

CAHIER DE

Formation

Biologie médicale

N°29

2003

Mycobactéries Mycobactérioses



BIOFORMA

FORMATION CONTINUE DES BIOLOGISTES

BIOFORMA

Cher Confrère,

La compétence des Biologistes, Médecins ou Pharmaciens, Vétérinaires, Hospitaliers ou Privés, ne serait pas complète si la Microbiologie leur était indifférente. Cette discipline scientifique, qui par son origine plonge au cœur même du vivant, est un monde fabuleux de complexité et de simplicité, d'évolution permanente, de questionnement existentiel, de menaces cliniques, de défis technologiques. Les thérapies existantes permettent aujourd'hui d'évacuer le risque léthal. Mais le danger n'est jamais loin.

Ce Cahier de Formation, rédigé par un groupe de spécialistes particulièrement reconnus pour leur capacité dans cette discipline scientifique, vous apporte un ensemble de données permettant la mise à niveau de vos connaissances.

C'est la vocation de BIOFORMA, votre organisme de formation continue, de vous présenter les éléments nécessaires à la préservation et à l'enrichissement de votre savoir.

Nous vous souhaitons bonne réception de ce document. Vous aurez remarqué des améliorations et modifications de la présentation et du graphisme de ce nouveau cahier. Nous espérons que cette formule rencontrera votre attente et votre assentiment.

Nous vous prions d'accepter, Cher Confrère, nos cordiales et confraternelles salutations.

*Adrien Bédossa
Président*

230, boulevard Raspail
75014 Paris

Tél. 01.56.54.39.39

Fax : 01.56.54.39.30

site internet : ww.bioforma.net

E-mail : bioforma@wanadoo.fr

Association régie par la loi de 1901

siret : 391 155 744 00025

code APE : 8040



Ceci est la VERSION NUMERIQUE des CAHIERS BIOFORMA déjà parus et distribués gratuitement* à l'ensemble des Laboratoires d'Analyses de Biologie Médicale en FRANCE.

Ce fichier et son contenu sont la propriété de BIOFORMA.
LES DROITS D'AUTEURS SONT PROTEGES A LA B.N.F.

Toute reproduction, toute utilisation, partielle ou totale, des textes, schémas et photos de cet ouvrage, sans l'autorisation écrite de BIOFORMA, seront poursuivies devant les tribunaux compétents.

Seule une impression pour une copie personnelle est permise.
(étudiant, interne, biologiste de labm)

Cet ouvrage n'est pas vendu dans le commerce.

* le financement est assuré par la dotation des Caisses d'Assurance Maladie à la formation continue conventionnelle des biologistes du secteur privé.

230 bd Raspail 75014 Paris - www.bioforma.net - bioforma@wanadoo.fr

Liste des auteurs

■ Bernard CARBONNELLE

Professeur des Universités Praticien Hospitalier

Laboratoire de Bactériologie Virologie Hygiène

Centre Hospitalier et Universitaire d'Angers - Hôpital Larrey - 49033 ANGERS

Tél. 02 41 35 47 09 - becarbonnelle@chu-angers.fr

■ Michèle DAILLOUX

Maître de Conférences des Universités Praticien Hospitalier

Laboratoire de Bactériologie

Hôpital Brabois - CHU de Nancy

54511 VANDOEUVRE LES NANCY

Tél. 03 83 15 34 72 - m.dailloux@chu-nancy.fr

■ Léa LEBRUN

Maître de Conférences des Universités Praticien Hospitalier

Laboratoire de Bactériologie

Hôpital Antoine Béclère

157 rue de la porte de Trivaux - 92141 CLAMART

Tél. 01 45 37 46 29 - lea.lebrun@abc.ap-hop-paris.fr

■ Jeanne MAUGEIN

Maître de Conférences des Universités Praticien Hospitalier

Laboratoire de Bactériologie

Hôpital Haut Lévêque

avenue Magellan - 33604 PESSAC

Tél. 05 57 65 64 91 - jeanne.maugein@chu-bordeaux.fr

■ Chantal PERNOT

Maître de Conférences des Universités Praticien Hospitalier

Laboratoire de Bactériologie Hygiène

Groupe Hospitalier Pitié Salpêtrière

47 - 83 boulevard de l'Hôpital - 75651 PARIS Cedex 13

Tél. 01 42 16 20 70 - bacterio.hyg@psl.ap-hop-paris.fr

SOMMAIRE

INTRODUCTION

Mycobacterium tuberculosis et la tuberculose 16

A - Notions d'épidémiologie	16
B - Caractères biologiques de M. tuberculosis	19
I - Des caractéristiques anatomiques	19
1° des faits bactériologiques	19
2° Des faits immunologiques	20
II - Des propriétés physiologiques particulières	20
C - Physiopathologie	21
I - Le contagé et son évolution	21
II - Evolution possible suite à ce premier contact	21
III - Evolution cellulaire après le contagé	23
1° Phagocytose du bacille par le macrophage	23
2° Reconnaissance de l'antigène	24
3° L'activation du macrophage est une conséquence de la reconnaissance de l'antigène par les cellules lymphocytaires T	25
4° Le macrophage activé acquiert des propriétés nouvelles	27
5° La formation du granulome empêche la dissémination des bacilles et réalise des conditions qui inhibent leur multiplication	27
D - Quelques questions	30
I - La paroi des mycobactéries	30
II - Bacilles quiescents	31
III - Le phénomène de Koch. Les tuberculines, l'intradermo-réaction	32
IV - Génétique	33
1° Les anomalies portant sur le récepteur de l'interféron γ	33
2° Les déficits portant sur le récepteur de l'IL12	34
V - Thérapeutique antibiotique	34
VI - Quelques apports découlant du séquençage du génome de M. tuberculosis (37)	35

Mise en évidence des mycobactéries 37

A - Prélèvements	38
I - Généralités	38
II - Les différents prélèvements	39
1° Les prélèvements d'origine pulmonaire	39
a) Les crachats	39
b) Les tubages gastriques	39
c) Les prélèvements sous fibroscopie	39

SOMMAIRE

2° Les prélèvements extra-pulmonaires	40
a) Les urines.....	40
b) Les abcès, lésions cutanées et tissus divers	40
c) Les liquides d'épanchement	40
d) Le sang et la moelle osseuse	41
e) Les selles.....	41
B - Préparation de l'échantillon - Décontamination - Fluidification.....	41
I - Principe et but.....	41
II - Contrôle d'une bonne décontamination.....	41
III - Circonstances dans lesquelles on peut éviter la décontamination.....	42
IV - Les différentes méthodes de décontamination.....	42
1° Les méthodes utilisant la soude	42
a) Méthode au lauryl sulfate de sodium ou méthode de Tacquet-Tison	42
b) Méthode à la N-acétyl- cystéine sodique ou méthode de Kubica	42
c) Méthode à la soude à 4 % ou méthode de Petroff	43
2° Autres méthodes	43
a) Méthode à l'acide sulfurique à 4 %	43
b) Méthode au chlorure de benzalkonium (Zéphiran)	43
c) Méthode à l'acide oxalique (44).....	43
d) Méthode au chlorure de cétyl pyridinium (CPC) et chlorure de sodium	43
C - Examen microscopique.....	44
I - Modalités techniques de l'examen microscopique	44
1° Réalisation du frottis.....	44
2° Fixation	44
3° Coloration de Ziehl Neelsen.....	46
4° Coloration à l'auramine.....	46
II - Expression des résultats.....	46
D - Mise en culture	47
I - Milieux solides.....	47
1° Milieux à l'œuf de Löwenstein-Jensen et Coletso	47
2° Milieux gélosés 7H de Middlebrook	48
3° Remarques	48
a) Règles à observer pour obtenir une bonne culture sur milieux solides	48
b) Lecture des cultures	48
c) Rendu des résultats des cultures.....	49
II - Culture en milieux liquides.....	49
1° Pourquoi des milieux liquides.....	49
2° Les différentes méthodologies	49
A - Le système Bactec™ 460 TB (Becton Dickinson).....	49
a) Principe	51
b) L'appareillage et les lectures	51
c) Délai de détection et sensibilité	51
d) Inconvénients.....	51

B - Milieux liquides non radiométriques	52
a) Milieux à utiliser manuellement.....	52
- Le tube BBL® MGIT™	52
- Système MB Redox (Biotest).....	52
b) Méthodes automatiques	52
- Systèmes BD Bactec™ 9000MB (Becton Dickinson)	52
- Système Bactec™ MGIT™ 960 (Becton Dickinson).....	52
- Système BactecT/ Alert 3D™ (Organon Technika).....	54
C - Remarques	54
• Ensemencement des milieux liquides et suivi des cultures.....	54
• Surveillance des cultures en milieux liquides	54
• Délai de détection et sensibilité des cultures en milieu liquide	55
• Intérêt des différents milieux liquides : avantages et inconvénients.....	55
III - Cas particuliers	55
1° Hémocultures	55
2° Les autres prélèvements.....	56
a) Selles : La culture des selles pour recherche de mycobactéries	56
b) Pus : Les pus et les liquides très purulents	56
3° Conditions particulières de culture	56
E - L'amplification génomique appliquée au diagnostic de la tuberculose	56
I - Principe de la PCR	57
II - Techniques	58
1° La PCR : Méthode Amplicor <i>M. tuberculosis</i> MTB (Roche)	58
2° La T.M.A. (Transcription Mediated Amplification) Gen-Probe amplified <i>M. tuberculosis</i> direct test bioMérieux	59
3° Le S.D.A. (Strand displacement Amplification) BD Probe Tec TMET DTB assay	59
4° Autres méthodes	59
a) La L.C.R. (Ligase Chain Reaction)	59
b) NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification).....	60
III - Efficacité des méthodes d'amplification génique	60
IV - Indications actuelles de l'amplification génique dans le diagnostic de la tuberculose pulmonaire	61

Etude de la sensibilité aux antibiotiques..... 62

A - Méthodes phénotypiques	63
I - Méthodes en milieu solide	63
1° Détermination de la proportion des bactéries résistantes	63
2° Comparaison de la proportion obtenue à la proportion critique.....	65
II - Méthodes en milieu liquide	65
1° Technique utilisant le BACTEC 460 TB.....	65
2° La méthode en milieu liquide avec la méthodologie MGIT.....	65
III - La méthode utilisant les bactériophages spécifiques de <i>M. tuberculosis</i>	66

SOMMAIRE

B - Méthodes génotypiques	67
C - Etude de la sensibilité des mycobactéries atypiques	70
I - Le principe	70
1° En milieu liquide avec les flacons 7H12B.....	70
2° D'autres méthodes peuvent être utilisées.....	71
II - Interprétation	71

Identification des mycobactéries..... 76

A - Etudes préliminaires	76
I - vérifier l'Acido-Alcoolo-Résistance par la coloration de Ziehl	76
II - Observation des cultures positives	78
1° Sur milieu solide.....	78
2° Sur milieux liquides.....	78
III - A l'issue de cette première phase	78
B - Identification d'une mycobactérie tuberculeuse	80
I - Identification du complexe tuberculosis	80
1° Hybridation moléculaire.....	80
2° Utilisation de la PCR.....	82
II - Individualisation des espèces au sein du complexe tuberculosis	82
1° Méthode phénotypique.....	82
2° Méthode génotypique.....	84
C - Identification des mycobactéries non tuberculeuses	86
I - Méthodes génotypiques	86
1° Avec kits commercialisés.....	86
2° Méthodes non commercialisées.....	86
II - Méthodes phénotypiques	90

Mycobactéries autres que tuberculeuses susceptibles de manifester un pouvoir pathogène..... 96

A - Généralités	96
I - Microbiologie	96
II - Pouvoir pathogène	97
1° Les infections pulmonaires.....	97
2° Les infections cutanées.....	98
3° Dans l'étiologie des adénites.....	98
4° Les infections moins fréquentes.....	98
5° Chez l'immunodéprimé.....	98
III - Sensibilité aux antibiotiques et traitement	99
IV - Ecologie des MNT	99

B - <i>M. kansasii</i>	100
I - Historique	100
II - Caractéristiques cliniques	100
III - Caractères bactériologiques	101
IV - Ecologie - Epidémiologie	102
V - Traitement	102
C - <i>M. marinum</i>	102
I - Historique	102
II - Caractéristiques cliniques	103
1° Chez l'homme	103
2° Infections des poissons	103
III - Caractères bactériologiques	103
IV - Ecologie - Epidémiologie	105
V - Traitement	105
D - <i>M. simiae</i>	106
I - Historique	106
II - Caractéristiques cliniques	106
III - Caractères bactériologiques	106
IV - Ecologie - Epidémiologie	107
V - Traitement	107
E - <i>M. goodnae</i>	107
I - Historique	107
II - Caractéristiques cliniques	107
III - Caractères bactériologiques	108
IV - Ecologie - Epidémiologie	109
V - Traitement	109
F - <i>M. scrofulaceum</i>	109
I - Historique	109
II - Caractères cliniques	109
1° Les adénites cervicales de l'enfant	109
2° Les infections pulmonaires	109
3° Les autres infections	110
III - Caractères bactériologiques	110
IV - Ecologie - Epidémiologie	110
V - Traitement	111
1° Sensibilité aux antibiotiques in vitro	111
2° Modalités du traitement	111
G - <i>M. szulgai</i>	111
I - Historique	111
II - Caractéristiques cliniques	111

SOMMAIRE

III - Caractères bactériologiques	111
IV - Ecologie - Epidémiologie	112
V - Traitement	112
H - <i>M. avium</i> intracellulare, le complexe MAC.....	112
I - Historique	112
II - Mycobactéries du complexe aviaire	113
III - Caractères cliniques	114
1° - Pathogénèse.....	114
2° - Manifestations cliniques.....	115
a) Chez les sujets séronégatifs pour le VIH.....	115
b) Chez les malades atteints de SIDA.....	115
IV - Caractères bactériologiques	115
V - Ecologie - Epidémiologie	116
VI - Traitement	117
I - <i>M. genavense</i>.....	117
I - Historique	117
II - Caractères cliniques	117
III - Caractères bactériologiques	118
IV - Ecologie - Epidémiologie.....	118
V - Traitement	119
J - <i>M. haemophilum</i>	119
I - Historique	119
II - Caractéristiques cliniques	119
III - Caractères bactériologiques	119
IV - Ecologie - Epidémiologie.....	120
V - Traitement	120
K - <i>M. malmoense</i>	120
I - Historique	120
II - Caractéristiques cliniques	122
III - Caractères bactériologiques	122
IV - Ecologie - Epidémiologie	122
V - Traitement	123
L - Le complexe terrae	123
I - Historique	123
II - Caractéristiques cliniques	123
III - Caractères bactériologiques	124
IV - Ecologie - Epidémiologie.....	124
V - Traitement	124

M - <i>M. ulcerans</i>	125
I - Historique	125
II - Caractères cliniques	127
1° Les formes cutanées évoluent en trois étapes	127
a) Phase pré-ulcérative	127
b) La phase ulcérative	127
c) Phase de cicatrisation	129
2° Les formes osseuses : arthrites, ostéites, ostéomyélites	129
III - Caractères bactériologiques	129
IV - Ecologie - Epidémiologie	131
V - Traitement	132
1° Sensibilité aux antibiotiques	132
2° Le traitement chirurgical	132
N - <i>M. xenopi</i>	132
I - Historique	132
II - Caractéristiques cliniques et épidémiologiques	132
III - Caractères bactériologiques	133
IV - Ecologie - Epidémiologie	133
V - Traitement	134
O - Mycobactéries à croissance rapide	134
I - Historique	134
II - Caractères cliniques	135
III - Caractères bactériologiques	136
IV - Ecologie - Epidémiologie	136
V - Traitement	137
ANNEXES	139
Coloration de Ziehl Neelsen	140
Coloration à l'Auramine	141
Décontamination par la méthode de Kubica à l'acétyl-cystéine et à la soude	142
Décontamination par la méthode du lauryl-sulfate de sodium	143
Recherche de l'acide nicotinique	144
Réduction des nitrates	145
Critères microbiologiques de pathogénicité d'une MNT	146
BIBLIOGRAPHIE	147

PREFACE

Cet opuscule se veut être avant tout un moyen d'enseignement. Enseignement des internes en Biologie mais aussi, pourquoi pas, des internes en Médecine, Pneumologie et Maladies infectieuses. Il s'adresse également aux biologistes médicaux, il se présente donc comme un document d'enseignement post-universitaire. Dans cette optique les rappels sont volontairement réduits à l'essentiel, c'est à dire à ce qui est nécessaire à la compréhension du comment et du pourquoi des analyses destinées au diagnostic des mycobactérioses et à leur interprétation.

C'est ainsi que dans le premier chapitre on trouvera des notions d'épidémiologie, de biologie de *Mycobacterium tuberculosis*, de la physiopathologie de la tuberculose et la réponse à quelques questions concernant des points particuliers ou des ouvertures vers l'avenir. Les trois chapitres suivants sont des chapitres techniques qui envisagent la mise en évidence des mycobactéries à partir des divers prélèvements qui parviennent au laboratoire, l'identification des germes isolés et l'étude de leur sensibilité aux antibiotiques. Les techniques qui ont toujours cours y sont développées et une place importante est faite aux techniques de Biologie Moléculaire. En effet la Mycobactériologie est certainement le chapitre de la Microbiologie qui au cours des vingt dernières années a le plus bénéficié des apports des méthodes nouvelles. Ce furent d'abord l'utilisation des cultures en milieu liquide qui permettent de raccourcir les délais de réponse, puis l'utilisation des sondes nucléiques qui en quelques heures permet l'identification des quatre espèces les plus fréquentes ; en 1990 l'apparition de la PCR avait, dans un premier temps, permis d'envisager que le diagnostic de la Lèpre et de la Tuberculose pourraient être faits en 24 heures. Ces espoirs devaient par la suite être tempérés par le manque de sensibilité de cette méthode par rapport à la

culture. Les milieux M.G.I.T., M.B. Rédox, remplacent avantageusement le milieu 7H12B, radioactif. L'apparition des automates, des bandelettes réactives pour identification des Mycobactéries atypiques, pour mise en évidence des mutants résistants à la rifampicine et tout récemment pour démembrer en ses différentes espèces le Complexe *tuberculosis*, toutes ces acquisitions ont été testées et apportent d'ores et déjà des solutions avantageuses de remplacement des méthodes anciennes dont la réalisation et l'interprétation restent difficiles.

On se trouve actuellement à une période charnière du diagnostic mycobactériologique où les méthodes conventionnelles ont toujours cours, mais où les méthodes de biologie moléculaire prennent de plus en plus d'importance en attendant qu'elles remplacent les anciennes techniques et permettent par le tout moléculaire l'automation complète de nos laboratoires. Les puces à ADN laissent présager de ce que pourrait être l'avenir.

Le cinquième chapitre est consacré aux monographies des mycobactéries non tuberculeuses dont le pouvoir pathogène pour l'homme est établi. En annexe se trouvent le détail des techniques usuelles. Pour les techniques d'utilisation moins fréquentes le lecteur pourra, s'il le désire, se référer au G.B.E.A. Mycobactéries (www.uvp5.univ-Paris5.fr).

Ce travail est une œuvre collective. Il a été réalisé par des bactériologistes des CHU du groupe Azay Mycobactéries.

INTRODUCTION

Sous le terme "Mycobactérioses" sont regroupées des infections de l'homme et des animaux provoquées par les mycobactéries.

Étymologiquement, le terme *Mycobacterium* provient de deux racines empruntées au grec "Myces" pour champignon et "Bakterion" petit bâton. En fait, ces bactéries n'ont en commun avec les champignons que leur seule propension à se développer en s'étalant à la surface des milieux liquides.

Les mycobactéries appartiennent à l'ordre des *Actinomycetales* où la famille des *Mycobacteriaceae* ne comporte qu'un seul genre, le genre *Mycobacterium*. (fig. 1) caractérisé par une propriété tinctoriale essentielle : ce sont des Bacilles Acido-Alcool Résistants (BAAR). Cette propriété est due à la richesse de leur paroi en lipides qui les rend imperméables aux colorants usuels mais qui fixe intensément les colorants alcalins comme la fuschine basique et s'oppose à leur décoloration après un traitement conjoint par l'acide et l'alcool. Toutes les mycobactéries sont des B.A.A.R. mais toutes les bactéries acido-résistantes ne sont pas des mycobactéries. En effet, les *Nocardia*, quelques *Actinomycetes*, quelques corynebactéries, sont faiblement acido-résistantes.

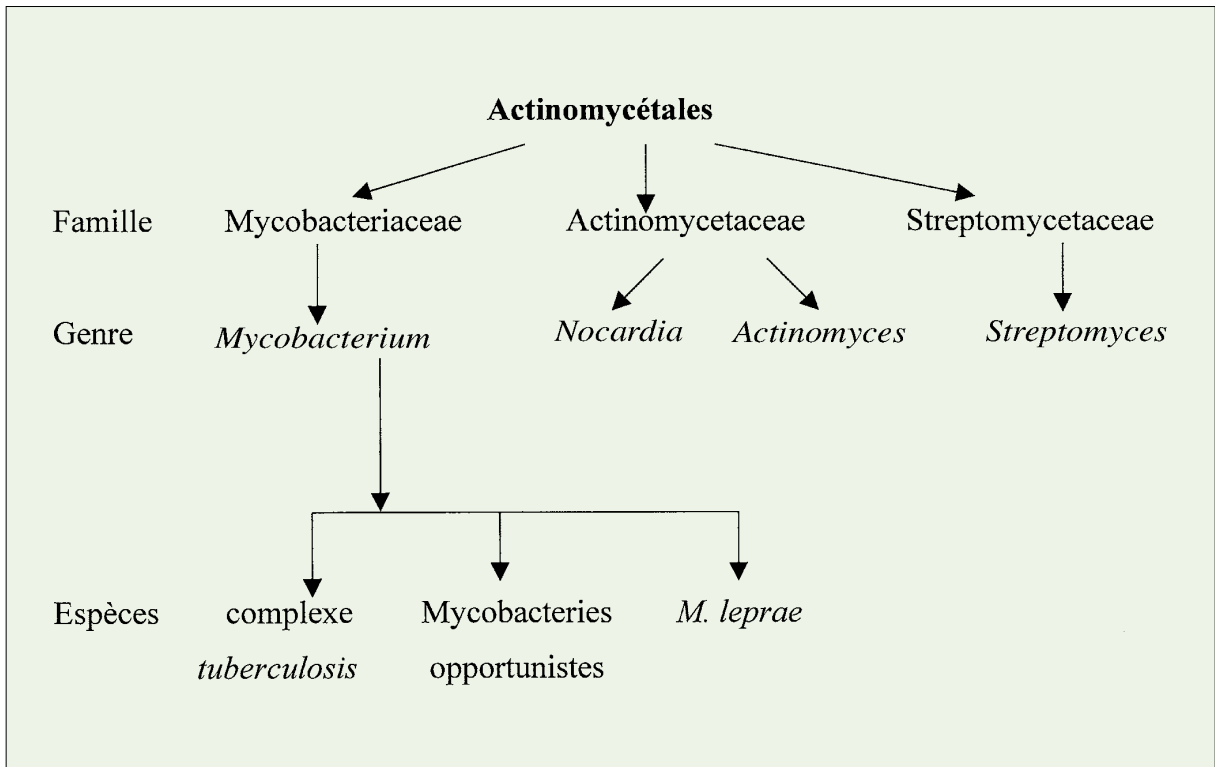
Le genre *Mycobacterium* peut être subdivisé en trois groupes : les mycobactéries du "complexe *tuberculosis*" (*M. tuberculosis*, *M. bovis* et BCG, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. microti*), les mycobactéries atypiques et *M. leprae*.

En ce qui concerne leur habitat, les mycobactéries du "complexe *tuberculosis*" ne sont retrouvées que chez des hôtes animaux ; *M. leprae* ne se rencontre que chez l'homme. Les mycobactéries dites "atypiques" sont retrouvées dans l'environnement hydro-tellurique à partir duquel l'homme et les animaux se contaminent. Il en résulte que si on peut envisager, à terme, par le dépistage et le traitement bien conduits de la tuberculose et de la lèpre, l'élimination de ces maladies, il n'en est pas de même pour les mycobactéries atypiques.

Sur le plan du pouvoir pathogène, chez l'homme, *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *M. ulcerans*, *M. marinum*, provoquent des infections spécifiques : la tuberculose, la lèpre, l'ulcère de Buruli, le granulome des piscines. Chez les animaux, *M. paratuberculosis* est à l'origine de la maladie de Johne, entérite hypertrophiante des bovidés, *M. bovis* est responsable de la tuberculose des bovidés, *M. avium* de celle des oiseaux. Mais les mycobactéries du complexe *avium intracellulare* (MAC) ainsi que les autres mycobactéries atypiques ne manifestent un pouvoir pathogène qu'en profitant d'une défaillance locale ou généralisée des défenses de l'hôte ; on les appelle encore, pour cette raison, mycobactéries opportunistes. Ces infections, favorisées par les thérapeutiques immunosuppressives ou par le V.I.H. ont vu, au cours des vingt dernières années, augmenter leur fréquence. Elles posent des problèmes diagnostiques et leur thérapeutique est difficile.

Compte tenu du pouvoir pathogène des mycobactéries, de leurs propriétés particulières : (acido-alcool-résistance, exigences métaboliques, lenteur fréquente des cultures, comportement vis à vis des antibiotiques) leur étude exige des méthodes particulières qui nécessitent, dans cette section du laboratoire de bactériologie, la mise en œuvre d'une organisation spécifique.

Figure 1 : Filiation taxonomique des mycobactéries (85).



Mycobacterium tuberculosis et la tuberculose

Reconnue dès le néolithique sur d'indiscutables témoignages anatomo-pathologiques, la tuberculose a été une fidèle compagne de l'homme tout au long de son histoire. Elle tire son nom de l'aspect macroscopique des lésions des tissus infectés qui évoquent des petits tubercules. Ces lésions granulomateuses ne sont pas spécifiques de la tuberculose, on les rencontre dans d'autres pathologies telles que les pneumoconioses ou la sarcoïdose. L'infection tuberculeuse donne naissance à une destruction particulière des tissus qui est caractérisée par la nécrose caséeuse. La tuberculose chez l'homme est très majoritairement provoquée par *M. tuberculosis*, bacille découvert en 1882 par Robert Koch. Il est pour cela souvent désigné sous la dénomination B.K. pour Bacille de Koch. Plus rarement, ce sont *M. bovis* ou *M. africanum* qui sont en cause. Seule l'identification biochimique précise permet de les différencier, la symptomatologie est rigoureusement identique. Ces bactéries constituent ce qu'il est convenu d'appeler le "complexe *tuberculosis*". On y trouve aussi le bacille de Calmette et Guérin (B.C.G.) Le B.C.G., mutant peu virulent de *M. bovis* peut, dans certaines circonstances manifester un pouvoir agressif certain (adénopathies suppurées post-vaccinales, infections généralisées au cours des traitements des cancers de la vessie). *M. canettii* a été récemment reconnu comme une espèce responsable de tuberculose de l'homme. Son isolement est très rare. *M. microti*, espèce non pathogène pour l'homme, est impliquée dans les infections du campagnol.

A - Notions d'épidémiologie

La tuberculose est la maladie infectieuse la plus répandue dans l'espèce humaine (33). En 1993, la prévalence de l'infection tuberculeuse (nombre de sujets ayant été en contact avec le bacille) est évaluée à 2,1 milliards d'individus, plus du tiers de la population humaine. Ces sujets, contaminés par le bacille ne font que pour un petit nombre d'entre eux une tuberculose maladie. En effet, le nombre de nouveaux cas apparaissant par an est évalué à 7,5 millions. La mortalité en 1999 se chiffre à 1,8 millions ([tableau I 1](#)) (55). Les pays en voie de développement (Sud-Est asiatique, Amérique du Sud et surtout Afrique) paient le plus lourd tribut à l'infection tuberculeuse (13). Dans les pays développés, le nombre de cas de tuberculose a depuis le début du siècle dernier régulièrement diminué. En France, il est en 1999, d'environ 7000 cas déclarés, soit une incidence de l'ordre de 11 cas nouveaux par an pour 100.000 habitants (48). Ce chiffre baisse régulièrement d'année en année. Toutefois, le taux d'incidence varie selon les régions, 26,4 cas pour 100.000 habitants dans la région parisienne, 16,8 dans les départements d'Outre-Mer. Il varie selon la nationalité. En France métropolitaine, il est de 7,3 cas pour 100.000 habitants pour les sujets de nationalité française et de 45,8 cas pour les sujets de nationalité étrangère. Chez ceux-ci l'incidence passe à 62 cas dans les tranches d'âge de 25 à 39 ans et de plus de 60 ans ([Tableau I 2](#)).

Tableau I 1 : Tuberculose dans le monde.

Pays	Prévalence des sujets infectés	Nouveaux cas par an	Mortalité par an
En développement	1.700.000.000	7.500.000	1.800.000
Industrialisés	382.000.000	440.000*	64.000

*dont environ 300.000 en Europe de l'Est.

Tableau I 2 : Incidence de la tuberculose en 1999 en France métropolitaine selon l'âge et la nationalité exprimée pour 100.000 habitants (48).

Age	Nationalité Française	Nationalité étrangère
0 – 14	1,4	9,6
15 – 24	3,8	40
25 – 39	6	62
40 – 59	8,5	54,3
> 60	15,5	61,9

Dans les pays développés la majorité des tuberculoses maladie s'observe chez des sujets appartenant à l'un des groupes suivants appelés groupes à risques. Il s'agit des personnes âgées, des immunodéprimés, des personnes en situation précaire, des émigrés venant des pays de forte endémicité, des détenus et des personnels de santé.

Dans les pays en développement où la prévalence de l'infection tuberculeuse est élevée, l'épidémie de SIDA banalise la tuberculose au rang de maladie opportuniste. Elle entraîne, chez les sujets infectés par le VIH, la réactivation d'une infection tuberculeuse antérieurement acquise ou la progression d'une tuberculose contractée postérieurement à l'infection par le VIH. Compte tenu du nombre élevé des séropositifs tuberculeux ([tableau I 3](#)), le nombre des sources de contamination croît, ce qui a deux conséquences : la première contribue à augmenter le risque de contamination de la population séronégative, la seconde contribue à aggraver l'insuffisance chronique des moyens sanitaires de lutte contre la tuberculose.

Dans la société, on considère que globalement, contamination et infection se déroulent de la façon suivante : sur 100 malades "cracheurs", c'est-à-dire éliminant des bacilles, après une période de deux ans la moitié est morte, le quart est guéri et le quart restant est devenu tuberculeux chronique. Ils ont contaminé 1.000 malades parmi lesquels 100 feront une maladie tuberculeuse. Ces derniers seront préférentiellement recrutés dans les groupes à risques. Parmi ces 100 malades, un peu plus de 50 % élimineront des bacilles et assureront la dissémination de l'agent infectieux ([figure I 1 et I 2](#)).

Ces malades "cracheurs" éliminent au moins 10.000 bacilles par millilitre de crachat, ils représentent la principale source d'infection. Ils doivent être détectés rapidement (intérêt de l'examen microscopique) traités et isolés pour rompre la chaîne de transmission. Les malades dont l'examen microscopique est négatif mais chez lesquels la culture sera positive, sont moins infectieux.

Figure I 1 : Déroulement de la contamination et de l'infection tuberculeuses dans la communauté.

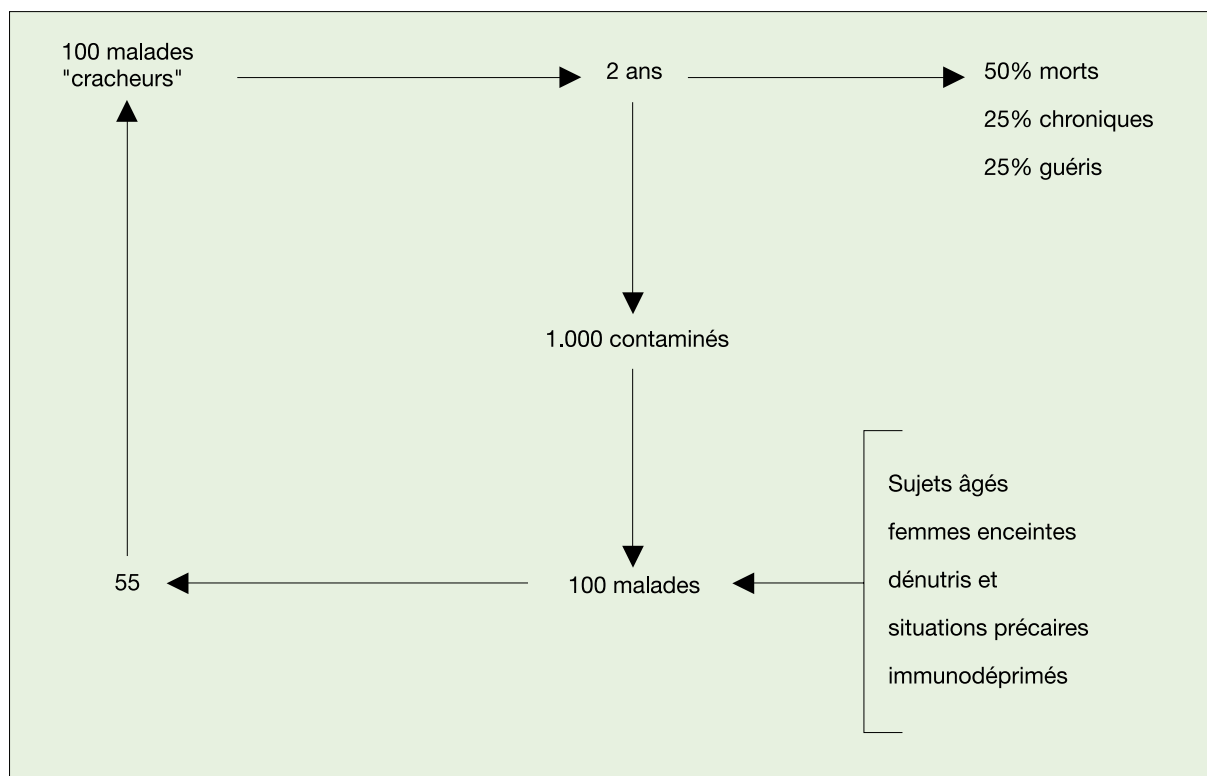


Figure I 2 : Un malade cracheur infecte 30 % des sujets contacts. Les 70 % restant ne présentent pas de signes d'infection. Parmi les sujets infectés, 5 % développeront une tuberculose maladie précoce. Chez les 95 % infectés qui ne font pas la maladie, 90 % continueront d'inhiber le bacille et 5 % après une période de latence feront une tuberculose post-primaire (85).

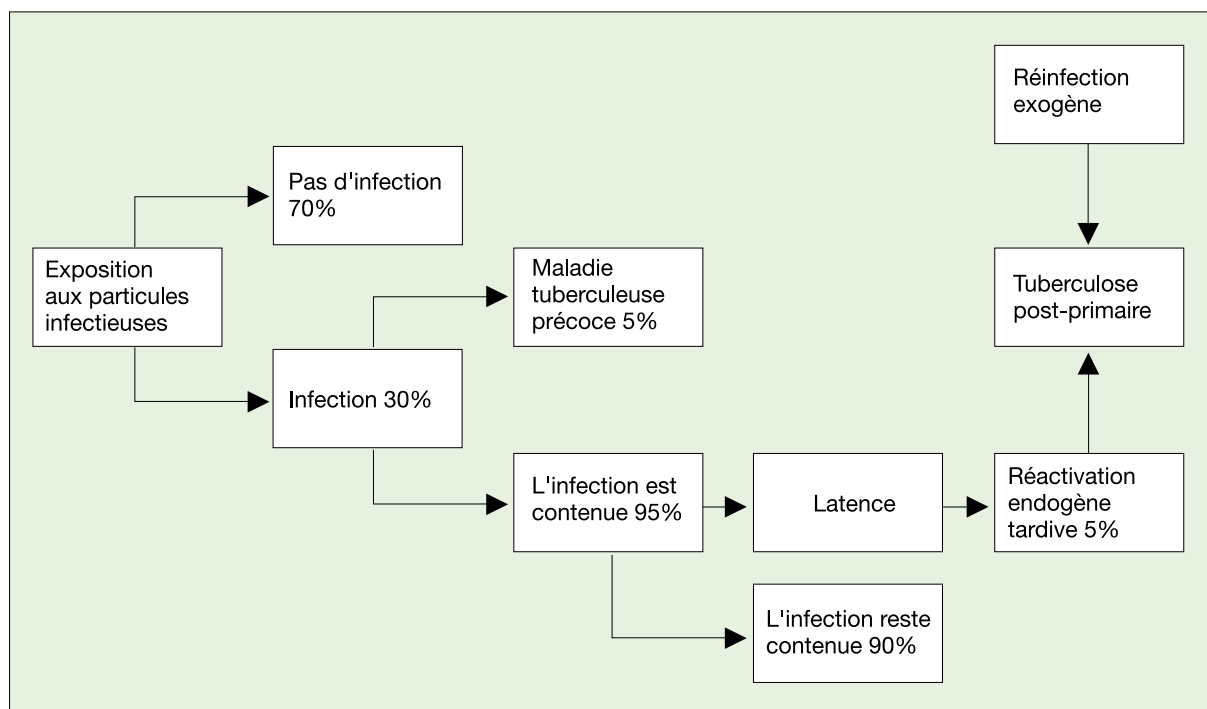


Tableau I 3 : Distribution des individus infectés par le VIH et le bacille tuberculeux dans la classe d'âge 15-49 ans, début 1992 (124).

Région	Infectés par le VIH en milliers	Infectés par la tuberculose (%)	Infectés par le VIH et la tuberculose en milliers	% du total
Afrique	6.500	48	3.120	77,8
Amériques ¹	1.000	30	300	7,5
Méditerranée Orientale	50	23	11	0,3
Sud-Est asiatique et Pacifique occidental ²	1.020	40	408	10,2
Europe et autres ³	1.550	11	170	4,2
Toutes les régions	10.120	34	4.009	100

1. Tous les pays, sauf Etats-Unis et Canada
2. Tous les pays de la région Pacifique occidentale sauf Japon, Australie, Nouvelle-Zélande
3. Etats-Unis, Canada, Australie, Nouvelle-Zélande, Japon

B - Caractères biologiques de *M. tuberculosis*

M. tuberculosis est la mycobactérie la plus fréquemment rencontrée chez l'homme. Elle partage, avec les autres mycobactéries, bon nombre de caractéristiques biologiques, parmi lesquelles :

I – Des caractéristiques anatomiques

Les mycobactéries doivent leurs propriétés particulières à la richesse de leur paroi en lipides qui explique :

1° des faits bactériologiques

- Il est très difficile de colorer ces germes par les méthodes habituellement utilisées en bactériologie courante. Bien que les mycobactéries soient Gram positif, leur propriété tinctoriale essentielle est leur acido-alcoolo-résistance, caractéristique du genre *Mycobacterium* et mise en évidence par la coloration de Ziehl Neelsen.
- La résistance des mycobactéries aux agents chimiques tels que les alcalis (soude), les acides (sulfurique...), les détergents (lauryl sulfate de sodium, chlorure de cetyl pyridinium...). Cette propriété est mise à profit pour la mise en culture des produits contaminés par les bactéries commensales; ces dernières beaucoup plus sensibles à ces substances sont éliminées après un contact de quelques minutes. C'est sur ce principe que reposent les méthodes de décontamination fluidification, préalable nécessaire à la mise en culture des prélèvements contaminés.
- La sensibilité particulière de *M. tuberculosis* aux antibiotiques. Certaines molécules, actives sur les bactéries pyrogènes, ne peuvent franchir la barrière hydrophobe de la paroi et ne peuvent atteindre leur cible, c'est par exemple le cas des bêta-lactamines. D'autres molécules qui

agissent en perturbant le métabolisme lipidique ou l'agencement complexe de la paroi ont une activité sur *M. tuberculosis* et sont dénuées d'efficacité sur les autres bactéries, c'est le cas par exemple de l'isoniazide et de l'éthambutol.

2° Des faits immunologiques

- L'injection intradermique de tuberculine permet de mettre en évidence, chez les sujets sensibilisés, l'existence d'une hypersensibilité de type retardée. La cuti-réaction et l'intradermoréaction sont les tests immunologiques qui mettent en évidence cette hypersensibilité.

- L'injection sous-cutanée ou intramusculaire à l'animal de laboratoire de mycobactéries tuées provoque au point d'injection une réaction inflammatoire granulomateuse.

Si à ces mycobactéries tuées, on mélange un antigène soluble vis-à-vis duquel on veut immuniser l'animal, la réalisation du granulome ralentit de façon très importante la résorption de l'antigène et fait persister beaucoup plus longtemps la stimulation antigénique. L'immunisation de l'animal est beaucoup plus efficace. C'est l'action adjuvante provoquée par l'adjuvant de Freud.

- La "cuirasse" lipidique qui entoure la bactérie et la capsule polysidique jouent un rôle dans la pathogénicité de *M. tuberculosis* en permettant sa multiplication intracellulaire.

- Les essais d'obtention d'antigènes spécifiques auraient dû permettre la mise au point de réactions sérologiques sensibles et spécifiques. Parmi les antigènes qui ont été préparés à partir de *M. tuberculosis* ont été essayés :

- Des antigènes polysaccharidiques comme l'arabinogalactane, l'arabino-mannane.

- Des peptidoglycolipides, mycoside C.

- Des antigènes protéiques antigène 5, antigène 6, antigène 85.

- Et l'antigène 65 KD, (protéine de stress) qui possède un déterminant antigénique spécifique de *M. tuberculosis* auraient donné des résultats intéressants. Mais dans l'ensemble, les études sérologiques ont été décevantes car ces antigènes, souvent présents chez de nombreuses espèces de mycobactéries, sont à l'origine de réactions croisées.

II – Des propriétés physiologiques particulières

a) *M. tuberculosis* est une bactérie exigeante dont la culture nécessite la présence de nombreux facteurs de croissance.

b) Son temps de division est élevé : environ 20 heures. Ceci explique :

- la lenteur de croissance : environ 3 semaines sur les milieux solides, 10 à 15 jours dans les milieux liquides.

- les particularités du traitement qui sera long (6 mois), mais une seule administration quotidienne des antibiotiques sera suffisante.

- le délai important qui sépare la contamination de l'apparition des signes cliniques et donc la difficulté de l'enquête épidémiologique.

c) C'est un germe aérophile, particularité qui n'est probablement pas étrangère à la localisation pulmonaire préférentielle de la maladie.

d) Les souches de *M. tuberculosis* sauvages, c'est-à-dire qui n'ont jamais été en contact avec les antibiotiques, possèdent naturellement un nombre de mutants résistants relativement élevé. Selon les antibiotiques, ce taux se situe entre 10^{-5} et 10^{-8} .

C - Physiopathologie

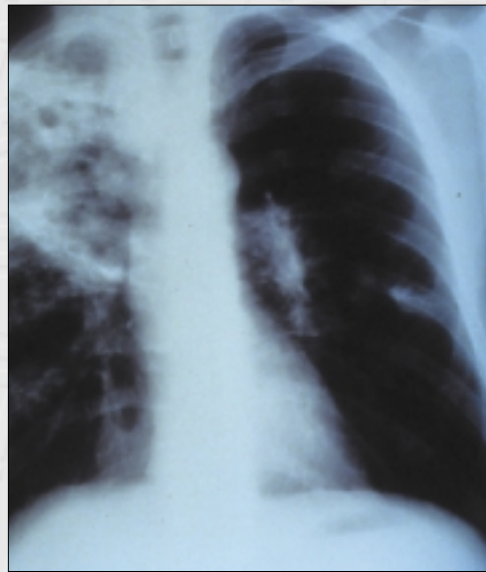
Les caractéristiques cliniques et histologiques de la tuberculose découlent de la conjonction de deux types de facteurs, d'une part, de la virulence du bacille et, d'autre part de la nature et de l'intensité des mécanismes de défense de l'hôte. Ceux-ci sont le résultat d'une étroite coopération cellulaire qui fait de la tuberculose le paradigme des maladies dont l'immunité protectrice est de type cellulaire. Elle fait intervenir des réactions qui évolueront selon deux axes principaux : la formation du granulome et la nécrose tissulaire.

I - Le contagage et son évolution

La tuberculose est d'abord et avant tout une infection des voies respiratoires. Le tuberculeux est le réservoir de microbes et partager le même espace de respiration avec un malade infecté est de loin le facteur de risque le plus important de contamination. Le malade "cracheur" émet, en parlant, en toussant, un aérosol de très fines gouttelettes (droplet nucléi ou gouttelettes de Pflugge) dont certaines chargées de quelques bacilles sont mises en suspension dans l'atmosphère. Ces particules qui ne mesurent que quelques microns sont un véhicule efficace pour le bacille tuberculeux. En effet, leur petite taille leur confère des propriétés aérodynamiques particulières qui leur permet, d'une part d'éviter d'être capturées et éliminées par le tapis mucociliaire comme c'est le cas des particules plus volumineuses, et d'autre part de suivre le flux d'air respiratoire jusqu'aux alvéoles pulmonaires où elles rencontrent le macrophage alvéolaire.

II - Evolution possible suite à ce premier contact

Les macrophages de sujets n'ayant pas eu de contact préalable avec le bacille tuberculeux ont à un degré variable, selon les individus, la capacité de tuer ou d'empêcher la multiplication des bacilles. Ainsi, après leur phagocytose, si le nombre des mycobactéries n'est pas trop élevé, leur digestion et leur élimination suit la majorité des contaminations. Si la contamination est plus importante et, ou, si les défenses innées de l'individu sont insuffisantes, des bacilles survivront et seront à l'origine d'une primo-infection. En général, l'organisme réagit à cette primo-infection et met en place une réponse immunitaire cellulaire efficace et rapide qui, en l'espace de quelques semaines, d'une part limite le processus infectieux grâce à l'activation des macrophages, et d'autre part crée, grâce à la nécrose tissulaire, des conditions défavorables à la multiplication des bacilles. Dans ces conditions, chez 90 % des infectés, la maladie s'arrête au stade de la primo-infection. Celle-ci est caractérisée par une lésion pulmonaire de petite taille accompagnée d'une adénopathie satellite. Durant la phase d'invasion tissulaire, des macrophages infectés peuvent migrer par voie lymphatique et par la circulation sanguine vers d'autres organes où l'infection pourra se développer, ainsi s'expliquent la participation ganglionnaire de la primo-infection et les tuberculoses extra-pulmonaires.



Lésions excavées et infiltratives de poumon au cours d'une tuberculose.



Si l'organisme ne parvient pas à mettre en place dans des délais suffisamment courts les défenses immunitaires cellulaires, la multiplication des bacilles entraîne, au niveau de la lésion, l'augmentation de la charge antigénique. Elle provoque un appel des monocytes circulants qui favorisent l'extension du foyer infectieux. Chez les sujets disposant d'une hypersensibilité de type retardé, les lymphocytes T cytotoxiques et les produits toxiques provenant de la multiplication intracellulaire des bacilles, tuent les macrophages qui libèrent leur contenu et sont à l'origine de la nécrose. Celle-ci est rapidement circonscrite par d'autres macrophages et par les cellules lymphocytaires T helper. L'ensemble contribue à former le granulome dont le centre sera occupé par le produit de nécrose, lequel est appelé caséum à cause de son aspect. Quand les phénomènes de défense cellulaire évoluent normalement, le caséum est solide et s'oppose à la multiplication des bacilles qui y sont enfermés. A l'inverse, si l'immunité cellulaire tarde à se mettre en place, le granulome ne se forme pas, les macrophages non activés se lysent et libèrent leur contenu enzymatique. La nécrose tissulaire se développe sous la forme de caséum liquide et constitue un bon milieu pour la multiplication des bacilles. La charge antigénique croît et favorise les manifestations de la réaction d'hypersensibilité retardée qui augmente la nécrose tissulaire. Un véritable cercle vicieux se crée.

Plus rarement, à la suite d'une contamination digestive, amygdalienne ou cutanée, la première rencontre du bacille se fera avec des macrophages respectivement en position digestive, amygdalienne ou cutanée.

III - Evolution cellulaire après le contage

1° Phagocytose du bacille par le macrophage

L'adhésion du bacille au phagocyte fait intervenir le double système classique, d'une part les épitopes du bacille qui sont nombreux et pas tous connus et, d'autre part des récepteurs spécifiques portés par la membrane de la cellule (récepteurs du mannose, de la transferrine, de la protéine A, de la molécule CD 14...). Les récepteurs les plus anciennement connus sont les récepteurs du complément CR₁, CR₃, CR₄ qui permettent, à la différence des autres récepteurs, la pénétration à bas bruit du bacille dans la cellule sans déclencher l'activation du macrophage (135).

Une fois le bacille fixé à la membrane cellulaire, celle-ci se déprime, cette invagination est l'ébauche du phagosome qui se forme et qui s'entoure sur sa face cellulaire d'une protéine particulière appelée T.A.C.O.(11). Cette protéine de revêtement n'est retrouvée ni dans les macrophages non infectés ni dans ceux infectés avec des mycobactéries tuées. Seuls les phagosomes contenant des mycobactéries vivantes sont revêtus de cette protéine. Elle empêcherait la fusion phagosome-lysosome.

Par ailleurs, dans le phagosome, *M. tuberculosis* élabore des radicaux de type NH₄⁺ et maintient une faible activité ATPasique qui, en conséquence, limite l'efficacité de la pompe à protons. Ces facteurs favorisent, dans le phagosome, le maintien d'un pH élevé compatible avec la multiplication du bacille. Au cours de la croissance intra-phagosomiale, le métabolisme microbien

donne naissance à des enzymes lytiques qui dégradent le phagosome, libèrent les mycobactéries dans le cytoplasme où elles vont continuer à se multiplier jusqu'à destruction de la cellule.

La réaction inflammatoire provoquée par cette lyse cellulaire attire d'autres phagocytes. Certains sont infectés et s'échappent avec leur charge bacillaire qu'ils transportent vers d'autres sites et en particulier au niveau du ganglion de drainage où sont réunis les différents types cellulaires susceptibles d'intervenir dans la réponse immunitaire.

Ainsi, *M. tuberculosis*, bactérie à développement intracellulaire a pu, chez le sujet neuf qui n'a pas été au préalable en contact avec le bacille, tromper les défenses du phagocyte et l'utiliser comme "cheval de Troie" pour pénétrer, sans dommages, dans l'organisme hôte et s'y multiplier.

2° Reconnaissance de l'antigène

Dans la cellule phagocytaire infectée présentatrice d'antigène, en l'occurrence le macrophage, des déterminants antigéniques provenant, soit du métabolisme microbien, soit des constituants bactériens de surface prélevés à la surface des bacilles, modifiés ou non par la cellule présentatrice d'antigène, sont présentés à la surface cellulaire au moyen des antigènes d'histocompatibilité de classe I ou de classe II. Ces déterminants antigéniques sont des molécules de petite taille dont la composition est mal connue. On sait qu'un certain nombre sont riches en mannose (113). Une connaissance plus approfondie de la structure de ces molécules pourrait avoir des répercussions importantes dans la mise au point d'un vaccin synthétique (63).

La fonction principale de ces molécules du système HLA est d'assurer la sélection, la fixation et le transport des fragments antigéniques générés dans la cellule phagocytaire et de les présenter au niveau de la membrane cytoplasmique aux lymphocytes T.

Les cellules lymphocytaires T possèdent des récepteurs membranaires qui reconnaissent spécifiquement les épitopes mycobactériens combinés aux molécules d'histocompatibilité. Les récepteurs membranaires lymphocytaires sont des hétérodimères liés par un pont disulfure et constitués, soit par une chaîne α et β , soit par une chaîne γ et δ . Selon la structure des chaînes protéiques, on distingue deux types de récepteurs, les récepteurs $\alpha\beta$ et $\gamma\delta$. Chez l'homme une très large majorité des cellules T expriment $\alpha\beta$ et une minorité exprime $\gamma\delta$.

Le récepteur isolé ne peut, lors de la rencontre avec l'antigène, assurer seul la transmission du signal d'activation. Il faut qu'intervienne une structure complémentaire appelée CD₃. Récepteur et CD₃ sont donc indispensables et doivent agir conjointement pour reconnaître l'antigène présenté par la molécule HLA et obtenir l'activation du lymphocyte T.

En plus du complexe récepteur T $\alpha\beta$ et T $\gamma\delta$, les lymphocytes T portent d'autres molécules membranaires qui leur confèrent des propriétés biologiques remarquables et permettent de caractériser les différentes populations de lymphocytes T. Les plus importants de ces marqueurs sont les CD₄ et les CD₈. Les cellules portant les récepteurs CD₈ reconnaissent les structures antigéniques liées aux antigènes d'histocompatibilité de classe I ; ce sont les cellules T cytotoxiques dotées d'une activité cytolytique. Elles sont activées par le contact avec des antigènes provenant des bacilles qui se multiplient dans le cytoplasme en dehors des

phagosomes, elles provoquent alors la lyse de la cellule présentatrice de l'antigène. Les cellules lymphocytaires CD₄ reconnaissent les complexes d'histocompatibilité de classe II et, ayant reconnu l'antigène provenant des bacilles qui se multiplient dans le phagosome, elles subissent une activation. Ces cellules lymphocytaires T élaborent diverses cytokines qui sont les médiateurs de la réponse immunitaire vis à vis des mycobactéries et autres bactéries à développement intracellulaire.

Ce sont elles qui sont responsables de l'activation du macrophage. C'est essentiellement sur ces deux populations lymphocytaires CD₄ et CD₈ que repose la protection antimycobactérienne. Leur apparition en nombre suffisant demande du temps car elle exige une multiplication suffisante du clone initial.

Toutefois, dans les infections à mycobactéries, les cellules T $\gamma\delta$ apparaissent précocément après la contamination, avant que n'apparaissent les cellules lymphocytaires T $\alpha\beta$. Ces cellules reconnaissent les antigènes de stress sur les cellules macrophagiques. Elles interviennent précocement et réalisent un granulome de type corps étranger qui limite la multiplication des bacilles et permet d'attendre que la multiplication des cellules T $\alpha\beta$ soit suffisante pour prendre efficacement le relais. Ces cellules permettraient d'assurer la jonction entre l'immunité naturelle et l'immunité spécifique acquise.

3° L'activation du macrophage est une conséquence de la reconnaissance de l'antigène par les cellules lymphocytaires T

Quand la cellule T a reconnu, par son site spécifique, l'antigène présenté par le macrophage, celui-ci élabore une monokine l'interleukine 12 (IL12) médiateur chimique qui se fixe sur un récepteur spécifique des lymphocytes CD₄ et CD₈ et provoque leur activation. Celle-ci a deux conséquences. D'une part, elle favorise la sécrétion de l'interféron γ (INF γ) cytokine majeure qui est un élément essentiel dans l'activation du macrophage et, d'autre part l'interleukine 2 (IL2) qui se fixe sur les lymphocytes et permet leur multiplication clonale.

Au sein des populations de lymphocytes T, CD₄ et CD₈ ont été reconnues des sous-populations définies par leur propriété de sécréter des lymphokines particulières. C'est ainsi qu'au sein des CD₄ on distingue, d'une part les lymphocytes T/CD₄/Th₁ qui élaborent l'INF γ et IL2. Ils jouent un rôle activateur et favorisent la réponse immunitaire protectrice. Les lymphocytes T/CD₄/Th₂ sécrètent, d'une part l'interleukine 4 (IL4) qui exerce un effet freinateur sur la sécrétion des cytokines élaborées par des cellules Th₁ (INF γ et IL2), ce qui retient défavorablement sur l'activation des macrophages et sur la multiplication clonale des cellules T, d'autre part elles sécrètent l'interleukine 10 (IL10) qui diminue le nombre de molécules HLA de classe 2 à la surface des macrophages et, de ce fait, diminue la présentation de l'antigène aux cellules Th₁. L'association IL₁₀ et IL₄ produit en plus une désactivation du macrophage. Les cellules Th₂ ont donc un rôle freinateur de la réponse immunitaire protectrice. En pratique, dans l'obtention d'une réponse immunitaire harmonieuse, les populations Th₁ et Th₂ ne fonctionnent pas indépendamment mais ont des effets modulateurs croisés. En règle générale, en ce qui concerne la tuberculose, la réponse Th₁ est prédominante. La coopération du couple Th₁ – Th₂

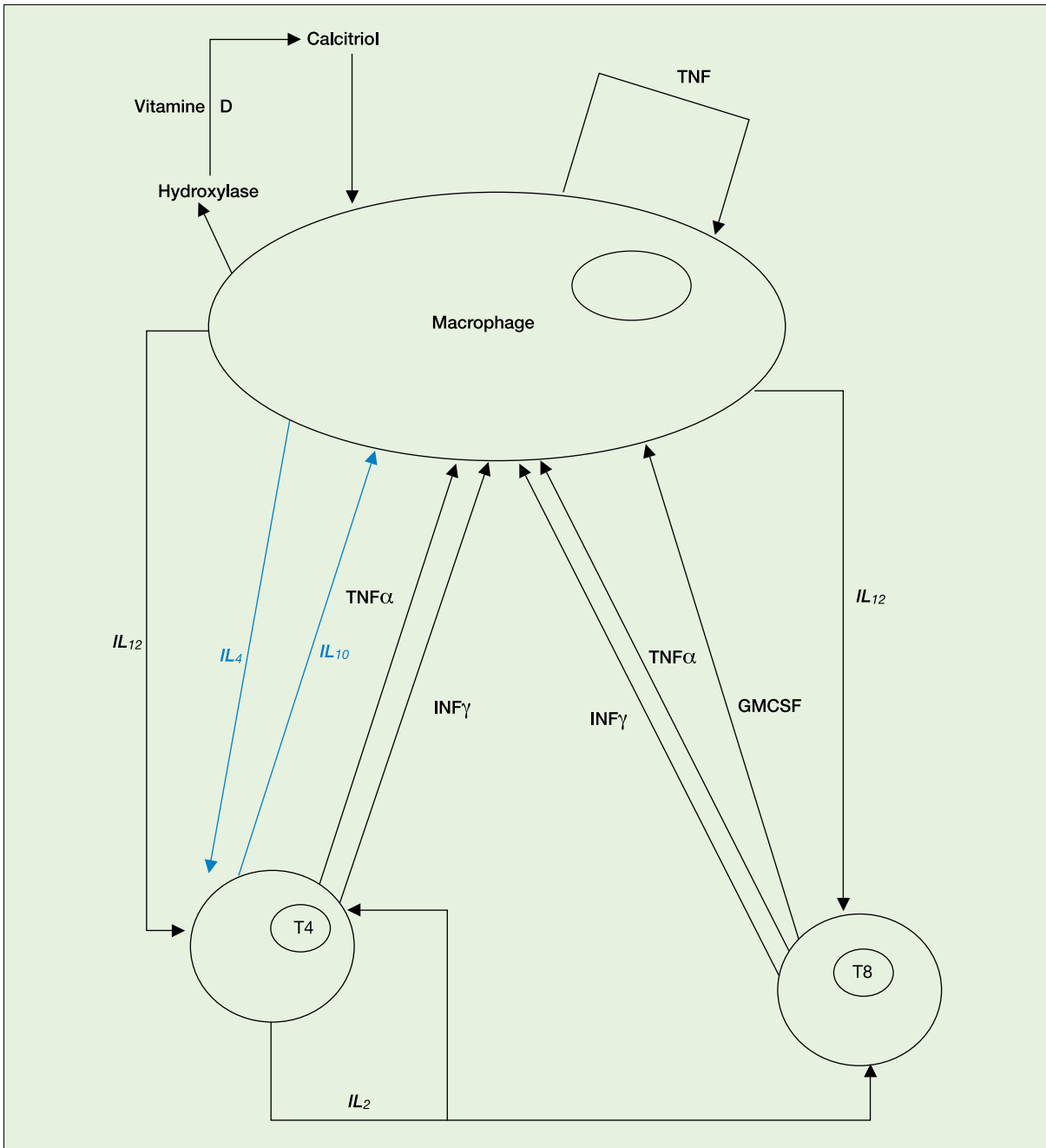


Figure I 3 : Principales interactions entre macrophage et lymphocytes.

Système activateur : l'infection du macrophage par *M. tuberculosis* entraîne l'élaboration de IL₁₂ qui active les cellules T₄ et T₈, celles-ci élaborent INF γ et TNF α qui activent le macrophage. Les cellules T fabriquent IL₂ qui provoque la multiplication clonale des deux populations lymphocytaires. Les cellules T₈ secrètent le GMCSF qui contribue à l'activation du macrophage. Elle se traduit par une production augmentée de TNF α , la mise en œuvre du système oxydatif, la sécrétion de calcitriol, qui tue les B.A.A.R..

Le système freinateur est élaboré par les lymphocytes. Deux lymphokines IL₄ et IL₁₀ agissent conjointement pour éviter l'emballement du système activateur. IL₁₀ élaborée par le macrophage et les lymphocytes T₄ diminue la production d'INF γ et de TNF α .

a été particulièrement étudiée dans la lèpre où la forme tuberculoïde s'expliquerait par l'excès d'une réponse Th₁. Dans la lèpre lépromateuse, ce serait le système Th₂ qui prédominerait et empêcherait l'activation du macrophage (figure I 3).

4° Le macrophage activé acquiert des propriétés nouvelles qui se traduisent par :

- L'augmentation de l'activité métabolique.
- L'élaboration d'une hydroxylase qui transforme la vitamine D₃ en calcitriol actif, accélère l'activation du macrophage et, augmente la quantité de TNF α produite.
- La production du Tumor Necrosis Factor α (TNF α) qui favorise la nécrose tissulaire et est à l'origine de la caséification au centre des granulomes.
- La mise en place de différents systèmes antimicrobiens tels que le système oxydatif qui met en œuvre des dérivés toxiques de l'oxygène (H₂O₂, OH⁻, O⁻), l'élaboration de protéines cationiques de type défensines, la sécrétion des ions nitreux, la captation du fer le rendant indisponible pour la multiplication bacillaire.

5° La formation du granulome empêche la dissémination des bacilles et réalise des conditions qui inhibent leur multiplication

Avant que l'activation des macrophages soit devenue effective, les bacilles peuvent se multiplier librement dans la cellule. Cette multiplication favorise l'apparition de structures de surface ou de produits métaboliques d'origine microbienne qui, se combinant aux molécules d'histocompatibilité, permettent leur reconnaissance par les cellules cytolytiques NK et CD₈ et provoquent la lyse des macrophages qui libèrent leur contenu.

Il se constitue un début de nécrose dont l'existence entraîne un afflux de phagocytes qui tendent à circonscrire le foyer infectieux en entourant la zone de multiplication des bacilles. Ces cellules s'organisent en palissade. Leur forme rappelant les cellules épithéliales, elles sont appelées cellules épithéloïdes. Certaines d'entre elles fusionnent et donnent les cellules multinucléées de Langhans. Des lymphocytes se fixent à cet ensemble, élaborent l'interféron γ et autres lymphokines qui permettent l'activation du macrophage.

Au centre du granulome se tient une suppuration d'un type particulier appelée nécrose caséuse qui se forme sous l'influence de plusieurs facteurs: lyse cellulaire, ischémie par thrombose des petits vaisseaux, libération par les bacilles de substances toxiques comme le dimycolate de tréhalose, rôle éventuel des anticorps qui, bien que n'intervenant pas dans la protection, peuvent à ce stade, en association avec le complément, jouer un rôle dans la réaction inflammatoire. Certaines cytokines comme le TNF α jouent également un rôle important dans la formation du caséum. Le caséum est dense, il contient des acides gras, son pH est acide, l'oxygène n'y pénètre pas. Dans cet état, le caséum solide possède un pouvoir inhibiteur sur les bacilles de la tuberculose qui, placés dans cet environnement défavorable meurent en grand nombre.

Chez certains sujets, la bactéricidie est complète, ils sont guéris. Chez d'autres, quelques bacilles survivent en mettant en œuvre des voies métaboliques particulières qui leur permettent

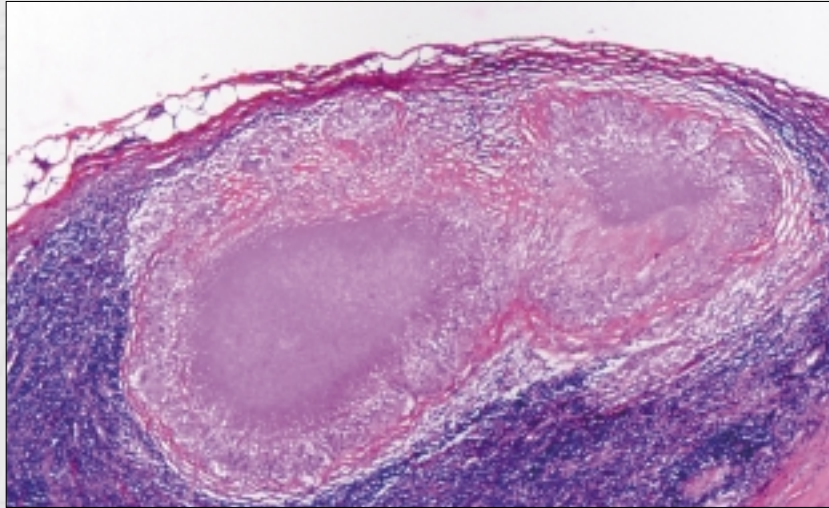
de persister dans un état métabolique hypo-actif. Cette hypothèse permet d'expliquer les tuberculoses tardives du vieillard ou celles qui surviennent chez l'immunodéprimé par réactivation de ces bacilles quiescents endogènes quand les potentialités immunitaires de défense diminuent (fig. 1 2).

Pour la plupart des sujets, l'évolution de l'infection sera favorable. Le granulome qui s'est formé empêche la diffusion des bacilles qui sont maintenus dans une zone de nécrose caséuse qui leur est tout à fait défavorable. La diffusion du processus infectieux est stoppée au stade de primo-infection.

Chez ceux qui entreront dans la maladie tuberculeuse, l'évolution se fait vers une nécrose importante. Tout semble se passer comme si les macrophages tardaient à être activés. Ils sont alors incapables d'empêcher la multiplication des bacilles, ils sont lysés massivement par les cellules NK et CD₈. La masse bacillaire devient importante et apporte de grandes quantités de substances antigéniques. La réaction d'hypersensibilité de type retardé se manifeste à plein et favorise le développement d'une nécrose tissulaire importante. Sous l'influence d'enzymes hydrolytiques (protéases, nucléases, lipases) provenant des macrophages qui se lysent, le caséum solide se liquéfie. Cette liquéfaction du matériel nécrotique caséux est un événement très important pour le patient car il détermine l'évolution vers la tuberculose maladie. En effet, à la différence du caséum solide, le caséum liquide est bien oxygéné et permet, par sa composition, une bonne multiplication des bacilles dont le nombre dans une caverne tuberculeuse de taille moyenne peut atteindre 10⁹ bacilles. Cette importante population bacillaire a plusieurs conséquences :

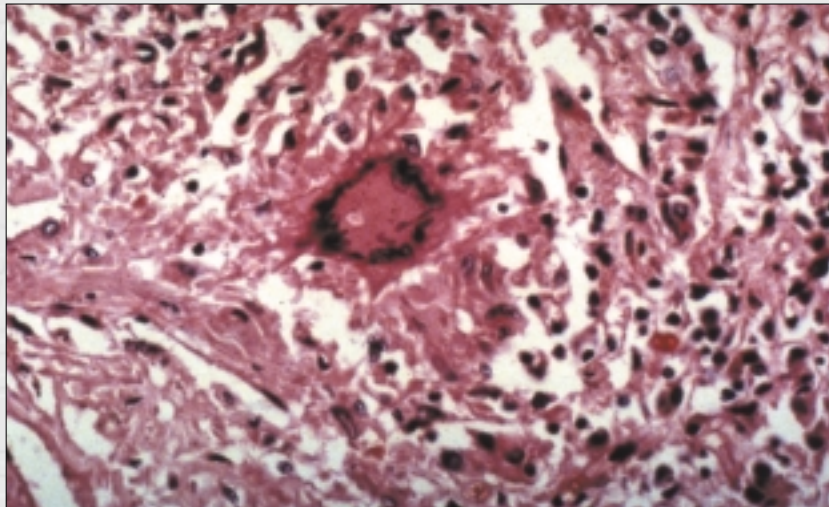
La nécrose s'étend de proche en proche, elle intéresse les bronches et les vaisseaux, les bacilles peuvent alors diffuser dans d'autres territoires. Lors de l'ouverture dans une bronche la lésion nécrotique se vide dans l'arbre bronchique. Il se forme alors une cavité : la caverne tuberculeuse. L'écoulement du caséum par voie bronchique permet, lorsque le malade tousse, d'éliminer des bacilles dans un aérosol de droplet nuclei et de favoriser la diffusion de l'infection. Les malades "cracheurs" constituent un risque important de diffusion de la maladie. Enfin, le caséum étant ramolli, la population bacillaire est importante, elle contient donc des mutants résistants. Si la thérapeutique n'est pas optimale, ils sont sélectionnés et sont à l'origine des souches résistantes.

Chez les malades du SIDA le déficit en cellules lymphocytaires T ne permet ni la formation du granulome ni l'activation du macrophage, les bacilles transportés par les macrophages essaient dans tout l'organisme la tuberculose se généralise.



Tubercule ganglionnaire avec large zone de caséification.

(photo aimablement donnée par M.C. Rousselet)

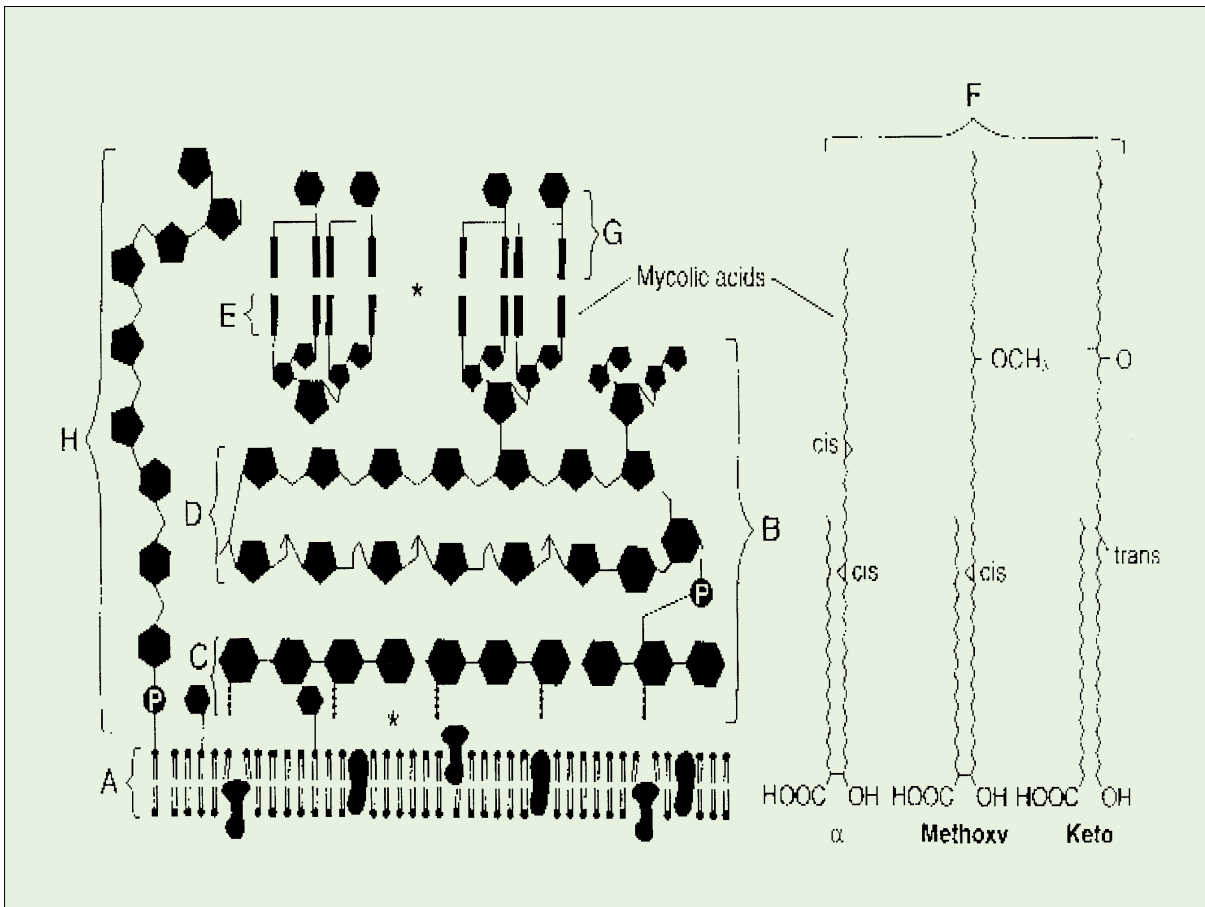


Cellules de Langhans cernant une zone de nécrose caséuse. Les cellules de Langhans sont des cellules géantes provenant de la fusion des macrophages.

(photo aimablement donnée par M.C. Rousselet)

D - Quelques questions

I - La paroi des mycobactéries (85)



Recouvre la membrane cytoplasmique (A).

Comme chez de très nombreuses espèces bactériennes, le squelette de base de la paroi est le peptidoglycane. Constitué par un enchaînement répétitif de deux molécules, la N-acetyl-glucosamine et l'acide N-glycolyl-muramique liés en β_{1-4} (C).

Sur celui-ci est attaché de façon covalente l'arabinogalactane (D) qui est un hétéropolyside complexe rencontré, non seulement dans le genre *Mycobacterium* mais aussi dans les genres *Nocardia* et *Corynebacterium*. Sur cette molécule sont fixés les acides mycoliques (E). Ce sont des acides gras de C₇₆ à C₉₀ atomes de carbone. La longueur de la chaîne α ramifiée de ces acides permet l'identification des espèces en chromatographie en phase gazeuse dans les conditions de pyrolyse. (ex : 26 atomes de carbone pour le bacille tuberculeux). Leur forte hydrophobicité rend les mycobactéries peu perméables aux solutés. Sans qu'il existe de preuves certaines, les acides mycoliques seraient responsables de l'acido-alcoolo-résistance des mycobactéries. D'autres molécules riches en lipides sont associées aux acides mycoliques et forment une seconde couche lipidique (G). Il s'agit de sulfatides, de cires (acides mycocérosiques, pthiocerols), de phospholipides (phosphatidyl-inositol dimannoside, acide tuberculostéarique) de dimycolate, de tréhalose encore appelé "Cord factor".

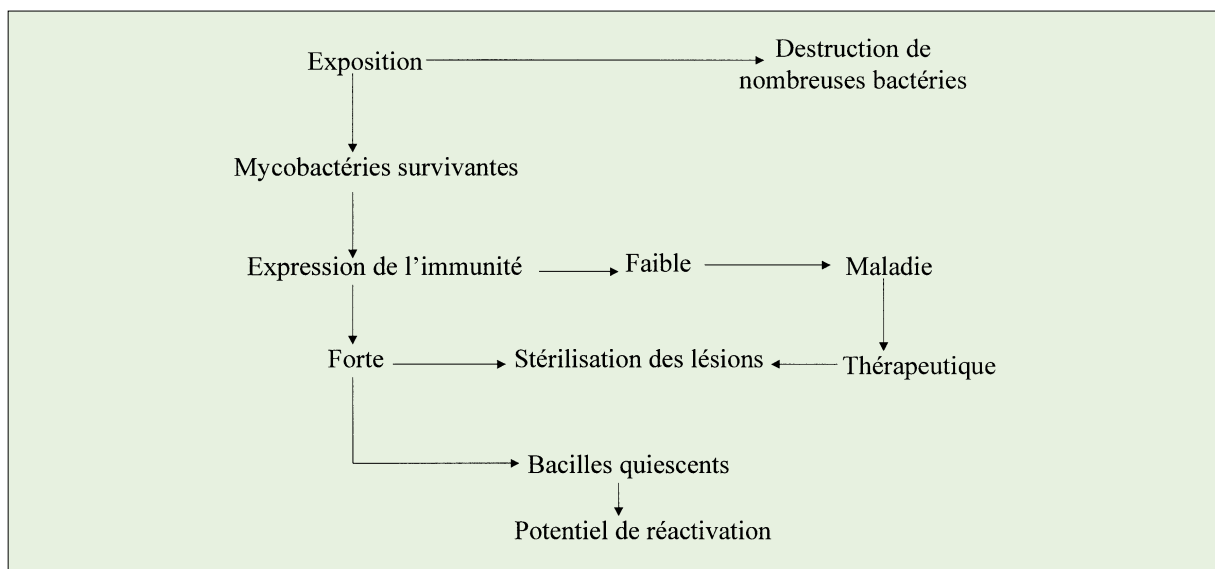
A cette structure complexe, il faut rajouter des polysaccharides dont le lipomannane et surtout le lipoarabinomannane (H) qui est considéré comme un facteur de virulence de *M. tuberculosis* qui inhiberait, au niveau des macrophages, la présentation des antigènes aux lymphocytes T et diminuerait la production du tumor necrosis factor (TNF).

Au sein de cet ensemble complexe se trouvent des protéines et des peptides qui ont des activités antigéniques ou physiologiques diverses (tuberculines mycobactines).

II - Bacilles quiescents

Un tiers des habitants de la planète a été infecté par *M. tuberculosis*. Dans la majorité des cas, rien ne traduit cette infection, soit parce que les bacilles ont été détruits par les mécanismes de protection naturelle, soit pour ceux qui survivent parce qu'ils sont fortement inhibés par l'immunité acquise de l'hôte. Les sujets qui hébergent dans les cicatrices de leurs lésions de primo-infection des bacilles quiescents vivants courent un risque, celui de développer une infection tardive dite réinfection endogène quand, pour diverses raisons (âge, maladie, traitements immunosuppresseurs divers), leurs défenses immunitaires perdent de leur intensité. Les infections post-primaires sont, pour bon nombre d'entre elles, des réinfections d'origine endogène et liées au réveil de ces bacilles quiescents. Sous quelle forme se maintiennent-ils dans l'organisme ? C'est un sujet mal connu. Il semble que la diminution de la concentration en oxygène dans les lésions caséeuses induise l'apparition de modifications métaboliques importantes qui provoqueraient un ralentissement du métabolisme. Mais une activité faible persisterait et serait à l'origine de l'élaboration de petites quantités d'antigènes, par exemple l'antigène A85 qui est une enzyme impliquée dans l'élaboration de la paroi mycobactérienne. Cette production d'antigènes maintiendrait une stimulation du système immunitaire qui empêcherait les manifestations pathogènes (129).

Figure I 5 : Différentes évolutions possibles suite à une contamination.



III - Le phénomène de Koch. Les tuberculines, l'intradermo-réaction

L'inoculation de bacilles tuberculeux en injection sous cutanée au cobaye est suivie, après 1 mois, par l'apparition d'une ulcération au point d'inoculation. Elle s'accompagne d'une volumineuse adénopathie où pullulent les bacilles. Par la suite, l'infection gagne les ganglions lombo-aortiques, la rate, le foie, les poumons et aboutit, 3 mois après l'inoculation, à la mort de l'animal par tuberculose généralisée.

Si on réinjecte des bacilles vivants un mois après l'inoculation initiale en un point éloigné de la première injection, les réactions à ce deuxième point d'injection sont différentes. Dans les 48 heures qui suivent, une nécrose cutanée survient au point de réinjection, elle est suivie de l'élimination d'une escarre qui laisse une ulcération dans laquelle on ne retrouve pas de bacilles. La cicatrisation survient en quelques jours. Cette réaction décrite par R. Koch est dénommée "phénomène de Koch". Elle survient après injection de bacilles vivants, de bacilles tués ou de tuberculine. La tuberculine mise au point par R. Koch, appelée "vieille tuberculine" est un produit brun, sirupeux provenant de la concentration par évaporation d'un milieu de culture liquide contenant des bacilles de la tuberculose. Ce produit utilisé par Koch à des fins thérapeutiques a eu des fortunes diverses. Dans les tuberculoses superficielles et à charge bacillaire faible, l'injection de tuberculine a pu avoir un effet positif : une escarre se forme et les bacilles sont éliminés. Par contre, dans les tuberculoses pulmonaires à charge bacillaire souvent importante, l'injection de tuberculine s'accompagne d'une aggravation brutale de la maladie par augmentation du processus nécrotique et peut avoir une issue fatale brutale par "choc tuberculinique".

Abandonnée comme moyen thérapeutique, la tuberculine est reprise en 1907 par Mantoux et Von Pirquet pour des études épidémiologiques. Les impuretés de la tuberculine brute conduisent Siebert à purifier le principe actif, en 1934, il obtient les premières PPD (Purified Protein Derivative). La réactivité à la tuberculine (cuti+ ou intradermo+) est l'apanage des sujets contaminés qui, à un moment donné de leur existence, ont été en contact avec le bacille. La conversion d'une réponse cutanée négative à la tuberculine en une réponse positive apparaît à partir de la 4^{ème} semaine après la contamination, en même temps qu'apparaît l'immunité à médiation cellulaire (150).

Chez le sujet contaminé, l'injection intradermique de tuberculine est suivie d'une réaction cutanée qui apparaît dans les 24 heures et atteint son intensité maximum en 48 heures. La réaction qui est observée est une réaction d'hypersensibilité de type retardé. Cliniquement, elle se manifeste par une macule d'un à deux centimètres de diamètre sensible, rouge pourpre, indurée, à bords bien limités. Elle est provoquée par un afflux de macrophages et de lymphocytes sensibilisés qui infiltrent le tissu sous-épidermique et le derme au point d'inoculation de l'antigène tuberculinique.

Sur le plan épidémiologique, la pratique de l'intradermo-réaction permet de déterminer le nombre des sujets positifs, c'est-à-dire des sujets contaminés. Sur le plan clinique, elle permet de dépister le moment de la contamination, de surveiller, chez le sujet, l'évolution de sa primo-infection et éventuellement d'instaurer un traitement.

IV - Génétique

Selon les individus, la croissance exponentielle des mycobactéries dans les macrophages est plus ou moins contrôlée. Ces différences individuelles ont un support génétique qui commence à être déchiffré. Bien avant la découverte de Koch, les anglo-saxons parlaient d'un facteur familial héréditaire intervenant dans l'étiologie de la tuberculose. Puis furent démontrées des différences raciales, la sensibilité à la tuberculose des sujets de race noire est plus grande que celle des blancs. L'efficacité protectrice du BCG varie selon les populations. Certains sujets montrent une absence de sensibilisation à la tuberculine malgré plusieurs vaccinations par le BCG. Chez certains personnels soignants n'ayant pas subi préalablement de vaccination qui sont en contact permanent avec des tuberculeux, les tests tuberculiniques restent négatifs et ils ne font pas de maladie. Les macrophages de ces sujets ont-ils une capacité particulièrement élevée à dégrader les mycobactéries ?

La première preuve de l'intervention de la constitution génétique dans la sensibilité ou la résistance à la tuberculose fut apportée par les études de Lurie et Dannenberg dans la tuberculose expérimentale réalisées chez différentes lignées de lapins consanguins (109). Selon la lignée à laquelle ils appartiennent, les animaux sont, soit très sensibles à l'infection respiratoire, soit beaucoup plus résistants. Chez les premiers, la tuberculose évolue rapidement alors que chez les seconds, quand ils sont infectés, elle évoluera beaucoup plus lentement. Des études semblables menées chez la souris permettent d'évoquer l'existence d'un gène appelé *Bcg*, il présente deux allèles qui phénotypiquement s'expriment sous la forme *Bcg S* et *Bcg R*. Ce gène ne contrôle que la phase très précoce de l'infection, c'est-à-dire la croissance dans le tissu réticulo-endothélial. Les macrophages de phénotype *Bcg R* expriment une plus grande activité bactéricide, ils élaborent à des niveaux plus élevés les antigènes $I A\beta$ et la, ils répondent mieux et plus rapidement à l'INF γ . Cet effet pléiotropique produit par la protéine Nramp (Natural Resistance Associated Macrophage Protein Gene) est issue du gène *Bcg*. Cette protéine de PM 53000 pourrait être un transporteur membranaire. La différence entre les *Bcg S* et *Bcg R* tiendrait au remplacement en position 105 d'une glycine par un acide aspartique, le changement de charge électrique qui en résulte serait à l'origine d'une plus faible activité du transporteur. Quelle est la substance transportée ? Il existe des analogies étroites entre la structure de Nramp et celle de la perméase Crna d'*Aspergillus nidulans* qui est une perméase à nitrate. Cette similitude pourrait étayer l'hypothèse que Nramp fonctionnerait comme un concentrateur nitrate nitrite, matériau de base pour l'élaboration des composés du RNI (Reactive Nitrogen Intermediates) substances toxiques pour le bacille. Des études sont en cours pour mettre en évidence un mécanisme similaire chez l'homme (156).

L'étude chez l'homme d'un certain nombre d'anomalies d'origine génétique a permis d'identifier un nombre de mutations dont les porteurs accusent une sensibilité anormale aux infections mycobactériennes.

Ont été décrits (28) :

1° Les anomalies portant sur le récepteur de l'interféron γ

Que la mutation touche la chaîne R_1 ou la chaîne R_2 du récepteur, le résultat est le même, l'INF γ ne peut se fixer. Le sujet est incapable de mettre en œuvre l'activation de ses macrophages. Les

infections à mycobactéries se traduisent par des formes généralisées dites de type "lépromatoïde". L'administration d'INF γ est sans effet, le traitement curatif repose sur la transplantation médullaire.

Si la mutation n'entraîne qu'une inactivation partielle, les antibiotiques et un traitement substitutif à base d'INF γ qui permet d'induire une réponse cellulaire ont un effet favorable.

2° Les déficits portant sur le récepteur de l'IL12

Ils entraînent une incapacité des lymphocytes à fixer cette cytokine sécrétée par les cellules présentatrices d'antigène. Les lymphocytes sont incapables d'élaborer l'INF γ en quantité suffisante. Le traitement substitutif par l'INF γ corrige cette anomalie.

V - Thérapeutique antibiotique

a) Dans la caverne tuberculeuse, les bacilles se trouvent dans trois situations différentes : les bacilles très nombreux, en phase de multiplication active qui sont dans le caséum liquide, les bacilles phagocytés par les macrophages et qui sont en position intracellulaire, enfin les bacilles qui sont présents en état de vie ralentie au sein du caséum solide (68).

b) Quatre antibiotiques sont couramment utilisés dans le traitement de la tuberculose. L'isoniazide (INH ou rimifon[®]) est bactéricide et agit bien au niveau des bacilles en phase de multiplication active. La rifampicine (Rifadine[®] - Rimactan[®]) agit également sur ces bacilles. Elle a en plus une activité bactéricide sur les bacilles quiescents présents dans le caséum solide. Le pyrazinamide (Pirilène[®]) se montre particulièrement actif sur les bacilles intracellulaires, en milieu acide, sur lesquels il manifeste une activité bactéricide. L'éthambutol (Myambutol[®]) a une activité bactériostatique et son action synergique vient appuyer celle des autres antibiotiques. La streptomycine est le médicament le plus actif sur la population métaboliquement très active, présente dans le caséum liquide.

c) Dès 1947, quelques mois après l'utilisation de la streptomycine pour le traitement des tuberculeux Pyle (141) mettait en évidence qu'un nombre important de malades traités hébergeaient des bacilles résistants qui avaient remplacé les bacilles initialement sensibles. L'explication est simple : les mutants résistants sont présents dans toute population de bacilles dès l'instant qu'elle est suffisamment importante. Il s'agit de mutants chromosomiques. Le taux de mutation pour la streptomycine est de $1/10^6$ bacilles, il est le même pour l'INH. Il est de $1/10^7$ bacilles pour la rifampicine. Pour des raisons techniques, on ne le connaît pas pour le pyrazinamide. Ce qui revient à dire que dans une caverne tuberculeuse qui contient 10^9 bacilles, on trouvera 1.000 mutants résistants à l'INH et 100 résistants à la rifampicine. Quelles que soient les qualités d'un antibiotique, si on l'utilise seul, en monothérapie, on a la certitude de sélectionner les bacilles résistants qui pourront se multiplier jusqu'à créer en quelques mois une population résistante qui remplacera la population initialement sensible. C'est la raison pour laquelle il est indispensable d'associer les antibiotiques car les mutations étant indépendantes, la probabilité d'isoler au sein d'une population sensible un bacille résistant simultanément à deux antibiotiques est égale au produit des probabilités simples. Il faudrait avoir une population de l'ordre de $10^6 \times 10^7 = 10^{13}$ bacilles pour avoir, dans une population sauvage, un bacille simultanément résistant à l'INH et à la rifampicine.

Les traitements actuels de la tuberculose font appel au moins dans les premiers mois à la prescription simultanée de quatre antibiotiques. Plusieurs raisons expliquent cette pratique : les antibiotiques se comportent différemment selon l'environnement ou se trouve le bacille. Associer deux antibiotiques devrait théoriquement suffire. Mais il n'est pas rare de constater l'existence de résistances primaires aux différents antibiotiques. Celles-ci surviennent, en France, avec une fréquence de l'ordre de 3 % pour l'isoniazide, 4 % vis à vis de la streptomycine et 1 % vis à vis de la rifampicine (88). Associer quatre antibiotiques au moins dans la première phase du traitement diminue les risques de se trouver dans la situation d'une monothérapie effective. Actuellement, en France, le traitement standard de tous les nouveaux cas de tuberculose fait appel à une trithérapie ou quadrithérapie pendant 2 mois suivi d'une bi-thérapie associant isoniazide et rifampicine pendant 4 mois.

VI - Quelques apports découlant du séquençage du génome de *M. tuberculosis* (37-38)

En 1998, la séquence complète du génome de *M. tuberculosis* H₃₇RV a été réalisée et a permis de confirmer certains caractères propres aux mycobactéries. Le génome 4,5 10⁹ daltons a une teneur en guanine et cytosine élevée : 66 %. Cette richesse en G+C s'explique par la fréquence élevée des codons dont le dernier nucléotide est une guanine ou une cytosine, par l'utilisation du codon GTC pour initier 35 % des gènes et par la fréquence élevée des protéines de *M. tuberculosis* en certains aminoacides (Ala Gly Pro Arg Trp) codés par des codons riches en G et C.

Comme toutes les mycobactéries à croissance lente *M. tuberculosis* possède une seule copie de l'opéron ribosomal et cet opéron est assez éloigné de l'origine de réplication alors que chez les bactéries à croissance rapide il y a plusieurs copies de cet opéron dont certaines sont proches de l'origine de réplication.

Environ 4000 cadres de lecture ouverts (ORF) ont été identifiés dans le génome de *M. tuberculosis* dont 91 % d'entre eux coderaient pour des protéines. 84 % des protéines de *M. tuberculosis* sont comparables à celles des autres espèces bactériennes. Seules 16 % apparaissent spécifiques de *M. tuberculosis*. Environ la moitié des gènes de *M. tuberculosis* sont dupliqués (51 %) comme chez *Escherichia coli* mais avec une meilleure conservation des séquences que chez *E.coli*.

Plus de 250 gènes sont impliqués dans le métabolisme des acides gras. Bon nombre d'entre eux contribuent à l'élaboration de la paroi riche en lipides (waxy coat) dans laquelle on rencontre un grand nombre de lipides particuliers : glycolipides, acides mycoliques, polykétides... dont bon nombre restent à découvrir.

La richesse en cytochromes P450 qui catalysent l'oxydation des composés hydrophobes tels que les acides gras à longue chaîne, qui sont impliqués dans la transformation des stérols et dans le métabolisme des molécules xénobiotiques, laisse penser que comme cette forme de métabolisme est caractéristique des saprophytes, *M. tuberculosis* pourrait dériver d'un ancêtre mycobactérien présent dans le sol.

Les différentes souches de *M. tuberculosis* présentent un manque remarquable de diversité génétique, ce qui est exceptionnel chez les bactéries et fait évoquer l'hypothèse de la propagation récente de la tuberculose ou que *M. tuberculosis* constitue une impasse de l'évolution.

Le génome de *M. tuberculosis* est également riche en séquences répétées d'ADN, en particulier la séquence IS 6110 dont on peut trouver jusqu'à 16 copies. Ces séquences d'insertion sont constituées de deux courtes séquences répétées de 30 paires de bases et encadrent le gène qui code pour la transposase. La position et le nombre de ces séquences sur le génome sont stables pour une souche mais variables d'une souche à l'autre. Cette particularité a été mise à profit pour développer l'analyse par RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) du génome des souches de bacilles tuberculeux. Cette méthode de typage moléculaire qui repose sur la dissémination de la taille des fragments d'ADN génomiques porteurs de la séquence d'insertion IS 6110 est actuellement la méthode de référence pour les études d'épidémiologie moléculaire de la tuberculose.

D'autres séquences répétées ont été identifiées. Le génome de *M. tuberculosis* contient 65 copies de MIRU (Mycobacterial interspaced repetitive unit) dont la taille varie de 46 à 101 paires de bases (107).

Frothingham (59) a décrit des séquences répétées VNTR (Variable Number Tandem Repeat) réparties en 11 loci et qui forment deux familles : les tandems de répétition exacte (ETP) comprenant 6 loci dont la taille de l'unité varie de 53 à 79 pb et les séquences polymorphiques majeures de répétition (MPTR) comprenant 5 loci. Ces séquences peuvent être amplifiées et la comparaison des produits d'amplification permet des études d'épidémiologie moléculaire.

Particulièrement intéressant pour ces études moléculaires est le locus de répétition directe DR qui est constitué d'une succession de séquences répétées de 36 paires de bases séparées par des séquences non répétées de 35 à 41 pb appelées séquences inter DR ou espaceur dont la composition varie selon les souches. On connaît pour les mycobactéries du complexe *tuberculosis* 51 espaceurs. Leur identification est à la base de la technique appelée spoligotypage (92).

Deux familles de gènes codant les protéines PE (Pro Glu) et PPE (Pro Pro Glu) occupent environ 10 % du génome de *M. tuberculosis*. Ces protéines sont associées respectivement aux séquences polymorphiques répétitives de type PGRS (Polymorphic G.C. Rich Repetive Sequences) et MPTR (Major Polymorphic Tandem Repeats) qui sont également présentes chez d'autres espèces de mycobactéries et qui se caractérisent par des motifs riches en glycine et en asparagine. Le rôle de ces protéines n'est pas clairement établi mais elles pourraient être impliquées dans des phénomènes de variations antigéniques de *M. tuberculosis* et de réplication du bacille tuberculeux dans les macrophages.

On n'a pas retrouvé dans les séquences du génome de *M. tuberculosis* des îlots de pathogénicité comparables à ceux observés chez les entérobactéries. Quelques gènes susceptibles d'être impliqués dans la pathogénicité ont été reconnus : un opéron codant pour d'éventuelles invasines, des gènes impliqués dans les phénomènes de captation du fer, des phospholipases C, lipases, estérases, cutinases, protéases, qui pourraient agir sur les composants cellulaires ou vésiculaires.

Mise en évidence des mycobactéries

La tuberculose est essentiellement une maladie des poumons. Il n'est donc pas étonnant que plus des trois quarts des prélèvements qui parviennent au laboratoire soient d'origine pulmonaire.

Il y a plusieurs moyens de mettre en évidence les mycobactéries présentes dans un prélèvement. Le plus facile à réaliser, car demandant peu de moyens techniques, est l'examen microscopique qui, dans les pays en développement, est souvent le seul à pouvoir être pratiqué directement à partir du produit pathologique, mais il est peu sensible et non spécifique ; aussi dans les régions développées il est complété par une mise en culture systématique.

L'obtention d'une culture microbienne permet d'identifier l'espèce, de réaliser l'étude de sa sensibilité aux antibiotiques et, le cas échéant, de mettre en œuvre des études épidémiologiques.

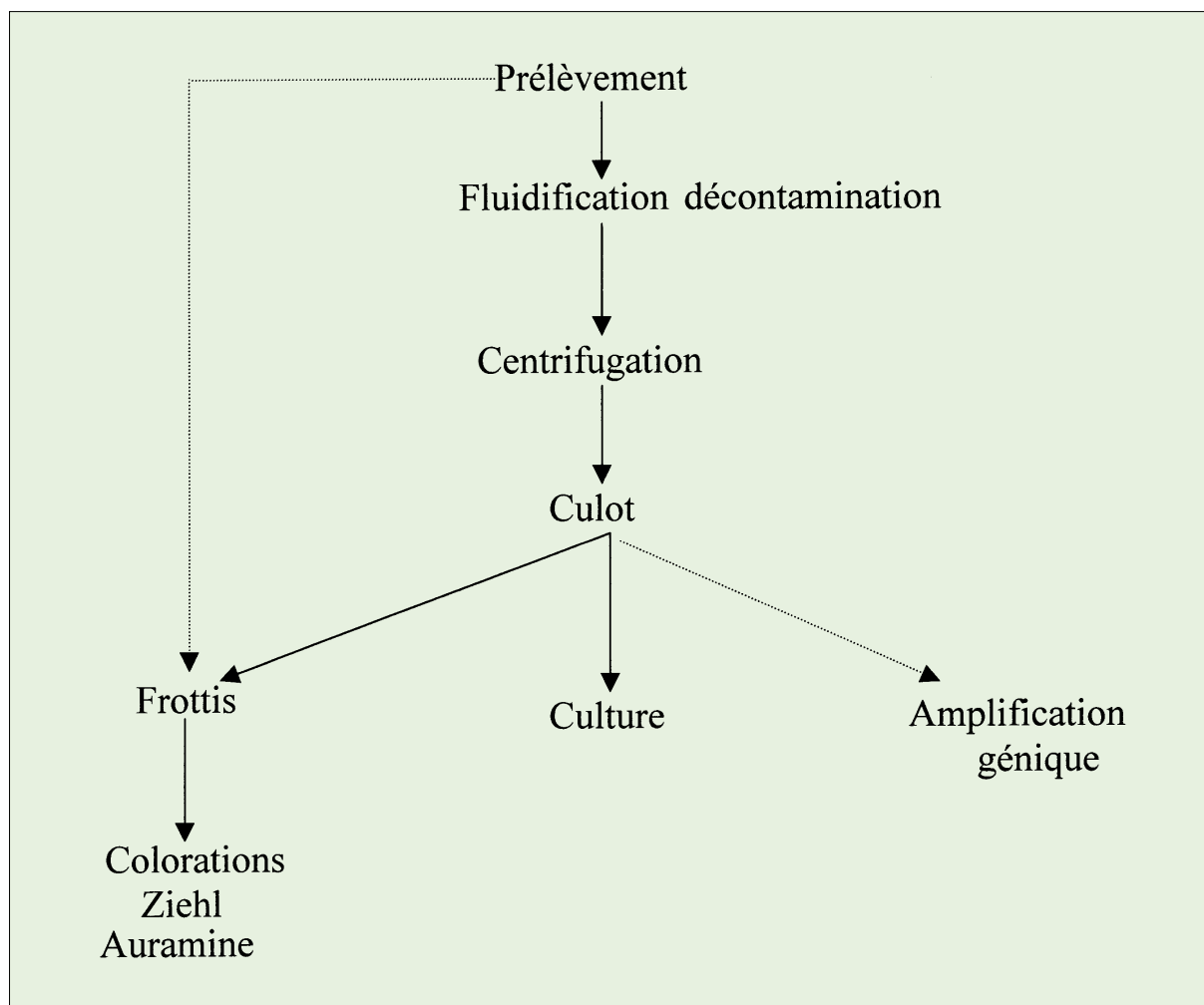
Quelle que soit la méthode de culture retenue, la nécessité d'utiliser des milieux enrichis et la croissance lente des mycobactéries, font qu'il est indispensable, avant d'ensemencer les prélèvements provenant de cavités ouvertes, de les décontaminer pour les débarrasser des micro-organismes commensaux dont la croissance plus rapide empêcherait celle des mycobactéries.

Après avoir subi un traitement fluidifiant et décontaminant, le culot de centrifugation servira à confectionner un frottis qui après coloration permettra l'examen microscopique. Il sera ensemencé sur les milieux de culture convenables ; enfin il pourra, si les indications sont correctement posées, faire l'objet d'une amplification génique (fig II 1).

Le quatrième moyen de diagnostic : l'inoculation au cobaye appartient maintenant à l'histoire. Il n'en sera pas fait mention.



Figure II 1 : Organigramme du traitement d'un prélèvement pour mise en évidence des mycobactéries.



A – Prélèvements

I – Généralités

La probabilité de mettre en évidence des mycobactéries dépend de la qualité et de la répétition des prélèvements ainsi que de la rapidité de leur transport jusqu'au laboratoire de bactériologie (67) (127).

Les prélèvements doivent, idéalement, être effectués avant la mise sous traitement. Ils doivent être recueillis dans des flacons stériles, à usage unique, ne contenant aucun additif, en particulier aucun conservateur. Les flacons sont fermés hermétiquement, pour éviter tout risque de contamination lors du transport, et acheminés le plus rapidement possible au laboratoire. Si l'analyse doit être différée, ils doivent être conservés à + 4°C, pour préserver la viabilité des bacilles tuberculeux et limiter la multiplication des éventuels micro-organismes contaminants.

L'usage de désinfectants comme le chlorure de cétyl pyridinium pour conserver les prélèvements (83) avant leur traitement par le laboratoire n'est pas utilisé dans nos régions mais peut être utile quand l'acheminement vers le laboratoire est très long.

II - Les différents prélèvements

1° Les prélèvements d'origine pulmonaire

a) Les crachats

En cas de suspicion de tuberculose pulmonaire, il est conseillé de recueillir les crachats émis spontanément après un effort de toux, de préférence le matin au réveil, dans des flacons stériles, à large embouchure afin d'éviter la contamination des bords extérieurs. La présence de bacilles dans les sécrétions respiratoires étant discontinue, les prélèvements sont généralement répétés trois jours de suite (131).

La nébulisation de sérum salé stérile peut aider à obtenir des crachats de bonne qualité, c'est à dire d'origine bronchique (et pas salivaire ou nasopharyngée) et en quantité suffisante (au minimum 3 et mieux 5 ml). Il est parfois nécessaire d'avoir recours au tubage gastrique, en particulier chez les enfants et les femmes qui ne savent pas ou ne veulent pas cracher, voire à des examens plus invasifs comme la fibroscopie bronchique ou le lavage broncho-alvéolaire, si les crachats ou les tubages n'ont pas été contributifs ou si l'endoscopie est réalisée en première intention dans un but bien défini.

b) Les tubages gastriques

Le tubage gastrique, qui consiste à prélever les sécrétions bronchiques qui ont été dégluties pendant le sommeil, doit être effectué chez un malade alité depuis la veille, le plus tôt possible après le réveil. Comme pour les crachats, les prélèvements doivent être répétés et la quantité recueillie suffisante (5 à 10 ml). Si le prélèvement ne peut pas être traité rapidement après son recueil, il est souhaitable qu'il soit additionné de carbonate de sodium (100 mg) pour neutraliser l'acidité des sécrétions gastriques qui pourraient nuire à la vitalité des mycobactéries.

Au laboratoire, si son volume est suffisant, plus de deux millilitres, le produit du tubage est centrifugé. Le culot sera traité comme un crachat.

c) Les prélèvements sous fibroscopie

L'aspiration bronchique, le brossage et le lavage broncho-alvéolaire, qui sont obtenus sous contrôle visuel grâce à l'introduction d'un fibroscope, permettent de réaliser des prélèvements au niveau des lésions.

- L'aspiration bronchique ramène des sécrétions bronchiques qui sont diluées dans l'eau stérile et recueillies dans un flacon stérile. Au laboratoire, si leur volume le nécessite, elles sont centrifugées et traitées comme un crachat.
- Le brossage bronchique prélève par brossage au niveau d'une lésion suspecte. La brosse est déposée dans un tube contenant 1 ml d'eau stérile qui est adressé au laboratoire. C'est sur ce liquide qu'est réalisée l'analyse.

Le produit est traité comme un crachat.

- Le liquide de lavage broncho-alvéolaire, si son volume est important, est centrifugé. Le culot est traité comme un crachat.

Ces prélèvements provoquent une irritation bronchique suivie, au cours des jours suivants, par l'émission spontanée de crachats de bonne qualité qu'il est indispensable de recueillir et d'analyser. Le recueil des prélèvements respiratoires est source d'aérosols de bacilles tuberculeux et fait courir des risques de contamination au personnel et aux autres malades. Il doit être assuré par un personnel compétent, portant un masque respiratoire.

2° Les prélèvements extra-pulmonaires

En cas de suspicion de tuberculose extra-pulmonaire ou de mycobactériose, les prélèvements issus de ponctions ou de biopsies, a priori non contaminés par des microorganismes commensaux (liquide pleural, liquide céphalo-rachidien, sang, biopsies), sont recueillis aseptiquement dans des flacons stériles. Les prélèvements contaminés (urines, lésions superficielles...) sont recueillis avec les mêmes précautions que les crachats.

a) Les urines

Les mycobactéries sont recherchées dans les urines après avoir vérifié la présence d'une leucocyturie et l'absence de bactériurie à germes banals. Les urines sont prélevées, 3 jours de suite, le matin au réveil et en quantité suffisante (40 ml minima). Une restriction hydrique prescrite la veille au soir est souhaitable. L'urine est centrifugée. C'est sur le culot que seront réalisées les opérations de fluidification décontamination.

b) Les abcès, lésions cutanées et tissus divers

Les abcès sont prélevés à la seringue après désinfection de la peau. Les mèches et les compresses sont déconseillées pour la recherche des mycobactéries. Pour les lésions cutanées, on peut être amené à utiliser un écouvillon, bien que ce ne soit pas recommandé, ou mieux à pratiquer une biopsie. La biopsie sera faite de préférence à la périphérie des lésions.

Les fragments d'organes profonds sont prélevés par les chirurgiens, leur volume doit être suffisant. Le prélèvement destiné aux analyses bactériologiques est déposé "à sec" dans un flacon stérile et adressé au laboratoire dans les délais les plus courts. Si la nature du prélèvement le permet, un examen macroscopique est réalisé éventuellement après avoir tranché la pièce pour y rechercher des zones de pus ou de caséum sur lesquelles porterait alors l'analyse. Selon le volume de la biopsie, celle-ci sera traitée en totalité ou en partie. A l'aide d'un scalpel stérile, on découpe les tissus prélevés en petits morceaux dans une boîte de pétri, les fragments ainsi obtenus sont prélevés et placés dans un broyeur homogénéiseur de Potter. Ils sont broyés en eau distillée stérile. Deux ou trois millilitres de ce broyat sont recueillis. Un premier ensemencement sera réalisé sans traitement décontaminant et le reste subira le traitement.

c) Les liquides d'épanchement

Pour les liquides d'épanchement : liquide pleural, liquide céphalo-rachidien, liquide d'ascite, liquide articulaire, qui sont souvent paucibacillaires, on recueillera la quantité la plus importante possible. Les liquides sérofibrineux ou hémorragiques peuvent être additionnés d'héparine ou de S.P.S. On évitera l'E.D.T.A. qui inhibe la croissance des mycobactéries. Ces liquides, si leur volume le permet sont centrifugés et subissent un double ensemencement, le premier sans traitement, le second après fluidification décontamination.

d) Le sang et la moelle osseuse

Les mycobactéries peuvent être facilement isolées du sang ou de la moelle osseuse chez les malades profondément immunodéprimés, en particulier chez les malades atteints de SIDA qui font fréquemment des infections généralisées. Il est toutefois nécessaire de les libérer des leucocytes où elles se trouvent. On y parvient en collectant le sang dans un tube spécial, qui contient de la saponine, le tube Isolator™ 10 (Oxoid). La saponine qui lyse rapidement les cellules sanguines, peut aussi, si le contact est trop prolongé, lyser les mycobactéries. Aussi faut-il acheminer le tube au laboratoire et faire la culture dans les 24 heures qui suivent le prélèvement. On peut aussi prélever le sang directement dans un flacon de milieu de culture pour mycobactéries additionné d'un agent lytique approprié. Plusieurs flacons de ce type sont actuellement disponibles dans le commerce (Bactec 13A – MB Blood – MycoF-lytic...). Ils sont adaptés à un appareil de détection. On peut encore, si au lit du malade on ne dispose ni de tube Isolator ni de flacons de culture spéciaux, prélever le sang sur un tube stérile hépariné et l'adresser à un laboratoire spécialisé.

e) Les selles

Compte tenu de la richesse de la flore commensale, la recherche des mycobactéries dans les selles est difficile et déconseillée. Elle est parfois réalisée chez des malades, séropositifs pour le VIH pour détecter un éventuel portage de MAC et, en cas de positivité, prescrire un éventuel traitement préventif. La biopsie colique est préférable.

B – Préparation de l'échantillon – Décontamination - Fluidification

I - Principe et but

Pour décontaminer les prélèvements on met à profit la propriété des mycobactéries d'être plus résistantes à certains antiseptiques que les autres bactéries. L'addition aux prélèvements de soude, ou d'acides dilués élimine les bactéries de la flore commensale et respecte au moins partiellement les mycobactéries. Pour que la décontamination soit de bonne qualité il faut que les prélèvements, notamment les crachats, soient homogénéisés, c'est-à-dire liquéfiés par un agent fluidifiant (détergent, mucolytique) qui libère les bactéries contenues dans le mucus, le pus et dans les cellules. Les bactéries commensales sont ainsi mises en contact avec l'agent décontaminant et sont détruites. Les mycobactéries plus résistantes survivent, le rendement de la culture est ainsi augmenté de façon notable (67, 127). Toutefois, bien que plus résistantes aux antiseptiques que les autres bactéries, les mycobactéries n'y sont pas complètement insensibles et la décontamination doit être effectuée en respectant scrupuleusement la concentration de l'antiseptique et le temps de son contact avec le prélèvement.

II - Contrôle d'une bonne décontamination

L'analyse du pourcentage des échantillons mis en culture et perdus par souillure fournit un contrôle de qualité interne de la méthode d'homogénéisation - décontamination employée. Le pourcentage doit être compris entre 2 à 5 % : inférieur à 2 % il signe une trop forte

décontamination et la destruction trop importante de mycobactéries ; supérieur à 5 % il signe une trop faible décontamination entraînant une survie trop importante de bactéries commensales qui provoquent la dégradation rapide des milieux de culture et l'inhibition du développement des mycobactéries.

III - Circonstances dans lesquelles on peut éviter la décontamination

Les prélèvements provenant de cavités fermées habituellement stériles et souvent paucibacillaires, tels que les liquides d'épanchement, la moelle osseuse et le sang, doivent être recueillis dans des conditions d'asepsie très rigoureuses et ensemencés directement sans décontamination. Dans les cas exceptionnels où l'on peut craindre la présence de contaminants il est conseillé de conserver l'échantillon à +4°C et de différer sa mise en culture jusqu'à ce qu'on dispose du résultat de la culture pour recherche des germes banals.

IV - Les différentes méthodes de décontamination*

De nombreuses méthodes de décontamination ont été décrites qui procèdent toutes du même principe. L'action de l'agent fluidifiant et décontaminant est suivie d'une phase de neutralisation puis d'une centrifugation. Le choix de la méthode à utiliser au laboratoire tient compte du nombre et de la nature des échantillons à traiter, des milieux de culture employés, de l'application ou non de méthodes d'amplification génique et encore du transport éventuel des échantillons vers un autre laboratoire pour une mise en culture différée.

1° Les méthodes utilisant la soude

La soude est l'agent décontaminant le plus utilisé, seul ou associé à un agent homogénéisant. Si l'agent homogénéisant est un ammonium quaternaire ou un détergent, seuls les milieux à l'œuf pourront être utilisés. En effet, la lécithine de l'œuf neutralise les résidus tensio-actifs qui ont une action néfaste importante à la culture des mycobactéries.

a) Méthode au lauryl sulfate de sodium ou méthode de Tacquet-Tison (168)

Le lauryl sulfate de sodium utilisé dans la méthode de Tacquet et Tison produit une excellente homogénéisation des crachats ainsi, avec une concentration finale de soude de 1% seulement, la décontamination est de bonne qualité. De plus le culot de centrifugation obtenu est de faible volume et facile à ensemencer en totalité. Il s'en suit que le rendement des cultures en mycobactéries est bon et que la méthode de Tacquet et Tison a longtemps été la plus employée en France. La méthode a perdu de son intérêt ces dernières années. En effet, le lauryl sulfate est un inhibiteur de l'amplification génique. De plus, il est bactériostatique pour les mycobactéries et ne peut pas être neutralisé dans les milieux liquides comme il l'est dans les milieux à l'œuf.

b) Méthode à la N-acétyl- cystéine sodique ou méthode de Kubica (98)

La méthode à la N-acétyl-cystéine sodique est la méthode la plus utilisée aux USA. Elle a supplanté ces dernières années en France la méthode au lauryl sulfate de sodium car elle est

** le détail des techniques courantes figure en annexe. On peut également le trouver sur le site internet : www.uvp5.univ-Paris5.fr*

compatible avec tous les milieux de culture, en particulier avec les milieux de culture liquides, et avec les techniques de biologie moléculaire. Comme dans la méthode de Tacquet et Tison la concentration finale de soude est de 1% mais l'homogénéisation produite par la N-acétyl cystéine étant moins bonne que celle produite par le lauryl sulfate, le résultat final de la culture est, sur les milieux à l'œuf, moins satisfaisant.

c) Méthode à la soude à 4 % ou méthode de Petroff (133)

La méthode de Petroff est la plus simple à mettre en œuvre. La soude agit à la fois en tant qu'agent homogénéisant et agent décontaminant. La neutralisation est effectuée par l'acide sulfurique en présence de teinture de tournesol. La concentration finale de la soude étant de 2 %, la méthode est plus "agressive" que les deux méthodes précédemment citées et se traduit par une moindre sensibilité. Sauf indications spéciales, elle ne doit pas être recommandée.

2° Autres méthodes

D'autres méthodes de décontamination sont disponibles. Elles sont habituellement réservées au traitement de prélèvements très contaminés dans des circonstances particulières. La plupart ne sont pas compatibles avec les milieux de culture liquides ni avec les techniques d'amplification génique.

a) Méthode à l'acide sulfurique à 4 % (80)

La méthode à l'acide sulfurique peut être utilisée pour la décontamination des urines, des biopsies (cutanée, colique, pulmonaire...) et des pièces anatomiques ou encore des prélèvements très contaminés.

b) Méthode au chlorure de benzalkonium (Zéphiran) (97)

Dans la méthode au Zéphiran, le phosphate trisodique est l'agent mucolytique et le Zéphiran, un ammonium quaternaire, l'agent décontaminant. L'intérêt de la méthode est que le contact de la solution décontaminante avec le prélèvement pourrait être prolongé jusqu'à 1 h sans nuire à la culture des mycobactéries. La méthode n'est pas compatible avec les techniques d'amplification génique ni avec les milieux de culture liquides.

c) Méthode à l'acide oxalique (44)

La méthode à l'acide oxalique est recommandée dans les cas de forte contamination, en particulier lorsqu'il y a présence de *Pseudomonas aeruginosa* ou d'autres bactéries apparentées. Elle est compatible avec les milieux de culture liquides et peut être utilisée conjointement avec la méthode à la N-acétyl-cystéine soude.

d) Méthode au chlorure de cétyl pyridinium (CPC) et chlorure de sodium (163)

Le CPC est un ammonium quaternaire qui est bactériostatique et non bactéricide vis-à-vis des mycobactéries qui restent vivantes à son contact pendant 8 jours alors que les autres bactéries sont détruites. La méthode est donc celle qui est recommandée quand les prélèvements doivent être adressés à un laboratoire éloigné. L'ensemencement sera réalisé sans neutralisation préalable après simple centrifugation sur milieux à l'œuf.

C - Examen microscopique

L'examen microscopique d'un produit pathologique est la première étape du diagnostic bactériologique de la tuberculose et parfois la seule dans les pays en développement. Il est effectué directement sur le frottis d'une parcelle purulente ou hémorragique du produit pathologique ou mieux, sur le culot du produit homogénéisé et centrifugé après un traitement fluidifiant décontaminant.

Pour mettre en évidence les mycobactéries, on utilise leur propriété d'acido-alcool-résistance, c'est à dire leur capacité à former des complexes stables avec des colorants basiques, fuchsine ou fluorochromes phéniqués, qui persistent malgré la double action de l'alcool et des acides forts dilués (67) (127). Les principales méthodes utilisant la fuchsine sont la méthode de Ziehl-Neelsen et ses variantes dont la méthode de Kinyoun.

En pratique, deux méthodes sont bien codifiées, elles sont bien adaptées à la pratique quotidienne où elles ont fait leurs preuves. Ce sont la méthode de Ziehl Neelsen et la méthode de coloration à l'auramine (51).

I - Modalités techniques de l'examen microscopique

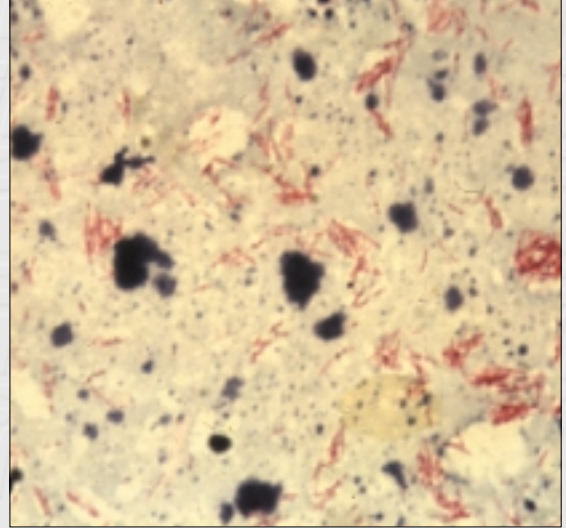
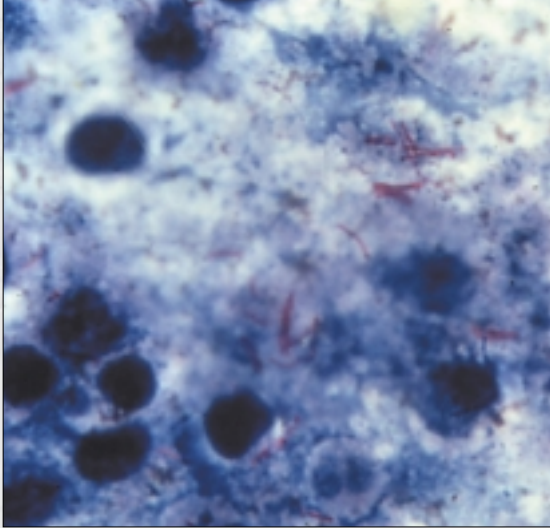
1° Réalisation du frottis

A partir du crachat, on examine le produit prélevé, on repère les parcelles purulentes et, avec une oese bouclée, on préleve une de celles-ci. On l'étalera sur une lame porte objet, soigneusement dégraissée et préalablement identifiée au nom ou numéro du patient correspondant. L'étalement se fera à l'extrémité de la lame par un mouvement d'aller et retour de l'oese sur la lame de telle façon qu'une surface de 20 mm de long sur 10 de large soit couverte. Souvent, les frottis sont trop épais. Un frottis d'épaisseur correcte doit permettre de distinguer les caractères d'un journal regardé en transparence. Après coloration de Ziehl, un tel frottis apparaîtra de couleur légèrement bleue. Les frottis bleu foncé sont trop épais. Le frottis est séché à l'air, l'utilisation d'une platine chauffante permet d'accélérer la dessiccation.

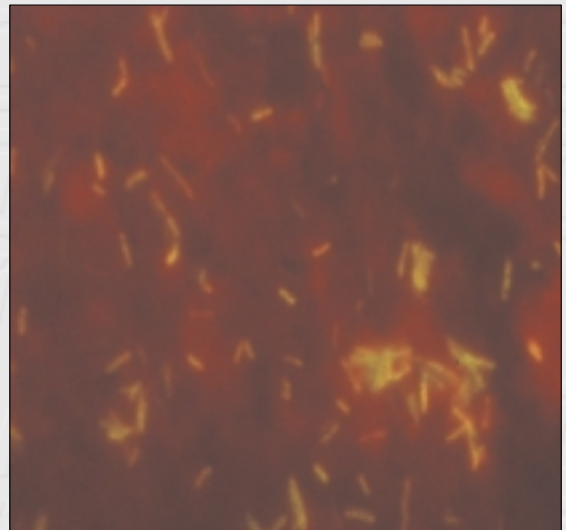
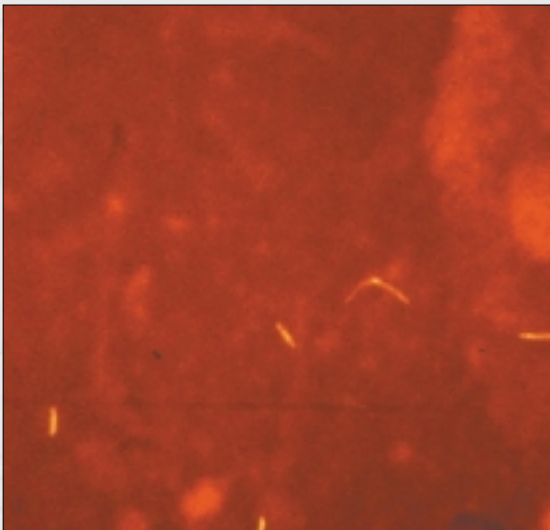
A partir du culot d'homogénéisation. Après centrifugation, le culot est remis en suspension dans 1 ml d'une solution tamponnée stérile additionnée d'albumine bovine à 0,1 %. Une goutte de cette suspension est étalée sur une lame porte objet dans les mêmes conditions que celles qui viennent d'être développées.

2° Fixation

Avant coloration, le produit déposé sur les lames doit être fixé. Plusieurs méthodes sont utilisées : la chaleur et l'alcool méthylique. Leur but est le même : dénaturer les protéines du produit pour permettre une meilleure adhésivité au support. Les plus sûres consistent à recouvrir le frottis maintenu sur la platine chauffante avec de l'alcool méthylique jusqu'à évaporation complète ou par immersion à froid pendant 10 minutes. La fixation à la chaleur consiste à passer rapidement à trois reprises la lame dans la flamme d'un bec bunsen de telle façon que la face du frottis soit directement exposée à la flamme. La méthode qui consiste à recouvrir la lame d'alcool et à l'enflammer réalise un compromis entre les deux précédentes.



Colorisation de Ziehl Neelsen. Les bacilles apparaissent rouges sur fond bleu de la préparation.



Colorisation à l'auramine : les bacilles apparaissent jaunes fluorescents sur fond rouge.

3° Coloration de Ziehl Neelsen

A chaud c'est la méthode de référence. Elle est simple, reproductible, ne nécessite pas d'équipements sophistiqués.

Elle peut être pratiquée à froid, les lames sont alors immergées dans un bain de fuschine pendant au moins trois heures. Elle est pratique mais elle est moins sensible que la méthode originale à chaud.

La décoloration peut se faire de différentes façons avec un acide fort dilué et l'alcool. Le bleu d'Armand ou le réactif de Fraenkel Gabbet associant dans un même réactif l'acide, l'alcool et le bleu de méthylène, permettent d'assurer, dans une même opération, décoloration et contre-coloration mais les résultats obtenus sont de moins bonne qualité.

4° Coloration à l'auramine (51)

Si le nombre de frottis à examiner est suffisamment important, si on dispose d'un microscope à fluorescence, l'utilisation de cette méthode permet un gain de temps appréciable puisque les bacilles, jaune brillant sur fond rouge sombre de la préparation, sont facilement vus au grossissement de 400 (objectif 40X oculaire 10X). Le champ microscopique balayé est alors 5 fois plus grand qu'à l'immersion. Les techniciens expérimentés utilisent le grossissement 250, le champ observé est alors environ 16 fois plus important que celui examiné à l'immersion.

Des variantes existent qui utilisent la rhodamine, l'acridine orange.

II - Expression des résultats

Le résultat de l'examen microscopique est exprimé quantitativement (en précisant la méthode de coloration utilisée), ce qui permet de contrôler la disparition progressive des bacilles sous traitement ([tableau II 1](#)). Lorsque le nombre total de bacilles observés est inférieur à 5, après coloration à la fuchine, ou à 10 après coloration fluorescente, il est prudent, en raison du risque de confusion entre BAAR et débris cellulaires, de considérer le résultat comme douteux, de le noter mais de ne pas le rendre avant de l'avoir vérifié par l'examen d'autres frottis préparés à partir du même échantillon ou mieux d'un autre échantillon (131).

Basé sur la propriété d'acido alcool résistance caractéristique de l'ensemble des mycobactéries, l'examen microscopique met en évidence des bactéries appartenant au genre *Mycobacterium* mais ne permet pas de déterminer l'espèce mycobactérienne en cause. Il n'en reste pas moins que le risque d'infection à mycobactéries atypiques étant, depuis la généralisation des traitements anti-VIH comportant les antiprotéases, de nouveau rare, l'observation de BAAR à l'examen microscopique, surtout si elle se répète et si les signes cliniques et radiologiques sont en faveur, déclenche l'isolement du malade et la mise immédiate sous traitement antituberculeux.

Comme il faut de 5000 à 10000 bacilles par ml de produit pathologique pour que la probabilité de voir au moins un BAAR sur le frottis atteigne 95%, il n'est pas étonnant que l'examen microscopique ne soit pas très sensible. En effet comparée à la culture, sa sensibilité varie de 20 à 80 % selon la population de malades considérés, les prélèvements examinés et aussi selon les méthodes de coloration et de culture employées (131). Les prélèvements d'origine respiratoire provenant de malades présentant des lésions excavées sont très fréquemment positifs à l'examen

microscopique tandis que les prélèvements d'origine extra pulmonaire ne le sont que rarement. La concentration des échantillons et l'utilisation de la méthode fluorescente, qui permet d'observer facilement la totalité du frottis, améliorent la sensibilité de l'examen microscopique (166).

Il y a habituellement une bonne corrélation entre les résultats de l'examen microscopique et ceux de la culture (131). Il arrive toutefois que la culture de prélèvements dans lesquels des BAAR ont été observés soit négative. Le plus souvent, il s'agit de prélèvements effectués après la mise en place du traitement. Si ce n'est pas le cas, il faut envisager que la culture ait été de mauvaise qualité ou que l'examen microscopique ait été faussement déclaré positif. Cette dernière éventualité peut s'expliquer par la contamination des lames, dans les bacs à coloration ou par l'eau du robinet qui peut contenir des mycobactéries atypiques en abondance, mais il est plus fréquent que des artefacts aient été confondus avec des BAAR, notamment quand l'examen est fait par la méthode fluorescente. Il est donc essentiel que la lecture des frottis soit effectuée par un personnel entraîné et que les frottis positifs soient relus et confirmés par une seconde personne. En cas de doute persistant, il est possible de sur-colorer par la méthode de Ziehl-Neelsen un frottis déjà coloré par la méthode fluorescente à l'auramine (166).

Tableau II 1 : Expression des résultats de l'examen microscopique.

Report	Nombre de BAAR observés	
	après coloration à la fuchsine (x 1000)	après coloration avec fluorochrome (x 250)
absence	0	0
douteuse	1-2/200 champs	1-9/frottis
1+	1-9/100 champs	1-9/10 champs
2+	1-9/10 champs	1-9/champ
3+	1-9/champ	10-99/champ
4+	> 10/champ	> 100/champ

D – Mise en culture

Actuellement en France les laboratoires peuvent se procurer dans le commerce des milieux solides et des milieux liquides pour la culture des mycobactéries.

I - Milieux solides

Les milieux de culture solides sont des milieux gélosés ou des milieux à l'œuf, les seconds étant les plus utilisés en France.

1° Milieux à l'œuf de Löwenstein-Jensen et Coletsos

Les milieux à l'œuf contiennent des œufs ou des extraits d'œufs, qui apportent des vitamines et sont inhibiteurs de diverses substances toxiques, de l'amidon de pomme de terre, des sels minéraux, du glycérol et du vert malachite, colorant qui inhibe la croissance d'éventuels contaminants. Ils sont à la fois sensibles, la plupart des espèces de mycobactéries et en

particulier les bacilles de la tuberculose s'y développent facilement, et d'un prix de revient modéré. Ils se conservent plusieurs mois à +4°C. Si l'hydratation et l'aération des milieux sont satisfaisantes les colonies de *M. tuberculosis*, présentent sur le milieu de Löwenstein-Jensen l'aspect caractéristique bien connu " en chou fleur " (colonies de couleur crème, rugueuses, d'aspect verruqueux) qui permet d'orienter le diagnostic (67). Le milieu de Coletsos est un milieu enrichi. Il contient davantage d'œuf, du pyruvate de sodium, de la cendre d'antracite et une solution d'oligo-éléments. Il est particulièrement indiqué pour la croissance des mycobactéries exigeantes : *M. bovis*, *M. africanum* ainsi que celle de certaines mycobactéries atypiques exigeantes : *M. xenopi*, *M. malmoense*, *M. triplex*...

2° Milieux gélosés 7H de Middlebrook

Les milieux gélosés 7H (7H10, 7H11) sont des milieux semi-synthétiques. Comme ils sont transparents les colonies examinées à la loupe binoculaire peuvent être détectées plus tôt que sur les milieux à l'œuf (127). Les milieux ne se conservent qu'un mois à +4°C, et leur prix de revient est élevé. Ils ne sont habituellement pas utilisés en France en routine au laboratoire d'analyses.

3° Remarques

a) Règles à observer pour obtenir une bonne culture sur milieux solides

Selon la nomenclature des actes de biologie, 4 tubes de milieux de culture doivent être inoculés. En pratique, on inocule 2 tubes de milieu de Löwenstein-Jensen et 2 tubes de milieu de Coletsos à raison de 0,2 ml du culot de centrifugation par tube. Les tubes sont placés dans une étuve à 37°C sur des portoirs spéciaux, en position inclinée. Les tubes ne sont fermés qu'après évaporation du liquide, le milieu devant être sec mais non desséché pour que les mycobactéries puissent s'y développer. Des conditions particulières de culture sont requises pour la mise en évidence de certaines espèces de mycobactéries. Elles sont exposées plus loin.

Les milieux doivent être incubés pendant 8 semaines au moins et mieux pendant 12 semaines. Les prélèvements dont l'examen microscopique était positif et dont les cultures n'apparaissent pas seront conservés encore plus longtemps.

b) Lecture des cultures

La surveillance journalière des cultures pendant la 1^{ère} semaine d'incubation permet d'éliminer rapidement les tubes contaminés et de refaire la décontamination ou de demander rapidement un nouveau prélèvement. Elle permet aussi de détecter les mycobactéries à croissance rapide.

Pour les mycobactéries à croissance lente, la lecture est faite 1 fois par semaine. L'aspect caractéristique en chou-fleur, des colonies de *M. tuberculosis* est rarement reconnu avant 21 à 28 jours d'incubation. La culture de *M. africanum*, *M. bovis* et de certaines mycobactéries atypiques comme *M. xenopi* apparaît rarement avant 6 à 8 semaines.

c) Rendu des résultats des cultures

Le rendu des cultures positives doit faire apparaître la date à laquelle les colonies ont été observées, le nom de l'espèce de mycobactérie et le nombre de colonies isolées. La quantification des colonies permet de suivre l'efficacité du traitement. Le nombre est habituellement formulé de la façon suivante : nombre exact si inférieur à 50, 50 à 100, 100 à 200 et > à 200 colonies.

Les bacilles de la tuberculose (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*) sont des pathogènes spécifiques et l'isolement de leurs colonies, même en nombre limité, signe habituellement la maladie tuberculeuse. Il ne faut toutefois pas oublier que les risques de contamination de laboratoire existent. Il est donc nécessaire de toujours s'assurer de la cohérence des résultats de la culture avec les données cliniques et radiologiques concernant le malade (61).

Les mycobactéries atypiques sont des bactéries de l'environnement et l'interprétation d'une culture positive est plus difficile, en particulier lorsqu'il s'agit d'isolement effectué à partir de cavités ouvertes. Le nombre de colonies isolées et le nombre de prélèvements positifs sont alors confrontés avec les données cliniques et radiologiques et avec l'état immunologique du malade. La connaissance de ces données est essentielle pour déterminer s'il s'agit d'une contamination du prélèvement ou d'isolats témoins d'une infection (190).

La culture est habituellement déclarée négative si après 4 semaines d'incubation il n'y a pas eu de développement de colonies. On signale que ce résultat peut être remis en question si une pousse se manifestait avant la fin de la période d'incubation.

II - Culture en milieux liquides

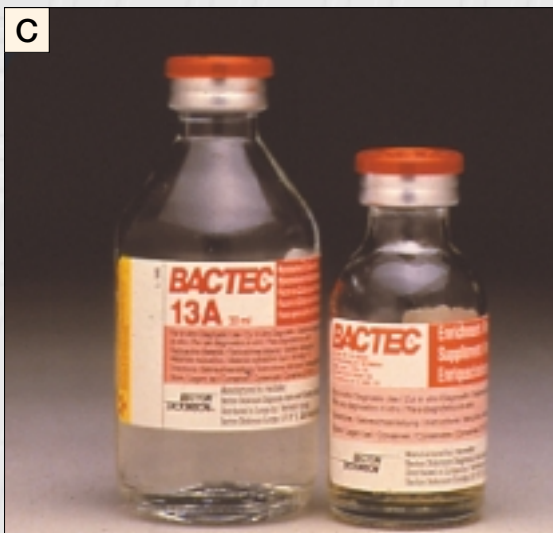
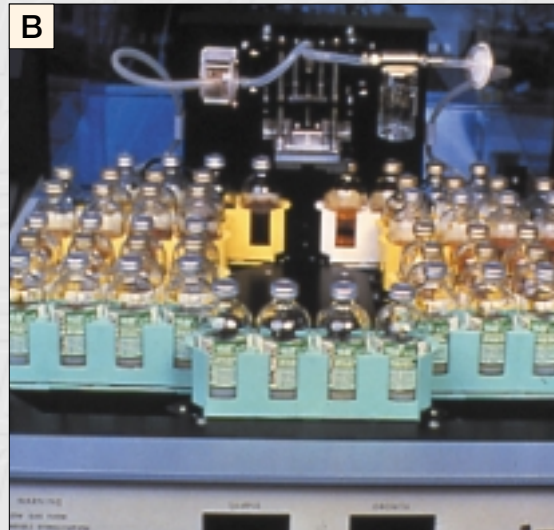
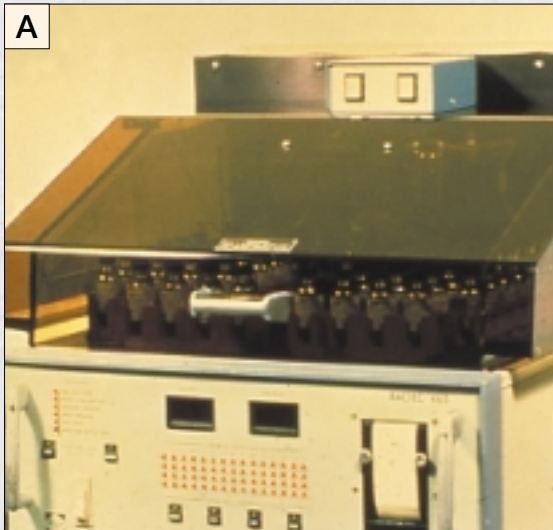
1° Pourquoi des milieux liquides

Au cours des deux dernières décennies, l'augmentation du nombre des tuberculoses, en particulier chez les malades immunodéprimés et l'apparition de souches multirésistantes ont conduit à la mise au point de nouvelles méthodes de culture pour pallier la lenteur du développement des colonies sur milieux solides. Toutes ces méthodes sont basées sur l'utilisation de milieux de culture liquides. Placée en atmosphère confinée, la croissance microbienne est mise en évidence, soit par la mesure de la consommation d'oxygène, soit par la mesure de la production d'anhydride carbonique. Il est recommandé d'ensemencer, en plus du milieu liquide, un milieu solide. En effet, l'utilisation des milieux liquides ne permet ni l'observation ni le dénombrement des colonies, ce qui est parfois préjudiciable à l'établissement du diagnostic, au suivi de l'efficacité du traitement, et à la détection de la présence de cultures mixtes de mycobactéries. Les deux types de milieux sont complémentaires et la sensibilité du résultat final est améliorée (161).

2° Les différentes méthodologies

A - Le système Bactec™ 460 TB (Becton Dickinson)

Le système Bactec qui est basé sur la respirométrie radiométrique est utilisé en France depuis 15 ans. Il n'est plus actuellement commercialisé.



Méthode Bactec

- A - Vue d'ensemble de l'appareil Bactec 460 TB.
- B - Plateau sur lequel sont posés les portoirs.
- C - Flacons Bactec 7H12B et 7H13A réservés aux hémocultures.
- D - Flacons pour antibiogrammes de 1^{ère} ligne.

a) Principe

C'est Bretey qui le premier a mis au point et décrit les lois de la culture des mycobactéries en atmosphère confinée (16). La technique de respirométrie radiométrique décrite par Middlebrook (120) utilise ce principe. Elle est basée sur la mesure du gaz carbonique marqué au carbone $^{14}\text{CO}_2$ libéré par les mycobactéries au cours de leur croissance dans le milieu liquide 7H₁₂B contenant de l'acide palmitique marqué au carbone 14. Des quantités minimales de $^{14}\text{CO}_2$ pouvant être mesurées, la présence de mycobactéries dans le flacon est détectée précocement.

b) L'appareillage et les lectures

Le $^{14}\text{CO}_2$ libéré dans l'atmosphère des flacons est mesuré par l'appareil à chaque fois qu'on lui présente les flacons incubés dans une étuve indépendante de l'appareil. Le résultat est exprimé selon une graduation appelée GI (Growth Index) allant de 0 (absence de $^{14}\text{CO}_2$) à 999 (quantité maximale décelable par l'automate). Les flacons sont habituellement soumis à la lecture 2 fois par semaine pendant les deux premières semaines puis 1 fois par semaine jusqu'à la fin de la 6^{ème} semaine. Le rythme de lecture peut être adapté à la richesse en B.A.A.R. des échantillons par exemple une lecture chaque jour pour un frottis très positif. S'il n'y a pas d'augmentation du GI après 6 semaines d'incubation, la culture est déclarée négative. Quand le GI est supérieur à 100 il convient de faire un frottis, de le colorer par la méthode de Ziehl-Neelsen afin de vérifier que le micro-organisme qui s'est développé dans le milieu est bien une mycobactérie et de faire une subculture sur milieu solide.

c) Délai de détection et sensibilité

La sensibilité du Bactec 460 TB est supérieure à celle des méthodes utilisant les différents milieux solides. Le système permet de détecter la présence de *M. tuberculosis* en moyenne en 10-15 jours quand les échantillons sont riches en bacilles (examen microscopique positif) et en 20 jours quand ils le sont moins (examen microscopique négatif) (25) (166).

Le système permet de rechercher les mycobactéries dans tous les prélèvements y compris dans le sang (milieu 13A). Lorsque les prélèvements proviennent de cavités ouvertes ils doivent être, comme pour la culture sur milieux solides, décontaminés avant d'être inoculés dans le flacon auquel il faudra ajouter un cocktail d'antibiotiques (40).

d) Inconvénients

Si le Bactec 460TB offre des avantages, il n'est pas dépourvu d'inconvénients. En effet, l'utilisation de produit radioactif entraîne de sérieuses contraintes de manipulation, de stockage et d'élimination des déchets qui ont contribué à limiter son implantation en France. De plus, l'appareil, qui n'est pas un automate, ne procure pas de gain de temps au technicien. Les flacons sont hermétiquement clos ce qui impose un ensemencement à la seringue avec des risques de piqûre du manipulateur. Enfin, le prix de revient d'une culture dans ce système est plus élevé que celui d'une culture effectuée sur milieu de Löwenstein Jensen.

B - Milieux liquides non radiométriques

Ces dernières années de nouveaux milieux liquides, non radioactifs qui permettent de pallier les inconvénients du système Bactec 460TB, ont été mis au point et sont disponibles en France (166). Les milieux dérivent tous du milieu de Middlebrook 7H9. Le signal qui permet de détecter la croissance est de nature différente selon les milieux. Les milieux sont à utiliser manuellement ou dans des systèmes automatisés.

a) Milieux à utiliser manuellement

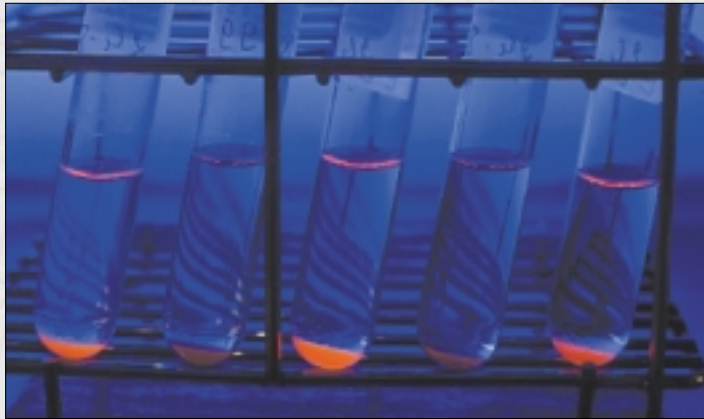
- **Le tube BBL® MGIT™** (Mycobacterial Growth Indicator Tube - Becton Dickinson). Le fond du tube MGIT est garni d'un support en silicone imprégné d'un sel de ruthénium qui émet une lumière fluorescente lorsque la pression partielle d'oxygène diminue. La croissance des micro-organismes dans le milieu provoque une consommation d'oxygène et entraîne l'apparition de la fluorescence dont l'intensité est proportionnelle au niveau de réduction du milieu. En plaçant le tube sous une source de lumière ultraviolette on observe alors une fluorescence de couleur orange vif dans le fond et une réflexion orange sur le ménisque de la surface du milieu. La lecture est facilitée par la comparaison avec des tubes témoins positif et négatif. Elle est effectuée régulièrement pendant 6 semaines avant de déclarer la culture négative (204). (deux fois par semaine pendant les deux premières semaines et une fois par semaine jusqu'à la 6^{ème} semaine).

- **Système MB Redox (Biotest)**. Le système MB Redox utilise un milieu de Kirchner modifié, additionné d'un sel de tétrazolium. Le métabolisme des mycobactéries en croissance consomme l'oxygène du flacon, ce qui entraîne la réduction du sel de tétrazolium incolore en formazan coloré en rose violet. La lecture se fait à l'œil nu, 24 heures après l'inoculation puis 2 fois par semaine pendant les 2 premières semaines et 1 fois par semaine jusqu'à 6 semaines (76). Il est parfois difficile de faire la distinction entre les grains de formazan et les particules d'échantillons, notamment lorsqu'il s'agit de cultures de fragments biopsiques.

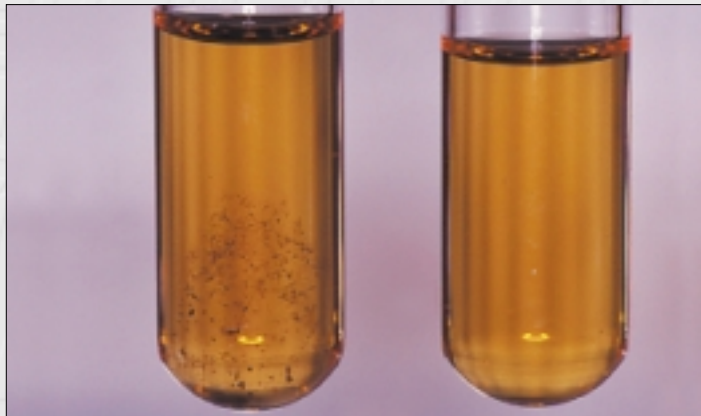
b) Méthodes automatiques

- **Systèmes BD Bactec™ 9000MB (Becton Dickinson)**. La firme Becton, a adapté grâce à des algorithmes spécifiques, ses automates de la série 9000 à la culture des mycobactéries. La détection de la croissance y est faite comme avec le tube MGIT par détection d'une lumière de fluorescence obtenue par réduction d'un sel de ruthénium. Deux appareils sont disponibles pour la culture des mycobactéries, l'un d'une capacité maximale de 240 flacons, le 9240 MB et l'autre d'une capacité maximale de 120 flacons, le 9120 MB. On peut les utiliser pour rechercher les mycobactéries dans le sang avec les flacons Myco/F-lytic et dans tous les autres prélèvements avec les flacons Myco/F sputa. L'automatisation est totale et l'existence d'un système informatique sophistiqué permet la lecture en continu et le suivi permanent pendant 6 semaines des flacons incubés dans l'appareil (204).

- **Système Bactec™ MGIT™ 960 (Becton Dickinson)** est le dernier né des automates Becton pour la culture des mycobactéries. Le système de détection de la croissance est encore basé sur l'apparition d'une lumière de fluorescence. Comme avec les appareils de la série 9000, la lecture se fait automatiquement en continu pendant 42 jours. Les tubes sont contrôlés toutes les 60



Milieu MGIT. Tubes positifs avec fluorescence rouge du ménisque et du culot due à la réduction du sel de Ruthénium.



Milieu MB Redox. Le tube positif (à gauche) présente un précipité brun de Formazan signant la positivité de la culture.

minutes. La capacité maximale (960 tubes) est beaucoup plus importante que celle des appareils 9120 et 9240 MB mais l'appareil n'accepte pas de tubes pour les hémocultures (69) (1).

- **Système BacT/Alert 3D™ (Organon Teknika).** Le système BacT/Alert 3D, évolution de l'ancien système MB/BacT, est un automate complet de capacité modulable. La détection de la croissance y est effectuée, comme dans l'automate pour hémoculture BacT/Alert, par colorimétrie. Une pastille située au fond du flacon agit comme un indicateur coloré. Sous l'effet du gaz carbonique dégagé au cours de la croissance de micro-organismes elle passe progressivement du vert au jaune. Chaque flacon dispose de sa propre cellule de lecture reliée au logiciel. Des algorithmes de calcul analysent en continu le virage de couleur (1).

C - Remarques

• Ensemencement des milieux liquides et suivi des cultures

Les milieux liquides sont habituellement ensemencés avec 0,5 ml de prélèvement. Les prélèvements sont introduits, soit à la seringue (Bactec 9000 MB), soit à la pipette (Bactec MGIT 960) soit indifféremment à l'aiguille ou à la pipette (MB Redox, BacT/Alert).

Si les prélèvements proviennent de cavités ouvertes ils doivent être, comme pour l'ensemencement sur milieux solides, préalablement décontaminés. Si après la décontamination des micro-organismes subsistent, même en très faible quantité, ils vont provoquer très rapidement l'envahissement total du milieu liquide. C'est pourquoi, les milieux liquides sont rendus sélectifs par addition d'un cocktail d'antibiotiques (PANTA) constitué de polymyxine B (50µg), d'amphotéricine (5µg), d'acide nalidixique (20µg), de triméthoprime (5µg) et d'une carboxy-pénicilline (10µg). Certains y ajoutent de la vancomycine (à la concentration finale de 1 à 4 mg/l) pour renforcer l'action vis à vis des bactéries à Gram positif. Si les prélèvements proviennent de cavités fermées ils sont ensemencés sans décontamination préalable et les milieux ne sont pas additionnés d'antibiotique.

Pour améliorer la culture des mycobactéries il faut aussi ajouter aux milieux liquides un supplément comme l'OADC (acide oléique, albumine, dextrose et catalase). Les suppléments vitaminique et antibiotique sont commercialisés sous forme lyophilisée et sont à ajouter, extemporanément après avoir été reconstitués, dans tous les milieux à l'exception du milieu MB Redox qui les contient déjà et qui de ce fait est prêt à l'emploi.

• Surveillance des cultures en milieux liquides

Lorsque la culture est déclarée positive, il est indispensable de vérifier que les micro-organismes qui se sont développés dans le milieu sont bien des B.A.A.R. (et ne sont pas des contaminants) (40). Le contrôle est effectué après coloration de Ziehl, qui permettra, mieux que la coloration à l'auramine, de faire une observation de la morphologie des B.A.A.R. et de leur groupement. Dans tous les cas, et en particulier lorsque la primoculture faite en parallèle sur milieu solide est négative, il est conseillé de faire une subculture sur milieu de Löwenstein-Jensen qui permettra de dépister une éventuelle culture mixte de mycobactéries.

Le rendu des cultures positives en milieu liquide doit, comme celui des cultures en milieux solides, préciser outre l'espèce isolée, si l'identification a pu être réalisée, la date à laquelle la

détection a été faite, ceci pour donner une idée du nombre de bactéries présentes dans le prélèvement. Il doit aussi, comme celui des cultures en milieux solides, se faire après confrontation avec les données de la clinique (61, 163).

• Délai de détection et sensibilité des cultures en milieu liquide

La sensibilité des milieux liquides, non radioactifs semblerait un peu inférieure à celle du système Bactec 460TB mais est toujours au moins égale à celle des milieux solides. La croissance de *M. tuberculosis* est détectée en 8 à 30 jours selon que les prélèvements sont très riches (M+) ou moins riches (MO) en B.A.A.R. (1, 69, 76, 127, 161, 164, 166, 204).

• Intérêt des différents milieux liquides : avantages et inconvénients

Parmi tous ces nouveaux milieux le biologiste pourra faire son choix en fonction du nombre et de la nature des échantillons à traiter au laboratoire, de ses habitudes de travail et de ses possibilités financières.

Si le laboratoire traite quelques échantillons par semaine seulement, on préférera les tubes MGIT, ou MB Redox. Si en revanche il traite plusieurs dizaines d'échantillons par jour on se tournera plutôt vers un automate. Si la demande en hémocultures est importante on pourra choisir le Bact Alert 3D ou l'un des appareils de la série Bactec.

III - Cas particuliers

1° Hémocultures

L'hémoculture est la méthode de choix pour le diagnostic des mycobactérioses chez les patients immunodéprimés, notamment celui des infections à MAC chez les malades atteints de SIDA (127).

Pour effectuer une bonne hémoculture il faut d'abord libérer les mycobactéries des cellules blanches sanguines. On y parvient en ajoutant un agent lytique dans le système de prélèvement (tube Isolator) ou dans le milieu de culture (voir plus haut). Le sang prélevé sur tube Isolator est centrifugé puis le culot est ensemencé sur les milieux solides à l'œuf. Des flacons de milieu de culture additionnés d'un agent lytique sont disponibles dans le commerce. Tous sont à utiliser conjointement avec un appareil de lecture. Ce sont les flacons 13A adaptés au système radiométrique Bactec 460 TB, les flacons Myco F/lytic adaptés aux automates Bactec de la série 9000 MB et les flacons MB BacT-sang adaptés à l'automate BacT/Alert 3D. L'utilisation conjointe du tube Isolator et des nouveaux milieux liquides n'est pas possible, le tube Isolator contenant des inhibiteurs de la culture des mycobactéries qui ne sont pas neutralisés dans ces milieux (191).

Lorsque l'hémoculture est effectuée dans le but de suivre l'efficacité du traitement, il faut utiliser le tube Isolator et les milieux à l'œuf et non les milieux liquides. En effet, ces derniers sont dépourvus d'inhibiteurs d'antibiotiques et la culture en milieu liquide ne permet pas de quantifier les bactéries présentes (102). En revanche pour établir le diagnostic de l'infection disséminée, les flacons spéciaux de milieux liquides semblent être supérieurs au tube Isolator associé au milieu de Löwenstein-Jensen.

Les mycobactéries les plus fréquemment isolées du sang sont les mycobactéries du complexe *M. avium*. On peut aussi isoler *M. kansasii*, *M. simiae* et même *M. tuberculosis* ou

encore *M. genavense* une espèce déficiente qui ne se multiplie pas sur milieu à l'œuf mais seulement dans les milieux liquides. L'isolement d'autres espèces est moins fréquent. La détection des mycobactéries dans le sang se fait beaucoup plus rapidement avec les milieux liquides qu'avec les milieux solides. Par exemple, MAC est en moyenne isolé en 5 à 8 jours dans le système Bactec 460TB et en 15-20 jours sur les milieux à l'œuf (25)

2° Les autres prélèvements

a) Selles : La culture des selles pour recherche de mycobactéries du fait de l'abondante flore commensale est un exercice très difficile et son rendement est mauvais. Bien que son intérêt, pour l'identification des malades séropositifs pour le VIH et à risque de faire une infection généralisée à MAC, soit controversé, c'est dans ce cadre qu'elle est encore parfois demandée. Avant de procéder à la culture, il est alors indispensable de mettre les selles (une noisette) en suspension dans l'eau stérile et d'éliminer les grosses particules. De plus, il est prudent d'ensemencer, en plus des milieux classiques, des milieux sélectifs (contenant des antibiotiques) solides ou/et liquides afin d'éliminer les bactéries commensales qui auraient échappé à la décontamination.

b) Pus : Les pus et les liquides très purulents sont dilués dans 5 à 10 parties d'eau stérile avant d'être ensemencés sur milieu solide, ce qui dilue les inhibiteurs et facilite la multiplication des mycobactéries. On peut aussi, après les avoir liquéfiés avec la N-acétyl-cystéine les ensemencer, dans un flacon de milieu liquide pour hémoculture.

3° Conditions particulières de culture

La primo-culture de plusieurs espèces de mycobactéries demande des conditions particulières. Aussi les mycobactéries responsables d'infections cutanées (*M. marinum*, *M. chelonae-abscessus*, *M. haemophilum* ou encore *M. ulcerans*) et une espèce responsable d'infection ganglionnaire et pulmonaire (*M. malmøense*) se développent beaucoup mieux voire exclusivement à 30°C (67) (127). Il est donc nécessaire, surtout en cas de lésions cutanées, d'incuber des milieux de culture à la température de 30°C en plus de milieux à 37°C. En cas de suspicion d'infection à *M. xenopi*, qui est thermophile, il est bon de placer des tubes à 42°C.

Certaines espèces de mycobactéries sont déficientes et exigent la présence de suppléments spécifiques dans les milieux de culture pour s'y multiplier. Ce sont *M. haemophilum* qui a besoin d'un apport en fer (citrate de fer ammoniacal à la concentration finale de 15 mg/ml ou disque d'hémine) et certaines souches de *M. avium* qui ne se développent qu'en présence de mycobactine.

E - L'amplification génomique appliquée au diagnostic de la tuberculose

Compte tenu du manque de sensibilité et de spécificité de l'examen microscopique, des délais de la culture même réduits par l'utilisation des milieux liquides font que le diagnostic de la tuberculose est long. On avait espéré, quand en 1990 la PCR (Polymerase Chain Reaction) a été décrite, voir le temps nécessaire au diagnostic de la lèpre et de la tuberculose ramené à 24 heures (17). Mais rapidement sur des prélèvements paucibacillaires, l'observation de divergences entre positivité de la culture et négativité de la PCR attiraient l'attention sur la

moindre sensibilité de la PCR. Ce manque de sensibilité est lié en partie au faible volume de l'échantillon analysé par la PCR mais l'augmenter entraînerait une augmentation des inhibiteurs de la polymérase. Les conditions techniques actuelles de réalisation de la PCR sont donc un compromis entre l'obtention d'un taux d'inhibition minimal et d'une sensibilité maximale. Compte tenu de ces limites, la sensibilité de la PCR se situe actuellement entre 60 et 70 % des prélèvements qui seront positifs à la culture, ce qui n'est pas beaucoup plus élevé que la sensibilité de l'examen microscopique (40 à 50).

Malgré ses insuffisances, la PCR est un outil qui est utilisé pour l'identification des espèces, pour l'étude de leur sensibilité aux antibiotiques, pour la comparaison des génomes entre eux, ce qui permet des études épidémiologiques intéressantes. Dans l'avenir, peut-être l'usage des puces à DNA viendra-t-il remplacer nos techniques de diagnostic actuel et automatiser le laboratoire de Bactériologie.

I – Principe de la PCR

La PCR est une technique d'amplification de déterminants génétiques (gènes, séquences d'insertion, séquences répétées...) portés par le chromosome bactérien, jusqu'à un niveau suffisant pour qu'ils puissent être détectés et identifiés.

Après obtention du culot de fluidification décontamination, les mycobactéries présentes sont lysées par différents moyens (S.D.S., ultrasons, choc thermique). Cette étape permet de libérer leur DNA. C'est sur celui-ci que se trouve la séquence à amplifier. Pour que la réaction ait lieu, il faut que dans le milieu se trouvent les 4 désoxyribonucléotides (d NTPs), la DNA polymérase (Taq Polymérase thermostable de *Thermophilus aquaticus*), le tampon contenant $MgCl_2$, le DNA à amplifier et deux oligonucléotides complémentaires des brins opposés du DNA à amplifier (primers ou amorces).

La réaction d'amplification débute par le chauffage du DNA à 95° pour le dénaturer (opération qui consiste à séparer les deux brins l'un de l'autre par rupture par la chaleur des liaisons H – H qui unissent les deux chaînes). On baisse alors la température à 50°-60°C et les primers se fixent en amont côté 3' de la séquence à amplifier. La température est montée à 72°, température optimale de fonctionnement de la Taq Polymérase. La synthèse se déroule en sens inverse sur chaque brin en prenant le primer comme amorce. Un double brin est formé au niveau de la séquence à amplifier. La multiplication des cycles (30 à 40) permet une multiplication exponentielle de la séquence DNA à amplifier et en quelques heures, on obtient de l'ordre de 10^6 copies. La présence des amplicons est alors révélée, soit par électrophorèse en gel en présence de bromure d'éthidium et comparaison avec une échelle témoin constituée d'oligonucléotides de poids moléculaire connu, soit par hybridation avec une sonde spécifique dans une opération de type Southern (transfert du contenu du gel sur une membrane sur laquelle on appliquera les sondes marquées complémentaires de l'amplicon obtenu).

II – Techniques (91)

La méthode originale, appliquée au diagnostic de la tuberculose (17) prenait pour cible la séquence d'insertion IS6110 et l'amplifiait avec la Taq Polymérase selon le brevet pris par CETUS. Ce brevet a été acquis par la société Roche Diagnostic.

Par la suite, pour contourner le brevet, d'autres techniques décrites dessous ont été imaginées. Plusieurs firmes ont, à partir de 1995, commercialisé des kits qui mettent à la portée des laboratoires des méthodes et des réactifs standardisés. Leur utilisation a permis un grand progrès en palliant la grande dispersion des réactifs "maison" qui dans les diverses évaluations faisait apparaître une grande variabilité des résultats (128).

1° La PCR : Méthode Amplicor *M. tuberculosis* MTB (Roche)

Cette technique amplifie le gène de l'ARN 16S. Elle emploie la Taq polymérase et correspond à la description donnée plus haut.

Un kit est commercialisé, il est validé pour les prélèvements d'origine respiratoire. Il présente plusieurs originalités dont la révélation des amplicons par une réaction colorée après réalisation d'une hybridation en microplaque et corrige plusieurs inconvénients relevés avec la méthode originale.

- Pour éviter les contaminations en chaîne des prélèvements* par des amplicons provenant d'expériences précédentes, dans le mélange des désoxyribonucléotides, la thymine est remplacée par l'uracile. Les amplicons résultant de la réaction incluent l'uridine à la place de la thymine et sont hydrolysés par contact avec l'uridine glycosylase (Amperase LD®) qui respecte les ADN contenant de la thymine. Le traitement du tube réaction avec cet enzyme permettra la destruction de l'amplicon contaminant mais respectera l'ADN des micro-organismes à amplifier. L'enzyme sera détruite lors de l'élévation de température.
- La présence d'un "contrôle interne" permet d'éviter les faux négatifs liés à la présence d'inhibiteurs de la PCR. Il consiste à amplifier en même temps que le DNA mycobactérien un plasmide (S₁ Myco) portant les mêmes sites d'hybridation pour les primers que le gène ARN 16S des mycobactéries du complexe *tuberculosis*. Il y aura amplification conjointe des séquences du chromosome bactérien et du plasmide contrôle. Le produit final d'amplification est réparti en deux aliquotes (deux puits d'une même microplaque), et mis en contact, d'une part avec la sonde spécifique du complexe *tuberculosis* (1^{er} puits) et d'autre part avec la sonde S1 Myco (2^{ème} puits). L'absence de coloration lors de la réaction dans le puits S₁ Myco signe la présence d'inhibiteurs.

Les réactions d'amplification et de détection peuvent être réalisées dans un automate le "Cobas Amplicor MTB".

* La prévention de cette contamination a nécessité la mise en place d'une procédure indiquant les précautions qui doivent permettre de les éviter (voir GBEA-mycobactéries).

2° La T.M.A. (Transcription Mediated Amplification) Gen-Probe amplified M. tuberculosis direct test bioMérieux.

L'amplification dans cette méthode porte sur le ARN 16 S qui, dans une même cellule bactérienne se trouve représenté à plusieurs milliers d'exemplaires, ce qui devrait théoriquement augmenter la sensibilité. Ces rRNA vont être hybridés à un primer qui se fixe spécifiquement sur eux. Le primer apporte en plus des bases nécessaires à son insertion une séquence promoteur de la RNA polymérase sur laquelle cette enzyme pourra se fixer. Les RNA ayant fixé ce primer sont mis en présence d'une transcriptase réverse dans un milieu réactif à température convenable. Il y a synthèse d'un DNA complémentaire cDNA et formation d'un double brin mixte DNA-RNA. Le brin cDNA libre peut fixer en 3' une deuxième amorce à partir de laquelle la transcriptase reverse réalise un brin d'ADN. On se trouve donc en fin d'opération avec un double brin de l'ADN porteur d'un site d'insertion de la RNA polymérase. Celle-ci transcrit rapidement de nombreux RNA. Ces RNA ainsi formés vont à leur tour servir de modèle pour faire des cDNA qui fixeront la RNA polymérase et permettront à chaque tour du cycle de multiplier par 100 à 1000 le nombre des copies de RNA.

On voit qu'avec cette méthode, en quelques cycles, on a atteint sans utiliser de thermocycleur le seuil de détection ($10^9 - 10^{12}$ copies).

Les produits amplifiés sont de deux sortes : cDNA : 10 %, RNA : 90 %. La détection s'effectue avec des sondes DNA marquées par un ester d'acridinium qui est détecté et mesuré dans un chimio-luminomètre. Cette technique est validée pour les prélèvements pulmonaires mais n'inclut ni contrôle interne ni détection d'amplicons parasites contaminants.

3° Le S.D.A. (Strand displacement Amplification) (91) BD Probe Tec TM^{ET} DTB assay

La méthode d'amplification par déplacement d'un brin d'ADN est une méthode isothermique. La cible est l'ADN. Les amorces oligonucléotidiques contiennent un site de fixation de l'endonucléase de restriction spécifique *Hinc II*. Lorsque ces amorces sont hybridées sur l'ADN cible, une ADN polymérase déficiente en exonucléase appelée "Klenow exo" synthétise une copie du fragment d'ADN cible qui, après action de l'enzyme *Hinc II* est coupée et déplacée. Le brin déplacé est hybridé avec une amorce antisens contenant le site de restriction spécifique *Hinc II*. La succession des réactions d'hybridation d'extension puis de déplacement du segment d'ADN cible dans les deux sens de lecture de l'ADN permettent la réaction d'amplication. La détection des amplicons par hybridation d'une sonde marquée par un fluorochrome est réalisée simultanément à l'amplification dans l'automate. BD probe Tec^{ET}, cette technique comporte un contrôle interne systématique.

4° Autres méthodes

a) La L.C.R. (Ligase Chain Reaction)

A la différence de la PCR, la LCR mise au point par les laboratoires Abbott n'utilise pas une polymérase mais une ligase pour amplifier la séquence codant pour la protéine antigène B. Un kit avait été mis au point ainsi qu'un automate. Il semble que la commercialisation ait été arrêtée.

b) NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification)

C'est une méthode voisine de la TMA qui consiste à amplifier du RNA après transcription reverse en DNA.

III – Efficacité des méthodes d'amplification génique (26)

En ce qui concerne l'analyse en routine des prélèvements destinés au diagnostic de la tuberculose, les techniques d'amplification génomique sont moins sensibles que la culture. Pour qu'une technique d'amplification soit reproductible il faut que le prélèvement contienne de l'ordre de 20 à 40 CFU par millilitre.

Deux catégories bien distinctes doivent être différenciées. Les prélèvements multibacillaires positifs à l'examen microscopique, sur ces prélèvements, la sensibilité des différentes techniques est de l'ordre de 90 à 100 %. Pour les prélèvements négatifs à l'examen microscopique, la sensibilité chute à 50 %.

Pour expliquer ce manque de sensibilité, on peut invoquer le nombre trop faible de bacilles. En effet, pour limiter l'action des inhibiteurs, on limite le volume de l'inoculum. Alors que le flacon de culture reçoit 0,5 ml, le volume destiné à l'amplification est de 0,1 ml. Le produit est ensuite dilué par les réactifs et tampons utilisés. Finalement, selon les méthodes, la dilution finale est de 20 à 50. S'y ajoute la forte résistance de la paroi des mycobactéries qui handicape la lyse cellulaire, l'extraction de l'ADN est entravée, la sensibilité de la méthode s'en ressent.

La présence d'inhibiteurs qui est maintenant bien décelée par le contrôle interne est à l'origine de réactions faussement négatives. Certaines méthodes de décontamination qui utilisent les tensioactifs comme le lauryl sulfate ou le chlorure de benzalkonium doivent être proscrites car ces produits sont très inhibiteurs des réactions d'amplification. Par ailleurs, certains prélèvements (urines, pus, biopsies) contiennent souvent plus d'inhibiteurs que les crachats (183).

Concernant la spécificité, les cibles des différentes techniques sont bien choisies et il n'y a pas de réactions croisées avec les autres mycobactéries. Ce qui fait que la spécificité est excellente, supérieure à 95 %.

Par contre, comme il a été dit plus haut, le risque de contamination d'un échantillon par les produits d'amplifications précédentes est à l'origine de faux positifs. Divers moyens permettent d'éviter ces contaminations (organisation du laboratoire, Ampérase, travail sous huile, automation).

Restent les dissociations : culture négative, amplification positive des malades traités où les bacilles sont morts mais les acides nucléiques persistent.

Au niveau du laboratoire, la réalisation des amplifications nécessite toujours d'encadrer la série à réaliser de témoins positifs et de témoins négatifs.

IV – Indications actuelles de l'amplification génique dans le diagnostic de la tuberculose pulmonaire (30)

En aucun cas les techniques d'amplification génomique peuvent être prescrites à titre systématique pour le diagnostic de la tuberculose où la culture reste l'élément clef du diagnostic. Toutefois, on peut dégager quelques indications à la réalisation de l'amplification génomique. C'est tout d'abord le cas des prélèvements positifs à l'examen microscopique où, en quelques heures, une amplification permet d'affirmer que les bacilles observés appartiennent au complexe *tuberculosis*.

L'amplification permet, chez les sujets fortement immunodéprimés ou porteurs de lésions pulmonaires chroniques, d'éliminer une tuberculose et d'orienter le diagnostic et le traitement vers une mycobactérie non tuberculeuse.

Chez un malade frottis négatif chez lequel les signes cliniques et radiologiques sont très évocateurs de tuberculose, une amplification positive aura une forte valeur prédictive positive et acquerra la même valeur qu'une culture positive. Elle permet de ce fait l'instauration du traitement et l'arrêt des autres investigations.

Enfin, l'amplification peut être utilisée pour identifier précocement une culture positive en milieu liquide, ce que les sondes ne peuvent pas toujours faire.

Une étude a montré (123) que l'amplification pourrait avoir un intérêt dans le diagnostic des tuberculoses pleurales.



Etude de la sensibilité aux antibiotiques

En 1944, Waksman découvre la streptomycine et montre qu'elle agit sur le bacille tuberculeux. Moins de 10 mois après, Youmans (203) rapporte les premières observations de malades traités par la streptomycine dont les bacilles initialement sensibles ont acquis, après quelques mois de traitement, la possibilité de cultiver sur des milieux contenant 10.000 fois la concentration qui au début empêchait leur multiplication. Quelques temps après Pyle (141) constate l'existence de rares bacilles résistants présents dans l'expectoration de malades non encore traités par la streptomycine, Youmans (202) montre que ces mutants ont été sélectionnés par l'antibiotique et qu'après quelques semaines de traitement la population bacillaire du malade est exclusivement représentée par ces germes de résistance souvent élevée. Ce même phénomène n'est pas l'apanage de la streptomycine, on le retrouvera par la suite avec tous les antibiotiques qui seront successivement découverts. Donc au sein de toute souche sauvage (souche qui n'a jamais été en contact avec les antibiotiques) dès que la population bacillaire devient suffisamment importante (une caverne contient de l'ordre de 10^9 bacilles), on retrouve des mutants résistants aux antibiotiques. Leur fréquence varie avec la nature de l'antibiotique considéré 1 sur 10^6 pour l'isoniazide (INH), 1 sur 10^7 à 10^8 pour la rifampicine, 1 sur 10^6 pour la streptomycine. L'association de plusieurs médicaments dans le traitement de la tuberculose réduit considérablement le risque de sélectionner une bactérie porteuse simultanément de plusieurs mutations. En effet, la loi de l'indépendance de mutations fait que la probabilité de trouver une mycobactérie sauvage porteuse simultanément de deux ou plusieurs mutations est égale au produit des probabilités simples. Ainsi, avec les chiffres cités plus haut, la probabilité de trouver dans une souche sauvage un bacille résistant à la fois à la rifampicine (10^{-7}) et à l'isoniazide (10^{-6}) sera $10^{-7} \times 10^{-6} = 10^{-13}$, soit 1 bactérie au sein d'une population de 10^{13} bacilles.

Cette règle est valable pour les souches qui n'ont jamais été en contact avec les antibiotiques. Mais la mauvaise prescription des traitements (monothérapie) les difficultés pour assurer sans rupture de stock la fourniture des médicaments dans les pays en développement et la mauvaise compliance des malades conduisent à la sélection de souches résistantes. Ce type de résistance qui survient à la suite d'un traitement mal conduit est dite secondaire et porte sur un ou sur plusieurs antibiotiques. Les souches résistantes à la fois à l'isoniazide et à la rifampicine sont dites multirésistantes. La résistance primaire est celle qui pré-existe chez un malade avant la mise en œuvre du traitement. Elle est liée à la contamination par un malade porteur d'une souche résistante.

En France et dans les pays industrialisés, chez les malades traités pour la première fois, la souche isolée est en général sensible aux antibiotiques de première intention. Il n'en est pas de même pour ceux qui rechutent ou qui viennent de pays de forte prévalence. Aussi, la détermination de la sensibilité sera systématique pour toute souche isolée chez un nouveau malade. Elle sera aussi pratiquée sur toute souche isolée à nouveau d'un patient après trois mois de traitement.

Les antibiotiques qui seront testés systématiquement seront les antibiotiques de première intention, réservant les autres molécules aux souches qui se seront montrées résistantes à ceux-ci (voir tableau III1).

Le pyrazinamide doit être considéré comme une molécule de première intention. Mais il n'est actif qu'en milieu acide, on ne dispose pas de tests performants pour l'étude de sa sensibilité. Celle-ci n'est donc réalisée qu'en seconde intention. Les antibiotiques de seconde intention ne seront testés que lorsqu'une multi-résistance sera décelée ou lorsque l'on aura à faire à une rechute ou à un malade non négativé après plusieurs mois.

A - Méthodes phénotypiques

II - Méthodes en milieu solide

La méthode des proportions, celle qui est décrite, est la méthode de référence laquelle peut être réalisée en milieu solide et en milieu liquide (24).

La méthode en milieu solide utilise, soit des milieux à l'œuf dans lesquels les antibiotiques sont ajoutés avant coagulation, soit des milieux gélosés (7H₁₀ et 7H₁₁) dans lesquels les antibiotiques ont été inclus dans la masse avant solidification de l'agar.

Ce qui va différencier une souche résistante à un antibiotique d'une souche sensible c'est que la première contient un pourcentage de mutants résistants beaucoup plus important que celui contenu dans la seconde. La méthode des proportions évalue, au sein de la souche à étudier, la proportion de mutants résistants qu'elle contient. Dans un second temps, on compare la proportion obtenue à la proportion critique définie par les auteurs de la méthode. Si la souche testée contient un pourcentage de mutants résistants inférieur à la proportion critique, on déduit que la souche est sensible, à l'inverse on la dira résistante. Cette technique peut être réalisée à partir des cultures ou directement à partir des prélèvements à condition qu'ils soient suffisamment riches en bacilles. Les délais de lecture sont de 4 à 6 semaines (tableau III 7).

1° Détermination de la proportion des bactéries résistantes

Pour déterminer le nombre des bacilles résistants contenus dans la population bactérienne étudiée, on ensemence sur des milieux sans antibiotiques (témoin) et sur des milieux avec antibiotiques (test) des dilutions de la souche microbienne telles, qu'après la pousse, on obtienne avec l'une ou l'autre de ces dilutions des colonies en nombre comptable. En général, on l'obtient avec les dilutions 10⁻³ et/ou 10⁻⁵ d'une suspension mère de la souche à étudier étalonnée par opacimétrie à 1 mg/ml. Les concentrations d'antibiotiques qui sont dans les milieux tests ne sont pas établies au hasard, elles sont corrélées au CMI et aux concentrations que l'on obtient chez un sujet normal après administration de la posologie standard. On les appelle concentrations critiques.

Pour déterminer la proportion de bactéries résistantes présentes dans la population, il faut connaître le nombre total de bactéries viables dénombrées sur le milieu témoin sans antibiotique et le nombre de bactéries résistantes dénombrées sur les milieux contenant les concentrations critiques d'antibiotiques. Le rapport des secondes aux premières permet de déterminer la proportion des bactéries résistantes.



Souche multirésistante. Lors de l'étude de la sensibilité, on observe une pousse identique à celle du témoin 100 % en présence d'INH 1µg/ml et de rifampicine.

2° Comparaison de la proportion obtenue à la proportion critique

La proportion critique a été définie une fois pour toutes par les auteurs de la méthode qui l'ont obtenue après étude du comportement d'un grand nombre de souches sauvages vis à vis de la concentration critique des différents antibiotiques que l'on peut étudier. Ils ont défini qu'en général, avec les antibiotiques de première intention, les proportions critiques se situaient à 1 %. Ce qui revient à dire que toute souche dont la proportion de mutants résistants à l'antibiotique est inférieure à 1 % sera sensible et qu'à l'inverse toute souche dont le nombre de mutants sera égal ou dépassera la proportion critique sera résistante. Pour certains antibiotiques de deuxième intention, cette proportion est de 10 %.

II - Méthodes en milieu liquide

1° Technique utilisant le BACTEC 460 TB

Dans son principe, elle est très voisine de la méthode des proportions (171). Un inoculum donné dont le GI du flacon de primo-culture ou du repiquage de la souche est proche du GI maximum (entre 800 et 999) est inoculé dans des flacons contenant les antibiotiques et dans des flacons témoins sans antibiotique. Le premier témoin estensemencé avec le même inoculum que celui qui a servi à ensemencer les flacons avec antibiotiques (témoin 100 %) et le second est inoculé avec la dilution au 1/100 (témoin 1 %) (fig. III 1). On compare les Δ GI. Toute souche dont le Δ GI est négatif est dite sensible. A l'inverse, elle est dite résistante. Cette méthode donne d'excellents résultats avec les 4 antibiotiques de 1ère intention et avec les mycobactéries du complexe tuberculosis (tableau III 1). Par contre, elle est insuffisante pour les mycobactéries opportunistes.

En ce qui concerne l'étude de la sensibilité de *M. tuberculosis* aux antibiotiques de seconde intention, une étude multicentrique (134) a défini les concentrations critiques utilisables avec la méthode radiométrique Bactec 460 et avec la méthode de dilution en milieu de Middelbrook 7H10. Les concentrations recommandées sont colligées dans le (tableau III 6).

2° La méthode en milieu liquide avec la méthodologie MGIT donne des résultats identiques à ceux obtenus avec les autres méthodes plus anciennes. Le principe en est le même. Le délai d'obtention des résultats est de 8 jours, identique à celui obtenu avec le Bactec 460. La méthode est automatisable sur le Bactec MGIT 960 (3).

La souche à étudier convenablement diluée (fig. III 2) est inoculée à raison de 0,5 ml dans un tube témoin sans antibiotique et dans des tubes tests contenant les antibiotiques (tableau III 2). Chaque tube a reçu 0,5 ml d'OADC (Acide Oléique Albumine Dextrose Catalase). Les tubes sont placés à l'étuve à 37° et la lecture se fait quotidiennement en lumière ultra-violet 365 nm du 3^{ème} au 12^{ème} jour. Une souche est considérée comme sensible si dans les 48 heures qui suivent la positivité du témoin, inoculum dilué au 1/100, aucune fluorescence ne s'est manifestée dans les tubes tests. Au contraire, si la fluorescence dans les tubes contenant les antibiotiques apparaît en même temps ou dans les 48 heures qui suivent la positivité du témoin, la souche est considérée comme résistante.

Cette méthode est aussi performante que celle qui utilise le Bactec 460. Elle a l'avantage de ne pas utiliser de radio-éléments et, réalisée dans des tubes à vis, elle évite l'inoculation à la seringue. Elle représente une très bonne alternative à la méthode Bactec 460 TB.

III - La méthode utilisant les bactériophages spécifiques de *M. tuberculosis*

Le gène de la luciférase des vers luisants introduit dans le génome de *M. tuberculosis* est une méthode astucieuse. Le bactériophage ainsi équipé qui infecte une culture de *M. tuberculosis* se multiplie et, en présence d'ATP et de luciférine, rend la bactérie luminescente. En présence d'antibiotique actif sur cette bactérie, la multiplication du bactériophage n'a pas lieu et la bactérie ne luit pas. A l'inverse, si elle n'est pas sensible à l'antibiotique, elle se multiplie en sa présence et devient lumineuse (86). Cette méthode reste du domaine de la recherche.

Remarques :

- En ce qui concerne l'INH, 3 concentrations sont étudiées car il existe plusieurs niveaux de résistance. En milieu solide, on considère comme résistantes à bas niveau les souches résistantes à 0,2 mg/l et sensibles à 1 mg/l. Une résistance détectée en milieu liquide devrait être contrôlée par la méthode de référence en milieu solide.
- La détermination de la proportion critique de bacilles résistants au pyrazinamide doit comparer la croissance sur le milieu avec antibiotique à celle d'un témoin du même milieu acidifié (pH 6,6) étant donné que la PZA n'a d'activité qu'en pH acide. La culture des mycobactéries du complexe *tuberculosis* est parfois fortement diminuée à ce pH ce qui rend souvent le test ininterprétable par culture négative sur le témoin. A l'inverse, le milieu peut n'être qu'insuffisamment acidifié ce qui rend inactif le PZA et permet la culture sur milieu avec antibiotique malgré la sensibilité de la souche. Il est habituel de considérer que si le pH acide est respecté, la culture sur le milieu témoin est environ de 10 % par rapport au témoin milieu pH neutre, le test est alors interprétable.
- L'état actuel de la prévalence de la résistance en France ([tableau III 3](#)) montre la réalité du problème et fait apparaître que les souches multirésistantes ne sont pas rares. Elles compromettent l'efficacité du traitement standard et celle des programmes de lutte antituberculeuse en prolongeant la période de contagiosité du malade porteur de ces souches, source probable de dissémination. Des épidémies de tuberculose, provoquées par des souches multirésistantes dans diverses collectivités, ont attiré l'attention sur ce problème majeur de santé publique et ont contribué à mettre au point des méthodes plus rapides de détection de la résistance et en particulier de celle à la rifampicine. Les méthodes génotypiques se prêtent bien à ce type de détermination.

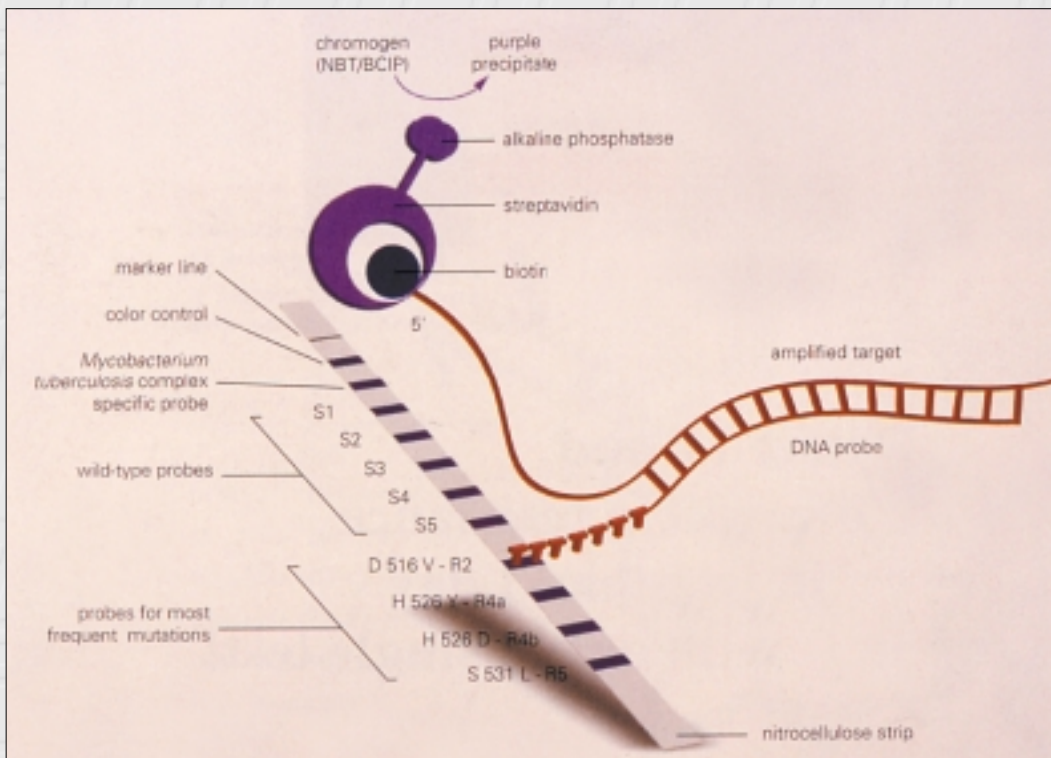
B - Méthodes génotypiques

On connaît maintenant bien les bases génétiques de la résistance, non seulement pour ce qui concerne la rifampicine mais aussi pour les autres antibiotiques de première ligne. Les mutations ponctuelles responsables de la résistance sont localisées sur une région limitée du gène qui code pour la cible protéique de l'antibiotique. Ainsi, pour la rifampicine, 95 % des souches résistantes le sont du fait d'une mutation survenant sur une portion de 81 paires de bases du gène *rpoβ* de la RNA polymérase DNA dépendante. Plus de 35 mutations ont été décrites dans cette région mais deux mutations His 526 → Tyr et Ser 531 → leu rendent compte de plus des deux tiers des mutations.

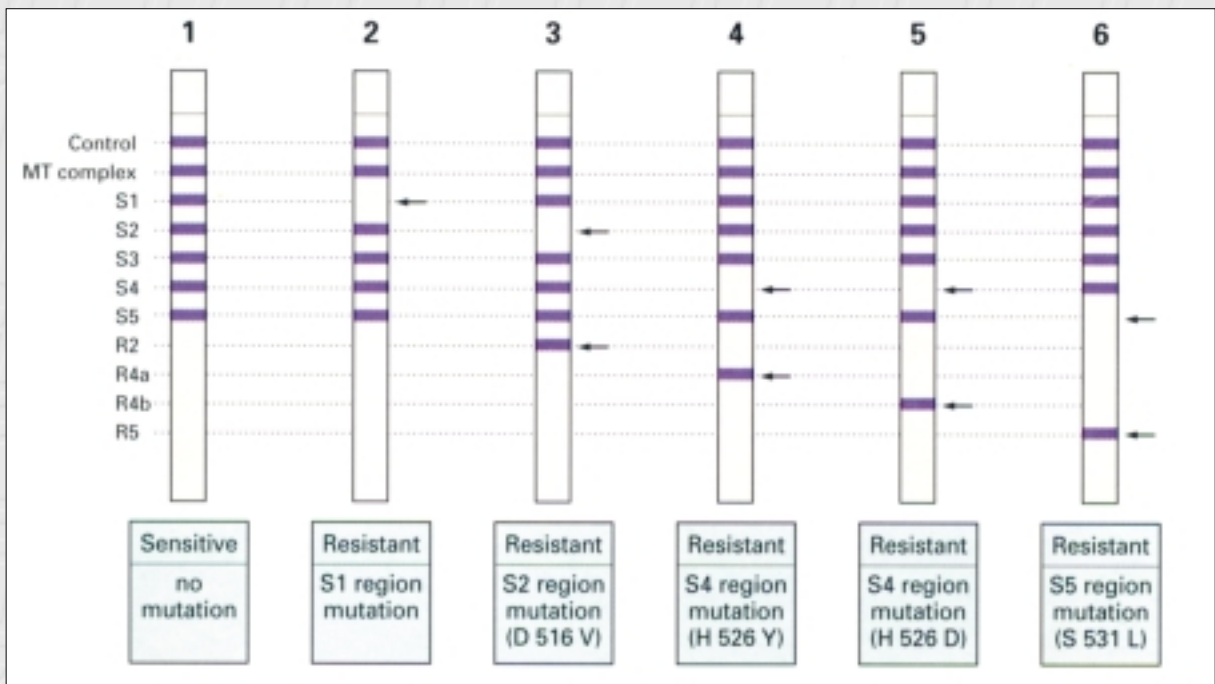
Le problème de la résistance à l'isoniazide est plus complexe, plusieurs gènes peuvent être impliqués. Bien que l'on dispose de moyens pour mettre en évidence ces différentes mutations, ceux-ci sont assez complexes à mettre en œuvre et sont peu utilisés, ce qui n'a qu'une importance relative. En effet, on sait que près de 90 % des souches qui sont résistantes à la rifampicine le sont aussi à l'INH. On recherchera la mutation à la rifampicine et si elle existe, on suspectera d'emblée une souche multirésistante, le traitement en tiendra compte, l'antibiogramme conventionnel viendra ensuite le confirmer ou l'infirmer.

L'essai génotypique comporte trois principales étapes, i) extraction du DNA de la souche à étudier, ii) amplification de la partie spécifique du gène par PCR, iii) détection de la mutation par comparaison avec la même séquence de la souche sauvage de référence. Pour réaliser cette dernière étape, plusieurs méthodes sont disponibles.

- Le séquençage des acides nucléiques de l'amplicon réalisé et comparaison de la séquence obtenue à celle de la souche sauvage.
- La dénaturation du produit de PCR et migration du produit dénaturé en gel de polyacrylamide. S'il y a modification de la structure primaire, il y a modification de sa mobilité. La position des bandes est déterminée par rapport à celle d'une souche sensible de référence. La méthode dite PCR Single Strand Conformation Polymorphism (PCRSSCP) (169) est une méthode efficace mais qui est coûteuse et d'exécution difficile. Elle est très peu utilisée.
- L'hybridation avec une sonde immobilisée sur un support solide permet de détecter avantageusement les mutations responsables de la résistance à la rifampicine. La méthode Line Probe Assay (LIPA) a consisté à fixer sur un support en cellulose une série de sondes complémentaires de la région de 81 paires de bases du gène *rpoβ* qui se chevauchent les unes aux autres. Cinq sondes hybrident, avec les séquences de la souche sauvage, les quatre autres avec les principales mutations. Les amplicons sont marqués et la fixation est révélée par une réaction enzymatique colorée. Cette méthode commercialisée par Murex Innogenetic est appelée InnoLipa Rif TB® (46). Les résultats obtenus sont intéressants, la méthode est simple et rapide. Elle peut s'appliquer directement sur le crachat si celui-ci est très riche en bacilles.



Rif TB (Murex Innogenetic). Bandelette sur laquelle sont fixées les sondes du gène *rpoβ* normal et les sondes portant les mutations les plus fréquentes qui déterminent la résistance à la rifampicine.



Identification des mutations les plus fréquemment observées par utilisation du test Rif TB (Murex Innogenetic).

C - Etude de la sensibilité des mycobactéries atypiques

Les mycobactéries non tuberculeuses sont peu sensibles aux antibiotiques et les résultats des tests réalisés *in vitro* ne permettent pas d'augurer avec certitude de l'efficacité de l'antibiotique lorsqu'il sera administré *in vivo*.

Les tests de sensibilité sont surtout utiles pour détecter l'apparition d'une résistance secondaire en cas de rechute. Les antibiotiques dont on peut tester la sensibilité sont peu nombreux et leur choix dépend de la nature de la mycobactérie isolée.

Il n'existe pas de méthode de référence. La technique habituellement utilisée est celle proposée par Heifets (75), elle consiste à mesurer la CMI de la souche à l'aide de dilutions d'antibiotiques judicieusement choisis (tableau III 4). C'est la même méthode qui peut s'appliquer à l'étude des souches de *M. tuberculosis* résistantes aux antibiotiques de première ligne et pour lesquelles on veut tester les antibiotiques de seconde intention (tableau III 1).

I Le principe

Il consiste à mettre un inoculum bactérien en contact avec des concentrations décroissantes d'antibiotiques afin de déterminer, après un temps de contact à 30°C ou 37°C selon l'espèce, la plus faible concentration d'antibiotique capable d'inhiber 99 % de l'inoculum.

La réalisation peut se faire selon plusieurs modalités :

1° En milieu liquide avec les flacons 7H₁₂B

Les médicaments qui doivent être testés sont dissous dans le solvant ad hoc, dilués et incorporés dans le bouillon pour réaliser des dilutions finales de raison 2 qui s'échelonnent de 32 µg/ml à 0,03 µg/ml.

On procède comme il a été indiqué plus haut pour la méthode Bactec. Des témoins sont inoculés avec 0,1 ml de la suspension lourde du germe (100 %) et avec la dilution au 1/100 témoin 1 %. Les tubes contenant les dilutions d'antibiotiques sont inoculés avec 0,1 ml de la suspension lourde. La lecture s'interprète par rapport au témoin 1 %. Souvent on utilise une méthode simplifiée qui limite le nombre des concentrations d'antibiotiques à étudier en la réduisant à deux. Une concentration faible assimilable à la valeur critique minima qui correspond à la valeur la plus élevée de la CMI obtenue lors d'études systématiques sur des souches sauvages. Les souches qui sont inhibées par cette concentration minima sont dites sensibles. La seconde valeur, la concentration critique maxima qui se définit comme étant la plus haute concentration d'antibiotique que l'on peut obtenir *in vivo*. Toute souche dont la CMI est supérieure à cette concentration est considérée comme résistante. Les souches dont la CMI se situe entre ces deux valeurs sont dites de sensibilité intermédiaire. Les concentrations conseillées figurent dans le (tableau III 5). On réalise les témoins 100 % et 1 %. Les tubes sont incubés à 30 ou 37° C selon la nature de la souche. Les lectures sont quotidiennes.

Le test est interprétable quand le jour de la lecture le GI du témoin 1 % atteint GI 30 et s'y maintient ou le dépasse pendant trois jours consécutifs et que le GI de la suspension 100 % atteint 999.

2° D'autres méthodes peuvent être utilisées

- La méthode de diffusion en milieu solide est utilisable pour les souches à croissance rapide. Le milieu utilisé est, soit du milieu de Middelbrook 7H10 supplémenté avec le mélange OADC ou le milieu de Mueller Hinton supplémenté avec le mélange OADC et 5 % de sang défibriné. On inocule la surface du milieu avec une suspension bactérienne Mac Farland 1 (1 mg/ml) diluée à 10^{-3} et on dépose comme pour un antibiogramme banal les disques ou les bandelettes E test (AES) imprégnées des antibiotiques à étudier. Les boîtes de Petri sont incubées en atmosphère humide à température de 30 ou de 37 ° C et examinées régulièrement. Les résultats ne peuvent être correctement interprétés que si la lecture peut se faire dans les trois jours.
- Les méthodes qui utilisent les milieux solides 7H10 ou milieux à l'œuf nécessitent d'incorporer les dilutions des antibiotiques avant solidification du milieu. En fonction de la nature du milieu de culture utilisé, les concentrations d'antibiotiques varient (tableau III 6).

III - Interprétation

S'il est facile de définir la CMI comme étant la plus faible concentration qui inhibe la pousse de la souche à étudier, il est parfois plus difficile de définir si la souche est sensible ou résistante.

Tableau III 1 : Antibiotiques actifs sur *M. tuberculosis*.

Antibiotiques testés en première intention	Antibiotiques testés en seconde intention
Isoniazide INH	Acide para-amino Salicylique PAS
Rifampicine RMP	Pyrazinamide PZA
Ethambutol EMB	Capréomycine CAP
	Cyclosérine D-CS
Streptomycine SM	Kanamycine KM
	Amikacine AN
	Ethionamide ETH
	Ofloxacine OFX
	Moxifloxacine MOX
	Levofloxacine LVX

Tableau III 2 : Concentration critique des médicaments utilisés en première ligne pour définir la sensibilité de *M. tuberculosis* sur les différents milieux de culture 7H₁₀, 7H₁₁, Löwenstein Jensen, 7H₁₂B (68) et MGIT (154).

Concentration en mg/l					
Médicaments	7H10	7H11	Löwenstein Jensen	Bactec 7H12B	MGIT
Isoniazide	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1
Rifampicine	1	1	40	2	1
Pyrazinamide	25	?	200	100	100
Ethambutol	5	7,5	2	2,5	5
Streptomycine	2	2	4	2	1

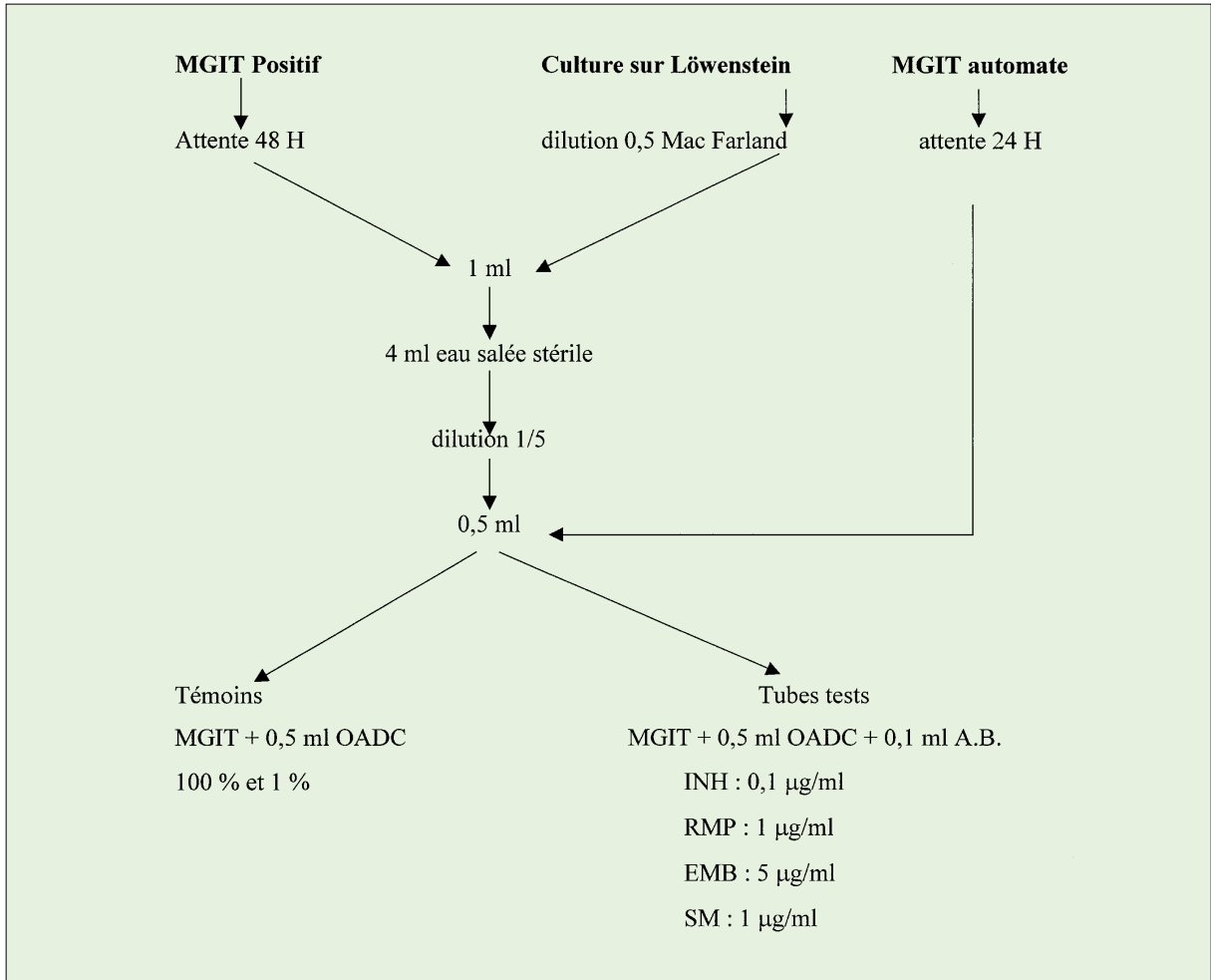
Tableau III 3 : Etat de la résistance à l'Isoniazide et à la Rifampicine en France en 1999 (148).

Résistance	Nombre de souches testées	% de résistance			
		Au moins 1 antibiotique	Au moins INH	Au moins RMP	INH +RMP
Primaire	910	9,2	3,4	0,8	0,7
Secondaire	106	16	12,3	9,4	8,5

Tableau III 4 : Antibiotiques à tester sur les mycobactéries atypiques selon que la souche est à croissance lente ou à croissance rapide.

Antibiotiques pour mycobactéries à croissance lente	Antibiotiques pour mycobactéries à croissance rapide
	<i>M. marinum</i>
<i>M. avium</i>	<i>M. fortuitum</i>
<i>M. kansasii</i>	<i>M. chelonae</i>
<i>M. xenopi</i>	<i>M. abscessus...</i>
Rifampicine RMP	Rifampicine RMP
Rifabutine	Rifabutine
Clarithromycine ou	Clarithromycine ou
Azithromycine AZM	Azithromycine AZM
Ofloxacine OFX	Doxycycline DO ou
	Minocycline MO
Amikacine AN	Imipénème
Moxifloxacine MOX	Cefoxitine
Ethambutol EMB	Amikacine

Figure III 2 : Etude de la sensibilité en milieu MGIT (154).

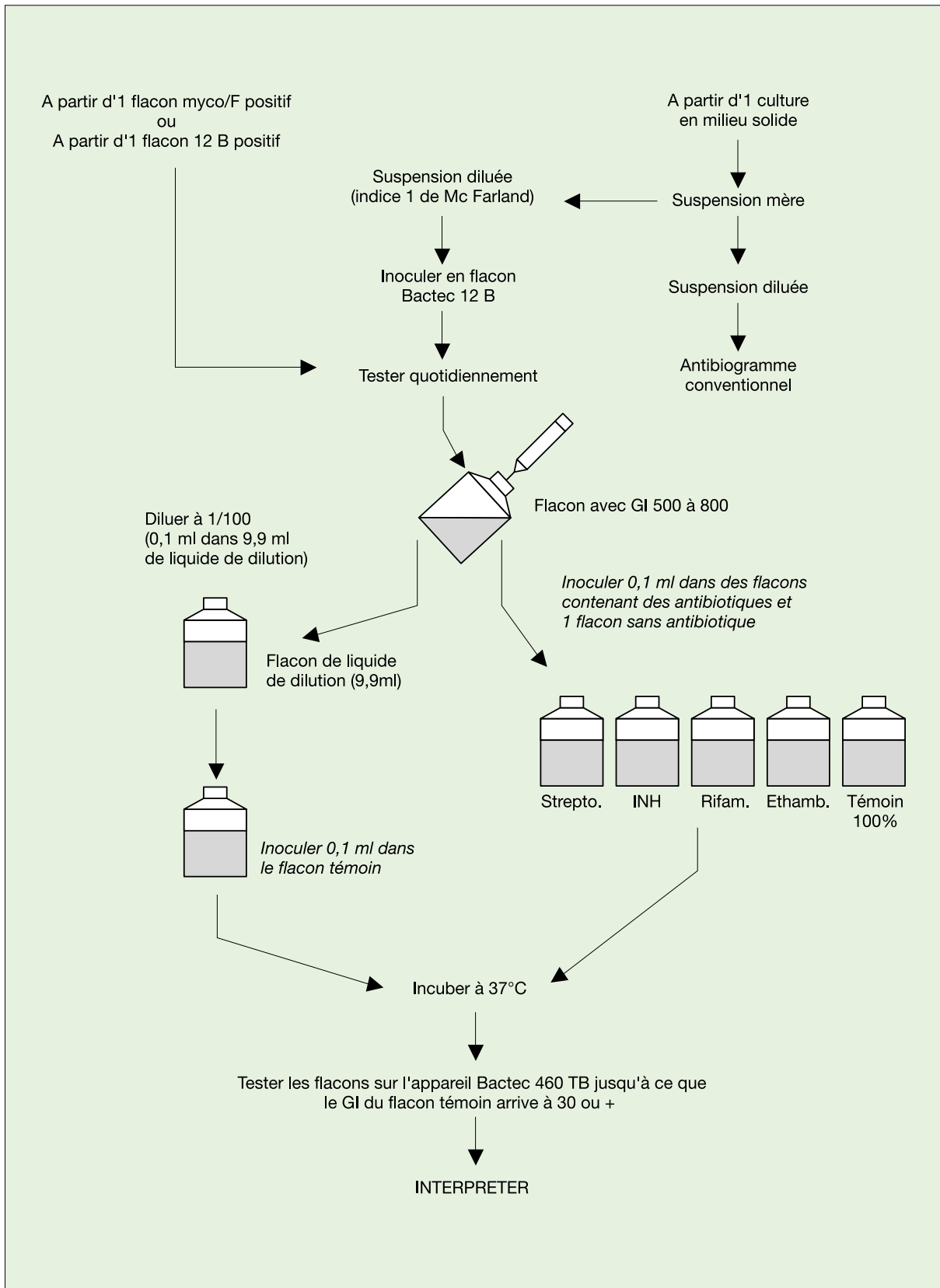


Etuve 37° C. Lecture quotidienne du 3^e au 12^e jour.

Absence de fluorescence dans les deux jours qui suivent la positivité du témoin : souche sensible.

Présence de fluorescence dans le tube test en même temps ou dans les deux jours qui suivent la positivité du témoin : souche résistante.

Figure III 1 : Schéma de la méthode Bactec d'antibiogramme.



Souche SENSIBLE : Δ GI du flacon contrôle > Δ GI du flacon avec antibiotique.

Souche RESISTANTE : Δ GI du flacon contrôle < Δ GI du flacon avec antibiotique.

Tableau III 5 : Les dilutions à tester proposées par Heifets (75).

	C.Cm	C.C. Max
Isoniazide	0,1	2,5
Rifampicine	0,5	8
Ethambutol	2	8
Streptomycine	2	8
Amikacine	2	8
Capréomycine	2,5	10
Ethionamide	1	4
Ofloxacine	2	8
Rifabutine	0,12	0,5
Clarithromycine	2	8

Tableau III 6 : Concentrations critiques exprimées en microgramme par millilitre des antibiotiques de seconde intention potentiellement actifs sur les souches de *M. tuberculosis* (134).

	Bactec 460	Milieu gélose 7H10	Löwenstein
Capréomycine	1,25	10	20
Ethionamide	1,25	5	20
Kanamycine	5	5	20
Amikacine	1	4	20
Clofazimine	0,5	1	
Ofloxacine	2	2	2
Rifabutine	0,5	1	4
Cyclosérine			30

Tableau III 7 : Méthode des proportions : titrage direct.

Dilutions à ensemercer en fonction du nombre de bacilles observés à l'examen microscopique (24).

Nombre de bacilles visibles à l'examen microscopique (objectif à immersion)	Dilutions à ensemercer	
	Sur les tubes témoins	Sur les tubes avec antibiotique
Moins de 1 bacille pour 10 champs	Pas de titrage direct	Pas de titrage direct
De 1 à 10 bacilles pour 10 champs	1 et 10 ⁻²	1 et 10 ⁻²
De 1 à 10 bacilles par champ	1, 10 ⁻² et 10 ⁻³	1 et 10 ⁻²
Plus de 10 bacilles par champ	10 ⁻¹ et 10 ⁻³	10 ⁻¹ et 10 ⁻³

Identification des mycobactéries

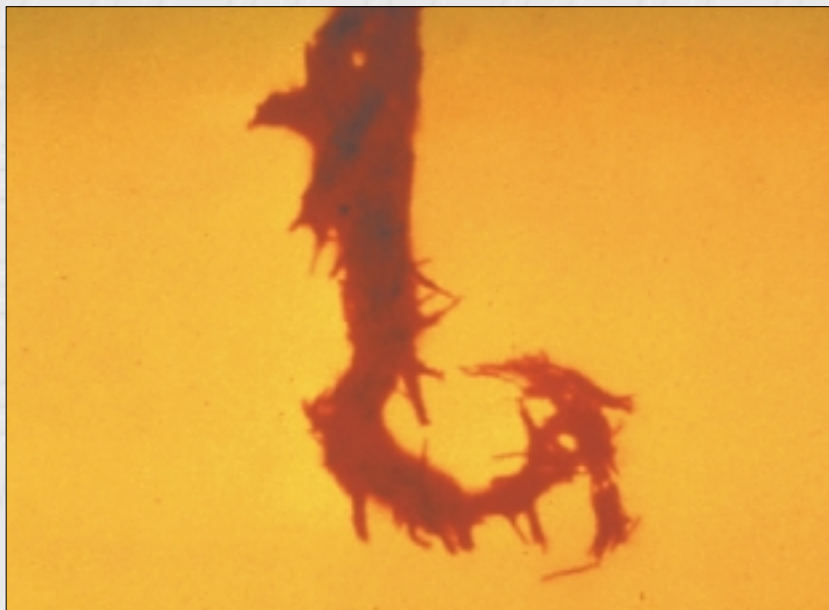
L'identification des mycobactéries à partir d'une culture positive s'effectue en plusieurs étapes : vérification de l'appartenance au genre *Mycobacterium*, identification des mycobactéries du groupe tuberculeux, identification des mycobactéries non tuberculeuses dites atypiques et différenciation des espèces. Depuis une dizaine d'années la culture en milieu liquide et l'utilisation en routine des techniques de biologie moléculaire ont modifié les schémas classiques d'identification. Dans un premier temps seront exposées les modalités pratiques d'identification réalisées à partir des souches isolées sur milieu solide (Löwenstein Jensen) ou milieux liquides positifs telles qu'elles sont appliquées dans les laboratoires de diagnostic. Elles permettent dans la majorité des cas d'aboutir à une conclusion. Dans la seconde partie seront exposées des techniques plus complexes réservées davantage aux laboratoires spécialisés.

A -Etudes préliminaires

I - vérifier l'Acido-Alcoolo-Résistance par la coloration de Ziehl

C'est une vérification essentielle et incontournable. La coloration de Ziehl doit être effectuée sur toute culture positive, elle permet la mise en évidence de l'acido-alcoolo-résistance caractéristique du genre *Mycobacterium*.

- De la morphologie des bacilles, on peut tirer un certain nombre de conclusions : les bacilles tuberculeux sont des bacilles fins de 5 à 7 μ de long. En culture ils se présentent sous forme d'agrégats et peuvent prendre un aspect en corde caractéristique ; les mycobactéries non tuberculeuses au contraire se répartissent habituellement de manière plus homogène, on pourra noter l'aspect caractéristique de certaines espèces ; *M. avium - intracellulare* est évoqué en présence de coccobacilles ; *M. xenopi* se présente sous forme de bacilles longs et fins souvent associés en paquets ; *M. kansasii* a un aspect de gros bacilles granuleux. Cet aspect morphologique des bacilles est contingent, il est susceptible de varier avec les conditions de culture. Il ne peut donc être considéré que comme un élément d'orientation.
- L'examen du frottis permet aussi de détecter la présence d'éventuels contaminants. La présence de formes bactériennes colorées en bleu après coloration de Ziehl indique la contamination probable de la culture et implique l'ensemencement d'une gélose au sang. Si la contamination est confirmée, une décontamination de la culture et sa purification sont nécessaires avant de poursuivre l'analyse.



Culture en milieu liquide (Bactec 7H12). Le groupement particulier "en cordes" évoque *M. tuberculosis*.

II - Observation des cultures positives

1° Sur milieu solide

L'aspect des cultures permet d'orienter l'identification vers une mycobactérie du complexe *tuberculosis* ou vers une mycobactérie non tuberculeuse.

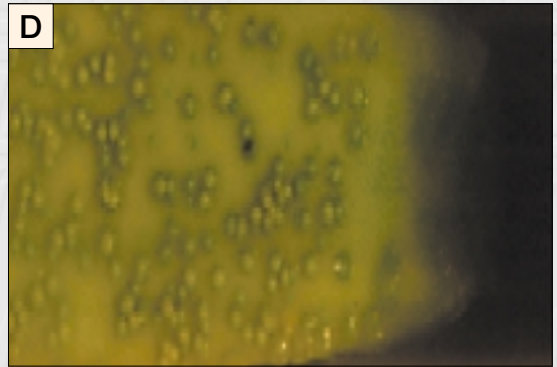
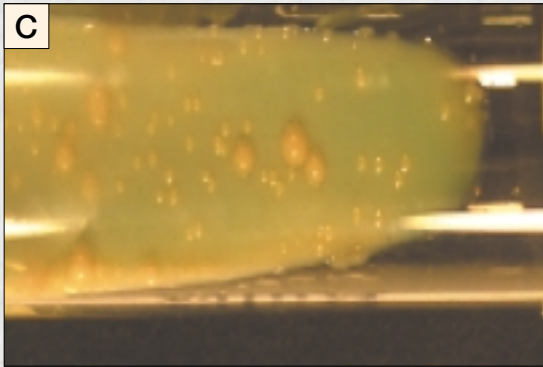
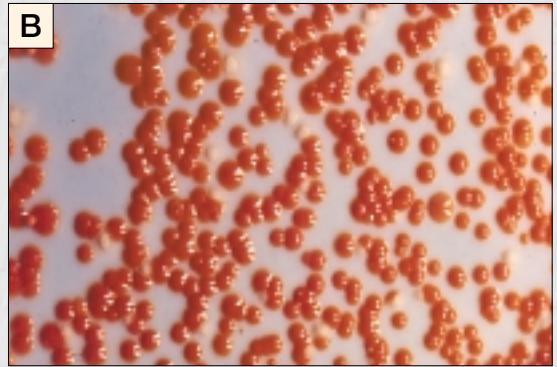
Sur milieu solide (Löwenstein Jensen) on notera le délai d'apparition des colonies, leur nombre, leur aspect rugueux ou lisse, la présence ou non d'une pigmentation. Les colonies de *M. tuberculosis*, comme celles du B.C.G., sont non pigmentées, elles sont rugueuses et apparaissent entre 2 et 6 semaines. Les colonies de *M. bovis* et *M. africanum* sont non pigmentées, petites, fines, et d'apparition tardive : 6 à 10 semaines, elles sont d'aspect lisse pour *M. bovis* et mat pour *M. africanum*. Dans le cas des mycobactéries atypiques l'aspect et la vitesse d'apparition des colonies varient en fonction des espèces (152).

Si plusieurs types de colonies (BAAR) sont observés, repiquer en séparation chaque type de colonie et faire l'identification sur chacune des subcultures.

2° Sur milieux liquides

On aura noté le délai d'apparition de la positivité. L'observation des milieux solides ensemencés peut donner des indications : présence ou absence de culture. Cette seconde éventualité est la plus fréquente car la pousse des mycobactéries sur milieu solide est souvent plus lente qu'en milieu liquide.

III - A l'issue de cette première phase, on dispose des éléments suivants. Il s'agit en effet de bacilles acido-alcoolo-résistants présentant des groupements torsadés évoquant des cordes. Il n'est pas observé de contaminants ni sur la lame ni sur le tube. La culture en milieu solide permet d'observer des colonies d'aspect rugueux, en chou fleur, de couleur ivoire, apparues en 20 jours environ sur milieux à l'œuf. Ces constatations corrélées à la présence de BAAR sur les frottis examinés et à l'existence de signes cliniques évocateurs constituent un faisceau d'arguments qui vont dans le sens du diagnostic de tuberculose. Dans plus de 90 % des cas, *M. tuberculosis* est en cause. La souche va être identifiée de façon précise.



Aspect de quelques cultures

- A - Mycobactérie non pigmentée rugueuse (BCG).
- B - Mélange mycobactérien. Colonies lisses pigmentées scotochromogènes (*M. goodii*).
- C - Colonies lisses de *M. avium*.
- D - *M. fortuitum* : certaines souches, en vieillissant, ont tendance à concentrer le vert malachite.



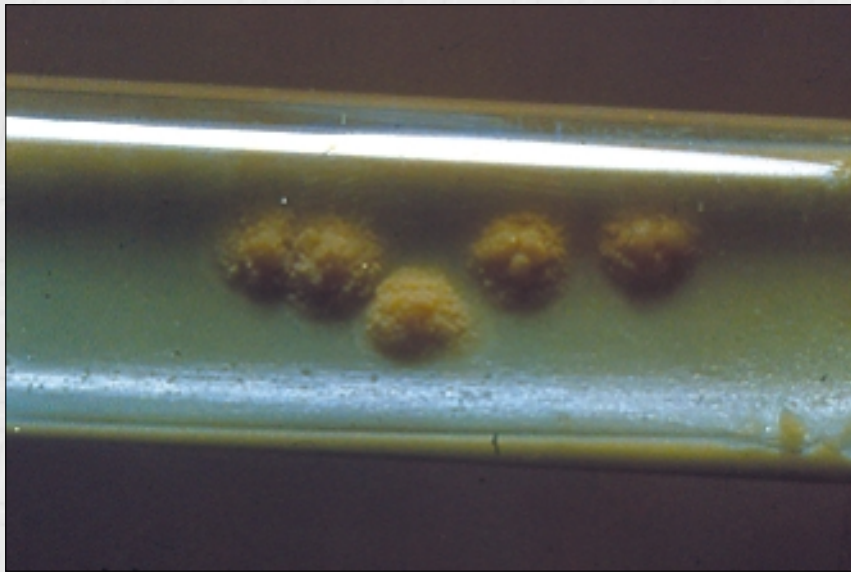
B - Identification d'une mycobactérie tuberculeuse

La distinction entre les mycobactéries du complexe *tuberculosis* et les mycobactéries atypiques est essentielle. Autrefois, elle était basée sur les caractères phénotypiques décrits dans le tableau (IV 1). Actuellement, les techniques de biologie moléculaire plus rapides sont effectuées en priorité.

I – Identification du complexe *tuberculosis*

1° Hybridation moléculaire

Les tests d'identification par hybridation avec les sondes moléculaires sont basés sur la capacité que possèdent des brins complémentaires d'acides nucléiques de s'apparier de manière spécifique pour former des complexes bicaténaires stables. Actuellement, trois types de sondes sont disponibles Accuprobe, Innolipa Mycobacteria, genotype Mycobacterium MTBC. Pour des raisons pratiques et économiques, l'utilisation de la sonde Accuprobe est recommandée. Il s'agit d'une sonde d'ADN conjuguée à un marqueur chimioluminescent, complémentaire de l'ARN ribosomal (ARNr). La sonde d'ADN marquée forme avec l'ARN ribosomal libéré un hybride ARN/ADN stable. Le réactif de sélection est une enzyme nucléasique capable d'hydrolyser les monobrans d'ADN non hybridés, il ne laissera subsister que les hybrides bicaténaires. Le signal lumineux émis par les hybrides est mesuré par un luminomètre. Un résultat est positif lorsque la valeur obtenue est supérieure ou égale à une valeur seuil. Une valeur inférieure fait considérer le test comme négatif. Ce test ne différencie pas les espèces du complexe *tuberculosis* entre elles. L'utilisation des sondes a amené un progrès considérable dans les possibilités d'identification des mycobactéries. Cette méthode allie une très bonne sensibilité à une très bonne spécificité. Elle s'effectue en deux heures et permet de poser précocément le diagnostic. Sa réalisation est facile, son coût tout à fait acceptable. Les sondes permettent d'identifier les mycobactéries qui ont poussé sur milieu solide 7H₁₀ ou Löwenstein Jensen ou autre, ou qui ont poussé en milieu liquide à la condition que la croissance ait atteint un niveau suffisant. Actuellement, l'utilisation des sondes permet d'établir rapidement, presque de façon contemporaine à l'observation d'une culture positive, que la souche isolée appartient au complexe *tuberculosis*, donc qu'elle possède un potentiel pathogène très probable. La réponse peut être rapidement rendue et le traitement mis en œuvre.



Mycobacterium tuberculosis. Culture de 4 semaines sur milieu de Löwenstein Jensen.

2° Utilisation de la PCR

Bien que ce ne soit pas son indication, on peut rapporter une mycobactérie au complexe *tuberculosis* sur la base d'une PCR positive pour IS 6110.

II - Individualisation des espèces au sein du complexe *tuberculosis*

Pour des raisons épidémiologiques et de bonne utilisation des antibiotiques, la distinction des différentes espèces du complexe *tuberculosis* est nécessaire.

1° Méthode phénotypique

L'individualisation des espèces du complexe *tuberculeux* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, BCG), peut s'effectuer par les techniques traditionnelles. Seront pris en compte : des caractères culturels, délai d'apparition des colonies, aspect Rough ou Smooth, des caractères biochimiques : niacine test, réduction des nitrates, de la sensibilité à l'hydrazide de l'acide thiophène-2-carboxylique 2 mg/L (T.C.H.), à la cyclosérine 30 mg/L ou au pyrazinamide 200 mg/L (P.Z.A.). La réalisation de ces tests (Cf. annexe technique) nécessite des cultures riches et ne pourra donc être effectuée qu'après plusieurs jours voire plusieurs semaines. Ces tests doivent être contrôlés par des témoins positifs et négatifs réalisés avec des souches de référence. L'interprétation se fera selon les résultats figurant sur le tableau (IV 1).

Tableau n° IV 1 : Caractères permettant de différencier les espèces du complexe *tuberculosis*.

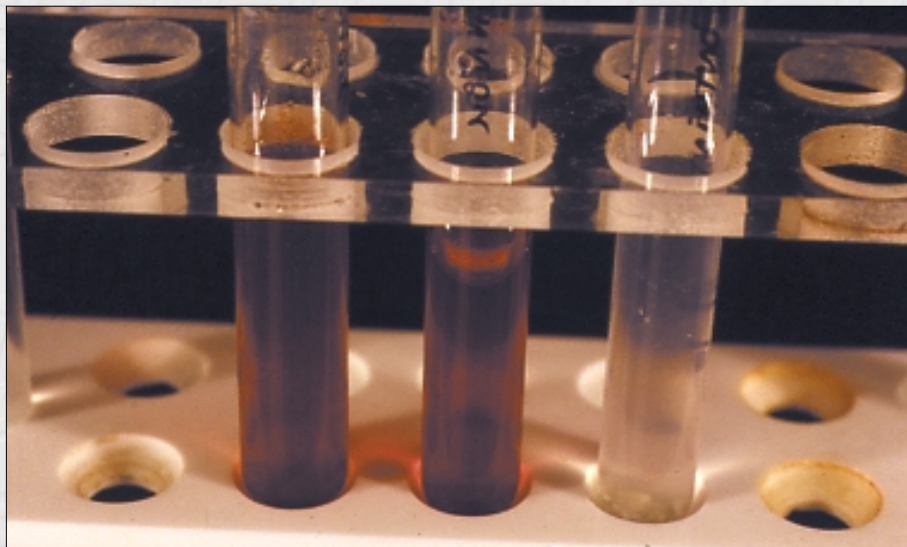
	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. africanum</i>	BCG	<i>M. atypique</i>
Aspect Colonies	Rough	Smooth	Rough	Rough	Rough/Smooth
Pigmentation	Non pigmenté	Non pigmenté	Non pigmenté	Non pigmenté	+/- pigmenté
Délais culture	10 à 20 jours	30 à 60 jours	30 à 60 jours	10 à 20 jours	4 à 30 jours ou plus
Niacin test	Positive	Négative	Négative *	Négative	Négative
Nitrates reductase	Positive	Négative	Négative * ou positive	Négative	Positive/ Négative
TCH	R	S	S*	S	R/S
PZA	S	R	S	R	
Cyclosérine	S	S	S	R	

R : résistant / S : sensible.

**En fonction du type Dakar, Yaoundé ou Rwanda ces deux caractères peuvent varier de positif à négatif.*



Niacin test. Test de Konno
Tube de droite positif. Coloration jaune.



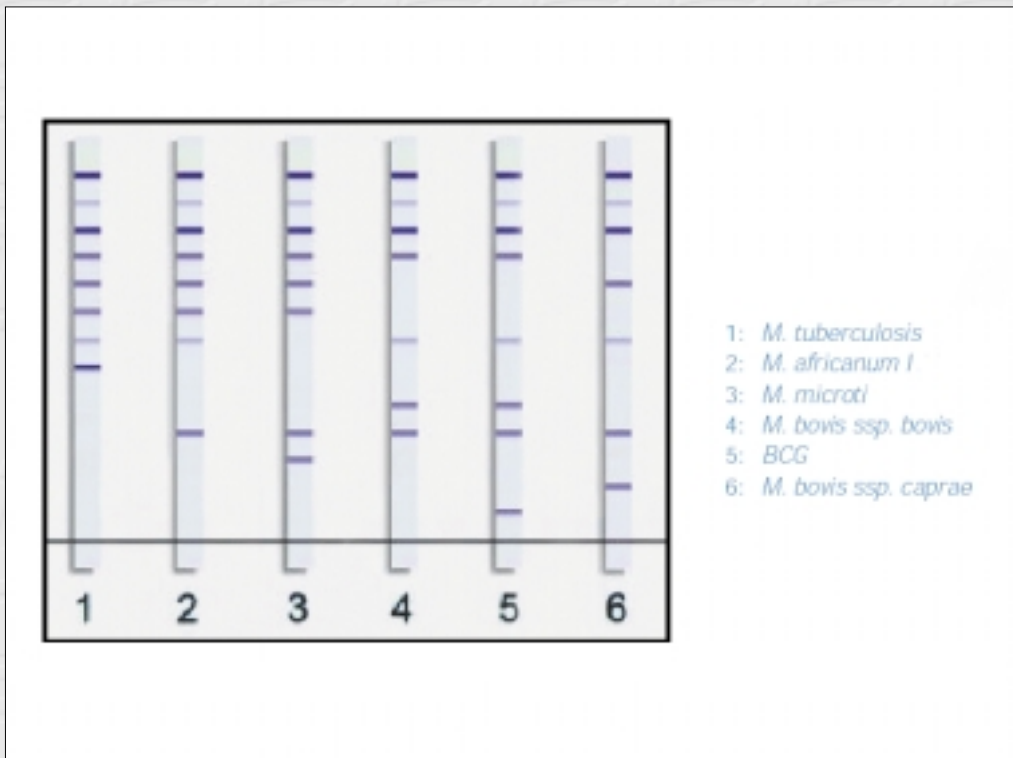
Réaction de Virtanen : Réduction du nitrate en nitrite. La positivité se manifeste par l'apparition d'une coloration rouge lie de vin.

2° Méthode géotypique

Les méthodes phénotypiques permettent de différencier les espèces mais elles sont lentes et un certain nombre de variants échappent à la classification car ils ne présentent pas tous les caractères de l'espèce type. C'est ainsi que les variants asiatiques de *M. tuberculosis* sont sensibles au TCH que les deux variants géographiques de *M. africanum* possèdent ou non une nitrate réductase (variant I Afrique de l'Ouest : Nitrate-, variant II Afrique de l'Est : Nitrate+) que 5 % des souches de *M. bovis* sont sensibles au pyrazinamide et jusqu'à présent les tests géotypiques ne permettaient pas la différenciation des espèces car les séquences étudiées (gène ARN 16 S, du spacer 16S 23S rDNA ou du gène *hsp65*) présentent une complète similitude et ne peuvent être distinguées.

Récemment, les progrès de la biologie moléculaire et l'accumulation des connaissances concernant le génome de *M. tuberculosis* ont permis la mise au point de méthodes qui permettent le démantèlement du complexe *tuberculosis* en ses différentes espèces. L'utilisation du spoligotyping, la mise en évidence de la séquence *mtp 40* chez *M. tuberculosis* et *M. africanum*, l'existence de mutations ponctuelles dans les gènes *oxy R* et *pnc A* spécifique de *M. bovis* ont permis de réaliser une première grille d'identification (126). Découlant directement du séquençage du génome de *M. tuberculosis* H37RV (38) et de la comparaison des génomes des différentes espèces du complexe, 16 régions de différence (RD) délétées variablement pour les différentes espèces ont été identifiées (132). Parmi ces régions, six sont intéressantes après amplification. Leur présence ou leur absence corrélées à l'étude de la sensibilité ou de la résistance à la pyrazinamide permet d'identifier les espèces.

En 2002, (147), la firme Biocentric a mis au point un kit Genotype Mycobacterium/MTBC qui permet de démanteler le complexe *tuberculosis* en ses différentes espèces. Une PCR multiplex permet d'amplifier plusieurs fragments du gène *gyr B*. Un des fragments de 215 pb sert de contrôle du *Mycobacterium*, deux autres fragments de 152 pb et de 203 pb permettent de différencier les espèces du complexe *tuberculosis*. Les amplicons sont marqués à la biotine et sont mis en contact de sondes spécifiques complémentaires fixées sur une bandelette. L'hybridation est révélée par le complexe streptavidine phosphatase alcaline. Cette méthode en fonction de l'emplacement des bandes, permet d'identifier les espèces du complexe *tuberculosis* à l'exception de *M. africanum* type II qui ne peut être différencié de *M. tuberculosis*.



Génotype MTBC. Différenciation des différentes espèces du Complexe tuberculosis.

(Photo aimablement fournie par Hain Life Science).

C - Identification des mycobactéries non tuberculeuses

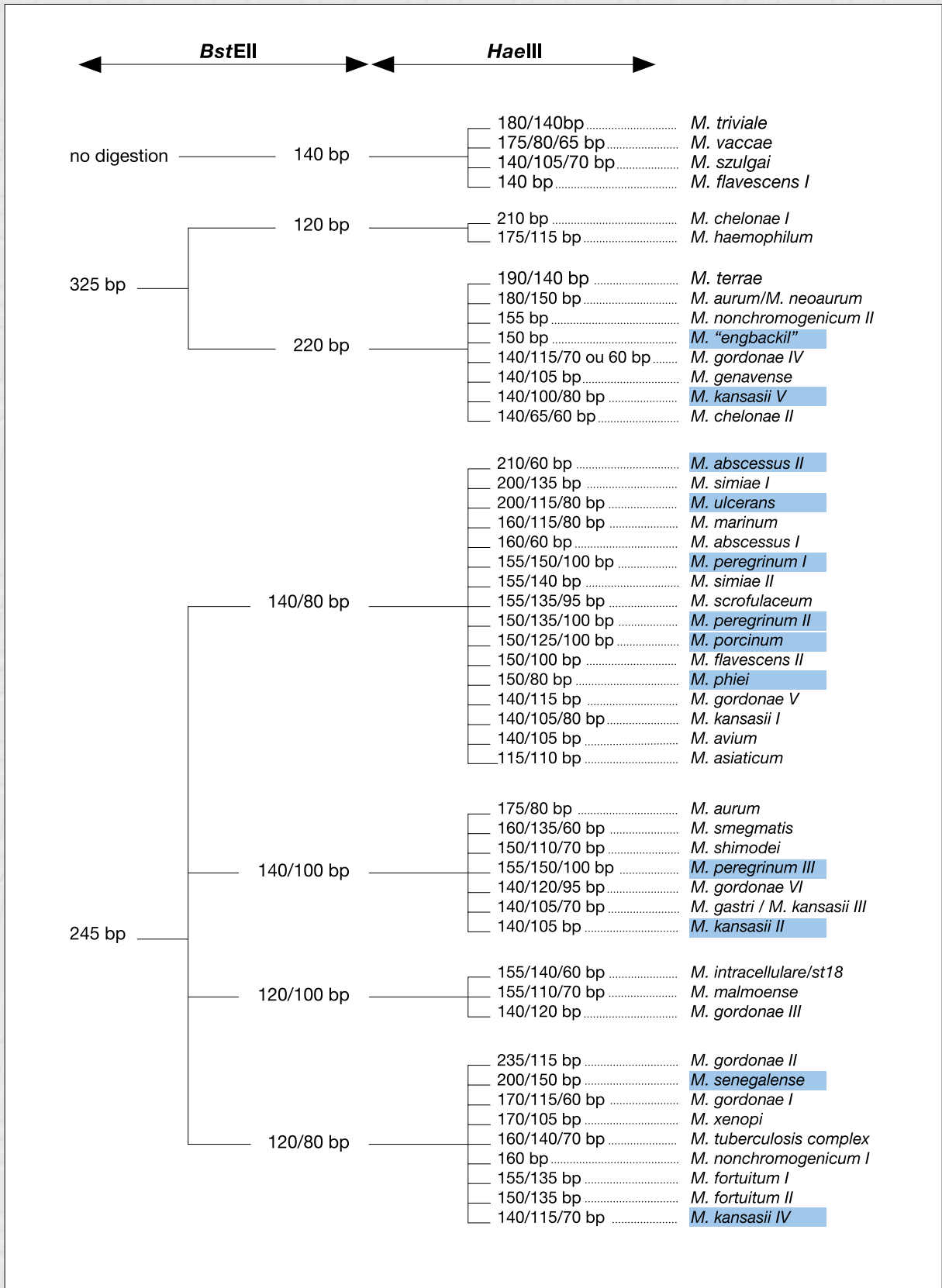
I – Méthodes génotypiques

1° Avec kits commercialisés

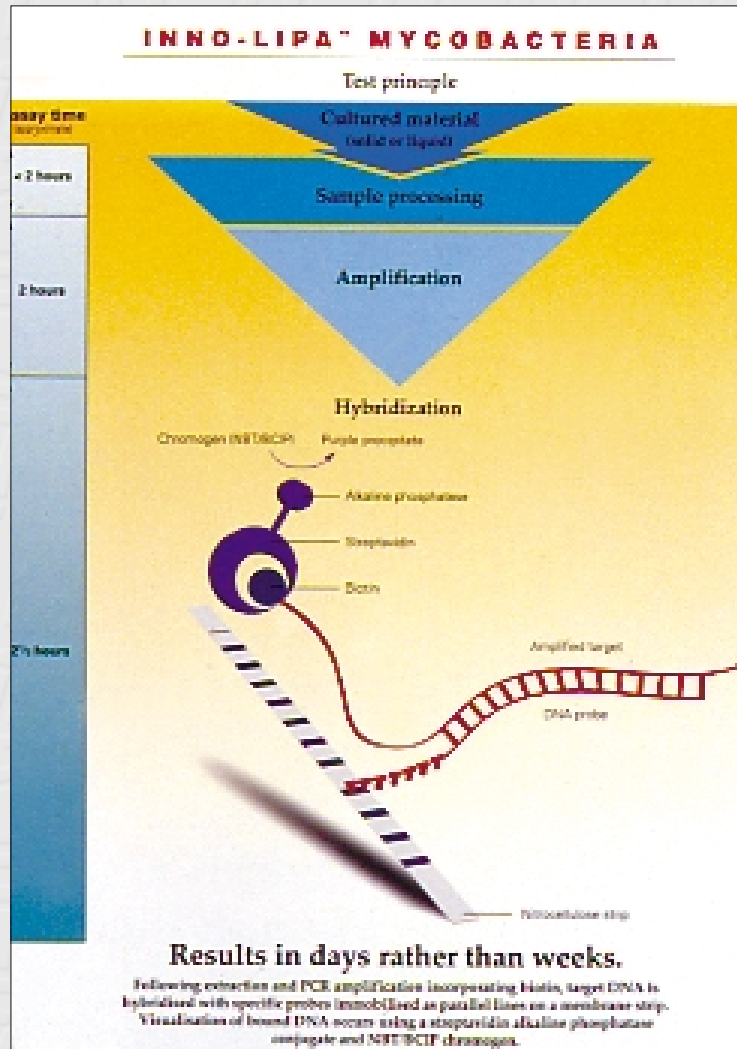
- Depuis quelques 10 ans, il est possible d'identifier une souche avec une très bonne spécificité par hybridation avec des sondes nucléiques. L'utilisation des sondes (Gen Probe) complexes *avium*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. goodii*, *M. kansasii* permettent d'identifier les souches de mycobactéries atypiques les plus fréquemment rencontrées en pathologie humaine.
- La méthode d'identification Innolipa Mycobacteria (Innogenetics) et GenoType Mycobacterium (Biocentric) sont dérivées de l'utilisation de l'hybridation moléculaire. Après amplification par PCR de la région 16S à 23S rRNA et marquage des amplicons à la biotine, ces amplicons sont hybridés à des sondes spécifiques placées en lignes parallèles sur une bandelette de nitrocellulose. Après hybridation élimination des produits non fixés, la révélation des amplicons fixés se fait par l'addition de streptavidine phosphatase alcaline qui colore en violet les zones de fixation. Ce sont des méthodes fiables (111) (121) qui permettent l'identification d'une vingtaine d'espèces différentes et qui contiennent un contrôle du genre *Mycobacterium*. Le résultat peut être obtenu en une journée mais nécessite l'utilisation d'un matériel plus complexe que dans le cas d'Accuprobe.

2° Méthodes non commercialisées

- La méthode Pra (PCR Restriction Enzyme Analysis) (54) (170) est une technique qui, dans un premier temps, met en œuvre l'amplification des gènes codant pour la protéine 65 kD (heat shock protein). Il s'agit d'un gène bien conservé au cours de l'évolution qui contient des séquences communes au genre *Mycobacterium* mais aussi des séquences spécifiques d'espèce. La PCR utilise des primers communs à l'ensemble des mycobactéries. Les amplicons obtenus sont dans une seconde étape soumis à une double digestion enzymatique, d'abord par *BstE II* puis par *Hae III*. Des fragments de taille variée sont obtenus à partir des différentes espèces. Après migration électrophorétique des différents fragments obtenus, on peut établir un algorithme et différencier, au niveau de l'espèce, les mycobactéries qui sont les plus significatives en pathologie humaine et animale. La détermination de la taille des fragments obtenus après digestion se fait par comparaison avec une échelle réalisée avec des standards, de poids moléculaire connu. Cette méthode permet d'obtenir des résultats en 24 heures. La méthode PRA permet de différencier différentes sous espèces dans le complexe *fortuitum* et également dans le complexe *avium*. Quoi qu'il en soit, la méthode PRA donne des résultats comparables à ceux obtenus par le séquençage du ARN 16 S. Ils sont obtenus beaucoup plus facilement par la méthode PRA mais l'interprétation est plus difficile.
- Les séquençages de l'ARN 16 S, *Its*, *hsp65*, *rpoβ* sont possibles mais en dehors du séquençage de l'ARN 16 S les banques de données des séquences référencées restent incomplètes. La mise en œuvre de cette technique nécessite l'utilisation d'un appareillage lourd.

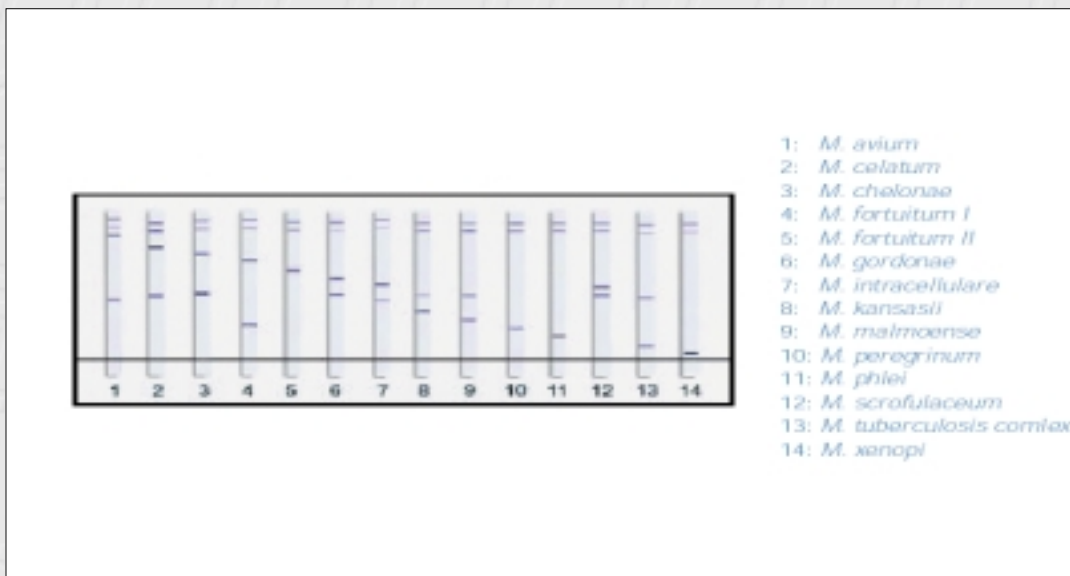


Algorithme d'identification des principales mycobactéries par la méthode PRA selon Talenti.



Principe du test innolipa

Après amplification, les amplicons marqués à la phosphatase alcaline hybrident avec les sondes disposées sur la membrane. Là où se produit l'hybridation apparaît une bande colorée.



Génotype Mycobacterium : identification à partir de cultures de 13 espèces différentes de mycobactéries.

(photo aimablement fournie par Hain Life Science)

II - Méthodes phénotypiques

La classification de Runyon répartit les mycobactéries atypiques en 4 groupes en fonction de la vitesse de leur croissance et de la pigmentation de leurs colonies (figure IV2). La mise en évidence de ces caractères constitue le point de départ de l'identification qui sera complétée, pour l'identification des espèces au sein des 4 groupes, par la mise en évidence de caractères biochimiques et de sensibilité aux antibiotiques (tableaux IV2, IV3, IV4, IV5). Les techniques sont laborieuses et d'interprétation délicate. Elles ne permettent pas toujours de différencier des espèces phénotypiquement proches. Suivant la vitesse de croissance des souches, les épreuves d'identification peuvent nécessiter plusieurs semaines. Aussi ces techniques seront-elles avantageusement remplacées chaque fois que ce sera possible par les méthodes de biologie moléculaire.

Tableau IV 2 : Identification des principales espèces de mycobactéries appartenant au Groupe I de Runyon (photochromogène).

Espèces	Aryl sulfatase	Morphologie	Vitesse / Lj	Aspect / Lj	LJ 30°C	LJ 37°C	LJ 42°C	LJ Tb1 10mg/l	Nitrate réd.	Hyd tween (10 j)	Uréase	Niacin test	P.A.
<i>kansasii</i>	-	bacilles trapus en échelle	14 j	E, R ou S	+	+	-	-	+	+	+	-	+
<i>marinum</i>	+	bacilles trapus	3 à 5 j	E, S	++	-	-	+	-	+	+	-	+
<i>asiaticum*</i>	V	courts	21 j	d, S	+	+	-	-	-	+	-	-	-
<i>simiae*</i>	-	courts	21 j	d, S	+	+	-	+	-	-	+	+a	-

P.A. : Phosphatase Acide

LJ : Löwenstein-Jensen

a : > 50 % mais < 80 % souches

S : lisse

+

E : Eugonique

- : ≤ 15 % des souches

* : faiblement photochromogène

R : Rugueux

V : variable

Tableau IV 3 : Identification des principales espèces de mycobactéries appartenant au Groupe II de Runyon (scotochromogène).

Espèces	morpho-logie	vitesse / LJ	aspect / LJ	GO	LJ 42°C	LJ 30°C	LJ Tb1 10mg/l	LJ CS 30mg/l	Nitrate réd.	Pase acide	Hyd tween (10 j)	Uréase	Niacin 37°	Aryl sulfatase
<i>gordonae</i>	id.BK	14 j	E, S	-	-	+	+	-	-	V	+	V	+	-
<i>szulgai*</i>	id. BK	14 j	E, S	-	-	+	+	+	+	+	V	+	+	+
<i>flavescens</i>	courts	7 j	E, R	±	±	+	+	-	+	-	+	+	+	+
<i>scrofulaceum</i>	courts	≥ 28 j	S	-	-	+	-	-	-	-	-	V	+	-

+

- : ≤ 15 % des souches

R : Rugueux

S : lisse

d : dysgonique

E : Eugonique

LJ : Löwenstein-Jensen

V : Variable

* : photochromogène à 22° CC

Tableau IV 4 : Identification des principales espèces de mycobactéries appartenant au Groupe III de Runyon.

Espèces de mycobactérie	Complexe <i>terrae</i>	<i>gastri</i>	<i>xenopi</i>	<i>malmoëense</i>	<i>shimoïdei</i>	<i>avium</i>	<i>haemophilum</i>	<i>ulcerans</i>
morphologie	id. BK	gros bacilles zébrés	longs et fins	courts	courts	courts	courts	id. BK ("globi" dans lésions)
aspect /LJ	E, R ou S	E, R ou S	d, S	d, S	d, R	d,S dissociation ±	d, S ou R	d, R
pigment	-	-	+ (scoto.)	-	-	- (±)	-	-
vitesse de croissance /LJ	14 j	14 j	≥28 j (37° C)	≥21 j	≥21 j	≥21 j	≥21 j	≥42 j
LJ 30°C	+	+	±	+	+	+	+ (CFA 15mg/l)	+
LJ 37°C	+	+	+	+	+	+	-	-
LJ 42°C	V	-	+	-	+	V	-	-
LJ Tb1 (10mg/l)	V	S	V	R	R	V	-	-
nitrate réductase	V	-	-	-	-	-	-	-
catalase à 22°	+++	+	±	+		+	-	-
catalase à 68°	+	-	±	-		V	-	-
uréase	-	V	-	V	-	-	-	-
hyd tween 80	+ (1-3 j)	+(1-3 j)	-	+ (10 j)	+ (10 j)	-	-	-
phosphatase acide	+		-	-		-	-	-
Aryl sulfatase	V	-	+	-		-	-	-

Le complexe *terrae* inclut *M. terrae*, *M. non chromogenicum* et *M. triviale*.

+ : ≥ 85 % des souches

- : ≤ 15 % des souches

R : rugueux

S : lisse

d : dysgonique

E : eugonique

LJ : Löwenstein-Jensen

V : variable

CFA : Löwenstein-Jensen enrichi avec du citrate de fer ammoniacal à 20 mg/l.

Tableau IV 5 : Identification des différentes espèces appartenant au Groupe IV de Runyon (croissance rapide 3 à 7 j sur gélose ordinaire).

Espèces de mycobactérie	Pigment	Nitrate réductase	42°C	CFA transf.	Aryl sulfatase	L.J. C.S. 30 mg/l	Phosph. Acide
<i>groupe fortuitum</i>	0	+	+	+	+	+	+
<i>groupe chelonae</i>	0	-	-	-	+	+	+
<i>M. smegmatis</i>	0*	+	V	+	-	-	-
Complexe vaccae**	+ (jaune)	V	-	+	-	V	-

*pigmentation tardive.

***M. aurum*, *M. neoaurum*, *M. parafortuitum*, ainsi que *M. thermoresistible* et *M. phlei* qui se développent à 52°C, le premier est β galactosidase +, le second est β galactosidase -.

Le groupe *fortuitum* inclut *M. fortuitum* et *M. peregrinum*.

Le groupe *chelonae* inclut *M. chelonae*, *M. abscessus* et MCL0 (*M. chelonae* like organism) également appelé *M. mucogenicum*.



Figure IV 1 : Arbre décisionnel pour l'identification des mycobactéries du complexe *tuberculosis*.

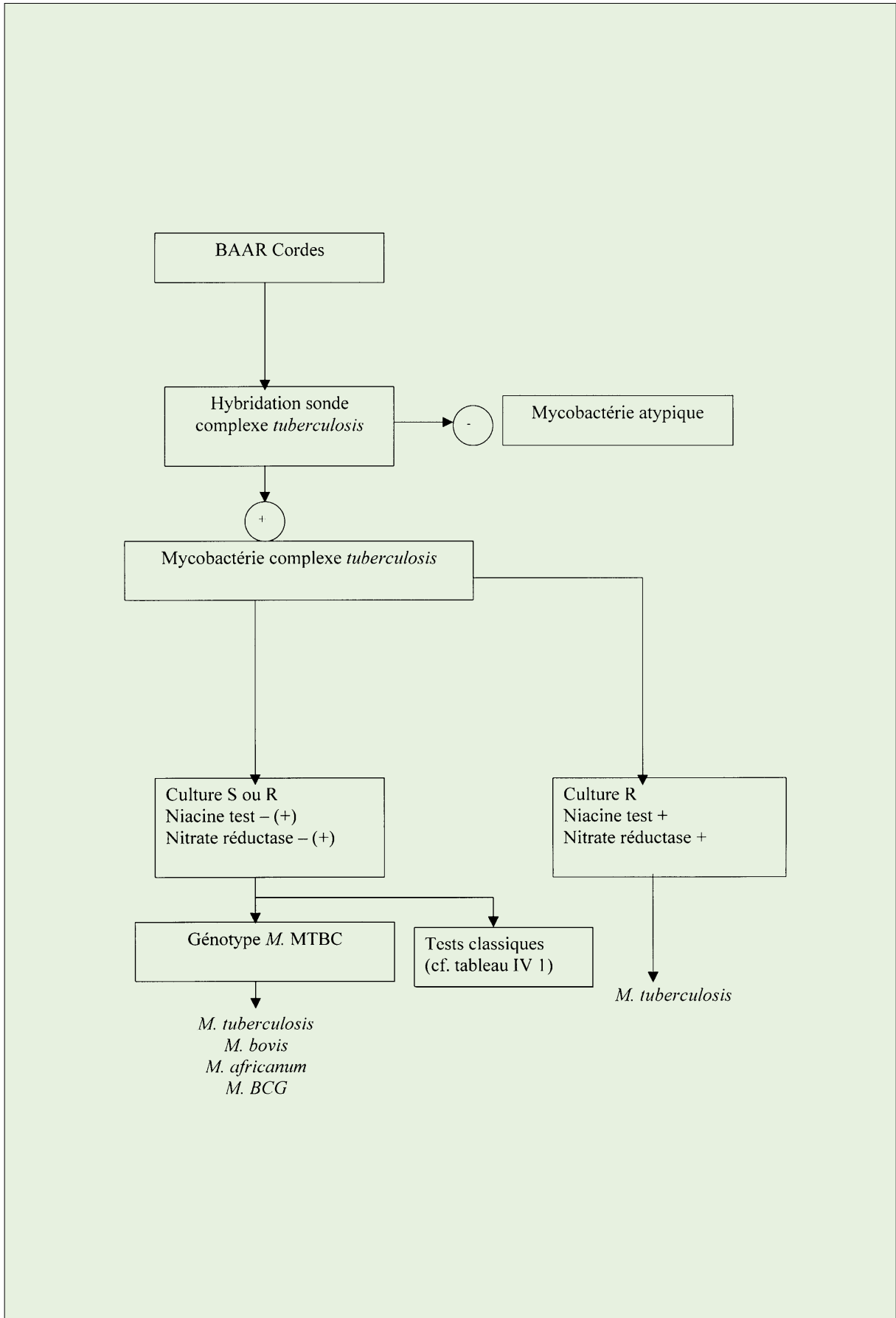


Fig. IV 2 : Principales mycobactéries non tuberculeuses isolées chez l'homme (Runyon).

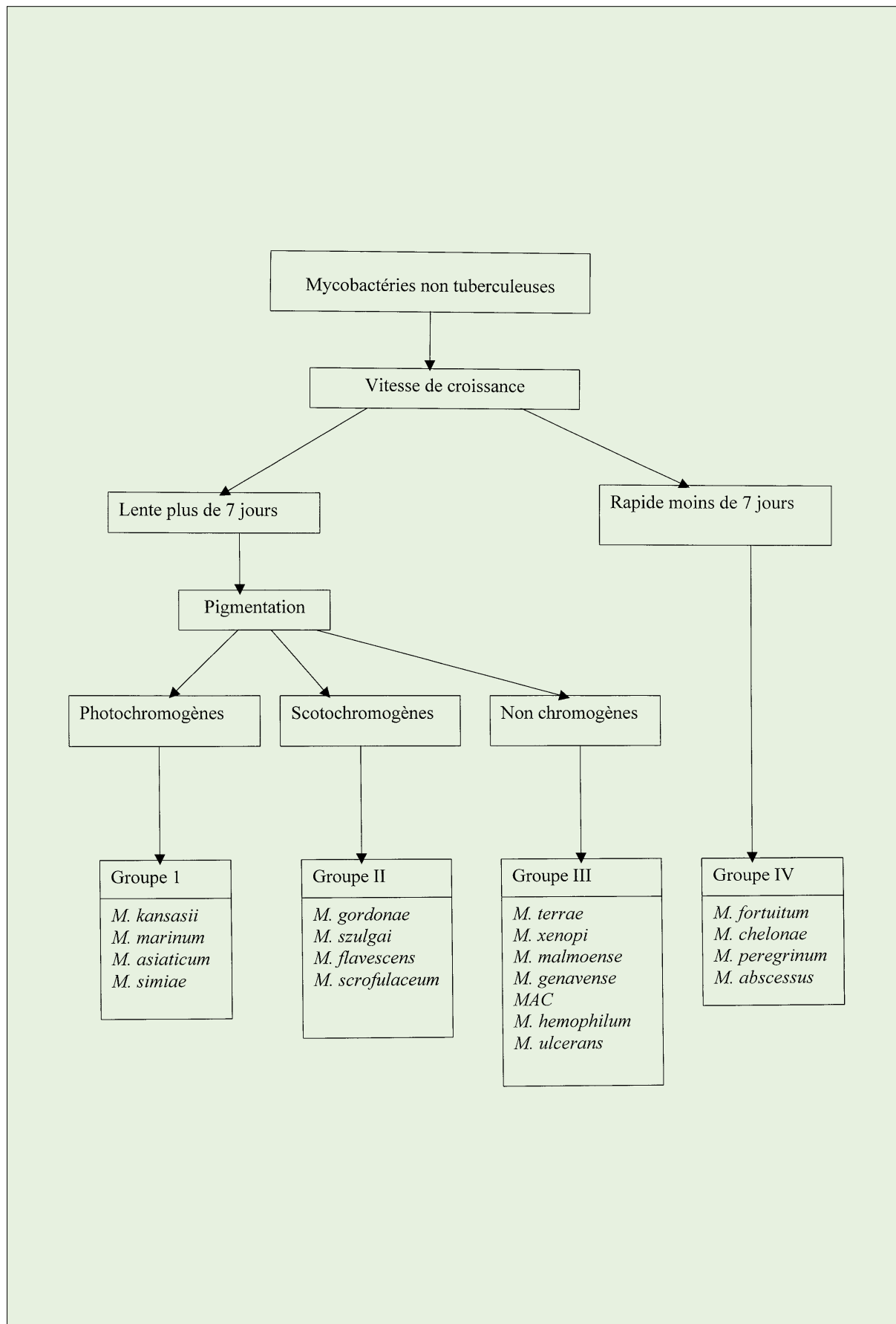
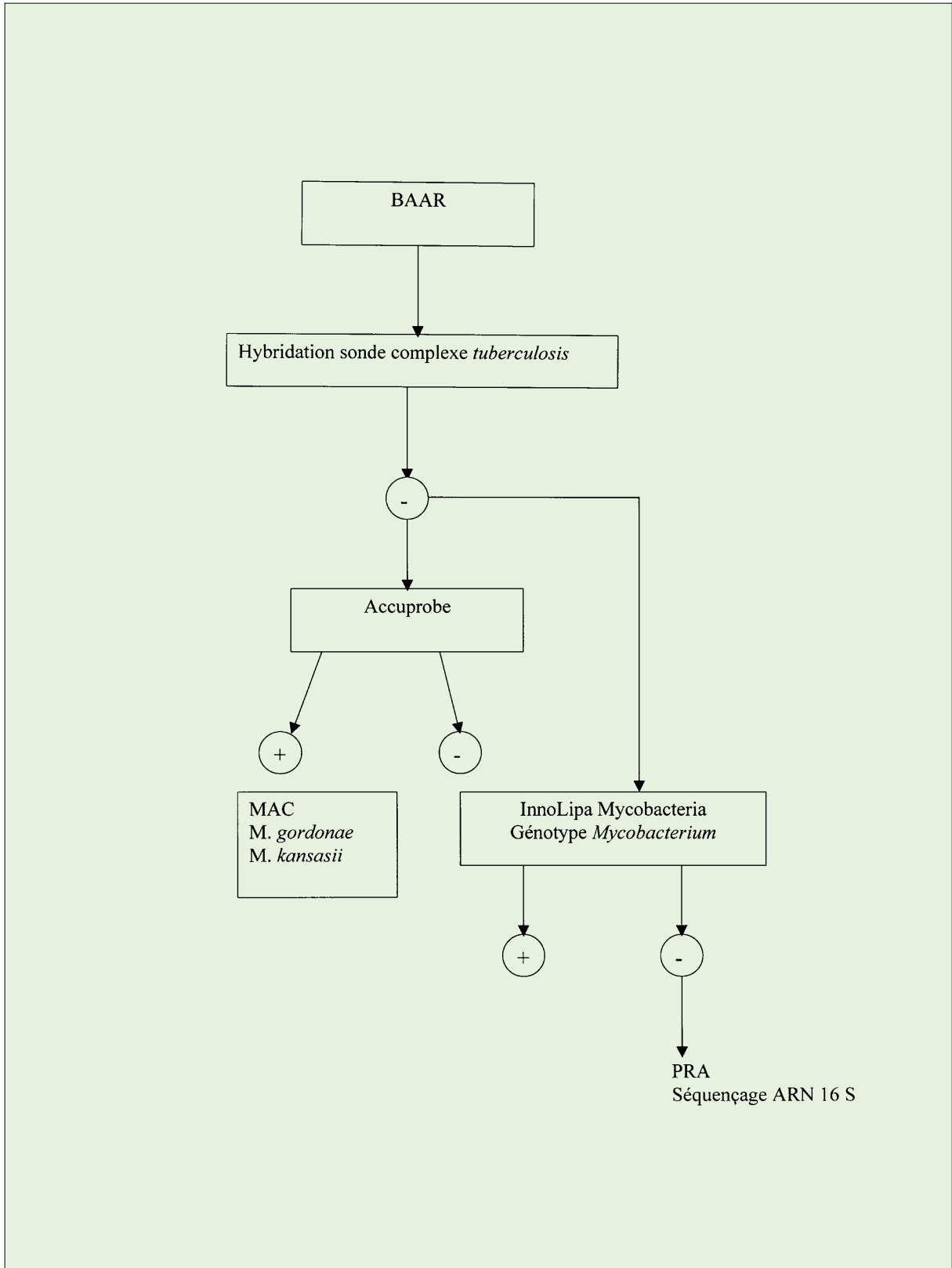


Figure IV 3 : Arbre décisionnel d'identification d'une mycobactérie atypique.



Selon l'origine du prélèvement, le contexte clinique, la morphologie des bacilles, l'aspect des colonies, l'identification se fera, soit par les sondes accuprobe, soit par les bandelettes multisondes.

Mycobactéries autres que tuberculeuses susceptibles de manifester un pouvoir pathogène

A la fin du XIX^{ème} siècle et pendant toute la première moitié du XX^{ème}, la tuberculose représentait un tel problème de santé publique qu'après la mise en évidence de "tuberkelbazillus", toutes les recherches se sont focalisées sur ce bacille et sur la tuberculose. Étaient reléguées au rang de simples saprophytes, les bactéries acido-résistantes ne présentant pas les caractéristiques de *M. tuberculosis* et qui étaient observées dans l'environnement ou dans des prélèvements d'origine humaine ou animale. Elles étaient considérées comme des bactéries sans importance. Ce n'est qu'à partir des années 1950 que des publications de plus en plus nombreuses ont attiré l'attention sur la responsabilité indiscutable de mycobactéries différentes du bacille de la tuberculose dans le déroulement d'un certain nombre de processus pathologiques. Avec les travaux de Runyon, Gordon, Wayne, Kubica, Shaeffer, Stanford et d'autres, un chapitre important de la bactériologie prenait corps, une entité nosologique nouvelle s'ouvrait, celle des mycobactérioses. Elle devait voir son importance s'amplifier en proportion du nombre des immunodéprimés. Parallèlement, l'exploration de l'environnement permettait de retrouver ces mycobactéries dans des niches écologiques nouvelles, de mieux comprendre leur comportement et d'en déduire, le cas échéant, des mesures de prévention. Par contre, leur dénomination reste à trouver car aucune ne donne entière satisfaction. Mycobactéries paratuberculeuses, mycobactéries atypiques, mycobactéries anonymes, mycobactéries opportunistes, mycobactéries pseudo-tuberculeuses, mycobactéries tuberculoïdes, mycobactéries non tuberculeuses (MNT), mycobactéries autres que tuberculeuses... Ces dernières dénominations établissent une différenciation entre les mycobactéries appartenant au complexe *tuberculosis* et les autres mycobactéries. *M. leprae* responsable d'une maladie tout à fait particulière ne sera pas pris en considération.

A - Généralités

I - Microbiologie

En pratique, la démarche diagnostique se déroule de la façon suivante.

A partir du prélèvement, l'examen microscopique permet, le cas échéant, d'observer ou non des Bacilles Acido-Alcool-Résistants (B.A.A.R.) mais comme nous l'avons vu précédemment il n'est pas possible en se basant sur le seul examen microscopique de différencier les mycobactéries tuberculeuses des mycobactéries non tuberculeuses. C'est l'aspect des cultures qui sera le premier élément d'orientation vers une mycobactérie atypique. L'identification des espèces est faite selon les techniques décrites plus haut (fig IV 2 et IV 3).

L'utilisation d'amplifications spécifiques pour identifier une souche ne peut s'envisager que si l'on a a priori une idée très précise de la bactérie que l'on recherche. Par exemple, l'utilisation de la PCR spécifique de *M. ulcerans* sur la biopsie cutanée d'un ulcère permet à la fois le diagnostic et l'identification.

Le recours aux méthodes d'identification classiques est devenu moins fréquent, il utilise à partir des caractéristiques de la culture en milieu solide la classification de Runyon qui est simple mais repose sur des caractères contingents.

Elle répartit les mycobactéries non tuberculeuses en 4 groupes suivant la vitesse de croissance et les caractéristiques de la pigmentation des colonies. Si la MNT pousse en plus de 7 jours, elle est dite à croissance lente groupes 1-2-3, si au contraire elle pousse en moins de 7 jours, elle est considérée comme étant à croissance rapide groupe 4.

Si les colonies sont pigmentées après exposition à la lumière (épreuve de photo-induction), elles sont photochromogènes ; elles constituent le groupe 1. Si la pigmentation des colonies apparaît à l'obscurité, sans qu'il soit nécessaire de les exposer à la lumière, elles sont scotochromogènes, c'est le cas des mycobactéries du groupe 2. Les mycobactéries non tuberculeuses à croissance lente et non pigmentées constituent le groupe 3. L'identification des espèces au sein des différents groupes se fait par des tests biochimiques (tableaux IV 2-IV 3-IV 4-IV 5).

II - Pouvoir pathogène

Les MNT sont des germes de l'environnement qui peuvent à ce titre contaminer les prélèvements. Elles peuvent aussi coloniser un hôte sans envahir les tissus, et peuvent enfin causer d'authentiques infections pulmonaires, lymphatiques, cutanées chez l'immunocompétent et être à l'origine d'infections variées et disséminées chez les immunodéprimés. Lors de l'isolement d'une MNT d'un prélèvement, une interprétation critique du résultat doit intervenir, elle confrontera les données cliniques et radiologiques aux données microbiologiques.

Les MNT pénètrent dans l'organisme par la voie respiratoire, par la voie digestive ou par inoculation directe dans la peau et le tissu sous cutané. Il n'a pas été signalé de transmission de personne à personne. Lors de l'invasion tissulaire par une MNT, la réponse de l'organisme est une réponse de type cellulaire qui aboutit à la constitution de granulomes. Ceux-ci sont en tous points comparables au granulome provoqué par *M. tuberculosis*. L'examen anatomo-pathologique ne permet pas à lui seul de différencier une infection à *M. tuberculosis* d'une infection provoquée par une MNT.

1° En matière d'infection pulmonaire provoquée par les MNT il n'existe pas de tableau clinique ou radiologique stéréotypé. Les infections sont habituellement indolores, chroniques et souvent masquées, chez l'immunocompétent, par la maladie sous-jacente sur laquelle elles surviennent, ce qui retarde souvent leur diagnostic.

Plusieurs tableaux cliniques peuvent être identifiés (160). Le plus habituel est celui qui survient chez des hommes d'un certain âge ayant une maladie pulmonaire pré-existante : BPCO, pneumopathie interstitielle chronique, tuberculose ancienne, bronchectasie, souvent fumeurs et alcooliques. Les signes cliniques habituellement rencontrés sont la toux, la perte de poids, la fatigue, la fièvre et les hémoptysies dans 1/3 des cas. Radiologiquement sont observées des opacités nodulaires bilatérales apicales, des cavités peuvent se former. MAC, *M. kansasii* et *M. xenopi* sont les plus fréquents. Viennent ensuite le groupe *fortuitum*, le groupe *chelonae abcessus*, *M. szulgai*, *M. malmoense*, *M. simiae*.

Le second tableau représente 10 à 20 % des infections pulmonaires à MNT. Ce sont en général des femmes âgées qui ont une toux productive souvent attribuée à une bronchite chronique s'accompagnant de dyspnée abondamment traitée par les antibiotiques. Les lésions radiologiques multinodulaires avec des broncheectasies siègent au niveau du lobe moyen et de la lingula. La maladie progresse lentement sur des années. MAC est souvent en cause. Dans ce groupe, on trouve le syndrome de Lady Windermere où la pathogénèse serait due pour des raisons sociales à un refus de tousser (145). Dans les complications infectieuses de la mucoviscidose, les mycobactéries à croissance rapide des groupes *fortuitum* et *chelonae abscessus* sont parfois impliquées.

Les critères microbiologiques de pathogénicité d'une MNT retenus par l'American Thoracic Society figurent en annexe. Le texte original (190) inclut à la fois des critères cliniques, radiologiques et microbiologiques.

2° Les infections cutanées provoquées par les MNT ont pour étiologie essentielle deux mycobactéries dont le pouvoir pathogène est spécifique : *M. marinum*, responsable du granulome des piscines ; *M. ulcerans*, responsable de l'ulcère de Buruli. Les mycobactéries des groupes *fortuitum* et *chelonae abscessus* se comportent davantage comme des bactéries opportunistes.

3° Dans l'étiologie des adénites provoquées par les MNT, deux espèces arrivent largement en tête : MAC et *M. scrofulaceum*.

Plus rarement on trouve *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. haemophilum*.

4° Les infections moins fréquentes

a) Ténosynovites, ostéomyélites : *M. marinum*, *M. ulcerans*, groupe *fortuitum* groupe *chelonae abscessus*, MAC, *M. kansasii*.

b) Infection des cathéters : groupes *fortuitum* et *chelonae abscessus*, *M. kansasii*.

5° Chez l'immunodéprimé en dehors des malades atteints de SIDA, il s'agit des transplantés, des malades avec lymphome, leucémies, maladies sévères du collagène et malades sous thérapeutique immunosuppressive. Chez ces patients, les MNT les plus fréquemment rencontrées sont MAC, *M. kansasii*, *M. fortuitum chelonae*, *M. scrofulaceum*, *M. hemophilum*, *M. malmoense*. Chez les malades non sidéens, la dissémination est peu fréquente. Chez les séropositifs, pour le VIH, quand les CD₄ deviennent inférieurs à 100, les infections disséminées à MAC sont fréquentes justifiant, chez ces malades, la recherche d'une colonisation et la mise en œuvre d'une antibio-prévention. Plus rarement, il s'agira de *M. kansasii*, *M. xenopi* ou encore de *M. genavense*, *M. malmoense*, *M. hemophilum*, *M. simiae*, *M. fortuitum*...(60).

Depuis la mise en œuvre de la polychimiothérapie antivirale incluant les antiprotéases ces infections disséminées sont devenues rares.

III - Sensibilité aux antibiotiques et traitement

La résistance naturelle à de nombreux antibiotiques actifs sur les mycobactéries du complexe *tuberculosis* est une caractéristique générale des MNT. Elle est principalement due à l'importante hydrophobicité des structures de surface qui empêche la pénétration des molécules hydrophiles, ce qui a conduit à rechercher des formes hydrophobes actives dérivées de molécules existantes. C'est ainsi que la rifabutine montre une activité supérieure à celle de la rifampicine. Elle a également incité en combinant les modes d'action des antibiotiques à trouver des associations synergiques (ex : l'utilisation de l'éthambutol qui désorganise dans la paroi l'agencement des acides mycoliques potentialise l'activité d'autres molécules). La présence des mycobactéries dans les cellules a contribué à rechercher des antibiotiques qui se concentrent bien dans les tissus, c'est le cas de l'azithromycine.

Par ailleurs, un même malade séropositif peut être infecté simultanément avec plusieurs sérotypes. 38 % des malades australiens infectés par MAC le sont avec plus d'un sérovar (45). De plus, les MNT et en particulier MAC évoluent facilement vers la résistance sous traitement, on peut observer des résistances à la clarithromycine (117) à la rifampicine, aux quinolones... Enfin, la bio-adaptation des MNT leur permet d'élaborer en présence de l'antibiotique des substances : protéines, pigments, polysaccharides, qui sont capables d'une activité antagoniste vis à vis de l'antibiotique auquel elles sont exposées. Cette sécrétion cesse quand le médicament est retiré. Ces constatations peuvent apporter une explication au moins partielle aux divergences observées entre sensibilité *in vitro* et efficacité *in vivo*.

IV - Ecologie des MNT

Il existe entre *M. tuberculosis* et les MNT des différences fondamentales. *M. tuberculosis* est responsable d'une maladie humaine spécifique bien définie. L'homme en est le seul réservoir de germes et, on peut penser que des mesures de prévention efficaces, le dépistage des malades et leur traitement devrait permettre, à terme, d'éliminer la tuberculose comme on l'envisage pour la lèpre. Par contre, les MNT qui colonisent une grande variété de niches écologiques ont pu être dépistées dans le sol, les poussières et surtout dans l'eau. Les animaux et l'homme, se contaminent à partir de cet environnement. Les sujets contaminés dont les défenses immunitaires sont conservées ne passent pas au stade d'infection, par contre si les défenses locales ou si l'immunité dans son ensemble est diminuée, les MNT sont susceptibles d'être à l'origine d'infections. Compte tenu de la diversité de leur habitat, il est vain d'espérer les supprimer.

De très nombreuses MNT ont été isolées des environnements hydrotelluriques (136, 174). A partir de ceux-ci, compte tenu de leur résistance aux désinfectants (27), en particulier au chlore, il y a passage des MNT de l'environnement au réseau de distribution de l'eau. Dans les réseaux d'eau surtout si ceux-ci sont compliqués et présentent des ralentissements du flux et des bras morts, les MNT se fixent et entrent dans la composition de biofilms. A partir de ceux-ci, elles maintiennent une présence constante dans l'eau et, l'homme se contamine soit par aérosols soit par ingestion. Les mycobactéries les plus fréquemment retrouvées dans l'eau d'alimentation (65) sont MAC, *M. kansasii*, *M. scrofulaceum*, les groupes *fortuitum* et *chelonae abscessus*, *M. xenopi*... Des infections nosocomiales provoquées par l'eau des hôpitaux ont été décrites (187).

Rappelons la contamination par *M. xenopi* de matériel chirurgical rincé à l'eau du robinet, de bronchoscopes ou autres endoscopes contaminés par des mycobactéries à croissance rapide.

On ne peut terminer ce chapitre sans évoquer la formidable capacité d'adaptation des MNT aux conditions environnementales très variables. Surtout s'agissant des mycobactéries non tuberculeuses à croissance rapide, elles sont aussi capables que les *Pseudomonas* (165) de métaboliser un nombre important de substances organiques, elles peuvent ainsi jouer un rôle de dépollution de l'environnement.

B - *M. kansasii*

I - Historique

Quand en 1953 Buhler et Pollak (20) décrivaient les deux cas d'infection qu'ils venaient d'observer à Kansas City, ils marquaient une date importante dans l'histoire des mycobactéries. Pour la première fois dans deux observations, l'une d'infection pulmonaire, l'autre d'une adénite inguinale, la preuve formelle était faite que des bacilles acido-alcool-résistants différents des mycobactéries tuberculeuses typiques et pour cette raison appelées mycobactéries atypiques pouvaient développer un pouvoir pathogène. Partant d'une infection locale, la mycobactérie était capable de se disséminer dans l'organisme du malade et d'entraîner sa mort. Le chapitre des mycobactérioses était ouvert. Le bacille observé était d'abord dénommé Yellow Bacillus à cause de la coloration jaune des colonies. Pour mieux satisfaire aux exigences de la nomenclature Hauduroy (71) proposait en 1955 la dénomination de *M. kansasii*. Runyon (152) reconnaissait le caractère photochromogène des bacilles et faisait de *M. kansasii* le prototype des mycobactéries qui se pigmentent après exposition à la lumière. Les descriptions cliniques d'infections provoquées par *M. kansasii* devaient se multiplier mais il semble que ce soit Boisvert (39) qui le premier ait isolé *M. kansasii* de l'eau d'un robinet parisien. On sait maintenant que c'est un germe largement représenté dans l'environnement hydrique et plus particulièrement dans l'eau de distribution.

II - Caractéristiques cliniques (197)

M. kansasii possède un pouvoir pathogène certain. Les localisations sont variées :

1) Les localisations bronchopulmonaires sont les plus fréquentes. Différentes formes cliniques existent. La manifestation la plus habituelle consiste en une pathologie pulmonaire chronique ressemblant tant sur le plan clinique que radiologique à la tuberculose. Les facteurs favorisants sont retrouvés dans plus de la moitié des cas, il s'agit de modifications du parenchyme pulmonaire par un cancer, une tuberculose ancienne, une pneumoconiose ; il peut s'agir de pathologies variées de l'arbre bronchique : dilatation des bronches, bronchopneumopathie chronique obstructive. Le tabac est un facteur important. Les infections sur poumon sain sont exceptionnelles chez l'enfant mais se rencontrent chez l'adulte et le vieillard. Les atteintes sont souvent bilatérales, il s'agit le plus souvent de nodules. Chez le sujet séropositif pour le VIH les infections à *M. kansasii* surviennent quand le taux des CD₄ est de 200/mm³, c'est-à-dire à un stade avancé de la maladie. La fréquence des infections à *M. kansasii* est faible (3 %) par rapport à celle des infections provoquées par MAC (95 %).

2) Les formes disséminées ne surviennent que chez les malades présentant un déficit immunitaire sévère : maladie hématologique, traitement immunosuppresseur, SIDA. Elles s'accompagnent d'une fièvre persistante, perte de poids, anémie, diarrhée, ces formes sont responsables d'une forte mortalité (199).

3) Les adénites ne sont retrouvées que chez l'enfant de 1 à 3 ans. Habituellement cervicales, unilatérales, peu ou pas douloureuses avec bonne conservation de l'état général. Elles peuvent se fistuliser, rester stables ou régresser spontanément (197).

4) Les localisations cutanées se rencontrent surtout chez des malades soumis à un traitement immunosuppresseur ou se manifestent au cours d'une mycobactériose disséminée.

5) Les localisations osseuses et ostéoarticulaires.

M. kansasii peut être responsable d'arthrites, d'ostéites, de bursites, de ténosynovites, qui surviennent après un acte chirurgical, une blessure profonde, une infiltration.

6) Les atteintes de l'appareil génito-urinaire sont signalées (199) (118).

III - Caractères bactériologiques

Les bacilles ont une morphologie particulière, ils sont gros, longs et granuleux, réalisant l'aspect classique "en échelle".

Mycobactérie à croissance lente, les colonies n'apparaissent qu'après 2 à 3 semaines sur milieu de Löwenstein. Elles sont habituellement rugueuses, photochromogènes, se colorent en jaune après exposition à la lumière (épreuve de photo-induction).

Les caractères biochimiques suivants permettent une identification facile : catalase positive > 45 mm thermostable, nitrate réductase, phosphatase acide, tween hydrolase : positives. Le niacin test est négatif.

L'identification par sonde nucléique facilite le diagnostic. (74)

Cinq sous-espèces peuvent être différenciées par les méthodes moléculaires et les tests biochimiques. Toutes les souches appartenant au biotype I (sous-espèce 1) hydrolysent le Tween 80 et possèdent une alpha fucosidase (178), elles sont toutes regroupées dans le même groupe d'identification donné par la méthode PRA et appelées *M. kansasii* profil 1 : digestion par *BstE II* 245 et 220 Pb et après digestion par *Hae III* trois fragments 140/105/80 Pb sont obtenus.

Le biotype II (sous-espèce 2) mis en évidence chez des malades VIH positifs serait moins pathogène que le biotype I. Il se caractérise par une hydrolyse du Tween 80 qui est plus lente, l'absence d'alpha fucosidase. Toutes les souches appartenant au biotype II sont regroupées dans le même profil PRA digestion par *BstE II* 245/140/80 digestion par *Hae III* 140/105/70 avec confusion possible avec *M. gastri*.

La méthode PRA a mis en évidence trois autres profils :

<i>M. kansasii</i> III	BstE II 245/140/80	Hae III 140/100/70
<i>M. kansasii</i> IV	BstE II 245/120/80	Hae III 140/115/70
<i>M. kansasii</i> V	BstE II 325/120	Hae III 140/100/80

Ces trois sous-groupes mineurs confirment bien l'hétérogénéité de l'espèce *M. kansasii* et sa très étroite parenté avec *M. gastri*.

La chromatographie des acides gras, en couche mince, *M. kansasii* possède les mycolates I III IV. En chromatographie phase gazeuse, après pyrolyse, on obtient un pic en C24.

IV - Ecologie - épidémiologie

M. kansasii a été isolé partout de par le monde. Toutefois, dans certaines régions, les isollements sont plus fréquents, c'est le cas des états du sud des Etats-Unis. La plus grande fréquence d'isolement dans les régions minières est liée à l'existence de pneumoconioses (silicose) qui réalisent un terrain favorable à la multiplication de *M. kansasii* et à la manifestation de son opportunisme agressif. Le réservoir de *M. kansasii* est l'eau. Il a été isolé des eaux de ruissellement comme des réseaux d'eau potable. Des contaminations hospitalières ont été imputées à l'existence de bras morts dans les réseaux hospitaliers (103), où *M. kansasii* peut se multiplier, réalisant des biofilms qui augmentent la résistance au chlore déjà importante chez les formes planctoniques puisqu'il est capable de résister à des concentrations de chlore de 1 mg/l (39) (201). *M. kansasii* est capable de se transmettre par aérosols et il est probable que la contamination des mineurs puisse s'expliquer par la nécessité d'arroser les sites d'exploitation pour éviter l'inhalation des poussières : cette pratique créant des aérosols est à l'origine de contaminations.

V - Traitement

Le traitement des infections provoquées par *M. kansasii* fait intervenir la rifampicine, l'isoniazide et l'éthambutol associés ou non à la streptomycine ou à l'amikacine. Le traitement doit être poursuivi pendant 18 mois.

La clarithromycine est active *in vitro*, la concentration de 2 µg/ml est bactéricide (12). *In vitro* les fluoroquinolones ont une bonne activité (142).

Le pyrazinamide est sans activité sur *M. kansasii*.

C - *M. marinum*

I - Historique

M. marinum a été décrit la première fois par Aronson (4), en 1926, qui l'avait isolé à Philadelphie de poissons malades et d'aquarium. Baker (6), en 1942, isole une mycobactérie d'un poisson plat qu'il appelle *M. platypoecilus* qui sera identifié à *M. marinum* par Shaeffer en 1961. Ce n'est qu'en 1951 que Linell et Norden (106) décrivent le granulome des piscines à la suite de l'étude d'une épidémie d'infections cutanées survenue chez 70 personnes ayant fréquenté la même

piscine. Des lésions, ils isolent une mycobactérie qu'ils dénommeront *M. balnei* (122). Une épidémie semblable est survenue au Colorado dans une piscine ouverte alimentée par des sources chaudes (122). Par la suite, Castelnovo (29) démontre que *M. marinum* et *M. balnei* sont une seule et même espèce.

II - Caractéristiques cliniques

M. marinum est retrouvé dans l'environnement hydrotellurique. Il est responsable d'infections chez les poissons. L'homme se contamine lors du contact avec les poissons (maladie des pêcheurs et des aquariophiles) ou avec l'eau contaminée par l'intermédiaire de lésions cutanées (granulome des piscines).

1° Chez l'homme

a) *M. marinum* est habituellement responsable d'infections cutanées, la lésion la plus habituelle est le granulome des piscines (106). C'est une lésion superficielle, limitée, apparaissant comme une excroissance verruqueuse de la main, du coude, des genoux, régions où les abrasions peuvent survenir et facilement se contaminer. L'incubation est de 2 à 3 semaines. La lésion la plus précoce est de type papulonodulaire, indolore, qui s'agrandit et peut donner du pus, s'ulcérer ou prendre un aspect kératosique ou lupoïde. Dans la forme sporotrichoïde, les nodules se développent le long du trajet des lymphatiques (197).

b) Des infections profondes ont été décrites. Synovites après piqûre lors de la manutention de poissons, crevettes, crabes (32), ostéomyélite et synovite décrites chez un pêcheur avec destruction osseuse après manipulation d'un poisson (36).

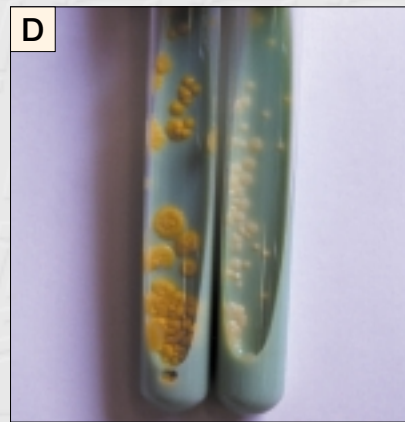
c) Chez l'immunodéprimé des formes cutanées disséminées ont été signalées (130). Ces mêmes formes généralisées surviennent exceptionnellement chez l'immunocompétent (184).

2° Infections des poissons

Les infections des poissons en éclosérie ou fermes marines semblent en augmentation. Ces infections sont décrites chez le saumon, les bars, les esturgeons (100). Elles se manifestent par des ulcérations et retentissent lourdement sur la croissance. Leur impact économique est important (96).

III - Caractères bactériologiques

Les bacilles apparaissent modérément longs et granuleux. Sur milieu à l'œuf, les colonies apparaissent à partir du 7^{ème} jour ou plus, elles sont lisses ou rugueuses. Il n'y pas de culture à 37° lors du premier isolement. Après repiquage, les souches peuvent éventuellement s'adapter à 37°. La température de culture optimale est 30°. *M. marinum* est une bactérie photochromogène et de ce fait appartient au groupe I de la classification de Runyon. Dans la 9^{ème} édition du Bergey's manuel, *M. marinum* est classé dans le groupe des mycobactéries à croissance lente. En fait, sa vitesse de croissance est intermédiaire entre celle des mycobactéries à croissance rapide (moins de 7 jours) et celle des mycobactéries à croissance lente.



Mycobacterium marinum

A et B - Granulome des piscines.

C - Lésions ulcérées de la queue de la souris après injection sous-cutanée du bacille.

D - Souche photochromogène : tube gauche coloré en jaune après exposition à la lumière.



Les caractères biochimiques utiles à l'identification sont : absence de production d'acide nicotinique (niacin test négatif), et de nitrate réductase. Il possède une uréase, une phosphatase acide, une arylsulfatase et hydrolyse le tween 80.

En chromatographie en couche mince, il a le profil I, III, IV. L'ester de pyrolyse prépondérant est à 24 atomes de carbone.

L'inoculation sous cutanée dans les parties froides de la souris (queue et coussinet plantaire) provoque, après 4 à 6 semaines, l'apparition de lésions ulcéraires comparables à celles observées dans l'infection expérimentale de la souris par *M. ulcerans*.

Après amplification du gène *hsp 65*, la méthode PRA fait apparaître, après digestion par *BstE II*, deux fragments de 245 et 220 paires de bases et après digestion par *Hae III*, trois fragments respectivement de 160, 115 et 80 paires de bases. Ce profil ne permet pas de différencier *M. marinum* de *M. ulcerans*.

Actuellement, l'identification peut se faire facilement par hybridation avec bandelettes Genotype et Innolipa.

La technique PRA ainsi que l'hybridation sur bandelette ne permettent pas de différencier *M. marinum* de *M. ulcerans*.

IV - Ecologie - Epidémiologie

La source de contamination de l'homme est l'eau douce ou salée. Le lien entre l'environnement hydrique et la maladie est apparu après l'observation de cas d'infections de personnes manipulant des aquariums ou employées dans les industries piscicoles.

Chez les poissons dans les fermes marines, la contamination de l'eau est favorisée par son recyclage qui contribue à l'enrichir en composés carbonés et nitrés. Des contaminations d'animal à animal ont été rapportées.

Chez l'homme les sujets exposés sont les aquariophiles, les pêcheurs. Le VIH est un facteur de risque qui conduit à déconseiller à ces malades la manipulation d'aquarium.

V - Traitement

Le traitement médical à base d'antibiotiques peut être efficace. *In vitro* par la méthode de dilution en gélose les ansamycines, rifampicine et rifabutine sont les plus efficaces avec des CMI respectivement de 0,25 µg/ml et de 0,06 µg/ml. La minocycline avec une CMI de 4 µg/ml est la plus active des cyclines. La clarithromycine est active *in vitro* avec une CMI₅₀ de 4 µg/ml. Parmi les fluoroquinolones, la moxifloxacine a la CMI la plus basse (CMI₅₀ 0,5 µg/ml). ciprofloxacine, ofloxacine, levofloxacine ont des CMI supérieures aux concentrations obtenues *in vivo*, les souches de *M. marinum* sont donc considérées comme résistantes. *M. marinum* est donc naturellement sensible aux rifamycines, à la minocycline, à la clarithromycine, à la moxifloxacine et à l'amikacine. Les traitements antibiotiques sont poursuivis pendant plusieurs mois et maintenus durant six semaines après cicatrisation des lésions. Le débridement chirurgical avec l'excision des lésions peut être envisagé.

D – *M. simiae*

I - Historique (119)

En 1969, Weiszfeiler étudie les 50 souches de mycobactéries atypiques produisant de l'acide nicotinique isolées en 1965 en Hongrie par Karasseva d'organes de singes provenant des Indes. Il les dénomme *M. simiae*.

En 1971, Valdivia rapporte qu'il a isolé à Cuba, chez des malades présentant, soit des signes de tuberculose pulmonaire, soit d'autres maladies pulmonaires, 35 souches niacine positive appartenant au groupe III de la classification de Runyon. Il propose de les appeler *M. habana*. En 1976, Weiszfeiler (196) démontre que *M. simiae* et *M. habana* sont une seule et même espèce.

II - Caractéristiques cliniques

M. simiae est assez rarement responsable d'infections chez l'homme bien qu'il soit fréquemment isolé comme contaminant, soit des voies respiratoires, soit du tube digestif. Il est chez le singe, à l'origine d'infections pulmonaires évoquant la tuberculose.

Les infections pulmonaires sont, chez l'homme, la manifestation la plus fréquente. Elles sont apparues chez des personnels s'occupant des singes mais aussi chez des malades n'ayant pas eu de contact avec les primates. Chez la plupart des malades, on retrouve dans les antécédents des bronchopneumopathies non mycobactériennes. Les signes cliniques et radiologiques ne permettent pas de différencier ces infections de la tuberculose. Des infections disséminées ont été observées chez les malades HIV. D'autres infections osseuses et rénales ont été signalées.

III - Caractères bactériologiques

M. simiae est une mycobactérie à croissance lente qui pousse en 3 à 4 semaines sur les milieux habituels. La croissance se fait de 25 à 41° mais ne pousse pas à 45°.

Les colonies sont lisses et photochromogènes. Il faut pour faire apparaître la pigmentation que l'exposition à la lumière soit prolongée environ 6 heures sur une souche jeune.

Les tests biochimiques d'identification courante montrent que certaines souches (50 %) produisent de l'acide nicotinique, toutes possèdent une uréase et une catalase thermostable. Elles n'ont pas de nitrate réductase, n'hydrolysent pas le tween 80.

La chromatographie en couche mince des acides mycoliques montre un profil de type I II IV. Les esters de pyrolyse possèdent 26 atomes de carbone.

Le profil PRA montre deux profils différents :

	<i>M. simiae I</i>	<i>M. simiae II</i>
<i>BstE II</i>	245/220	245/220
<i>Hae III</i>	200/135	155/140

L'hybridation avec les bandelettes ne met en évidence qu'un seul profil.

IV - Ecologie - Epidémiologie

M. simiae est diversement isolé selon les pays. Peu fréquent aux USA où, de 1981 à 1983, 67 isollements ont été répertoriés, parmi ceux-ci, 14 seulement étaient impliqués dans un processus pathologique. Pour la même période en Israël, 399 souches provenant de 287 personnes sont isolées dans la plaine côtière de Tel Aviv. Parmi ceux-ci 18 ont eu des prélèvements multiples et ont été considérés comme infectés. Dans leurs antécédents, on retrouve une ancienne tuberculose. L'origine de la contamination massive est rapportée à une contamination hydrique. *M. simiae* a été isolé par Lavy (101) dans l'eau de l'hôpital de Gaza.

Le portage humain semble fréquent : Portaels (139) a isolé 14 fois *M. simiae* des coprocultures réalisées chez 50 sujets bien portants.

M. simiae est capable de se transmettre d'animal à animal. 36 % des singes mis en cage avec des animaux contaminés sont infectés par *M. simiae* après un contact variant de 13 à 90 jours. La transmission se fait-elle par voie oro-fécale ou par aérosol ? On manque d'éléments de réponse (195).

V - Traitement

On manque d'études pour définir quel serait le traitement le plus efficace sur le plan clinique.

M. simiae est résistant aux antituberculeux de 1^{ère} intention.

L'association qui, *in vivo* chez la souris, a présenté la meilleure efficacité serait celle qui associerait l'éthambutol, à la clarithromycine et/ou l'ofloxacine (182).

E - *M. gordonae*

Bien que considéré comme non pathogène, *M. gordonae* est très fréquemment isolé à titre de contaminant des prélèvements d'origine humaine.

I - Historique (39)

Les "Tap Water scotochromogen" ont été reconnus par Maie et par Galli-Valerio en 1922 à partir d'analyses d'eau par l'aspect jaune de leurs colonies. Ils les baptisent *M. aquae*. Les caractères décrits par ces auteurs en font une entité originale non assimilable aux espèces précédemment décrites. En 1955, Gordon trouve que la souche isolée par Maie a les caractères de *M. smegmatis*. Bonicke en 1961 étudie des bacilles scotochromogènes à croissance lente des robinets et les appelle *M. aquae*. Bojalil applique aux mycobactéries scotochromogènes les méthodes de classification adansonienne et introduit l'espèce *M. gordonae*, c'est cette dénomination qui est actuellement retenue.

II - Caractéristiques cliniques

Bien que *M. gordonae* soit très répandu dans la nature, et en dépit d'une grande exposition à ce germe, les infections provoquées chez l'homme par *M. gordonae* sont rares. Rattacher *M. gordonae* à une infection même chez l'immunodéprimé doit faire l'objet d'un examen

critique approfondi. Dans une revue générale portant sur 24 cas Weinberger (194) rapporte 8 infections pulmonaires, 7 infections des tissus mous et des téguments, 5 infections disséminées, trois infections péritonéales et une infection cornéenne. Les infections pulmonaires sont survenues chez des hommes âgés et ayant une maladie pulmonaire sous jacente. Les infections cutanées et des tissus mous surviennent chez les malades qui avaient une infection systémique ou une maladie sous jacente. Dans trois cas sur sept analysés, une notion traumatique avec effraction tissulaire est notée. Les infections disséminées sont survenues chez 4 malades immunocompétents et la cinquième chez un sidéen. Les 4 patients non immunodéprimés avaient un corps étranger : valve cardiaque, cathéter. Le 5^{ème} avait eu une voie profonde avec maintien d'un cathéter pendant six mois.

Les trois cas de péritonite sont plus difficiles à systématiser et à rattacher à une étiologie précise. La dialyse péritonéale est une cause possible d'infections provoquées par *M. gordonae* (70).

III - Caractères bactériologiques

L'aspect des bacilles après coloration de Ziehl ne présente pas de particularités. Ce sont des BAAR modérément longs. Sur milieux de Löwenstein Jensen, les colonies apparaissent en une quinzaine de jours. Elles sont régulières, lisses et colorées à l'obscurité en jaune orange (scotochromogènes). Elles se développent entre 22 et 37°C. *M. gordonae* possède une catalase thermostable et hydrolyse le tween 80. Un certain nombre de souches possèdent une arylsulfatase et une phosphatase acide. *M. gordonae* pousse en présence de 10 µg/ml de thioacetazone (TB₁). Il ne possède ni uréase ni nitrate réductase et n'accumule pas l'acide nicotinique. Compte tenu de la fréquence d'isolement de *M. gordonae*, des sondes ADN spécifiques sont disponibles. Elles donnent de très bons résultats. L'analyse des acides mycoliques met en évidence un profil de type I, III, IV avec un ester de pyrolyse à 24 atomes de carbone.

***M. gordonae* par la méthode PRA se montre très hétérogène puisque 6 profils différents sont observés.**

	<i>BstE II</i>	<i>Hae III</i>
<i>M. gordonae</i> I	245/125/80	170/115/60
<i>M. gordonae</i> II	245/125/80	235/115
<i>M. gordonae</i> III	245/120/100	140/120
<i>M. gordonae</i> IV	325/120	140/115/70
<i>M. gordonae</i> V	245/220	140/115
<i>M. gordonae</i> VI	245/140/80	140/120/25

IV - Ecologie - Epidémiologie

M. gordonae est extrêmement fréquent dans l'environnement. Aux Etats-Unis, en 1980, sur un total de 19.977 isollements de mycobactéries potentiellement pathogène de l'environnement, *M. gordonae* est identifié 6.007 fois (30 % du total). Une fréquence d'isolement aussi importante contraste étrangement avec le faible nombre de cas d'infections véritables provoquées par ce germe qui manifeste un pouvoir pathogène extrêmement réduit (193). Germe très présent dans l'eau, il contamine fréquemment les eaux de distribution.

Des pseudoépidémies ont été décrites après contamination de la solution Panta utilisée dans la méthode Bactec (176). La contamination d'une solution anesthésique a été à l'origine de contaminations de prélèvements réalisés sous bronchoscopie (167).

V - Traitement

In vitro, la plupart des souches sont sensibles à l'éthambutol (72 %), à la rifampicine (61%), à la cyclosérine (88 %) et aux aminosides. 75 % des souches sont résistantes à l'Isoniazide.

F - *M. scrofulaceum*

I - Historique

Isolé en 1956 par Prissick et Masson d'une adénite cervicale apparue chez un enfant (140), observé par les mêmes auteurs dans le pus d'une fistule ganglionnaire cervicale (140), *M. scrofulaceum* a par la suite été isolé d'une lésion pulmonaire et d'infections généralisées. Bien qu'ayant souvent été associé à MAC (*M. avium intracellulare scrofulaceum*) sous l'acronyme MAIS, il doit être considéré comme une espèce distincte. Son individualité ayant été démontrée par l'étude des ANR 16S.

II - Caractères cliniques

1° Les adénites cervicales de l'enfant (95)

C'est la forme clinique qui est la plus fréquemment observée. Les enfants sont souvent jeunes (entre 1 et 5 ans). Il s'agit le plus souvent de nodules unilatéraux, sous maxillaires mais non exclusivement puisque des nodules semblables de siège axillaire ou inguinal ont été signalés. Des adénopathies provoquées par *M. scrofulaceum* ont été observées chez l'enfant plus âgé et chez l'adulte. Ces adénopathies sont souvent isolées, non douloureuses et ne s'accompagnent pas de signes généraux. Souvent bien supportées, elles peuvent guérir spontanément ou rarement se fistuliser.

La porte d'entrée pourrait être amygdalienne. Des inoculations directes après traumatisme ont été rapportées.

2° Les infections pulmonaires

Dans la majorité des cas, l'isolement de *M. scrofulaceum* de crachat est le fait d'une colonisation asymptomatique. Cependant, de véritables lésions cavitaires ont été observées. Dans les cas signalés par Wolinsky (198), il s'agissait de malades soumis aux poussières industrielles et à la

fumée (soudeurs à l'arc). D'autres facteurs prédisposant peuvent être retenus : existence d'une tuberculose antérieure, bronchite chronique, emphysème, pneumoconioses, bronchectasies. Chez ces patients l'infection évolue lentement mais s'accompagne de toux, de perte de poids. La radiographie peut montrer des lésions infiltratives parfois excavées.

3° Les autres infections

Des méningites, hépatites granulomateuses, abcès, ont été signalés. Des lésions cutanées sont décrites chez des sujets recevant des corticoïdes ou chez les greffés rénaux. Des formes disséminées sont signalées chez l'immunodéprimé (SIDA) (155) mais aussi chez des sujets immunocompétents (82).

III - Caractères bactériologiques

M. scrofulaceum appartient au groupe II de la classification de Runyon. Il est scotochromogène et sa culture est lente. Au microscope sa taille est variable, il est souvent épais et présente des granulations plus épaisses que celles observées chez *M. tuberculosis*. Sur milieux à l'œuf, sa croissance demande 4 à 5 semaines. Les colonies sont bombées et pigmentées en jaune orange à l'obscurité. Sa température de croissance optimale est 37°C. Il pousse lentement à 25°C et ne pousse pas à 45°C. Il possède une catalase abondante et thermostable, une uréase et une arylsulfatase qui se manifeste en 9 jours. Il n'hydrolyse pas le tween 80, n'a pas de nitrate réductase.

M. scrofulaceum a des caractères génétiques, écologiques, biochimiques, qu'il partage avec le complexe aviaire ce qui lui a valu d'entrer dans la constitution du complexe MAIS. En fait, bien qu'il y ait des chevauchements au niveau des caractéristiques immunologiques (présence d'antigènes partagés entre plusieurs sérotypes de *M. avium* et de *M. scrofulaceum*) les tests génétiques comme l'étude des ARN 16S en font une espèce autonome différente de celles du complexe *avium*. Par la méthode PRA, on obtient, après digestion par *BstE II*, deux fragments de 245 et 220 pb et, après action de *Hae III*, on obtient trois fragments 155/135/95 (200).

IV - Ecologie - Epidémiologie

L'habitat de *M. scrofulaceum* est situé dans l'environnement hydrique : eau des fleuves et des lacs situés de préférence dans les régions chaudes. Il est très rare sinon absent de l'eau d'alimentation. *M. scrofulaceum* a pu être isolé dans les huîtres, le lait cru et non dans le lait pasteurisé. Il semble que sa fréquence d'isolement était plus élevée avant 1979 que maintenant (93). Cette observation rejoint les constatations faites par Wolinsky dans l'étude épidémiologique des adénites cervicales (198).

M. scrofulaceum est un germe peu fréquent en clinique humaine. Il représente seulement 2 % des mycobactéries non tuberculeuses identifiées au Center for Disease Control (C.D.C.) (93). Il existe une sensibilité spécifique de *M. scrofulaceum*. Des études épidémiologiques réalisées dans différentes contrées montrent que l'existence d'une réaction cutanée positive se situe aux environs de 7 %, que celle-ci est plus importante chez les sujets qui vivent en zone maritime que chez ceux qui vivent dans les montagnes (53).

V - Traitement

1° Sensibilité aux antibiotiques *in vitro*

M. scrofulaceum se présente comme une mycobactérie naturellement peu sensible aux antibiotiques. Elle résiste à l'isoniazide, à l'acide para-aminosalicylique, à la kanamycine. Il peut être sensible à rifampicine et rifabutine, éthambutol, streptomycine, amikacine. La clarithromycine et l'azithromycine peuvent être efficaces.

2° Modalités du traitement

Les infections ganglionnaires peuvent nécessiter le recours à la chirurgie. Les formes compliquées ou les formes disséminées justifient l'utilisation d'un traitement antibiotique. La clarithromycine seule ou associée à la rifampicine ou rifabutine donne de bons résultats.

G - *M. szulgai*

I - Historique

C'est en 1972 que cette espèce a été identifiée par Jenkins, Marks, Schaeffer (89) au cours d'une étude des lipides de souches scotochromogènes par chromatographie en couche mince. Au sein de souches appartenant aux espèces *M. scrofulaceum*, *M. xenopi*, *M. aquae*, *M. gordonae*, *M. flavescens*, un profil original se dégageait qui prenait le nom de *M. szulgai*, du nom d'un microbiologiste polonais (T. Szulgai). Ce germe est rarement isolé chez l'homme où il est cependant susceptible de manifester un pouvoir pathogène certain.

II - Caractéristiques cliniques

a) Localisations pulmonaires

Elles sont les plus fréquentes. Il s'agit le plus souvent de maladies pulmonaires chroniques qui ressemblent à la tuberculose. Dans une étude rapportée en 1987 sur 27 cas décrits, 18 sont des infections pulmonaires non distinguables de la tuberculose (112).

b) Les infections extrapulmonaires adénites, bursites, ténosynovites, ostéomyélite, se partagent les 9 autres cas de l'étude de Maloney (112).

c) Chez l'immunodéprimé, des lésions cutanées extensives ont été observées ainsi que des formes disséminées.

III - Caractères bactériologiques

L'aspect morphologique après coloration de Ziehl est peu évocateur. Bacilles modérément longs avec quelques granulations rappelant les rayures de *M. kansasii*. Il pousse en deux semaines sur milieu à l'œuf. Les colonies sont lisses ou rugueuses, parfois à bords irréguliers. Bien qu'un certain nombre de souches soient non pigmentées (206), une des caractéristiques essentielles de *M. szulgai* est liée à sa pigmentation. Photochromogène après culture à 25°C, scotochromogène à 37°C. La croissance se fait de 25°C à 37°C, il ne pousse pas à 42°C.

Les caractères biochimiques d'identification sont les suivants : présence d'une catalase (> 45 mm), thermostable, d'une nitrate réductase, d'une uréase et d'une arylsulfatase. Il hydrolyse le tween 80. Il n'a pas de phosphatase acide et ne pousse pas en présence de Na Cl 5 %.

Le profil chromatographique des acides mycoliques est de type I, III, IV avec un ester pyrolyse à 24 atomes de carbone.

Les séquences du ARN 16 S de *M. szulgai* sont voisines de celles de *M. malmoeense* (149). Le profil PRA montre l'absence de digestion avec l'enzyme *BstE II* et la migration de trois fragments après digestion par *Hae III* 140-105-70 paires de bases (170).

IV - Ecologie - Epidémiologie

Il n'y a pas eu d'études systématiques pour identifier les niches écologiques de *M. szulgai*. Il est probable que la source soit localisée dans l'environnement comme c'est le cas pour de nombreuses mycobactéries. Récemment (206), une augmentation importante des isollements de *M. szulgai* a été observée au Texas. Le germe a été isolé d'une citerne d'eau servant à l'alimentation de l'hôpital. C'est donc probablement une bactérie de l'environnement aquatique et plus particulièrement des réseaux de distribution.

En ce qui concerne les infections de l'homme dans les facteurs de risques, sont retenus le tabagisme et l'alcoolisme pour les formes pulmonaires. Les injections de corticoïdes sont à l'origine d'un certain nombre de manifestations tendineuses ou ostéo-articulaires (31).

M. szulgai a été isolé d'un poisson d'aquarium tropical (158).

VI - Traitement

a) *M. szulgai* est habituellement sensible, *in vitro*, aux antibiotiques suivants : rifampicine, rifabutine, kanamycine, éthambutol, clarithromycine, amikacine ; montre une résistance à pyrazinamide, streptomycine, cyclosérine. Il est résistant à bas niveau à l'isoniazide. Le traitement associant rifampicine, cyclosérine, éthambutol s'est montré efficace (56). La cyclosérine est remplacée par la clarithromycine.

b) Les atteintes osseuses ostéo-articulaires et tendineuses sont justiciables du traitement chirurgical.

H - *M. avium intracellulare*, le complexe MAC

I - Historique

Rivolta en 1889, Mafucci en 1890 démontrent la spécificité de l'infection aviaire et R. Koch déclare en 1890, au Congrès International de Médecine de Berlin, "Je n'hésite pas à considérer les bacilles de la tuberculose des poules comme une espèce à part quoique très rapprochée des vrais bacilles de la tuberculose".

Strauss et Gamaleia devaient, l'année suivante, en apporter la preuve expérimentale en cultivant sur sérum coagulé, sur gélose ordinaire, sur-gélose glycinée et sur gélose sucrée, les bacilles isolés de la rate d'une poule. Tous les ensemencements avaient été fertiles, ce qui n'est pas le

cas des bacilles tuberculeux et bovins (23). Au cours de la première moitié du 20^{ème} siècle les études porteront sur deux points particuliers, à savoir, d'une part déterminer le pouvoir pathogène de *M. avium* pour les mammifères, les résultats seront positifs et, d'autre part de démontrer que *M. avium* ne constitue pas en lui-même une espèce mais qu'il s'agit de bacilles tuberculeux qui se sont adaptés à l'oiseau. Les résultats de cette seconde hypothèse demeureront résolument négatifs, ce qui confirmera les conclusions de Koch et de Gamaleia qui, d'emblée dès 1890, en faisaient une espèce bien distincte.

Le pouvoir pathogène pour l'homme dans une infection rénale sera évoqué par Lowenstein. Des adénopathies sont rapportées par Jansco, Espérance isole *M. avium* de la rate et d'adénopathies de malades atteints de maladie de Hodgkin. Klimmer et Mollers estiment que 0,2 % des tuberculoses pulmonaires humaines sont dues au bacille aviaire. Feldmann reconnaît le bacille aviaire comme un pathogène humain (58).

En 1949, Cuttino et Mc Nabe (42) isolent *Nocardia intracellularis* d'une infection systémique chez un enfant. Au sanatorium de Battey en Géorgie où le "Battey bacillus" est fréquemment isolé de crachats. Ces deux bacilles deviendront par la suite *M. intracellulare*.

L'absence de caractères phénotypiques permettant une différenciation facile entre *M. avium* et *M. intracellulare* a confondu leur identification dans une même rubrique, le complexe MAC. Pour des raisons pratiques c'est cette dénomination qui reste encore le plus souvent utilisée.

La prévalence des infections causées par le complexe MAC a notablement augmenté avec l'épidémie de SIDA. Avant que l'on ne dispose des médicaments antirétroviraux efficaces, les infections disséminées à MAC étaient la complication bactérienne la plus fréquente lorsque le taux des CD₄ s'effondrait et bien souvent ces infections opportunistes entraînaient la mort du malade. La thérapeutique antivirale et la prophylaxie ont heureusement fait chuter considérablement ces infections.

II - Mycobactéries du complexe aviaire (57) (193)

Le complexe inclut *M. intracellulare*, *M. avium*, *M. leprae murium*, *M. paratuberculosis*, le bacille du "Wood Pigeon" et d'autres nouvelles espèces. Bien qu'il soit difficile de différencier sur des critères phénotypiques *M. avium* de *M. intracellulare*, les études plus récentes des relations entre DNA, RNA, protéines, confirment qu'il s'agit bien de deux espèces différentes. Par ailleurs, *M. scrofulaceum* en est tout à fait distinct.

La différenciation entre *M. avium* et *M. intracellulare* conduit à redistribuer les sérotypes, ainsi *M. avium* comprend les sérovars 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 et les sérovars 7, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20, et 25 constituent l'espèce *M. intracellulare*.

Le sérovar 18 contient des souches rattachées à *M. intracellulare*, à *M. simiae* et à des espèces non encore identifiées.

Les sérovars 22, 23, 26, 28 sont compatibles avec *M. avium* mais n'hybrident pas avec les sondes *M. avium* ou *M. intracellulare*, ce qui suggère l'existence, au sein du MAC, d'un troisième groupe génospecies.

Des études récentes tendent à considérer *M. leprae murium* et *M. paratuberculosis* comme des

sous-espèces de *M. avium* ainsi que la souche isolée par Chiodini. Il s'agit d'une mycobactérie dont la pousse est mycobactine dépendante, elle provient d'un malade atteint de maladie de Crohn et montre une hybridation DNA-DNA parfaite avec *M. paratuberculosis*. Sur la base de ce même critère les souches "Wood Pigeon" et *M. leprae murium* s'avèreraient identiques. Le DNA de ces 4 sous-espèces s'hybride parfaitement avec celui de *M. avium*.

Les RFLP réalisées sur les DNA des différentes sous-espèces montrent des différences évaluées entre 2 et 3 % pour *M. avium*, *M. paratuberculosis* et *M. leprae murium*. Par contre, le DNA des souches de *M. intracellulare* montrent un taux de substitutions de bases de l'ordre de 15 %. Thorel (173) s'appuyant sur des données de taxonomie numérique propose trois sous-espèces : *M. avium subsp avium*, *M. avium subsp paratuberculosis* incluant les souches Wood Pigeon bacillus, *M. avium subsp silvaticum*.

III - Caractères cliniques

1° Pathogénèse

La colonisation des appareils respiratoires et digestifs précède, chez les malades VIH, la dissémination. Dans un suivi de 10 mois de 160 malades dont le compte des CD₄ était inférieur à 50 mm³, 72 % des malades ayant une contamination respiratoire (examen des crachats positif) et 60 % de ceux dont la coproculture mettait en évidence des MAC ont développé une infection disséminée.

La virulence des souches varie selon la morphologie des colonies. Les bacilles issus des colonies translucides et lisses se multiplient plus rapidement dans les macrophages et sont plus résistantes aux antibiotiques *in vitro* que les autres souches, elles induisent une moindre production de Tumor Necrosis Factor (TNF) qui joue un rôle dans l'activation du macrophage et une moindre production des cytokines qui freinent le déroulement de l'infection alors que celle d'interleukine 6 qui favorise la multiplication de MAC dans le macrophage est augmentée. Il est bien évident que l'effondrement des CD₄ chez les malades atteints de SIDA a des implications dans l'apparition de ces anomalies. Par ailleurs, un facteur sérique stimulant la croissance intracellulaire des MAC a été mis en évidence chez les sidéens (77). Le risque d'infection disséminée évolue dans le SIDA en fonction du nombre des CD₄. 95 % des malades faisant une infection disséminée à MAC ont un nombre de CD₄ inférieur à 100/mm³.

Le nombre de bactéries trouvées dans le sang, quand des hémocultures quantitatives sont réalisées, varie entre 10 et 1000 UFC/ml alors que dans les tissus il est 100 à 1000 fois plus élevé.

On peut considérer que l'histoire naturelle de l'infection à MAC chez le sidéen se déroule de la façon suivante : l'exposition à une source environnementale de MAC est suivie d'une colonisation digestive et/ou respiratoire. A partir de la multiplication intra-tissulaire surviennent d'abord des décharges bactériémiques suivies d'une bactériémie permanente.

Chez le sujet immunocompétent, les infections provoquées par MAC sont souvent des infections pulmonaires qui surviennent sur un parenchyme pulmonaire remanié par des affections de type pneumoconiose, séquelles de tuberculose, broncho-pneumopathie chronique, dilatation des bronches.

2° Manifestations cliniques

a) Chez les sujets séronégatifs pour le VIH

Les formes pulmonaires sont les plus fréquentes.

La symptomatologie est peu spécifique et souvent attribuée aux anomalies du terrain sous jacent : maladie du poumon, bronchite, ce qui retarde le diagnostic.

La toux productive reste le symptôme le plus précoce et le plus fréquent. La fièvre et la perte de poids sont présents dans un tiers des cas.

A la radio plusieurs types d'images peuvent être observées : des cavités peu différentes de celles observées dans la tuberculose, des infiltrats nodulaires du lobe supérieur ou, chez la femme âgée, de la lingula ou du lobe moyen. (syndrome de Lady Windermere) (145) et enfin, des nodules isolés.

L'évolution est lente et peut s'étaler sur des années. Non traité, le malade décède d'insuffisance respiratoire. Des bactéries appartenant au MAC ont été isolées dans les crachats de malades atteints de mucoviscidose.

M. avium est la mycobactérie la plus fréquemment impliquée dans les adénopathies cervicales de l'enfant.

Les formes disséminées sont rares et ne surviennent que comme complication d'un traitement immunosuppresseur.

Les formes cutanées existent. Elles peuvent revêtir des aspects variables : ulcères, abcès, plaques infiltrées comme dans la lèpre lépromateuse, nodules dermiques inflammatoires. Des tendinites et formes osseuses ont été signalées.

b) Chez les malades atteints de SIDA

Les infections disséminées à MAC surviennent quand le taux des CD₄ est au-dessous de 100/mm³. Les signes cliniques les plus fréquents sont la fièvre, les sueurs nocturnes profuses, l'anorexie, la perte de poids. Une hépatosplénomégalie et des adénopathies disséminées sont habituelles. Anémie, troubles digestifs, diarrhées, vomissements, nausées complètent ce tableau. Les infections pulmonaires et cutanées sont souvent observées dans les infections disséminées.

IV - Caractères bactériologiques

Les mycobactéries du complexe *avium* sont classées dans le groupe III de la classification de Runyon, c'est-à-dire qu'elles poussent en plus de 7 jours, et sont non pigmentées. Certaines cultures âgées peuvent se colorer en jaune. Les souches isolées à partir de lésions, lors de la primoculture, ont habituellement des colonies lisses, plates et translucides qui se délitent bien dans l'eau, donnant une suspension homogène. Après plusieurs subcultures, la morphologie des colonies se modifie, elles deviennent opaques, bombées.

La température optimale de culture est 37°C. L'amplitude thermique des souches est variable. La plupart des souches poussent de 25°C à 42°C.

Après coloration de Ziehl, les bactéries du MAC sont habituellement de petite taille et ne montrent pas d'amas.

L'identification biochimique montre un profil plutôt pauvre : pas de production d'acide nicotinique (niacin test), pas de nitrate réductase, pas d'hydrolyse du tween 80, présence d'une catalase thermostable mais faiblement produite (< 45 mm), pas d'uréase. Les souches MAC réduisent le tellurite et poussent sur milieu contenant du TCH. La présence d'une arylsulfatase en 10 jours peut suggérer la présence de *M. intracellulare*. En pratique, les tests biochimiques ne permettent pas de différencier MAC de *M. intracellulare*.

Des sondes nucléiques permettent d'identifier le complexe et de différencier les deux espèces.

Par la méthode PRA, il est aussi possible de différencier les deux espèces (19). En effet, la digestion *BstE II* donne pour MAC/*paratuberculosis* des fragments de taille 234 et 211 pour *M. intracellulare* 234, 117 et 99. La digestion avec *Hae III* donne avec *M. avium/paratuberculosis* trois fragments 127-104-51 et avec *M. intracellulare* trois fragments 147-109-81.

Par chromatographie en couche mince, des acides mycoliques ou par chromatographie phase gazeuse, les profils de *M. avium* et *M. intracellulare* sont identiques (104) à savoir, présence des mycolates I IV VI et d'un alcool secondaire de type econasol qui estérifie le mycolate VI avec un ester de pyrolyse en C₂₄ qui prédomine. Des différences trop minimes apparaissent en HPLC pour que l'on puisse les retenir (22).

V - Ecologie - Epidémiologie

MAC est retrouvé partout dans le monde. Il est présent en grande quantité dans l'eau, surtout si le pH est bas, la matière organique abondante et la tension partielle d'oxygène faible. Il présente une certaine résistance au chlore. On le retrouve dans l'eau d'alimentation et dans les circuits d'eau chaude des hôpitaux surtout si ceux-ci sont galvanisés ce qui permet des concentrations élevées en zinc favorables à leur croissance. MAC a été fréquemment isolé du sol, de la terre, des pots de fleurs, d'aérosols, de poussière de maison, du lait cru, de bronchoscope... Il a été possible de démontrer que la souche isolée de malades sidéens était génétiquement identique à celle trouvée dans l'eau de l'environnement de ces malades (185). Un même malade peut être contaminé simultanément par plusieurs souches différentes provenant de diverses contaminations issues de l'environnement hydrique.

Chez les malades immunocompétents la porte d'entrée pulmonaire peut être reliée à l'inhalation d'aérosols contaminés. Chez l'enfant, les adénopathies cervicales sont probablement consécutives à l'ingestion d'eau contaminée.

Chez les sidéens, il n'est pas facile de déterminer si l'infection généralisée a son point de départ au niveau d'une contamination digestive ou respiratoire, les deux sont possibles. Ce que l'on sait, c'est que la contamination intestinale mise en évidence par coproculture ou la contamination respiratoire précèdent de quelques mois la survenue de la dissémination. La contamination directe de personne à personne n'a pas été démontrée, par contre, une contamination fécale ne peut être exclue chez les VIH positifs. 90 % des infections disséminées à MAC, chez les VIH positifs, sont imputables à l'espèce MAC alors que 50 % des isollements des infections pulmonaires chez les malades non VIH sont dues à des sérovars *M. intracellulare* (143).

VI - Traitement

- En première ligne se placent les macrolides clarithromycine ou azithromycine qui possèdent une activité remarquable sur MAC, atteignent de fortes concentrations intracellulaires et ont une excellente diffusion tissulaire. Ils sont relativement bien tolérés. L'association à d'autres médicaments est nécessaire car l'utilisation en monothérapie permet inévitablement l'émergence de mutants résistants (117). Des cas de résistance primaire étant signalés, il est nécessaire de réaliser *in vitro* l'étude de la sensibilité des souches isolées.

La rifabutine a montré son efficacité *in vivo*, que ce soit en chimioprophylaxie ou dans le traitement des infections à MAC. Toutefois, ce médicament n'est pas sans effets secondaires : uvéite, arthralgies, coloration orange de la peau qui sont amplifiés par l'association avec la clarithromycine. L'association de ces deux médicaments se montre synergique et capable de supprimer les bactériémies et les signes cliniques d'infection.

Des souches résistantes aux macrolides ayant été sélectionnées, soit par les traitements curatifs, soit à l'issue d'une prophylaxie, l'association à un troisième médicament comme l'éthambutol ou l'amikacine est conseillée.

- La chirurgie peut être indiquée dans le traitement des adénopathies cervicales. La prescription de macrolide peut être un appoint pour encadrer l'acte chirurgical ou dans les cas où la chirurgie n'est pas possible (74). Les formes pulmonaires nodulaires ou bien limitées si l'état général du malade le permet sont redevables de l'exérèse chirurgicale.

I - *M. genavense*

I - Historique

En 1990, Hirschel (78) rapporte une infection avec une nouvelle mycobactérie qui ressemble à *M. simiae* mais qui ne pousse pas sur milieux solides et montre une multiplication limitée en milieu liquide 7H₁₂B (Bactec). Le malade avait des signes cliniques évoquant une infection disséminée à MAC.

En 1992, Böttger (15) décrit 18 cas d'une infection disséminée provoquée par une mycobactérie qui ne pousse pas sur milieu solide malgré des tentatives répétées. Par contre, ces souches présentaient, après amplification, une séquence ARN 16S unique et ont été appelées *M. genavense*.

II - Caractères cliniques

M. genavense est responsable d'infections disséminées chez des malades immunodéprimés par le VIH. L'infection s'accompagne de fièvre, perte de poids, diarrhée avec hépatosplénomégalie, adénopathies abdominales. Une anémie est fréquente : le taux des CD₄ est effondré, inférieur à 50/mm³. Ont également été signalés un abcès du cerveau, une angiocholite. Des cas ont été observés chez des malades traités par des immunosuppresseurs (14). Par amplification génique réalisée sur des biopsies coliques prélevées à l'occasion d'une coloscopie pour traitement de polypes ou de cancer, des

séquences spécifiques de *M. genavense* ont été trouvées chez des sujets non-immunodéprimés et en l'absence de toute infection disséminée.

III - Caractères bactériologiques

M. genavense est une mycobactérie très difficile à faire pousser. Elle pousse bien en milieu Bactec 13A (milieu liquide dérivé du milieu 7H₁₂B et réservé aux hémocultures) et pour les autres milieux liquides dans certaines conditions (144). La primoculture à 37° est lente (environ 40 jours) avec des écarts allant de 14 à 67 jours. Les bacilles sont petits, cocco-bacillaires, groupés en amas. Ses repiquages sur milieu 7H₁₁ contenant 2 µg/ml de mycobactine J permettent d'obtenir des colonies d'aspect variable qui en vieillissant ont un aspect comparable à celui de *M. avium*. Aucune culture n'apparaît sur les milieux de Löwenstein Jensen quel que soit la supplémentation.

Les colonies ne sont pas pigmentées. L'uréase est positive en moins d'une heure, la catalase est positive et thermostable, la pyrazinamidase est positive en 30 minutes.

Niacine, nitrate reductase, hydrolyse du twen 80 et arylsulfatase sont négatifs.

La chromatographie en phase gazeuse montre que toutes les souches testées ont le même profil et qu'il se différencie de celui de *M. simiae* par deux acides gras : l'acide cis 10 hexadécénoïque est présent chez *M. genavense* et absent chez *M. simiae* alors que c'est l'inverse pour l'acide 11 cis hexadécénoïque. Par contre, la chromatographie en couche mince des acides mycoliques montre que les deux souches ont le même profil I II IV. Le séquençage de la région hypervariable du gene ARN 16 S montre un profil spécifique. Par la méthode PRA, après digestion par *BstE II*, deux fragments sont obtenus 323 et 120 pb et avec *Hae III*, trois fragments 127 108 et 43 pb sont obtenus.

IV - Ecologie - Epidémiologie

La survenue de cas groupés dans la région de Seattle pendant une courte période pourrait être due à la contamination de l'eau d'alimentation (41). La contamination d'animaux de compagnie a été signalée, les oiseaux de compagnie ou exposés dans des parcs zoologiques mouraient subitement, leurs viscères contenaient des BAAR qui ne se sont pas multipliés sur milieu de Löwenstein. Par contre, l'amplification du ARN 16 S montre les séquences caractéristiques de *M. genavense*. Dans l'étiologie de ces contaminations survenues dans le même zoo (27 au total) la contamination entre les oiseaux n'a pas été retenue. L'hypothèse émise rapporte à l'alimentation en eau des oiseaux l'origine de la contamination. Des adénopathies cervicales provoquées par *M. genavense* ont été observées chez le chien.

L'hypothèse physiopathologique la plus vraisemblable fait évoquer que chez l'immunodéprimé la colonisation intestinale consécutive à une contamination hydrique serait le point de départ des infections disséminées.

V - Traitement

Etant donné l'espérance de vie très courte des patients traités pour l'infection à *M. genavense*, il est difficile de tirer des conclusions sur l'efficacité des traitements antimycobactériens qui ont été pratiqués. On peut toutefois retenir que la prescription d'un traitement antimycobactériens (amikacine, rifampicine ou rifabutine, clarithromycine) peut améliorer l'état des malades et prolonger leur vie. (116).

J - *M. haemophilum*

I - Historique

Décrit pour la première fois en Israël par Sompolinsky (125) qui met en évidence dans le pus d'un abcès sous-cutané survenu chez une malade ayant une maladie de Hodgkin des BAAR qui ne cultiveront que sur des milieux contenant des hématies de mouton hémolysées. C'est une mycobactérie à croissance lente, non pigmentée, qui pousse à 30°C et non à 37°C et qui a besoin de fer.

II - Caractéristiques cliniques (57)

M. haemophilum est à l'origine d'infections cutanées et d'infections généralisées survenant essentiellement chez les immunodéprimés : transplantés rénaux, SIDA, lymphomes. Des adénopathies chez l'enfant immunocompétent ont été décrites. Chez l'adulte, les lésions cutanées sont les plus fréquemment observées. Il s'agit de nodules érythémateux et de lésions ulcératives prédominant aux extrémités. Des arthrites, ténosynovites, ostéomyélites et infections respiratoires ont été rapportées..

Les profils RFLP de l'ADN de souches d'origine géographique variée montrent des différences. Toutefois, la similitude de certains profils permet d'évoquer l'existence d'une source hospitalière commune lors d'infections nosocomiales.

III - Caractères bactériologiques

Les caractères culturels de *M. haemophilum* présentent deux caractéristiques essentielles :

- le besoin en fer est satisfait, soit par l'apport de l'hème provenant de l'hémolyse d'hématies et fourni par des milieux type gélose au sang cuit, soit par l'apport dans le milieu de culture de citrate de fer ammoniacal à concentration finale de 2 %.
- la température optimale de croissance qui se situe entre 30°C et 32°C. *M. haemophilum* ne pousse pas à 37°.

D'où, tout prélèvement d'origine cutanée qui contient des B.A.A.R. doit en routine être inoculé sur un milieu contenant du citrate de fer ammoniacal ou de l'hémine et incubé à 30°C pendant au moins 10 semaines. La croissance est lente mais stimulée par le CO₂ (5 %). Les colonies sont non pigmentées. Les caractères phénotypiques suivants sont habituellement observés : hydrolyse du tween 80 négative, nitrate réductase négative, catalase négative

La chromatographie en couche mince des acides mycoliques ainsi que la chromatographie gazeuse des acides gras après méthylation met en évidence des profils spécifiques.

La méthode PRA permet la mise en évidence de deux fragments après digestion par *BstE* // 325 pb/140 pb et deux fragments après action de *Hae III* 175 pb/115 pb.

L'identification par hybridation sur bandelette (innoLipa) est possible.

IV - Ecologie - Epidémiologie

La présence de *M. haemophilum* dans l'environnement est probable. Il manifeste de larges capacités d'adaptation en particulier au pH. Les amphibiens contaminés par *M. haemophilum* ne meurent d'infection systémique que lorsque leur température est portée à 30°. A température inférieure ils se comportent comme des porteurs, peut-être véhiculent-ils *M. haemophilum* ? La diffusion du germe se ferait après à l'occasion d'une infection systémique qui se réaliserait à température plus élevée et entraînerait leur mort. Le citrate de fer ammoniacal qui est susceptible de remplacer avantageusement l'hématine est largement répandu dans la nature. Ainsi, l'eau, comme c'est le cas pour de nombreuses mycobactéries, pourrait être la source de contamination de l'immunodéprimé.

V - Traitement

L'étude *in vitro* de la sensibilité de *M. haemophilum* aux antibiotiques n'a pas été standardisée et sa corrélation entre les tests *in vitro* et l'efficacité *in vivo* n'est pas établie. De plus, on ne sait pas comment interfère, *in vitro*, avec les antibiotiques, la présence de citrate de fer ammoniacal.

Enfin, l'association rifampicine ciprofloxacine et clarithromycine apparaît l'association qui actuellement aurait les meilleures chances de succès (159).

K - *M. malmoense*

I - Historique

En 1977, Schroder et Johlin, à Malmö (Suède), décrivent une nouvelle espèce : *M. malmoense*, à partir de l'étude de 7 isollements cliniques réalisés en Suède chez des malades immunocompétents présentant des signes cliniques et radiologiques d'infection pulmonaire (10). Puis des cas sont décrits en Europe du Nord. En Suède, Finlande, Angleterre, la fréquence élevée des infections pulmonaires provoquées par *M. malmoense* en fait, vers 1990, la seconde mycobactériose après *M. tuberculosis*. Dans les autres pays européens les cas restent sporadiques. Comme c'est le cas aux Etats-Unis, le nombre d'infections répertoriées par le CDC et provoquées par *M. malmoense* est très faible 0,07 % des isollements.

Chez l'immunodéprimé séropositif pour le VIH alors que les isollements de mycobactéries sont assez fréquents, les infections disséminées provoquées par *M. malmoense* restent plutôt rares (205) même en Angleterre et en Suède où le germe est plus fréquemment isolé.

II - Caractéristiques cliniques

La localisation pulmonaire est de loin la plus fréquente. Des facteurs prédisposants sont signalés : pneumoconiose, antécédents de tuberculose, tabagisme, bronchite chronique, emphysème, asthme. Pour Banks (8), sur 34 malades, 22 ont une maladie survenant sur un terrain modifié par une maladie pulmonaire chronique, 6 ont reçu des traitements immunosuppresseurs (corticothérapie), alors que pour les 6 derniers, on ne signale pas de tare associée.

En seconde position se placent les adénopathies. Il s'agit de nodules cervicaux survenant chez l'enfant et évoluant comme un abcès froid.

Enfin, viennent les infections disséminées, les formes cutanées, les ténosynovites et ostéites sont plus rares.

III - Caractères bactériologiques

M. malmoeense pousse lentement, en 6 à 8 semaines sur milieu de Löwenstein Jensen. Il pousse mieux en présence de pyruvate 5g/l ou sur milieu de Coletsos. Sur ces milieux, les colonies sont petites, lisses, non pigmentées.

En milieu liquide les délais d'obtention de la culture sont considérablement réduits (entre 10 et 20 jours).

M. malmoeense pousse mieux à 30°C et à pH6.

Les tests biochimiques montrent que le tween 80 est hydrolysé en 10 jours ; la catalase est thermolabile ; La bactérie est dépourvue : d'uréase, de β -galactosidase, de phosphatase acide, de nitrate réductase ; il ne produit pas d'acide nicotinique.

La chromatographie en couche mince montre un profil d'acides mycoliques de type I II IV. La chromatographie en phase gazeuse met en évidence des esters de pyrolyse en C26. Enfin, on met en évidence des marqueurs taxonomiques intéressants, il s'agit des acides polyméthylramifiés C21r et C27r qui ne sont rencontrés que chez *M. malmoeense*.

L'analyse du polymorphisme de restriction met en évidence trois fragments de 245/120/100 pb après digestion par *BstE II* et trois fragments 155/110/70 pb après digestion par *Hae III*.

L'identification après hybridation sur bandelette est possible.

IV - Ecologie - Epidémiologie

M. malmoeense a été isolé de l'environnement de l'eau en Finlande ; du sol au Japon ; mais ces isolements restent rares.

Il a été isolé des matières fécales de malades HIV mais aussi des selles de personnes en bonne santé.

V - Traitement

Le nombre d'études sur ce sujet est faible. Il semble ressortir de différentes études que l'association isoniazide rifampicine éthambutol pendant 12 à 24 mois soit le meilleur schéma thérapeutique.

La CMI moyenne de *M. malmoense* à la clarithromycine est faible : inférieure à 1 µg/ml.

Pour plusieurs auteurs, le rôle de l'éthambutol est important, son association avec la rifampicine est très bactéricide *in vitro* (79).

L – Le complexe *terrae*

I - Historique

Le complexe *terrae* a été isolé en 1950 par Richmond et Cummings (146) à partir de l'eau de lavage de radis d'où son nom *Radish bacillus* et fut considéré comme un saprophyte. Wayne (192) l'isole de tubages gastriques de sujets suspects de tuberculose pulmonaire mais n'obtient aucune preuve de son pouvoir pathogène. Il le décrit comme un germe normalement présent dans la terre et lui donne le nom de *M. terrae*.

En 1973, Cianciulli (34) décrit une atteinte pluriviscérale survenant chez une patiente de 21 ans, un an après une miliaire tuberculeuse.

Actuellement, le complexe *terrae* regroupe *M. terrae*, *M. non chromogenicum* et *M. triviale*.

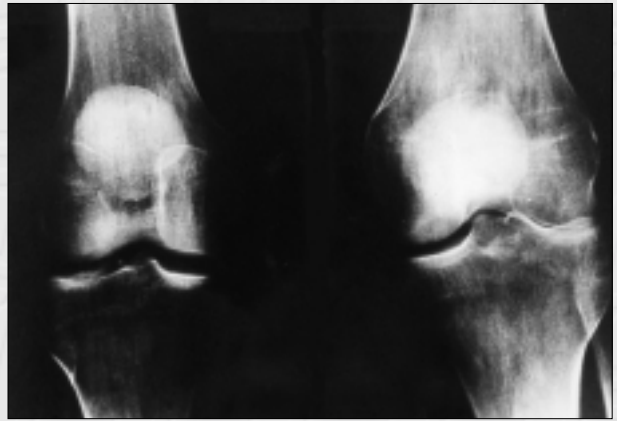
II - Caractéristiques cliniques

Les infections provoquées par le complexe *terrae* sont rares.

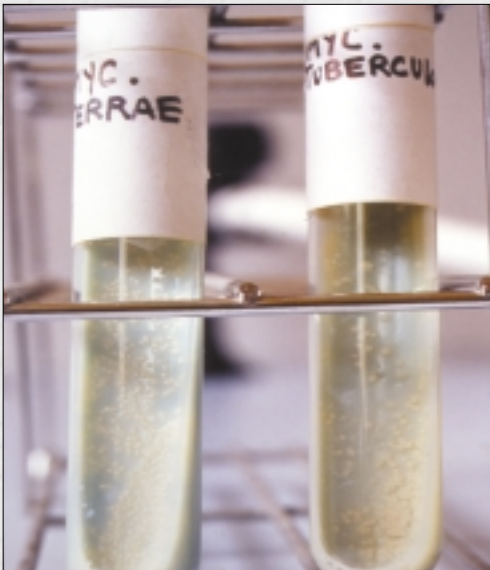
Dans une revue de la littérature portant sur 54 cas d'infections à *M. terrae*, Smith (162) considère que les infections les plus fréquentes siègent aux extrémités des membres supérieurs impliquant le bras, les poignets, les mains, les doigts (59 %). Il s'agit le plus souvent de ténosynovites dont la symptomatologie est comparable à celle des ténosynovites tuberculeuses (87).

Les caractéristiques cliniques essentielles sont les suivantes : les lésions siégeant à la face palmaire sont indolores, à évolution lente et torpide, se fistulisent dans le tiers des cas. Elles ne s'accompagnent ni de fièvre ni d'adénopathies ni d'atteinte de l'état général.

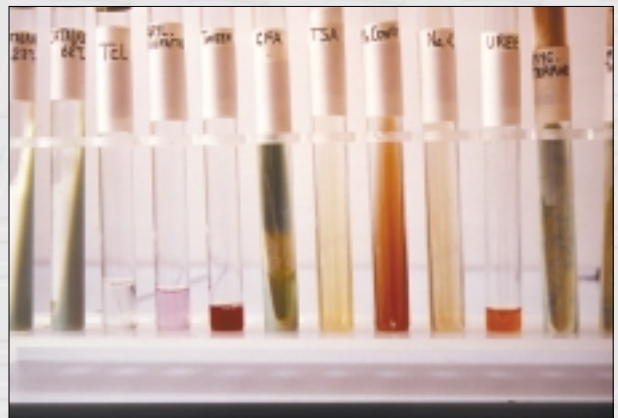
Des atteintes articulaires sont signalées, soit après infiltrations de corticoïdes ou de blessures souillées de terre où *M. triviale* est en cause (47). Des infections pulmonaires cavitaires provoquées par *M. non chromogenicum*, survenant sur un poumon antérieurement lésé, ont été décrites par Tsukamura (179).



Lésions ostéoarticulaires du genou provoqués par *M. terrae* chez une femme de 40 ans non immunodéprimée après blessure articulaire. Remarquer le pincement artériel et la lésion condylienne.



Aspect des colonies de *M. tuberculosis* et de *M. terrae* sur milieu de Löwenstein Jensen.



Galerie d'identification de *M. terrae*. Catalase positive thermostable, pas de réduction du tellurite, arylsulfatase positive, hydrolyse du tween 80 positive, citrate de fer ammoniacal négatif.

III - Caractères bactériologiques

Les mycobactéries du complexe *terrae* poussent lentement et donnent des colonies non pigmentées, habituellement rugueuses, sur milieu de Löwenstein Jensen qui ressemblent aux colonies de *M. tuberculosis*. Elles appartiennent au groupe III de la classification de Runyon. Elles poussent à 25°C, à 37°C mais pas à 45°C. Ces trois espèces ont une activité métabolique élevée. Les caractères biochimiques différentiels figurent dans le (tableau V1).

M. terrae possède les mycolates I et VI mis en évidence sur les profils de chromatographie en couche mince, en chromatographie phase gazeuse l'ester de pyrolyse prépondérant est en C₂₄.

Sur le plan génétique, les trois espèces du complexe ont un profil des ARN 16S qui les différencie nettement des autres espèces, et qui, au sein du complexe, les unes des autres. Ainsi, par la méthode PRA, il est possible de différencier les espèces.

<i>BstE II</i>	<i>Hae III</i>	
Pas de digestion	180/140	<i>M. triviale</i>
325/120	190/140	<i>M. terrae</i>
245/120/80	155	<i>M. non chromogenicum II</i>
245/120/80	160	<i>M. non chromogenicum I</i>

IV - Ecologie - Epidémiologie

Les mycobactéries du complexe *terrae* sont présentes dans l'environnement hydrotellurique. Elles ont été isolées de la terre, des végétaux et de l'eau d'alimentation et sont géographiquement très répandues.

L'homme se contamine à la suite de blessures souillées de terre. Des infections iatrogènes après infiltrations avec corticoïdes ont été signalées.

Les infections sont rares.

V - Traitement

Les mycobactéries du complexe *terrae* ne sont sensibles qu'à un petit nombre d'antibiotiques *in vitro*. Dans l'étude de Smith (162), toutes les souches testées sont sensibles à l'azithromycine CMI < 32 µg/ml à la clarithromycine, seulement 57 % le sont à l'amikacine et 50 % à la streptomycine.

Pratiquement, toutes sont résistantes à la rifampicine à l'isoniazide, à la clofazimine et aux fluoroquinolones.

En pratique, le traitement devra toujours associer la chirurgie à une antibiothérapie qui pourrait comporter : macrolide, azithromycine ou clarithromycine associée à éthambutol ou rifampicine.

Tableau V1 : Caractères biochimiques des espèces appartenant au Complexe *terrae*.

	<i>M. non chromogenicum</i>	<i>M. terrae</i>	<i>M. triviale</i>
Culture 25°C	+	+	+
Culture 37°C	+	+	+
Culture 45°C	-	-	-
Catalase > 45 mm	+	+	+
Catalase thermostable	+	+	+
Hydrolyse Tween 80	+	+	+
Phosphatase acide	+	+	+
Betagalactosidase	+	+	+
Aryl sulfatase 10j	+	±	±
Nitrate reductase	-	-	+
Culture NaCl 5 %	-	-	+
Réduction du tellurite 10j	-	+	-

M - *M. ulcerans*

I - Historique

Dès 1897, Sir Robert Cook décrivait dans l'Est Africain des infections cutanées tout à fait semblables à ce que l'on connaît actuellement de la clinique de l'ulcère de Buruli (81). C'est à Bairnsdale, ville du sud-est australien, qu'en 1940, Mac Callum observe, chez un enfant présentant un ulcère de jambe, une mycobactérie. Il isole le germe après incubation à 30°C et le dénomme "Bacille de Bairnsdale". Il observe plusieurs cas similaires et rapporte ses observations en 1948 dans une revue complète sur la question (110). Suite aux travaux expérimentaux sur l'animal menés en 1950 par Tolburst (177), le bacille sera débaptisé et prendra le nom de *M. ulcerans*, plus conforme aux exigences de la taxonomie.

En Ouganda, en 1961, Clancey observe (35) à proximité de la ville de Buruli, de nombreux cas d'ulcérations cutanées qu'il dénommera ulcère de Buruli. Malgré de nombreux éponymes issus d'observations géographiques variées, c'est sous le terme d'ulcère de Buruli que l'on range actuellement les infections cutanées provoquées par *M. ulcerans*. Dans les années suivantes, le nombre des observations augmentera, l'épidémie observée en 1970 dans le camp de réfugiés de Kinyara et rapportée par le "Uganda Buruli Group" (181) attirera l'attention pour la première fois sur la relation entre zone humide et survenue d'ulcère de Buruli, évoquera l'éventuelle responsabilité d'une plante aquatique et retiendra un possible effet protecteur de la vaccination par le BCG (180).

A partir des années 1980, l'attention sera attirée sur l'Afrique de l'Ouest où de nombreux cas sont décrits (dans les pays situés autour du Golfe de Guinée), Bénin, Cameroun, Congo, Côte d'Ivoire, Ghana, Gabon, Liberia, Nigéria, Togo (43, 115). Dans ces pays, le nombre des cas augmente de façon dramatique ainsi, au Bénin, où le nombre des cas recensés en 1990 ne dépassait pas la vingtaine, il atteignait 3600 en 2000. Des observations provenant de nombreux pays sont



Mycobacterium ulcerans

- A - Forme nodulaire de début.
- B - Forme oedémateuse.
- C - Lésion ulcérate de la cheville et oedème du membre.
- D - Ulcération du bas du dos.

publiées (5) ([Tableau V2](#)), l'Amérique du Nord et l'Europe ne signalent que des rares cas importés par des immigrants ou par des touristes en provenance des zones d'endémie.

En 1999, George (62) obtient la toxine purifiée et étudie ses propriétés. En 2000, Dega et Grosset mettent en évidence l'action bactéricide de l'association rifampicine-amikacine (50).

En 2001, Marsollier démontre le rôle des punaises d'eau dans la transmission de *M. ulcerans* et celui des plantes aquatiques comme réservoir de germe. Il établit un cycle épidémiologique de transmission (114).

II - Caractères cliniques

M. ulcerans est essentiellement un germe à tropisme cutané. Cependant, ces dernières années il a été incriminé dans des ostéomyélites apparemment primitives.

1° Les formes cutanées évoluent en trois étapes

a) Phase pré-ulcéralive

Précoce, non douloureuse, elle est souvent négligée par les malades. Elle peut prendre plusieurs aspects.

1° La forme nodulaire : la plus fréquente, elle est caractérisée par un nodule dur unique adhérent à la peau, indolore parfois prurigineux. L'épiderme recouvrant ce nodule est souvent hyperpigmenté.

2° La forme œdémateuse : moins fréquente mais d'emblée plus grave, se présente comme un œdème d'apparition brutale ou progressive. Les tissus sont infiltrés. Parfois chaud et douloureux, il a tendance à s'étendre, intéressant un segment de membre voire le membre tout entier. Il s'agit d'une panniculite nécrosante d'emblée préoccupante (5).

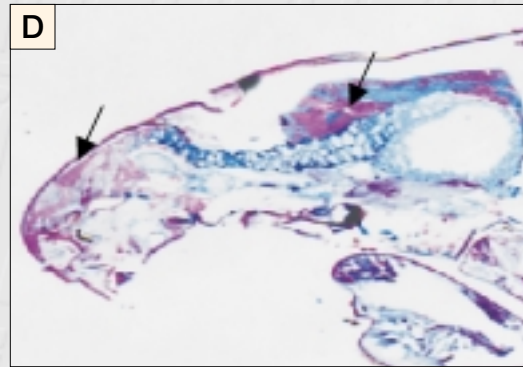
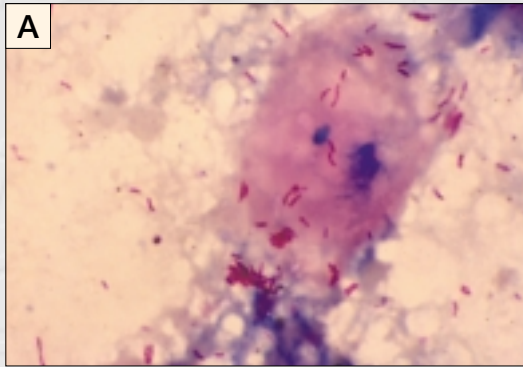
3° D'autres manifestations plus rares, de début de l'ulcère de Buruli peuvent s'observer. Les formes papuleuses et bulleuses et le placard cutané banal reposant sur une base œdémateuse et au sein duquel apparaîtra une ulcéralion.

b) La phase ulcéralive

Progressivement pendant une période de quelques semaines à plusieurs mois, le nodule s'étend, l'épiderme se ramollit et en quelques jours la nécrose apparaît donnant naissance à une ulcéralion qui progresse de façon centrifuge. Le derme et le fascia profond sont envahis, le tissu graisseux sous-cutané se lyse. La lésion laisse suinter un liquide nécrotique.

L'ulcéralion constituée a un aspect caractéristique : ses bords sont irréguliers et largement décollés du plan sous-jacent musculo aponévrotique, ce qui fait que l'ulcéralion réelle est d'une surface largement supérieure à celle de l'ulcéralion cutanée apparente.

Le fond de l'ulcère est plus au moins propre selon le degré de surinfection. Elle est peu douloureuse et ne s'accompagne pas de signes généraux. C'est souvent à cette phase que le malade vient consulter. La biopsie réalisée sur le tissu cutané périphérique ou le prélèvement à l'écouvillon sous les berges de l'ulcère permettent la mise en évidence des bacilles acido-alcool-resistant. Plusieurs lésions peuvent fusionner et s'étendre à l'ensemble d'un membre.



Mycobacterium ulcerans

- A - Aspect des bacilles souvent groupés en amas, coloration de Ziehl Neelsen.
- B - Colonies de *M. ulcerans* sur milieu de Löwenstein Jensen.
- C - Lésion inflammatoire de la queue de la souris 5 semaines après injection de 10^4 bacilles.
- D - Naucoris dont les glandes salivaires sont contaminées.



c) Phase de cicatrisation

En l'absence de traitement après une phase d'extension d'une durée variable, des bourgeons charnus apparaissent sur fond de l'ulcération. Les lésions cessent de s'étendre, la cicatrisation débute. Elle est lente et peut aboutir en quelques mois à la guérison au prix de séquelles d'autant plus lourdes que les lésions étaient plus étendues. Elles mettent en jeu le pronostic fonctionnel et esthétique. Dans d'autres cas, les lésions évoluent de façon chronique avec de fréquentes rechutes.

2° Les formes osseuses : arthrites, ostéites, ostéomyélites

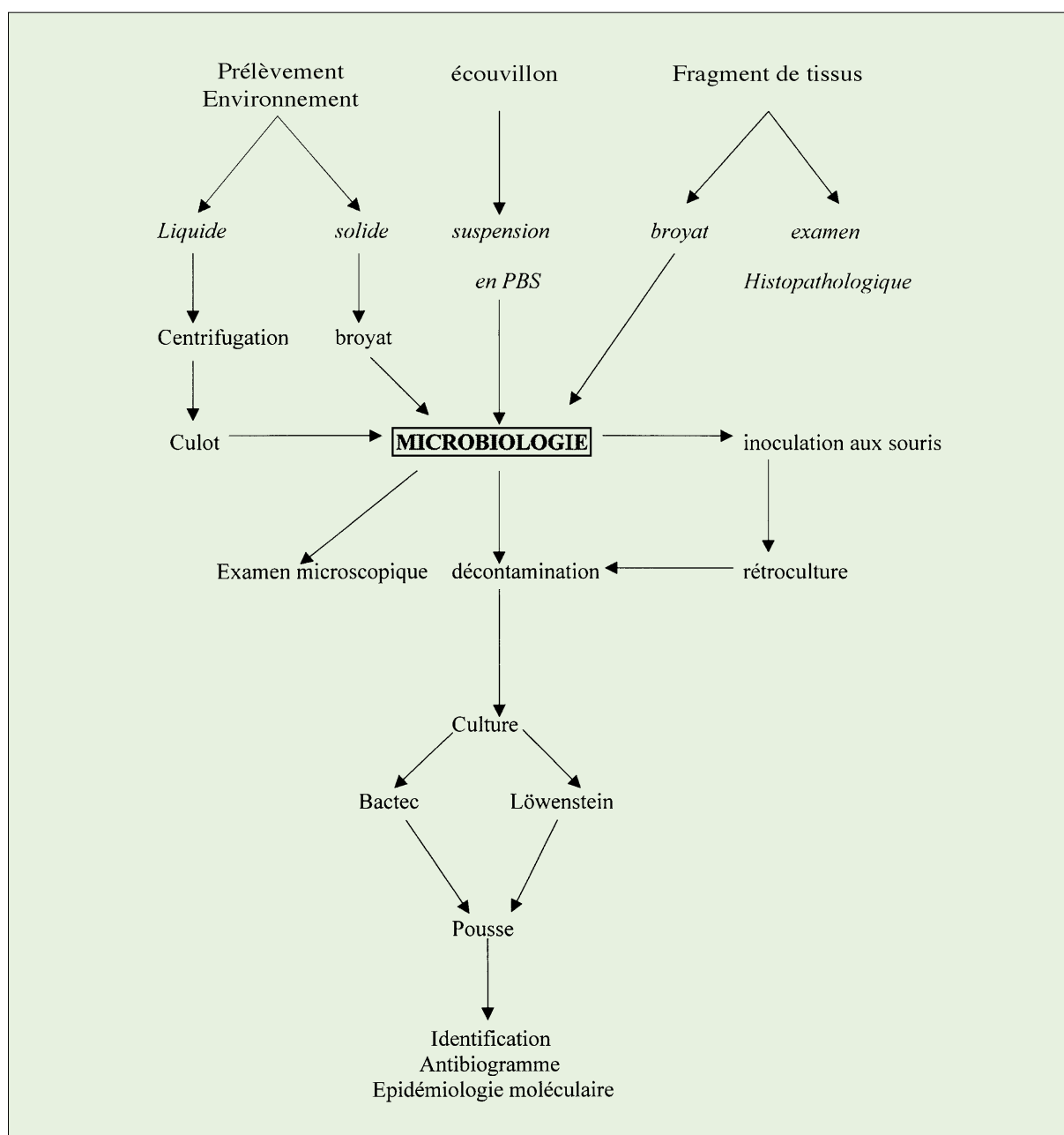
Elles ne sont pas rares. S'il est facile d'expliquer les infections ostéoarticulaires qui se développent à proximité d'une ulcération, il est par contre plus difficile d'expliquer les authentiques ostéomyélites primitives qui ont été décrites (99). En effet, la diffusion par voie hémotogène ou par voie lymphatique dans la profondeur de l'os sont incompatibles avec la température de croissance de *M. ulcerans*, il faut imaginer une éventuelle adaptation de la souche à des températures plus élevées. Le même phénomène a été relevé avec un certain nombre d'infections profondes provoquées par *M. marinum*. Toujours est-il que ces infections osseuses peuvent conduire à l'amputation (36).

III - Caractères bactériologiques (138)

- *M. ulcerans* est une espèce à croissance très lente, non pigmentée qui est classée dans le groupe III de Runyon.
- Après coloration de Ziehl, les bacilles sont de taille variable de 3 à 10 µm. Dans les prélèvements, ils sont souvent groupés en amas comparables aux globi observés dans la lèpre.
- Les caractères cultureux sont importants pour l'identification du germe. La culture est difficile, lente (de 6 semaines à plusieurs mois). *M. ulcerans* ne pousse pas à 37° mais entre 29 et 32°. Sur milieu à l'œuf (Löwenstein Jensen), les colonies sont rugueuses, légèrement pigmentées en jaune. Cette pigmentation scotochromogène n'est pas constante. Une même culture peut donner naissance à des colonies pigmentées et non pigmentées. *M. ulcerans* pousse sur milieu de 7H₁₂B mais sa pousse n'est pas plus rapide que sur milieu à l'œuf.
- Les caractères d'identification biochimique sont d'une grande pauvreté et de plus ils varient selon la provenance géographique des souches. Toutes les souches poussent en présence de TCH. Quand elles possèdent une catalase, celle-ci est thermostable. Les souches africaines et australiennes poussent en présence de 250 µg d'hydroxylamine. Les souches africaines peuvent produire une phosphatase acide. La présence d'une uréase et d'une accumulation d'acide nicotinique est possible mais peu fréquente (137).

- L'inoculation de 10^4 germes dans le coussinet plantaire de la souris ou dans la queue est suivie d'une réaction inflammatoire importante qui apparaît 4 à 5 semaines après l'inoculation des souches américaines et plus tardivement (8 à 9 semaines) chez les souches africaines. Des ulcérations se développent, la mort de l'animal survient vers la 12^{ème} semaine par surinfection. Ce pouvoir pathogène est le fait des souches toxigènes. Les mutants non toxigènes sont non pathogènes (62). La mise en évidence du pouvoir pathogène expérimental chez la souris est un bon test d'identification.
- Le profil des acides mycoliques par chromatographie en couche mince de type I, III, IV avec un ester de pyrolyse prépondérant à 24 atomes de carbone est retrouvé chez toutes les souches mais ne permet pas de différencier *M. ulcerans* et *M. marinum*.

Figure n° V1 : Mise en œuvre des modalités du diagnostic microbiologique à partir de prélèvements susceptibles d'héberger *M. ulcerans*.



Compte tenu des difficultés de la culture et de l'identification des souches, les méthodes moléculaires prennent pour ce germe toute leur importance. Représentée à de très nombreux exemplaires dans le génome, la séquence d'insertion *IS2404* est spécifique de *M. ulcerans*. Elle n'est retrouvée, ni dans les souches du complexe *tuberculosis*, ni chez *M. leprae*, ni surtout chez 45 espèces de mycobactéries différentes (151). La PCR est donc un moyen facile, fiable, rapide d'identification des souches et de détection du germe dans les prélèvements provenant de tissus animaux ou de l'environnement. Après amplification du gène *hsp 65 KDA*, la méthode PRA ne permet pas de différencier *M. ulcerans* de *M. marinum*. Toutes les deux montrent, après action de *BstE II* deux fragments 245 et 220 pb et après digestion par *Hae III*, trois fragments 160, 115, 80 paires de bases. L'hybridation sur bandelettes ne permet pas de différencier *M. marinum* de *M. ulcerans*.

IV - Ecologie - Epidémiologie

Les infections provoquées par *M. ulcerans* se manifestent en Afrique de l'Ouest comme une maladie émergente. En 2002, à l'occasion de la 5^{ème} réunion du groupe consultatif de l'OMS sur l'ulcère de Buruli, tous les pays font état d'une augmentation du nombre des cas. Elle est certainement due à un meilleur dépistage compte tenu de la mise en œuvre des programmes nationaux mais aussi elle est liée à une augmentation réelle de l'incidence (tableau V2).

Tableau V 2 : Incidence et prévalence de l'ulcère de Buruli dans cinq pays d'Afrique de l'Ouest.

	Cas cumulés	Nouveaux cas en 2001
Bénin	4374 de 1988 à 2001	478 et 34 rechutes
Côte d'Ivoire	12033 de 1978 à 2001	562
Ghana	3388 de 1993 à 2001	621
Guinée	442 de 1995 à 2001	221
Guyane Française	193 en 2001	17

Hormis l'Europe et l'Amérique du Nord, tous les continents sont atteints. Les souches provenant des différents continents ont des variations génétiques (137) et phénotypiques légères. Hayman (73) propose l'explication suivante : issues d'un ancêtre commun ancien, les souches auraient été séparées par la dérive des continents et auraient évolué chacune pour son compte dans des environnements différents.

Quoi qu'il en soit, c'est dans les zones humides que l'on trouve les infections provoquées par *M. ulcerans*. Mais dans les zones humides l'incidence de la maladie est éminemment variable : nulle à certains endroits, atteignant 22 % de la population à d'autres endroits (5). D'autres facteurs doivent intervenir. Pour Barker (9) ce sont les plantes qui sont le réservoir de microbes. Pour Hayman (72) c'est la déforestation qui est la cause des infections à *M. ulcerans*. Les auteurs australiens (90) ont suggéré que *M. ulcerans* pourrait être transmis par aérosols produits par l'arrosage d'un terrain de golf avec de l'eau d'un marécage. Récemment, Marsollier (114) a démontré que *M. ulcerans* colonisait les plantes aquatiques sur lesquelles il forme des biofilms, que les escargots aquatiques étaient capables de brouter ces herbes et de se contaminer, ils sont alors porteurs du germe. Attaqués et dévorés par les insectes carnivores présents dans les marécages (Naucoris, Nepes,

Belostomides) ces escargots infectent les insectes chez lesquels *M. ulcerans* se développe dans les glandes salivaires. Très agressifs, ces insectes sont capables de piquer l'homme qui fréquente ces marécages et de lui transmettre l'infection au point de piqûre où le micro-organisme se multipliera. Dans les zones d'endémie, les enfants sont le plus souvent atteints. Les lésions peuvent chez eux se développer sur tout le corps. Chez l'adulte, les ulcérations atteignent essentiellement les membres.

V - Traitement (21)

1° Sensibilité aux antibiotiques

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques par la méthode décrite par Heifets (75) montre que *M. ulcerans* est résistant à l'isoniazide et à l'éthambutol. Il est sensible aux ansamycine (rifampicine rifabutine), à l'Amikacine et Streptomycine, à la Clarithromycine et aux Fluoroquinolones. Cette sensibilité *in vitro* n'est pas confirmée par les études de chimiothérapie expérimentale réalisées chez la souris (50) puisque seuls amikacine et rifampicine sont bactéricides pris isolément et en association. L'utilisation de la rifampicine isolément permet, *in vivo*, la sélection de mutants résistants imposant, pour le traitement, une bithérapie. Des essais chez l'homme de l'efficacité du traitement rifampicine aminoside sont actuellement menés au Ghana.

2° Le traitement chirurgical

Le traitement chirurgical est actuellement le seul à être reconnu. Il consiste en l'exérèse large, en tissu sain, des tissus nécrosés, suivi si besoin de greffe cutanée. Celle-ci est bien souvent nécessaire car les malades viennent souvent consulter trop tardivement, au stade où les ulcérations sont largement constituées, ce qui non seulement pose des problèmes immédiats de traitement mais aussi est à l'origine de séquelles, de rétractions, d'impotences fonctionnelles, qu'il faudra traiter par la chirurgie réparatrice dans les suites de l'évolution.

N – *M. xenopi*

I - Historique

M. xenopi a été isolé en 1959 par Schwabacher (157) de lésions cutanées observées chez un crapaud *Xenopus laevis* d'où son nom "*M. xenopi*". Son pouvoir pathogène pour l'homme n'a pas été reconnu avant 1965.

II - Caractéristiques cliniques (49)

Chez l'homme *M. xenopi* est en premier lieu responsable d'infections pulmonaires survenant en particulier chez des sujets ayant des antécédents d'affection pulmonaire (bronchopneumopathie obstructive, fumeurs, tuberculeux). En France, quel que soit le statut VIH, 77 % des infections observées sont des infections pulmonaires. Les signes cliniques ne sont pas spécifiques (toux chronique, crachats abondants, fatigue), ce qui rend le diagnostic clinique difficile sans l'apport du laboratoire. Plus rarement, malaise, dyspnée, fièvre, hémoptysies et perte de poids sont retrouvés.

Les infections osseuses et ostéoarticulaires sont souvent iatrogènes. Entre 1989 et 1999, 58 cas de spondylodiscites ont été observés chez des sujets ayant subi des nucléotomies percutanées ou une microchirurgie du rachis pour pathologie discale. Wolinski (199) décrit des infections génito-urinaires.

Des infections disséminées chez les malades HIV sont rapportées.

III - Caractères bactériologiques

M. xenopi se présente après coloration de Ziehl comme des bacilles longs et fins.

Sa pousse est lente. L'optimal de croissance est entre 40°C et 45°C. Il ne pousse pas à 28°C.

Les cultures jeunes ne sont pas pigmentées. La pigmentation jaune apparaît en vieillissant. Les colonies restent petites.

L'identification biochimique met en évidence l'absence de production d'acide nicotinique (niacin test négatif), absence de nitrate reductase, d'urease, de phosphatase acide, de betagalactosidase et d'hydrolyse du tween 80.

Il possède une catalase thermostable et une arylsulfatase très active en 3 jours. C'est un caractère différentiel important avec *M. avium*.

Son profil d'acides mycoliques en couche mince montre les mycolates I et VI avec présence d'un alcool secondaire. En chromatographie phase gazeuse, l'ester de pyrolyse en C₂₆ prédomine.

Le profil d'analyse du polymorphisme de restriction met en évidence trois fragments 245/120/80 pb après digestion par *BstE II* et deux fragments 170/105 pb après digestion par *Hae III*.

Son identification est possible par hybridation sur bandelettes.

IV - Ecologie - Epidémiologie

La fréquence d'isolement de *M. xenopi* qui est très variable selon les pays, faible aux USA, en Australie, au Japon, est beaucoup plus fréquente au Canada et en Europe (172).

M. xenopi se trouve dans l'eau. Des souches ont été isolées des réseaux d'eau chaude au niveau des robinets et des pommes de douche, ce qui s'explique par la température de croissance de cette espèce.

Chez les malades séronégatifs pour le VIH où l'infection pulmonaire est la règle, on peut penser à une contamination par aérosol contaminé comme on l'observe pour *Legionella*.

Chez les malades séropositifs pour le VIH, l'infection généralisée peut trouver son origine, soit au niveau d'une porte d'entrée pulmonaire, soit d'une porte d'entrée digestive.

Une mauvaise pratique de désinfection du matériel chirurgical rincé après désinfection par de l'eau du réseau contenant de nombreux *M. xenopi* a été à l'origine de nombreux cas de spondylodiscites iatrogènes (49).

De nombreux isollements réalisés dans la région du Havre entre 1960 et 1970 auraient attribué l'origine de la contamination humaine au portage chez des oiseaux de mer (52).

V - Traitement

In vitro, la plupart des souches de *M. xenopi* sont résistantes aux antituberculeux classiques (172). Actuellement, les nouvelles molécules telles que la clarithromycine et les fluoroquinolones ont des CMI compatibles avec une certaine activité *in vivo*.

Le C.CLIN Paris-nord propose les recommandations thérapeutiques suivantes pour le traitement des infections ostéoarticulaires (2) :

Molécules indispensables en 1^{ère} intention : clarithromycine fluoroquinolone associé à rifampicine et éthambutol. Les traitements ont une durée minimum de 12 mois, les résultats obtenus sont variables.

O - Mycobactéries à croissance rapide

I - Historique

Les mycobactéries à croissance rapide forment un ensemble complexe dont les souches, d'origine environnementale, sont susceptibles de provoquer des infections chez l'homme. L'origine de ce groupe remonte à 1903 quand Friedmann, à Berlin, isole deux bacilles paratuberculeux responsables d'une maladie pulmonaire de la tortue. Ce bacille sera utilisé comme vaccin contre la tuberculose, son nom déposé "anningzochin" est, en France, plus connu sous le nom de vaccin de Friedmann. Son efficacité clinique n'a jamais été démontrée. Cette espèce dénommée ensuite *M. chelonae* et maintenant *M. chelonae* a regroupé sous son nom les souches initialement décrites sous les dénominations de *M. abscessus*, *M. borstelense*, *M. runyonii*, *M. salmonophilum* (175).

Sur la base de différences phénotypiques et génétiques, deux sous espèces sont décrites : *M. chelonae chelonae* et *M. chelonae abscessus* (105). En 1982, est rattachée à l'espèce *M. chelonae* une espèce isolée d'une épidémie de péritonite survenant chez des dialysés et provoquée par une mycobactérie provisoirement désignée *M. chelonae* like organism (MCLLO) (7). Actuellement, (18) trois espèces sont individualisées : *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. immunogenum* et constituent le groupe *chelonae abscessus*.

En 1905, Kuster isole du foie d'une grenouille une mycobactérie. Le bacille de Kuster fut appelé *M. ranae*. En 1950, Darlins décrit une épidémie de "tuberculose" chez des gias (grenouilles géantes du Brésil) : il isole *M. giae*.

Penso en 1952 reprend l'étude des quatre souches isolées en 1932 par Minetti d'ostéopathies et d'adénopathies méésentériques du bétail et les dénomme *M. minetti*. En 1938, Cruz avait isolé, d'un abcès après injection intramusculaire de vitamines, une mycobactérie qu'il dénomme *fortuitum*. Runyon (153) retiendra ce nom et montrera que *M. ranae*, *M. giae*, *M. minetti* sont identiques (64) à *M. fortuitum*. L'espèce *M. fortuitum* a été subdivisé en 2 sous espèces *M. fortuitum fortuitum* et *M. fortuitum peregrinum* auxquelles avait été rattaché un troisième biovariant différencié en deux biotypes selon qu'ils utilisent ou non le sorbitol (94).

Actuellement, le groupe *fortuitum* comprend essentiellement les espèces *M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. mucogenicum*, *M. senegalense* (18).

II - Caractères cliniques

- Dans les infections respiratoires *M. abscessus* est le plus souvent retrouvé 80 % des cas. La plupart des cas ont été observés dans le sud des USA le long de la côte atlantique. L'infection est retrouvée chez des personnes âgées et des femmes non fumeur et non alcoolique, ce qui les différencie des autres mycobactérioses pulmonaires qui surviennent souvent sur un parenchyme pulmonaire modifié par diverses affections ou infections pulmonaires. Les signes cliniques les plus fréquents sont une toux chronique et une importante sécrétion bronchique. A la radio sont observés des infiltrats des sommets 90 % des cas, des cavités sont observées dans 15 % des cas.

M. fortuitum et *M. chelonae* ont été isolées de crachats de malades atteints de mucoviscidose. On ne sait pas actuellement quelle est la signification clinique de ces isollements mais des décès ont été rapportés à *M. fortuitum*.

- Les infections cutanées primitives sont fréquentes. Les lésions se présentent, soit comme des nodules rouges foncés peu douloureux et presque toujours consécutifs à un traumatisme survenu dans les mois qui ont précédé, soit comme des abcès ou comme une cellulite localisée. Elles peuvent se compliquer d'atteinte osseuse de voisinage. Wallace signale 6 cas d'ostéomyélite sur 34 infections cutanées. *M. chelonae* et *M. abscessus* sont impliqués (189).

- Les infections disséminées (84), c'est-à-dire avec de multiples abcès, où l'implication d'un organe (poumon par exemple) avec des hémocultures ou myélocultures positives ne sont pas fréquentes. Elles sont décrites chez des malades sans tare apparente mais dans 80 % des cas, une maladie sous-jacente (greffe rénale, hémodialyse chronique, maladie de Horton, sarcoïdose, cancers) ou une infection par le VIH sont retrouvées. Elles s'accompagnent souvent de fièvre et de manifestations cutanées. *M. chelonae* est plus fréquemment impliqué (70 %) que *M. fortuitum*. Des infections nosocomiales (188) ont été rapportées dans les suites de chirurgie cardiaque : suppurations sternales, endocardites après pose d'une valve et contamination du site de prélèvement de la veine. *M. fortuitum* est retrouvé dans 2/3 des cas. *M. chelonae abscessus* a été retrouvé dans 5 cas groupés de malades hémodialysés (108). Des mycobactéries à croissance rapide ont été mises en évidence dans une épidémie de péritonites après dialyse péritonéale et le germe était présent dans les machines et dans l'eau, elles ont été également incriminées dans des greffes de cornée.

III - Caractères bactériologiques (186)

Depuis 1986, les études génomiques hybridation ADN-ADN, analyse des ARN 16S ont permis d'établir une classification plus précise des mycobactéries à croissance rapide. Les caractères des différentes espèces sont colligés dans le (tableau V 3).

La chromatographie en couche mince des acides mycoliques montre que *M. fortuitum* possède les mycolates de type I, II et V que *M. chelonae* possède les mycolates de type I et II.

Le séquençage des ARN 16S (94) permet une différenciation de la plupart des espèces et sous-espèces. Après amplification du gène *Hsp 65* et digestion par les enzymes *BstE II* et *Hae III*, les profils suivants sont obtenus par la méthode PRA.

	<i>BstE II</i>	<i>Hae III</i>
Groupe fortuitum		
<i>M. fortuitum</i>	235/133/87	137/117/58
<i>M. peregrinum</i>	235/213	145/138/95/54
Groupe chelonae		
<i>M. chelonae</i>	318/131	200/60/55
<i>M. abscessus</i>	235/213	145/74/62/55

L'hybridation sur les bandelettes permet l'identification des espèces les plus fréquemment rencontrées en pathologie.

L'identification précise des espèces sous espèces et biovariants n'a pas que des justifications taxonomiques mais elle a des répercussions importantes dans les indications thérapeutiques. Les différents membres du groupe *fortuitum* ont, des sensibilités variables aux antibiotiques. (cf tableau V 4).

IV - Ecologie - Epidémiologie

Les mycobactéries du groupe *fortuitum* sont largement représentées dans l'environnement hydrique : rivières, lacs, eau de mer, eaux usées mais également des réseaux d'eau potable. Leur résistance au chlore leur permet de survivre dans les canalisations d'eau. Ils sont capables de s'organiser en biofilms. *M. chelonae* a été isolé de l'eau d'un établissement, la même souche a pu être isolée de malades après pontage coronarien (188). *M. fortuitum* a été isolé à de nombreuses reprises du sol. Certaines substances phénols polyhalogénés pentachlorophénols sont métabolisées par les mycobactéries du groupe *fortuitum* qui peuvent se multiplier dans les sols et les eaux polluées. *M. chelonae* et *M. abscessus* ont été mis en évidence dans la tourbe et chez divers animaux. La contamination de valves cardiaques d'origine porcine a été à l'origine d'endocardites. La résistance naturelle de ces mycobactéries leur permet de survivre dans certains désinfectants (ammonium quaternaires) ils ont été à l'origine de contaminations transmises par les fibroscopes.

V - Traitement

Les mycobactéries à croissance rapide sont naturellement insensibles aux médicaments antituberculeux de première ligne (isoniazide, rifampicine, éthambutol, pyrazinamide). L'étude de la sensibilité *in vitro* doit être réalisée. On peut considérer que presque toutes les souches du groupe *chelonae* sont sensibles à la clarithromycine et à l'amikacine et que les mycobactéries du groupe *fortuitum* sont moins sensibles à la clarithromycine mais sensibles à de nombreuses autres molécules notamment les fluoroquinolones (voir tableau V 4).

Tableau V 3 : Caractères biochimiques des principales espèces de mycobactéries à croissance rapide rencontrées en pathologie humaine.

	Pigment	Aryl Sulfatase	Mac Conkey 28°	NO3	Citrate de fer	CROISSANCE			
						NaCl 5 %	Citrate de sodium	Mannitol	Inositol
Groupe Fortuitum									
<i>M. fortuitum</i>	-	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>M. peregrinum</i>	-	+	+	+	+	+	-	+	-
Biovariant 3	-	+	+	+	+	+	-	+	+
Groupe Chelonae									
<i>M. chelonae</i>	-	+	+	-	-	-	+	-	-
<i>M. abscessus</i>	-	+	+	-	-	+	-	-	-
<i>M. chelonae like</i>	-	+	+	-	+	-	+	+	-0

Tableau V 4 : emprunté à Brown Elliott (18). Activité antimicrobienne des trois mycobactéries à croissance rapide, non pigmentées, les plus fréquemment isolées.

Espèce	90 % sensible ou intermédiaire % si inférieur à 100 %	< 90 % sensible ou intermédiaire
Groupe <i>fortuitum</i>	amikacine, cefoxitine ciprofloxacine, gatifloxacine levofloxacine, linezolid (96 %) triméthoprime, sulfaméthoxazole	clarithromycine (80 %) doxycycline (46 %) vancomycine (38 %)
<i>M. abscessus</i>	amikacine (98 %) cefoxitine (95 %) clarithromycine	Doxycycline (4 %) imipenem (57 %) ciprofloxacine (<1 %) linezolid (48 %)
<i>M. chelonae</i>	amikacine (97 %) clarithromycine gatifloxacine (96 %) linezolid (94 %) tobramycine	Ciprofloxacine (19 %) doxycycline (26 %) imipenem (40 %)



Annexes

Coloration de Ziehl Neelsen

I – Matériel et préparation des réactifs

1) Solution A : Solution alcoolique saturée de fuschine	
Fuschine basique	3 g
Ethanol 96°	qsp 100 ml
Solution B : Solution de phénol à 5 %	
Phénol cristallisé	10 g
Eau distillée	qsp 200 ml
Mélanger	
Solution A	10 ml
Solution B	90 ml
2) Agents décolorants	
a) Eau distillée	300 ml
Acide sulfurique concentré	100 ml
b) alcool éthylique 95°	
3) Contre colorant	
Bleu de méthylène	1 g
Alcool 95°	10 ml
Phénol	1 g
Eau distillée	qsp 100 ml

II - Technique

- Les lames préalablement fixées sont placées sur le portoir du bac à coloration, la face sur laquelle le frottis a été réalisé étant au-dessus.
- Couvrir avec la fuschine, chauffer légèrement jusqu'à émission de vapeurs, ne pas faire bouillir et ne pas sécher le colorant. S'il en manque, on peut en rajouter en cours de préparation. La coloration dure 10 minutes. On aura chauffé trois fois.
- Rincer à l'eau du robinet.
- Recouvrir d'alcool et laisser pendant 5 minutes.
- Rincer à l'eau du robinet.
- Recouvrir de la solution d'acide 3 minutes.
- Rincer à l'eau du robinet.
- Recouvrir de la solution de bleu de méthylène et laisser agir 30 secondes.
- Rincer à l'eau du robinet.
- Sécher.
- Examiner à l'immersion, observer 200 champs. Rechercher les bacilles rose rouge sur fond bleu.

Coloration à l'Auramine

I – Matériel et préparation des réactifs

1) Acide trichloracétique 1 %		
	Acide trichloracétique	10 g
	Eau distillée	qsp 1000 ml
2) Auramine		
Solution A	Auramine 00	1 g
	Eau distillée	800 ml
Solution B	Chlorure de magnésium	2 g
	Eau distillée	200 ml
	Phénol	50 g
<i>Laisser dissoudre</i>		
<i>Mélanger A et B. Filtrer</i>		
<i>Conserver à 4° et à l'obscurité</i>		
3) Décolorant		
	Alcool 90°	1000 ml
	Acide chlorhydrique pur	5 ml
	Chlorure de sodium	5 g
4) Solution de rouge de Thiazine		
Solution A	Rouge de thiazine	1 g
	Eau distillée	800 ml
Solution B	Chlorure de magnésium	2 g
	Eau distillée	200 ml
	Phénol	50 g
<i>Laisser dissoudre</i>		
<i>Mélanger A + B. Filtrer</i>		
<i>Conserver à l'obscurité</i>		

II - Technique

- Les lames préalablement fixées sont placées sur le portoir du bac à coloration, la face sur laquelle le frottis a été réalisé étant au-dessus.
- Recouvrir d'acide trichloracétique à 1 % et laisser agir 30 minutes.
- Rincer à l'eau du robinet.
- Recouvrir le frottis d'auramine. Laisser 15 minutes.
- Rincer à l'eau du robinet.
- Couvrir le frottis avec le décolorant et laisser agir 5 minutes.
- Rincer à l'eau du robinet.
- Couvrir le frottis avec le rouge thiazine et laisser agir 1 minute 30.
- Rincer à l'eau.
- Recouvrir le frottis de décolorant. Laisser agir 3 minutes.
- Rincer à l'eau. Sécher à l'air.
- Examiner à l'objectif 40 ou 25 à sec et en fluorescence.
- Observer au moins 30 champs. On recherche des bâtonnets fluorescents sur fond rouge foncé.

Décontamination par la méthode de Kubica à l'acétyl-cystéine et à la soude

1° - Réactifs

1) Préparation de la solution n° 1 = citrate de sodium

Citrate trisodique, 3 H ₂ O	29,4 g
Eau distillée	qsp 1000 ml

Répartir en flacons de 50 ml.

Stériliser à l'autoclave 10 mn à 120°C.

Conserver à T° ambiante.

2) Préparation de la solution n° 2 = soude à 4 %

Hydroxyde de sodium en pastilles	40 g
Eau distillée	qsp 1000 ml

Répartir en flacons de 50 ml.

Autoclaver.

Conserver à T° ambiante.

Mélanger 50 ml de chaque solution 1 et 2 dans un flacon stérile, et conserver à T° ambiante.

3) Préparation de la solution de N-acétyl-cystéine

Solution de N-acétyl-cystéine	0,5 g
Mélange des solutions 1+2	100 ml

Filter

ATTENTION : Le mélange final doit être réalisé tous les jours car le réactif ne se conserve pas.

2° - Méthode

Dans un tube à centrifuger cône :

- Ajouter à 3 ml de produit pathologique 4 ml de solution décontaminante.
- Mélanger par agitation au vortex pendant 20 secondes, retourner le tube afin de parfaire le contact.
- Laisser en contact 20 mn à température ambiante en agitant doucement sur agitateur de Kahn.
- Ajouter le tampon phosphate jusqu'à 50 ml.
- Centrifuger 30 mn à 3000 g.
- Jeter le surnageant et reprendre le culot avec 1 ml de tampon phosphate.

Décontamination par la méthode du lauryl-sulfate de sodium

1° - Réactifs

1) Préparation de la solution décontaminante

Lauryl - sulfate de sodium pur	30 g
Hydroxyde de sodium pur en pastilles	10 g
Eau distillée	qsp 1000 ml

Dissoudre le lauryl-sulfate de sodium dans de l'eau chaude stérile et, après dissolution, ajouter l'hydroxyde de sodium. Répartir dans un flacon le volume déterminé en fonction de la consommation journalière. Maintenir le flacon à 37° C.

2) Solution neutralisante

Pourpre de bromocrésol en solution dans l'eau à 0,4 %	2 ml
Filtrer	
Acide phosphorique pur	2 ml
Eau distillée	qsp 1000 ml

Répartir en flacons unitaires de 50 ml à raison de 30 ml par flacon. Stériliser à l'autoclave 120° pendant 20 mn. On utilisera un flacon par prélèvement.

3) Contrôle de la solution neutralisante (à chaque fabrication)

Dans un pot cône :

A 3 ml de solution décontaminante, ajouter la solution neutralisante jusqu'au virage au jaune → le volume ajouté doit être égal à 30 +/- 1 ml.

2° - Méthode

Cette méthode ne peut être utilisée qu'avec les milieux de culture à l'oeuf, elle ne peut être utilisée pour les méthodes de biologie moléculaire.

Dans un tube à centrifuger cône :

- Ajouter à 2 ml de produit pathologique, 3 ml de solution décontaminante.
- Agiter à l'agitateur de Kahn pendant 30 à 45 mn.
- Neutraliser avec la solution neutralisante jusqu'au virage au jaune.
- Centrifuger 30 mn à 3000 g.
- Jeter le surnageant et reprendre le culot avec 1 ml de tampon phosphate.

Recherche de l'acide nicotinique (Niacin Test de Konno)

Réactifs

Aniline pure ou PAS en poudre

Bromure de cyanogène

Technique

- Déposer à la surface d'une culture sur milieu de Löwenstein 1 ml d'eau distillée stérile (si possible additionnée de 1 % de Tween 80).
- Laisser le tube incliné pendant 20 mn et recueillir l'eau dans un tube à hémolyse.
- Ajouter une goutte d'aniline ou 0,03 g de PAS en poudre ; agiter.
- Laisser agir pendant 5 à 15 mn.
- Ajouter, à la seringue, 1 ml de bromure de cyanogène à 10 %.
Niacin Test positif = Coloration jaune.
Niacin Test négatif = Absence de coloration.

Méthode par strip (bandelette imprégnée de réactif)

- Déposer à la surface d'une culture sur milieu de Löwenstein 1 ml d'eau distillée stérile (si possible additionnée de 1 % de Tween 80).
- Laisser le tube incliné pendant 20 mn et recueillir l'eau dans un tube à hémolyse.
- Tremper la bandelette imprégnée de réactif dans le tube à hémolyse.
- Laisser à température ambiante pendant 15 à 20 mn en agitant de temps en temps.
Niacin Test positif = Coloration jaune.
Niacin Test négatif = Incolore.

Témoin

- Témoin positif : Coloration jaune avec culture de *M. tuberculosis*.

Réduction des nitrates (Epreuve de Virtanen)

Réactifs

Solution de nitrate de sodium	
Nitrate de sodium	0,085 g
Eau distillée	100 ml

Réactif A de Griess

Acide sulfanilique	0,80 g
Acide acétique	30 ml
Eau distillée	100 ml

Réactif B de Griess

Alpha naphthylamine	0,50 g
Acide acétique	30 ml
Eau distillée	100 ml

Ces réactifs se conservent plusieurs mois dans l'obscurité.

Technique

- Une anse de mycobactéries à étudier est émulsionnée dans 2 gouttes d'eau distillée stérile dans un tube à hémolyse.
- Ajouter 2 ml d'une solution à 0,085 % de nitrate de sodium.
- Incuber 2 h à 37°C.
- Ajouter 0,2 ml du réactif A et 0,2 ml du réactif B.

Réaction + = Coloration rose à rouge résultat de la réduction des nitrates en nitrites par la nitrate réductase.

Si pas de coloration, **ajouter une pincée de poudre de zinc** : le zinc réduit les nitrates encore présents en nitrites, une coloration rose apparaît ; la réaction est négative (bactéries sans nitrate réductase).

Si au contraire, la teinte du milieu reste inchangée, le stade nitrite a été dépassé (bactéries ayant une nitrate réductase très active).

Témoins

- Témoin positif : culture de *M. tuberculosis*.
- Témoin négatif : culture de *M. bovis*.

Critères microbiologiques de pathogénicité d'une MNT (190)

Selon les critères retenus par l'American Thoracic Society on considère que l'on a affaire à une MNT pathogène quand en l'absence d'isolement d'une bactérie appartenant au *complexe tuberculosis* ;

- Sur une même année on dispose au moins de trois prélèvements de crachat ou de lavage bronchique :
 - tous les trois ont donné une culture de la même bactérie ; les frottis étant négatifs.
 - deux ont donné une culture et à l'examen microscopique de l'un des prélèvements des BAAR ont été vus.
- Un seul lavage bronchique avec une culture 2+3+4+ avec ou sans examen microscopique positif.
- En ce qui concerne les biopsies :
 - on a obtenu une culture à partir du tissu prélevé
 - présence de granulomes et/ou de BAAR à l'examen anatomo-pathologique de la biopsie avec une ou plusieurs cultures de crachat ou de lavage bronchique positif.
 - toute culture positive à partir d'un site habituellement stérile.

Autres critères : cliniques et radiologiques

1° Critères cliniques

Que les signes cliniques soient compatibles avec une tuberculose.

Que toute autre pathologie soit exclue.

2° Critères radiologiques

Présence d'infiltrats, cavernes, nodules uniques ou multiples, d'apparition récente et persistante, supérieure à deux mois ; ou modifications d'images anciennes.

Bibliographie



1. **Alcaide, F., M. A. Benitez, J. M. Escriba, and R. Martin.** 2000. Evaluation of the Bactec MGIT 960 and the MB/BacT systems for recovery of Mycobacteria from clinical specimens and for species identification by DNA Accuprobe. *J. Clin. Microb.* **38**:398-401.
2. **Alfandari, S.** 1998. Recommendations du C.CLIN Paris-Nord pour le diagnostic et le traitement des infections ostéo-articulaires à *Mycobacterium xenopi*. *Med. Mal. Inf.* **28**:231-234.
3. **Ardito, F., B. Posteraro, M. Sanguinetti, S. Zanetti, and G. Fadda.** 2001. Evaluation of BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT 960) automated system for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* **39**:4440-4444.
4. **Aronson, J. D.** 1926. Spontaneous tuberculosis in salt water fish. *J. Infect. Dis.* **39**:314-320.
5. **Asiedu, K., R. Sherpbier, and M. C. Raviglione.** 2000. Buruli Ulcer *Mycobacterium ulcerans* infection. W.H.O. Global Buruli Ulcer initiative. Report 2000 World Health Organisation Geneva Switzerland.
6. **Baker, J. A., Hagan, W.A.** 1942. Tuberculosis of the mexican flat fish (*platypoecilus maculatus*). *Jour. Inf. Dis.* **76**:248-252.
7. **Band, J. D., Ward, J.I., Fraser, W., Peterson, N.J., Silox, UA., Good, RC, Ostroy, PR. Kennedy, J.** 1982. Peritonitis due to a *Mycobacterium chelonae* like organism associated with peritoneal dialysis. *J. Infect. Dis.* **145**:9-17.
8. **Banks, J., P. A. Jenkins, and A. P. Smith.** 1985. Pulmonary infection with *Mycobacterium malmoense*--a review of treatment and response. *Tubercle* **66**:197-203.
9. **Barker, D. J. P.** 1973. Epidemiology of *Mycobacterium ulcerans* infection. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **66**:867.
10. **Bauriaud, R., Carbonnelle, B., Castets, M., Maugein, J., Roos, P., Vincent, V.** 1994. *Mycobacterium malmoense*, nouvel agent de mycobactériose en France. *Med. Mal. Inf.* **24**:747-758.
11. **Bermudez, E., and F. J. Sangari.** 2001. Cellular and molecular mechanisms of internalization of mycobacteria host cells. *Microbes and infection* **3**:37-42.
12. **Biehle, J., and S. J. Cavalieri.** 1992. *In vitro* susceptibility of *Mycobacterium kansasii* to clarithromycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**:2039-2041.
13. **Billo, N. E.** 1996. Tendances épidémiologiques de la tuberculose. *Rev. du Prat.* **46**:1332-1335.
14. **Bogdan, C., P. Kern, E. Richter, A. Tannapfel, S. Rusch-Gerdes, T. Kirchner, and W. Solbach.** 1997. Systemic infection with *Mycobacterium genavense* following immunosuppressive therapy in a patient who was seronegative for human immunodeficiency virus. *Clin. Infect. Dis.* **24**:1245-1247.
15. **Bottger, E. C., A. Teske, P. Kirschner, S. Bost, H. R. Chang, V. Beer, and B. Hirschel.** 1992. Disseminated "*Mycobacterium genavense*" infection in patients with AIDS. *Lancet* **340**:76-80.
16. **Bretey, J., and M. T. Jahan.** 1971. Air tight cultures of mycobacteria in liquid medium for the estimation of antibiotic resistance. *Ann. Inst. Pasteur* **121**:349-387.
17. **Brisson Noel, A., B. Gicquel, D. Lecossier, V. Levy-Frebault, X. Nassif, and A. J. Hance.** 1989. Rapid diagnosis of tuberculosis for Amplification of Mycobacterial DNA in clinical samples. *Lancet* :1069-1071.
18. **Brown-Elliott, B. A., and R. J. Wallace, Jr.** 2002. Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**:716-746.
19. **Brunello, F., M. Ligozzi, E. Cristelli, S. Bonora, E. Tortoli, and R. Fontana.** 2001. Identification of 54 mycobacterial species by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp65 gene. *J. Clin. Microbiol.* **39**:2799-806.
20. **Buhler, V. B., Pollak, A.** 1953. Human infection with atypical acid fast organisms. Report of two cases with pathological findings. *Amer. J. Clin. Path.* **23**:363-374.
21. **Buntine, J. C., K. Crofts.** 2001. Buruli ulcer : Management of **mycobacterium ulcerans** disease. WHO Global Buruli Ulcer Initiative. Geneva, Switzerland.

22. **Butler, W. R., and J. O. Kilburn.** 1988. Identification of major slowly growing pathogenic mycobacteria and *Mycobacterium gordonae* by high-performance liquid chromatography of their mycolic acids. *J. Clin. Microbiol.* **26**:50-53.
23. **Calmette, A.** 1936. L'infection bacillaire et la tuberculose. Edition Masson et Cie. Paris **1**.
24. **Canetti, G., N. Rist, and J. Grosset.** 1963. Mesure de la sensibilité du bacille tuberculeux aux drogues antibacillaires par la méthode des proportions. Méthodologie critères de résistance. Résultats. Interprétation. *Rev. Tuberc. Pneumol.* **27**:217-272.
25. **Carbonnelle, B., E. Carpentier, R. Bauriaud, M. Castets, C. Chippaux, M. F. Danjoux, I. Fischer, M. J. Gevaudan, C. Martin, and D. Moinard.** 1995. Use of the Bactec TB 460 method for mycobacterial diagnosis of tuberculosis results of a multicentric study. *Path. Biol.* **43**:401-406.
26. **Carpentier, E., B. Drouillard, M. Dailloux, D. Moinard, E. Vallée, B. Dutihl, J. Maugein, E. Bergogne, and B. Carbonnelle.** 1995. Diagnosis of tuberculosis by Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* test : a multicenter study. *J. Clin. Microb.* **33**:3106-3110.
27. **Carson, L. A., N. J. Petersen, M. S. Fauero, and S. M. Agüero.** 1978. Growth characteristics of atypical mycobacteria in water and their comparative resistance to disinfectants. *Appl. Environ. Microbiol.* **36**:839-846.
28. **Casanova, J. L.** 2000. Prédiposition microbienne aux infections mycobactériennes chez l'homme. *J. Soc Biol.* **194**:25-28.
29. **Castelnuovo, G. M., M.** 1962. Gli antigeni di alcuni dei copidetti "Mycobatteri atipici" o "anonimi". *Ann. Inst. Pasteur Carbo Forlanini* **22**:1-20.
30. **Catanzaro A. and The American Thoracic Society Workshop.** 1997. Rapid diagnosis tests for tuberculosis. What is the appropriate use. *Ann. J. Resp. Crit. Care Med.* **155**:1804-1814.
31. **Cesari, V., L. Fougerat, J. N. Charlon, M. J. Demarcq, and P. Dumoulin.** 1988. Un nouveau cas de syndrome du canal carpien par une tenosynovite due à *Mycobacterium szulgai*. *Med. Mal. Inf.* **6**:340-341.
32. **Chow, S. P., A. B. Stroebel, J. H. Lau, and R. J. Collins.** 1983. *Mycobacterium marinum* infection of the hand involving deep structures. *J Hand Surg [Am]* **8**:568-73.
33. **Chretien, J., and C. Voisin.** 1995. Tuberculose, parcours imagé. Ed Hauts de France **2**.
34. **Cianciulli, F. D.** 1979. The radish bacillus (*Mycobacterium terrae*) Saprophyte or pathogen. *J. Clin. Microb.* **10**:506-514.
35. **Clancey, J. K., O. G. Dodge, H. F. Lunn, and M. L. Oduori.** 1961. Mycobacterial skin ulcer in Uganda. *lancet* **28**:951-954.
36. **Clark, R. B., H. Spector, D. M. Friedman, K. J. Oldrati, C. L. Young, and S. C. Nelson.** 1990. Osteomyelitis and synovitis produced by *Mycobacterium marinum* in a fisherman. *J. Clin. Microbiol.* **28**:2570-2572.
37. **Cole, S. T.** 1999. Que peut-on attendre du séquençage du génome de *Mycobacterium tuberculosis* ? *Bull. Acad. Natle Med.* **183**:41-50.
38. **Cole, S. T., R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S. V. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, C. E. Barry, 3rd, F. Tekaia, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, S. Gentles, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, B. G. Barrell, and et al.** 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**:537-544.
39. **Collins, C. H., J. M. Grange, and M. D. Yates.** 1984. Mycobacteria in water. *J. Appl. Bacteriol.* **57**:193-211.
40. **Cornfield, D. B., K. Glisson Davis, J. A. Greene, M. Bojak, and J. Bondi.** 1997. Mycobacterial growth and bacterial contamination in the mycobacteria growth indicator tube and Bactec 460 systems. *J. Clin. Microb.* **35**:2068-2071.
41. **Coyle, M. B., L. C. Carlson, C. K. Wallis, R. B. Leonard, V. A. Raisys, J. O. Kilburn, M. Samadpour, and E. C. Bottger.** 1992. Laboratory aspects of "*Mycobacterium genavense*", a proposed species isolated from AIDS patients. *J. Clin. Microbiol.* **30**:3206-3212.
42. **Cuttino, J. T., Mac Nabe, A.** 1949. Pure granulomatous nocardiosis. A new fungus disease distinguished by intracellular parasitism. *Amer. J. Clin. Path.* **25**:1-47.

43. **Darie, H., T. Le Guyadec, and J. E. Touze.** 1993. Epidemiological and clinical aspects of Buruli ulcer in Ivory Coast. 124 recent cases. *Bull. Soc. Pathol. Exot* **86**:272-276.
44. **David, H. L., Levy Frebault U., Thorel L.M.F.** 1989. Méthodes de laboratoire pour Mycobactériologie clinique. Institut Pasteur Paris:35-36.
45. **Dawson, D. J.** 1990. Infection with *Mycobacterium avium* complex in Australian patients with AIDS. *Med. J. Aust.* **153**:466-468.
46. **De Beenhouwer, H., Z. Lhiang, G. Jannes, W. Mijs, L. Machtelinckx, R. Rossau, H. Traore, and F. Portaels.** 1995. Rapid detection of rifampicin resistance in sputum and biopsy specimens from tuberculosis patients by PCR and line probe assay. *Tuber. Lung. Dis.* **76**:425-430.
47. **Dechairo, D. C., D. Kittredge, A. Meyers, and J. Corrales.** 1973. Septic arthritis due to *Mycobacterium triviale*. *Am. Rev. Respir. Dis.* **108**:1224-1226.
48. **Decludt, B., and C. Campese.** 2001. Cas de tuberculose déclarés en France en 1998 et 1999. *Bull. Epid. Heb.* **10**:41-44.
49. **Decludt B., T. D., Vincent, V., Truffot-Pernot, C., Boulahbal, F., Robert, J., Botherel, A.H., Perronne, C., Grosset, J.** 2000. Infections à *Mycobacterium xenopi* en France. *Bull.Epid. Heb.* **17**:71-72.
50. **Dega, H., J. Robert, P. Bonnafous, V. Jarlier, and J. Grosset.** 2000. Activities of several antimicrobials against *Mycobacterium ulcerans* infection in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:2367-2372.
51. **Degommier, J.** 1957. Nouvelle technique de coloration des bacilles tuberculeux pour la recherche en fluorescence. *Ann. Inst. Pasteur.* 692-694.
52. **Desbordes, J.** 1971. Compte rendu d'une enquête épidémiologique après la découverte à l'hôpital du Havre d'une importante pullulation de *Mycobacterium xenopi*. *Bull. Mém. Soc Méd. Passy.* **93**:37-41.
53. **Descalopoulos G.A., L. S., Constantopoulos S.H.** 1995. Wide geographic variations of sensitivity of MOTT sensitins in Greece. *Eur. Resp. J.* **8**:715-717.
54. **Devallois, A., L. Horgen, C. Sola, and N. Rastogi.** 1998. Molecular typing of mycobacteria. *Pathol. Biol.* **46**:625-36.
55. **Dye, C., S. Scheele, P. Dolin, V. Pathania, and M. C. Raviglione.** 1999. Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. *Jama* **282**:677-686.
56. **Dylewski, J. S., H. M. Zackon, and A. H. Latour.** 1987. *Mycobacterium szulgai* an unusual pathogen. *Rev. Inf. Dis.* **1987**:578-580.
57. **Falkinham, J. O., 3rd.** 1996. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* **9**:177-215.
58. **Feldman, W. H., David, R., Moses, H.E., Andberg, W.** 1943. An unusual *Mycobacterium* isolated from pulmonary disease of long duration. *Amer. Rev. of tuberculosis* **48**:82-93.
59. **Frothingham, R., and W. A. Meeker-O'Connell.** 1998. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology* **144**:1189-1196.
60. **Garry, S.** 1995. Non tuberculous mycobacterial infection in HIV patients. *Semin. Respir. Crit. Care. Med.* **16**:199-206.
61. **Gascoyne-Binzi D.M., Barlow R. E. L., Frothingham R., Robinson G., Collins T.A., Gelletlie R. and Hawkey P.M.** 2001. Rapid identification of laboratory contamination with *Mycobacterium tuberculosis* using variable number tandem repeat analysis. *J. Clin. Microb.* **39**:69-74.
62. **George, K. M., D. Chatterjee, G. Gunawardana, D. Welty, J. Hayman, R. Lee, and P. L. Small.** 1999. Mycolactone: a polyketide toxin from *Mycobacterium ulcerans* required for virulence. *Science* **283**:854-7.
63. **Gicquel, B.** 1999. Search for new tuberculosis vaccines. *Bull. Acad. Natl. Med.* **183**:53-62.
64. **Gordon, R. E., Smith, M.M.** 1955. Rapidly growing acid fast bacteria II species description of *Mycobacterium fortuitum* Cruz. *J. of Bact.* **69**:502-507.
65. **Grange, J. M., Collins C.H.** 1983. Mycobacterial pathogenicity and nomenclature. The nycrocin mycobacteria. *Tubercule* **64**:141-143.

66. **Griffith, D. E., W. M. Girard, and R. J. Wallace, Jr.** 1993. Clinical features of pulmonary disease caused by rapidly growing mycobacteria. An analysis of 154 patients. *Am. Rev. Respir. Dis.* **147**:1271-1278.
67. **Grosset, J., H. Boisvert, and C. Truffot-Pernot.** 1990. In *bactériologie médicale* L. Leminor, M. Veron. Ed. Flammarion Paris:965-1017.
68. **Grosset, J., C. Truffot-Pernot, and E. Cambau.** 2000. *Bacteriology of tuberculosis. Tuberculosis a comprehensive international approach.* Reichman and Hershfield **144 p.** Second edition.
69. **Hanna, B. A., A. Ebrahimzadeh, L. B. Elliott, M. A. Morgan, S. M. Novak, S. Rüsç-Gerdes, M. Acio, D. F. Dunbar, T. M. Holmes, C. H. Rexer, C. Savthyakumar, and A. Vannier.** 1999. Multicenter evaluation of the MGIT 960 system for recovery of mycobacteria. *J. Clin. Microb.* **37**:748-752.
70. **Harro, C., G. L. Braden, A. B. Morris, G. S. Lipkowitz, and R. L. Madden.** 1997. Failure to cure *Mycobacterium gordonae* peritonitis associated with continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Clin. Infect. Dis.* **24**:955-957.
71. **Hauduroy, P.** 1955. *Derniers aspects du monde des mycobactéries.* Edition Masson et Cie. Paris.
72. **Hayman, J.** 1991. *Mycobacterium ulcerans* infection. *Lancet* **337**:124.
73. **Hayman, J.** 1984. *Mycobacterium ulcerans* : an infection from Jurassic time ? *Lancet* **2**:1015-1016.
74. **Hazra, R., C. D. Robson, A. R. Perez-Atayde, and R. N. Husson.** 1999. Lymphadenitis due to nontuberculous mycobacteria in children: presentation and response to therapy. *Clin. Infect. Dis.* **28**:123-129.
75. **Heifets, L.** 1988. Qualitative and quantitative drug-susceptibility tests in mycobacteriology. *Am. Rev. Respir. Dis.* **137**:1217-1222.
76. **Heifets, L., Linder T., Sanchez D., Spencer D., Brennan j.** 2000. Two liquid medium systems mycobacteria growth indicator tube and MB Redox tube for *Mycobacterium tuberculosis* isolation from system. *J. Clin. Microb.* **38**:1227-1230.
77. **Henderson, H. M., Chapman, S.W.** 1994. *Mycobacterium avium intracellulare.* Current opinion in infectious diseases **7**:225-230.
78. **Hirschel, B., H. R. Chang, N. Mach, P. F. Piguët, J. Cox, J. D. Piguët, M. T. Silva, L. Larsson, P. R. Klatser, J. E. Thole, and et al.** 1990. Fatal infection with a novel, unidentified *Mycobacterium* in a man with the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Engl. J. Med.* **323**:109-113.
79. **Hoffner, S. E., U. Hjelm, and G. Kallenius.** 1993. Susceptibility of *Mycobacterium malmoense* to antibacterial drugs and drug combinations. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:1285-1288.
80. **Hohn, A., and Lowenstein.** 1926. Die Kulture des tuberklebacillus zur diagnose der tuberculose. *Zeut. fur. Bakt. I origin* **98**:460-477.
81. **Horsburgh, C. R., Jr., Meyers, W.M. Buruli ulcer : Pathology of emerging infection. In Horsburgh CR, Nelson AM.** 1997. Washington DC ASM Press:119-126.
82. **Hsueh, P. R., T. R. Hsieu, J. J. Jarn, S. W. Ho, and W. C. Hsieh.** 1996. Disseminated infection due to *Mycobacterium scrofulaceum* in an immunocompetent host. *Clin. Inf. Dis.* **22**.
83. **Huet, M., N. Rist, G. Boube, and D. Potier.** 1971. Bacteriological study of tuberculosis in Cameroon. *Rev. Tuberc; Pneumol.* **35**:413-26.
84. **Ingram, C. W., D. C. Tanner, D. T. Durack, G. W. Kernodle, Jr., and G. R. Corey.** 1993. Disseminated infection with rapidly growing mycobacteria. *Clin. Infect. Dis.* **16**:463-471.
85. **Iseman, M. D.** *Biology and laboratory diagnosis of tuberculosis. A clinician's guide to tuberculosis.* Lippincott Williams-Wilkins.
86. **Jacobs, W. R., Jr., R. G. Barletta, R. Udani, J. Chan, G. Kalkut, G. Sosne, T. Kieser, G. J. Sarkis, G. F. Hatfull, and B. R. Bloom.** 1993. Rapid assessment of drug susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* by means of luciferase reporter phages. *Science* **260**:819-22.
87. **Janier, M., B. Dupont, P. C. Achach, H. David, and C. Lapresle.** 1984. Digital tenosynovitis caused by non-tuberculous mycobacteria. Apropos of the 4th case caused by *Mycobacterium terrae*. *Presse Med.* **13**:269-71.
88. **Jarlier, V.** 2000. Centre National de Référence pour la surveillance des infections à mycobactéries et de leur résistance aux antibiotiques. Rapport d'activité pour l'année 2000.

89. **Jenkin, P. A., Marks J., Schaeffer W.B.** 1972. Thin layer chromatography of mycobacterial lipids as an aid to classification. The scotochromogenic mycobacteria including *Mycobacterium scrofulaceum*, *M. xenopi*, *M. aquae*, *M. gordonae*, *M. flavescens*. *Tubercle* **53**:116.
90. **Johnson, P. D., M. G. Veitch, D. E. Leslie, P. E. Flood, and J. A. Hayman.** 1996. The emergence of *Mycobacterium ulcerans* infection near Melbourne. *Med. J. Aust.* **164**:76-78.
91. **Jouveshomme, S. and E. Cambau.** 2001. Place de l'amplification génique dans le diagnostic de la tuberculose pulmonaire. *Antibiotiques* **3**:173-180.
92. **Kamerbeek, J., L. Schouls, A. Kolk, M. van Agterveld, D. van Soolingen, S. Kuijper, A. Bunschoten, H. Molhuizen, R. Shaw, M. Goyal, and J. van Embden.** 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* **35**:907-914.
93. **Kent, P. T., and G.P.Kubica.** 1985. Public Health Mycobacteriology : a guide for level III laboratory. US Departement of health and Human services-Public health service-Center for Disease Control Atlanta Georgia 30333
94. **Kirschner, P., M. Kiekenbeck, D. Meissner, J. Wolters, and E. C. Bottger.** 1992. Genetic heterogeneity within *Mycobacterium fortuitum* complex species: genotypic criteria for identification. *J. Clin. Microbiol.* **30**:2772-2775.
95. **Kirschner, R. A., B. C. Parker, and J. O. Falhingham.** 1992. Epidemiology of infections by non tuberculous mycobacteria : *Mycobacterium avium Mycobacterium intracellulare ad Mycobacterium scrofulaceum* in acid brown-water swamps of the southeastern united states and their association with environmental variables. *Am. Rev. Resp. Dis.* **145**.
96. **Knibb, W., A. Colorni, M. Ankaoua, D. Lindell, A. Diamant, and H. Gordin.** 1993. Detection and identification of a pathogenic marine *Mycobacterium* from the European seabass *Dicentrarchus labrax* using polymerase chain reaction and direct sequencing of 16S rDNA sequences. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **2**:225-32.
97. **Krasnow, I., and L. G. Wayne.** 1966. Sputum digestion. I. The mortality rate of tubercle bacilli in various digestion systems. *Tech. Bull. Regist. Med. Technol.* **36**:34-37.
98. **Kubica, G. P., W. E. Dye, M. L. Cohn, and M. G. Middelbrook.** 1963. Sputum digestion and decontamination with N-acetyl-cystein Sodium Hydroxyde for culture of Mycobacteria. *Amer. Rev. Resp. Dis.* **87**:775-779.
99. **Lagarrigue, V., F. Portaels, W. M. Meyers, and J. Aguiar.** 2000. Buruli ulcer: risk of bone involvement! Apropos of 33 cases observed in Benin. *Med. Trop.* **60**:262-266.
100. **Landsell, W. R., Dixon, N. Benjamin, L.** 1993. Isolation of several Mycobacterium species from fish. *J. Aquat. Anim. Health* **5**:73-76.
101. **Lavy, A., P. Yoshpe-Purer.** 1982. Isolation of *Mycobacterium simiae* rom clinical specimens in israel. *Tuber.* **63**:279-285.
102. **Lebrun, L., J. Livartowski, T. May, J. Dormont, and P. Nordmann.** 1995. Failure of the radiometric Bactec method to detect *Mycobacterium avium* complex in the blood of patients infected with human immunodeficiency virus who were treated with antibiotics. *Clin. Infect. Dis.* **21**:1343-4.
103. **Levy-Frebault, V., David, H.L.** 1983. *Mycobacterium kansasii* : contaminant du réseau d'eau potable d'un hôpital. *Rev. Epidem. Santé Publ.* **31**:11-20.
104. **Levy-Frebault, V., K. S. Goh, and H. L. David.** 1986. Mycolic acid analysis for clinical identification of *Mycobacterium avium* and related mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* **24**:835-839.
105. **Levy-Frebault, V., Grimont, F., Grimont, PAD, David, HL.** 1986. Desoxyribonucleic acid relatedness study of the *Mycobacterium fortuitum* - *Mycobacterium chelonae* complex. *Int. J. Sys. Bacterio.* **36**:458-460.
106. **Linnel, F., Norden, A.** 1954. *Mycobacterium balnei*. A new acid fast bacillus occurring in swimming pools and capable of producing skin lesions in human. *Act. Tub. Scand.* **33**:1-84.
107. **Locht, C.** 1997. Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two components system operon. *Mol. Microbiol.* **26**:991-1003.

108. **Lowry, P. W., C. M. Beck-Sague, L. A. Bland, S. M. Aguero, M. J. Arduino, A. N. Minuth, R. A. Murray, J. M. Swenson, and W. R. Jarvis.** 1990. *Mycobacterium chelonae* infection among patients receiving high-flux dialysis in a hemodialysis clinic in California. *J. Infect. Dis.* **161**:85-90.
109. **Lurie, M. B., Dannenberg, A.M.** 1965. Macrophage function in infectious diseases with inbred rabbits. *Bacteriol. Review* **29**:466-476.
110. **Mac Callum, P., J. C. Tolhurst, G. Buckle, and H. A. Sissons.** 1948. A new bacterial infection in man. Clinical aspects. *J. Pathol. Bacteriol* **60**:93-101.
111. **Makinen, J., A. Sarkola, M. Marjamaki, M. K. Viljanen, and H. Soini.** 2002. Evaluation of genotype and LiPA MYCOBACTERIA assays for identification of Finnish mycobacterial isolates. *J. Clin. Microbiol.* **40**:3478-3481.
112. **Maloney, J. M., C. R. Gregg, D. S. Stephens, F. A. Manian, and D. Rimland.** 1987. Infections caused by *Mycobacterium szulgai* in humans. *Rev. Inf. Dis.* **9**:1120-1126.
113. **Marchal, G.** 1995. La réponse immunitaire au cours de la tuberculose. *Méd. Thérap.* **1**:19-29.
114. **Marsollier, L., R. Robert, J. Aubry, J. P. Saint Andre, H. Kouakou, P. Legras, A. L. Manceau, C. Mahaza, and B. Carbonnelle.** 2002. Aquatic Insects as a Vector for *Mycobacterium ulcerans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:4623-4628.
115. **Marston, B. J., M. O. Diallo, C. R. Horsburgh, Jr., I. Diomande, M. Z. Saki, J. M. Kanga, G. Patrice, H. B. Lipman, S. M. Ostroff, and R. C. Good.** 1995. Emergence of Buruli ulcer disease in the Daloa region of Côte d'Ivoire. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **52**:219-224.
116. **Matsiota-Bernard, P., D. Thierry, P. De Truchis, M. Saillour, F. Paraire, J. L. Guesdon, and C. Nauciel.** 1995. *Mycobacterium genavense* infection in a patient with AIDS who was successfully treated with clarithromycin. *Clin. Infect. Dis.* **20**:1565-1566.
117. **Maugein, J., Carbonnelle, B., Doucet-Populaire, F., Grosset, J., et le Groupe Azay-Mycobactéries.** 1999. Surveillance de la résistance à la Claritromycine et à la Rifabutine des souches de mycobactéries du complexe aviaire (MAC) isolées d'hémocultures au cours du SIDA. *B.E.H.* **19**:73-74.
118. **May, T. D., M., Canton, P.** 1991. Les mycobactéries atypiques : les manifestations cliniques inhabituelles. *Med. Mal. Inf.* **21**:75-81.
119. **Meissner, G., and K. H. Schroder.** 1975. Relationship between *Mycobacterium simiae* and *Mycobacterium habana*. *Am. Rev. Respir. Dis.* **111**:196-200.
120. **Middlebrook, G., Z. Reggiardo, and W. D. Tigertt.** 1977. Automatable radiometric detection of growth of *Mycobacterium tuberculosis* in selective media. *Am. Rev. Respir. Dis.* **115**:1066-1069.
121. **Miller, N., S. Infante, and T. Cleary.** 2000. Evaluation of the LiPA MYCOBACTERIA assay for identification of mycobacterial species from BACTEC 12B bottles. *J. Clin. Microbiol.* **38**:1915-1919.
122. **Mollohan, C. S., Romer, M.S.** 1961. Public health significance of swimming pool granuloma. *Ann. J. Public Health* **51**:883-891.
123. **Nagesh, B. S., S. Sehgal, S. K. Jindal, and S. K. Arora.** 2001. Evaluation of polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in pleural fluid. *Chest* **119**:1737-1741.
124. **Narain, J. P., M. C. Raviglione, and A. Kochi.** 1992. HIV associated tuberculosis in developing countries : epidemiology and strategies for prevention. *Tuber. Lung. Dis.* **73**:322-325.
125. **Naveh, D., T. Yankilewitz, A. Lagziel, and D. Sompolinsky.** 1978. Skin granulomata caused by a new microorganism (*Mycobacterium haemophilum* sp. nov.). *Harefuah* **95**:5-8.
126. **Niemann, S., E. Richter, and S. Rusch-Gerdes.** 2000. Differentiation among members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by molecular and biochemical features: evidence for two pyrazinamide-susceptible subtypes of *Mycobacterium bovis*. *J. Clin. Microbiol.* **38**:152-157.
127. **Nolte, F. S., and B. Metchock.** 1995. *Mycobacterium*. In manual of clinical microbiology 6th ed. American society for microbiology Washington DC **34**:400-437.
128. **Noordhoek, G., A. Kolk, G. Bjurne, D. Catty, J. W. Dale, P. E. Fine, P. Godfrey-Fausset, S. N. Cho, T. Shinnick, S. B. Suenson, S. Wilson, and J. D. Van Embden.** 1994. Sensibility and specificity of PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* a blind comparison among seven laboratories. *J. Clin. Microb.* **32**:277-284.

129. **Orme, I. M.** 2001. The latent tuberculosis bacillus. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* **7**:589-593.
130. **Parent, L. J., M. M. Salam, P. C. Appelbaum, and J. H. Dossett.** 1995. Disseminated *Mycobacterium marinum* infection and bacteremia in a child with severe combined immunodeficiency. *Clin. Infect. Dis.* **21**:1325-1327.
131. **Parrot, R., Grosset J., Augier J., Meyer L.** 1976. Le rôle et la place des informations bactériologiques dans l'identification des sources de contagion. *Rev Fr Mal Respir* **4**:289-304.
132. **Parsons, L. M., R. Brosch, S. T. Cole, A. Somoskovi, A. Loder, G. Bretzel, D. Van Soolingen, Y. M. Hale, and M. Salfinger.** 2002. Rapid and simple approach for identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by PCR-based genomic deletion analysis. *J. Clin. Microbiol.* **40**:2339-45.
133. **Petroff, S. A.** 1915. Some cultural studies on the tubercle bacillus. *Bull. Johns Hopkins Hosp.*:276-279.
134. **Pfyffer, G. E., D. A. Bonato, A. Ebrahimzadeh, W. Gross, J. Hotaling, J. Kornblum, A. Laszlo, G. Roberts, M. Salfinger, F. Wittwer, and S. Siddiqi.** 1999. Multicenter laboratory validation of susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* against classical second-line and newer antimicrobial drugs by using the radiometric BACTEC 460 technique and the proportion method with solid media. *J. Clin. Microbiol.* **37**:3179-3186.
135. **Pieters, J.** 2001. Entry and survival of pathogenic mycobacteria in macrophages. *Microbes and infection.* **3**:249-255.
136. **Portaels, F.** 1995. Epidemiology of mycobacterial diseases. *Clin. Dermatol.* **13**:207-222.
137. **Portaels, F., P. A. Fonteyene, H. de Beenhouwer, P. de Rijk, A. Guedenon, J. Hayman, and M. W. Meyers.** 1996. Variability in 3' end of 16S rRNA sequence of *Mycobacterium ulcerans* is related to geographic origin of isolates. *J. Clin. Microbiol.* **34**:962-5.
138. **Portaels, F., Johnson, P., Meyers, W.M.** 2001. Buruli ulcer : diagnosis of *Mycobacterium ulcerans* disease. WHO. Geneva.
139. **Portaels, F., L. Larsson, and P. Smeets.** 1988. Isolation of mycobacteria from healthy persons' stools. *Int. J. Lepr. Other. Mycobact. Dis.* **56**:468-471.
140. **Prissick F.H., M. A. M.** 1956. Cervical lymphadenitis in children caused by chromogenic mycobacteria. *Can. Med. Assoc. J.* **75**:798-803.
141. **Pyle, M. M.** 1947. Relative number of resistant tubercle bacilli in sputa of patients before and during treatment with Streptomycin. *Proc. Staff. Mayo Clinic* **22**:465-472.
142. **Raskine, L., Leleu, S., Sanson-Le-Pors, M.S.** 1997. *Mycobacterium kansasii* aspects cliniques et bactériologie. *Feuillets de biologie.* **219**:33-42.
143. **Raszka, W. V., Jr., L. P. Skillman, P. L. McEvoy, and M. L. Robb.** 1995. Isolation of nontuberculous, non-*avium* mycobacteria from patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin. Infect. Dis.* **20**:73-76.
144. **Realini, L., P. Van Der Stuyft, K. De Ridder, B. Hirschel, and F. Portaels.** 1997. Inhibitory effects of polyoxyethylene stearate, PANTA, and neutral pH on growth of *Mycobacterium genavense* in BACTEC primary cultures. *J. Clin. Microbiol.* **35**:2791-2794.
145. **Reich, J. M., and R. E. Johnson.** 1992. *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease presenting as an isolated lingular or middle lobe pattern. The lady Windermere syndrom. *Clus.* **101**:1605-1609.
146. **Richmond, L., M.M. Cummings.** 1930. Acid Fast Bacilli. *Ann. Rev. Tuberc.* **62**:632--637.
147. **Richter, E., M. Weizenegger, S. Rusch-erdes, S. Nieman.** 2002. Differentiation within the *Mycobacterium tuberculosis* complex by molecular techniques. 23^{ème} Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology Dubrovnick Croatia June:23-26.
148. **Robert, J., and V. Jarlier.** 2002. Tuberculose et résistance aux antituberculeux. Surveillance nationale des maladies infectieuses. *InVS*:239-243.
149. **Rogall, T., J. Wolters, T. Flohr, and E. Böttger.** 1990. Toward a phylogeny and definition of species at molecular level within the germs *Mycobacterium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **40**:323-330.
150. **Rook, G. A., and J. L. Stanford.** 1979. The relevance to protection of three forms of delayed skin-test response evoked by *M. leprae* and other mycobacteria in mice. Correlation with the classical work in the guinea-pig. *Parasite Immunol.* **1**:111-123.

151. **Ross, B. C., L. Marino, F. Oppedisano, R. Edwards, R. M. Robins-Browne, and P. D. R. Jonhson.** 1997. Development of a PCR assay for rapid diagnosis of *Mycobacterium ulcerans* infection. *J. Clin. Microbiol.* **35**:1696-1700.
152. **Runyon, E. H.** 1959. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. *Med. Clin. N. Amer.* **43**:273-290.
153. **Runyon, E. H.** 1972. Conservation of the specific epithet fortuitum in the name of the organism known as *Mycobacterium fortuitum* Da Costa Cruz. *Int. J. of Syst. Bact.* **22**:50-51.
154. **Rusch-Gerdes, S., C. Domehl, G. Nardi, M. R. Gismondo, H. M. Welscher, and G. E. Pfyffer.** 1999. Multicenter evaluation of the mycobacteria growth indicator tube for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to first-line drugs. *J. Clin. Microbiol.* **37**:45-8.
155. **Sanders, J. W., A. D. Walsh, L. Snider, and E. E. Sahn.** 1995. Disseminated *Mycobacterium scrofulaceum* infections. A potentially treatable complication of AIDS. *Clin. Infect. Dis.* **20**.
156. **Schurr, E., and E. Skamene.** The role of the Bcg gene in mycobacterial infections. In *Tuberculosis* W.N. Rom, S. Garay.
157. **Schwabacher, H.** 1959. A strain of mycobacteria isolated from skin lesions of a cold blooded animal *xenopus laevis* and its relation to atypical acid fast bacilli occurring in man. *J. Hyg.* **57**:57-67.
158. **Seva Sutter, E. A., V. A. Silcox, and H. David.** 1976. Differential identification of *Mycobacterium szulgai* and other scotochromogène mycobacteria. *J. Clin. Microb.* **3**:414.
159. **Shih, J. Y., P. R. Hsueh, Y. L. Chang, S. F. Lin, L. J. Teng, and K. T. Luh.** 1998. Pyomyositis due to *Mycobacterium haemophilum* in a patient with polymyositis and long-term steroid use. *Clin. Infect. Dis.* **26**:505-507.
160. **Shinners, D., and H. Yeager.** 1999. Clinical syndromes and diagnosis overview in Schlossberg tuberculosis and non tuberculosis mycobacterial infections. 4th edition Sanders compagny **32**:341-350.
161. **Skinnick, T. M., and R. C. Good.** 1995. Diagnostic mycobacteriology laboratory practices. *Clin. Inf. Dis.* **21**:291-299.
162. **Smith, D. S., P. Lindholm-Levy, G. A. Huitt, L. B. Heifets, and J. L. Cook.** 2000. *Mycobacterium terrae* : case reports, literature review, and in vitro antibiotic susceptibility testing. *Clin. Infect. Dis.* **30**:444-453.
163. **Smithwick, R. W., C. B. Stratigos, and H. L. David.** 1975. Use of cetyl pyridinium chloride acid sodium chloride for the decontamination of sputum specimens that are transported to the laboratory for isolation of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microb.* **31**:1677-1682.
164. **Somoskovi, A., and P. Magyar.** 1999. Comparison of the mycobacteria growth indicator tube with MB redox, Lowenstein-Jensen, and Middlebrook 7H11 media for recovery of mycobacteria in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* **37**:1366-139.
165. **Stanier, R. Y., E. A. Adelberg, and J. Ingraham.** 1976. *The microbial world.* Fourth Edition. Prentice Hall Inc.
166. **Starke, J. R., and L. Heifets.** 1997. Navigating through laboratory reports : expectorations, dreams and realities. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medecine.* **18**:509-522.
167. **Steere, A. C., J. Corrales, and A. von Graevenitz.** 1979. A cluster of *Mycobacterium gordonae* isolates from bronchoscopy specimens. *Am. Rev. Respir. Dis.* **120**:214-216.
168. **Tacquet, A., and F. Tison.** 1961. Nouvelle technique d'isolement des mycobactéries par le lauryl sulfate de sodium. *Ann. Inst. Pasteur* **100**:676-680.
169. **Talenti, A., P. Imboden, F. Marchesi, T. Schmidheini, and T. Bodmer.** 1993. Direct, automated detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:2054-2058.
170. **Talenti, A., I. F. Marches, M. Balz, F. Bally, E. Böttger, and T. Dodmer.** 1993. Rapid identification of Mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restrict enzyme analysis. *J. Clin. Microb.* **31**:175-178.
171. **Tarrand, J. J., and D. H. Groschel.** 1985. Evaluation of the BACTEC radiometric method for detection of 1% resistant populations of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* **21**:941-946.
172. **Thomas, P., F. Liu, and W. Weiser.** 1988. Characteristics of *Mycobacterium xenopi* disease. *Bull. Int. Union Tuberc. Lung Dis.* **63**:12-13.

173. **Thorel, M. F., M. Krichevsky, and V. V. Levy-Frebault.** 1990. Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. **40**:254-260.
174. **Thorel, M. F., Moreau R., Charvin M., Ebiou D.** 1991. Débusquement enzymatique des mycobactéries dans les milieux naturels. C. R. Soc. Biol. **185**:331-337.
175. **Tison, F., and Carbonnelle B.** 1972. Recherche isolement et étude du bacille tuberculeux et des autres mycobactéries en pratique courante. Crouau et Roques ed. **1**:355.
176. **Tokars, J. I., M. M. McNeil, O. C. Tablan, K. Chapin-Robertson, J. E. Patterson, S. C. Edberg, and W. R. Jarvis.** 1990. *Mycobacterium gordonae* pseudoinfection associated with a contaminated antimicrobial solution. J. Clin. Microbiol. **28**:2765-2769.
177. **Tolhurst, J. C., and G. Buckle.** 1948. A new mycobacterial infection in man : experimental investigation in laboratory animals. J. Pathol. Bacteriol. **60**:102-110.
178. **Tortoli, E., M. T. Simonetti, C. Lacchini, V. Penati, and P. Urbano.** 1994. Tentative evidence of AIDS-associated biotype of *Mycobacterium kansasii*. J. Clin. Microbiol. **32**:1779-1782.
179. **Tsakamura, M., N. Kita, W. Otsuka, and H. Shimoide.** 1983. A study of the taxonomy of the *Mycobacterium nonchromogenicum* complex and report of six cases of lung infection due to *Mycobacterium nonchromogenicum*. Microbiol. Immunol. **27**:219-236.
180. **Uganda Buruli Group.** 1969. BCG vaccination against *mycobacterium ulcerans* infection (Buruli ulcer). First results of a trial in Uganda. Lancet **1**:111-115.
181. **Uganda Buruli Group.** 1971. Epidemiology of *Mycobacterium ulcerans* infection at Kinyara, Uganda. Trans. Soc. Trop. Med. Hyg. **65**:763-775.
182. **Valero, G., F. Moreno, and J. R. Graybill.** 1994. Activities of clarithromycin, ofloxacin, and clarithromycin plus éthambutol against *Mycobacterium simiae* in murine model of disseminated infection. Antimicrob. Agents Chemother. **38**:2676-2677.
183. **Van Vollen Houen, P., C. F. Heyns, P. M. Debeer, P. Whitaker, P. D. Van Helden, and T. Victor.** 1996. Polymerase Chain Reaction in the diagnosis of urinary tract *tuberculosis*. Urol. res. **2**:107-111.
184. **Vazquez, J. A., and J. D. Sobel.** 1992. A case of disseminated *Mycobacterium marinum* infection in an immunocompetent patient. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **11**:908-911.
185. **Von Reyn, C. F., Maslow, J.N., Barber, T.W., Falkinham, J.O. III, Arbeit, J.D.** 1992. Persistent colonisation of potable water as a source of *mycobacterium avium* infection in AIDS. Lancet **343**:1137-1141.
186. **Wallace, R. J., Jr.** 1994. Recent changes in taxonomy and disease manifestations of the rapidly growing mycobacteria. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **13**:953-60.
187. **Wallace, R. J., Jr., B. A. Brown, and D. E. Griffith.** 1998. Nosocomial outbreaks/pseudo-outbreaks caused by nontuberculous mycobacteria. Annu. Rev. Microbiol. **52**:453-490.
188. **Wallace, R. J., Jr., J. M. Musser, S. I. Hull, V. A. Silcox, L. C. Steele, G. D. Forrester, A. Labidi, and R. K. Selander.** 1989. Diversity and sources of rapidly growing mycobacteria associated with infections following cardiac surgery. J. Infect. Dis. **159**:708-716.
189. **Wallace, R. J., Jr., J. M. Swenson, V. A. Silcox, R. C. Good, J. A. Tschen, and M. S. Stone.** 1983. Spectrum of disease due to rapidly growing mycobacteria. Rev. Infect. Dis **5**:657-679.
190. **Wallace, R. J., O'Brien R., Glasnoth J. and al.** 1997. American thoracic society : diagnostic and treatment of diseases caused by non tuberculosis mycobacteria. Am. J. Respir. Crit. Care Med. **156**:S1-S25.
191. **Wasiluskas, B. L., and R. M. Morrell, Jr.** 1997. Isolator component responsible for inhibition of *Mycobacterium avium-M. intracellulare* in BACTEC 12B medium. J. Clin. Microbiol. **35**:588-590.
192. **Wayne, L. G.** 1966. Classification and identification of mycobacteria. 3. Species within group 3. Am. Rev. Respir. Dis. **93**:919-928.
193. **Wayne, L. G., and H. A. Sramek.** 1992. Agents of newly recognized or infrequently encountered mycobacterial diseases. Clin. Microbiol. Rev. **5**:1-25.
194. **Weinberger, M., S. L. Berg, I. M. Feuerstein, P. A. Pizzo, and F. G. Witebsky.** 1992. Disseminated infection with *Mycobacterium gordonae* : report of a case and critical review of the literature. Clin. Infect. Dis. **14**:1229-1239.

195. **Weiszfeiler, J. G., V. Karasseva, and E. Karczag.** 1981. *Mycobacterium simiae* and related Mycobacteria. Rev. Infect. Dis. **3**:1040-1045.
196. **Weiszfeiler, J. G., Karczag, E.** 1976. Synonymy of *Mycobacterium simiae* (karasseva et Al. 1965) and *Mycobacterium habana*. (Valdivia et Al. 1971). Inter. J. Sys. Bacteriol. **26**:474-477.
197. **Wolinsky, E.** 1992. Mycobacterial diseases other than tuberculosis. Clin. Infect. Dis. **15**:1-10.
198. **Wolinsky, E.** 1995. Mycobacterial lymphadenitis in children: a prospective study of 105 nontuberculous cases with long-term follow-up. Clin. Infect. Dis. **20**:954-963.
199. **Wolinsky, E.** 1979. Non tuberculous mycobacteria and associated diseases. Am. Rev. Resp. Dis. **119**:107-159.
200. **Wolinsky, E.** 1995. Non tuberculous mycobacteria and associated diseases. Am. Rev. Resp. Dis. **119**:107-159.
201. **Wright, E. P., C. H. Collins, and M. D. Yates.** 1985. *Mycobacterium xenopi* and *Mycobacterium kansasii* in a hospital water supply. J. Hosp. Infect. **6**:175-178.
202. **Youmans, G. P., and A. G. Karlson.** 1947. streptomycin sensitivity of tubercle bacilli. Studies of recently isolated tubercle bacilli and development of resistance to streptomycin *in vivo*. Ann. Rev. Tuberc. **55**:529-536.
203. **Youmans, G. P., E. H. Williston, W. H. Feldman, and H. C. Hirschaw.** 1946. Increase in resistance of tubercle bacilli to Streptomycin. Preliminary report. Proc. Staff. Meet. Maya. clin. **21**:126-127.
204. **Zanetti, S., F. Ardito, L. Sechi, M. Sanguinetti, P. Molicotti, G. Delogu, M. P. Pinna, A. Nacci, and G. Fadda.** 1997. Evaluation of a nonradiometric system (BACTEC 9000 MB) for detection of mycobacteria in human clinical samples. J. Clin. Microbiol. **35**:2072-2075.
205. **Zaugg, M., M. Salfinger, M. Opravil, and R. Luthy.** 1993. Extrapulmonary and disseminated infections due to *Mycobacterium malmoense* : case report and review. Clin. Infect. Dis. **16**:540-549.
206. **Zhang, O., R. Kennon, M. A. Koza, K. Hulten, and J. E. Clarridge.** 2002. Pseudoepidemic due to a unique strain of *Mycobacterium szulgai* genotypic, phenotypic and epidemiological analysis. J. Clin. Microb. **40**:1134-1139.



ISSN : 1293-2892

ISBN : 2-913-633-38-2

EGOPRIM

45, rue de la Glacière 75013 Paris

Dépôt légal : Novembre 2003