombreux espoirs sont placés dans les nouvelles techniques de biologie moléculaire dont les intérêts sont multiples.

Les technologies « modernes » telles que l'informatisation, internet (...) permettent une consultation rapide et des résultats des recherches et une coopération scientifique internationale qui espérons le, éradiquera cette maladie qui a eu son apogée au XIXème siècle.



## BIBLIOGRAPHIE

1. ALIFANO, M., DE PASCALIS, R., SOFIA, M. and al  
Evaluation of a IgA-mediated Humoral and Immune Response Against the Mycobacterial Antigen P-90 in Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis.  
*Chest*, Mars 1997, **111**, 601-605.
2. Association CAMILLE GUERIN  
Chabonne, 86210 VOUNEIL-SUR-VIENNE. FRANCE. (33)(0)5 49 85 58 89
3. BEHR, M.A., SMALL, P.M.  
Molecular fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*: How Can It Help the Clinician?  
*Clin Inf Dis*, 1997, **25**, 806-810.
4. BERGMANN, J.S., KEATING, W.E., WOODS, G.L.  
Clinical Evaluation of the BDProbe Tec ET System for Rapid Detection of *Mycobacterium tuberculosis*.  
*J Clin Microbiol*, Fevrier 2000, **38**, 2, 863-865.
5. BEYERS, A.D., VAN RIE, A., ADAMS, J. et al.  
Signals that regulate the host response to *Mycobacterium tuberculosis*. Proceedings of the 217th Novartis Foundation Symposium on Genetics and tuberculosis.  
Wiley, Chichester, 1988, 145-159.
6. BOGARD, M., LAMORIL, J.  
Biologie moléculaire en Biologie clinique, I. méthodes. ville d'édition: Elsevier, juillet 1998. 2 volumes, 348p. (Collection OPTION BIO).
7. CARBONNELLE, B., CARPENTIER, E.  
Diagnostic bactériologique de la tuberculose: hiérarchisation actuelle des méthodes.  
*Rev Med Interne*, 1995, **16**, 518-523.
8. CARTER, G.R., CHENGAPPA, M.M.  
Microbial Diseases. A veterinarian's guide to laboratory diagnosis.  
Ames (USA): Iowa State University Press, 1993. 1 volume, 304p.
9. COHN, D.L., O'BRIEN, R.J.  
The use of restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis for epidemiological studies of tuberculosis in developing countries.  
*Int J Tuberc Lung Dis*, 1998, **2**, 1, 16-26.
10. COSIVI, O., GRANGE, J.M., DABORN, C.J. et al  
Zoonotic Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries.  
*Em Inf dis*, **4**, 1, Janvier-mars 1998.

11. COSIVI, O., MESLIN, F.X., DABORN, C.J. et al  
Epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans, with particular reference to Africa  
*Rev sci tech Off int Epiz*, 1995, **14**, 3, 733-746.
12. COUSINS, D.V., SKUCE, R.A., KAZWALA, R.R.  
Towards a standardized approach to DNA fingerprinting of *Mycobacterium bovis*.  
*Int J Tuberc Lung Dis*, 1998, **2**, 6, 471-478.
13. COUSINS, D.V., WILLIAMS, S.N., ROSS, B.C. et al  
Use of a repetitive element isolated from *Mycobacterium tuberculosis* in hybridization studies with *Mycobacterium bovis*: a new tool for epidemiological studies of bovine tuberculosis.  
*Vet microbiol*, 1993, **37**, 1-17.
14. DECLICH, S., CARTER, A.O.  
Public health surveillance: historical origins, methods and evaluation.  
*Bull World Health Organ*, 1994, **72**, 2, 285-304.
15. DICTIONNAIRE DE BACTERIOLOGIE VETERINAIRE. (page consultée le 24 octobre 2001). Site de J.P. Euzéby, [en ligne]. Adresse URL: <http://www.bacterio.cict.fr/>
16. DOHERTY, T.M., ANDERSEN, Ph. D., ANDERSEN, P.  
Tuberculosis vaccines: developmental work and the future.  
*Inf Dis*, 2000, 203-208.
17. DOLIN, P.J., RAVIGLIONE, M.C., KOCHI, A.  
Global tuberculosis incidence and mortality during 1990-2000.  
*Bull WHO*, 1994, **72**, 2, 213-220.
18. DURR, P.A., HEWINSON, R.G., CLIFTON-HADLEY, R.S.  
Molecular epidemiology of bovine tuberculosis. I. *Mycobacterium bovis* genotyping.  
*Rev sci tech Off int Epiz*, 2000, **19**, 3, 675-688.
19. ECOLES NATIONALES VETERINAIRES FRANCAISES, MALADIES CONTAGIEUSES.  
La tuberculose.  
Ouvrage d'enseignement, MÈRIAL, 1999. 152 p.
20. EHOLIE, S.P., EHUI, E., DOMOUA, K. et al  
La tuberculose à l'heure du sida au centre antituberculeux de Bouaké (Côte-d'Ivoire).  
*Méd Mal Infect*, 1999, **29**, 99-104.
21. FEIZABADI, M.M., ROBERTSON, I.D., COUSINS, D.V. et al  
Genomic Analysis of *Mycobacterium bovis* and other members of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex by Isoenzyme Analysis and Pulsed-field Gel Electrophoresis.  
*J Clin Microbiol*, mai 1996, **34**, 5, 1136-1143.

22. FORTAS, N., IMBERT, Y., TISSOT, B.  
Tuberculose digestive dans le département du Lot-et-Garonne de 1988 à 1995.  
*Med Mal Infect*, 1999, **29**, 184-187.
23. GOH, K.S., RASTOGI, N.  
Rapid preliminary differentiation of species within the *Mycobacterium tuberculosis* complex: proposition of a radiometric method.  
*Res Microbiol*, 1991, **142**, 659-665.
24. GOUDEAU, C.  
L'OIE répertorie les "armes" modernes contre la tuberculose. *Planetvet* [On line].  
Mardi 9 octobre 2001 [citée 21 octobre 2001]. Adresse URL:  
<http://www.invivo.net/invivo/db/news/planetvet/>
25. GRANGE, J.M., ZUMLA, A.  
Advances in the management of tuberculosis: clinical trials and beyond.  
*Curr Opin in Pulm Med*, 2000, **6**, 193-197.
26. HAAS, D.W., DES PREZ, R. M.  
Tuberculosis and Acquired Immunodeficiency Syndrome: A Historical Perspective on Recent Developments.  
*Am J Med*, mai 1994, **96**, 439-451.
27. HERRERA, E.A., PEREZ, O., SEGOVIA, M.  
Differentiation between *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* by a multiplex-polymerase chain reaction.  
*J Appl bacteriol*, 1996, **80**, 596-604.
28. HESS, J., KAUFMANN, S.H.E.  
Live antigen carriers as tools for improved anti-tuberculosis vaccines.  
FEMS. *Immunol Med Microbiol*, 1999, **23**, 165-173.
29. INSTITUT NATIONAL DE VEILLE SANITAIRE. (Page consultée le 14 février 2002). invs,[en ligne]. Adresse URL: <http://www.invs.sante.fr/>
30. INSTITUT PASTEUR. (Page consultée le 29 août 2001). Base de données de l'Institut Pasteur, [en ligne]. Adresse URL: <http://www.genolist.pasteur.fr/>
31. JOHNSON, J.L., ELLNER, M.D., ELLNER, J.J.  
Adult tuberculosis overview: African versus Western perspectives.  
*Curr Opin Pulm Med*, 2000, **6**, 180-186.
32. KAPLAN, J-C, DELPECH, M.  
Biologie moléculaire et médecine. 2ème édition.  
Paris: Flammarion, 1998. 1 volume, 790 p. (Médecine-Sciences).
33. KERMAREC, J., BUSSY, E., HILTENBRAND, C.  
Réactions tuberculiques.  
*Rev Pneumol Clin*, 1994, **50**, 280-287.

34. LECLERC, H., GAILLARD, J-L, SIMONET, M.  
Microbiologie générale. La bactérie et le monde bactérien.  
Vélizy: DOIN EDITEURS, 1995. 1 volume, 535 p.
35. LIEBANA, E., ARANAZ, A., MATEOS, A. et al.  
Simple and Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis Complex Organisms in bovine Tissue Samples by PCR.  
*J Clin Microbiol.*, janvier 1995, **33**, 1, 33-36.
36. LIENHARDT, C., RODRIGUES, L.C.  
Estimation of the impact of the human immunodeficiency virus infection on tuberculosis: tuberculosis risks re-visited?  
*Int J Tuberc Lung Dis*, 1997, **1**, 3, 196-294.
37. MADA, G., DABORN, C.J., GRANGE, J.M. et al  
The zoonotic importance of *Mycobacterium bovis*.  
*Tuber Lung Dis*, 1996, **77**, 103-108.
38. MITCHINSON, D.A.  
Basic mechanisms of chemotherapy.  
*Chest*, 1979, **76**, 771-781.
39. MUNK, M.E., AREND, S.M., BROCK, I. and al  
Use of ESAT-6 and CFP-10 Antigens for diagnosis of Extrapulmonary Tuberculosis.  
*JID*, 2001, **183**, 175-177.
40. OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. (Page consultée le 19 mars 2001). site de l'OIE, [en ligne]. Adresse URL: <http://www.oie.int/>
41. OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. Site de l'OIE, [en ligne]. Adresse URL: <http://www.oie.int/>
42. ORME, I.M.  
Beyond BCG: the potential for a more effective TB vaccine.  
*Mol Med Today*, Novembre 1999, **5**, 487-492.
43. ORME, I.M.  
Vaccination against Tuberculosis: recent progress.  
*AdvVet Med*, **41**, 135-145.
44. PETHE, K., ALONSO, C., BIET, F. et al  
The heparin-binding haemagglutinin of *Mycobacterium tuberculosis* is required for extrapulmonary dissemination  
*Nature*, juillet 2001, **412**, 6843, 190-194.
45. QUINN, P.J., CARTER, M.E., MARKEY, B. and al  
Clinical Veterinary . 4ème édition.  
Arte Sobre Papel : Wolfe, 1994 , 1 vol, 648p.

46. REPORT OF THE EXPERT PANEL IX

Vaccines against tuberculosis. Proceedings of the European Commission COST/STD Initiative, 703-716.

47. ROOK, G.A.W., HERNANDEZ-PANDO, R.

Immunological and endocrinological characteristics of tuberculosis that provide opportunities for immunotherapeutic intervention. Proceedings of the 217th Novartis Foundation Symposium on genetics and tuberculosis. Wiley, Chichester, 1998, 73-98.

48. SKINNER, M.A., WEDLOCK, D.N., BUDDLE, B.M.

Vaccination of animals against *Mycobacterium bovis*. *Rev sci tech Off int Epiz*, 2001, **20**, 1,112-132.

49. SOINI, H., VILJANEN, M.K.

Gene amplification in the diagnosis of mycobacterial infections *APMIS*, 1997,**105**, 345-353.

50. TIGR. (page consultée le 31 août 2000). Base de données de TIGR, [en ligne]. Adresse URL: <http://www.tigr.org/>

51. VAN HELDEN, P.D.

Bacterial genetics and strain variation. Proceedings of the 217th Novartis Foundation Symposium on Genetics and tuberculosis. Wiley, Chichester, 1998, 178-194.

52. VAN SOOLINGEN, D., HERMANS, P.W.M., DE HAAS, P. E. W. et al

Insertion Element IS1081-Associated Restriction Fragment Length Polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* Complex Species: a reliable Tool for Recognizing *Mycobacterium bovis* BCG. *J Clin Microbiol*, juillet 1992, **30**, 7, 1772-1777.

53. VAYLET, F., ALLARD, P., NATALI, F. et al

Epidémiologie actuelle de la tuberculose. *Rev Pneumol Clin*, 1994, **50**, 106-115.

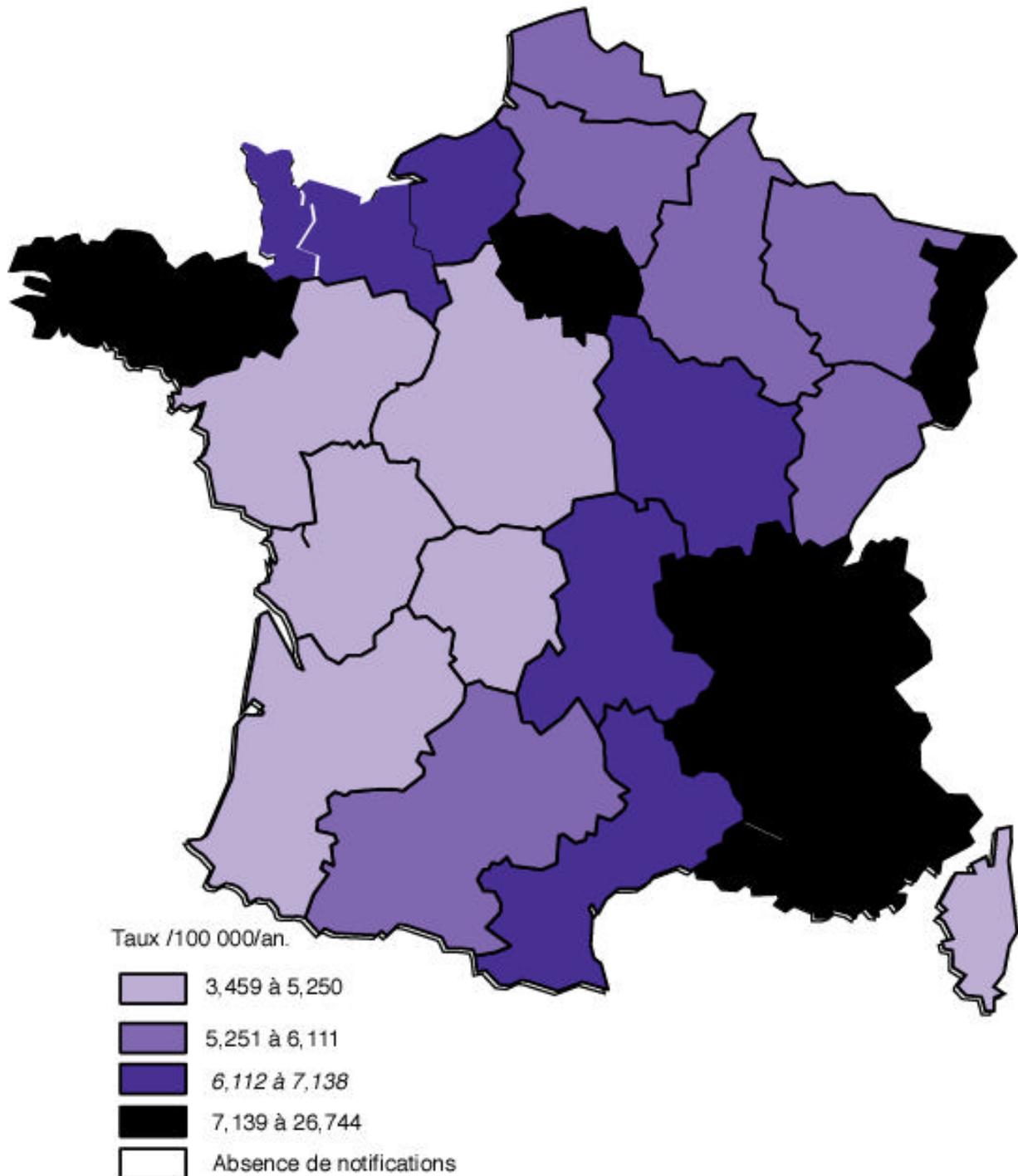
54. ZUMLA, A., MWABA, P., SQUIRE, S.B. et al

The Tuberculosis Pandemic- Which Way Now? *J Infect*, 1999, **38**, 74-79.

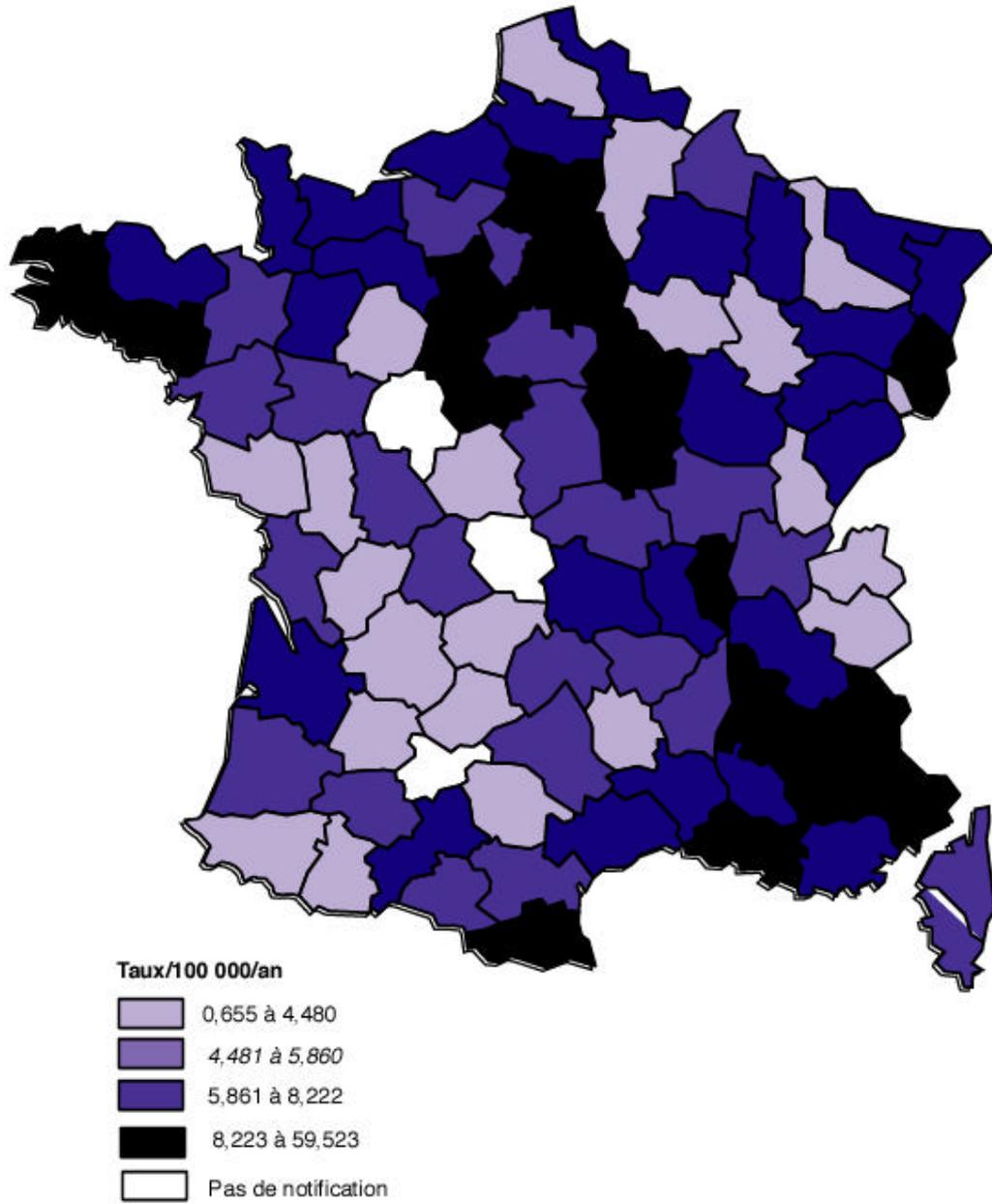


## ANNEXES

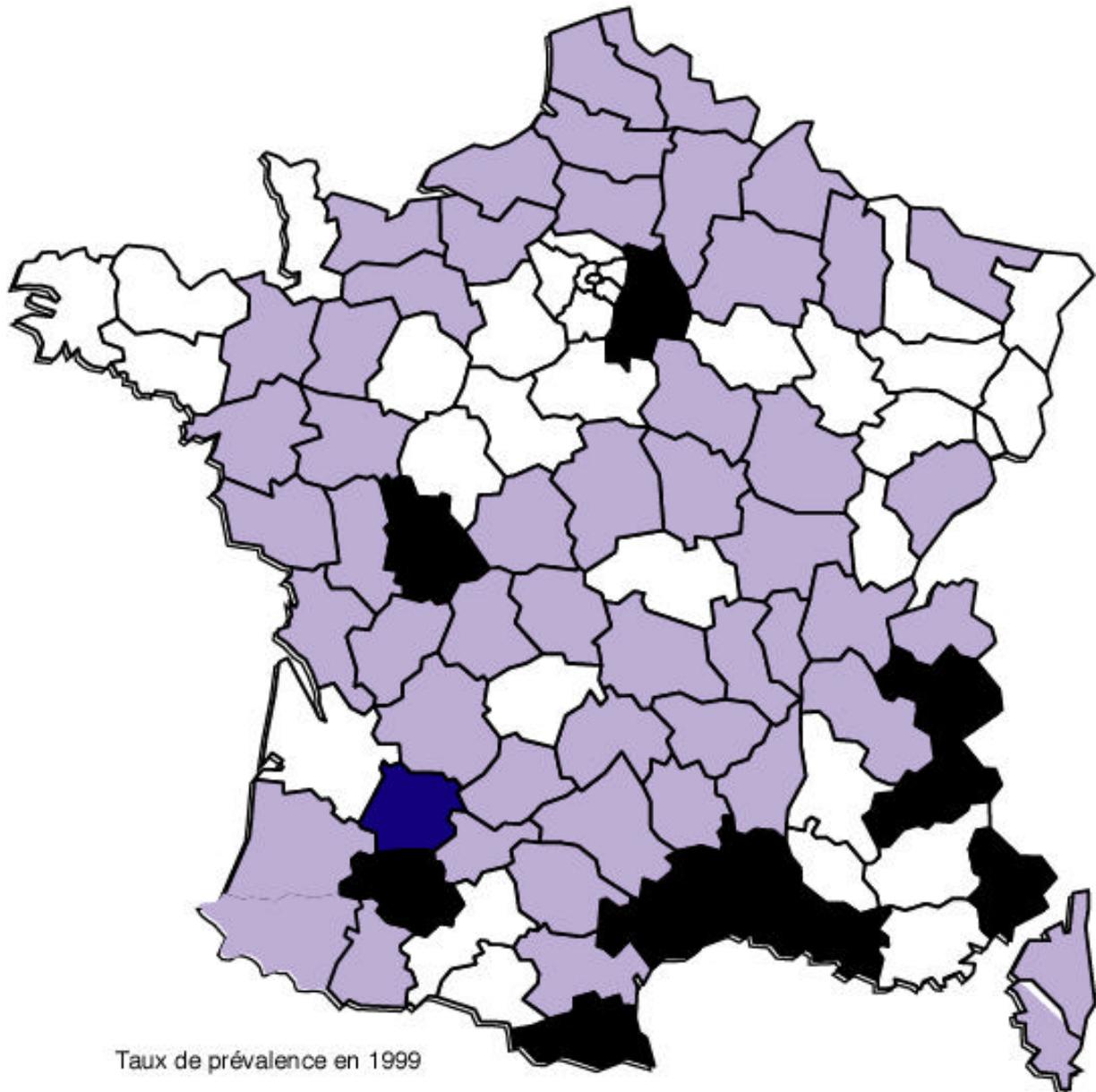
Annexe 1 : Taux de notification des cas de tuberculose humaine, par région en France  
du 31 janvier 2001 au 1<sup>er</sup> février 2002.



Annexe 2 : Taux de notification des cas de tuberculose humaine par département en 1999.



**Annexe 3 : Taux de prévalence de la tuberculose bovine en France en 1999.**



Taux de prévalence en 1999

-  Prévalence nulle
-  inférieure à 0,2%
-  de 0,2% À 0,5%
-  de 0,5% à 1%
-  supérieur à 1%

**Annexe 4 : Tests in vitro de différenciation des principales mycobactéries**

	Groupe de Runyon	Croissance à 7 jours	Inhibition par glycérol	Morphologie des colonies	pigmentation	Production de niacine	Tolérance à 5% de NaCl	Réduction du nitrate	Production d'urée
<i>M. tuberculosis</i>		-	-	R	N	+	-	+	V
<i>M. bovis</i>		-	+	S/(R)	N	-	-	-	V
<i>M. simiae</i>	I	-	-	S	P	V	-	-	+
<i>M. kansasii</i>	I	-	-	SR/S	P	-	-	+	V
<i>M. marinum</i>	I	-	-	S/SR	P	-(+)	-		+
<i>M. scrofulaceum</i>	II	-	-	S	S	-	-	-	V
<i>M. avium-intracellulare</i>	III	-	-	S/R	N	-	-	-	-
<i>M. ulcérant</i>	III	-	-	R	N	-	-	-	V
<i>M. xenopus</i>	III	-	-	S	N(S)	-	-	-	-
<i>M. chelonae</i>	IV	+	-	S/R	N	V	+(-)	--	+
<i>M. fortuitum</i>	IV	+	-	S/R	N	V	+	+	+
<i>M. phlei</i>	IV	+	-	R	S	•	-	+	•
<i>M. smegmatis</i>	IV	+	-	R/S	N	•	-	+	•

R : Rough, S : smolt, SR : intermédiaire

P : Photochromogénique (pigmentation uniquement si la culture est exposée à la lumière)

S : Scotochromogénique (pigment produit à la lumière et à l'obscurité)

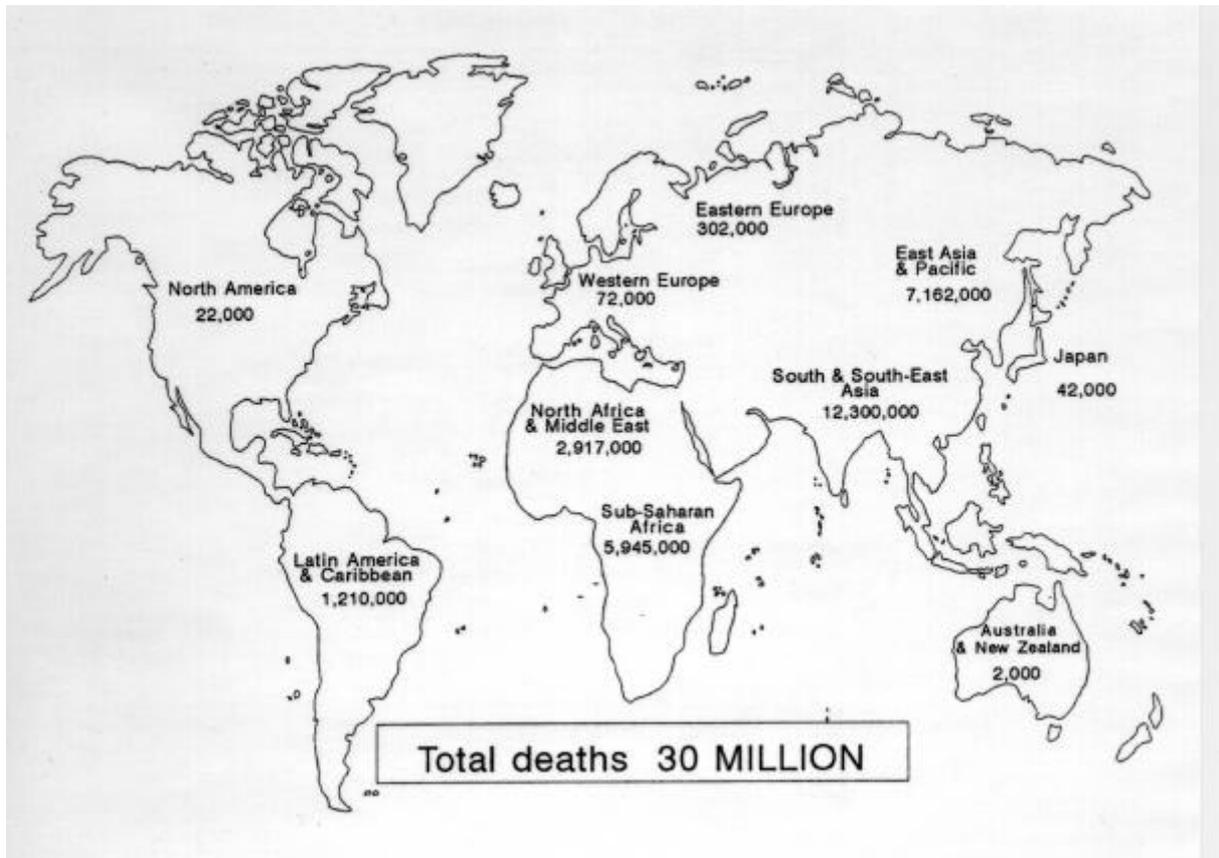
N : non-chromogénique (pas de pigment produit)

V : réactions variables, -(+) :majoritairement négatif

+(-) : positif majoritairement

**Annexe 5** : Estimation de la prévalence de la tuberculose humaine dans le monde entre 1990 et 1999

**Annexe 6 :** Estimation de la mortalité humaine due à la tuberculose dans le monde entre 1990 et 1999.



Toulouse, 2002

NOM : DUBOIS

PRENOM : MELANIE

TITRE : Les tuberculoses chez l'animal et l'homme : actualités épidémiologique et diagnostique.

RESUME :

La tuberculose est une infection cosmopolite touchant de nombreuses espèces et responsable chaque année de millions de morts dans le monde. Ce travail a pour objectif de recenser les connaissances épidémiologiques et diagnostiques actuelles.

La première partie répertorie les agents responsables de la tuberculose de l'homme et de l'animal, les différentes étapes de l'infection, la symptomatologie et l'épidémiologie de l'infection et de la maladie, sans oublier l'aspect zoonosique. La relation tuberculose/Sida est également développée. L'étude épidémiologique mondiale et nationale montrera l'hétérogénéité et l'évolution de la répartition de la tuberculose. Plusieurs paragraphes sont consacrés aux organisations nationales et internationales de surveillance sanitaire, soulignant leur importance dans la surveillance et la lutte contre la maladie.

La deuxième partie développe les différentes méthodes de diagnostic et donne des exemples d'utilisation des techniques diagnostiques de biologie moléculaire.

La troisième partie traite de la biologie moléculaire avec une étude particulière des vaccins « candidats » et une énonciation illustrée des découvertes qu'elle permet et des perspectives qu'elle ouvre.

MOTS-CLES : Tuberculose, Mycobactéries, Zoonose, Epidémiologie, Diagnostic

ENGLISH TITLE : Tuberculosis in animal and human: epidemiological and diagnostic actualities.

ABSTRACT :

Tuberculosis is a cosmopolitan infection which affects many species and is responsible for many deaths all over the world.

In this study, the author summarizes the data relative to the agents of tuberculosis in human and animal, the different stages of the infection, the symptoms and the epidemiology of the infection and the illness without forgetting the zoonotic aspect. The relation between tuberculosis and AIDS is developed too. The international and national epidemiological study will show the heterogeneity and the evolution of the repartition of tuberculosis. Several paragraphs are given over to Public Health Surveillance with a description of the health surveillance Organizations and of the role in struggle against infection.

In the second part, the author describes the different diagnostic techniques and gives examples of the molecular biology ones.

In the third part, the author deals with molecular biology with a special study of vaccines, discoveries and perspectives.

KEY WORDS : Tuberculosis, Mycobacteria, Zoonosis, Epidemiology, Diagnosis.