

UNIVERSITE DE YAOUNDE I
THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I



FACULTE DES SCIENCES
FACULTY OF SCIENCE

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

**Epidémiologie moléculaire de la tuberculose et
caractérisation des mutations associées aux résistances à
l'Isoniazide, à la Rifampicine et à la Streptomycine dans la
région du Centre au Cameroun.**

THESE

Présentée et soutenue le **13 Avril 2015** en vue de l'obtention du Doctorat/ Ph.D en
Biochimie
Option : Microbiologie et Biologie Moléculaire

Par :

KAMGUE SIDZE Larissa
Matricule 02Z101
DEA en Biochimie

Devant le jury composé de :

Président: **LEKE Rose**, Professeur, Université de Yaoundé I
Rapporteur: **KUABAN Christopher**, Professeur, Université de Yaoundé I
PENLAP BENG Véronique, Maître de Conférences, Université de
Yaoundé I
Membres: **WANJI Samuel**, Professeur, Université de Buéa
NJIOKOU Flobert, Professeur, Université de Yaoundé I
EYANGOH-NIOBE Sara, HDR, Maître de Recherche, CPC.

Année 2015

 *Je dédie ce travail*

A mon tendre époux Hervé Joël Símó

A mon bout'chou Wendy Lydia Mbeukem

*A mes parents André Sidze et Riter Mefe
Mbouobda*

*A mes frères et sœurs Amélie, Estelle,
Sandrine, Yves, Florent, Naomi et
Alexandra*

*A ma tante Jacquy sans oublier EVanie
Léa et Raoul Axel*

Ils comprendront tous pourquoi...

SUPPORT FINANCIER



EDCTP “*European and developing countries Clinical Partnership*” et **NACCAP**
«*Nederland-African Partnership for Capacity Development and Clinical interventions
against Poverty related Diseases*”

Subvention N° CB.0741700.006, à travers CANTAM-UYI

DAAD « *Deutscher Akademischer Austausch Dienst* »

Bourse de recherche doctorale, à travers l’Institut de Médecine Tropicale de
Tübingen en Allemagne



Laboratoire de Référence des Mycobactéries de Borstel en Allemagne



REMERCIEMENTS

« La gratitude est la clé qui ouvre les portes du vrai savoir ».
(Mikhaël Aïvanhov)

Avant tout développement, que la gloire soit rendue à l'Éternel pour la force et le courage dont il m'a comblée pour mener ce travail.

La réalisation de ce travail de recherche a été possible grâce à la contribution de plusieurs personnes et institutions que je tiens à remercier chaleureusement :

Le Chef du Département de Biochimie de l'Université de Yaoundé I

Je vous exprime toute ma reconnaissance pour le confort et le suivi académique que vous nous avez assurés durant notre formation.

Le Pr. Véronique Penlap Beng

La rigueur scientifique et le sens du travail bien accompli sont les clés de la réussite en recherche. Vous avez l'un et l'autre avec en plus l'affection d'une « maman » et l'estime de ceux qui vous côtoient. Votre disponibilité et votre compétence font de vous un encadreur exemplaire. Ce que je vous témoigne ne sont pas des compliments de circonstance, mais l'expression de toute ma reconnaissance pour votre encadrement.

Le Pr. Christopher Kuaban

Vous m'avez fait honneur en acceptant de co-diriger cette thèse, recevez mes remerciements pour votre contribution dans la mise en œuvre du programme au travers duquel ce travail a été réalisé.

Le Dr Matthias Frank

Vous avez coordonné tant l'aspect scientifique que logistique des analyses moléculaires réalisées dans le cadre de ce travail ; vos qualités humaines et intellectuelles me font saisir avec empressement l'occasion de vous exprimer toute ma gratitude et vous assurer toute ma reconnaissance.

Le Laboratoire de Recherche sur la Tuberculose (LTR) du Centre de Biotechnologie de Nkolbisson (BTC)

J'exprime toute ma reconnaissance pour l'accueil, le plateau technique et les conditions de travail qui m'ont été offertes.

Le Pr. Peter Kremsner, Directeur de l'Institut de Médecine Tropicale de Tübingen

Je vous exprime toute ma reconnaissance pour l'accueil et les conditions de travail privilégiées qui m'ont été offertes dans la prestigieuse institution que vous dirigez.

Le Dr Stefan Niemann, responsable du Laboratoire de Référence sur les Mycobactéries de Borstel

Je vous suis redevable pour votre contribution scientifique et surtout logistique qui ont permis à ce travail de thèse de connaître un aboutissement.

Le Dr Julia Stéphanie Frick, responsable de l'unité de Microbiologie de l'Université de Tübingen

Votre enthousiasme, votre intérêt et surtout votre investissement ont contribué à faire avancer ce travail de recherche.

Les Enseignants du Département de Biochimie de l'Université de Yaoundé I

Vos exigences scientifiques m'ont permis d'acquérir de bonnes leçons pour la suite de mon parcours.

La Coordination du projet CANTAM à travers le Pr. Francine Ntoumi

Vous m'avez offert l'opportunité d'effectuer ma thèse au sein de ce grand réseau. J'espère humblement vous avoir rendu toute la confiance qui m'a été accordée.

Le Dr Christophe Ayissi, Directeur de l'hôpital Jamot de Yaoundé et le Dr François-Xavier Fouda, Directeur de l'hôpital de District de Mbalmayo

Vous avez bien voulu autoriser les activités de terrain dans les formations sanitaires que vous dirigez. Je vous exprime par ces mots toute ma gratitude.

Le Directeur du Centre Pasteur du Cameroun (CPC)

Vous nous avez offert un cadre de travail et l'expertise nécessaire pour le traitement des échantillons.

Le Dr Sara Eyangoh, responsable du Laboratoire des Mycobactéries du Centre Pasteur du Cameroun à Yaoundé

Nous vous sommes redevables pour votre intérêt et votre important investissement qui ont fait avancer le projet.

Au personnel médical de l'hôpital Jamot de Yaoundé et de l'hôpital de District de Mbalmayo, aux techniciennes de laboratoire, Mmes Andrea Wierich et Helga Lay

de l'Université de Tübingen, Mmes Augusta Tsasse du Centre Pasteur du Cameroun à Yaoundé et Tanja Ubben du Laboratoire de Mycobactériologie de Borstel qui se sont investies à un moment ou un autre de ce travail.

A l'ensemble des malades qui ont bien voulu donner leur accord pour participer à cette étude, j'exprime ma reconnaissance.

Je tiens à remercier la grande équipe de recherche du projet CANTAM-TB Cameroun qui m'a aidée au cours de ces années de thèse. Je pense au Dr Tedom, au Dr Jean-Paul Assam Assam, au Dr Emmanuel Tekwu pour les nombreux échanges constructifs et la bonne humeur. Je ne saurais oublier Mme Anne-laure Wetewale, M. Serges Tchatchouang, ainsi que Mlle Gaëlle Makafe pour leurs rires inoubliables.

A l'ensemble des étudiants et chercheurs de l'Institut de Médecine Tropicale de Tübingen, notamment Dr Daniel Olusola, Dr Ellen Bruske, Dr Corina Enderes, Dr Adesola Olalekan, Dr Felix Koukouila, Ms. Christian Nguetse et Antony Ajua, toujours prêts à m'aider, je leur dit merci pour les nombreux échanges scientifiques et humains.

Une thèse c'est aussi un environnement affectif. A toute ma famille, sans oublier mon tonton le Dr Hermann Mbouobda, vos conseils ont été une grande source d'appui, de motivation et d'encouragement tout au long de mon parcours.

Un merci tout particulier à ma belle-mère maman Lydie et à toute la famille Ntemameu Simo, pour le soutien et les mots d'encouragement.

A mes amis Saincidy Gahane, Alain Tagnouokam, Fidèle Koagne, Steve Ledje, Julius Chia, Marie-Paule Ngogang, Ingrid Djuikoue, Clarisse Mapa et Anine Tsamene, je dis grandement merci pour tous leurs mots d'encouragement et leur amitié maintes fois renouvelée.

TABLE DES MATIERES

DEDICACE	x
SUPPORT FINANCIER	xi
REMERCIEMENTS	xii
TABLE DES MATIERES	xv
RESUME	xx
ABSTACT	xxiii
LISTE DES ABREVIATIONS	xxvi
LISTE DES TABLEAUX	xxix
LISTE DES FIGURES	xxxi
INTRODUCTION GENERALE	1
OBJECTIFS DE L'ETUDE	4
CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE	5
I.1 GENERALITES SUR LES MYCOBACTERIES	5
I.1.1 Taxonomie	5
I.1.1.1 L'acido-alcoolo-résistance	6
I.1.1.2 Les acides mycoliques	6
I.1.1.3 Le contenu en GC	7
I.1.2 Classification des mycobactéries	7
I.1.2.1 Classification selon le pouvoir pathogène	7
I.1.2.2 Classification selon leur vitesse de croissance	8
I.1.2.3 Classification des mycobactéries non tuberculeuses ou atypiques	8
I.2 LA TUBERCULOSE ET LE COMPLEXE <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i>	9
I.2.1 Définition	9
I.2.1.1 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	9
I.2.1.2 <i>Mycobacterium bovis</i>	9
I.2.1.3 <i>Mycobacterium africanum</i>	10
I.2.1.4 <i>Mycobacterium microti</i>	11
I.2.1.5 <i>Mycobacterium canetti</i>	11
I.2.1.6 <i>Mycobacterium pinnipedii</i>	11
I.2.2 Le génome de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	11
I.2.3 Pathogénèse et histoire naturelle de la maladie	14
I.2.3.1 Transmission	14
I.2.3.2 Evolution du bacille dans l'organisme	14
I.3 EPIDEMIOLOGIE DE LA TUBERCULOSE	16
I.3.1 Incidence globale et prévalence	16
I.3.2 Tuberculose et interaction avec l'épidémie de VIH	17
I.3.3 Tuberculose et Multirésistance	18
I.4 DEPISTAGE ET DIAGNOSTIC DE LA TUBERCULOSE	19

I.4.1 Dépistage de l'infection tuberculeuse latente _____	19
I.4.1.1 Intradermoréaction (IDR) tuberculique (ou test de Mantoux) _____	19
I.4.1.2 Tests immunologiques (QuantiFERON-TB-Gold® et TSPOT-TB®) _____	20
I.4.2 Diagnostic de la tuberculose active _____	20
I.4.2.1 Choix des prélèvements _____	20
I.4.2.2 Examen microscopique _____	21
I.4.2.3 Culture des mycobactéries _____	22
I.4.2.4 Identification des mycobactéries à partir des cultures _____	25
I.4.2.5 Détermination de la sensibilité aux antibiotiques _____	28
I.5 TRAITEMENT DE LA TUBERCULOSE _____	30
I.6 APPROCHES MOLECULAIRES DANS LE DIAGNOSTIC DE LA TUBERCULOSE ET LA DETECTION DES RESISTANCES _____	31
I.6.1 Méthodes moléculaires de détection et d'identification de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> _____	31
I.6.1.1 Méthodes d'amplification des acides nucléiques _____	31
I.6.1.2 Techniques d'hybridation moléculaire _____	34
I.6.1.3 Les méthodes antigéniques par immunochromatographie _____	35
I.6.2 Méthodes moléculaires de détection des résistances chez <i>Mycobacterium tuberculosis</i> _____	36
I.6.2.1 Concepts de base de la résistance _____	36
I.6.2.2 Bases génétiques de la résistance aux antituberculeux _____	38
I.6.2.3 Les techniques de détection basées sur l'électrophorèse _____	46
I.6.2.4 Le séquençage de l'ADN _____	48
I.6.2.5 Les techniques basées sur l'hybridation _____	48
I.6.2.6 Techniques de PCR en temps réel _____	50
I.7 TYPAGE MOLECULAIRE DE <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> _____	51
I.7.1 Polymorphismes dans le génome du complexe <i>Mycobacterium tuberculosis</i> _____	51
I.7.2 Méthodes de génotypage appliquées à <i>Mycobacterium tuberculosis</i> _____	52
I.7.2.1 La méthode RFLP <i>IS6110</i> _____	52
I.7.2.2 Le spoligotyping (<i>Spacer Oligonucleotide Typing</i>) _____	54
I.7.2.3 Le typage MIRU-VNTR _____	56
I.8 PRINCIPALES FAMILLES GENETIQUES AU SEIN DU COMPLEXE <i>M. TUBERCULOSIS</i> _____	57
I.8.1 La famille Afrique de l'Est – Inde (East African India, EAI) _____	57
I.8.2 La famille Beijing _____	58
I.8.3 La famille de l'Asie centrale (CAS) ou famille de Delhi _____	59
I.8.4 La famille Haarlem _____	60
I.8.5 La famille Amérique latine et Méditerranée (LAM) _____	61
I.8.6 La famille X _____	61
I.8.7 La famille T et les autres _____	62
I.8.8 West africanum 1 et West africanum 2 _____	62

CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES	64
II.1 CADRE CONCEPTUEL DE L'ETUDE	64
II.2 SITES DE L'ETUDE	64
II.3 SCHEMA GENERAL DE L'ETUDE ET PLAN EXPERIMENTAL	64
II.3.1 Type et durée de l'étude	64
II.3.2 Critères d'éligibilité de la population d'étude	65
II.3.3 Plan expérimental	65
II.3.4 Considérations éthiques	66
II.4 ANALYSE PHENOTYPIQUE DES ISOLATS DU COMPLEXE <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i>	67
II.4.1 Examen microscopique	67
II.4.1.1 Principe	67
II.4.1.2 Procédure	67
II.4.2 Mise en culture	68
II.4.3 Identification phénotypique	69
II.4.4 Test de sensibilité aux antibiotiques	69
II.4.4.1 Principe	69
II.4.4.2 Procédure	69
II.4.5 Détermination de la sérologie VIH	70
II.4.5.1 Principe	70
II.4.6 Test GeneXpert/RIF	70
II.4.7 Analyse des données	72
II.5 ANALYSE DE LA DIVERSITE DES SOUCHES DU COMPLEXE <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> ET MODE DE CIRCULATION DANS LA POPULATION	73
II.5.1 Extraction d'ADN par inactivation et lyse des cultures mycobactériennes	73
II.5.2 Spoligotypage	73
II.5.2.1 Principe	73
II.5.2.2 Amplification par PCR de la région DR	74
II.5.2.3 Hybridation	76
II.5.2.4 Détection	76
II.5.2.5 Analyse des résultats	77
II.5.3 Typage MIRU-VNTR	78
II.5.3.1 Principe	78
II.5.3.2 Amplification par PCR	78
II.5.3.3 Principe de l'analyse automatisée	80
II.5.3.4 Procédure	82
II.5.4 Analyse des résultats de typage	83
II.6 CARACTERISATION DES MUTATIONS ASSOCIEES A LA RESISTANCE A L'ISONIAZIDE, LA RIFAMPICINE ET LA STREPTOMYCINE ET ANALYSE DES LIENS GENETIQUES ENTRE LES SOUCHES RESISTANTES	85
II.6.1 Choix des gènes de résistance à séquencer	85
II.6.1.1 Résistance à la rifampicine	85

II.6.1.2	Résistance à l'isoniazide _____	85
II.6.1.3	Résistance à la streptomycine _____	88
II.6.2	Amplification par PCR des gènes cibles _____	89
II.6.2.1	Mélange réactionnel _____	90
II.6.2.2	Amplification _____	90
II.6.2.3	Électrophorèse sur gel d'agarose _____	91
II.6.3	Purification des produits de PCR _____	91
II.6.3.1	Principe _____	91
II.6.3.2	Procédure _____	92
II.6.4	Séquençage des gènes cibles _____	93
II.6.4.1	Principe _____	93
II.6.4.2	Procédure _____	94
II.6.5	Purification des produits d'extension _____	95
II.6.5.1	Principe _____	95
II.6.5.2	Procédure _____	95
II.6.6	Electrophorèse capillaire _____	96
II.6.7	Analyse des séquences d'acides nucléiques _____	96
	CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION _____	97
	III.1 ANALYSE PHENOTYPIQUE DES ISOLATS DU COMPLEXE <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> _____	97
III.1.1	Caractéristiques sociodémographiques de la population d'étude _____	97
III.1.2	Caractéristiques cliniques de la population d'étude _____	99
III.1.3	Culture et identification des isolats _____	100
III.1.4	Fréquence de résistance aux antituberculeux _____	100
III.1.5	Test d'identification MTB/RIF en utilisant la technologie GeneXpert _____	105
III.1.6	Discussion partielle _____	106
	III.2 ANALYSE DE LA DIVERSITE DES SOUCHES DU COMPLEXE <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> ET MODE DE CIRCULATION DANS LA POPULATION _____	110
III.2.1	Diversité génétique des isolats du complexe <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ____	110
III.2.1.1	Diversité génétique par la technique du spoligotypage _____	110
III.2.1.2	Diversité génétique par la technique de MIRU-VNTR _____	113
III.2.1	Variabilité des génotypes en fonction de la résistance et du VIH _____	119
III.2.2	Pouvoir discriminatoire des différentes méthodes de typage et diversité allélique _____	122
III.2.2.1	Pouvoir discriminatoire des méthodes de typage _____	122
III.2.2.2	Diversité allélique des 24 loci MIRU-VNTR _____	122
III.2.2.3	Schéma alternatif de typage dans la famille Cameroun _____	125
III.2.3	Mode de circulation des souches dans la population _____	126
III.2.3.1	Facteurs associés à la transmission récente définie par la formation des grappes _____	126
III.2.3.2	Etude des éventuels liens épidémiologiques dans les grappes majeures_	129
III.2.1	Discussion partielle _____	134

III.3 CARACTERISATION DES MUTATIONS ASSOCIEES A LA RESISTANCE A L'ISONIAZIDE, A LA RIFAMPICINE ET A LA STREPTOMYCINE ET ANALYSE DES LIENS GENETIQUES ENTRE LES SOUCHES RESISTANTES	141
III.3.1 Mutations conférant la résistance à l'isoniazide	141
III.3.1.1 Polymorphismes dans le gène <i>katG</i>	142
III.3.1.2 Polymorphismes dans le gène <i>inhA</i>	143
III.3.1.3 Polymorphismes dans le gène <i>ahpC</i>	144
III.3.2 Mutations conférant la résistance à la rifampicine	146
III.3.3 Mutations conférant la résistance à la streptomycine	147
III.3.4 Analyse des liens génétiques entre les souches résistantes	151
III.3.5 Discussion partielle	153
CONCLUSION GENERALE	157
PERSPECTIVES	158
GLOSSAIRE	159
ANNEXES	xxxiv
ANNEXE 1: CLAIRANCE ETHIQUE	xxxiv
ANNEXE 2 : AUTORISATION ADMINISTRATIVE	xxxv
ANNEXE 3 : LETTRE D'ACCORD DE L'HÔPITAL JAMOT DE YAOUNDE	xxxvi
ANNEXE 4 : LETTRE D'ACCORD DE L'HÔPITAL DE DISTRICT DE MBALMAYO	xxxvii
ANNEXE 5 : QUESTIONNAIRE DE COLLECTE DE DONNÉES	xxxviii
ANNEXE 6 : FORMULAIRE DE LABORATOIRE	xli
ANNEXE 7 : NOTE D'INFORMATION	xliii
ANNEXE 8: FICHE DE CONSENTEMENT ECLAIRE	xliv
ANNEXE 9: PROCEDURE OPERATOIRE STANDARDISEE DU SPOLIGOTYPAGE	xlvi
ANNEXE 10: PROCEDURE OPERATOIRE STANDARDISEE DU TYPAGE MIRU-VNTR	li
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	xxxvi
PUBLICATIONS ISSUES DE LA THESE	xxxvi

RESUME

Mycobacterium tuberculosis est responsable chaque année d'environ 9 millions de nouveaux cas de tuberculose (TB) active et 1,4 millions de décès dans le monde. Au Cameroun comme dans la plupart des pays de la région Sub-saharienne, la tuberculose est une maladie commune. L'incidence annuelle était estimée à 243 cas pour 100 000 habitants en 2011. Dans la région du Centre, l'épidémiologie de la tuberculose a consisté jusque-là en une description du nombre de cas détectés et des données socio-démographiques associées. Il n'existe actuellement pas de données publiées sur l'épidémiologie moléculaire de la maladie dans cette région du pays. Afin de déterminer les caractéristiques moléculaires des souches circulant dans cette région pour améliorer notre compréhension de la dynamique de transmission, nous avons réalisé une étude dont l'objectif général était de décrire l'épidémiologie moléculaire de la tuberculose et caractériser les mutations associées aux résistances à l'Isoniazide, la Rifampicine et la Streptomycine.

Pour ce faire, nous avons réalisé une étude transversale descriptive et analytique allant d'Avril 2010 à Décembre 2010. Durant cette période, tous les patients âgés de 15 ans ou plus admis consécutivement à l'hôpital Jamot de Yaoundé et à l'hôpital de District de Mbalmayo et dont le frottis était positif à la microscopie étaient enrôlés dans l'étude après obtention de leur consentement. Les données sociodémographiques et cliniques des patients étaient recueillies à l'aide d'un questionnaire. La sérologie VIH a été déterminée par un test immuno-enzymatique à microparticules (AxSYM HIV Ag/Ac Combo). Les crachats à frottis positif étaient ensuite soumis à la culture sur milieu Löwenstein-Jensen. Les échantillons à culture négative ont été analysés par le test MTB/RIF utilisant la technologie GeneXpert. La sensibilité aux antituberculeux a été évaluée vis-à-vis de l'Isoniazide (INH), la Rifampicine (RIF), la Streptomycine (SM), l'Ethambutol (EMB), l'Ofloxacine (OFX) et la Kanamycine (KAN) en utilisant la méthode indirecte des proportions. L'association entre la résistance et les caractéristiques socio-démographiques et cliniques a été évaluée par régression logistique univariée. Les souches ont été caractérisées par spoligotypage et typage MIRU-VNTR utilisant le schéma de 24 loci. La caractérisation moléculaire de la résistance a été réalisée sur les isolats résistants : INH^R, RIF^R et SM^R et sur une collection de 50 souches

sensibles par séquençage de l'ADN. Les gènes analysés étaient *rpoB* pour la résistance à la RIF, *inhA*, *katG* et *ahpC* pour la résistance à l'INH, *rrs* et *rpsL* pour la résistance à la SM.

Au total 344 patients tuberculeux pulmonaires ont été inclus dans l'étude. La fréquence de co-infection TB-VIH était de 29,1% (IC95 [24,4%-34,1%]). Parmi les 315 crachats ayant donné des cultures positives, 4 ont été identifiées comme des mycobactéries non tuberculeuses et exclues de l'analyse. Parmi les 308 souches ayant donné des résultats de sensibilité, 29 (9,4%) étaient résistants à au moins un antituberculeux et principalement à l'INH (6,8%) et à la SM (2,9%). La résistance chez les cas déjà traités (17,1%) était plus élevée mais pas statistiquement significative par rapport à celle observée chez les nouveaux cas (8,4%). La multirésistance (MR) a été détectée chez 3 cas tandis qu'aucun cas n'a présenté une ultrarésistance (UR).

Les souches du complexe *M. tuberculosis* circulant dans la région du Centre appartiennent à 12 familles génétiques dont 3 (Cameroon_H37Rvlike, Uganda like, New-1) n'ont pas encore été décrites. Les familles Cameroun (54%), Haarlem (21,5%) et Uganda I (8,7%) représentent plus de 80% des isolats. *M. africanum* ne représente que 3% des isolats répartis en West african 1 (2,3%) et West african 2 (3,7%). Nous avons noté une grande diversité génétique au sein des souches, 124 des 164 génotypes étaient uniques et les 40 autres constituaient des grappes regroupant 173 isolats résultant en un index de transmission récente de 44%. Toutefois, malgré la présence de quelques grappes de grande taille, 70% des grappes avaient moins de 4 isolats. Ces observations seraient en faveur d'une importance des réactivations d'infections latentes qui justifierait la grande diversité et la faible taille des grappes observées dans cette étude. Dans la famille Cameroun, on a pu identifier un set minimal de 15 loci (QUB11b, Mtub39, MIRU40, ETRA, MIRU16, QUB26, MIRU26, MIRU10, MIRU27, ETRC, Mtub21, MIRU31, Mtub34, MIRU39 et Mtub04) permettant de discriminer les isolats aussi bien que le format à 24 loci.

Au total 18 isolats INH^R dont 10 de haut niveau de résistance (1µg/ml) et 8 de bas niveau de résistance (0,2µg/ml) ont été analysés pour la recherche des mutations. Des mutations affectant le gène *katG* avec ou sans mutation additionnelle dans la région promotrice du gène *inhA* ont été observées dans 9 (90%) isolats de haut niveau de résistance. Il s'agissait de la mutation Ser315Thr pour 8 isolats et d'une

délétion partielle du gène pour un isolat. Pour la détection de la résistance de haut niveau à l'isoniazide, l'altération du gène *katG* avait une sensibilité de 90% et une spécificité de 100%. Quatre (50%) isolats de bas niveau de résistance à l'isoniazide ont présenté la mutation -15C→T dans la région promotrice du gène *inhA*. Cette mutation avait une sensibilité de 50% et une spécificité de 100% pour la détection de la résistance de bas niveau à l'isoniazide. La mutation *rpoB531* a été observée chez 4 (80%) des 5 isolats RIF^R. Un seul isolat SM^R était génétiquement modifié avec la substitution de Lys43 par Arg au niveau du gène *rpsL*. Parmi les 28 isolats résistants caractérisés avec succès, 20 avaient des profils génétiques distincts. Cette observation est en faveur d'une diversité génétique élevée au sein des souches résistantes.

L'épidémiologie de la tuberculose dans la région du Centre serait le reflet d'une combinaison de transmission active et de réactivations d'infections tuberculeuses latentes dues au VIH. Les interventions du programme de lutte contre la tuberculose devraient être orientés à la fois vers la réduction de la transmission active dans la population (détection et le traitement des cas actifs) et la réactivation (dépistage des infections latentes). Les mutations *rpoB*, *katG315* et -15C→T du gène *inhA* ont montré de bonnes sensibilité et spécificité pour la détection de la résistance à la rifampicine et à l'isoniazide. Ces données sont en faveur de l'utilisation des techniques moléculaires comme le GeneXpert pour la détection de RIF^R et l'inclusion des mutations *katG315* et -15C→T comme marqueurs de INH^R.

Mots clés: Génotypage, Cameroun, tuberculose, mutations associées à la résistance

ABSTRACT

Mycobacterium tuberculosis is responsible each year for approximately 9 million new cases of active tuberculosis (TB) and 1.4 million deaths worldwide. In Cameroon as in most countries of the Sub-Saharan region, tuberculosis is a common disease. The annual incidence was estimated at 243 cases per 100 000 inhabitants in 2011. In the Centre region, the epidemiology of TB has so far largely consisted of describing the number of cases detected and socio-demographic data associated. Actually, there are no published data on the molecular epidemiology of the disease in this region of the country. In order to determine molecular characteristics of strains circulating in the region to improve our understanding of the transmission dynamic, we conducted a study whose general objective was to describe the molecular epidemiology of tuberculosis and characterize mutations associated with Isoniazid, Rifampicin and Streptomycin resistance.

To achieve this, we conducted a cross-sectional descriptive and analytic study between April 2010 and December 2010. During this period, all patients aged 15 years or above admitted consecutively in Jamot hospital of Yaoundé and Mbalmayo District hospital with a positive smear microscopy were enrolled in the study after providing their informed consent. Socio-demographic and clinical data were collected using a questionnaire. HIV serology was determined by a microparticle enzyme immunoassay (AxSYM HIV Ag/Ab Combo). Smear-positive sputa were then subjected to culture on Löwenstein Jensen medium. Negative culture samples were analyzed by the MTB/RIF test using the GeneXpert technology. Drug susceptibility was evaluated to Isoniazid (INH), Rifampicin (RIF), Streptomycin (SM), Ethambutol (EMB), Ofloxacin (OFX) and Kanamycin (KAN) using the indirect proportion method. The association between resistance and socio-demographic and clinical characteristics were assessed by univariate logistic regression. Strains were characterized by spoligotyping and MIRU-VNTR typing using the 24 loci scheme. Molecular characterization of resistance was performed by DNA sequencing on INH^R, RIF^R, and SM^R isolates and a set of 50 fully sensitive strains. *RpoB* gene was screened for RIF's resistance, *inhA*, *katG* and *ahpC* for INH resistance, *rpsL* and *rrs* for SM resistance.

A total of 344 pulmonary tuberculosis patients were included in the study. HIV-TB co-infection rate was 29.1% (95 CI [24.4% -34.1%]). Of the 315 sputa with

positive cultures, 4 were identified as nontuberculous mycobacteria and excluded from the analysis. Of the 308 strains with drug sensibility results, 29 (9.4%) were resistant to at least one TB mainly to INH (6.8%) and SM (2.9%). Resistance among previously treated cases (17.14%) was higher but not statistically significant compared to new cases (8.4%). Multidrug resistance (MDR) was detected in 3 cases while no case has presented extensively drug resistance (XDR).

Mycobacterium tuberculosis complex strains circulating in the Centre region of Cameroon belong to 12 genetic families among which 3 (Cameroon_H37Rvlike, Uganda_like and New-1) have not yet been described. Cameroon (54%), Haarlem (21.5%) and Uganda I (8.7%) lineages account for over 80% of the isolates. *M. africanum* represents only 3% of the isolates divided into West african 1 (2.3%) and West africa 2 (3.7%). We noticed a great genetic diversity, 124 of the 164 genotypes, were unique while the remaining 40 were clustered comprising 173 isolates resulting in a recent transmission index of 44%. However, despite the presence of few large clusters, 70% of the clusters had less than 4 isolates. These observations support the importance of reactivation of latent infections which could justify the great diversity and small size of clusters observed in this study. In the Cameroon family, a minimal set of 15 loci (QUB11b, Mtub39, MIRU40, ETRA, MIRU16, QUB26, MIRU26, MIRU10, MIRU27, ETRC, Mtub21, MIRU31, Mtub34, MIRU39 and Mtub04) that allow the discrimination of isolates as well as the 24 loci format was identified.

A total of 18 INH^R including 10 high level resistance (1µg/ml) and 8 low level resistance (0.1µg/ml) were screened for genetic mutations. Mutations in the *katG* gene with or without additional mutation in the promoter region of the *inhA* gene were observed in 9 (90%) isolates of high-level resistance. This was the Ser315Thr mutation for 8 isolates and a partial deletion of the gene for one isolate. For detection of high level isoniazid resistance, alteration of the *katG* gene had a sensitivity of 90% and a specificity of 100%. Four (50%) low-level isoniazid resistant isolates harbored the mutation -15C → T in the promoter region of the *inhA* gene. This mutation had a sensitivity of 50% and a specificity of 100% for the detection of low level isoniazid resistance. The mutation *rpoB531* was observed in 4 (80%) of the 5 rifampicin resistant isolates. Only one SM resistant isolate was genetically altered with a Lys43 to Arg substitution in the *rpsL* gene. Of the 28 resistant isolates successfully characterized, 20 had distinct genetic profiles. This observation is in favor of a high genetic diversity in resistant strains.

The epidemiology of tuberculosis in the Centre region might reflect a combination of active transmission and reactivation of latent TB infection due to HIV. TB control programs interventions should be directed to both reduction of active transmission in the population (detection and treatment of active cases) and reduction of reactivation (detection of latent infections). *rpoB*, *katG315* and -15 point mutations in *inhA* promoter had high specificities and sensitivities for the detection of rifampicin and isoniazid resistance. The data support the use of molecular techniques such as the GeneXpert for the detection of RIF^R and argue for the inclusion of *katG315* and -15 *inhA* promoter mutations as markers for the INH^R.

Keywords: Genotyping, Cameroon, tuberculosis, resistance associated mutations

LISTE DES ABREVIATIONS

BAAR	Bacille Acido-Alcool Résistant
BAC	<i>Bacterial Artificial Chromosome</i>
BCG	Bacille Calmette Guerin
CBT	Complexe du Bacille Tuberculeux
CIBS	Comité International de Bactériologie Systématique
CDC	<i>Centers for Disease Control</i>
CDT	Centre de Diagnostic et de Traitement
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CNE	Comité National d’Ethique
CPC	Centre Pasteur du Cameroun
DMSO	Dimethyl Sulfoxyde
DR	<i>Direct Repeat</i>
DROS	Direction de la Recherche Opérationnelle en Santé
ECL	<i>Electro Chemiluminescence</i>
EDTA	<i>Ethylene Diamine Tetra Acetate</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked ImmunoSorbant Assay</i>
EMB	Ethambutol
ESAT	<i>Early Secretory Antigen Target</i>
ETR	<i>Exact Tandem Repeat</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HGDI	<i>Hunter Gaston Discriminatory Index</i>
IC	Intervalle de Confiance
IDR	Intra-Dermo Reaction
INF	Interféron
INH	Isoniazide
IS	<i>Insertion Sequence</i>
ITL	Infection Tuberculeuse Latente
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
KAN	Kanamycine
LAM	<i>Latin America and Mediteranea</i>
LCR	Liquide Céphalo-Rachidien
LRT	Laboratoire de Recherche sur la Tuberculose

MDR	<i>Multi Drug Resistant</i>
MDR-TB	<i>Multi Drug Resistant Tuberculosis</i>
MGIT	<i>Mycobacterial Growth Indicator Tube</i>
MIRU	<i>Mycobacterial Interspersed Repetitive Units</i>
MNT	<i>Mycobactérie Non Tuberculeuse</i>
MST	<i>Minimum Spanning Tree</i>
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NADH	<i>Nicotinamide Adenine Dehydrogenase</i>
NADP	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
OADC	<i>Oleic Albumine Dextrose Catalase</i>
OFX	<i>Ofloxacin</i>
OMS	<i>Organisation Mondiale de la Santé</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PNB	<i>Para Nitro Benzoic acid</i>
PNLT	<i>Programme National de Lutte contre la Tuberculose</i>
PPD	<i>Purified Protein Derivative</i>
PZA	<i>Pyrazinamide</i>
QUB	<i>Queens University of Belfast</i>
RC	<i>Rapport de Côte</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RIF	<i>Rifampicine</i>
RRDR	<i>Rifampicin Resistance Determining Region</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SIDA	<i>Syndrome de l'ImmunoDéficiency Acquis</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SSCP	<i>Single Strand Conformational Polymorphism</i>
SSPE	<i>Sodium chloride-Sodium Phosphate-Edta</i>
ST	<i>Spoligotypes</i>
TB	<i>Tuberculose</i>
TBE	<i>Tris Borate EDTA</i>
TB-MR	<i>Tuberculose multirésistante</i>
TB-UR	<i>Tuberculose ultrarésistante</i>

TCH	<i>Tiophen Carboxylic Hydrazid</i>
TDR-TB	<i>Totally Drug Resistant Tuberculosis</i>
TMA	<i>Transcription Mediated Amplification</i>
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VNTR	<i>Variable Number of Tandem Repeats</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
XDR-TB	<i>Extensively Drug Resistant Tuberculosis</i>

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Caractères phénotypiques de différenciation des espèces du complexe <i>tuberculosis</i>	28
Tableau II : Expression des résultats de l'examen microscopique	68
Tableau III : Mélange réactionnel utilisé pour l'amplification de la région DR	75
Tableau IV : Amorces utilisées pour l'amplification des loci MIRU-VNTR.....	79
Tableau V : Amorces utilisées pour la résistance à la rifampicine	85
Tableau VI : Amorces du gène <i>katG</i> utilisées pour la résistance à l'isoniazide	86
Tableau VII : Amorces utilisées pour l'amplification complète du gène <i>katG</i>	86
Tableau VIII : Amorces de la région promotrice du gène <i>inhA</i> utilisées pour la résistance à l'isoniazide.....	87
Tableau IX : Amorces de la région promotrice du gène <i>ahpC</i> utilisées pour la résistance à l'isoniazide.....	87
Tableau X : Amorces du gène <i>rpsL</i> utilisées pour la résistance à la streptomycine	88
Tableau XI : Amorces des boucles 530 et 912 du gène <i>rrs</i> utilisées pour la résistance à la streptomycine	88
Tableau XII : Température d'hybridation et taille des fragments attendue pour chaque gène cible	89
Tableau XIII : Mélange réactionnel utilisé pour l'amplification des gènes cibles	90
Tableau XIV : Caractéristiques sociodémographiques de la population d'étude	98
Tableau XV : Caractéristiques cliniques de la population d'étude	99
Tableau XVI : Association entre la co-infection TB-VIH, l'âge, le genre et le statut marital.....	100
Tableau XVII : Comparaison de la résistance aux antituberculeux chez les nouveaux cas et les cas antérieurement traités	102
Tableau XVIII : Profils de résistance aux antituberculeux chez les nouveaux et cas antérieurement traités.....	103
Tableau XIX : Analyse univariée des caractéristiques sociodémographiques et cliniques avec le développement de la résistance.....	104
Tableau XX : Distribution des isolats dans les différentes familles génétiques.....	115
Tableau XXI : Comparaison de l'identification des familles génétiques par MIRU-VNTR et des familles génotypiques SpolDB4.....	116
Tableau XXII : Profils de spoligotypage des isolats appartenant aux familles génétiques non encore décrites.....	117
Tableau XXIII : Pouvoir discriminatoire des différentes méthodes de typage	122
Tableau XXIV : Diversité allélique des 24 loci MIRU-VNTR dans l'ensemble de l'échantillon et dans la famille Cameroun	124
Tableau XXV : Pouvoir discriminatoire cumulatif et index de transmission récente résultant de l'addition successive de locus MIRU-VNTR dans la famille Cameroun.	125
Tableau XXVI : Relation entre les caractéristiques socio-démographiques, cliniques et biologiques et la formation des grappes : Analyse univariée	128

Tableau XXVII : Caractéristiques mutationnelles des isolats au niveau des gènes <i>katG</i> , <i>inhA</i> et <i>ahpC</i>	145
Tableau XXVIII : Caractéristiques mutationnelles des isolats au niveau du gène <i>rpoB</i>	150
Tableau XXIX : Caractéristiques mutationnelles des isolats au niveau des gènes <i>rpsL</i> et <i>rrs</i>	150

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Taxonomie des mycobactéries.....	5
Figure 2 : Représentation du génome de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	12
Figure 3 : Estimations de l'incidence de la tuberculose toutes formes confondues en 2011 à l'échelle mondiale (WHO, 2012).	17
Figure 4 : Estimations de la prévalence de VIH chez les nouveaux cas de tuberculose en 2011 à l'échelle mondiale.....	18
Figure 5 : Microscopie des bacilles tuberculeux.	22
Figure 6 : Structure de l'isoniazide	38
Figure 7 : Structure de la rifampicine.....	41
Figure 8 : Structure de la pyrazinamide.....	42
Figure 9 : Structure de l'éthambutol.....	43
Figure 10 : Structure de la streptomycine.....	44
Figure 11 : Principe du typage par RFLP IS6110 et du typage MIRU-VNTR.....	54
Figure 12 : Structure et amplification de la région DR.....	55
Figure 13 : Etapes du spoligotypage	56
Figure 14 : Carte des 41 loci VNTR sur le chromosome de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.	57
Figure 15 : Distribution de la famille EAI dans le monde	58
Figure 16 : Distribution de la famille Beijing dans le monde	59
Figure 17 : Distribution de la famille CAS dans le monde.....	60
Figure 18 : Distribution de la famille Haarlem dans le monde.....	60
Figure 19 : Distribution de la famille LAM dans le monde.....	61
Figure 20 : Distribution des souches de <i>M. africanum</i> dans les pays de la côte Ouest-africaine	63
Figure 21 : Procédure du test GeneXpert/RIF	71
Figure 22 : Principe du spoligotypage et d'analyse des résultats.	74
Figure 23 : Principe de détection par chimioluminescence (Amersham).....	77
Figure 24 : Photographie de migration dans un canal capillaire	81
Figure 25 : Fenêtre d'affectation des différents allèles sur logiciel Gene Mapper....	82
Figure 26 : Allèles des 24 loci MIRU-VNTR obtenus pour 18 souches.....	83
Figure 27 : Procédure de purification des produits de PCR (Macherey Nagel)	92
Figure 28 : Cycle de séquençage big dye terminator (Applied Biosystems).....	93
Figure 29 : Exemple d'un chromatogramme.....	94
Figure 30 : Exemple de mutations sur le gène <i>inhA</i>	96
Figure 31 : Fréquences de résistance aux antituberculeux	101
Figure 32 : Profils de spoligotypes obtenus pour 43 isolats.....	110
Figure 33 : Différents spoligotypes et répartition des isolats par famille génétique SpolDB4 et shared types (ST).....	111
Figure 34 : Profils des spoligotypes orphelins	113
Figure 35 : Différentes familles génétiques identifiées par la technique de MIRU-	114

Figure 36: “Minimum Spanning Tree” base sur les données MIRU-VNTR des 298 isolats.	118
Figure 37 : Fréquence de résistance et de co-infection VIH dans la population étudiée par famille génétique.....	119
Figure 38: “Minimum Spanning Tree” basé sur les données MIRU-VNTR des 298 isolats en fonction du phénotype de résistance.	120
Figure 39 : “Minimum Spanning Tree” basé sur les données MIRU-VNTR des 298 isolats en fonction du statut sérologique VIH.....	121
Figure 40 : Taille de différentes grappes identifiées par typage moléculaire	126
Figure 41: Dendrogramme des isolats de <i>Mycobacterium africanum</i>	129
Figure 42 : Dendrogramme circulaire des isolats de la famille Haarlem.....	130
Figure 43 : Dendrogramme des isolats de la famille Cameroun obtenu par spoligotypage et typage MIRU-VNTR.....	132
Figure 44: Profil d'électrophorèse des produits de PCR amplifiant le gène <i>katG</i> (A), le gène <i>inhA</i> (B) et le gène <i>ahpC</i> (C).....	141
Figure 45: Profil d'électrophorèse d'amplification du gène <i>katG</i> pour les isolats n'ayant pas présenté de mutations dans la région 315	142
Figure 46: Mutation affectant le gène <i>katG</i> en position 315 AGC → ACC.....	143
Figure 47: Mutation affectant la région promotrice du gène <i>inhA</i> en position -15 C→T	144
Figure 48 : Mutation affectant la région promotrice du gène <i>ahpC</i> en position -32 G→A.....	144
Figure 49 : Profil d'électrophorèse des produits de PCR amplifiant le gène <i>rpoB</i> .	146
Figure 50 : Mutation affectant le gène <i>rpoB</i> en position 531 TCG → TTG	147
Figure 51 : Mutation affectant le gène <i>rpoB</i> en position 516 GAC → TAC	147
Figure 52 : Profil d'électrophorèse des produits de PCR amplifiant le gène <i>rpsL</i> (A), la boucle <i>rrs</i> 530 (B) et la boucle <i>rrs</i> 912 (C).	148
Figure 53 : Mutation affectant le gène <i>rpsL</i> en position 43 AAG → AGG	149
Figure 54 : Dendrogramme des 28 isolats résistants à au moins un antituberculeux	152

Maladie contagieuse causée par un germe du complexe *Mycobacterium tuberculosis*, la tuberculose est et demeure un problème de santé publique à l'échelle mondiale. Alors que son éradication avait été envisagée à la faveur d'une décroissance constante dans les pays développés jusqu'à la moitié des années 1980, la progression de la pandémie du VIH, la dégradation des conditions de vie des populations défavorisées l'ont remise au-devant comme préoccupation importante des autorités sanitaires mondiales (Smith et *al.*, 2003).

L'Organisation Mondiale de la Santé estime que 8,7 millions de nouveaux cas de tuberculose sont survenus dans le monde en 2011. Au cours de la même année, le nombre de décès associé à la tuberculose se chiffrait à environ 1,4 millions de personnes (WHO, 2012). L'Afrique continue d'être l'épicentre de la maladie avec une incidence annuelle estimée à 262 cas pour 100 000 habitants en 2011.

L'objectif d'éliminer la tuberculose à l'horizon 2050 impose de nouvelles approches dans le développement de stratégies opérationnelles pour le contrôle de la maladie. Le développement des stratégies de lutte appropriées passe par la compréhension des caractéristiques de l'épidémie (Schurch and van Soolingen, 2011). Bien que l'épidémiologie classique ait joué et continue de jouer un rôle précieux dans la compréhension de la dynamique de la maladie, elle présente certaines limites qui sont exacerbées dans un contexte de forte morbidité (Mathema et *al.*, 2006). Les méthodes d'épidémiologie moléculaire sont devenues des compléments indispensables à la menée d'enquêtes épidémiologiques classiques car elles permettent entre autres de suivre l'évolution statistique du nombre de cas associés à un géotype donné, et donc la diversité des souches ; d'évaluer le taux de transmission récente (et par conséquent, l'efficacité des systèmes de contrôle de la tuberculose) et les facteurs de risque associés; de suivre la circulation globale des souches; de déterminer les spécificités géographiques de certaines souches ; de définir des relations phylogénétiques entre souches et de proposer un schéma de l'évolution des bacilles tuberculeux (Mathema et *al.*, 2006). Plusieurs techniques de typage basées sur l'amplification génomique ont été développées pour compenser les limites de la RFLP sur *IS6110*, première méthode de référence pour le typage

des bacilles de la tuberculose (van Embden et *al.*, 1993). Parmi elles, les plus utilisées sont le spoligotypage et le typage MIRU-VNTR.

L'objectif final de l'application de l'épidémiologie moléculaire à l'étude de la tuberculose humaine est de comprendre la dynamique de transmission de cette maladie dans une communauté donnée, ce que nous cherchons à faire pour le Cameroun au travers de l'analyse des souches isolées des patients tuberculeux pulmonaires.

Au Cameroun, la tuberculose demeure une maladie commune. Selon les estimations récentes de l'Organisation Mondiale de la Santé, l'incidence annuelle est de 262 cas pour 100 000 habitants (WHO, 2012). Cette incidence est en nette augmentation comparée aux estimations de 2009 où elle était de 182 cas pour 100 000 habitants (WHO, 2010). Le taux de détection de la maladie se situe autour de 50% et a permis d'enregistrer 25 000 nouveaux cas et cas de rechutes au cours de l'année 2011 (WHO, 2012). Cette incidence élevée semble être entretenue par l'épidémie du VIH. En effet, le Cameroun présente un des taux de séroprévalence de VIH les plus élevés en Afrique Centrale (ONUSIDA, 2010). On estime à environ 38% le nombre de patients tuberculeux co-infectés par le VIH (WHO, 2012).

L'épidémiologie de la tuberculose dans la région du Centre a consisté jusque-là en une description du nombre de cas détectés et des données démographiques associées. Il n'existe actuellement pas de données publiées sur l'épidémiologie moléculaire de la maladie dans cette région du pays. Une étude sur la biodiversité des isolats du complexe *Mycobacterium tuberculosis* collectés entre juillet 1997 et juin 1998 dans la région Ouest du Cameroun avait permis d'identifier un clone épidémiologiquement important circulant dans cette région du pays (Niobe-Eyangoh et *al.*, 2003). Ce groupe d'isolats génétiquement lié avait été désigné *famille Cameroun*. Dans ce contexte où plus de 42% des isolats présentent une homogénéité génétique considérable (Niobe-Eyangoh et *al.*, 2003), le spoligotypage n'est pas à mesure de distinguer efficacement les souches et d'identifier leur mode de circulation dans la communauté (Mathema et *al.*, 2006), d'où l'intérêt de l'associer au typage MIRU-VNTR pour une meilleure compréhension de la dynamique de transmission de la tuberculose. La valeur du pouvoir discriminatoire du typage MIRU-VNTR est proportionnelle au nombre de loci analysés. Lorsque 12 loci sont utilisés,

cette technique est moins discriminante que la RFLP sur *IS6110* pour les isolats à nombre élevé de copies *IS6110* (Mathema et al., 2006). Récemment, un système de génotypage basé sur 24 loci VNTR, a été développé et est en passe de devenir la nouvelle méthode de référence pour le typage des bacilles de la tuberculose (Supply et al., 2006). Bien que prometteuse, ce nouveau format de typage MIRU-VNTR doit être évalué dans des contextes différents du fait de la variabilité et du polymorphisme des loci VNTR selon certains facteurs liés aux zones géographiques.

C'est pour apporter notre contribution à la compréhension de la dynamique de transmission de la tuberculose dans la région du Centre au Cameroun que nous nous sommes proposés comme objectif de caractériser les souches du complexe *M. tuberculosis* dans la région du Centre ainsi que mutations associées à la résistance à l'isoniazide, la rifampicine et la streptomycine.

OBJECTIFS DE L'ETUDE

Objectif général

L'objectif général de ce travail était de décrire l'épidémiologie moléculaire de la tuberculose et caractériser les mutations associées à la résistance à l'isoniazide, la rifampicine et la streptomycine chez les patients tuberculeux pulmonaires admis à l'hôpital Jamot et à l'hôpital de District de Mbalmayo dans la région du Centre au Cameroun.

Objectifs spécifiques

Plus spécifiquement, nous nous sommes résolus à :

- Déterminer la fréquence de co-infection TB-VIH et les facteurs associés, la fréquence des résistances primaire et secondaire des souches du complexe *Mycobacterium tuberculosis*;
- Analyser la diversité des souches du complexe *Mycobacterium tuberculosis* et leur mode de circulation dans la population étudiée;
- Evaluer le potentiel des marqueurs moléculaires dans la prédiction de la résistance à l'isoniazide, la rifampicine et la streptomycine et analyser les liens génétiques entre les isolats résistants.

I.1 GENERALITES SUR LES MYCOBACTERIES

I.1.1 Taxonomie

Les mycobactéries appartiennent à l'ordre des Actinomycetales incluant la famille des Mycobacteriaceae qui ne comporte qu'un seul genre : le genre *Mycobacterium* (Shinnick and Good, 1994) (Figure 1).

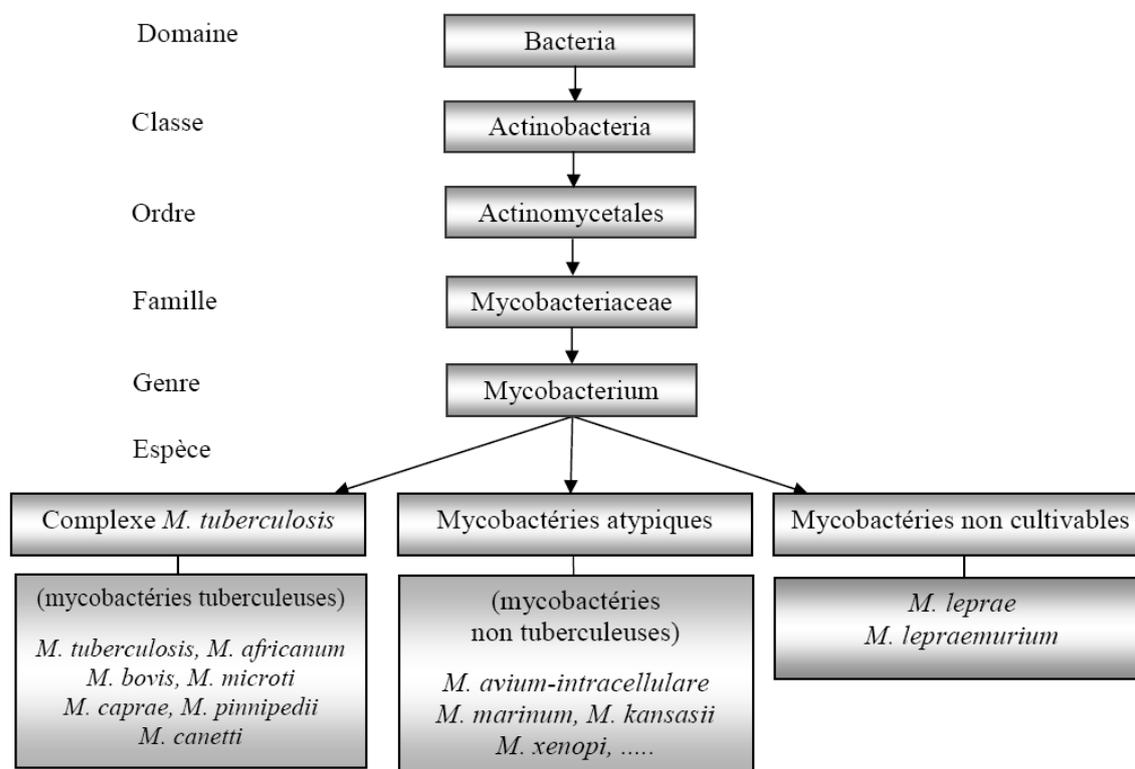


Figure 1 : Taxonomie des mycobactéries (Shinnick and Good 1994)

Classiquement, l'inclusion dans le genre *Mycobacterium* repose sur des propriétés morphologiques et tinctoriales (Vincent, 1995). Les mycobactéries sont définies comme des bacilles droits ou légèrement incurvés, de 1 à 10 µm de long et de 0,2 à 0,6 µm de large, immobiles, incapables de former des spores, conidies et capsules. La croissance, parfois filamenteuse ou en forme de mycélium, donne généralement lieu à la formation d'éléments bacillaires ou coccoïdes. La composition particulière de leur paroi, ne permet pas leur caractérisation par coloration à la méthode de Gram, mais leur confère une acido-alcool-résistance qui est mise en

évidence par des techniques de coloration spécialement développées, dérivées de la méthode originale de Ziehl-Neelsen.

Sous l'égide du Comité International de Bactériologie Systématique (CIBS), des critères de définition du genre ont été récemment proposés (Levy-Frebault and Portaels, 1992).

Ces critères sont :

- ✓ l'acido- alcool- résistance,
- ✓ la structure des acides mycoliques,
- ✓ le contenu en guanine- cytosine (GC%) de l'ADN

Comparés à d'autres organismes qui présentent une certaine acido-alcool-résistance et une valeur de %GC comparable, les mycobactéries se singularisent par la présence d'acides mycoliques particuliers (Levy-Frebault and Portaels, 1992).

I.1.1.1 L'acido-alcool-résistance

Les mycobactéries ont la capacité de retenir les colorants même après avoir été exposées à des solutions de décoloration fortes, telles que les acides ou les alcools. Pour mettre en évidence ce phénomène, plusieurs méthodes peuvent être utilisées soit par microscopie en lumière transmise (méthode chaud de Ziehl-Neelsen, et froid de Kinyoun) ou par fluorescence. Il est nécessaire que l'acido-alcool-résistance soit observée sur des bacilles isolés pour éviter une interprétation abusive de la décoloration inefficace du centre d'agrégats cellulaires. Les organismes d'autres genres peuvent également présenter une certaine acido-alcool-résistance, en particulier les *Nocardia* et genres apparentés, *Gordona*, *Rhodococcus*, et *Tsukamurella*, et dans une moindre mesure les corynebactéries.

I.1.1.2 Les acides mycoliques

Tous les genres mentionnés ci-dessus ont en commun la capacité de synthétiser des lipides particuliers : les acides mycoliques. Ces acides gras à longues chaînes carbonées, ramifiées, 6-hydroxyles, constituent le support moléculaire de l'acido-alcool-résistance. Liés au peptidoglycane par l'intermédiaire d'arabinogalactane, les acides mycoliques constituent une barrière hydrophobe tout autour de la cellule. Ils fixent directement la fuschine et la retiennent au niveau du cytoplasme, assurant ainsi l'intensité et la réfringence de la coloration. Ces acides constituent ainsi une barrière physique prévenant l'action décolorante des acides et

alcools. De ce fait, les acides mycoliques représentent un critère taxonomique de choix de par la variation de leur structure selon les genres bactériens. Les mycobactéries se singularisent par des mycolates à très longues chaînes, de 60 à 90 atomes de carbone qui libèrent des esters de pyrolyse de 22 à 26 atomes de carbone.

De plus, les mycobactéries sont les seuls organismes à synthétiser des mycolates porteurs de fonctions oxygénées supplémentaires telles que méthoxyl, cétone, époxyde ou carboxylique (Levy-Frebault and Portaels, 1992).

I.1.1.3 Le contenu en GC

Les taux en G+C dans le génome des mycobactéries sont compris entre 61 et 71%. Les autres genres qui synthétisent des acides mycoliques, présentent sensiblement les mêmes valeurs en G+C. Cependant, il faut noter une exception remarquable à cette homogénéité de contenu en G+C, à savoir *M. leprae* avec un % G+C de 54-57% (Levy-Frebault and Portaels, 1992).

I.1.2 Classification des mycobactéries

Les mycobactéries peuvent être classées selon leur importance clinique ou leur vitesse de croissance

I.1.2.1 Classification selon le pouvoir pathogène

Sur le plan du pouvoir pathogène, on distingue 3 grandes catégories de mycobactéries.

✓ **Les espèces strictement pathogènes** : ce sont les bacilles du complexe tuberculeux, *M. leprae*, *M. ulcerans*, *M. paratuberculosis*, *M. haemophilum* et *M. marinum*.

M. leprae, responsable de la lèpre chez l'homme est non cultivable sur milieu synthétique. *M. ulcerans*, agent d'ulcère nécrosant est la seule espèce capable de sécréter une toxine. *M. paratuberculosis* est l'agent causal de la para-tuberculose, entérite hypertrophiante des ruminants. *M. marinum* est responsable de granulomes. *M. haemophilum* provoque des lésions cutanées disséminées en particulier chez les immunodéprimés.

✓ **les espèces pathogènes opportunistes**, pouvant entraîner des affections humaines appelées mycobactérioses. Ces espèces sont en général responsables

des infections pulmonaires chez l'homme (et ce même en absence de toute immunodépression), des adénites chez l'enfant et aussi de rares infections osseuses ou cutanées. Contrairement à la tuberculose et à la lèpre, les mycobactérioses ne se transmettent pas entre individu. La source d'infection est l'environnement lui-même où ces mycobactéries sont largement répandues (Phillips and von Reyn, 2001).

✓ **les espèces saprophytes ou commensales**, qui ne sont jamais ou rarement responsables d'infection.

I.1.2.2 Classification selon leur vitesse de croissance

Selon la vitesse de croissance sur les milieux de culture à température optimale, le genre *Mycobacterium* se divise en deux groupes:

- ✓ **les mycobactéries à croissance lente** qui nécessitent de 7 jours jusqu'à 3 mois pour former des colonies visibles, avec un temps de génération compris entre 12 et 24 heures.
- ✓ **les mycobactéries à croissance rapide** (Runyon, 1959) ont un temps de génération qui varie entre 2 et 6 heures avec formation de colonies visibles en moins de 7 jours.

I.1.2.3 Classification des mycobactéries non tuberculeuses ou atypiques

La classification des mycobactéries atypiques en 4 groupes (Runyon, 1959) est basée sur des critères phénotypiques qui sont la pigmentation et la vitesse de croissance. Les groupes I, II et III ne renferment que les organismes à croissance lente alors que le groupe IV ne comprend que ceux à croissance rapide.

- ✓ **Le groupe I** de Runyon se compose d'espèces photochromogènes dont les colonies se pigmentent en présence de la lumière (*M. kansasii* et *M. marinum*).
- ✓ **Le groupe II**, inclut les bactéries scotochromogènes, dont les colonies sont pigmentées en présence ou en absence de la lumière (*M. gordonae*, *M. scrofulaceum*).
- ✓ **Le groupe III** comprend les non chromogènes qui donnent des colonies non pigmentées (*M. avium*, *M. intracellulare* et *M. xenopi*).
- ✓ **Le groupe IV** regroupe les individus à croissance rapide, pigmentés ou non (*M. fortuitum* et *M. chelonae*).

I.2 LA TUBERCULOSE ET LE COMPLEXE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

I.2.1 Définition

La tuberculose (TB) est une maladie infectieuse causée par les mycobactéries du complexe *tuberculosis*. Tsukamura a introduit pour la première fois la notion de « complexe *M. tuberculosis* » pour désigner les 4 espèces pathogènes strictes de *Mycobacterium* à savoir : *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, et *M. canetti* (Hoffner et al., 1993). Ces dernières présentent une homologie ADN/ADN supérieure à 95%. L'espèce *M. canetti* est la dernière décrite et présente les mêmes caractéristiques (van Soolingen et al., 1997). Au total ce sont 5 espèces reconnues par la nomenclature qui composent le « complexe *M. tuberculosis* ».

I.2.1.1 *Mycobacterium tuberculosis*

M. tuberculosis est le principal agent de la tuberculose humaine. Il a été décrit par Robert Koch en 1882. Le bacille mesure 1 à 4 µm de long sur 0,2 µm de large, légèrement incurvé, avec des extrémités arrondies. Dans les produits pathologiques il se présente isolé ou en amas et se multiplie en moyenne toutes les 20 heures sur les milieux de cultures enrichis dont le plus connu est le milieu de Löwenstein-Jensen additionné de glycérine. Les colonies qui se développent sur ce milieu en 3 à 4 semaines ont un aspect caractéristique: sec, rugueux, en «chou-fleur», celles-ci peuvent atteindre 5 à 10 mm de diamètre (eugoniques), sont de couleur crème, se détachent facilement du milieu et se dispersent mal dans l'eau.

I.2.1.2 *Mycobacterium bovis*

M. bovis est l'agent causal de la tuberculose du bétail. Contrairement à *M. tuberculosis* chez l'animal, il est fréquemment identifié comme agent causal de la tuberculose chez les humains (Cosivi et al., 1995). Le bacille est court et trapu sur le milieu de Löwenstein- Jensen. Sa culture est très lente et prend toujours plus de 30 jours à l'isolement. Les colonies sont d'abord plates et transparentes, puis bombées, le diamètre ne dépassant pas 1 mm. Elles se dissocient facilement dans l'eau. La croissance de *M. bovis* est inhibée par la glycérine à 0,075%, et à l'inverse elle est stimulée par la présence de 0,6% de pyruvate de sodium dans le milieu de culture. La dissociation spontanée des colonies sur milieu de culture artificielle est fréquente et se traduit par l'apparition sur une colonie d'un bourgeon satellite d'aspect rugueux.

Ce dernier donne naissance à une colonie eugonique et rugueuse, d'aspect similaire à *M. tuberculosis*. On pense que c'est ainsi qu'est apparu le BCG, mutant rugueux et avirulent de *M. bovis*. Il existe deux sous-espèces de *M. bovis*.

- ✓ *M. bovis* BCG qui a été obtenu par Calmette et Guérin en 1921 à partir d'une souche *M. bovis*, après 230 passages en séries dans un milieu contenant du glycérol, de l'extrait de pomme de terre et sels biliaires. Au cours de ces passages, la souche *M. bovis* est devenue inoffensive, avirulente mais protectrice.
- ✓ *M. bovis caprae* comb. Nov, dont la souche a été décrite en 1999 sous le nom de *M. tuberculosis subsp. Caprae* (Aranaz et al., 1999), puis a été reclassée sous le nom de *M. bovis susp. Caprae* (Niemann et al., 2002a). Cette espèce a été identifiée comme agent causal de la tuberculose des chèvres et moutons et se diffère de *M. bovis* par sa sensibilité à la pyrazinamide (Niemann et al., 2002a).

I.2.1.3 *Mycobacterium africanum*

M. africanum a été décrit pour la première fois en 1968 à partir d'un isolement réalisé au Sénégal chez un patient atteint de tuberculose pulmonaire (Castets et al., 1968). Ce germe occasionne surtout chez l'homme une tuberculose pulmonaire, principalement chez les patients originaires ou vivant en Afrique sub-saharienne (Baril et al., 1995). En raison de leur origine géographique, ces souches ont été appelées *M. africanum*. Par la suite deux sous-types ont été identifiés: le sous-type I avec les caractéristiques culturelles et biochimiques proche de *M. bovis*, surtout isolé en Afrique de l'Ouest, et le sous-type II semblable au *M. tuberculosis* est quant à lui localisé en Afrique de l'Est (Niemann et al., 2002b).

A l'examen microscopique, son aspect est identique à celui de *M. tuberculosis*. La croissance de la culture est stimulée par 0,25% de pyruvate de sodium. Les colonies sont dysgoniques, plates, de couleur mâte avec un bourgeon central et s'enchâssent dans la gélose ; les bacilles sont micro aérophiles. Les caractères biochimiques sont: absence habituelle de nitrate réductase, et une variabilité dans le résultat du test à la niacine. *M. africanum* est sensible à l'hydrazide thiophène carboxylique (TCH) et à 50 µg/mL de pyrazinamide (Castets et al., 1968).

I.2.1.4 *Mycobacterium microti*

M. microti a été découvert par Wells en 1937 sur la chauve-souris (*Microtus agrestis*) (Wells and Oxon, 1927) sous le nom de «vole bacillus» et est classé comme membre du complexe *M. tuberculosis*. Cette espèce est responsable de la tuberculose murine et a été isolé chez d'autres mammifères tels que: les rongeurs sauvages, les chats, les porcs et le Lama du zoo (Cavanagh et al., 2002). Récemment il a été identifié comme agent causal de la tuberculose humaine aussi bien chez les patients immunocompétents qu'immunodéprimés (van Soolingen et al., 1998).

I.2.1.5 *Mycobacterium canetti*

Isolé et identifié par G. Canetti en 1969 chez un patient français présentant une tuberculose pulmonaire cavitaire, *M. canetti* a été décrit comme une espèce du complexe du bacille tuberculeux (CBT) en 1997 par (van Soolingen et al., 1997) Les cas d'infection dues à *M. canetti* n'ont été décrits que chez des patients originaires ou ayant séjourné en Afrique de l'Est (Miltgen et al., 2002).

I.2.1.6 *Mycobacterium pinnipedii*

L'espèce *M. pinnipedii* tient son nom des pinnipèdes marins desquelles elle a été isolée pour la première fois. Entre 1985 et 1996, elle a été isolée des phoques et des otaries à fourrure en Australie et en Nouvelle-Zélande (Cousins et al., 1993). Elle a par la suite été identifiée dans les isolats de mammifères semblables en Amérique du Sud (Bastida et al., 1999). Plutard, la caractérisation de ces souches a permis de confirmer qu'il s'agit bien d'une espèce distincte appartenant au complexe *M. tuberculosis* (Cousins et al., 2003).

I.2.2 Le génome de *Mycobacterium tuberculosis*

Le séquençage et l'analyse systématique du génome de *M. tuberculosis* H37Rv ont été entrepris en collaboration entre l'Institut Pasteur de Paris et le *Sanger Centre de Hinxton* (Cambridge, Grande-Bretagne). La construction d'une banque ordonnée de BAC (Bacterial Artificial Chromosome) contenant de larges inserts d'ADN de *M. tuberculosis* H37Rv (Brosch et al., 1998) a été une étape décisive dans l'accomplissement de ce projet. Ce système BAC a en fait permis de maintenir et de répliquer des fragments d'ADN mycobactérien d'une taille allant jusqu'à 130 kb dans

Escherichia coli. Un jeu de 68 BACs chevauchant a été à la fin construit et qui couvrait pratiquement l'ensemble du génome de *M. tuberculosis* H37Rv. Ce qui a permis de déterminer, bien que sans difficultés la séquence de régions de *M. tuberculosis* ayant un contenu en G+C supérieur à 80%.

Le séquençage du génome a enfin permis de démontrer que le chromosome de *M. tuberculosis* était circulaire avec un pourcentage en G+C d'environ 65,6% (Figure 2).

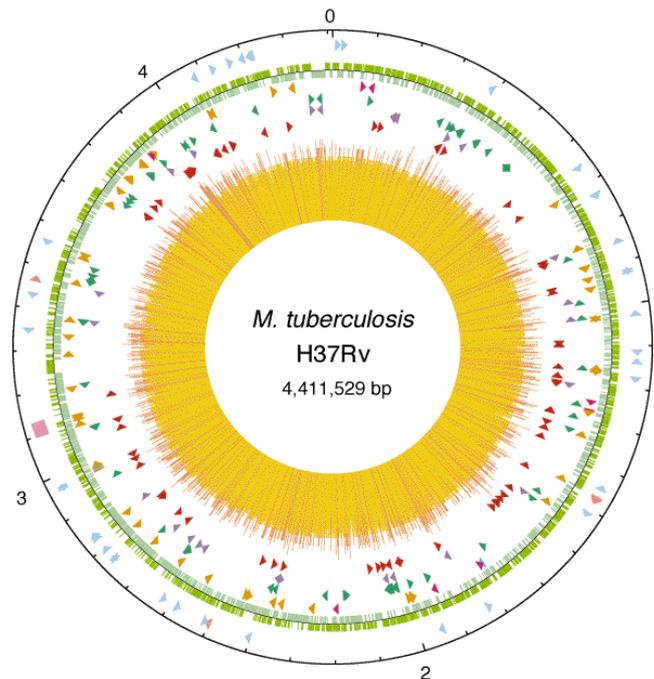


Figure 2 : Représentation du génome de *Mycobacterium tuberculosis* (Cole et al., 1998)

L'annotation du génome de *M. tuberculosis* H37Rv publiée en 1998 est très vite devenue obsolète et une ré-annotation de cette séquence a été publiée en 2002 (Camus et al., 2002). Cette nouvelle annotation a permis d'incorporer 82 gènes supplémentaires. Toutefois, la nomenclature des gènes n'a pas été modifiée; les nouveaux gènes conservent les noms des gènes précédemment identifiés suivis des lettres A, B ou D. La ré-annotation de la séquence du génome a permis l'identification de quatre erreurs de séquençage qui font passer la taille du génome de 4411529 à 4411532 pb (Camus et al., 2002). Il a été possible de d'identifier de façon précise les fonctions de 2058 protéines (52% des 3995 protéines existantes).

L'analyse du génome de *M. tuberculosis* a permis l'identification de grandes familles de gènes qui étaient jusque-là inconnues. Au premier rang, figuraient les familles PE et PPE qui occupent environ 8% du génome, comprenant 67 membres et 100 membres respectivement (Cole et al., 1998). Ces protéines sont caractérisées par des motifs de pro-glu (PE) et pro-pro-glu (PPE) typique, situés dans la partie aminoterminal, et par des régions centrales et carboxyterminales répétitives, très riches en glycine pour les PE et asparagine pour les PPE. Il existe des preuves de plus en plus évidentes que certaines protéines PE-PGRS pourraient être impliquées dans la pathogenèse de la maladie (Camacho et al., 1999). Des études de fractionnement subcellulaire ont permis de localiser certaines protéines PE-PGRS dans la paroi cellulaire et la membrane de *M. tuberculosis* (Banu et al., 2002). Une autre protéine PE-PGRS Rv1759c, qui varie selon les souches, lie la fibronectine et pourrait ainsi réguler la fixation des bactéries aux cellules hôtes (Espitia et al., 1999). L'immunogénicité de la protéine Rv1818c PE-PGRS a été largement étudiée chez la souris (Delogu and Brennan, 2001), où l'immunisation avec les domaines PE induit des réponses de type Th1 qui ne sont pas rencontrées lorsque la protéine complète PE-PGRS est utilisée.

L'analyse du génome a aussi indiqué que 14 gènes *esx*, codant pour les protéines de la famille ESAT-6, sont présents dans 11 régions différentes (Cole et al., 1998). ESAT-6, une petite protéine codée par le gène *esxA* de cette famille, est un antigène protéique apparemment sécrété indépendamment de la voie habituelle de sécrétion faisant intervenir un peptide signal. Cet antigène est fortement reconnu par les lymphocytes T humains et provoque une production massive d'IFN- γ . Des études récentes ont démontré que certains membres de la famille ESAT-6 seraient impliqués dans le pouvoir pathogène de *M. tuberculosis* (Pym et al., 2002). Des vaccins sous-unités potentiels ont été obtenus en utilisant des antigènes immunodominants. C'est le cas de la protéine ESAT-6 « *early secretory antigenic target* » (6 kiloDalton (kDa) qui confère un certain degré de protection contre *M. tuberculosis* chez la souris (Olsen et al., 2004) et chez des primates non humains (Langermans et al., 2005). Une protéine de fusion basée sur la combinaison ESAT-6-antigène 85B administrée à des souris en même temps qu'un adjuvant induit une réponse immunitaire dose dépendante. Cette réponse immunitaire s'accompagne d'une immunité protectrice comparable à celle induite par le BCG sur une large

gamme de doses. Le vaccin induit une mémoire immunologique efficace qui reste stable 30 semaines après la vaccination (Agger et *al.*, 2006).

I.2.3 Pathogenèse et histoire naturelle de la maladie

I.2.3.1 Transmission

La tuberculose est transmise par voie aérogène, c'est-à-dire d'une personne atteinte de tuberculose pulmonaire à une autre personne non infectée. L'infection se transmet à travers un aérosol de très petites gouttelettes de sécrétions bronchiques («droplet nuclei»), qui sont dispersées dans l'air lors de quintes de toux et inhalées par la personne saine en contact (Dautzenberg and Bouvet, 1996). Le risque de contamination dépend de la concentration des mycobactéries dans l'air ambiant, de la virulence des micro-organismes, de la durée d'exposition et de la réceptivité individuelle de la personne en contact. Dans la pratique, cela signifie que seules les personnes atteintes de tuberculose des voies aériennes (poumons, bronches, larynx) peuvent transmettre la maladie, pour autant que leurs expectorations contiennent des bactéries tuberculeuses en quantité suffisante et que ces expectorations atteignent l'air ambiant sous forme d'aérosol (Rouillon et *al.*, 1976). Chez les personnes immunodéprimées, il est possible que l'infection ait lieu après un contact de courte durée avec un malade. Dans la majorité des cas, les bacilles tuberculeux sont arrêtés au niveau du nez, des bronches et bronchioles. Ils sont alors entraînés par le mucus vers le pharynx puis déglutis et détruits par l'acidité de l'estomac.

I.2.3.2 Evolution du bacille dans l'organisme

I.2.3.2.1 La primo-infection

Chez certains sujets exposés, les mycobactéries inhalées dans les voies respiratoires survivent et interagissent avec le système de défense immunitaire. La réaction a lieu à l'intérieur des macrophages alvéolaires qui ont phagocyté les mycobactéries, et se caractérise par la libération de cytokines, le recrutement de cellules T et la formation progressive de granulomes (Dautzenberg and Bouvet, 1996). La signature de la réaction immunitaire est la sensibilisation des lymphocytes T qui seront capables, quelques semaines après l'infection, de reconnaître les peptides antigéniques de *M. tuberculosis* et de réagir par une libération d'interféron gamma et de cytokines et le recrutement de cellules inflammatoires en cas de

nouveau contact naturel ou artificiel. Cette réaction est à la base du test tuberculinique et des tests sanguins de dépistage de l'infection tuberculeuse latente.

Sur le plan clinique, la tuberculose primaire ou primo-infection est souvent asymptomatique. La majorité des sujets contaminés ne développent pas la tuberculose immédiatement après l'infection et peuvent rester sans aucun signe clinique de maladie pendant des mois ou des années. Une fois passée la phase initiale, les micro-organismes entrent dans une phase prolongée de latence, caractérisée par un ralentissement de leur métabolisme. L'infection tuberculeuse est limitée aux granulomes formés lors de la primo-infection et peut être détectée seulement par une conversion tuberculinique ou par la présence de lymphocytes sensibilisés à l'égard des peptides antigéniques spécifiques de *M. tuberculosis*. Dans la plupart des cas (dans 90% des cas chez les patients VIH négatifs) la situation se stabilise à ce stade et la lésion pulmonaire cicatrise progressivement, on parle d' « infection tuberculeuse latente (ITL) » (Smith, 2003).

I.2.3.2.2 La tuberculose active

▪ La tuberculose pulmonaire

La tuberculose-active ne se développe que chez environ 10% des personnes infectées par *M. tuberculosis*. Elle peut se développer soit directement après la primo-infection, soit après plusieurs années suite à la réactivation de l'« infection tuberculeuse latente » (Dautzenberg and Bouvet, 1996). Dans ce cas, la lésion précédemment formée se nécrose et les bacilles tuberculeux quiescents sont libérés (Smith, 2003). La tuberculose active s'accompagne de signes cliniques et/ou radiologiques. Les signes cliniques de la tuberculose pulmonaire sont une toux persistante avec des expectorations parfois accompagnées de sang, une douleur thoracique et des symptômes plus généraux comme fièvre, sudation nocturne, fatigue, perte d'appétit, et amaigrissement.

▪ Les formes extrapulmonaires

La tuberculose pulmonaire (ou phtisie) est la forme la plus commune de la tuberculose (85% des cas), cependant les bacilles tuberculeux peuvent, plus rarement, être transportés dans tout l'organisme, via les systèmes lymphatique et sanguin, créer de nouveaux foyers infectieux et provoquer une tuberculose extra-pulmonaire (15% des cas) (Dautzenberg and Bouvet, 1996). Les bacilles peuvent

infecter différents organes du corps tels que les os, les reins, les ganglions, les méninges, l'intestin, la peau,... Lorsque la tuberculose est extra-pulmonaire, les symptômes peuvent varier en fonction de la région corporelle atteinte. La forme extra-pulmonaire est plus fréquemment observée chez les patients séropositifs (VIH positifs) dont le système immunitaire ne peut contrôler l'infection. Chez les enfants, les tuberculoses miliaires (disséminées) sont plus fréquentes que les tuberculoses pulmonaires.

I.3 EPIDEMIOLOGIE DE LA TUBERCULOSE

I.3.1 Incidence globale et prévalence

Appelée autrefois « peste blanche », la tuberculose a ressurgi à la fin des années 1980 et est devenue en quelques années une des principales causes de mortalité et de morbidité dans le monde (Moore, 2007). L'OMS estime à 12 millions, le nombre de cas de tuberculose active à l'échelle mondiale (WHO, 2012). En 2011, on estimait à environ 8,7 millions soit 125 cas pour 100 000 habitants, le nombre de nouveaux cas de tuberculose survenus dans le monde, dont 56% à frottis d'expectoration positifs aux bacilles acido-alcool résistants, la forme la plus infectieuse de la maladie. La mortalité associée à la tuberculose a été estimée à 1,4 millions de personnes au cours de la même année (WHO, 2012).

L'épidémie de la tuberculose reste cependant fortement localisée (Figure 3). La plupart des cas incidents surviennent en Asie (59%) et en Afrique (26%) (WHO, 2012). Les cinq pays ayant eu le plus grand nombre de cas incidents en 2011 étaient l'Inde (2 à 2,5 millions), la Chine (0,9 à 1,1 millions), l'Afrique du Sud (0,4 à 0,6 million), l'Indonésie (0,4 à 0,5 million) et le Pakistan (0,3 à 0,5 million).

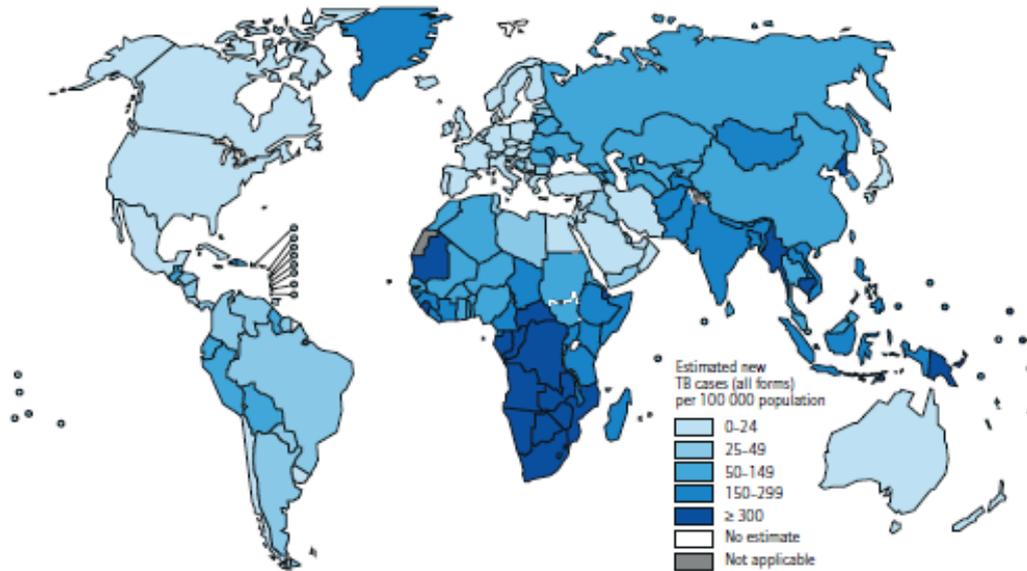


Figure 3 : Estimations de l'incidence de la tuberculose toutes formes confondues en 2011 à l'échelle mondiale (WHO, 2012).

I.3.2 Tuberculose et interaction avec l'épidémie de VIH

Le VIH/sida est d'une importance primordiale dans la résurgence de la tuberculose (Dye, 2006). Une comparaison des statistiques mondiales de la tuberculose et du VIH/sida montre un chevauchement entre les deux épidémies, principalement en Afrique sub-saharienne et en Asie du Sud-est où on observe une synergie dévastatrice entre les deux épidémies (Corbett et *al.*, 2003). Globalement, on estime qu'environ 1,1 million soit 13% des cas de tuberculose nouvellement diagnostiqués sont infectés par le VIH (WHO, 2012).

En Afrique, 39% des cas de tuberculose incidente sont co-infectés par le VIH, représentant 79% du fardeau à l'échelle mondiale (Figure 4) (WHO, 2012). L'infection par le VIH est un puissant facteur de risque pour la tuberculose. Non seulement le VIH augmente le risque de réactivation de l'infection tuberculeuse latente, mais augmente également le risque de progression rapide de la tuberculose peu de temps après infection par *M. tuberculosis* ou le risque d'une réinfection. Chez les personnes seulement infectées par *M. tuberculosis*, le risque de développer une tuberculose au cours de la vie varie entre 10% et 20%. Chez les personnes co-infectées par la tuberculose et le VIH, cependant, le risque annuel peut dépasser 10% (Corbett et *al.*, 2003).

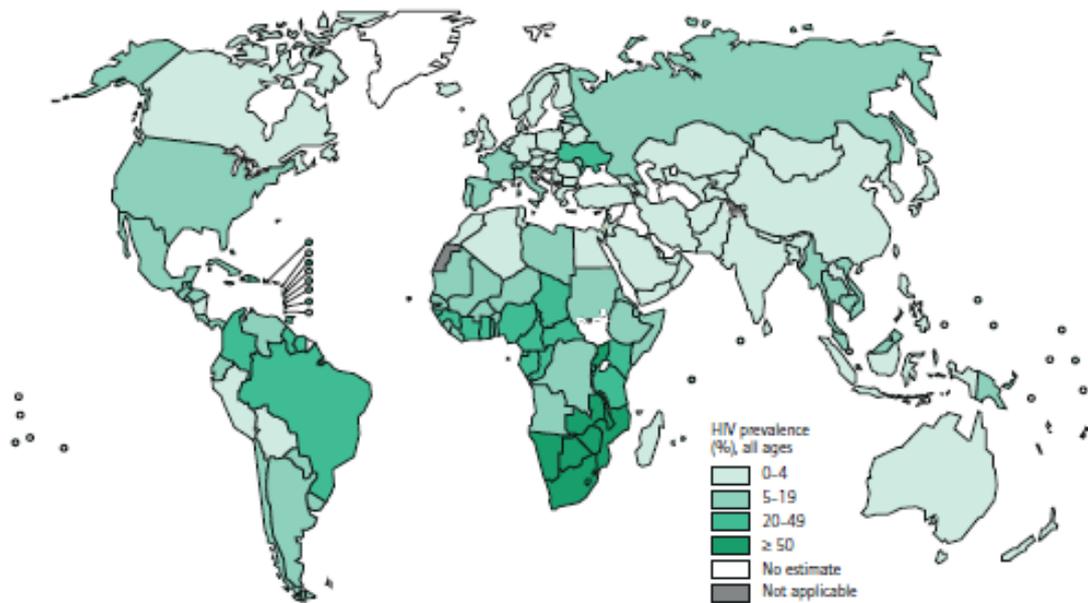


Figure 4 : Estimations de la prévalence de VIH chez les nouveaux cas de tuberculose en 2011 à l'échelle mondiale (WHO, 2012)

I.3.3 Tuberculose et Multirésistance

Le contrôle efficace de la maladie est entravé par l'émergence de tuberculose multirésistante (Cauthen et *al.*, 1996). La tuberculose multirésistante (TB-MR) se définit comme une tuberculose résistante à la fois à l'isoniazide et à la rifampicine (WHO-IUATLD, 2008). La prévalence de la TB-MR est passée d'environ 500 000 cas en 2008 à 630 000 cas en 2011 (WHO, 2012). Globalement, 3,7% de nouveaux cas et 20% des cas déjà traités ont des TB-MR (WHO, 2012). La résistance aux antituberculeux est d'une grande préoccupation pour le contrôle de la tuberculose et les programmes de prévention, car les patients hébergeant des souches multirésistantes de *M. tuberculosis* doivent recevoir des régimes de traitement alternatifs impliquant des médicaments de seconde ligne qui sont plus toxiques et moins efficaces (Montoro and Rodriguez, 2007). Au-delà de cette importance évidente sur le plan clinique et épidémiologique, la TB-MR a également un impact économique puisque le traitement est plus cher que le coût estimatif pour tous les autres cas.

En Juillet 2011, 84 pays et territoires avaient signalé au moins un cas de tuberculose ultrarésistante (XDR-TB) qui définit les TB résistantes non seulement à l'isoniazide et la rifampicine mais aussi aux fluoroquinolones et à au moins un antituberculeux injectable de seconde ligne (WHO-IUATLD, 2008). Plus récemment, un pallier a été franchi avec l'émergence des cas de tuberculose totalement résistants (TDR-TB).

I.4 DEPISTAGE ET DIAGNOSTIC DE LA TUBERCULOSE

La plupart des personnes qui entrent en contact avec des mycobactéries développent une réaction immunitaire dite retardée qui repose sur la sensibilisation des lymphocytes T. Cette réaction immunitaire peut être mise en évidence par la réaction cutanée à l'injection intradermique de tuberculine que l'on obtient à partir de cultures de *M. tuberculosis* (CSHPF, 2004b), ou par la mesure *in vitro* de la libération de l'interféron gamma à partir des lymphocytes T stimulés (tests IFN- γ) (Pai et al., 2004). La mise en évidence d'une sensibilisation contre les antigènes tuberculeux est une preuve indirecte qu'une infection due à *M. tuberculosis* s'est produite à la suite d'un contact avec un cas de tuberculose contagieuse.

I.4.1 Dépistage de l'infection tuberculeuse latente

I.4.1.1 Intradermoréaction (IDR) tuberculique (ou test de Mantoux)

Il s'agit d'un test d'hypersensibilité retardée. Cette épreuve consiste en l'injection intradermique (face antérieure de l'avant-bras) d'un mélange de protéines tuberculeuses purifiées appelé PPD (*Purified Protein Derivative*) ou tuberculine (CSHPF, 2004b). Une réaction positive à ce test se traduit, 48 à 72 heures après l'injection, par une rougeur et une induration de la peau (> 10 mm de diamètre) au niveau du site d'injection (présence d'une immunité cellulaire contre *M. tuberculosis*). Une réponse positive à ce test ne signifie pas que le patient présente une tuberculose active mais bien que son organisme a connu, à un moment donné, un contact avec le bacille tuberculeux (primo-infection).

Chez les personnes âgées et les patients immunodéprimés, comme les malades atteints par le SIDA, il y a un risque de résultats faussement négatifs à l'IDR car ces patients sont «non répondeurs». Des résultats faussement positifs sont également possibles notamment si le patient a été vacciné par le BCG ou infecté par

une autre mycobactérie non-tuberculeuse donnant lieu à une réaction croisée. Lorsqu'un patient présente une intradermo-réaction positive, il est nécessaire de réaliser des examens plus approfondis afin de différencier une tuberculose latente d'une tuberculose active.

I.4.1.2 Tests immunologiques (QuantiFERON-TB-Gold® et TSPOT-TB®)

Les tests sont basés sur la mesure *in vitro* de la libération d'interféron gamma (IFN- γ) par les lymphocytes T sensibilisés envers certains peptides spécifiques du complexe *Mycobacterium tuberculosis* mais absents chez *M. bovis* BCG et chez la plupart des mycobactéries non tuberculeuses (Pai et *al.*, 2004). Ils ont une sensibilité comparable à celle du test tuberculinique chez les sujets immunocompétents, mais cependant une plus grande spécificité, en particulier chez les sujets vaccinés avec le BCG. Les tests sanguins évitent le défaut majeur du test tuberculinique, soit l'existence de faux positifs dus à une vaccination préalable avec le BCG et au contact avec les mycobactéries de l'environnement.

I.4.2 Diagnostic de la tuberculose active

Le diagnostic bactériologique de la tuberculose repose sur la mise en évidence des bacilles de la tuberculose dans les prélèvements respiratoires (tuberculose pulmonaire) ou dans d'autres prélèvements biologiques (tuberculose extrapulmonaire). Les méthodes bactériologiques à mettre en œuvre comprennent la recherche de bacilles acido-alcoolrésistants (BAAR) par l'examen microscopique, la mise en culture sur des milieux spécifiques (Löwenstein-Jensen et Coletsos), l'identification par méthode moléculaire ou biochimique des bacilles obtenus en culture et les tests de sensibilité aux antituberculeux (CSHPF, 2004a).

I.4.2.1 Choix des prélèvements

I.4.2.1.1 Formes pulmonaires

On privilégie les produits issus de l'expectoration spontanée. En effet, quand la toux est productive, l'expectoration est préférable au tubage gastrique. Les prélèvements d'aspect salivaire ne conviennent pas. Les prélèvements doivent être faits dans de bonnes conditions d'hygiène (récipient large, à fermeture hermétique), afin d'assurer la sécurité du personnel (port de masques de protection respiratoire).

Comme les émissions de bacilles de la tuberculose sont intermittentes, les examens bactériologiques doivent être répétés. Le nombre optimal de prélèvements est de 3 (1 par jour, 3 jours consécutifs), à réaliser avant la mise en route du traitement antituberculeux (CSHPF, 2004a).

I.4.2.1.2 Formes extra-pulmonaires (CSHPF, 2004a)

En cas de suspicion de tuberculose rénale, les urines sont prélevées trois jours de suite, si possible après restriction hydrique. Pour le diagnostic de méningite tuberculeuse, le liquide céphalorachidien (LCR) est prélevé par ponction lombaire. Afin d'optimiser la découverte de bacilles de la tuberculose à l'examen microscopique et en culture, il est souhaitable de prélever au moins 2 mL de LCR et de signaler au laboratoire la suspicion de tuberculose. En cas d'adénopathies, l'exérèse est préférable à la ponction-aspiration. Dans les formes disséminées, fréquentes chez les immunodéprimés, notamment les patients séropositifs pour le VIH, *M. tuberculosis* peut être cherché par hémoculture. Le prélèvement est réalisé sur tube spécial pour centrifugation-lyse, soit sur flacon spécial contenant un milieu de culture lytique radioactif ou froid. Le prélèvement de sang sur tube conventionnel n'est pas recommandé. En cas de biopsie (plèvre, péritoine, bronche, os, péricarde, foie, ganglion lymphatique, etc.), les prélèvements sont rapidement transportés au laboratoire pour éviter la multiplication d'autres bactéries ou champignons. Les prélèvements sont conservés au froid (+4 °C) en attendant leur manipulation.

I.4.2.2 Examen microscopique

L'examen peut être effectué soit directement sur le produit pathologique, soit après fluidification et décontamination. Le caractère d'acido-alcoolo-résistance des mycobactéries permet l'utilisation de colorations spécifiques : coloration de Ziehl Nielsen à chaud ou de Kinyoun à froid, ou encore la coloration à l'auramine (Figure 5) (WHO, 1998a).

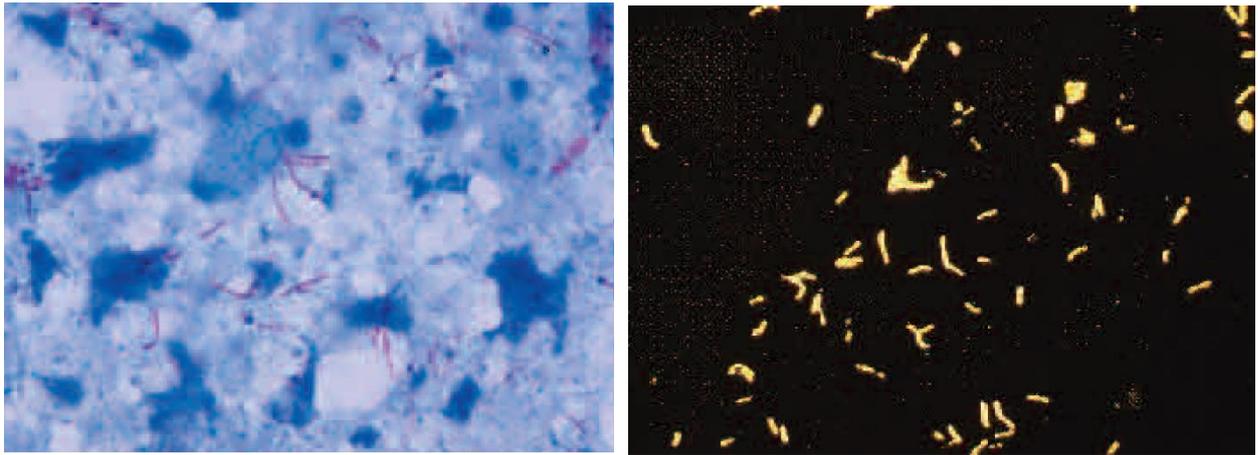


Figure 5 : Microscopie des bacilles tuberculeux. Coloration au Ziehl Nielsen (gauche), les bacilles apparaissent rouges sur fond bleu de la préparation. Coloration à l'auramine (droite), Les bacilles apparaissent jaunes fluorescents sur fond noir. (WHO, 1998a)

La microscopie à fluorescence permet de réduire le temps de lecture à 2 ou 3 minutes. L'examen microscopique est peu sensible et son seuil est de 10^4 – 10^5 bacilles par mL. La spécificité est très bonne pour la détection des mycobactéries dans leur ensemble (complexe *M. tuberculosis* et mycobactéries atypiques). Les bactéries des genres *Nocardia* et *Rhodococcus* présentent des degrés variables d'acido-alcoolo résistance, mais posent, en pratique, peu de problèmes d'interférence.

La détection de BAAR à l'examen microscopique constitue un élément présomptif de tuberculose de toute première importance. C'est pourquoi l'examen microscopique est une étape essentielle qui doit être effectuée au plus vite, le jour du prélèvement de préférence. Les résultats, exprimés de manière semi-quantitative, doivent être communiqués rapidement.

I.4.2.3 Culture des mycobactéries (WHO, 1998b)

Du fait que la culture des mycobactéries est longue et qu'il n'existe pas de milieu sélectif pour ces bactéries, il est nécessaire de décontaminer les prélèvements non stériles pour en éliminer la flore commensale. Les méthodes de décontamination mettent généralement en jeu de la soude ou un tensioactif pour assurer également la fluidification, très utile pour les expectorations. Plusieurs méthodes de décontamination peuvent être utilisées en vue des cultures sur milieu solide à l'œuf de Löwenstein-Jensen, mais seule la méthode associant soude et N-acétylcystéine

est compatible avec les cultures sur milieu liquide ou sur milieu solide gélosé. Les méthodes de décontamination les plus couramment utilisées :

- ✓ **L'hydroxyde de sodium.** Cette méthode utilise l'hydroxyde de sodium à des concentrations variant entre 2% et 4% permettant de digérer et en même temps, de décontaminer le spécimen. Chaque laboratoire doit en implémentant la technique, déterminer la concentration minimale pour une digestion et une décontamination optimales.
- ✓ **N-acétylcystéine-hydroxyde de sodium, chlorure de sodium et d'hydroxyde de sodium.** Cette méthode, l'une des plus utilisées dans le monde entier, implique la N-acétylcystéine qui sert à la digestion du mucus, et l'hydroxyde de sodium servant d'agent de décontamination.
- ✓ **L'acide oxalique.** Cette méthode est recommandée pour la décontamination des spécimens cliniques qui peuvent être contaminés par *Pseudomonas aeruginosa*, habituellement les échantillons d'urine et des échantillons pulmonaires chez des patients atteints de mucoviscidose.

Les prélèvements considérés comme stériles tels que le LCR, le sang et les lésions fermées (ponctions ou biopsies) sont directement mis en culture sans décontamination préalable. Les bacilles de la tuberculose, bien que plus résistants que les autres bactéries aux procédures de décontamination, sont en partie détruits et des décontaminations trop prolongées ou effectuées dans de mauvaises conditions. La décontamination des prélèvements non stériles doit être contrôlée. Pour cette raison, les laboratoires surveillent leur taux de cultures souillées. Un taux inférieur à 3% suggère des méthodes de décontamination trop drastiques et un taux de 3 à 5% est considéré comme convenable.

1.4.2.3.1 Méthodes traditionnelles de culture

Différents milieux de culture sont utilisés pour l'isolement des mycobactéries. Ils sont pour la plupart à base d'œufs et contiennent des concentrations élevées de vert de malachite dont le rôle est d'empêcher la contamination par d'autres bactéries (WHO, 1998b). En général, après l'étape de centrifugation, les sédiments sont inoculés sur deux tubes Löwenstein- Jensen. Dans les zones à forte incidence de tuberculose bovine, un tube de milieu coletsos doit être ajouté. *M. bovis* et d'autres

espèces du complexe *M. tuberculosis* (*M. microti* et *M. africanum*) sont incapables d'utiliser le glycérol comme source de carbone en raison de l'absence d'une pyruvate kinase. Ainsi, on observe une moins bonne croissance de ces organismes sur milieu de Löwenstein-Jensen qui contient du glycérol comme seule source de carbone disponible. Le milieu coletsos a la même composition à l'exception du glycérol qui est remplacé par 0,5% de pyruvate de sodium.

Le milieu Ogawa est un autre milieu à base d'œufs qui est comparable dans sa composition au milieu Löwenstein-Jensen. Il est plus économique car l'asparagine y est remplacée par le glutamate de sodium plus facilement accessible. Les milieux Middlebrook 7H10 et 7H11 sont des milieux à base de gélose. Leurs ingrédients de base sont commercialement disponibles: poudre de base, agar et enrichissement Middlebrook OADC. Le Middlebrook 7H9 est un milieu liquide et peut être préparé à partir des poudres disponibles dans le commerce complétées par un enrichissement Middlebrook OADC après stérilisation (WHO, 1998b). Ces milieux produisent des rendements d'isolement légèrement plus élevés que ceux à base d'œufs, mais sont nettement plus chers. Les délais des cultures dépendent de la richesse en bacilles et sont en moyenne, respectivement pour les milieux solides et liquides, de trois et une semaine pour les prélèvements positifs à l'examen microscopique et de quatre et deux semaines pour les prélèvements négatifs à l'examen microscopique.

1.4.2.3.2 Culture en milieu liquide

- ✓ **La méthode Mycobacterial Growth Indicator Tube (MGIT)** manuelle et automatisable (Bactec 960 TB) : Cette méthode utilise un tube contenant un sel de ruthénium qui émet une fluorescence visible en lumière violette lorsque la pression en oxygène diminue dans le tube. Les délais de croissance de *M. tuberculosis* sont proches de ceux obtenus avec le Bactec 460 TB. Ce milieu ne peut pas être utilisé pour la recherche de mycobactéries dans le sang (Pfyffer et al., 1997).
- ✓ **La méthode Bactec 9000MB (Becton Dickinson)** : il s'agit d'une adaptation de la série des Bactec 9000 aux mycobactéries. Le principe est identique à celui du MGIT. La croissance est détectée par l'apparition d'une fluorescence liée à la diminution de la pression en oxygène. Ses performances semblent identiques au

Bactec 960 TB pour les échantillons positifs à l'examen microscopique, mais inférieures pour les négatifs (Zanetti et *al.*, 1997).

- ✓ **La méthode BacT/Alert 3D (BioMérieux)** : c'est une méthode automatisée dont le principe repose sur l'acidification du milieu provoquée par le métabolisme bactérien qui entraîne une modification de l'indicateur coloré contenu dans une pastille au fond du flacon. Le délai moyen de croissance est, selon les études, de 13 à 16 jours (Alcaide et *al.*, 2000).
- ✓ **Le dispositif SEPTI CHEK AFB (Becton Dickinson)** : constitué d'un système diphasique liquide et solide. Le délai moyen de détection de la croissance est de 16 jours. Pour réduire le délai de détection, il est nécessaire de réaliser un examen microscopique systématique sur le milieu liquide car il n'existe aucun indicateur de croissance dans ce milieu.
- ✓ **La méthode Biotest utilisant un milieu MBRedox** : cette méthode utilise un tube de 5 mL de milieu de Kirchner contenant un sel de tétrazolium qui, incolore en milieu oxygéné, se transforme en formazan de couleur rouge en atmosphère réduite. La présence d'une culture de *M. tuberculosis* se traduit par l'apparition de grains rouge-violet dont la lecture est parfois délicate. Le gain de temps de croissance par rapport au milieu de Löwenstein semble moins important qu'avec les autres milieux liquides (Heifets et *al.*, 2000).
- ✓ **La méthode BIO RAD utilisant le milieu Bio FM** : Cette méthode utilise dans son principe un tube de 5 mL de milieu de Middlebrook enrichi en OADC (Oleic Albumin Dextrose Catalase). La croissance des souches de mycobactéries est détectée par un indicateur de positivité qui entraîne une coloration des cultures en bleu foncé pouvant aller jusqu'au violet.

I.4.2.4 Identification des mycobactéries à partir des cultures

I.4.2.4.1 Identification du complexe *Mycobacterium tuberculosis*

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

Sur milieu 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 celle de BCG, sont non pigmentées, rugueuses et apparaissent entre 2 et 6 semaines (WHO, 1998b). Les colonies de *M. bovis* et *M. africanum* sont non pigmentées, petites, fines et d'apparition tardive entre 6 et 10 semaines (Vincent et al., 2003). 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.

▪ **La morphologie des bacilles après coloration de Ziehl Nielsen**

L'examen microscopique permet de vérifier le caractère acido-alcool résistant des cultures. Les bacilles tuberculeux sont des bacilles fins de 5 à 7 µm de long. Ils se présentent sous forme d'agrégats et peuvent prendre un aspect de 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* intracellulaire évoquée en présence de coccobacilles.

I.4.2.4.2 Différenciation des espèces au sein du complexe *tuberculosis*

La différenciation des espèces du complexe tuberculeux (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, BCG) peut s'effectuer par des techniques traditionnelles. Elle est basée sur :

- ✓ Les caractères cultureux
- ✓ Le délai d'apparition des colonies
- ✓ L'aspect *smooth* ou *rough*
- ✓ Les caractères biochimiques (Tableau I)

▪ **Test de niacine**

L'acide nicotinique ou niacine est produit par toutes les mycobactéries, mais certaines espèces telles que *M. tuberculosis*, *Mycobacterium simiae* et *M. bovis* BCG, l'excrètent du fait d'un blocage dans leur processus de *scavenging*. La niacine excrétée s'accumule ainsi dans le milieu de culture et témoigne de la présence

d'halogénure de cyanogène avec une amine primaire. Les souches de *M. tuberculosis* niacine négatif sont extrêmement rares (WHO, 1998b).

- **Croissance en présence d'acide p-nitrobenzoïque**

Ce composé inhibe la croissance de plusieurs espèces dans le complexe *M. tuberculosis*: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* et *M. microti* (WHO, 1998b).

- **Test de réduction de nitrates**

Ce test est particulièrement utile pour différencier *M. tuberculosis* qui donne une réaction positive de *M. bovis* qui est négatif (WHO, 1998b).

- **Test de la catalase**

La catalase est une enzyme intracellulaire qui transforme le peroxyde d'oxygène en oxygène et en eau. Le test de la catalase à 68°C est un test de tolérance qui mesure l'activité de la catalase à haute température. De façon caractéristique, *M. tuberculosis* a une catalase thermolabile comme toutes les autres espèces du complexe (WHO, 1998b).

- **Test de la pyrazinamidase**

La pyrazinamidase est une enzyme qui hydrolyse le pyrazinamide en ammoniac et en acide pyrazinoïque. Le test est utile pour différencier *M. tuberculosis* (positive) des autres espèces de *M. tuberculosis* complexes (négatif), à l'exception de «*M. canettii*», qui est également positif (WHO, 1998b). Certaines souches de *M. tuberculosis* peuvent acquérir une résistance au pyrazinamide due à une pression sélective induite par le traitement avec ce médicament.

- **Croissance en présence d'hydrazide thiophène-2-carboxylique**

Ce test permet la distinction entre *M. tuberculosis*, qui pousse en présence de ce composé, «*M. canettii*» et la plupart des non-tuberculeuses espèces de mycobactéries sont également positives à ce test (WHO, 1998b).

Tableau I : Caractères phénotypiques de différenciation des espèces du complexe *tuberculosis* (Vincent et al., 2003)

	<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.

I.4.2.5 Détermination de la sensibilité aux antibiotiques

Les méthodes d'étude phénotypique de la sensibilité aux antituberculeux évaluent l'inhibition de la croissance de *M. tuberculosis* en présence d'antibiotiques pour distinguer les souches sensibles des souches résistantes. On définit classiquement une souche résistante comme étant une souche présentant un degré de sensibilité nettement inférieur à celui d'une souche sauvage n'ayant jamais été en contact avec le médicament (Canetti et al., 1969). Les méthodes les plus couramment utilisées sont basées sur la culture de *M. tuberculosis* sur les milieux solides à base d'œufs ou d'agar. Ces méthodes peuvent être directes ou indirectes. Dans les méthodes directes, le milieu contenant l'antibiotique et le tube témoin sont inoculés avec le culot de centrifugation du produit pathologique décontaminé, tandis que dans les méthodes indirectes, les milieux sontensemencés avec une suspension bactérienne de la souche isolée. Les méthodes phénotypiques se réfèrent toutes aux trois techniques de référence adoptées par l'OMS.

I.4.2.5.1 La méthode des proportions

La méthode des proportions est la méthode la plus couramment utilisée dans le monde parmi les trois méthodes mentionnées ci-dessus. Elle permet la détermination précise de la proportion de mutants résistants à un médicament donné (Canetti et al., 1969). Pour connaître le nombre de 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 des dilutions 10^{-3} et/ou 10^{-5} d'une suspension mère de la souche à étudier étalonnée par opacimétrie) 1 mg/mL. Les concentrations d'antibiotiques qui sont dans les milieux tests ne sont pas établies au hasard, elles sont corrélées à la concentration minimale inhibitrice (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 des milieux contenant les concentrations critiques d'antibiotiques. Le rapport entre ces deux valeurs permet de déterminer la proportion des bactéries résistantes. Toute souche dont la proportion de mutants résistants à l'antibiotique est inférieure à 1% sera sensible et 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%.

I.4.2.5.2 La méthode des ratios

Cette méthode est basée sur le ratio de la résistance qui correspond à la CMI d'une souche test divisée par la CMI d'une souche de référence sensible à l'antituberculeux testé H37Rv. Ainsi, elle compare la résistance d'une souche inconnue à celle d'une souche standard de laboratoire. La méthode consiste à ensemençer une gamme de dilution de raison 2 de l'antibiotique avec un inoculum standardisé de la souche testée et de la souche de référence. La lecture se fait après 4 semaines d'incubation à 37°C. Les tubes contenant 20 colonies ou plus sont considérés comme positifs pour la croissance et la CMI est définie comme étant la plus faible concentration du médicament en présence de laquelle le nombre de colonies est inférieur à 20. Un isolat dont la valeur du ratio de résistance est de 2 ou moins est considéré comme sensible, alors qu'un ratio de résistance de 8 ou plus définit l'isolat comme résistant (Kent and Kubica, 1985).

I.4.2.5.3 La méthode des concentrations absolues

Cette méthode utilise un inoculum standardisée de la souche cultivée sur des milieux sans antibiotiques (témoin) et sur des milieux avec antibiotiques (test) dans une gamme de dilution de raison 2. La résistance d'une souche est exprimée en fonction de la plus faible concentration d'un médicament donné qui inhibe tout ou presque entièrement la croissance de la souche. Les concentrations critiques du médicament incluses dans le milieu sont similaires à celles utilisées dans la méthode des proportions, mais la concentration du médicament considérée comme «critique» doit être déterminée au sein de chaque laboratoire. Pour l'interprétation du test, la lecture est effectuée après 4 semaines d'incubation à 37°C, ou à 5-6 semaines s'il n'y a pas assez de croissance. Une souche est considérée comme sensible si le nombre moyen de colonies sur les milieux contenant l'antibiotique est inférieur à 20 avec une croissance de 3+ ou 4+ (confluence) sur le milieu témoin (Heifets, 2000).

I.5 TRAITEMENT DE LA TUBERCULOSE (Tattevin, 2007)

Parmi les infections bactériennes, la tuberculose pose des problèmes particuliers au niveau thérapeutique. Les germes responsables (*Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* et *Mycobacterium africanum*) sont à croissance lente (temps de doublement de 20 heures). Au sein d'un foyer tuberculeux, il existe trois formes principales de bacilles dont le métabolisme, et par là même la chimiosensibilité, sont variables : les bacilles à métabolisme actif en milieu aérobie (extracellulaires ou intra-cavitaires), les bacilles intramacrophagiques (intracellulaires, pour lesquels les antibiotiques efficaces devront posséder une bonne diffusion intracellulaire, ainsi qu'une activité conservée en milieu acide), et les bacilles intracaséux (quiescents ou «dormants»). C'est à cause de ces bacilles dormants que le traitement doit être prolongé. Les deux molécules les plus actives sur ces populations bacillaires sont la RIF qui a permis de raccourcir les durées de traitement de 18 à 9 mois, et la pyrazinamide (PZA) qui a permis de réduire la durée de traitement de neuf à six mois. Par la suite, il a été démontré qu'en raccourcissant la durée du traitement en dessous de six mois, on augmentait le risque de rechute.

Par ailleurs, il existe au sein de chaque population de bacilles tuberculeux des résistances spontanées à chacun des antituberculeux dont on dispose actuellement, ces résistances n'étant habituellement pas croisées. De ces considérations

découlent les grands principes du traitement qui doivent associer plusieurs antituberculeux afin de ne pas sélectionner les souches résistantes. Ce traitement doit être suffisamment prolongé pour obtenir une stérilisation complète des lésions et être actif sur les différentes populations bacillaires (y compris les formes quiescentes et les formes intracellulaires).

Le traitement, d'une durée totale de six mois, associe au cours des deux premiers mois l'isoniazide (INH), la rifampicine (RIF), l'éthambutol (EMB) et la pyrazinamide (PZA), et est simplifié pour les quatre mois suivants par la mise en place d'une bithérapie composée de INH + RIF. L'EMB n'est pas indispensable en cas de souche sensible, d'autant que son activité antimycobactérienne n'est que bactériostatique. La seule justification systématique de l'utilisation de l'éthambutol en première ligne est le pourcentage relativement élevé de la résistance à l'INH. À l'inverse, l'EMB peut être interrompu précocement à la réception de l'antibiogramme lorsqu'on a la certitude qu'il s'agit d'un bacille tuberculeux multisensible.

I.6 APPROCHES MOLECULAIRES DANS LE DIAGNOSTIC DE LA TUBERCULOSE ET LA DETECTION DES RESISTANCES

I.6.1 Méthodes moléculaires de détection et d'identification de *Mycobacterium tuberculosis*

I.6.1.1 Méthodes d'amplification des acides nucléiques

Compte tenu des limites du diagnostic classique de la tuberculose, de nombreux laboratoires se sont tournés vers de nouvelles approches pour une détection rapide, spécifique et fiable et l'identification des mycobactéries. La découverte de la réaction en chaîne polymérase ou encore *Polymerase Chain Reaction* (PCR) a conduit au développement de tests d'amplification géniques pour la détection rapide et l'identification du complexe *M. tuberculosis* dans des échantillons cliniques. On regroupe sous le terme de techniques d'amplification génique toutes les techniques basées sur l'amplification de l'ADN et l'ARN mycobactériens directement à partir des spécimens cliniques.

I.6.1.1.1 Les techniques « in house » de diagnostic de la tuberculose

Les techniques « in house » consistent à amplifier des fragments d'ARN ou d'ADN suivie de la détection sur gel d'agarose ou de polyacrylamide ou d'hybridation sous divers formats. Parmi les premières cibles génomiques proposées pour le diagnostic par PCR, la séquence d'insertion *IS6110*, qui est présente en plusieurs exemplaires (entre 4 et 20 dans plus de 95% des souches de *M. tuberculosis*), semble avoir une sensibilité plus élevée. D'autres séquences d'ADN ont également été appliquées avec succès ; on peut citer le gène codant pour la «heat shock protein» (65 kDa), le gène codant pour la protéine de fusion (126 kDa) et le gène codant la sous unité β de l'ARN polymérase. Elles sont toutes présentes en une seule copie dans le génome du complexe *M. tuberculosis* (Palomino, 2009).

Une autre approche est celle de l'analyse des profils de restriction après PCR. La méthode Pra (*PCR restriction Enzyme Analysis*) est une technique mettant en œuvre l'amplification des gènes codant pour la protéine 65 kD (heat shock protein). La PCR utilise des amorces communes à l'ensemble des mycobactéries. Les amplicons obtenus sont soumis à une double digestion les enzymes de restriction *BstE II* et *HAEIII*. Les fragments de digestion sont séparés et visualisés sur gel d'agarose. Le profil de restriction obtenu permet d'identifier plusieurs espèces de mycobactérie y compris *M. tuberculosis*.

I.6.1.1.2 Les techniques commercialisées

Il existe quatre tests d'amplification génique commercialisés pour la détection directe de la tuberculose dans des échantillons cliniques. Toutefois, la *US Food and Drug Administration* (FDA) n'a approuvé que deux d'entre elles pour la détection directe des bacilles acido-résistants (BAAR) dans les échantillons respiratoires à frottis positif: Enhanced Amplified *Mycobacterium tuberculosis* test direct (DMT) (Gen-Probe, San Diego, Californie, USA), et COBAS Amplicor MTB test (Amplicor, Roche Diagnostic Systems, Indianapolis, IN, USA) (Shamputa et al., 2004).

- **La PCR : Méthode Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* (Roche)**

Le brevet de la PCR a été acheté par la société Roche Diagnostic qui commercialise toutes les techniques diagnostiques à base de PCR et en particulier Amplicor *M. tuberculosis* pour le diagnostic de la tuberculose.

La méthode Amplicor *M. tuberculosis* développée par les laboratoires Roche est basée sur l'amplification par PCR d'un fragment de 584 paires de base du gène codant pour l'ARN 16S. Après amplification, les amplicons sont dénaturés et hybridés en microplaque par une sonde oligonucléotidique spécifique de MTB complex. Les produits d'hybridation sont révélés par une réaction colorée utilisant le conjugué peroxydase avidine (horseradish) et le 3, 3', 5, 5'tétraméthyl benzidine dans le diméthylformamide. Les résultats sont mesurés à l'aide d'un spectrophotomètre. La présence d'un contrôle interne permet d'éviter les faux négatifs liés à la présence d'inhibiteurs de la PCR (Tortoli and Palomino, 2007).

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 inclut l'uridine à la place de la thymine et sont hydrolysés par contact avec l'uridine glycosylase qui respecte les ADN contenant la thymine. Les résultats sont disponibles en 6-7 heures. Les réactions d'amplification et de détection peuvent être réalisées dans un automate COBAS Amplicor TB. La sensibilité et la spécificité de ce test pour les prélèvements respiratoires varient de 79,4 à 91,9% et de 85,7 à 100% pour les prélèvements non respiratoires et respiratoires respectivement (Shamputa et al, 2004).

Du fait de la faible sensibilité du test (40 - 73,1%) pour les prélèvements à microscopie négative, ce kit n'a été validé par la FDA que pour des prélèvements respiratoires à microscopie positive.

- **La TMA (*Transcription Mediated Amplification*) GenProbe *amplified M. tuberculosis direct test bioMérieux***

Ce test est basé sur la détection de l'ARN 16S par une amplification isothermique (Shamputa et al., 2004). L'ARNr mycobactérien est obtenu par sonication des cellules cibles. Ces ARNs vont être hybridés à une amorce qui se fixe spécifiquement sur eux. L'amorce apporte en plus des bases nécessaires à son insertion une séquence promoteur de l'ARN polymérase sur laquelle cette enzyme

pourra se fixer. Le complexe primer-ARNr est ensuite mis en présence d'une transcriptase reverse dans un milieu réactif à une température convenable. Il y a synthèse d'un ADNc et formation d'un hybride ADNc-ARNr. Le brin ADNc libre peut fixer en 3' une deuxième amorce à partir de laquelle la transcriptase reverse réalise la synthèse d'un brin d'ADN porteur d'un site d'insertion d'une ARN polymérase ADN dépendant qui peut alors transcrire de nouvelles molécules d'ARNr. Les ARNr ainsi formés vont servir de modèle pour la transcription reverse et l'amplification. Il est possible d'atteindre ainsi théoriquement 10^9 - 10^{12} copies en quelques cycles sans utiliser de thermocycleur.

La détection s'effectue avec des sondes ADN marquées par un ester d'acridium dans une réaction d'hybridation en milieu liquide. L'ester d'acridinium de la sonde est hydrolysé par addition de peroxyde d'hydrogène alcalin produisant une lumière visible qui peut être mesurée dans un luminomètre. Ce test est réalisé à 42°C dans un seul tube pour réduire les contaminations (Shamputa, 2004). Ce système fonctionne aussi bien avec les échantillons à microscopie positive qu'avec les échantillons à microscopie négative. La sensibilité pour les prélèvements respiratoires comparée à la culture est de 85,7% - 97,8%. Cependant, elle est plus élevée pour les prélèvements à microscopie positive que les prélèvements à microscopie négative. La spécificité du test est de 100%. L'inconvénient majeur de ce test est qu'il n'inclut ni contrôle interne, ni détection d'amplicons parasites contaminants (Soini and Musser, 2001).

I.6.1.2 Techniques d'hybridation moléculaire

Les tests d'identification par hybridation avec les sondes moléculaires sont basés sur la capacité que possèdent les brins complémentaires d'acides nucléiques de s'apparier de manière spécifique pour former des complexes bicaténaires stables.

I.6.1.2.1 La sonde Accuprobe

La sonde Accuprobe est une sonde d'ADN conjuguée à un marqueur chimioluminescent et complémentaire d'une séquence spécifique au sein de la région hypervariable de la l'ARN ribosomal 16S. Une fois les cellules lysées par sonication, l'extrait est mélangé avec la sonde dans des conditions stringentes d'hybridation. La sonde marquée forme avec l'ARN ribosomal libéré un hybride ARN/ADN stable. Le réactif de sélection est une enzyme nucléasique capable

d'hydrolyser les monobrins d'ADN non hybridés ; il ne subsistera 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. Cette méthode allie une très bonne sensibilité et une très bonne spécificité (Tortoli et *al.*, 1996).

I.6.1.2.2 INNO LiPA Mycobacteria (Innogenetics)

Les sondes INNO LiPA sont spécifiques à la région intergénique 16S-23S de l'ARN ribosomal. Le système comprend une sonde spécifique pour le genre *Mycobacterium*, deux sondes spécifiques au complexe *M. tuberculosis* et au complexe *M. avium* et 23 autres sondes appropriées pour identifier 18 espèces et plusieurs variantes intra-spécifiques dans le groupe *Mycobacterium chelonae-abscessus* groupe et dans les espèces de *M. kansasii*). La sensibilité de cette technique est identique à celle de Gen-Probe et elle présente l'avantage de confirmer l'appartenance de la souche à la famille des mycobactéries dans le cas où l'identification d'espèce n'est pas possible.

I.6.1.2.3 GenoType Mycobacterium (HAIN life sciences)

Les sondes immobilisées de GenoType *Mycobacterium* sont des fragments de l'espace intergénique 16-23S. L'amplification est suivie d'une hybridation sur la bandelette où sont fixées les sondes biotinylées. L'identification n'est pas fondée sur la spécificité d'un seul signal d'hybridation, mais sur les différentes combinaisons de bandes multiples qui caractérisent chaque espèce. Cette méthode permet le diagnostic du complexe *tuberculosis* et de 15 espèces de MNT. Les évaluations de cette technique récemment commercialisée montrent des résultats proches des techniques déjà décrites (Tortoli et *al.*, 2003).

I.6.1.3 Les méthodes antigéniques par immunochromatographie

Il existe deux types de tests immuno-chromatographiques permettant d'identifier les bacilles du complexe *tuberculosis*.

Le premier test d'identification après culture repose sur la détection de l'antigène MPT64, protéine incriminée dans la virulence et sécrétée par les mycobactéries du complexe *tuberculosis* (excepté quelques souches de BCG dont la

souche vaccinale Pasteur). Cette détection sur bandelettes est réalisée en 15 minutes à partir de culture en milieu solide ou liquide. La sensibilité et la spécificité sont de l'ordre de 99%. Ce test permet d'identifier le complexe tuberculosis, hors BCG, dès la positivité de la culture (Kumar et al., 2011).

Le second test par immunochromatographie est réalisé directement sur les urines du patient suspect de tuberculose et repose sur la détection de lipo-arabino-mannane (LAM), composant majoritaire de la paroi bactérienne. Ce test peu coûteux, rapide et facile est utilisé dans les pays en voie de développement à forte incidence de co-infection tuberculose-VIH où il présente une valeur prédictive positive (VPP) de 80% (Lawn et al., 2012).

I.6.2 Méthodes moléculaires de détection des résistances chez *Mycobacterium tuberculosis*

I.6.2.1 Concepts de base de la résistance

I.6.2.1.1 Résistance naturelle de *Mycobacterium tuberculosis*

La résistance naturelle de *M. tuberculosis* aux antibiotiques est généralement attribuée à la structure complexe de sa paroi qui du fait de la présence d'acides mycoliques, offre une faible perméabilité à de nombreux composés tels que les antibiotiques et d'autres agents thérapeutiques (Jarlier and Nikaido, 1994). Plus récemment, des mécanismes d'efflux ont aussi été évoqués comme responsables de la résistance naturelle de *Mycobacterium tuberculosis* à la tétracycline, aux fluoroquinolones et aux aminosides. Le principal mécanisme associé à la résistance aux β -lactamines est la production de β -lactamases codée par les gènes blaC et blaS chez *Mycobacterium tuberculosis*. En effet, les β -lactamines agissent en inhibant l'activité des protéines impliquées dans la biosynthèse de la paroi.

Toutefois, elles sont susceptibles à l'action hydrolysante des enzymes β -lactamases. L'utilisation de β -lactamines en association avec des inhibiteurs de β -lactamases ou de β -lactamines résistantes aux β -lactamases a montré une activité inhibitrice sur les souches de *M. tuberculosis* (Flores et al., 2005). Les mécanismes de perméabilité membranaire et la sécrétion de β -lactamases ne sont pas les seuls mis en cause dans la résistance de *Mycobacterium tuberculosis* aux agents thérapeutiques. Des adaptations physiologiques de la mycobactérie chez l'hôte

peuvent également être responsables d'une tolérance aux antibiotiques (Nguyen and Pieters, 2009).

En définitive, la résistance naturelle de *Mycobacterium tuberculosis* limite le nombre d'antibiotiques utilisé dans le schéma thérapeutique et favorise l'émergence des souches présentant un niveau de résistance élevé.

I.6.2.1.2 Résistance acquise aux antituberculeux

Contrairement à la résistance aux médicaments dans d'autres espèces bactériennes qui est médiée principalement par des éléments génétiques mobiles tels que des plasmides ou les transposons, la résistance aux antituberculeux se développe à travers des mutations chromosomiques spontanées (Zhang and Yew, 2009). Chez les procaryotes, des mutations spontanées se produisent à un faible taux de 0,0033 pour la réplication. Le taux de mutation par paire de base est inversement proportionnel à la taille du génome. Des études antérieures ont montré que le taux de mutation dépend de la nature de la sélection des médicaments, mais pour la plupart des médicaments anti-TB, les mutations se produisent à un taux de 10^{-9} par division cellulaire (Gillespie, 2002). Théoriquement, parce que ces mutations ne sont pas liées, la probabilité d'acquérir une résistance à deux médicaments en même temps est le produit des taux de résistance de l'individu. Ainsi, le risque de résistance à trois médicaments ou plus pourrait être aussi élevé que 10^{-27} . Une prescription inappropriée ou encore une mauvaise compliance du patient sont autant de facteurs qui peuvent réduire ce taux d'apparition des mutations (Gillespie, 2002).

I.6.2.2 Bases génétiques de la résistance aux antituberculeux

I.6.2.2.1 Les antituberculeux dits de «première ligne»

I.6.2.2.1.1 Isoniazide

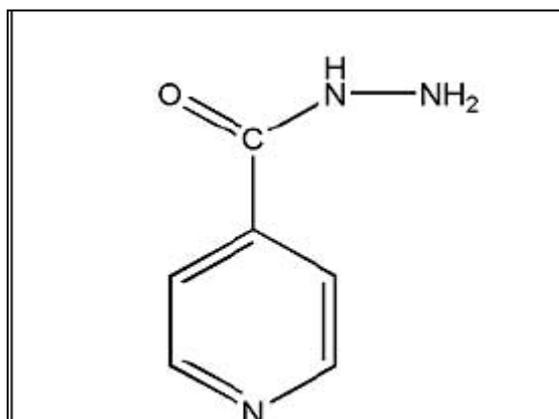


Figure 6 : Structure de l'isoniazide (Almeida da Silva and Aínsa, 2007)

L'isoniazide est l'un des principaux médicaments utilisés dans le traitement de la tuberculose. Il exerce une activité bactéricide sur les populations bacillaires et une activité bactériostatique sur les populations métaboliquement inactives. Il a une structure simple contenant un cycle pyridine et un groupe hydrazide (Figure 6), deux éléments essentiels et responsables de son activité élevée contre *M. tuberculosis*. Les souches de *Mycobacterium tuberculosis* sensibles à l'isoniazide ont des concentrations minimales inhibitrices variant de 0,02 à 0,05 mg/L (Musser, 1995). En dépit de cette structure simple, le mode d'action de l'isoniazide demeure assez complexe. Le mécanisme par lequel les organismes deviennent résistants à l'isoniazide n'est pas complètement élucidé, il serait associé à des mutations dans plusieurs gènes.

L'isoniazide est un pro-médicament nécessitant une activation par la catalase/peroxydase codée par le gène *katG* (Zhang et al., 1992). Lors de l'activation, de nombreuses espèces réactives comme les radicaux acyle isonicotinique et les radicaux oxygène sont des produits qui peuvent endommager les cellules infectées. Les résultats de nombreuses études suggèrent que l'isoniazide affecte principalement la synthèse des acides mycoliques de la paroi cellulaire en inhibant une réductase enoyl-ACP NADP dépendante qui est codée par *inhA* (Zhang

et *al.*, 1992). Deux mécanismes moléculaires ont principalement été associés à la résistance à l'isoniazide. Il s'agit des mutations dans le gène *katG* codant pour la catalase peroxydase responsable de l'activation de l'isoniazide et des mutations dans le gène *inhA*, la cible finale éventuelle de l'isoniazide activé (Guo et *al.*, 2006). Les altérations les plus fréquemment associées à la résistance à l'isoniazide sont une diminution ou une perte totale de l'activité catalase peroxydase à la suite de mutations du gène *katG* (Zhang et *al.*, 1992). Jusqu'à présent, plus d'une centaine de mutations dans *katG* ont été décrites, avec des CMI allant de 0,2 à 256 mg/L. Des mutations faux-sens et non-sens, des insertions, des délétions, et plus rarement, la délétion complète du gène ont été observées. Une mutation en particulier, la substitution *KatG* Ser315Thr, est responsable de 50-90% des souches résistantes à l'isoniazide (Wade and Zhang, 2004).

La résistance peut également se développer en raison de mutations dans le gène *inhA* ou dans sa région promotrice (Musser, 1995). Des mutations dans la région régulatrice du gène *inhA* et dans la région structurale ont été identifiées (Dalla Costa et *al.*, 2009). La mutation la plus fréquente dans le gène *inhA* se produit dans la région promotrice (-15 C→T). Des mutations faux-sens dans la région structurale entraînent une résistance à l'isoniazide en réduisant l'affinité de liaison NADH- *InhA* et donc la protection de l'inactivation de l'enzyme par l'isoniazide. Les mutations du promoteur *inhA* régulent l'expression des cibles entraînant une résistance non seulement à l'isoniazide, mais aussi une résistance au médicament de structure apparentée de deuxième ligne, l'éthionamide (ETH) via un mécanisme de titration (Wade and Zhang, 2004).

Chez *M. tuberculosis*, le gène *ahpC* code pour une réductase alkyle hydroperoxydase impliquée dans la résistance à l'oxygène réactif et aux intermédiaires d'azote réactif. Des mutations dans la région promotrice de *ahpC* ont initialement été proposées comme marqueurs de substitution pour la détection de la résistance à l'isoniazide (Kiepiela et *al.*, 2000). Cependant, plusieurs autres études ont montré que la surexpression de *ahpC* semble être plus une mutation compensatoire pour la perte de l'activité catalase peroxydase plutôt qu'une base de la résistance à l'isoniazide (Sherman et *al.*, 1996).

Des mutations dans le gène *ndh* seules ou en combinaison avec des mutations dans *katG* et *inhA* ont également été décrites comme mécanisme de résistance à l'isoniazide chez *Mycobacterium tuberculosis*. Décrites pour la première fois chez *M. smegmatis*, ces mutations entraînent une réduction de l'activité de la NADH déshydrogénase et une résistance à l'isoniazide et éthionamide (Miesel et al., 1998). Bien que les mutations V18A et A13C aient été décrites dans deux isolats de *M. tuberculosis* résistants à l'isoniazide, ces 2 souches étaient également altérées dans le gène *katG*. En outre, la mutation V18A a déjà été décrite dans un isolat clinique sensible à l'isoniazide (Ramaswamy et al., 2003).

Plus récemment, la régulation de l'expression de *katG* a été mise en cause dans certains cas de résistance à l'isoniazide chez *M. tuberculosis*. Trois nouvelles mutations dans la région *fura-katG* intergéniques ont été identifiées dans 4% des 108 souches résistantes à l'isoniazide étudiées, et aucune d'entre elles n'était présente dans les 51 souches sensibles à l'isoniazide (Almeida Da Silva and Palomino, 2011). De même, des mutations dans la région intergénique *oxyR-ahpC* peuvent réduire le niveau d'expression de *inhA* et ont été associées à la résistance à l'isoniazide. Une étude menée par (Dalla Costa et al., 2009) ont trouvé des mutations dans la région intergénique *oxyR-ahpC* dans 8,9% des 224 souches résistantes à l'isoniazide étudiées, confirmant son implication moins fréquente comme cause de résistance à l'isoniazide. Le rôle de certains de ces gènes de résistance à l'isoniazide n'a cependant pas été complètement élucidé.

I.6.2.2.1.2 Rifampicine

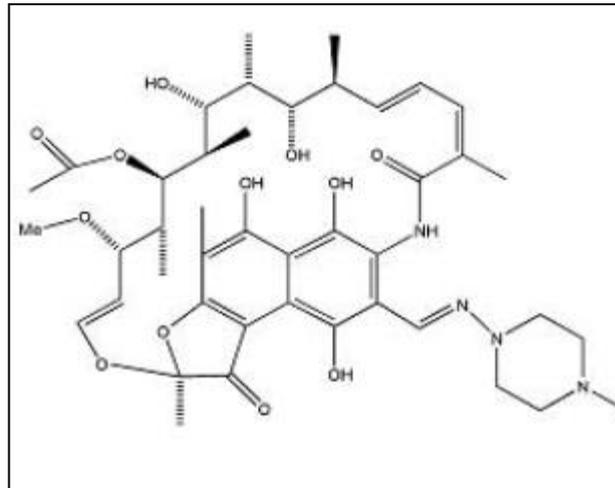


Figure 7 : Structure de la rifampicine (Almeida da Silva and Aínsa, 2007)

La rifampicine est un ansamycine lipophile (Figure 7) introduit en 1972. Grâce à son action antimicrobienne efficace, il est considéré avec l'isoniazide comme les piliers du régime thérapeutique de courte durée pour la tuberculose (Rattan et *al.*, 1998). La cible de la rifampicine chez *M. tuberculosis* est la sous-unité β de l'ARN polymérase ADN dépendante à laquelle elle se lie et empêche l'élongation de l'ARNm (Blanchard, 1996). Une des caractéristiques importantes de la rifampicine c'est qu'elle est active aussi bien sur les populations bacillaires en phase de multiplication que sur les populations métaboliquement inactives (Mitchison, 1979).

La grande majorité des isolats cliniques de *M. tuberculosis* résistants à la rifampicine présentent des mutations dans le gène *rpoB* qui code pour la sous-unité β de l'ARN polymérase. Il en résulte des changements de conformation à l'origine d'une faible affinité pour le médicament et par conséquent le développement de résistance (Telenti et *al.*, 1993). Des mutations dans une région spécifique «hot spot» de 81 paires de bases du gène *rpoB* couvrant les codons 507 à 533 également connue sous le nom de « Rifampicine Resistance Determining Region, RRDR » sont responsables de 97% de souches résistantes à la rifampicine (Ramaswamy and Musser, 1998). Cependant, toutes les mutations génétiques dans cette région de 81 paires de bases ne confèrent pas le même niveau de résistance. Les mutations dans les codons 526 (H526P/D/Y) et 531 (S531L) qui sont les plus fréquemment décrites dans la littérature confèrent une résistance de haut niveau à la rifampicine avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) > 64 pg /mL, sur la base

BACTEC méthode radiométrique) (Moghazeh et *al.*, 1996). Ces codons sont affectés dans 60-86% des souches de tuberculose résistantes. En revanche, les mutations dans les codons 511 (L511P), 516 (D516V/Y), 519 (N518K) et 522 (S522L) confèrent un faible niveau de résistance (CMI <64 pg/mL) (Moghazeh et *al.*, 1996). Bien que rares, il existe des preuves d'une mutation amino-terminal (V149F) qui peut aussi conduire à la résistance à la rifampicine (Heep et *al.*, 2000).

I.6.2.2.1.3 Pyrazinamide

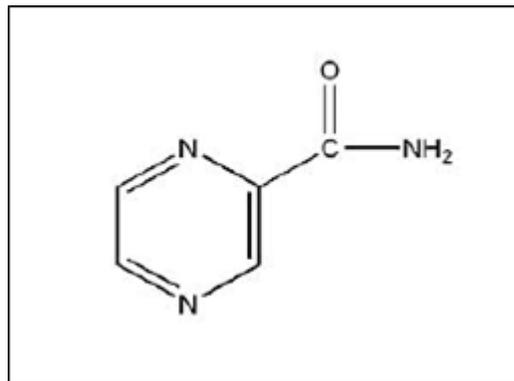


Figure 8 : Structure de la pyrazinamide (Almeida da Silva and Aínsa, 2007)

La pyrazinamide a été découverte en 1952 et introduite dans la chimiothérapie antituberculeuse dans le début des années 1950. Son utilisation a permis de réduire la durée de traitement de 9 à 6 mois. Une des caractéristiques importantes de la pyrazinamide est sa capacité à inhiber les bacilles quiescents se trouvant en milieu acide (Mitchison, 1985). La pyrazinamide est un analogue structural de la nicotinamide (Figure 8). Elle est similaire à l'isoniazide en ce sens qu'elle est un promédicament qui nécessite une conversion en sa forme active, l'acide pyrazinoïque par l'enzyme pyrazinamidase nicotinamidase (PZase) (Scorpio and Zhang, 1996). La Pzase est codée chez *M. tuberculosis* par une gène de 561 nucléotides, *pncA* (Scorpio and Zhang, 1996). Il a été suggéré que la pyrazinamide exerce son action via sa forme active, l'active pyrazinoïque, en perturbant le potentiel énergétique membranaire et en inhibant le transport membranaire (Zhang et *al.*, 2003).

Les mutations dans le gène *pncA* constituent le principal mécanisme par lequel la résistance à la pyrazinamide se développe. La plupart des altérations se produisent dans une région de 561 paires de base du cadre de lecture ou dans une

région de 82 paires de base du promoteur. Les mutations dans le gène *pncA* sont variables et pas moins de 120 mutations ont été reportées (Laurenzo and Mousa, 2011). Cependant, certains isolats résistants à la pyrazinamide ne présentent pas de mutations dans le gène *pncA*. Dans ce cas, il a été postulé que la résistance pourrait être due à des mutations dans un gène de régulation non connu (Cheng et al., 2000) ou encore pourrait être liée à la difficulté de tester la sensibilité à la pyrazinamide résultant en une fausse interprétation de la résistance phénotypique (Sreevatsan et al., 1997a).

I.6.2.2.1.4 Ethambutol

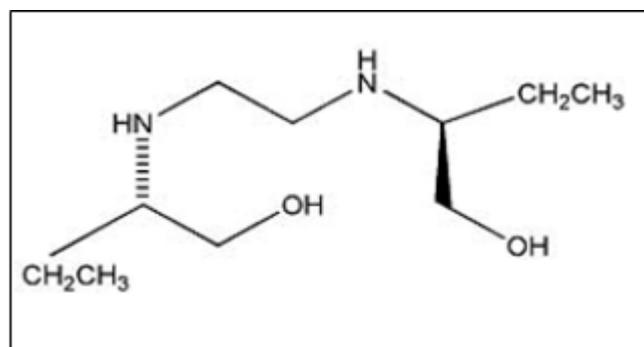


Figure 9 : Structure de l'éthambutol (Almeida da Silva and Aínsa, 2007)

L'éthambutol, 2,2'-(1,2-ethanediyl)diimino) bis-1-butanol (Figure 9), a été introduit dans le traitement de la tuberculose en 1966. Il constitue, avec l'isoniazide, la rifampicine et la pyrazinamide, les médicaments de première ligne actuellement utilisés pour le traitement de la maladie. Il est bactériostatique contre les bacilles en phase de multiplication où il inhibe la biosynthèse de la paroi cellulaire (Sreevatsan et al., 1997b). Plus précisément, l'éthambutol perturbe la synthèse d'arabinogalactane en inhibant l'arabinosyl transférase. L'inhibition de l'arabinosyl transférase empêche la formation du complexe mycolyl-arabinogalactane-peptidoglycane qui joue un rôle dans la perméabilité de la paroi cellulaire (Sreevatsan et al., 1997b). Il y a quelques années, il a été démontré que chez *M. tuberculosis*, les gènes *embA*, *embB* et *embC* étaient organisés en un opéron de 10 kb codant pour les arabinosyl transférases. Le mécanisme le plus probable de résistance à l'éthambutol est la sur-expression ou la modification structurale des protéines Emb, en particulier *embB*. Il a été suggéré que des niveaux accrus de Emb entraînent une perte d'efficacité de l'éthambutol (Telenti et al., 1997b). Une mutation

spécifique du codon 306 du gène *embB* a également été impliquée dans la résistance à l'éthambutol (Telenti et al., 1997b). Des études suggèrent que 47-62% de souches résistantes possèdent cette mutation génétique et qu'elle confère un très haut niveau de résistance (Telenti et al., 1997b). Les mutations au niveau des codons 330 et 630 ont également été identifiées et confèreraient des niveaux élevés de résistance (Telenti et al., 1997b). Il existe néanmoins un pourcentage important d'isolats résistants à l'éthambutol qui ne possèdent pas de mutations dans le gène *embB*, soulignant le fait que d'autres mécanismes non encore décrits pourraient expliquer la résistance à l'éthambutol (Zhang and Yew, 2009).

I.6.2.2.2 Les antituberculeux dits de « seconde ligne »

I.6.2.2.2.1 Streptomycine

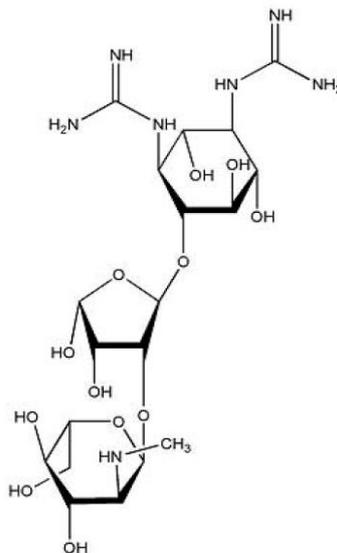


Figure 10 : Structure de la streptomycine (Almeida da Silva and Aínsa, 2007)

La streptomycine est le premier antibiotique à avoir été utilisé dans le traitement de la tuberculose. C'est un glycoside aminocyclitol (Figure 10) isolé pour la première fois de *Streptomyces griseus*, un micro-organisme du sol. La streptomycine exerce son action en se fixant sur l'ARN ribosomal 16S, interférant avec le processus de translation et inhibant ainsi la synthèse protéique (Sreevatsan et al., 1996). Les bases génétiques de la résistance à la streptomycine résident dans les mutations au niveau du gène *rrs* qui est un ARN ribosomal et du gène *rpsL* qui code pour la protéine ribosomale S12, celle-ci jouant un rôle dans la stabilisation de l'ARNr (Sreevatsan et al., 1996). La majorité des mutations ponctuelles conduisant à

une résistance à la streptomycine se produisent dans le gène *rpsL*, la mutation K43R étant la plus fréquente. Certains isolats cliniques présentant une résistance de bas niveau à la streptomycine et ne possédant aucune mutation dans le gène *rpsL* ou le gène *rrs* ont également été trouvés (Silva et al., 2001). Plus récemment, il a été montré que des mutations dans le gène *gidB*, codant pour une 7-méthylguanosine méthyltransférase spécifiques de l'ARNr 16S, pourrait conférer un faible niveau de résistance à la streptomycine (Okamoto et al., 2007).

I.6.2.2.2 Fluoroquinolones

Les fluoroquinolones sont des antibiotiques bactéricides actuellement utilisés comme médicaments de deuxième intention dans le traitement de la tuberculose. La ciprofloxacine et l'ofloxacine sont des dérivés synthétiques de l'acide nalidixique, la molécule mère découverte en 1965. Actuellement, une nouvelle génération de fluoroquinolones telles que la moxifloxacine et la gatifloxacine sont en cours d'évaluation clinique et sont proposées comme des antibiotiques de première intention dans le but de raccourcir la durée du traitement de la tuberculose (Alvarez-Freites et al., 2002). Chez *M. tuberculosis*, la topoisomérase de type II (ADN gyrase) est présente et est donc la seule cible des fluoroquinolones. La topoisomérase de type II est un tétramère composé de deux sous-unités A et B codées par les gènes *gyrA* et *gyrB* respectivement qui catalysent le superenroulement de l'ADN (Drlica, 1999).

La résistance aux fluoroquinolones est le résultat des substitutions d'acides aminés dans la région putative de liaison des fluoroquinolones dans *gyrA* ou *gyrB*. Une région particulière appelée « Fluoroquinolones Resistance Determining Region » (FRDR) dans *gyrA* a été identifiée comme la principale source de mutations (van Doorn et al., 2008). Il a été démontré qu'environ 60-70% de souches de *M. tuberculosis* résistantes aux quinolones possèdent des mutations dans la région FRDR de *gyrA* (van Doorn et al., 2008).

I.6.2.2.3 Kanamycine, Amikacine, Capréomycine et Viomycine

La kanamycine et l'amikacine sont des aminosides, alors que la capréomycine et la viomycine sont des antibiotiques peptidiques cycliques. Tous les quatre sont

utilisés comme médicaments de deuxième intention dans le traitement de la TB multirésistante. Bien qu'appartenant à deux familles d'antibiotiques, tous exercent leur activité au niveau de la traduction des protéines. Plusieurs études ont signalé une résistance croisée entre la kanamycine et l'amikacine ou entre la kanamycine et la capréomycine ou viomycine à des degrés variables (Maus et *al.*, 2005). Le mécanisme moléculaire de la résistance le plus couramment associé est une mutation A1401G dans le gène *rrs* codant pour l'ARNr 16S. Cette mutation se produit plus fréquemment chez les souches présentant une résistance de haut niveau à la kanamycine et l'amikacine

La capréomycine et la viomycine sont des antibiotiques structurellement similaires dont la résistance croisée a été démontrée dans plusieurs études (Maus et *al.*, 2005). Les mutations dans le gène *tlyA* ont été impliquées dans la résistance à la capréomycine et la viomycine. Ce gène code pour une méthyltransférase ARNr spécifique de la 2'-O-méthylation du ribose de l'ARNr. Lorsqu'il est muté, il dénote une absence d'activité de méthylation (Johansen et *al.*, 2006). Une étude récente a montré que des mutations dans la région promotrice du gène *eis* chez *M. tuberculosis*, qui code pour une aminoglycoside acétyltransférase, produit une surexpression de la protéine et conférerait une résistance de bas niveau à la kanamycine, mais pas l'amikacine. La même étude a révélé que 80% des isolats cliniques évalués et présentant une faible résistance à la kanamycine ont des mutations dans la région promotrice du gène *eis* (Campbell et *al.*, 2011).

I.6.2.3 Les techniques de détection basées sur l'électrophorèse

Les différentes approches basées sur l'électrophorèse recherchent des mutations après l'analyse des mobilités électrophorétiques des fragments d'ADN comprenant les régions génétiques impliquées dans la résistance. Un changement de mobilité dans ces fragments d'ADN par rapport au type sauvage indique la présence de mutations. Cette détection est facilitée par l'analyse des variantes de structure de l'ADN (simple brin, hétéroduplex) et des conditions de l'électrophorèse (gradients de pH, gels dénaturants).

I.6.2.3.1 PCR-SSCP (*PCR-single strand conformational polymorphism*)

Cette méthode est basée sur la distorsion conformationnelle qu'une substitution de nucléotides peut causer dans un fragment d'ADN simple brin. Ce changement de conformation entraîne un changement de mobilité électrophorétique par rapport à celle du fragment d'ADN issu du type sauvage. La procédure met en jeu une amplification par PCR d'un fragment d'ADN comprenant la région d'intérêt, la dénaturation de ce fragment, et l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide du fragment d'intérêt dénaturé et de la séquence correspondante de type sauvage. Une altération de la mobilité indiquera la présence dans le spécimen clinique d'une mutation dans la région analysée. Les avantages de cette méthode est qu'elle est peu coûteuse, facile et rapide. Elle ne nécessite pas d'équipements complexes et a une bonne spécificité. Elle a été appliquée à la détermination des résistances de *M. tuberculosis* à la rifampicine et à l'isoniazide, avec une sensibilité plus élevée pour les mutations associées à la résistance à la rifampicine qu'à l'isoniazide (Telenti et al., 1997a). Certains auteurs ont obtenu des résultats positifs en appliquant cette technique directement sur des échantillons cliniques, en particulier pour exclure la présence de mutations chez les cas vulnérables. Dans certains cas, l'interprétation est difficile et ambiguë et certaines souches mutantes ne présentent des altérations de mobilité que dans des conditions extrêmes d'électrophorèse.

I.6.2.3.2 Analyse des hétéroduplex

Une autre méthode de détection basée sur les changements de mobilité est la détection des hétéroduplex sur gel de polyacrylamide. La technique repose sur l'amplification par PCR des régions d'intérêt dans l'isolat clinique. Les amplicons sont ensuite dénaturés et mélangés avec une quantité équivalente d'amplicons dénaturés obtenus à partir d'une souche de référence de type sauvage. Le mélange d'amplicons est laissé se refroidir lentement de manière à reconstituer des fragments d'ADN double brins à partir des brins dénaturés. Si les souches cliniques ne présentent pas de mutations dans la région d'intérêt, la complémentarité entre les brins simples des souches cliniques et les amplicons de référence sera complète, avec comme résultat que le duplex renaturé soit identique aux homoduplexes d'ADN de souche clinique/référence. Au contraire, s'il existe une mutation dans l'isolat

clinique, les hétéroduplex pourraient être obtenus par renaturation d'un brin mutant d'origine clinique et l'autre de la souche de référence (Williams et *al.*, 1998). Ces hétéroduplex ont une mobilité électrophorétique différente de celle des amplicons d'origine.

I.6.2.4 Le séquençage de l'ADN

Le séquençage de l'ADN est le moyen le plus direct pour caractériser la résistance génotypique et constitue le « gold standard » dans la détection moléculaire de la résistance. Il implique une amplification de la région d'intérêt et le séquençage des amplicons obtenus pour déterminer la présence / absence d'une mutation spécifique. Il présente une limite liée au coût de la mise en œuvre de la technique et à l'expertise requise. Bien que les séquenceurs automatiques soient de plus en plus disponibles dans les établissements de santé, ils ne sont pas disponibles dans tous les laboratoires de microbiologie. Néanmoins, le séquençage de l'ADN est la technique de choix dans les études sur la détection génotypique des souches de tuberculose résistantes. Il a été appliqué à des isolats de diverses origines géographiques, dans la recherche de mutations dans les loci multiples (Dalla Costa et *al.*, 2009, Feuerriegel et *al.*, 2012).

I.6.2.5 Les techniques basées sur l'hybridation

Les techniques basées sur l'hybridation constituent un groupe hétérogène. Certaines d'entre elles sont effectuées avec des sondes d'ADN spécifiques fixées sur un support et d'autres sont des tests d'hybridation conventionnels en milieu solide ou liquide. Toutes sont basées sur l'hybridation de deux brins d'ADN, un de la souche clinique et un autre du consensus sonde/oligonucléotides. L'hybridation des deux brins est très stable quand il s'agit de séquences complémentaires. Et si une altération se produit dans une position nucléotidique, en raison d'une différence génétique entre la souche clinique et la séquence consensus, l'hybridation des deux brins est thermodynamiquement instable.

I.6.2.5.1 Hybridation sur support solide

La méthode Line Probe Assay (LiPA) consiste à fixer sur un support en cellulose une série de sondes complémentaires de la région de 81 paires de base du gène *rpoB* qui se chevauchent les unes aux autres (Rossau et *al.*, 1997). Cinq de

ces sondes sont homologues avec cinq sous-régions qui constituent ensemble la région « hot spot » du gène *rpoB*, quatre autres sondes avec les principales mutations et une autre sonde constituant un contrôle d'amplification pour le complexe MTB. La méthode consiste en une hybridation reverse dans laquelle les amplicons marqués à la biotine sont hybridés aux sondes immobilisées sur la membrane dans des conditions strictes. Les complexes hybrides formés sont détectés après incubation avec la streptavidine-peroxydase et ajout ultérieur d'un chromogène. Si l'une des cinq sondes homologues des séquences de type sauvage ne s'hybride pas, ceci indique la présence d'une mutation dans la région couverte par cette sonde. Par ailleurs, le cas échéant, des sondes homologues à une mutation produisent un signal d'hybridation positif, alors il est possible de préciser la mutation responsable de la résistance.

La technique est simple et ne nécessite aucune expertise technique en biologie moléculaire, mais nécessite une étape de pré-PCR pour amplifier et marquer l'ADN du spécimen clinique suivie d'une étape d'hybridation ultérieure. Son application à des isolats cliniques montre une bonne corrélation avec le séquençage de l'ADN (seulement 2-4% de divergences avec le séquençage de l'ADN/ tests phénotypiques) ainsi qu'une bonne sensibilité directement sur des échantillons cliniques. Sa sensibilité augmente quand on utilise une PCR nichée. En ce qui concerne la possibilité d'attribuer la mutation spécifique associée à la résistance, un certain nombre de cas ont été rapportés chez certains mutants qui, possédant des insertions, ne pouvaient pas être détectés.

1.6.2.5.2 L'hybridation en microplaques

Un format de PCR-ELISA a été développé pour la détection des souches rifampicine résistantes. Dans cette technique, cinq oligonucléotides indépendants, complémentaires de la séquence correspondante de type sauvage qui couvrent la région de 81 paires de base du gène *rpoB* ont été conçus comme des sondes de capture et immobilisés dans les puits d'une microplaque (Garcia et al., 2001). La région *rpoB* de l'isolat clinique est amplifiée et marquée avec la digoxygénine. Après hybridation et révélation, les signaux positifs correspondent aux amplicons dépourvus de mutations dans la région analysée et les signaux négatifs indiquent la présence d'une mutation dans la région correspondante. Ce format a été testé avec

succès avec une collection de souches cliniques et aussi directement sur des échantillons cliniques.

I.6.2.5.3 Hybridation sur puces d'oligonucléotides ou biopuces.

Différents formats de biopuces ont été développés pour la recherche des résistances à la rifampicine chez *M. tuberculosis*. Le test est basé sur l'hybridation de l'ADN issu de l'isolat clinique sur un ensemble d'oligonucléotides, chacun correspondant à une des variantes de la mutation *rpoB*, immobilisés soit sur des billes de polyacrylamide (MAGIChip) (Mikhailovich et al., 2001), soit sur des billes de verre miniaturisées (GeneChip, d'Affymetrix Inc, Santa Cruz, Californie). La région *rpoB* de la souche testée est amplifiée par PCR et marquée par fluorescence, puis hybridée à des oligonucléotides sur des biopuces. La fluorescence est plus élevée pour les oligonucléotides immobilisés qui sont complémentaires à l'amplicon de la souche testée et la présence d'une discordance est à l'origine d'une instabilité du duplex conduisant à une réduction de la fluorescence. L'intensité relative de la fluorescence entre les différentes positions sur la puce va définir le modèle de mutations dans les souches testées. Ce format permet le screening de 30 variantes différentes de mutations dans le gène *rpoB* sur biopuce de polyacrylamide en 24 heures, et 51 différents variantes dans la version GeneChip en 4 heures.

I.6.2.6 Techniques de PCR en temps réel

La PCR en temps réel est basée sur l'hybridation des acides nucléiques amplifiés avec des sondes marquées fluorescentes couvrant la région d'ADN d'intérêt et monitorée dans des thermocycleurs (Shamputa et al., 2004). L'intensité du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité de produit amplifié. Pour la détection de la résistance aux antituberculeux, différents sondes ont été utilisées, en particulier pour la rifampicine ou l'isoniazide telles que les sondes TaqMan, les sondes fluorescentes de transfert d'énergie par résonance, les balises moléculaires « molecular beacons » et biprobes (Garcia de Viedma, 2003). Le principal avantage de la PCR en temps réel est sa vitesse. Elle permet de produire des résultats 1,5 à 2 heures après l'extraction de l'ADN. Elle présente également un faible risque de contamination, car les deux réactions et la détection se produisent dans un seul tube. Les principaux inconvénients seraient l'équipement et

les réactifs coûteux ainsi que la nécessité de personnel technique qualifié. La PCR en temps réel a été évaluée dans plusieurs études pour la détection de *M. tuberculosis* et la résistance aux antituberculeux.

I.7 TYPAGE MOLECULAIRE DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Avant le début des années 1990, le génome de *M. tuberculosis* était considéré comme tout à fait stable et presque dépourvu de polymorphismes. Par conséquent, la distinction entre les différentes espèces reposait sur des caractères phénotypiques tels que la morphologie des colonies, la vitesse de croissance, la sensibilité aux antibiotiques ou la lysotypie. Du fait de leur faible pouvoir discriminant, ces techniques ont restreint de façon significative les études épidémiologiques sur la tuberculose. La publication du génome complet annoté de la souche de laboratoire *M. tuberculosis* H37Rv en 1998 (Cole et al., 1998) a ouvert la voie pour le développement de nouvelles méthodes de typage. Ces techniques ont pour objectif de comparer les souches sur la base de leurs empreintes génétiques. Ainsi, elles permettent non seulement de différencier les espèces au sein du complexe *tuberculosis*, mais aussi elles contribuent à l'étude de la transmission de la tuberculose (Mathema et al., 2006). L'épidémiologie moléculaire est aujourd'hui devenue un complément indispensable à la menée d'enquêtes épidémiologiques classiques.

I.7.1 Polymorphismes dans le génome du complexe *Mycobacterium tuberculosis*

Les mycobactéries du complexe *M. tuberculosis* représentent un exemple extrême d'homogénéité génétique intraspécifique avec un degré de polymorphisme nucléotidique synonyme estimé à 0,01-0,03% et l'absence de transfert horizontal de gènes, à la différence de la majorité des bactéries pathogènes (Brosch et al., 2002). Une étude réalisée à l'aide des méthodes très sensibles a abouti à la découverte au milieu des années 1990 que ces types monophormes avaient des sites génomiques polymorphes (Mathema et al., 2006) qui peuvent être regroupés en 3 groupes principaux :

- **Les substitutions nucléotidiques simples**

Il s'agit de mutations ponctuelles plus communément appelées SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) qui se produisent au sein du génome des bactéries. Il existe deux catégories de substitutions nucléotides :

- Les SNP synonymes (silencieux)
- Les SNP non synonymes (non silencieux)

- **Les polymorphismes de séquences répétitives**

Ils sont subdivisés en :

- Séquences répétées entrecoupées telles que les répétitions directes (exemple de la région DR)
- Séquences répétées d'insertion (exemple de la séquence *IS6110*)

- **Les séquences répétées en tandem en nombre variable**

Ces polymorphismes sont subdivisés en microsatellites et macrosatellites en fonction de la taille de l'élément répétitif (séquences de 1-10 pb et de 10-100 pb respectivement).

1.7.2 Méthodes de génotypage appliquées à *Mycobacterium tuberculosis*

De nombreuses méthodes de génotypage des souches cliniques de *M. tuberculosis* ont été développées depuis une vingtaine d'années. Parmi les plus utilisées, on compte la méthode RFLP sur *IS6110* développée originalement, le spoligotyping et le typage MIRU-VNTR décrit plus récemment (Mathema et al., 2006).

1.7.2.1 La méthode RFLP *IS6110*

La méthode repose sur la détection du premier marqueur moléculaire identifié pour le typage moléculaire des bacilles de la tuberculose, l'élément *IS6110*. Il s'agit d'une séquence d'insertion de la famille IS3 constituée de 1361 pb, spécifique des bacilles de la tuberculose. Bien qu'*IS6110* soit transposable, la fréquence de transposition est faible. L'élément *IS6110* est présent en nombre de copies variable, jusqu'à une vingtaine de copies, avec des localisations diverses sur le chromosome.

Ces variations de distribution génèrent une importante variété de profils génomiques selon les souches et font de la séquence *IS6110* un remarquable outil épidémiologique. Le séquençage du génome de *M. tuberculosis* H37Rv (Cole et al., 1998) a montré que la plupart des copies de *IS6110* sont insérées dans des régions inter-géniques ou non codantes, souvent près des gènes tRNA, ce qui contribue à prévenir l'inactivation des gènes et explique la diversité des possibilités d'insertion de l'élément. Cependant la distribution de *IS6110* n'est pas uniforme sur l'ensemble du génome. Les insertions sont rares dans le quart du génome encadrant le gène *oriC* et très fréquentes dans une autre région spécifique des bacilles de la tuberculose, la région dite, DR.

La méthode de typage RFLP *IS6110* est standardisée (van Embden et al., 1993) et consiste en l'analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction du génome après hybridation avec la sonde *IS6110*. Le génome est digéré par PvuII, une enzyme de restriction qui ne coupe qu'une seule fois dans l'*IS6110*, et les fragments sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose. Après transfert sur membrane et hybridation avec la séquence répétée *IS6110*, on révèle par marquage chimioluminescent les quelques fragments d'ADN qui portent *IS6110* (Figure 11). La comparaison des profils génomiques obtenus est réalisée visuellement si les profils à étudier sont tous sur le même film d'autoradiographie ou par analyse informatique si plusieurs films sont en jeu. La réalisation de la méthode nécessite des quantités importantes de cellules pour l'obtention de plusieurs milligrammes d'ADN. Le temps de réalisation, depuis la lyse bactérienne jusqu'à la lecture des profils, est de l'ordre d'une dizaine de jours.

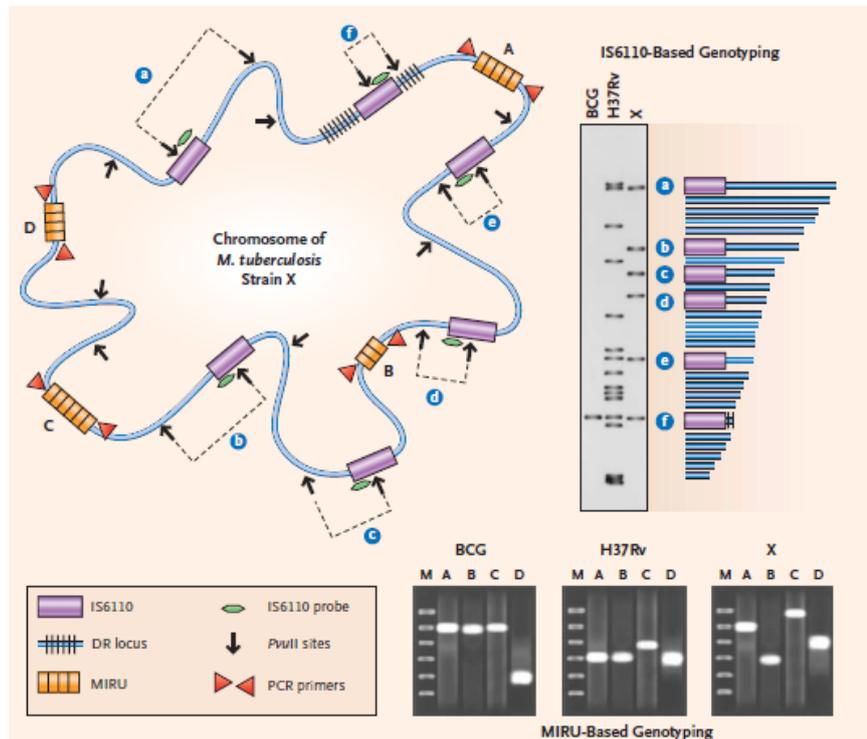


Figure 11 : Principe du typage par RFLP *IS6110* et du typage MIRU-VNTR (Barnes and Cave, 2003)

1.7.2.2 Le spoligotyping (Spacer Oligonucleotide Typing)

Cette méthode repose sur la détection du polymorphisme de la région DR (Kamerbeek et al., 1997). La région DR (direct repeat) est un site unique, présent exclusivement chez les bacilles de la tuberculose, qui comporte des répétitions directes de 36 pb (séquences DR) séparées par des séquences non conservées de 35 à 41 pb (séquences inter DR) (van Soolingen et al., 2007). Ces séquences varient d'une souche à une autre par leur longueur, leur séquence et leur nombre. Deux formes de réarrangements génomiques ont été identifiées, soit des variations affectant une ou plusieurs répétitions contigües, probablement dues à des événements de recombinaisons homologues, soit des variations liées à la transposition d'un élément *IS6110* pratiquement toujours présent dans la région DR.

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

à obtenir un lysat cellulaire utilisé comme source d'ADN puis à amplifier la région DR grâce à 2 amorces complémentaires de la séquence conservée de 36 pb et dirigées vers l'extérieur (Figure 12).

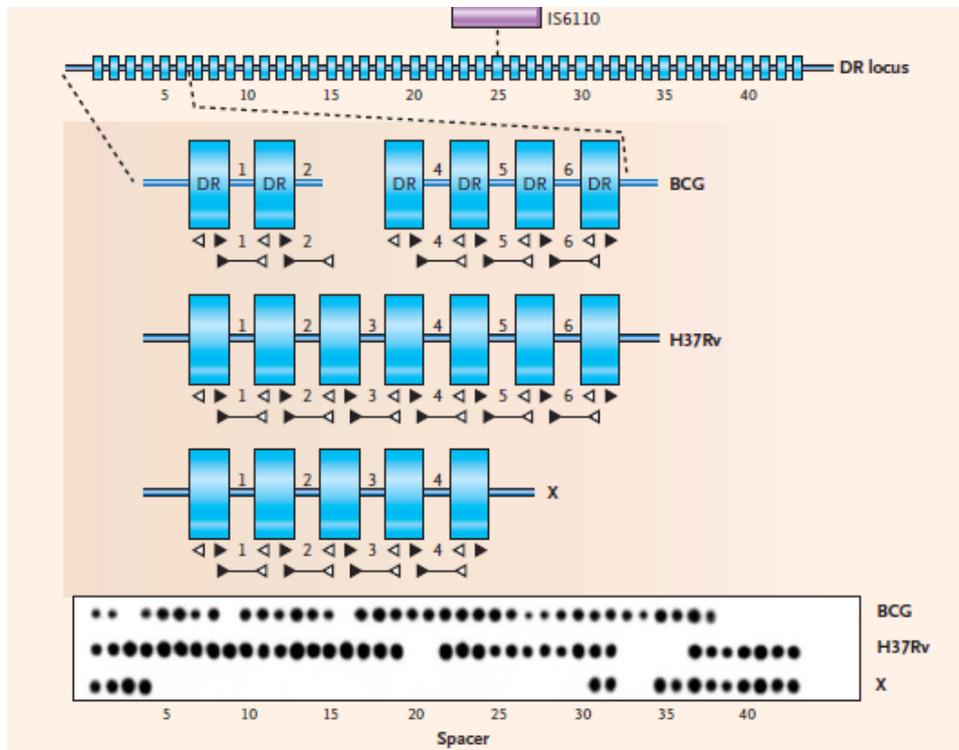


Figure 12: Structure et amplification de la région DR (Barnes and Cave, 2003)

Les profils génomiques sont révélés après hybridation de la membrane avec les produits d'amplification (Figure 13). La méthode est beaucoup moins exigeante en ADN que la méthode de référence RFLP *IS6110* grâce à l'amplification par PCR. Le temps de réalisation est également réduit, et l'ensemble des étapes de la méthode peut être effectué en 48 heures.

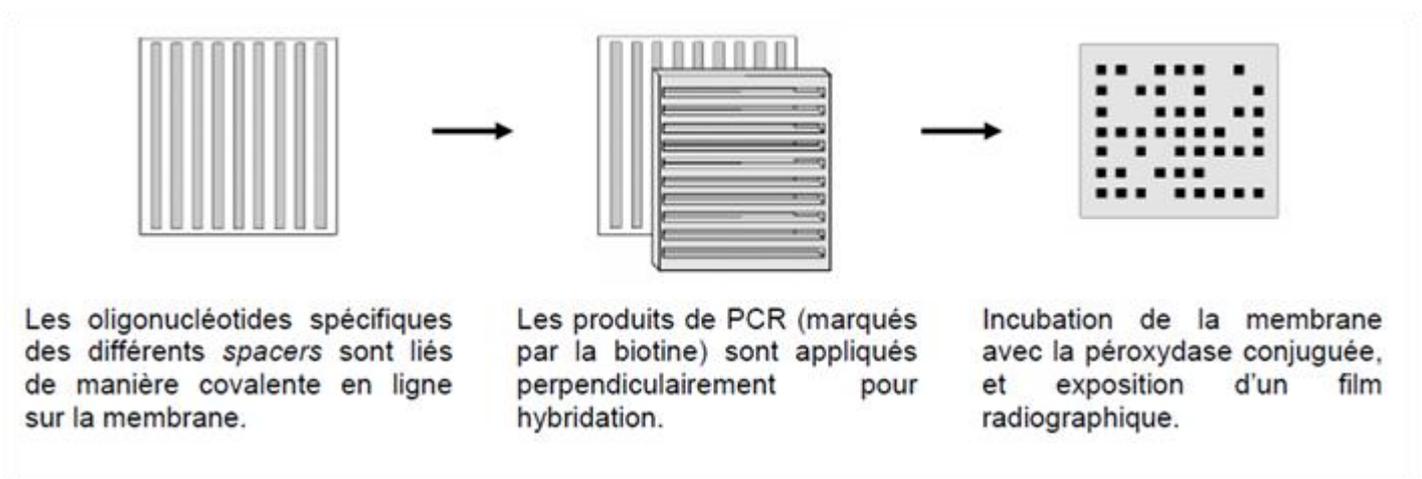


Figure 13 : Etapes du spoligotyping (Barnes and Cave, 2003)

I.7.2.3 Le typage MIRU-VNTR

L'analyse des régions génomiques présentant des nombres variables de répétitions en tandem (VNTR, Variable Number of Tandem Repeat) a permis de mettre en évidence 11 loci VNTR dont 5 comprenant des répétitions en tandem majeures polymorphes (major polymorphic tandem repeat, MPTR) et 6 loci comprenant des répétitions en tandem exactes (exact tandem repeats, ETR) dont la taille variait entre 53 et 79 pb (Frothingham and Meeker-O'Connell, 1998). Ces travaux de (Frothingham and Meeker-O'Connell, 1998) ont débouché sur une proposition d'un schéma de typage qui s'est montré utile pour le génotypage de souches de *M. tuberculosis*. Depuis lors, de nombreux loci VNTR ont été identifiés grâce au séquençage complet de *M. tuberculosis* H37Rv. En 2000, (Supply et al., 2000) ont décrit 41 VNTR d'éléments génétiques appelés « unités répétitives dispersées sur le génome mycobactérien » ou MIRU (Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit (Figure 14). Douze des 41 loci MIRU considérés comme les plus polymorphes ont été sélectionnés pour le génotypage des isolats cliniques (Supply et al., 2000).

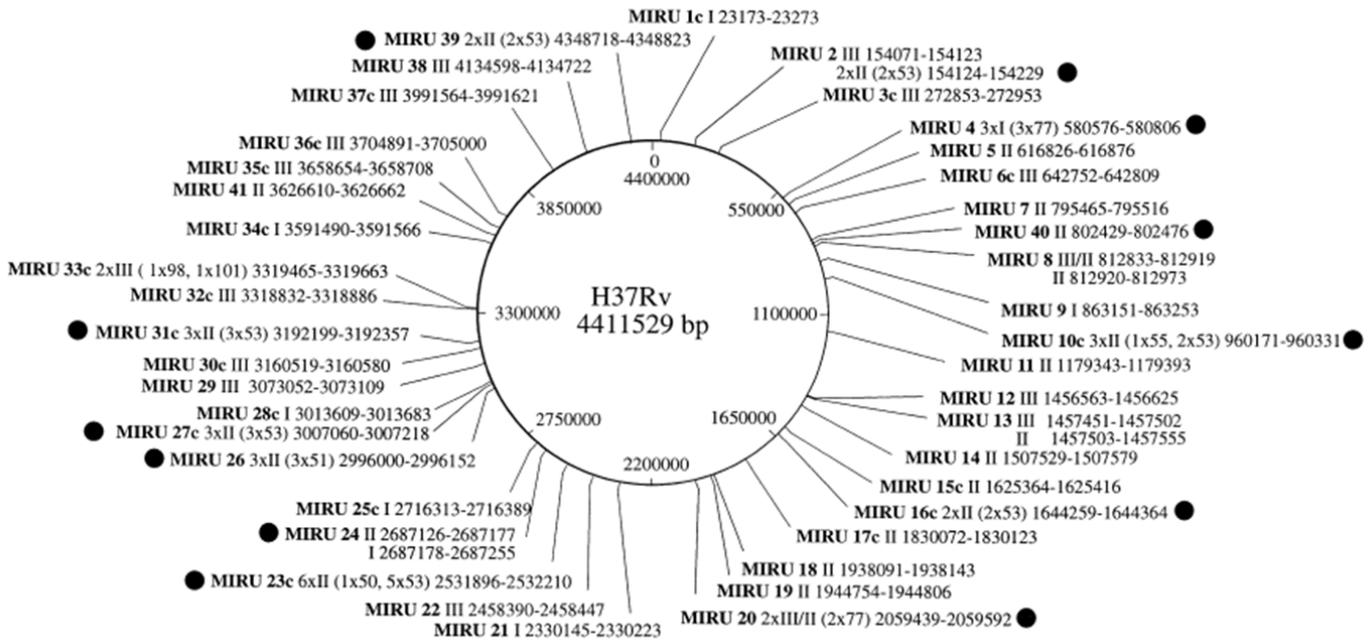


Figure 14 : Carte des 41 loci VNTR sur le chromosome de *M. tuberculosis* H37Rv. Les 12 loci utilisés dans la technique MIRU-VNTR sont repérés par un point noir (Supply et al., 2000)

La technique consiste en l'amplification des régions flanquantes des MIRUs, puis à la détermination de la taille des produits amplifiés qui reflètent le nombre de copies de l'élément au locus utilisé (Figure 11) (Supply et al., 2006). Le résultat final est un code numérique à 12 chiffres correspondant au nombre de répétitions observées pour chaque locus chromosomique.

Récemment, une technique standardisée basée sur l'analyse de 15 loci MIRU au lieu de 12, présentant un pouvoir discriminatoire augmenté, a été proposée comme nouveau standard pour les études épidémiologiques de routine alors qu'un système à 24 loci a été proposé comme méthode à haute résolution pour les études phylogénétiques (Supply et al., 2006).

I.8 PRINCIPALES FAMILLES GENETIQUES AU SEIN DU COMPLEXE *M. TUBERCULOSIS*

I.8.1 La famille Afrique de l'Est – Inde (East African India, EAI)

Décrite pour la première fois en Guinée-Bissau, cette famille est fréquente en Asie du Sud-Est, en Inde, et en Afrique de l'Est (Figure 15) (Kremer et al., 1999). Ce

groupe de souches est caractérisé par un faible nombre de copies *IS6110*. La caractérisation des isolats appartenant à cette famille révèle une congruence entre les spoligotypes (absence des espaceurs 29-32, présence de l'espaceur 33, et absence de l'espaceur 34), les VNTR [(ETR-A) allèle ≥ 4], le regroupement basé sur les gènes *katGgyrA* (groupe 1), et plus tard la présence de la séquence TbD1 (Sola et al., 2001). Elle a été renommée famille indo-océanique dans les travaux de (Gagneux et al., 2006).

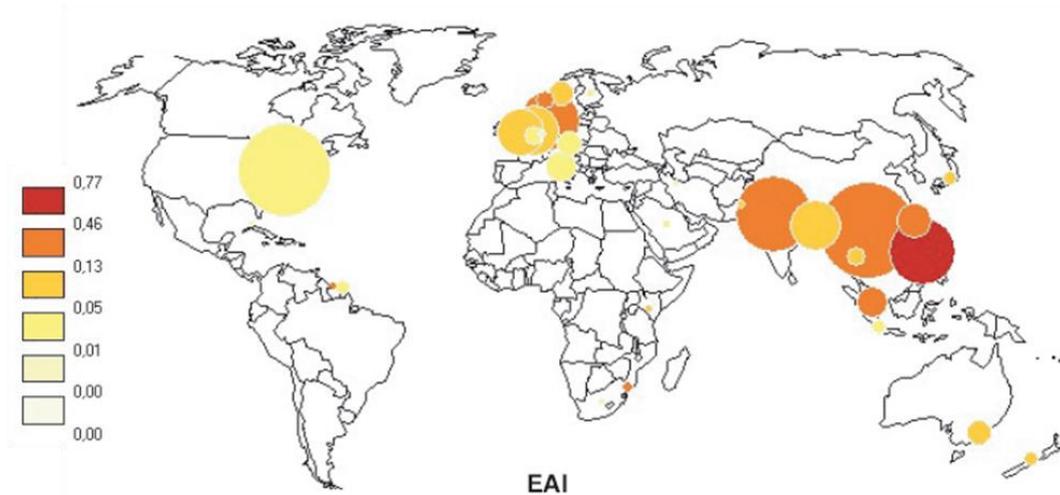


Figure 15 : Distribution de la famille EAI dans le monde (Brudey et al., 2006)

I.8.2 La famille Beijing

Le génotype Beijing appartient au groupe génétique principal 1 de Sreevatsan. Les travaux de (van Soolingen et al., 1995) ont identifié un spoligotype spécifique (absence de l'espaceur 1-33, présence des espaceurs 34 - 43). Cependant, une épidémie associée à un clone multirésistant de l'un de ses descendants (souche W New York) avait été caractérisée plus tôt, au début des années 90. L'émergence de cette famille génotypique continue de poser une grave menace pour la lutte contre la tuberculose en raison de sa forte virulence et de son association fréquente avec la multirésistance. Ces souches sont caractérisées par la présence d'une copie *IS6110* inversée au sein de la région DR, un élément *IS6110* à un site d'insertion particulier (à l'origine de répliation) et une ou deux copies *IS6110*.

La famille Beijing a récemment été rebaptisée famille de l'Asie de l'Est (Figure 16) par d'autres auteurs (Gagneux et al., 2006).

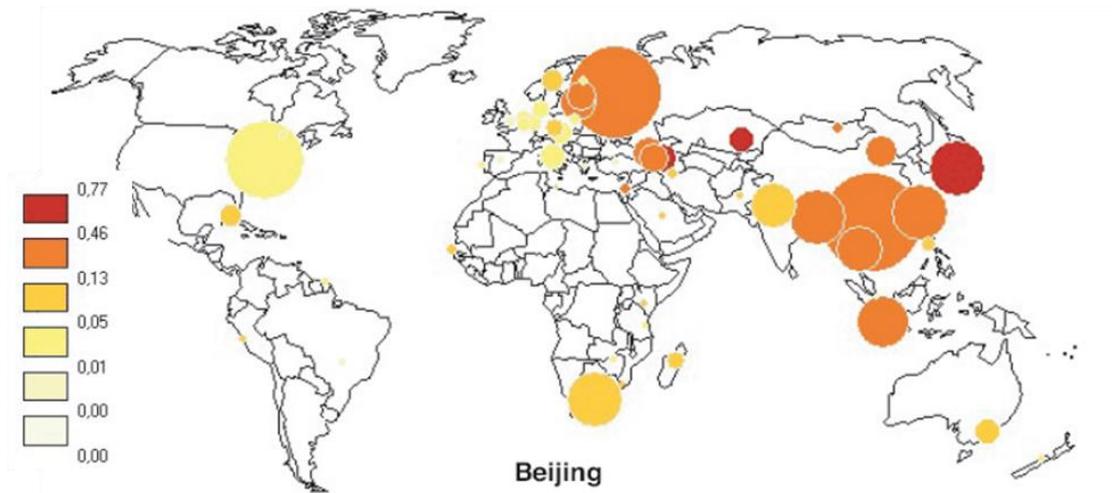


Figure 16 : Distribution de la famille Beijing dans le monde (Brudey et al., 2006)

I.8.3 La famille de l'Asie centrale (CAS) ou famille de Delhi

La présence en Inde d'une lignée spécifique du complexe *M. tuberculosis* a été signalée de façon concomitante et indépendante par deux études à l'aide de la RFLP *IS6110* et du spoligotypage, respectivement (Filliol et al., 2003). Cette lignée est endémique au Soudan, dans d'autres pays d'Afrique sub-saharienne et au Pakistan (Figure 17) (Brudey et al., 2006). L'utilisation de la RFLP *IS6110* dans la lignée Delhi montre une bande caractéristique dans la région de poids moléculaire élevé (12,1 et 10,1 paires de kilobases), et sa signature spoligotype est formée par l'absence des espaceurs 4-27 et 23-34. Cette spoligo-signature montre de nombreuses variantes et plusieurs sous-groupes tels que CAS1- Kili (pour le Kilimandjaro) et CAS1-Dar (pour Dar-es-Salaam) qui ont déjà été définis sur la base de nouvelles spoligo-signatures qui sont spécifiques pour chaque nouveau complexe clonal.

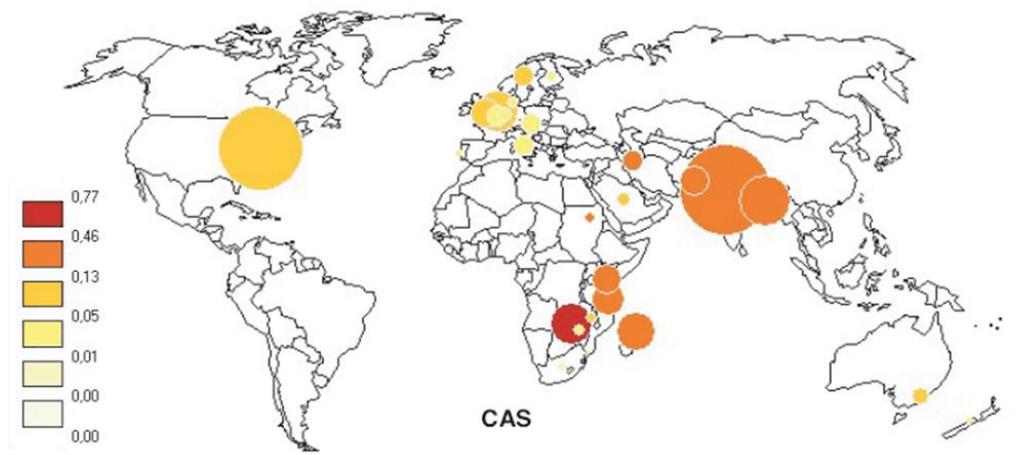


Figure 17 : Distribution de la famille CAS dans le monde (Brudey et *al.*, 2006)

I.8.4 La famille Haarlem

La famille Haarlem a été décrite à Haarlem aux Pays-Bas en 1999 (Kremer et *al.*, 1999). L'analyse RFLP *IS6110* de ces souches montre une double bande de 1,4 kb. Leur spoligotype est caractérisé par l'absence de l'espaceur 31 qui est due à la présence d'une deuxième copie de *IS6110* dans la région DR (Groenen et *al.*, 1993). Trois principales signatures définissent les variantes H1 à H3 (Filliol et *al.*, 2002). La famille Haarlem est très répandue en Europe du Nord. Elle est présente dans les Caraïbes (Figure 18) dans une moindre mesure et est également répandue en Afrique centrale où l'on croit qu'elle a été introduite lors de la colonisation européenne (Filliol et *al.*, 2003).

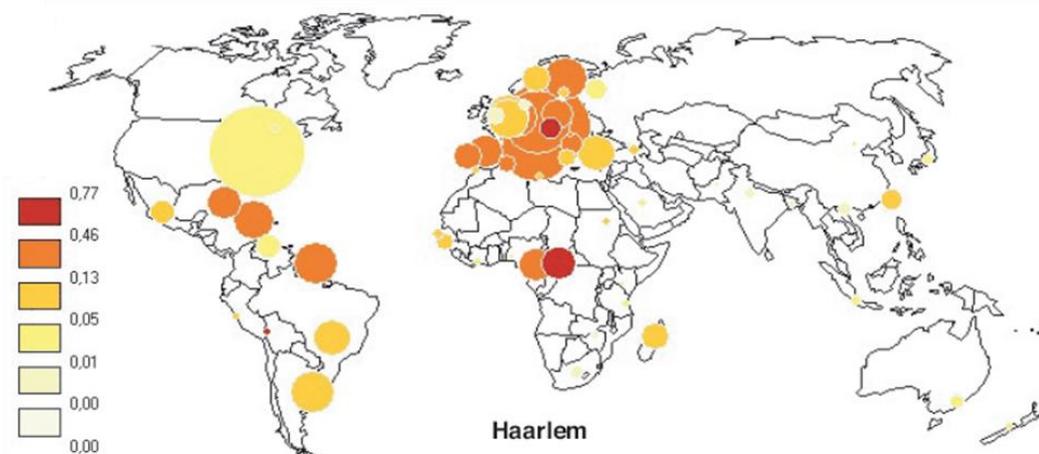


Figure 18 : Distribution de la famille Haarlem dans le monde (Brudey et *al.*, 2006)

I.8.5 La famille Amérique latine et Méditerranée (LAM)

La famille LAM a été définie par le constat d'un déséquilibre de liaison entre l'absence des espaceurs 21-24 dans le spoligotpage et la présence d'un allèle ETR-Aégal à 2 (Sola et *al.*, 2001). Toutefois, cette famille génotypique est plus diversifiée, ce qui rend son étude un peu plus complexe. Beaucoup de sous-motifs - LAM1 à LAM12 - ont été proposés dans les dernières versions de la base de données internationale SpolDB4 (Brudey et *al.*, 2006). Cependant, la signification phylogénétique de l'absence commune des espaceurs 23-24 n'a pas été démontrée dans cette lignée. En ce sens, certains génotypes présentent une forte spécificité géographique (Par exemple le LAM10-Cameroun) (Niobe-Eyangoh et *al.*, 2003). Le clade LAM est fréquent dans les pays méditerranéens et en Amérique (Figure 19).

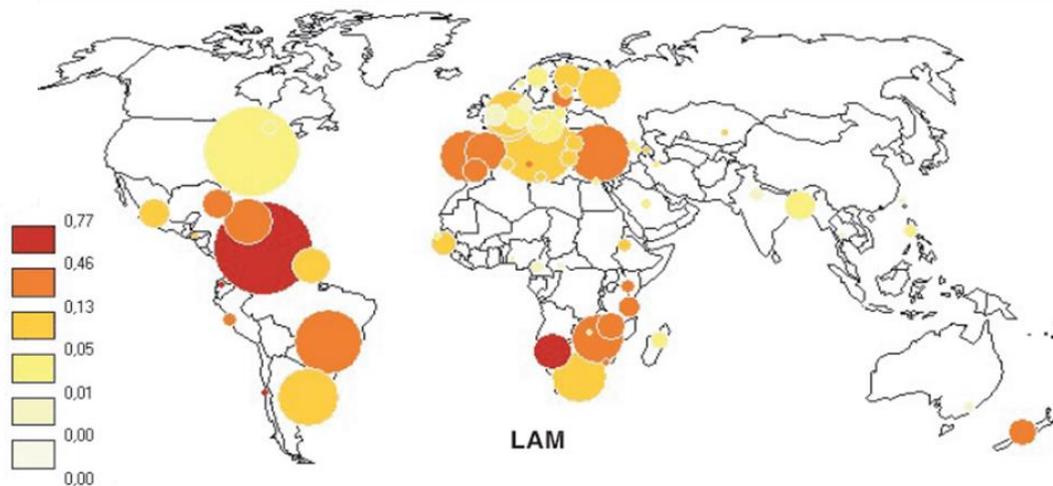


Figure 19 : Distribution de la famille LAM dans le monde (Brudey et *al.*, 2006)

I.8.6 La famille X

La famille X est définie par deux caractéristiques concomitantes, un faible nombre de copies *IS6110* et l'absence de l'espaceur 18 dans le spoligotpage. Ce dernier est en effet une caractéristique importante commune à au moins trois spoligotypes : ST119, ST137, et ST92. Ces deux caractéristiques sont présentes dans la souche CDC1551 qui a été signalée être très virulente. La famille X a également été le premier groupe identifié en Guadeloupe (Sola et *al.*, 1997). Des variantes épidémiques spécifiques de cette famille ont été décrites en Afrique du Sud

(Streicher et *al.*, 2004). Il est également très répandu en Afrique du Sud et dans une moindre mesure dans les Caraïbes.

I.8.7 La famille T et les autres

La famille T est «mal définie» et a été caractérisée «par défaut». Elle comprend des souches dépourvues des espaceurs 33-36 qui peuvent difficilement être classées dans les autres groupes. Il s'agit d'une caractéristique générale des souches appartenant aux principaux groupes génétiques 2 et 3. On s'attend à ce que les combinaisons des signatures MIRU au spoligotype apportent plus de précisions sur la définition de ce complexe clonal (Supply et *al.*, 2006).

I.8.8 West africanum 1 et West africanum 2

Les outils de génotypage utilisés dans les études d'épidémiologie moléculaire (RFLP et spoligotypage) ont permis d'identifier quelques caractéristiques des souches de *M. africanum* qui ne permettent pas cependant de les détecter avec certitude. L'absence des espaceurs 8-12 et 37-39 permet une classification non ambiguë des souches de *M. africanum* dans la famille West african 1. Les souches de *M. africanum* appartenant à la famille West african 2 présentent en général une spoligo-signature caractérisée par l'absence des espaceurs 7-9 et 39 (de Jong et *al.*, 2009, Streicher et *al.*, 2007). Cependant, pour les souches ne présentant aucune des spoligo-signatures associées à West african 1 et West african 2, et caractérisées par l'absence des espaceurs 33-36, des analyses moléculaires additionnelles sont nécessaires pour une bonne classification. L'utilisation de la RFLP montre que les souches de la famille West african 1 présentent plus de cinq copies *IS6110* tandis que dans la famille West African 2, on note en général moins de cinq copies de *IS6110* (Viana-Niero et *al.*, 2001). Des études ont établi que West african 1 et West african 2 sont des lignées différentes. Elles partagent avec *M. bovis* la délétion RD9 tandis que West african 2 et *M. bovis* présentent en plus les délétions RD7, RD8 et RD10 (Mostowy et *al.*, 2002). La Figure 20 présente la distribution des souches West african 1 (MAF1) et West african 2 (MAF2) dans la côte Ouest-africaine.

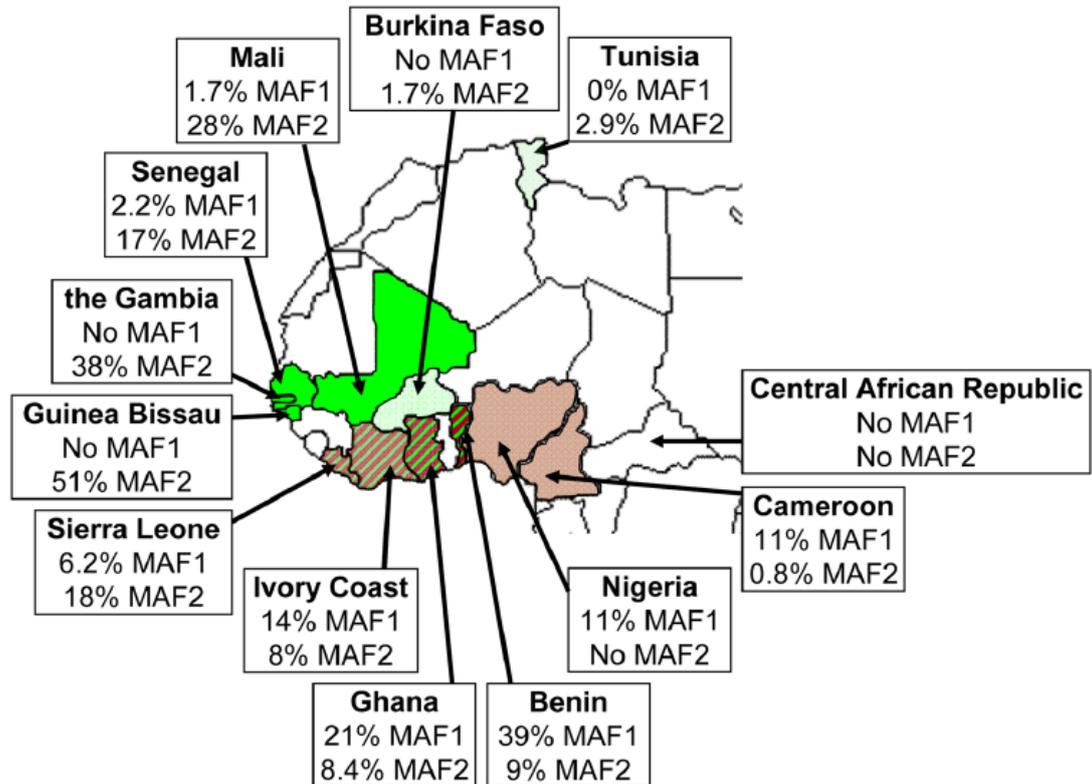


Figure 20 : Distribution des souches de *M. africanum* dans les pays de la côte Ouest-africaine (de Jong et *al.*, 2010)

II.1 CADRE CONCEPTUEL DE L'ETUDE

La présente étude s'intègre dans un programme de recherche initié par le projet CANTAM « Central Africa Network for Tuberculosis, AIDS/HIV and Malaria ». Financé par EDCTP « European and Developing countries Clinical Trials Partnership », ce programme avait pour objectif de préparer des sites et de constituer une cohorte en vue de la réalisation des essais cliniques futurs de nouveaux vaccins et médicaments antituberculeux au Cameroun.

Entre autres activités principales de ce programme, figuraient le renforcement des capacités humaines et infrastructurelles et l'obtention des informations épidémiologiques de base sur la tuberculose dans les sites choisis. C'est dans le cadre de l'obtention des données épidémiologiques dans les sites choisis que le présent travail a été réalisé.

II.2 SITES DE L'ETUDE

Les échantillons ont été collectés à l'Hôpital Jamot de Yaoundé et à l'Hôpital de District de Mbalmayo. Ces deux formations sanitaires sont spécialisées dans la prise en charge des patients tuberculeux et constituent des Centres de Diagnostic et de Traitement (CDT) pour le Programme National de Lutte contre la Tuberculose (PNLT). L'Hôpital Jamot de Yaoundé situé en zone urbaine est un centre de référence dans la prise en charge des patients tuberculeux tandis que l'Hôpital de District de Mbalmayo est situé en zone semi-urbaine dans la périphérie de Yaoundé.

II.3 SCHEMA GENERAL DE L'ETUDE ET PLAN EXPERIMENTAL

II.3.1 Type et durée de l'étude

L'étude réalisée était de type transversal descriptif et analytique. Les échantillons ont été collectés sur une période de 9 mois allant d'Avril 2010 à Décembre 2010.

II.3.2 Critères d'éligibilité de la population d'étude

Notre échantillon était constitué des patients tuberculeux pulmonaires admis consécutivement durant la période de collecte à l'hôpital Jamot de Yaoundé et à l'hôpital de District de Mbalmayo.

Outre le critère de tuberculose pulmonaire, l'inclusion des cas a été faite sur la base des critères suivants :

- Les patients présentant un frottis positif à la recherche des BAAR ;
- Les patients âgés d'au moins 15 ans ;
- Les patients ayant donné leurs consentements éclairés.

II.3.3 Plan expérimental

Tous les patients suspects de tuberculose se présentant dans les formations sanitaires retenues pour cette étude étaient soumis à un examen clinique. A l'issue de l'examen clinique, des données socio-démographiques et cliniques étaient collectées sur une fiche technique désignée à cet effet (Annexe 5) pour les patients présentant des signes fortement évocateurs de tuberculose pulmonaire ; ceux-ci étaient ensuite orientés au laboratoire pour un examen des crachats. Pour cela, un crachat était collecté pour chaque patient en vue de la recherche des BAAR. En cas de microscopie positive, un deuxième crachat était collecté, ainsi qu'un échantillon de sang pour la réalisation de la sérologie VIH. Les participants étaient enrôlés dans l'étude après avoir été informés du but et des objectifs de l'étude et donné un accord de participation par la signature d'une fiche de consentement éclairé ou d'un assentiment respectivement pour les participants majeurs et mineurs.

Tous les échantillons de crachats à microscopie positive étaient acheminés dans de la glace au Centre Pasteur du Cameroun. Toutes les analyses phénotypiques ont été réalisées au Laboratoire de Mycobactéries du Centre Pasteur du Cameroun. Ces analyses consistaient en une microscopie de confirmation par la technique de coloration à l'auramine, une mise en culture des prélèvements et les tests de sensibilité aux antituberculeux. Les tests de sérologie VIH étaient réalisés au Laboratoire de Virologie du Centre Pasteur.

Toutes les cultures positives ont servi à la préparation des lysats qui étaient transférés au Laboratoire de Recherche en Tuberculose (LRT) de Nkolbisson où des

aliquots ont été préparés avant le transport pour l'Institut de Médecine Tropicale de Tübingen en Allemagne pour la caractérisation des mutations par séquençage et le typage moléculaire.

Le typage moléculaire a été effectué au Laboratoire de Référence des Mycobactéries de Borstel (Allemagne) à partir des lysats.

Tous les échantillons de crachats à microscopie positive ayant donné des cultures négatives ont été transportés au Laboratoire de Microbiologie de l'Université de Tübingen en Allemagne pour le diagnostic moléculaire de la tuberculose à l'aide de la technologie GeneXpert.

II.3.4 Considérations éthiques

Le projet de recherche a reçu une clairance éthique N°126/CNE/SE/09 en date du 02/10/2009 du Comité National d'Éthique du Cameroun (Annexe 1). Une autorisation administrative (Annexe 2) de la Direction de la Recherche Opérationnelle en Santé (DROS) du Ministère de la Santé Publique a également été accordée à l'investigateur principal du projet.

II.4 ANALYSE PHENOTYPIQUE DES ISOLATS DU COMPLEXE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

II.4.1 Examen microscopique (WHO, 1998a)

Il a été réalisé sur les frottis des crachats. Deux colorations étaient utilisées : la coloration de Ziehl-Neelsen et la coloration à l'auramine.

II.4.1.1 Principe

Coloration Ziehl-Neelsen

Dans la technique de Ziehl-Neelsen, la fuchsine colore en rouge les bacilles qui conservent cette coloration après traitement par l'acide sulfurique dilué et par l'alcool. Le fond de la préparation est ensuite coloré au bleu de méthylène. Les Bacilles Acido-Alcool-Résistants (B.A.A.R.) apparaissent rouges sur fond bleu. La lecture se fait à l'objectif immersion (x100).

Coloration à l'auramine

L'auramine se fixe sur le bacille et le rend fluorescent. Après traitement à l'acide-alcool et contre-coloration du fond de la préparation, celle-ci est examinée au microscope en fluorescence (x50). Les B.A.A.R. apparaissent fluorescents, brillants sur fond noir de la préparation.

II.4.1.2 Procédure

Après examen macroscopique du crachat, on repère les parcelles purulentes et à l'aide d'une anse de platine, on prélève une de celles-ci pour la confection du frottis. Le frottis est réalisé en étalant la parcelle prélevée sur une lame par un mouvement d'aller et retour. Après avoir séché la lame, le frottis est fixé par passages sur la flamme d'un bec bunsen, la face étant directement exposée à la flamme jusqu'à émission de vapeur pendant 10 minutes.

Coloration Ziehl-Neelsen (Méthode à chaud)

Le frottis est coloré à la fuschine puis décoloré par un mélange acide alcool pendant 2-3 minutes. Après rinçage à l'eau de robinet, le frottis est coloré par le bleu

de méthylène pendant 2 minutes. La lame est de nouveau rincée à l'eau, séchée à l'étuve, puis examinée au microscope optique sous immersion à l'objectif x 100.

Coloration à l'auramine

Le frottis est coloré à l'auramine 0,1% puis décoloré par un mélange acide alcool. Après rinçage à l'eau, le frottis est coloré par le permanganate de potassium 0,5%. La lame est de nouveau rincée à l'eau, séchée à l'étuve, puis examinée au microscope à fluorescence à l'objectif x 50. Les B.A.A.R. sont dénombrés par champ microscopique (Tableau II).

Tableau II : Expression des résultats de l'examen microscopique (WHO, 1998a)

Nombre de BAAR observés		
Report	Après coloration à la fuschine (x 100)	Après coloration avec fluorochrome (x 50)
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

II.4.2 Mise en culture

Tous les échantillons à microscopie positive dans les sites de collecte étaient soumis à une microscopie de confirmation au Laboratoire de Mycobactéries du Centre Pasteur. Après une étape de décontamination par la technique du lauryl sulfate de sodium (Tacquet and Tison, 1961), le culot de centrifugation étaitensemencé dans 2 tubes de milieu Löwenstein Jensen et 1 tube de milieu Löwenstein Jensen supplémenté en pyruvate 0,5% encore appelé milieu coletsos. Les cultures étaient incubées à 37°C dans une étuve en position inclinée, légèrement dévissées. Les tubes n'étaient fermés qu'après évaporation du liquide. La lecture était faite 1 fois toutes les semaines et n'était déclarée négative que si on n'observait aucune pousse après 8 semaines d'incubation.

II.4.3 Identification phénotypique

L'étape préliminaire d'identification a consisté en une observation de l'aspect des colonies et des délais de croissance. Cette étape a été complétée par des tests de sensibilité à la kanamycine et à l'acide paranitrobenzoïque qui ont permis une différenciation des mycobactéries atypiques et des mycobactéries tuberculeuses.

II.4.4 Test de sensibilité aux antibiotiques

La sensibilité des souches vis-à-vis des antituberculeux a été évaluée par la méthode indirecte des proportions telle que décrite par (Canetti et *al.*, 1969). Les antituberculeux ont été utilisés aux concentrations suivantes : Isoniazide (0,2 µg/mL et 1 µg/mL), Rifampicine (40 µg/mL), Ethambutol (2 µg/mL), Streptomycine (4 µg/mL), Kanamycine (10 µg/mL et 20 µg/mL) et Ofloxacin (2 µg/mL).

II.4.4.1 Principe

Dans son principe, la méthode indirecte des proportions consiste à déterminer pour la souche à étudier la proportion de mutants résistants à un antibiotique donné. On l'obtient en dénombrant sur des milieux solides contenant la concentration critique d'antibiotique, les colonies qui se sont développées et on compare ce nombre à celui des bactéries viables contenues dans le même inoculum et dénombrées sur milieux sans antibiotique. Le rapport des premiers aux seconds permet d'établir la proportion. La comparaison de la proportion obtenue aux proportions critiques conventionnellement définies permet de conclure sur la sensibilité ou à la résistance de la souche étudiée.

II.4.4.2 Procédure

A l'aide d'une spatule, quelques colonies isolées sur milieu Löwenstein Jensen sont prélevées et transférées dans un tube stérile contenant des billes de verre. Le tube était agité pendant 5 minutes et on y ajoutait 1 mL d'eau distillée stérile. La concentration de la suspension était ajustée à 1 mg/mL à l'aide d'un étalon commercialisé de BCG titrant 1 mg de poids sec bactérien par mL d'eau. Cette suspension était ensuite diluée afin d'obtenir une gamme de dilution décimale de 10^{-1} à 10^{-6} . Environ 200 µL de suspension de dilution 10^{-1} , 10^{-3} et 10^{-5} ont été

ensemencées en nappe dans deux tubes témoins sans antibiotiques et sur chacun des tubes contenant les antibiotiques étudiés. Deux autres tubes témoins ont été ensemencés avec 200 microlitres des dilutions 10^{-4} et 10^{-6} . Les tubes ont ensuite été incubés à 37°C en position horizontale. Après 24 heures, les tubes étaient refermés hermétiquement. Le comptage des colonies s'est fait au J28 et J42 pour en déduire la proportion des bacilles résistants. Les résultats étaient ensuite interprétés en comparant la proportion de bacilles résistants pour la souche étudiée à la proportion critique définie pour un antituberculeux donné qui est de 1%.

II.4.5 Détermination de la sérologie VIH

La sérologie VIH a été déterminée par une technique immuno-enzymatique à microparticules (AxSYM HIV Ag/Ab Combo) commercialisée par les laboratoires Abbott.

II.4.5.1 Principe

Il s'agit un dosage immuno-enzymatique de microparticules pour la détection qualitative des anticorps anti-VIH-1 et/ou VIH-2 dans le sérum humain. Le dosage utilise un mélange de microparticules (phase solide) recouvert d'antigènes recombinants de VIH (gp41 du VIH-1 groupe M, gp41 du VIH-1 groupe O et gp36 du VIH-2) pour la capture d'anticorps et de microparticules enrobées avec le VIH-1, des anticorps monoclonaux p24-spécifiques pour la capture de l'antigène du VIH dans un échantillon. Un ratio supérieur à 1 indique la présence d'immunoglobuline anti-VIH et/ou d'antigènes p24 tandis qu'un ratio inférieur à 1 indique un résultat négatif.

II.4.6 Test GeneXpert/RIF

Le test Xpert/RIF a été réalisé sur les culots de crachats décontaminés à microscopie positive mais ayant donné des cultures négatives. Le protocole est celui décrit par (Helb et *al.*, 2010) (Figure 21).

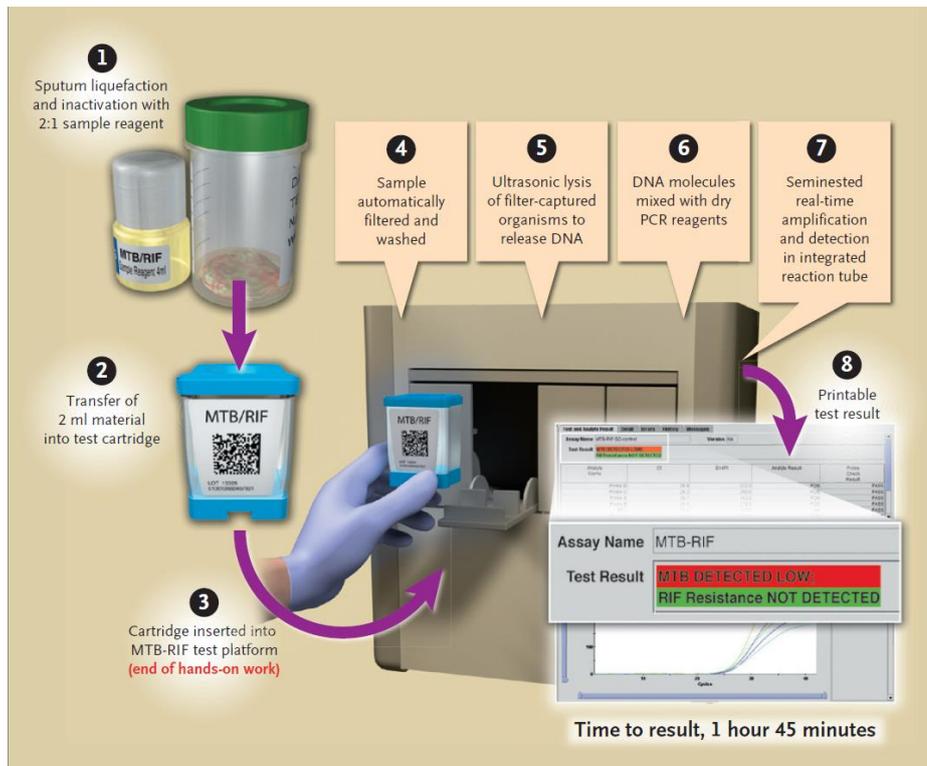


Figure 21 : Procédure du test GeneXpert/RIF (Boehme et *al.*, 2010)

Le test consiste en l'utilisation d'une cartouche en plastique à usage unique pré-chargée avec les tampons et les billes de réactifs lyophilisés nécessaires pour le traitement des échantillons, l'extraction d'ADN et la PCR nichée en temps réel. Les crachats décontaminés sont traités avec un réactif contenant du NaOH et de l'isopropanol. Le réactif est ajouté dans les proportions 2:1 et incubé pendant 15 min à température ambiante. L'échantillon traité est ensuite transféré dans la cartouche qui est ensuite chargée dans l'appareil GeneXpert. L'interface standard de l'utilisateur indique la présence ou l'absence de *M. tuberculosis*, la présence ou l'absence de résistance à la rifampicine, et une estimation semi-quantitative de la concentration de *M. tuberculosis* (élevé, moyen, faible et très faible). Les analyses qui sont négatives pour *M. tuberculosis* et le contrôle interne sont reportées comme non valides.

II.4.7 Analyse des données

Les données des patients étaient enregistrées dans un masque de saisie développé à cet effet sous Epi-info 3.5.3 version 2008 (*Centers for Disease Control, Atlanta, USA*). Les variables quantitatives (âge) sont exprimées en moyenne [IQ]. Les variables qualitatives (genre, statut marital, sérologie VIH, niveau d'études...) sont exprimées en fréquence (%).

L'analyse univariée par régression logistique a été utilisée pour identifier les facteurs associés au développement de la résistance aux antituberculeux. Les associations étaient considérées comme significatives pour des p valeurs inférieures à 5%.

II.5 ANALYSE DE LA DIVERSITE DES SOUCHES DU COMPLEXE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* ET MODE DE CIRCULATION DANS LA POPULATION

II.5.1 Extraction d'ADN par inactivation et lyse des cultures mycobactériennes

Les cultures du complexe *M. tuberculosis* ont été inactivées par la chaleur. Pour ce faire, les bactéries en culture sur milieu Löwenstein Jensen étaient récoltées à l'aide d'une anse de platine stérile et placées dans un microtube à centrifuger à vis Eppendorf® contenant 400 µL de tampon Tris EDTA (TE) 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA. Les tubes étaient ensuite placés dans un bain-marie à 90°C pendant 30 min. Ce traitement inactive et lyse les cellules permettant ainsi la libération de l'ADN.

Les tubes étaient ensuite centrifugés et le surnageant contenant l'ADN était récupéré et conservé à -20°C jusqu'à l'utilisation.

II.5.2 Spoligotypage

II.5.2.1 Principe

Le spoligotypage, ou typage oligonucléotidique des espaceurs du locus DR est une méthode pré-conceptualisée par (Groenen et *al.*, 1993) et développée par (Kamerbeek et *al.*, 1997). Cette méthode repose sur la détection du polymorphisme de 43 séquences oligonucléotidiques du génome de *M. tuberculosis*, intégrées dans le locus DR (*direct repeat*). Le locus DR est constitué de courtes séquences d'ADN répétées (DR) de 36 paires de base (pb), séparées par des séquences variables de 35 à 41 pb appelées espaceurs ou séquences inter-DR. Ces séquences varient d'une souche à l'autre par leur longueur, leur séquence et leur nombre.

La technique consiste à amplifier le locus DR par PCR, puis à l'hybrider sur une membrane où sont fixées de façon covalente 43 espaceurs (Figure 22). Les fragments hybridés sur le gel sont ensuite révélés par chimioluminescence. Les résultats montrent la présence ou l'absence des 43 espaceurs dans la souche testée.

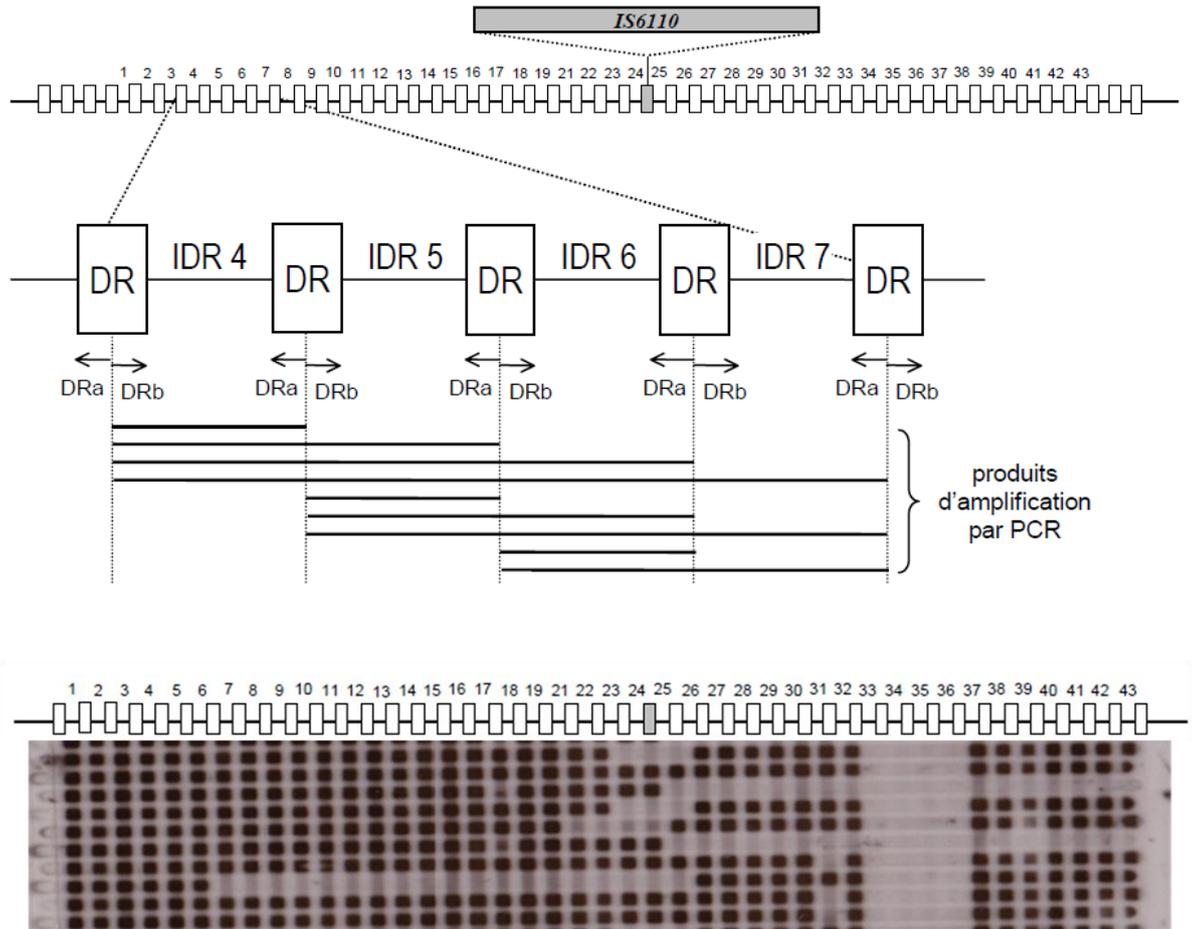
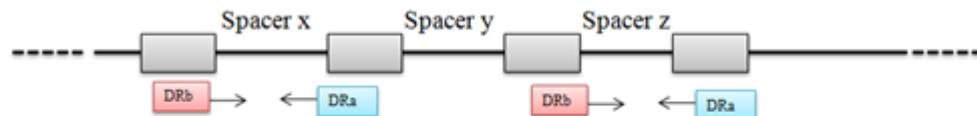


Figure 22 : Principe du spoligotypage et d'analyse des résultats (Kamerbeek et *al.*, 1997).

II.5.2.2 Amplification par PCR de la région DR

La région DR « *Direct Repeat* » a été amplifiée à partir des amorces DRa et DRb (TIB MolBiol, Allemagne).



DRa: 5'- biotine GGT TTT GGG TCT GAC GAC - 3'

DRb: 5'- CCG AGA GGG GAC GGA AAC - 3'

Le groupement biotine permet la fixation de la streptavidine qui elle-même couplée à la peroxydase permet la détection des produits d'amplification par chimioluminescence.

Le mélange réactionnel (Tableau III) a été préparé à partir du kit de PCR (Invitrogen, Inc) dans des conditions stériles sur de la glace pour le nombre de réactions en y ajoutant une réaction pour le témoin négatif et deux réactions pour les témoins positifs. Les deux témoins positifs étaient les souches de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv et *Mycobacterium bovis* BCG.

Tableau III : Mélange réactionnel utilisé pour l'amplification de la région DR

Composantes	Volume par réaction (µL)	Concentration finale
Eau distillée stérile	15	
Tampon de PCR 10X	2,5	1X
Amorce DRa	2	20 pmol
Amorce DRb	2	20 pmol
MgCl ₂ 25mM	0,75	0,75 mM
dNTPs	0,5	200 µM
Taq polymérase recombinante	0,125	0,5 U/µL
Volume du mix	20	-/-

Vingt microlitres de mélange réactionnel ont été introduits dans chaque tube de PCR (0,2 mL) auxquels on y a ajouté 5 µL de lysat mycobactérien (≈ 10 ng) et 2 µL d'ADN pour les contrôles positifs. Après homogénéisation et centrifugation, les tubes ont été placés dans un thermocycleur (MJ Research). Les conditions d'amplification standards étaient: 94°C pendant 3 min, suivi de 30 cycles comprenant les 3 étapes suivantes : 94°C pendant 1 min, 55°C pendant 1 min et 72°C pendant 30 sec. L'amplification était terminée par une élongation finale à 72°C pendant 5 min.

II.5.2.3 Hybridation

Après amplification, les produits de PCR ont été hybridés sur un jeu de 43 oligonucléotides de séquences uniques issues de souches de référence (37 séquences pour *M. tuberculosis* H37Rv, 6 pour *M. bovis* BCG). Ces oligonucléotides ont été déposés en lignes parallèles et liés de manière covalente sur une membrane biodyne C activée (Isogen, Pays bas) : 20 µL des produits de PCR ont été dilués dans 190 µL de tampon SSPE 2x 0,1% SDS dénaturés à 99°C pendant 15 min. La dénaturation était bloquée en déposant les tubes immédiatement sur un bloc de glace. Environ 160 µL de produits de PCR dilué étaient appliqués perpendiculairement aux lignes d'oligonucléotides avec un applicateur « miniblottter » de 45 lignes (Immunetic) à l'aide d'une micropipette.

Après hybridation à 60°C pendant 1 heure, le contenu de chaque canal était retiré par aspiration. La membrane était ensuite lavée 2 fois dans 250 mL de tampon SSPE 2x, 0,5% SDS sous agitation pendant 15 min à 60°C. Elle a ensuite été introduite dans un tube à hybridation et incubée pendant 45 min à 42°C en présence de 10 mL de tampon SSPE2X, 0,5% SDS contenant 4 µL de conjugué streptavidine peroxydase (Roche, Mannheim).

A l'issue de cette incubation, la membrane était lavée deux fois dans 50 mL de tampon SSPE2X, 0,5% SDS à 42°C pendant 10 min sous agitation. La membrane était ensuite enlevée du tube d'hybridation et lavée deux fois à température ambiante dans environ 250 mL de tampon SSPE 2x pendant 5 min sous agitation.

II.5.2.4 Détection

Le signal d'hybridation est révélé par électrochimiluminescence (Figure 23) (ECL detection kit, Amersham, Angleterre) en incubant la membrane 1 min dans 6 mL de liquide de détection. La membrane était ensuite placée dans un plastique et exposée à un film (GE healthcare) sensible à la lumière pendant 20 min. Le film était développé à l'aide d'un appareil KODAK X-OMAT M35.

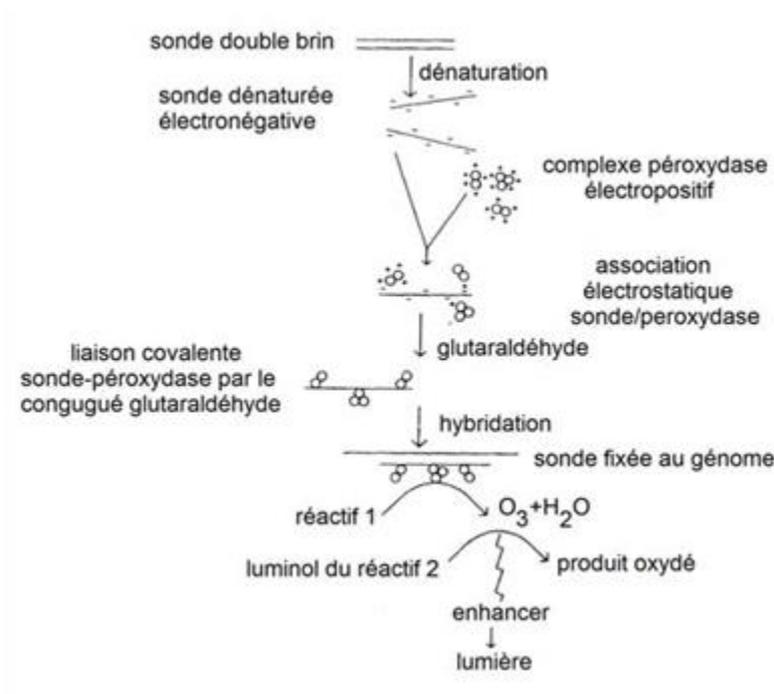
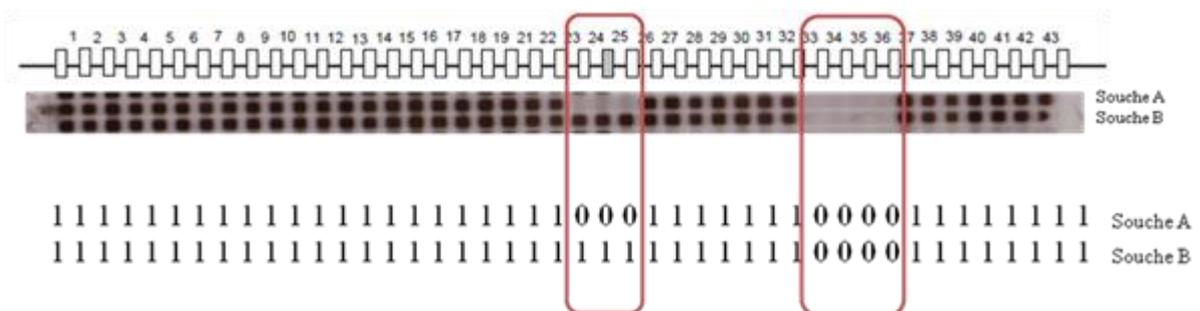


Figure 23 : Principe de détection par chimioluminescence (Amersham)

II.5.2.5 Analyse des résultats

Le signal d'hybridation sur le film se traduit par la présence d'un spot noir. La présence d'un spot noir (respectivement absence) indique la présence (respectivement absence) de l'espaceur correspondant. Ces données brutes ont été converties en un code binaire de 43 chiffres ; chaque souche était alors caractérisée par un numéro à 43 chiffres.



II.5.3 Typage MIRU-VNTR

II.5.3.1 Principe

Le séquençage complet du génome de *M. tuberculosis* H37Rv a permis de mettre en évidence certaines régions d'ADN (ou loci) contenant un nombre variable de régions répétées en tandem (VNTR). Le nombre de répétitions en tandem à chaque locus (ou copies) est variable d'une souche à l'autre (Supply et *al.*, 2000).

Chaque locus est amplifié par PCR, et les produits de PCR sont soumis à une électrophorèse qui permet de déterminer précisément le poids moléculaire des fragments dont on en déduit ensuite le nombre de copies de chaque VNTR.

Le calcul des poids moléculaires se fait par comparaison avec des marqueurs de poids moléculaire que l'on fait migrer en parallèle avec les échantillons à analyser et qui sont des mélanges de fragments d'ADN de poids connus. Après calcul du nombre de copies de chaque VNTR, on aboutit à un code chiffré représentatif du polymorphisme de la souche considérée sur les régions répétées en tandem.

La technique utilisée pour déterminer les types MIRUs est celle décrite par (Supply et *al.*, 2006) selon le nouveau schéma à 24 loci (MIRU24).

II.5.3.2 Amplification par PCR

Les 24 loci cibles ont été amplifiés par des réactions de PCR en multiplex à l'aide des amorces spécifiques fluorescentes (Tableau IV).

Au total, huit PCR multiplex permettent de déterminer le nombre de répétitions à chaque locus. Chaque PCR multiplex permet d'amplifier trois loci qui sont individualisés à l'aide d'une amorce marquée avec un fluorochrome de couleur différente FAM™, VIC®, NED™. Des contrôles négatifs (PCR réalisée en l'absence d'ADN) et positif (*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv) sont inclus dans chaque série.

Le mélange réactionnel a été préparé comme décrit à l'aide du kit de génotypage développé par Genoscreen (Lille, France). Deux microlitres d'ADN de la souche à tester ont été ajoutés à 8 µL de Mix PCR du multiplex correspondant pour un volume final de 10 µL. L'amplification était exécutée selon le programme suivant : une pré-dénaturation à 94°C pendant 15 minutes suivie de trois étapes pendant 30 cycles:

- Dénaturation à 94°C pendant 1 minute
- Hybridation à 59°C
- Élongation à 72°C pendant une 1 minute 30 secondes

Le dernier cycle était suivi d'une élongation terminale à 72°C pendant 10 minutes avant une étape terminale de conservation à 15°C pendant 24 heures.

Tableau IV : Amorces utilisées pour l'amplification des loci MIRU-VNTR (Supply et al., 2006)

Multiplex	Locus	Alias	Longueur d'une unité de répétition pb	Séquences de la paire d'amorce (5'→3')
Mix 1	580	MIRU 4	77	GCGCGAGAGCCCGAACTGC (FAM) GCGCAGCAGAAACGCCAGC
	2996	MIRU 26	51	TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC CATAGGCGACCAGGCGAATAG (VIC)
	802	MIRU 40	54	GGGTTGCTGGATGACAACGTGT (NED) GGGTGATCTCGGCGAAATCAGATA
Mix 2	960	MIRU 10	53	GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT (FAM)
	1644	MIRU 16	53	TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA CCCGTCGTGCAGCCCTGGTAC (VIC)
	3192	MIRU 31	53	ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA GTGCCGACGTGGTCTTGAT (NED)
Mix 3	424	42	51	CTTGCCGGCATCAAGCGCATTATT GGCAGCAGAGCCCGGGATTCTTC (FAM)
	577	43	58	CGAGAGTGGCAGTGGCGTTATCT (VIC) AATGACTTGAACGCGCAAATTGTGA
	2165	ETR A	75	AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT (NED) CGAAGCCTGGGGTGCCCGCGATTT
Mix 4	2401	47	58	CTTGAAGCCCCGGTCTCATCTGT (FAM) ACTTGAACCCCCACGCCATTAGTA
	3690	52	58	CGGTGGAGGCGATGAACGTCTTC (VIC) TAGAGCGGCACGGGGGAAAGCTTAG
	4156	53	59	TGACCACGGATTGCTCTAGT

				GCCGGCGTCCATGTT (NED)
Mix 5	2163b	QUB 11 b	69	CGTAAGGGGGATGCGGGAAATAGG CGAAGTGAATGGTGGCAT (FAM)
	1955		57	AGATCCCAGTTGTCGTCGTC (VIC) CAACATCGCCTGGTTCTGTA
	4052	QUB-26	111	AACGCTCAGCTGTCCGAT (NED) CGGCCGTGCCGGCCAGGTCCTTCCCGAT
Mix 6	154	MIRU 2	53	TGGA CTTCAGCAATGGACCAACT TACTCGGACGCCGGCTCAAAAT (FAM)
	2531	MIRU 23	53	CTGTGATGGCCGAACAAAACG (VIC) AGCTCAACGGGTTCCGCCCTTTTGTGTC
	4348	MIRU 39	53	CGCATCGACAAACTGGAGCCAAAC CGGAAACGTCTACGCCCCACACAT (NED)
Mix 7	2059	MIRU 20	77	TCGGAGAGATGCCCTTCGAGTTAG (FAM) GGAGACCGCGACCAGGTA CTCTGTA
	2687	MIRU 24	54	CGACCAAGATGTGCAGGAATACAT GGGCGAGTTGAGCTCACAGAA (VIC)
	3007	MIRU 27	53	TCGAAAGCCTCTGCGTGCCAGTAA GCGATGTGAGCGTGCCACTCAA (NED)
Mix 8	2347	46	57	GCCAGCCGCCGTGCATAAACCT (FAM) AGCCACCCGGTGTGCCTTGTATGAC
	2461	48	57	ATGGCCACCCGATACCGCTTCAGT (VIC) CGACGGGCCATCTTGGATCAGCTAC
	3171	49	54	GGTGCGCACCTGCTCCAGATAA (NED) GGCTCTCATTGCTGGAGGGTTGTAC

II.5.3.3 Principe de l'analyse automatisée

Après amplification, les amplicons de chaque PCR multiplex marqués avec les 3 fluorochromes FAM[™], VIC[®], NED[™] sont combinés avec un marqueur de taille interne marqué par un quatrième fluorochrome ROX[™]. Ils sont ensuite séparés en fonction de leur taille par électrophorèse capillaire (Figure 24).

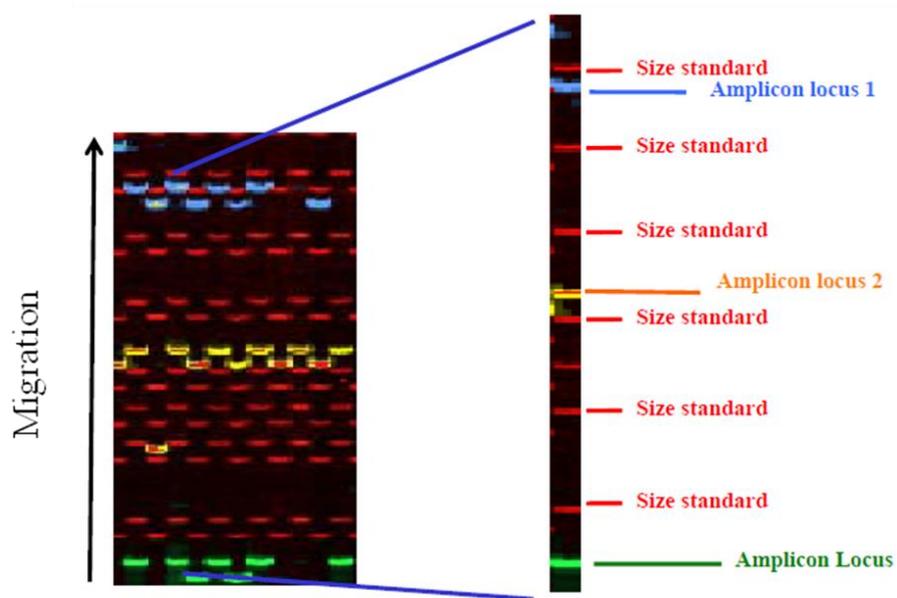


Figure 24 : Photographie de migration dans un canal capillaire (Supply et *al.*, 2006)

L'affectation des différents allèles était basée sur la taille correspondante attendue pour les 24 loci MIRU-VNTR. Les tailles des fragments de PCR ont été estimées en utilisant le logiciel Gene mapper. La précision de la détermination de la taille était contrôlée par l'analyse des fragments marqués amplifiés par PCR multiplex de *M. tuberculosis* H37Rv dont le nombre de répétitions était connu pour chaque locus (Figure 25).

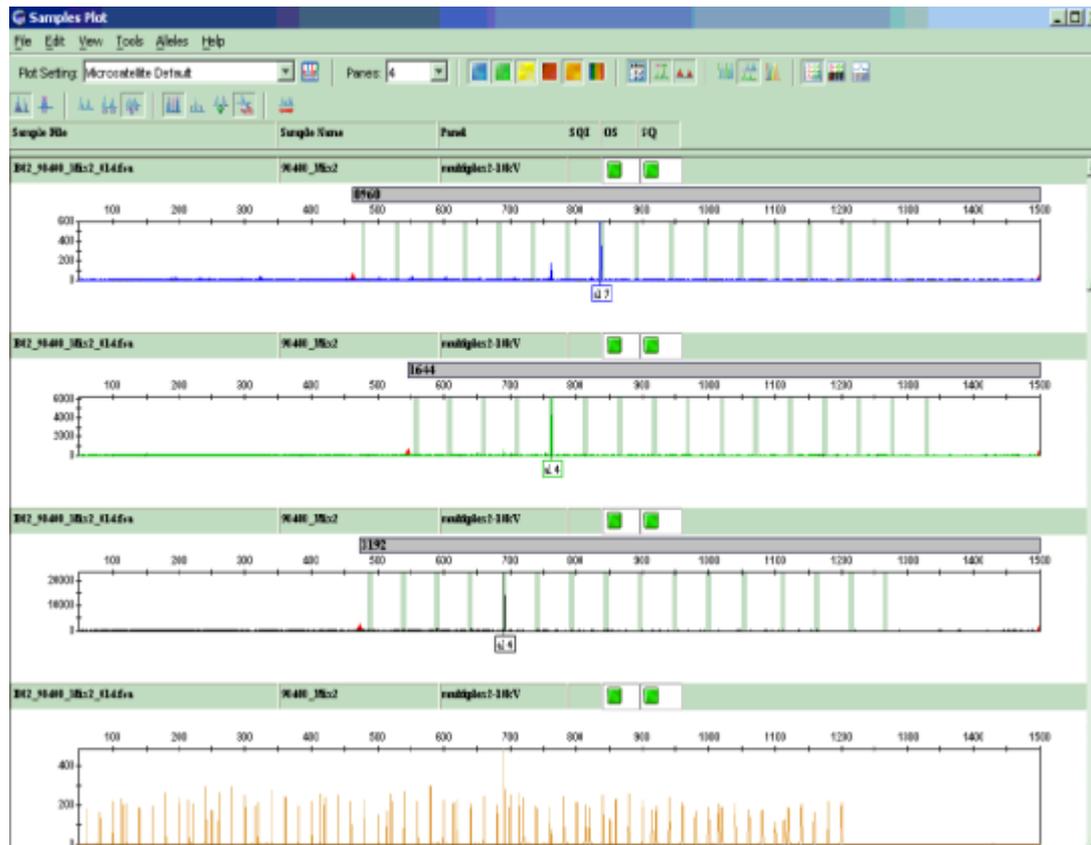


Figure 25 : Fenêtre d'affectation des différents allèles sur logiciel Gene Mapper

II.5.3.4 Procédure

Pour chaque PCR multiplex, 1 μ L de produit de PCR dilué 5 fois dans de l'eau distillée était ajouté à 10 μ L de Formamide Hi Di (Applied Biosystems) et 0,2 μ L de Mapmarker 1000 ROX™ (Bioventures, USA). Les échantillons étaient dénaturés à 95°C pendant 5 min puis conservés sur de la glace. Les fragments d'ADN marqués étaient ensuite séparés en fonction de leur taille par électrophorèse capillaire sur séquenceur à ADN ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), et leur fluorescence respective était analysée lors de leur passage devant le détecteur du séquenceur. L'ordinateur fournissait ensuite les résultats sous forme d'un chromatogramme.

Les tailles des fragments de PCR et le nombre de répétitions pour chaque locus étaient estimées en utilisant le logiciel Gene mapper. On obtenait à un code à 24 chiffres représentatif du polymorphisme de la souche considérée sur les régions répétées en tandem (Figure 26).

ID	580	2996	802	960	1644	3192	424	577	2165	2401	3690	4156	2163b	1955	4052	154	2531	4348	2059	3007	2687	2347	2461	3171
001_ca	2	5	3	4	3	3	2	5	3	2	6	2	3	3	4	2	5	2	1	3	1	4	2	3
002_ca	2	5	1	3	1	3	1	4	2	1	2	2	2	3	4	2	6	2	2	3	1	5	2	3
003_ca	2	5	2	3	4	2	2	4	2	2	3	2	3	2	5	2	5	2	2	3	1	4	2	3
004_ca	2	5	4	3	2	3	2	4	3	2	11	2	3	3	5	2	5	2	1	3	1	4	2	3
005_ca	2	4	3	3	3	3	2	3	2	2	3	2	3	3	5	2	5	2	2	3	1	4	2	3
008_ca	2	5	2	5	3	3	2	3	3	4	3	3	3	3	5	2	5	2	2	3	1	3	2	3
009_ca	2	5	1	3	3	3	2	4	4	2	3	2	5	3	3	2	5	2	1	3	1	4	2	3
013_ca	2	5	2	3	4	2	2	4	2	2	3	2	3	2	5	2	5	2	2	3	1	4	2	3
017_ca	2	5	1	3	3	3	2	4	4	2	18	2	5	3	5	2	5	2	1	3	1	4	2	3
018_ca	2	5	3	3	3	3	2	4	3	2	12	2	5	3	5	2	5	2	1	3	1	4	2	3
019_ca	2	5	3	3	4	3	2	5	3	2	9	2	1	3	3	2	5	2	2	3	1	4	2	3
020_ca	2	5	3	3	3	3	2	4	2	2	9	2	6	3	4	2	5	2	1	5	1	4	2	3
021_ca	2	5	3	3	2	3	2	4	3	2	10	2	4	3	5	2	5	2	1	3	1	4	2	3
022_ca	2	5	4	3	2	3	2	4	3	2	11	2	3	3	5	2	5	2	1	3	1	4	2	3
023_ca	2	5	1	2	3	3	2	4	4	2	2	2	5	3	5	2	5	2	1	3	1	4	2	3
024_ca	2	1	3	5	3	3	4	3	3	4	3	3	2	2	4	2	5	2	2	3	1	4	2	3
025_ca	2	5	4	3	2	3	2	4	3	2	9	2	3	3	5	2	5	2	1	3	1	4	2	3
026_ca	2	5	3	3	3	3	2	4	4	2	10	2	4	3	4	2	5	2	1	3	1	4	2	3

Figure 26: Allèles des 24 loci MIRU-VNTR obtenus pour 18 souches

II.5.4 Analyse des résultats de typage

Les profils de spoligotypage en format binaire et les profils MIRU-VNTR étaient entrés dans une feuille de calcul Excel et comparés aux profils présents dans la base de données SpoIDB4 (Brudey et al., 2006) à travers l'application web MIRUVNTR plus (Allix-Beguec et al., 2008). L'identification était faite en 2 étapes ; les souches étaient premièrement attribuées à une famille génétique selon une approche basée sur la meilleure correspondance avec les souches de référence, le « cut off » était fixé à 0,17 ; ensuite on procédait à une identification basée sur le dendrogramme généré à l'aide des résultats combinés spoligotypage-typage MIRU. Cette identification était confirmée sur les « Minmum Spanning Tree ».

La diversité allélique (h) pour un locus MIRU-VNTR donné a été calculée selon la formule $1 - \sum x_i^2 [n/n - 1]$ où x_i est la fréquence de l'allèle i dans le locus et n le nombre de souches présentant la variante allélique i et les loci ont été classés selon les critères définis par Supply et al., 2006.

L'index discriminatoire de Hunter Gaston (HGDI) (Hunter and Gaston, 1988) a été utilisé pour évaluer le pouvoir discriminatoire de chaque méthode de génotypage

$$HGDI = 1 - \left[\frac{1}{n(n-1)} \sum_{j=1}^s n_j(n_j - 1) \right]$$

où n est le nombre total de souches, n_j le nombre de souches présentant le j^e profil et s le nombre total de profils identifiés.

Les cas s'étant révélés porteurs de la même souche (spoligotypes et profils MIRU-VNTR identiques), donc potentiellement issus d'une même source de contamination, sont appelés « cas en grappe », et l'ensemble des souches ayant un profil génétique identique définit une grappe, ou « cluster ». Ces grappes définissent une chaîne infectieuse potentielle.

L'index de transmission récente a été calculé selon la formule $(T_c - N_c / T_a) * 100\%$ où T_c est le nombre de souches en grappes, N_c le nombre de grappes et T_a le nombre total de souches.

Les dendrogrammes ont été générés selon la méthode *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean* (UPGMA) et les « Minimum Spanning Tree (MST) » ont été générés à l'aide du logiciel Ridom MLVA (Ridom GmbH, Allemagne).

L'analyse par régression logistique a été utilisée pour identifier les facteurs associés à la formation des grappes. La comparaison de la distribution des familles génétiques selon les caractéristiques des patients a été réalisée par le test exact de Fisher. Les associations étaient considérées significatives pour des p valeurs inférieures à 5%. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R version 2.15.3

II.6 CARACTERISATION DES MUTATIONS ASSOCIEES A LA RESISTANCE A L'ISONIAZIDE, LA RIFAMPICINE ET LA STREPTOMYCINE ET ANALYSE DES LIENS GENETIQUES ENTRE LES SOUCHES RESISTANTES

II.6.1 Choix des gènes de résistance à séquencer

II.6.1.1 Résistance à la rifampicine

Le mécanisme génétique à l'origine de la résistance à la rifampicine a été caractérisé à travers le séquençage du gène *rpoB*. C'est un gène de 3519 paires de bases codant pour une protéine de 1172 acides aminés. Cette protéine catalyse la transcription de l'ADN en ARN. Le gène *rpoB* est localisé entre 759807-763325 kb (GenBank NC_000962.2) du génome de la souche de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

Les altérations génétiques associées à une résistance à la rifampicine sont localisées dans une région centrale de 81 paires de bases appelée région déterminant la résistance à la rifampicine ou RRDR « Rifampicine Resistance Determining Region ».

Cette région a été amplifiée à l'aide de 2 amorces spécifiques dont la localisation est donnée dans le Tableau V.

Tableau V : Amorces utilisées pour la résistance à la rifampicine

Loci	<i>rpoB-F</i>	<i>rpoB-R</i>
Oligonucléotides	5'-TCGCCGCGATCAAGGAGT-3'	5'-GTGCACGTCGCGGACCTCCA-3'
Localisation (kb)	761059-761075	761197-761216
GenBank accession number	L27989	
Référence	(Homolka et al., 2010)	

II.6.1.2 Résistance à l'isoniazide

Trois gènes ont été choisis pour la caractérisation des mutations responsables de la résistance à l'isoniazide. Ces gènes ont été choisis sur la base de leur implication dans les mécanismes moléculaires de résistance à l'isoniazide tel que relevé dans de nombreuses publications (Ramaswamy and Musser, 1998, Zhang et al., 1992).

II.6.1.2.1 Le gène *katG*

C'est un gène codant pour une catalase-péroxydase-peroxynitrase. Il est localisé entre 2153889-2156111 kb du génome de la souche de référence *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (GenBank NC_000962.2). Des délétions, mutations ponctuelles de ce gène sont à l'origine d'une résistance à l'isoniazide (Zhang and Yew, 2009). Parmi ces mutations, une affectant particulièrement le codon 315 explique la majorité des résistances à l'isoniazide chez les souches du complexe *M. tuberculosis*. Une portion de ce gène couvrant le codon 315 a été amplifiée à partir d'une paire d'amorces spécifiques (Tableau VI).

Tableau VI : Amorces du gène *katG* utilisées pour la résistance à l'isoniazide

Loci	<i>katG-F</i>	<i>katG-R</i>
Oligonucléotides	5'-TCGCCGCGATCAAGGAGT-3'	5'-GTGCACGTCGCGGACCTCCA-3'
Localisation (kb)	2155331-2155312	2155122-2155141
GenBank accession number	X68081	
Référence	(Homolka et al., 2010)	

La séquence complète du cadre de lecture du gène *katG* a été amplifiée pour 4 souches n'ayant pas présenté de mutations dans la région couvrant le codon 315 à l'aide de 3 couples d'amorces (Tableau VII).

Tableau VII : Amorces utilisées pour l'amplification complète du gène *katG*

Loci	Oligonucléotides	Référence
<i>katG1-F</i>	5'- CACCAACTCCTGGAAGGAATGC-3'	(Lipin et al., 2007)
<i>katG1-R</i>	5'- CATCTGCTCCAGCGGAGCAG-3'	
<i>katG2-F</i>	5'-CGGTCACACTTTCGGTAAGACC-3'	
<i>katG2-R</i>	5'-CCACCGAGCACGACGAGGTC-3'	
<i>katG3-F</i>	5'-CATTGCGACCCTGGAAGAGATC -3'	
<i>katG3-R</i>	5'-CAACCCGAATCAGCGCACGTC-3'	

II.6.1.2.2 Le gène *inhA*

Le gène *inhA* code pour une enoylACP réductase de 1052 paires de bases, enzyme qui catalyse une étape clé de la synthèse des acides mycoliques. Son rôle déterminant dans la synthèse des acides mycoliques justifierait son implication dans la résistance à l'isoniazide de certains isolats du complexe *Mycobacterium tuberculosis*. Des mutations ponctuelles dans la région promotrice de ce gène seraient responsables d'une résistance à l'isoniazide. Cette région a été amplifiée à l'aide d'un couple d'amorces (Tableau VIII).

Tableau VIII : Amorces de la région promotrice du gène *inhA* utilisées pour la résistance à l'isoniazide

Loci	<i>fabG1-inhA-F</i>	<i>fabG1-inhA-R</i>
Oligonucléotides	5'-TCGCCGCGATCAAGGAGT-3'	5'-GTGCACGTCGCGGACCTCCA-3'
Localisation (kb)	1673272-1673291	1673519-1673500
GenBank accession number	U66801	
Référence	(Homolka et al., 2010)	

II.6.1.2.3 Le gène *ahpC*

Chez la souche de référence *M. tuberculosis* H37Rv, le gène *ahpC* est localisé entre 2726193 et 2726780 kb (GenBank NC_000962.2). Il code pour une réductase alkyle hydroperoxydase de 195 acides aminés impliquée dans la résistance à l'oxygène réactif et aux intermédiaires d'azote réactif. Des mutations dans la région promotrice de *ahpC* ont été proposées comme marqueurs de substitution pour la détection de la résistance à l'isoniazide (Kiepiela et al., 2000). Cette région de régulation a été amplifiée à l'aide d'un couple d'amorces (Tableau IX).

Tableau IX : Amorces de la région promotrice du gène *ahpC* utilisées pour la résistance à l'isoniazide

Loci	<i>ahpC-F</i>	<i>ahpC-R</i>
Oligonucléotides	5'-ACCACTGCTTTGCCGCCACC-3'	5'-CCGATGAGAGCGGTGAGCTG-3'
Localisation (kb)	2726015-2726034	2726232-2726251
GenBank accession number	U16243	
Référence	(Homolka et al., 2010)	

II.6.1.3 Résistance à la streptomycine

II.6.1.3.1 Le gène *rpsL*

Le gène *rpsL* code pour une protéine ribosomale S12 de 124 acides aminés, impliquée dans l'étape d'initiation du processus de traduction. Dans le génome de la souche de référence *M. tuberculosis* H37Rv, le gène *rpsL* est localisé entre 781560 et 781934 kb (GenBank NC_000962.2). La plupart des isolats cliniques résistants à la streptomycine présentent des mutations ponctuelles au niveau de ce gène (Sreevatsan et al., 1996). Le gène a été amplifié à l'aide du couple d'amorces présenté dans le Tableau X.

Tableau X : Amorces du gène *rpsL* utilisées pour la résistance à la streptomycine

Loci	<i>rpsL-F</i>	<i>rpsL-R</i>
Oligonucléotides	5'- GGCCGACAAACAGAACGT -3'	5'- GTTCACCAACTGGGTGAC -3'
GenBank accession number	L08011	
Référence	(Sreevatsan et al., 1996)	

II.6.1.3.2 Le gène *rrs*

Il s'agit d'un gène de 1537 pb qui code pour l'ARN ribosomal. La streptomycine exerce son action en se fixant sur l'ARN ribosomal 16S, interférant ainsi avec le processus de translation et inhibant la synthèse protéique. Il a été montré que des mutations ponctuelles au niveau des boucles 530 et 912 du gène *rrs* pourraient conférer une résistance à la streptomycine (Sreevatsan et al., 1996). Le gène a été amplifié à l'aide du couple d'amorces présenté dans le Tableau XI.

Tableau XI : Amorces des boucles 530 et 912 du gène *rrs* utilisées pour la résistance à la streptomycine

Loci	<i>rrs530</i>	<i>rrs912</i>
Oligonucléotides <i>Forward</i>	5'-GATGACGGCCTTCGGGTTGT-3'	5'- GTAGTCCACGCCGTAACGG -3'
Oligonucléotides <i>Reverse</i>	5'- TCTAGTCTGCCCGTATCGCC -3'	5'- AGGCCACAAGGGAACGCCTA -3'
GenBank accession number	X52917	
Référence	(Brzostek et al., 2004)	

II.6.2 Amplification par PCR des gènes cibles

La PCR est une méthode qui permet l'amplification enzymatique ciblée des fragments d'ADN. Le kit de PCR utilisé était celui produit par Qiagen (Allemagne). Les amorces ont été synthétisées par le laboratoire TIB MolBio (Allemagne). Afin d'optimiser les conditions de PCR et de les adapter aux conditions de laboratoire, des PCR « touchdown » ont été réalisées. Il s'agissait de faire varier les conditions d'amplification (température d'hybridation) (Tableau XII) et la composition du mélange réactionnel (concentration de magnésium, utilisation d'additifs comme la solution Q, le DMSO) (Tableau XIII) afin de retenir les conditions optimales d'amplification.

Tableau XII : Température d'hybridation et taille des fragments attendue pour chaque gène cible

Loci	Température d'hybridation	Taille du fragment attendue (pb)
<i>katG</i>	66°C	210
<i>fabG1-inhA</i>	64°C	248
<i>ahpC</i>	65°C	237
<i>rpoB</i>	62°C	158
<i>rrs530</i>	62°C	238
<i>rrs912</i>	62°C	240
<i>rpsL</i>	58°C	375

II.6.2.1 Mélange réactionnel

Le mélange réactionnel a été réalisé tel que présenté dans le Tableau XIII.

Tableau XIII : Mélange réactionnel utilisé pour l'amplification des gènes cibles

Composantes	Volume par réaction (µL)	Concentration finale
Eau distillée stérile	8,9	
Tampon de PCR 10X	2	1X
Amorce « sens »	1	20 pmol
Amorce « anti-sens »	1	20 pmol
MgCl ₂ 25mM	0,5	0,75 mM
dNTPs	0,4	200 µM
Taq polymerase	0,2	0,5 U/µL
Volume du mix	15	

Quinze µL de mélange réactionnel ont été introduits dans chaque tube de PCR (0,5 mL) auxquels on y a ajouté 5 µL de lysat mycobactérien (≈ 10 ng).

II.6.2.2 Amplification

Après homogénéisation et centrifugation, les tubes ont été placés dans un thermocycleur (PCT-100, MJ Research.Inc), le programme d'amplification a été exécuté selon trois étapes pendant 35 cycles:

- Dénaturation à 94°C pendant 5 minutes
- Hybridation à X°C (suivant la température d'hybridation de chaque couple d'amorces) pendant une minute
- Élongation à 72°C pendant une minute

Le dernier cycle a été suivi d'une élongation terminale à 72°C pendant 10 minutes avant une étape terminale de conservation à 15°C pendant 24 heures. Les produits amplifiés ont fait l'objet d'une électrophorèse sur gel d'agarose 1%.

II.6.2.3 Électrophorèse sur gel d'agarose

- **Préparation du gel (moulage)**

Une solution d'agarose à 1% (Agarose Ultra-pure, Gibco BRL) a été préparée dans du TBE 1X, chauffée jusqu'à dissolution complète puis refroidie à 60°C. L'agarose a ensuite été coulée dans un moule monté sur cassette munie d'un peigne à 30 cupules. Après polymérisation, le gel a été immergé dans une solution de TBE 1X.

- **Dépôt des échantillons**

Un volume de 5 µL du tampon de chargement (SYB Green, glycérol et H₂O) a été additionné à 5 µL de chaque produit d'amplification. Ensuite, les marqueurs de poids moléculaires ont été déposés dans les puits extérieurs du gel.

- **Migration**

La migration a été réalisée au moyen d'un générateur de courant sous un voltage de 120 Volts pendant 45 minutes.

- **Visualisation**

Le gel a été visualisé à l'aide d'un trans-illuminateur à UV et photographié à l'aide d'un appareil Canon.

II.6.3 Purification des produits de PCR

Pour obtenir des chromatogrammes de bonne qualité, il est important d'éliminer les dNTPs et les amorces en excès qui n'ont pas été incorporés durant l'amplification avant la réaction de séquençage. La purification a été effectuée au moyen du kit Nucleospin Extract II (Macherey Nagel, Allemagne) (Figure 27).

II.6.3.1 Principe

Le principe repose sur la fixation de l'ADN sur une membrane de silice en présence des sels chaotropiques apportés par un tampon de fixation. Le mélange est chargé sur une colonne, les agents contaminants tels que les sels solubles et les composants macromoléculaires sont éliminés par une étape de lavage simple avec de l'éthanol. L'ADN pur est élué dans des conditions de faible stringence grâce à un tampon d'éluion légèrement alcalin (Tris/HCl 5 mM, pH 8,5).

II.6.3.2 Procédure

<p>Ajustement des conditions de fixation de l'ADN</p>	<p>Mélanger 1 volume d'échantillon avec 2 volumes de tampon de fixation</p>	 <p>+ 2 vol de tampon NT par volume d'échantillon</p>
<p>Fixation de l'ADN sur une membrane de silice</p>	<p>Placer une colonne Nucleospin Extract dans un tube collecteur (2 mL) et charger l'échantillon. Centrifuger à 11 000 x g pendant 1 min, éliminer le liquide collecté et replacer la colonne dans le tube collecteur</p>	 <p>Charger l'échantillon</p>  <p>11 000 x g 1 min</p>
<p>Laver la membrane de silice</p>	<p>Ajouter 700 µL de tampon de lavage NT3 dans la colonne et centrifuger à 11 000 x g pendant 1 min. Éliminer le liquide et replacer de nouveau la colonne dans le tube collecteur</p>	 <p>+ 700 µL tampon NT3</p>  <p>11 000 x g 1 min</p>
<p>Sécher la membrane de silice</p>	<p>Centrifuger à 11 000 x g pendant 2 min afin d'enlever complètement les résidus d'éthanol en s'assurant que la colonne ne rentre pas en contact avec le liquide du tube collecteur</p>	 <p>11 000 x g 2 min</p> 
<p>Eluer l'ADN</p>	<p>Placer la colonne Nucleospin Extract II dans un nouveau microtube à centrifuger (1,5 mL) et ajouter 20 µL de tampon d'éluion. Incuber à température ambiante pendant 1 min et centrifuger à 11 000 x g pendant 1 min</p>	 <p>+ 20 µL tampon NE</p> <p>RT 1 min</p>  <p>11 000 x g 1 min</p>

Figure 27 : Procédure de purification des produits de PCR (Macherey Nagel)

II.6.4 Séquençage des gènes cibles

Les différents gènes étudiés ont été séquencés dans les 2 directions (« sens » et « anti-sens») afin d'assurer une couverture maximale de la séquence du gène étudié et la reproductibilité des résultats. Les réactions de séquençage ont été réalisées sur les produits d'amplification de PCR avec les mêmes amorces que celles utilisées pour l'amplification. Le séquençage a été assuré au moyen du kit de séquençage « Big Dye Terminator » (PE Applied Biosystems). Les produits d'amplification ont été analysés sur un séquenceur de modèle ABI 3100 (Applied Biosystems).

II.6.4.1 Principe

Brièvement, une amplification PCR de la région à étudier est réalisée en présence des 4 désoxynucléotides habituels (dATP, dTTP, dGTP et dCTP) ainsi que de 4 didéoxynucléotides (ddATP, ddTTP, ddGTP et ddCTP) associés chacun à un fluorophore spécifique. Lorsque la polymérase, qui allonge l'amorce, insère un didéoxynucléotide, l'élongation est bloquée. Cette amplification linéaire et le hasard de l'incorporation des didéoxynucléotides font que l'on obtienne une série de fragments marqués par un fluorophore en position terminale (Figure 28).

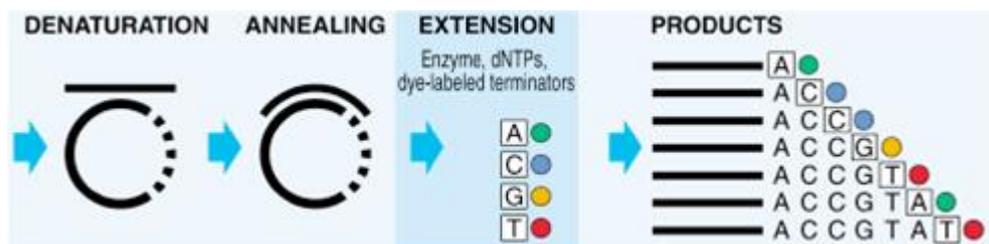


Figure 28 : Cycle de séquençage big dye terminator (Applied Biosystems)

Les fragments d'ADN marqués sont séparés en fonction de leur taille par électrophorèse capillaire et leur fluorescence respective est analysée lors de leur passage devant le détecteur du séquenceur. L'ordinateur fournit ensuite les résultats sous forme d'un chromatogramme (Figure 29) et d'un fichier texte qui sont analysés plus tard.

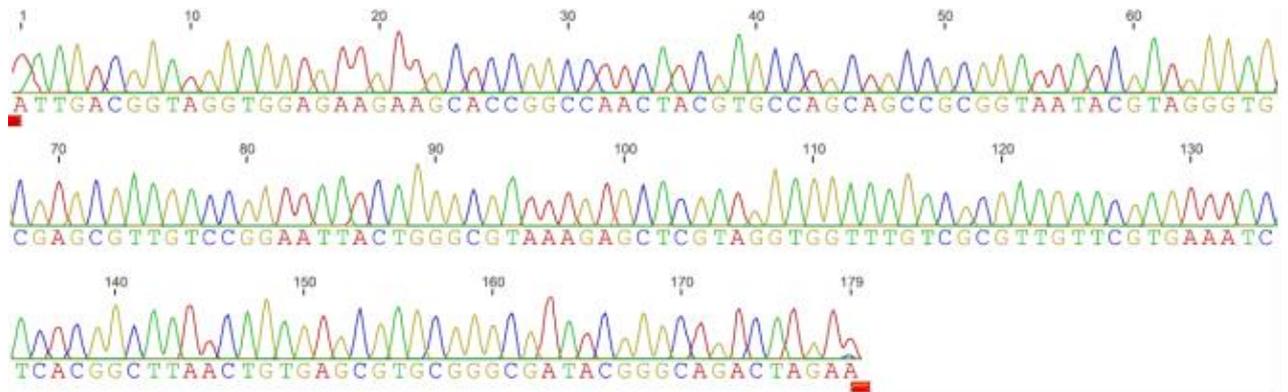


Figure 29 : Exemple d'un chromatogramme

II.6.4.2 Procédure

La quantité de produit de PCR utilisée pour le séquençage a un impact significatif sur les données de séquençage. De faibles quantités d'ADN réduisent la puissance du signal et donc la hauteur des pics des produits de réaction qui pourrait conduire à des erreurs dans la séquence en bases. Lorsque la quantité d'ADN est importante, celle-ci se comporte comme des protéines et s'accumulent dans les capillaires affectant la résolution des données.

Les quantités de produits de PCR recommandées par Applied Biosystems pour une réaction de séquençage Big Dye sont les suivantes :

- 1-3 ng de produits 100 - 200 pb;
- 3-10 ng de produits 200 - 500 pb;
- 5-20 ng de produits 500 - 1000 pb;
- 10-40 ng de produits 1000 - 2000 pb.

Le milieu réactionnel était composé de 10 ng d'ADN à séquencer, de 1 μ L de « Big dye terminator » (Applied Biosystems), de 2 μ L de tampon de séquençage 5x et de 5 pmol d'amorces dans un volume final de 10 μ L.

L'élongation des amorces s'est effectuée dans un thermocycleur selon le programme suivant :

- 2 min à 96°C
- 30 secs à 96°C
- 15 secs à 50°C
- 4 min à 60°C
- ∞ 15°C

II.6.5 Purification des produits d'extension

La qualité d'ADN utilisée pour la réaction de séquençage est déterminante pour la qualité des séquences produites. Il est important d'éviter les sels résiduels, les protéines, les détergents qui sont susceptibles d'interférer avec l'injection électrocinétique et l'électrophorèse capillaire.

Les produits d'extension ont été purifiés par gel filtration sur colonne de séphadex G50. La résine Sephadex® G50 utilisée permet de dé-saler les échantillons et d'éliminer les nucléotides non incorporés et les amorces de PCR en excès. La limite d'exclusion de la résine G50 est d'environ 20 bases.

II.6.5.1 Principe

La gel filtration permet le piégeage des particules de faible poids moléculaire sur une colonne de Sephadex G50 constituée de billes perforées dont les trous ont un diamètre compris entre 20 et 50 μm . Les petites particules de diamètre inférieur sont piégées. A l'inverse, les grosses particules vont passer autour et seront éluées plus rapidement.

II.6.5.2 Procédure

La résine Sephadex® G50 a été préparée en ajoutant 2,2 g de Sephadex illustra (GE healthcare, Allemagne) à 33 mL d'eau désionisée. La préparation a été incubée à température ambiante sous agitation régulière pendant 30 minutes. Environ 300 μL ont été déposés au fond de chaque puits et les colonnes ont été centrifugées à 3000 rpm pendant 3 min afin d'éliminer l'eau et de compacter les colonnes. Dix microlitres de produits d'extension ont été déposés délicatement au centre des colonnes de résine et centrifugés à 3000 rpm pendant 3 min. Les produits purifiés ont été récupérés dans des microtubes à centrifuger. Les cylindres secs étaient jetés et les colonnes rincées avec de l'eau ultra-pure pour une réutilisation ultérieure.

II.6.6 Electrophorèse capillaire

Les fragments d'ADN marqués par fluorescence sont séparés par électrophorèse capillaire sur un modèle ABI 3100. Brièvement, 1 µL de produit de PCR a été dilué 50 fois dans de l'eau distillée. Puis, on y a ajouté 10 µL de HiDi formamide et les échantillons ont été dénaturés à 95°C pendant 5 min et refroidis sur un bloc de glace. Après centrifugation, la microplaque de 96 puits était placée dans un dispositif appelé *autosampler* qui permettait de la maintenir fixe. Ce dispositif déplace successivement chaque échantillon pour le mettre en contact avec l'électrode de la cathode à une extrémité d'un capillaire rempli de polymère de séparation. L'anode située à l'autre bout du capillaire plonge dans un tampon. L'échantillon qui pénètre dans un capillaire se déplace de la cathode vers l'anode. Lorsque le fragment d'ADN atteint la fenêtre de détection, le marqueur fluorescent est excité par un laser et la fluorescence émise est captée par une caméra à une longueur d'onde donnée et stockée sous forme de signaux digitaux dans un ordinateur. Une application permet d'analyser ces données et de produire un chromatogramme.

II.6.7 Analyse des séquences d'acides nucléiques

L'analyse des séquences obtenues après séquençage a été réalisée par comparaison des séquences obtenues avec celles publiées dans les bases de données. La commande *Contig Express* de l'application Vector NTI (Invitrogen) a permis de comparer les séquences étudiées avec la séquence connue du génome de *M. tuberculosis* H37Rv (Cole et al., 1998).

Les alignements de séquences permettent la mise en évidence d'éventuelles différences de nucléotides, c'est-à-dire la présence de mutations (Figure 30).

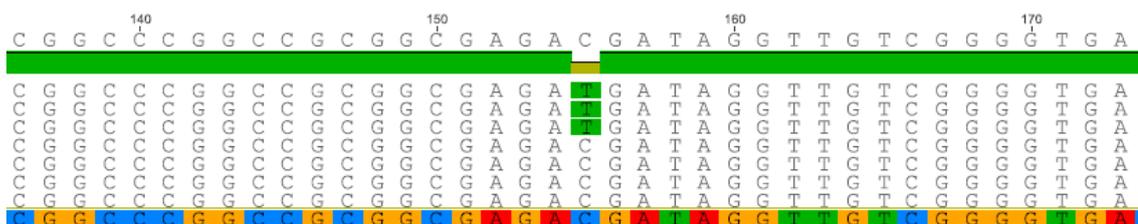


Figure 30: Exemple de mutations sur le gène *inhA*

III.1 ANALYSE PHENOTYPIQUE DES ISOLATS DU COMPLEXE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

III.1.1 Caractéristiques sociodémographiques de la population d'étude

Les caractéristiques sociodémographiques de la population d'étude sont présentées dans le Tableau XIV. Au total, 344 crachats à microscopie positive ont été inclus dans l'étude, dont 325 (94,4%) provenant de l'hôpital Jamot et 19 (5,6%) de l'hôpital de District de Mbalmayo. Les patients de genre masculin représentaient 54,9% contre 45,1% pour les patients de genre féminin.

L'âge moyen des patients inclus dans cette étude était de 33,94 [IQ 25-40] ans. Plus de 80% de ces patients étaient âgés entre 15 et 45 ans avec la tranche d'âge de 25-35 ans étant la plus représentée avec 33,7% des patients. La population d'étude était majoritairement célibataire avec 65,1% de cas. Les patients veufs et divorcés quant à eux représentaient respectivement 0,9% et 6,7%. Cent quatre-vingt-seize (57%) patients ont affirmé avoir un niveau d'études secondaire. Seul 4,4% de la population d'étude avait un niveau d'études supérieur tandis que 5,2% ont déclaré être des illettrés.

Tableau XIV: Caractéristiques sociodémographiques de la population d'étude

Caractéristiques	Effectif	%
Origine du prélèvement		
Hôpital Jamot	325	94,4
Hôpital de District de Mbalmayo	19	5,6
Moyenne [IQ] années	33,94 [IQ 25-40] ans	
Age (années)		
15-24	83	24,1
25-34	116	33,7
35-44	82	23,8
45-54	37	10,8
55-64	15	4,4
65-74	9	2,6
75-85	2	0,6
Genre		
Féminin	155	45,1
Masculin	189	54,9
Statut marital		
Divorcé	3	0,9
Marié	94	27,3
Célibataire	224	65,1
Veuf	23	6,7
Niveau d'études		
Illettré	18	5,2
Primaire	115	33,4
Secondaire	196	57,0
Supérieur	15	4,4
Lieu de résidence		
Rural	54	15,7
Urbain	290	84,3
Séjour en prison		
Non	322	93,6
Oui	22	6,4

III.1.2 Caractéristiques cliniques de la population d'étude

Au total, 300 (87,2%) patients étaient des nouveaux cas tandis que 40 (11,6%) étaient des cas antérieurement traités. Les données sur le traitement antérieur étaient indisponibles pour 4 patients. Sur l'ensemble des 344 participants, 340 (98,3%) ont consenti au test de sérologie VIH. Le taux de co-infection TB-VIH observé était de 29,1% (IC95 [24,4%-34,1%]) (Tableau XV).

Tableau XV : Caractéristiques cliniques de la population d'étude

Caractéristiques	Effectif	%
Traitement TB antérieur		
Nouveaux cas	300	87,2
Cas antérieurement traités	40	11,6
Données non disponibles	4	1,2
Sérologie VIH (n=340)		
Négative	241	70,9
Positive	99	29,1

On a noté que la co-infection TB-VIH était significativement associée avec l'âge et le genre. Les femmes étaient plus susceptibles d'être coinfectées par le VIH et la tuberculose (RC=2,85 IC95 [1,52-3,95]). De même, les patients tuberculeux âgés de 25-35 ans (RC= 3,36 IC95 [1,60-7,06]) et ceux âgés de 35-44 ans (RC= 5,43 IC95 [2,51-11,73]) avaient une tendance plus élevée à être infectés par le VIH que ceux âgés de moins de 25 ans (Tableau XVI).

Tableau XVI : Association entre la co-infection TB-VIH, l'âge, le genre et le statut marital

	N=340	Cas de co-infection TB-VIH		RC [IC95%]	p-valeur
		N=99	%		
Selon l'âge (années)					<0,001
25-34	114	39	34,2	3,36 [1,60-7,06]	
35-44	81	37	45,7	5,43 [2,51-11,73]	
> 45	63	12	19,0	1,52 [0,62-3,71]	
15-24	82	11	13,4	Réf	
Selon le genre					
Féminin	153	60	39,2	2,45 [1,52-3,95]	<0,001
Masculin	187	39	20,9	Réf	
Selon le statut marital					0,14
Célibataire	221	63	28,5	1,15 [0,66-1,98]	
Veuf/Divorcé	26	12	46,2	2,46 [1,00-6,06]	
Marié	93	24	25,8	Réf	

III.1.3 Culture et identification des isolats

Après culture sur milieu Löwenstein Jensen de l'ensemble des 344 crachats à microscopie positive, les colonies de mycobactéries n'ont pu être observées que pour 315 (91,5%) cultures. Parmi ces 315 cultures, l'identification au PNB et à la kanamycine a permis de confirmer l'appartenance de 311 isolats au complexe *Mycobacterium tuberculosis* et 4 mycobactéries atypiques.

III.1.4 Fréquence de résistance aux antituberculeux

Les tests de sensibilité aux antituberculeux ont donné des résultats exploitables pour 308 des 311 isolats du complexe *tuberculosis*. Il ressortait de ces résultats que 29 (9,4% ; IC95 [6,5%-13,1%]) isolats étaient résistants à au moins un antituberculeux testé. La résistance était observée plus fréquemment avec l'isoniazide (6,81%), suivie de la streptomycine (2,92%), de la rifampicine (1,62%) et de la kanamycine (0,32%) (Figure 31). Aucune résistance n'a été observée vis-à-vis de l'éthambutol et de l'ofloxacine.

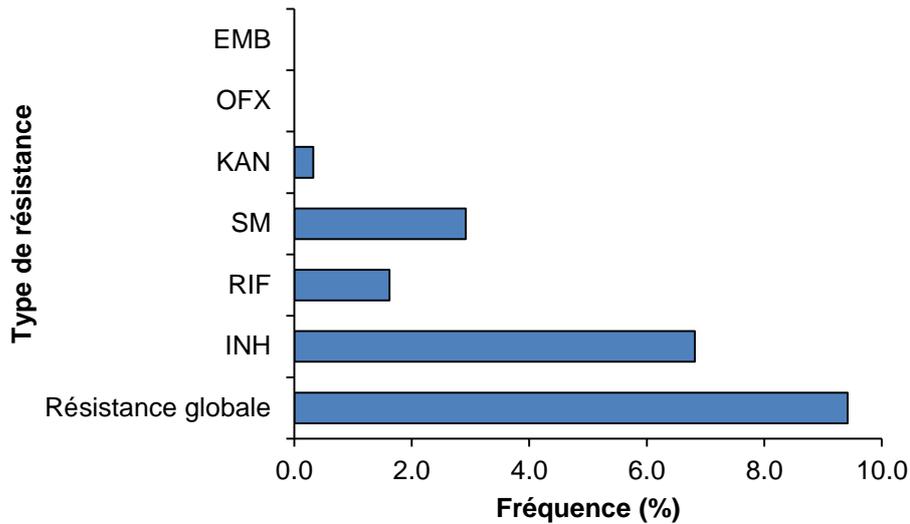


Figure 31 : Fréquences de résistance aux antituberculeux

Les résistances observées étaient présentes aussi bien chez les nouveaux cas que chez les cas déjà traités (Tableau XVII).

Chez les nouveaux cas, la résistance globale représentait 8,4%. Elle était observée plus fréquemment avec l'isoniazide (6,2%) suivie par la streptomycine (2,6%). Parmi les cas antérieurement traités, 17,1% étaient résistants à au moins un antituberculeux. La résistance à l'isoniazide (11,4%) était la plus fréquente comparée aux résistances à la streptomycine et la rifampicine qui représentaient 5,7% chacune. Cependant, les différences observées entre les nouveaux cas et les cas antérieurement traités n'étaient pas statistiquement significatives (Tableau XVII).

Tableau XVII : Comparaison de la résistance aux antituberculeux chez les nouveaux cas et les cas antérieurement traités

Antituberculeux	Nouveaux cas (n=273)	%	Cas antérieurement traités (n=35)	%	p-valeur
Isoniazide					
Sensible	256	93,8	31	88,6	0,25
Résistant	17	6,2	4	11,4	
Streptomycine					
Sensible	266	97,4	33	94,3	0,31
Résistant	7	2,6	2	5,7	
Rifampicine					
Sensible	270	98,9	33	94,3	0,09
Résistant	3	1,1	2	5,7	

De façon globale, la monorésistance était le profil de résistance le plus fréquent avec 23 des 29 isolats résistants identifiés dont 19/23 chez les nouveaux cas et 4/6 chez les cas antérieurement traités. Deux cas de polyrésistance (INH-SM et RIF-SM) ont été observés chez les cas antérieurement traités. Au total 3 cas de TB-MR dont 2 cas déjà traités et un nouveau cas ont été observés. La multirésistance observée chez le patient-nouveau cas était combinée à une résistance à la streptomycine. Aucune souche ultrarésistante n'a été identifiée (Tableau XVIII).

Tableau XVIII : Profils de résistance aux antituberculeux chez les nouveaux et cas antérieurement traités

Phénotypes de résistance	Total	Nombre d'isolats	
		Nouveaux cas	Cas antérieurement traités
Total	308	273	35
Monorésistance			
INH	16	14	2
SM	5	3	2
RIF	1	1	0
KAN	1	1	0
Sous-total	23	19	4
Résistance à plus d'un antituberculeux (MDR exclu)			
INH-SM	2	2	0
RIF-SM	1	1	0
Sous-total	3	3	0
Résistance à plus d'un antituberculeux (MDR)			
INH-RIF	2	0	2
INH-RIF-SM	1	1	0
Sous-total	3	1	2

Les résultats de l'analyse univariée de la relation entre les caractéristiques sociodémographiques et cliniques des patients et la résistance aux antituberculeux ont permis de noter que ni l'âge, ni la sérologie VIH, ni un séjour en prison, ni le statut marital, ni le genre ou le lieu de résidence n'étaient significativement associés au développement de la résistance aux antituberculeux. Il convient de souligner même si le lien observé n'était pas significatif ($p=0,12$), une tendance des cas antérieurement traités à être plus résistants ($RC= 2,25$ IC95 [0,85-5,98]) que les nouveaux cas a été observée (Tableau XIX).

Tableau XIX : Analyse univariée des caractéristiques sociodémographiques et cliniques avec le développement de la résistance

	N=308	Isolats résistants		RC [IC95%]	p-valeur
		N=29	%		
Age (années)					
< 35	129	13	10,1	1,14 [0,53-2,46]	0,73
≥ 35	179	16	8,9	Réf	
Genre					
Féminin	138	14	10,1	1,17 [0,54-2,51]	0,69
Masculin	170	15	8,8	Réf	
Statut marital					
Seul	226	24	10,6	1,83 [0,67-4,97]	0,21
En couple	82	5	6,1	Réf	
Niveau d'instruction					
Illettré/Primaire	121	12	9,9	1,10 [0,51-2,39]	0,80
Secondaire/Supérieur	187	17	9,1	Réf	
Séjour en prison					
Oui	20	3	15,0	1,78 [0,49-6,47]	0,38
Non	288	26	9,0	Réf	
Sérologie VIH					
Négatif	223	22	9,9	1,22 [0,50-2,97]	0,66
Positif	85	7	8,2	Réf	
Traitement antérieur					
Cas antérieurement traités	35	6	17,1	2,25 [0,85-5,98]	0,12
Nouveaux cas	273	23	8,4	Réf	
Lieu de résidence					
Rural	50	6	12,0	1,39 [0,54-3,62]	0,50
Urbain	258	23	8,9	Réf	

III.1.5 Test d'identification MTB/RIF en utilisant la technologie GeneXpert

Au total, 29 échantillons à microscopie positive ayant donné des cultures négatives ont été examinés à l'aide de la technologie GeneXpert. Le test MTB/RIF a révélé la présence de MTB dans 4 échantillons et la présence d'une résistance à la rifampicine pour un d'eux.

III.1.6 Discussion partielle

Dans la première partie de ce travail, il était question de déterminer la fréquence de co-infection TB-VIH, de définir le niveau de résistance aux antituberculeux chez les patients tuberculeux pulmonaires à microscopie positive dans la région du Centre et d'identifier les potentiels facteurs associés à l'émergence des souches résistantes.

L'analyse descriptive des caractéristiques de la population d'étude a montré une prédominance (80%) des cas de tuberculose dans la population jeune (15-45 ans) avec la tranche d'âge de 25-35 ans étant la plus représentée. Cette forte proportion des cas de tuberculose dans la population jeune est similaire aux études réalisées dans les pays en voie de développement et particulièrement ceux de la région subsaharienne (Bruchfeld et *al.*, 2002). Dans les pays développés où le risque d'infection a considérablement décliné, l'âge médian des patients tuberculeux s'est élevé et on observe des pics de cas de tuberculose chez les sujets âgés de 65 ans et plus (Rieder, 1999). Cette proportion croissante des cas aux âges avancés émane du réservoir des personnes infectées de nombreuses années auparavant qui du fait d'une baisse d'immunité développent des tuberculoses actives par réactivation des infections latentes (Rieder, 1999). Dans les pays en voie de développement, on assiste à une transmission active de la tuberculose et la population jeune du fait de la promiscuité, de l'exposition au VIH est la plus à risque d'être infectée et/ou de développer la tuberculose une fois que l'infection a eu lieu.

La proportion la plus élevée des cas de tuberculose pulmonaire dans notre population d'étude a été trouvée chez les célibataires. Ces observations pourraient être attribuables à un comportement social différent des hommes selon leur situation matrimoniale résultant en un risque plus ou moins élevé d'infection et, en conséquence, en une fréquence plus ou moins élevée de la maladie (Rieder, 1999). On a observé une tendance plus élevée des patients tuberculeux célibataires et divorcés/veufs à être co-infectés par le VIH comparée aux patients tuberculeux mariés. La différence de risque à l'infection à VIH selon le statut matrimonial pourrait donc justifier les différences de fréquence tuberculose pulmonaire observées selon le statut matrimonial.

En effet, pour développer la tuberculose, il faut avoir été infecté par des bacilles de la tuberculose. Néanmoins, les bacilles de la tuberculose sont une cause nécessaire mais non suffisante pour développer une tuberculose-maladie. Si le risque d'être infecté est largement exogène, déterminé par les caractéristiques de la source d'infection, l'environnement et la durée de l'exposition, le risque de développer une tuberculose-maladie, l'infection ayant eu lieu, est largement endogène, déterminé par l'intégrité du système immunitaire cellulaire.

L'infection par le VIH est actuellement le facteur connu le plus puissant pour passer d'une infection à *M. tuberculosis* préexistante à une tuberculose maladie (Corbett et al., 2003). Le taux global d'infection VIH chez les patients tuberculeux dans cette étude était de 29,1%. Au Gabon, une étude a rapporté une prévalence de l'infection à VIH chez les patients tuberculeux de 26% (Nkoghe et al., 2005). Au Cameroun, la prévalence de la co-infection TB-VIH est passée de 16,6% en 1997 (Kuaban et al., 1997) à 31,1% en 2009 (Yone et al., 2012) au sein des malades tuberculeux bacillifères suivis à l'hôpital Jamot de Yaoundé. Cette augmentation de la prévalence de l'infection à VIH au sein des patients tuberculeux bacillifères a suivi l'augmentation de la prévalence de l'infection à VIH dans la population générale à Yaoundé (Yone et al., 2012). Nos résultats ont mis en évidence une association significative entre la co-infection TB-VIH, le jeune âge et le genre féminin. Cette forte prédominance des femmes chez les malades séropositifs dans notre étude s'expliquerait par un risque plus élevé d'infection chez les femmes de part leur physiologie.

La résistance constitue un véritable défi dans la lutte contre la tuberculose. Une étude réalisée à l'hôpital Jamot de Yaoundé de 1994/95 avait rapporté un taux de résistance initiale de 31,8% chez les patients tuberculeux pulmonaires, signal d'alarme que le taux de résistance acquise pourrait être plus élevé dans cette région (Bercion and Kuaban, 1997). En 2000, une étude dans le même centre a rapporté un taux de résistance acquise de 58,2%. Cette étude a eu comme impact la réorganisation du programme national de lutte contre la tuberculose (Kuaban et al., 2000a). Le taux de résistance étant un indicateur de la qualité et de la performance d'un programme de lutte contre la tuberculose (Chalet et al., 1995), il est important d'effectuer une surveillance régulière de la résistance dans la population pour évaluer l'efficacité des stratégies mises en place au niveau national. Dans cette

étude, le taux de résistance global chez les patients tuberculeux pulmonaires à microscopie positive était de 9,4%. Au vu des taux de résistance aux antituberculeux rapportés dans les études réalisées en Guinée équatoriale (18,22%) (Tudo et al., 2004), au Burkina Faso (12,40%) (Sangare et al., 2011), au Brésil (17,10%) (Brito et al., 2010), en Ethiopie (14,00%) (Bruchfeld et al., 2002), ou en Côte d'Ivoire (23,70%) (N'Guessan et al., 2008), on pourrait dire que le taux de résistance (9,4%) rapporté dans la présente étude n'est pas alarmant. Une étude précédente réalisée dans la région de l'Ouest avait déjà relevé une baisse significative ($p < 0,05$) de la résistance (Assam-Assam et al., 2011). Cette baisse avait été attribuée à la réorganisation du programme de lutte contre la tuberculose.

Comparée à la rifampicine (1,62%), la résistance à l'isoniazide (6,81%) et la streptomycine (2,92%) étaient les plus fréquentes. Cette observation est parfaitement cohérente avec celle déjà rapportée en 2000 dans la région du Centre au Cameroun et plus récemment en 2011 dans la partie Ouest où les résistances à l'isoniazide étaient les plus rencontrées et respectivement de 18,7% (Kuaban et al., 2000a) et 3,22% (Assam-Assam et al., 2011). En général, les taux de résistance à l'isoniazide et la streptomycine observés en Afrique sub-saharienne sont les plus élevés (Bruchfeld et al., 2002). Cela pourrait s'expliquer par l'utilisation intensive de ces deux médicaments dans le passé, surtout la streptomycine qui était couramment utilisée dans le traitement des infections autres que la tuberculose (Kuaban et al., 2000b). La proportion élevée de la résistance aux antituberculeux chez les patients déjà traités (17,1%), comparativement aux nouveaux cas (8,4%), est similaire avec les données publiées en Afrique sub-saharienne. Un traitement préalable contre la tuberculose a été identifié dans de nombreux contextes comme un facteur de risque important pour l'acquisition de la résistance aux antituberculeux (Sharma and Mohan, 2004). Cependant, cette étude n'a pas mis en évidence une association statistiquement significative entre un traitement antituberculeux antérieur et le développement de la résistance aux médicaments. Cette observation pourrait être attribuée au faible nombre de cas antérieurement traités enrôlés dans cette étude ou au caractère restrictif de la population d'étude qui était limitée aux patients tuberculeux pulmonaires à microscopie positive.

Le test Xpert MTB/RIF a permis de détecter les bacilles du complexe *Mycobacterium tuberculosis* dans 4 des 29 crachats ayant présenté une culture

négative. En effet, on pourrait penser que la culture n'a pas mis en évidence les bacilles tuberculeux dans ces échantillons du fait d'une étape de décontamination rude qui aurait diminué la viabilité des bacilles tuberculeux affectant leur croissance sur milieu Löwenstein Jensen. Le test MTB/RIF quant à lui recherche la présence d'une séquence spécifique sur le génome, il ne nécessite donc pas de cellules viables.

III.2 ANALYSE DE LA DIVERSITE DES SOUCHES DU COMPLEXE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* ET MODE DE CIRCULATION DANS LA POPULATION

III.2.1 Diversité génétique des isolats du complexe *Mycobacterium tuberculosis*

Sur l'ensemble des 302 échantillons analysés, 298 (98,7%) ont donné des résultats de typage moléculaire exploitables. Les 4 isolats ayant produit des résultats de typage non exploitables étaient des cas d'infections mixtes c'est-à-dire présentant deux versions alléliques à plus d'un locus et qui ont été exclus de l'analyse.

III.2.1.1 Diversité génétique par la technique du spoligotypage

Le film de spoligotypage après révélation correspond à une succession de présence et d'absence du signal d'hybridation. L'absence du signal d'hybridation se traduit par un spot blanc tandis que la présence du signal d'hybridation correspond au spot noir (Figure 32).

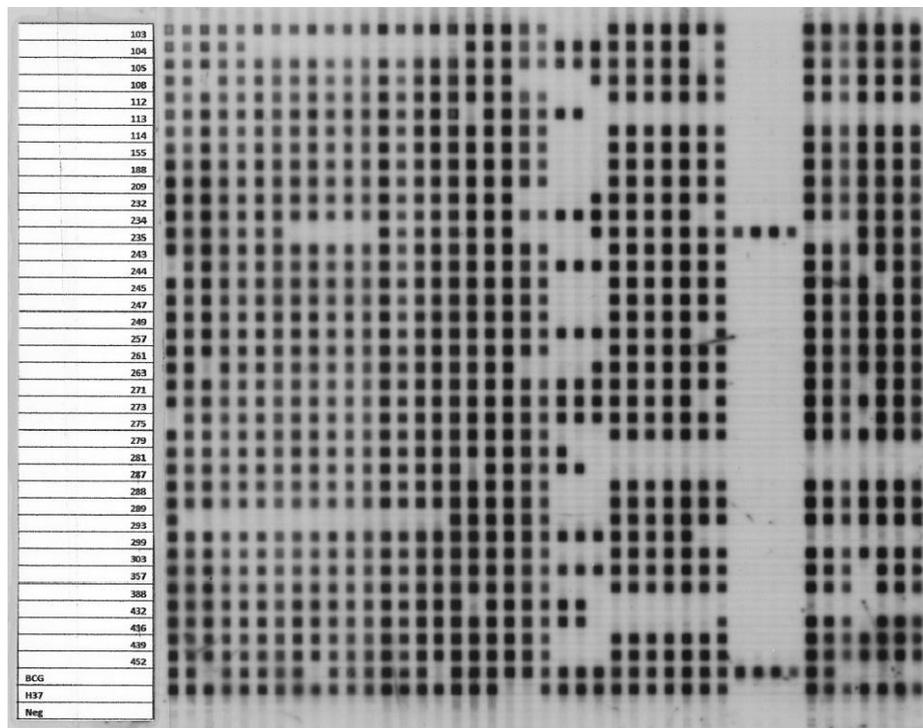


Figure 32 : Profils de spoligotypes obtenus pour 43 isolats.

Les spots noirs indiquent la présence des espaceurs et les spots blancs l'absence des espaceurs

La caractérisation par spoligotypage des isolats du complexe *Mycobacterium tuberculosis* a permis de distinguer 66 spoligotypes différents pour l'ensemble des 298 souches analysées. Une analyse détaillée de la distribution par famille génétique contenue dans la base de données SpolDB4 (Institut Pasteur de la Guadeloupe), restreinte aux souches isolées jusqu'en Février 2011, a été réalisée via l'application web MIRUVNTR *plus*. Au total, 274 isolats ont été groupés en 42 *shared types* (ST), les autres 24 isolats ayant donné des spoligotypes non identifiés encore appelés spoligotypes orphelins. La Figure 33 ci-dessous résume la distribution des souches par famille génétique SpolDB4 et *shared types* (ST). De façon globale, Les ST les plus représentés étaient le ST 61 (n=128 ; 43%) et le ST 50 (n=34 ; 11,4%) appartenant respectivement aux familles génétiques LAM10_CAM (famille Cameroun) et H3 (famille Haarlem).

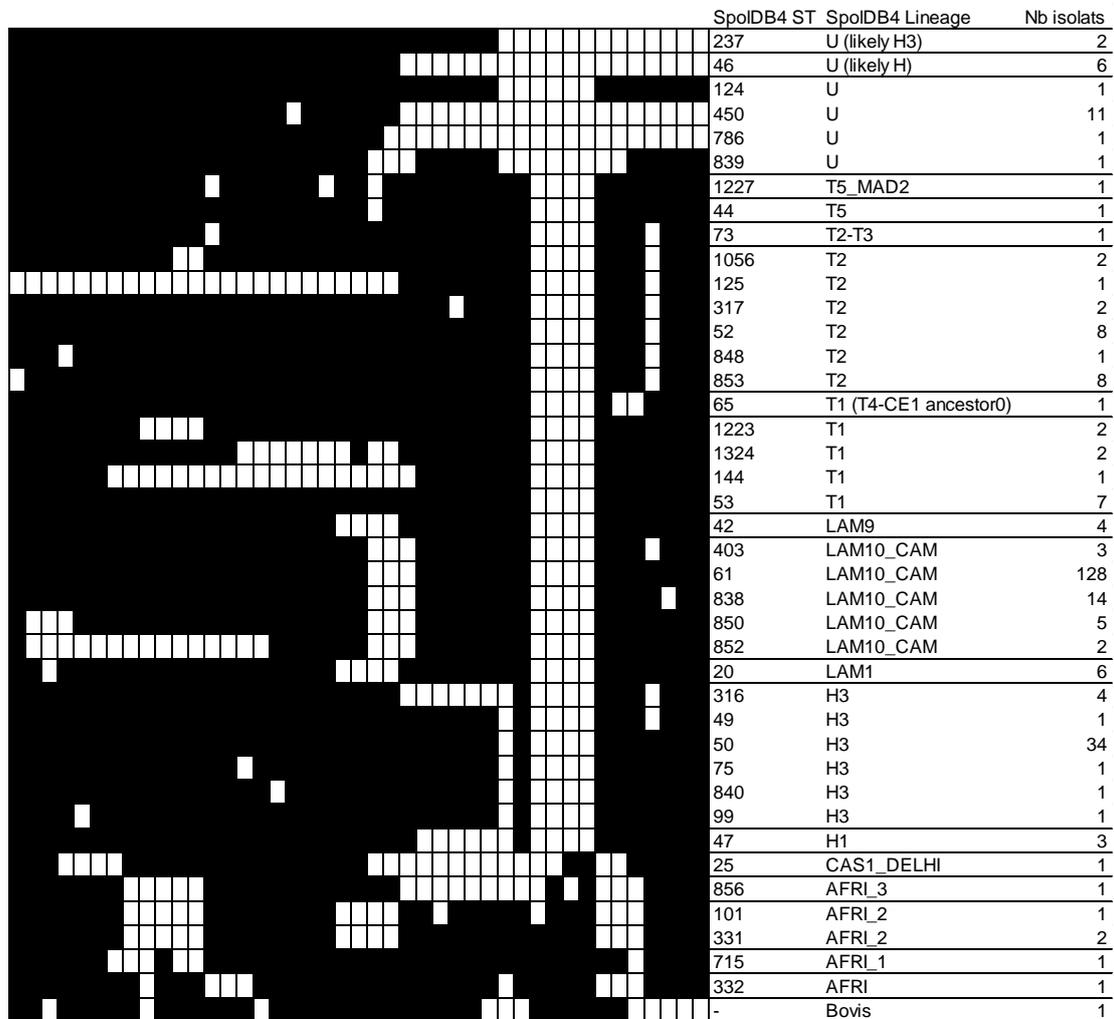


Figure 33 : Différents spoligotypes et répartition des isolats par famille génétique SpolDB4 et *shared types* (ST)

III.2.1.1.1 *Mycobacterium africanum*

Les isolats de *M. africanum* ont été répartis en 5 spoligotypes différents. Les spoligotypes ST332, ST715, ST101 et ST856 étaient représentés par une seule souche tandis que le ST331 comptait deux souches (Figure 33).

III.2.1.1.2 *Mycobacterium tuberculosis*

- **La famille T** : elle était assez diversifiée et divisée en 3 sous-familles à savoir T1, T2 et T5. Dans la sous-famille T1, les ST65 et ST144 étaient représentés par une seule souche. Le ST53 comptait 7 isolats tandis que les ST1223 et 1324 regroupaient 2 isolats chacun. Dans la sous-famille T2, on a observé 2 grappes de 8 isolats chacun représentées par les ST 853 et 52. Les autres ST de cette sous-famille incluent le ST 1056, le ST 125, le ST 317 et le ST 48. Les ST44 et ST1227 retrouvés dans le clade T5 étaient représentés chacun par une seule souche (Figure 33).
- **La famille LAM** : les isolats de *M. tuberculosis* appartenant à la famille LAM étaient représentés par les spoligotypes LAM1 (ST20) et LAM9 (ST420) qui regroupaient 6 et 3 isolats respectivement (Figure 33).
- **La famille LAM10_CAM** : elle comptait 152 isolats répartis en 5 grappes qui regroupaient entre 2 et 128 isolats. Les ST61 et ST838 étaient les plus représentés avec 128 et 14 isolats respectivement (Figure 33).
- **La famille Haarlem** : elle était subdivisée en 2 sous-familles ; H3 et H1. La sous-famille H3 comptait 42 isolats regroupés en 6 spoligotypes différents ; le spoligotype 50 étant le plus représenté avec 34 isolats. La sous-famille H1 ne comptait que 3 isolats regroupés sous le ST47 (Figure 33).
- **Les autres** : ils incluent le spoligotype CAS1_Deqli et les spoligotypes de la famille U. La famille U comptait 22 isolats répartis en 6 grappes, les plus importantes étant les grappes ST450 et ST46 qui regroupaient 11 et 6 isolats respectivement (Figure 33).

III.2.1.1.3 Les spoligotypes orphelins

Au total 24 spoligotypes (Figure 34) n'ont pas été retrouvés dans la base de données SpolIDB4 et constituaient des « spoligotypes orphelins ».

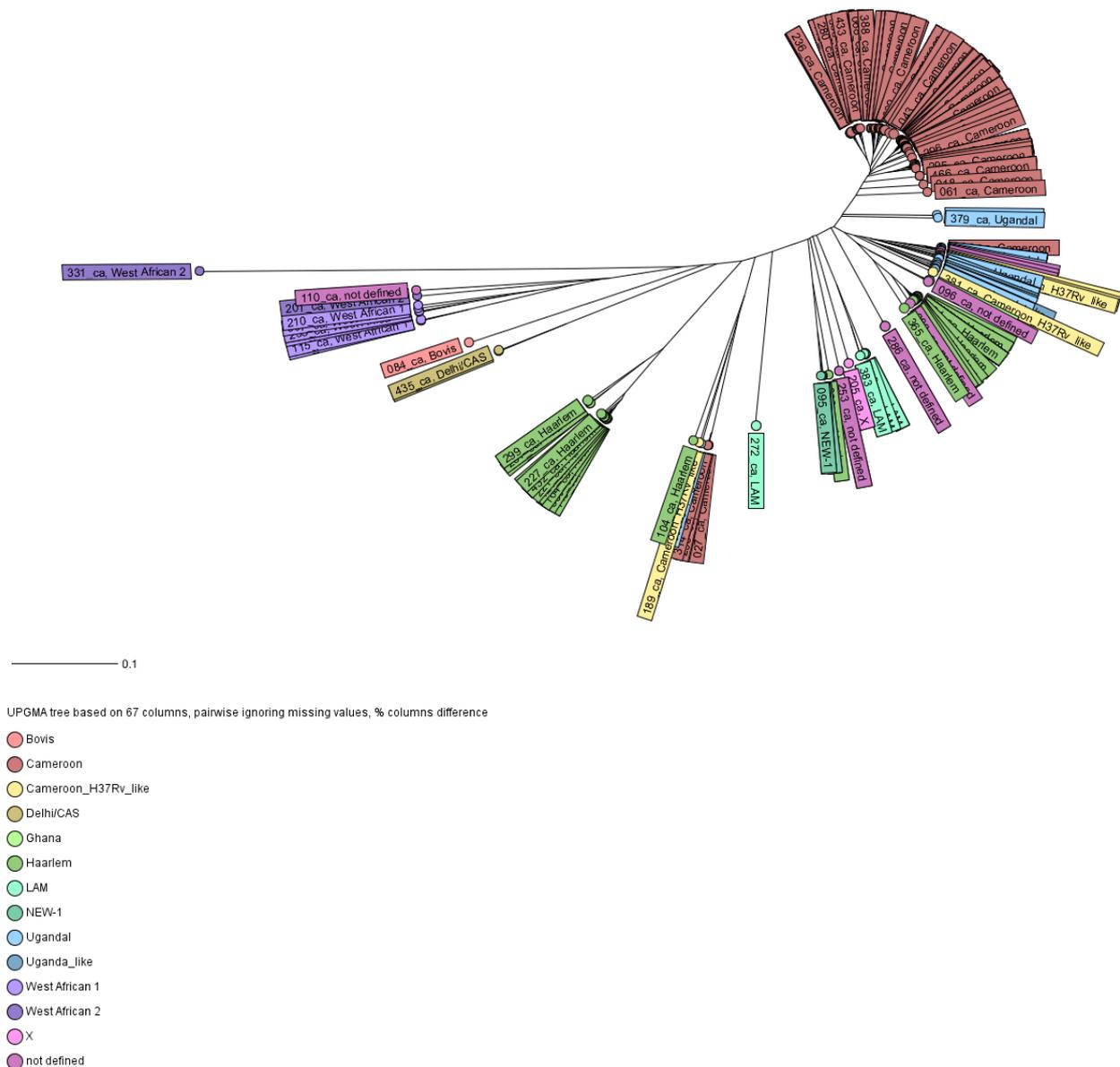


Figure 35 : Différentes familles génétiques identifiées par la technique de MIRU-VNTR

Mycobacterium tuberculosis était l'espèce responsable dans 288 (96,7%) cas de tuberculose pulmonaire. Les familles génétiques les plus représentées dans cette espèce étaient la famille Cameroun (n=161 ; 54%), suivie de la famille Haarlem (n= 64 ; 21,5%) et de la famille Uganda I (n=26 ; 8,7%) (Tableau XX).

Les isolats de *Mycobacterium africanum* représentaient 3% des isolats répartis en 2 familles génétiques ; West African 1 (n= 7 ; 2,3%) et West African 2 (n= 2 ; 0,7%) (Tableau XX).

Tableau XX : Distribution des isolats dans les différentes familles génétiques

Espèces	Familles génétiques	Nombre d'isolats	Fréquence (%)
<i>M. bovis</i>	Bovis	1	0,3
	Cameroun	161	54,0
<i>M. tuberculosis</i>	Haarlem	64	21,5
	Ugandal	26	8,7
	LAM	10	3,4
	Ghana	2	0,7
	Delhi/CAS	2	0,7
	Cameroun_H37Rv_like	5	1,7
	NEW-1	5	1,7
	Uganda_like	1	0,3
	X	2	0,7
	Non définie	10	3,4
<i>M. africanum</i>	West African 1	7	2,3
	West African 2	2	0,7
Total		298	100,0

Globalement, l'identification des familles génétiques par la technique de MIRU-VNTR corrobore l'identification par le spoligotypage. Le typage MIRU a cependant permis d'attribuer certains isolats de familles génotypiques SpolDB4 mal définies aux familles génétiques connues (Tableau XXI).

Tableau XXI: Comparaison de l'identification des familles génétiques par MIRU-VNTR et des familles génotypiques SpoIDB4

Familles génétiques	Familles SpoIDB4	Nombre d'isolats
Bovis		1
		1
Cameroun		160
	Orphelin	7
	LAM10_CAM	152
	U	1
Delhi/CAS		2
	Orphelin	1
	CAS1_DELHI	1
Ghana		2
	T1	2
Haarlem		43
	Orphelin	2
	H1	1
	H3	36
	U	2
	U (likely H3)	2
LAM		10
	LAM1	6
	LAM9	2
	T1	2
Non définie		70
	Orphelin	9
	AFRI	1
	H1	2
	H3	6
	LAM9	1
	T1	8
	T1 (T4-CE1 ancestor0)	1
	T2	22
	T2-T3	1
	T5	1
	T5_MAD2	1
	U	11
	U (likely H)	6
Uganda 1		1
	Orphelin	1
West African 1		7
	Orphelin	3
	AFRI_2	3

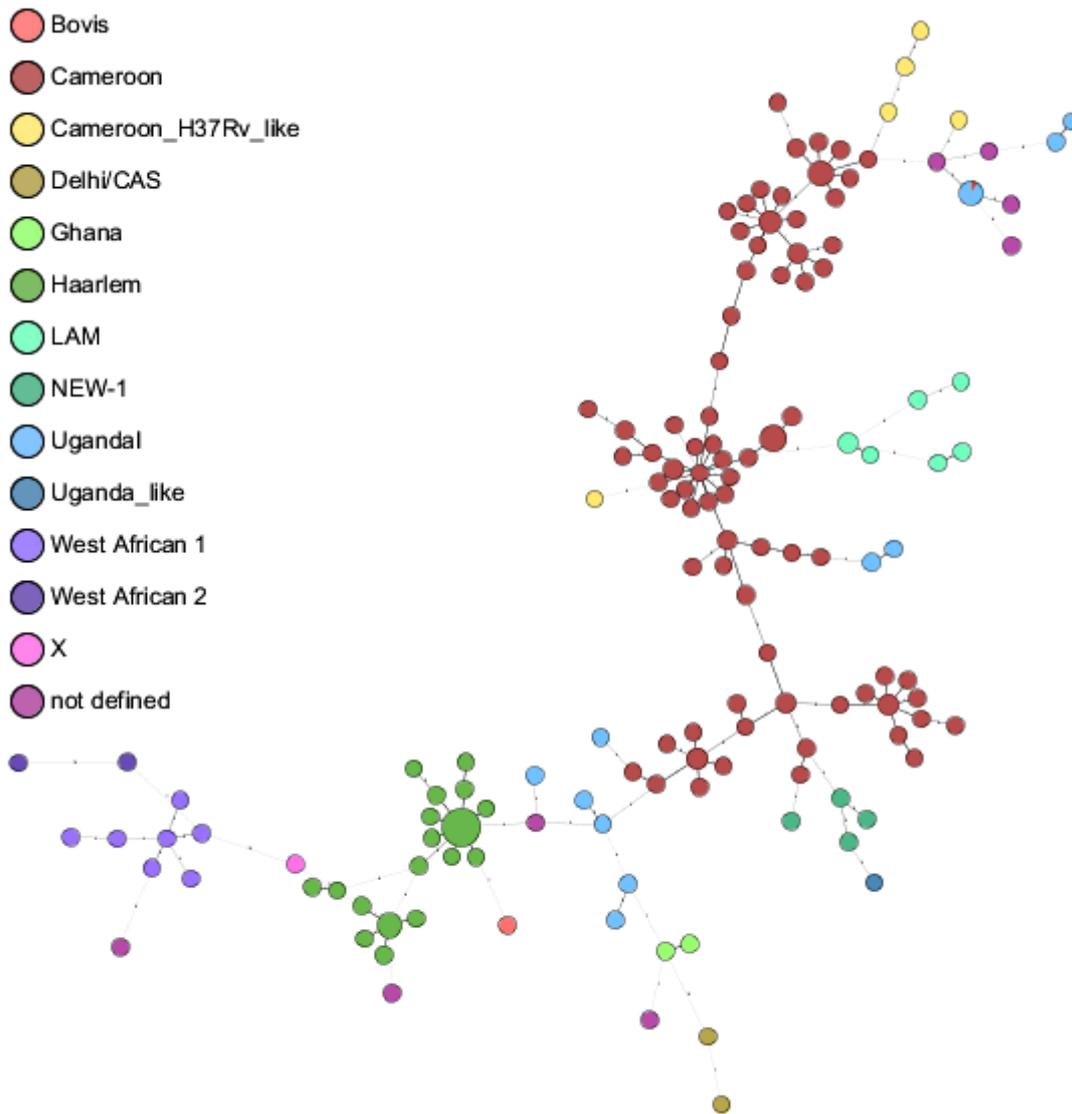
	AFRI_3	1
West African 2		2
	Orphelin	1
	AFRI_1	1
Total		298

Le Tableau XXII présente les profils de spoligotypage obtenus pour les souches appartenant aux familles génétiques non encore décrites tel que identifié par le typage MIRU-VNTR.

Tableau XXII : Profils de spoligotypage des isolats appartenant aux familles génétiques non encore décrites

Famille génétique	ST	Famille SpoIDB4	Profil spoligotypage
Cameroon_H37Rv_like	-	-	
	53	T1	
	144	T1	
	1227	T5_MAD2	
	53	T1	
NEW-1	-	-	
	316	H3	
	316	H3	
	316	H3	
Uganda_like	49	H3	

L'analyse phylogénétique a permis de confirmer l'identification des familles génétiques faite par comparaison aux souches de référence de la base de données MIRU-VNTR *plus* et à travers les dendogrammes UPGMA. Ainsi, on a pu observer que toutes les familles génétiques connues et même celle non encore décrites étaient présentes en complexes clonaux sur les «Minimum Spanning Tree (MST) » (Figure 36).



MST based on 24 columns, missing values are an own category

Figure 36: “Minimum Spanning Tree” base sur les données MIRU-VNTR des 298 isolats.

Chaque cercle représente un génotype MIRU-VNTR. La taille du cercle est proportionnelle au nombre d’isolats présentant le génotype MIRU-VNTR correspondant. Distance maximum dans un complexe clonal: 2 changements; nombre minimum de génotypes dans un complexe clonal: 2 génotypes MIRU-VNTR

III.2.1 Variabilité des génotypes en fonction de la résistance et du VIH

Des 298 isolats ayant produit des résultats de typage exploitables, 28 (9,4%) étaient résistants à au moins un antituberculeux dont 3 multirésistants. La Figure 37 montre que tous les isolats appartenant à la famille WAF1/WAF2, ceux appartenant à la famille Haarlem et ceux appartenant aux familles Uganda/Ghana/DelhiCAS étaient susceptibles à tous les antituberculeux testés. La fréquence de résistance la plus élevée 41,7% (IC95% [17,2-69,8]) a été retrouvée au sein des isolats de la famille X et ceux appartenant aux familles non définies. La fréquence de résistance dans la famille Cameroun était de 12,4% (IC95% [7,9-18,2]). Les isolats multirésistants appartenaient à la famille Cameroun (n=2) et à une famille non définie (n=1). L'arbre phylogénétique montre qu'aucun des génotypes identifiés dans la collection n'est associé à la résistance aux antituberculeux (Figure 38).

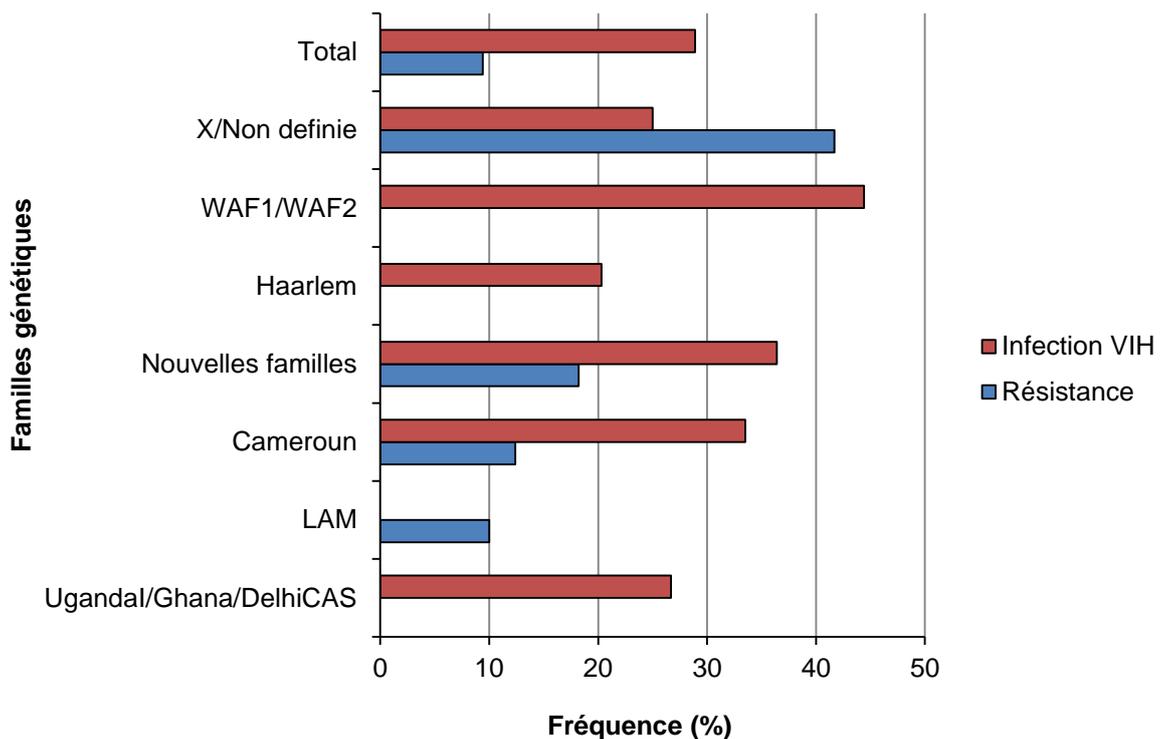


Figure 37 : Fréquence de résistance et de co-infection VIH dans la population étudiée par famille génétique

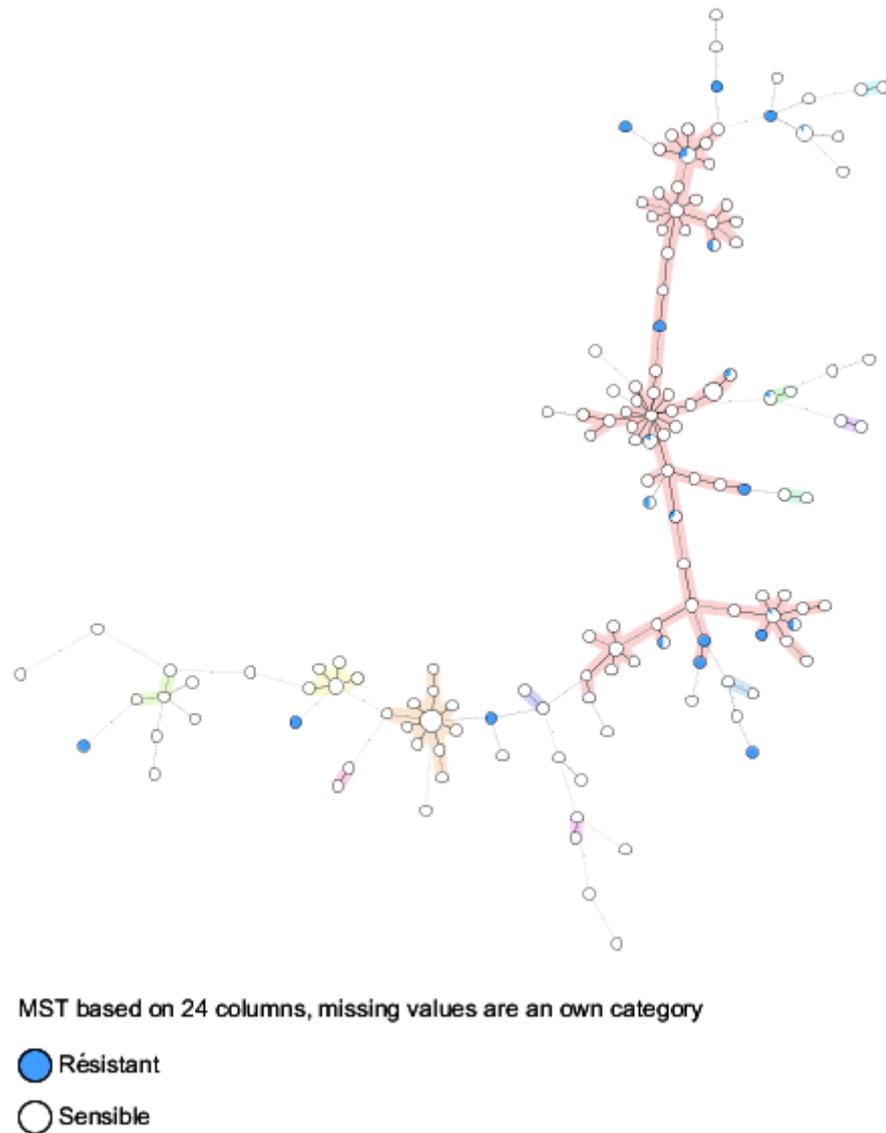


Figure 38: “Minimum Spanning Tree” basé sur les données MIRU-VNTR des 298 isolats en fonction du phénotype de résistance.

Chaque cercle représente un génotype MIRU-VNTR. La taille du cercle est proportionnelle au nombre d’isolats présentant le génotype MIRU-VNTR correspondant. Distance maximum dans un complexe clonal: 2 changements; nombre minimum de génotypes dans un complexe clonal: 2 génotypes MIRU-VNTR

La sérologie VIH était positive pour 86 (28,9%) des 298 isolats caractérisés. La fréquence la plus élevée de co-infection TB-VIH a été observée dans la famille WAF1/WAF2 (n=4 ; 44,4%) suivie par les familles Uganda_like/Cameroon_H37Rv_like/New-1 « nouvelles familles » (n=4 ; 36,4%). La fréquence de co-infection TB-VIH était significativement plus élevée dans

la famille Cameroun que dans la famille Haarlem (33,5% vs 20,3% ; $p=0,04$). Dans la famille LAM, aucune des souches identifiées n'a été isolée chez des patients co-infectés par le VIH (Figure 37).

L'arbre phylogénétique a montré que les génotypes identifiés sont répartis indifféremment selon le statut sérologique VIH (Figure 39).

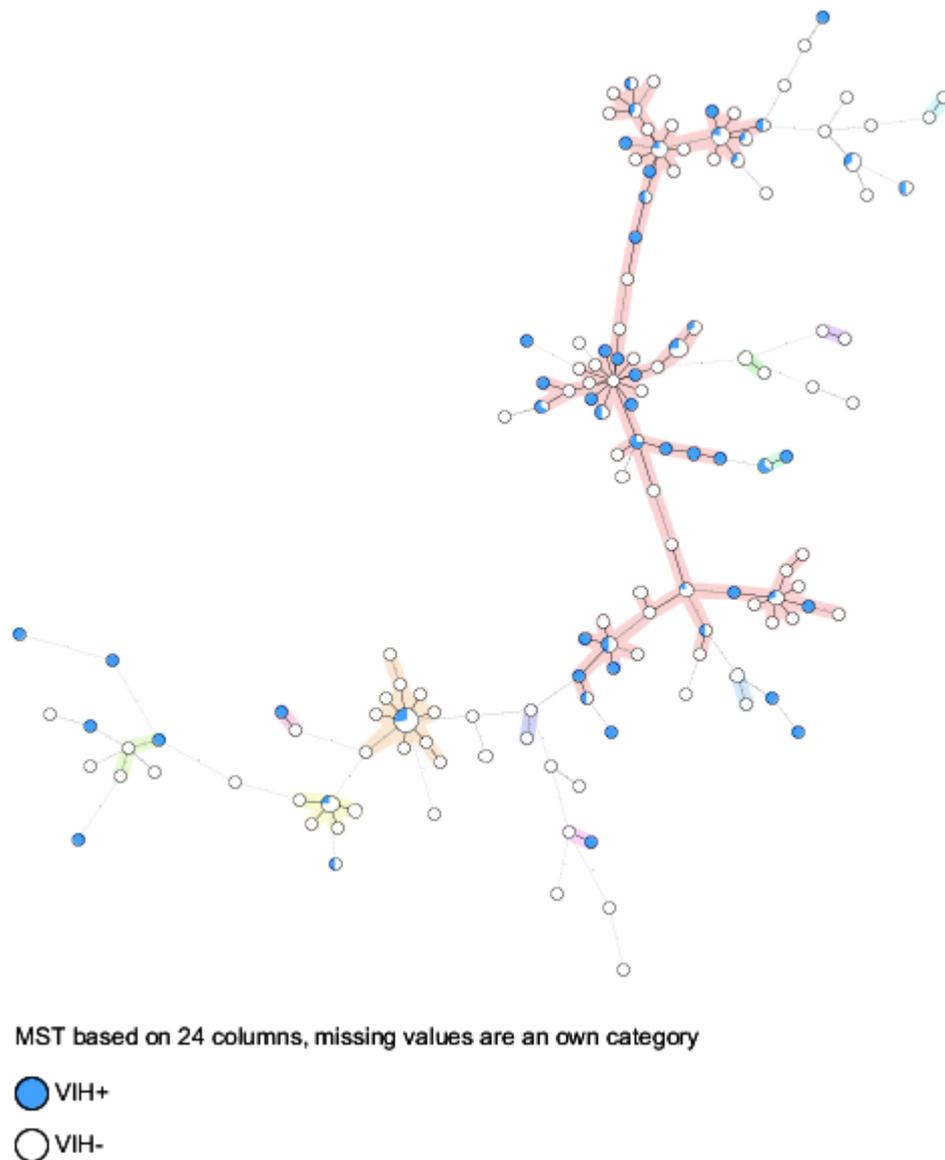


Figure 39 : “Minimum Spanning Tree” basé sur les données MIRU-VNTR des 298 isolats en fonction du statut sérologique VIH.

Chaque cercle représente un génotype MIRU-VNTR. La taille du cercle est proportionnelle au nombre d'isolats présentant le génotype MIRU-VNTR correspondant. Distance maximum dans un complexe clonal: 2 changements; nombre minimum de génotypes dans un complexe clonal: 2 génotypes MIRU-VNTR.

III.2.2 Pouvoir discriminatoire des différentes méthodes de typage et diversité allélique

III.2.2.1 Pouvoir discriminatoire des méthodes de typage

L'analyse des spoligotypes obtenus pour l'ensemble des 298 souches a permis de dénombrer 66 spoligotypes différents. Quarante-cinq spoligotypes étaient représentés par une seule souche, les 21 autres regroupaient deux ou plusieurs souches et totalisaient 254 isolats ; soit un taux de formation de grappes de 0,85. Le pouvoir discriminatoire du spoligotypage était de 0,79 (Tableau XXIII). Avec la technique MIRU-VNTR, au total 101 profils uniques et 42 grappes comprenant entre 2 et 31 souches et totalisant 197 souches ont été identifiées, résultant en un taux de formation de grappes de 0,66 et un index de transmission récente de 0,52. Le pouvoir discriminatoire du typage MIRU-VNTR était de 0,97. La combinaison du spoligotypage et du typage MIRU-VNTR a permis d'obtenir un pouvoir discriminatoire de 0,98 et un index de transmission récente de 0,44.

Tableau XXIII : Pouvoir discriminatoire des différentes méthodes de typage

Méthode de génotypage	Spoligotypage	MIRU-VNTR	Spoligo+MIRU-VNTR
Nb de profils différents	66	143	164
Nb de profils uniques	45	101	124
Nb de grappes	21	42	40
Nb d'isolats en grappes	254	197	173
Taux de formation de grappes	0,85	0,66	0,58
Index de transmission récente	0,78	0,52	0,44
Pouvoir discriminatoire	0,79	0,97	0,98

III.2.2.2 Diversité allélique des 24 loci MIRU-VNTR

Dans l'ensemble de l'échantillon, les loci ETRA, MIRU40, QUB11b et Mtub39 se sont révélés hautement discriminants ($h \geq 0,6$). Les loci ETRC, MIRU20, MIRU10, MIRU26, QUB26, MIRU16, Mtub30, Mtub29, Mtub21, Mtub04, MIRU31 et QUB4156 étaient modérément discriminants ($0,3 \leq h < 0,6$) tandis que les loci MIRU27, MIRU39,

Mtub34, MIRU23, MIRU24, MIRU02 et MIRU04 étaient classés comme peu discriminants ($h < 0,3$).

Dans la famille Cameroun, les loci MIRU04, MIRU02, ETRB, MIRU24, MIRU23, QUB4156 et Mtub30 se sont avérés monomorphes. Seuls 3 loci (MIRU40, QUB11b et Mtub39) ont présenté une diversité allélique supérieure à 0,6 et étaient classés comme hautement discriminants. Les loci Mtub34, MIRU39, Mtub04, Mtub29, MIRU20, MIRU31, Mtub21, ETRC, MIRU27, MIRU10 et MIRU26 étaient peu discriminants ($h < 0,3$) tandis que les loci QUB26, MIRU16 et ETRA étaient classés comme modérément discriminants ($0,3 \leq h < 0,6$) (Tableau XXIV).

Tableau XXIV : Diversité allélique des 24 loci MIRU-VNTR dans l'ensemble de l'échantillon et dans la famille Cameroun

Loci VNTR	alias	Echantillon total	Famille Cameroun
MIRU04	580	0,02	0
MIRU02	154	0,027	0
ETRB	2461	0,04	0
MIRU24	2687	0,072	0
MIRU23	2531	0,164	0
QUB4156	4156	0,432	0
Mtub30	2401	0,443	0
Mtub34	3171	0,046	0,012
MIRU39	4348	0,053	0,012
Mtub04	424	0,282	0,012
Mtub29	2347	0,352	0,012
MIRU20	2059	0,495	0,012
MIRU31	3192	0,236	0,025
Mtub21	1955	0,384	0,095
ETRC	577	0,499	0,14
MIRU27	3007	0,158	0,182
MIRU10	960	0,536	0,201
MIRU26	2996	0,422	0,259
QUB26	4052	0,542	0,408
MIRU16	1644	0,516	0,473
ETRA	2165	0,623	0,585
MIRU40	802	0,709	0,605
QUB11b	2163b	0,767	0,747
Mtub39	3690	0,779	0,747

III.2.2.3 Schéma alternatif de typage dans la famille Cameroun

Dans la famille Cameroun, la diversité allélique a montré que seuls 17 des 24 loci MIRU-VNTR étaient polymorphes. Le pouvoir discriminatoire cumulatif calculé en ajoutant successivement un locus MIRU-VNTR en allant du plus discriminant au moins discriminant est présenté dans le Tableau XXV ci-dessus.

Il ressort que la combinaison des 15 loci les plus discriminants permet d'obtenir un pouvoir discriminatoire de 0,97 et un index de transmission récente de 0,50 comparables à ceux obtenues avec la combinaison des 24 loci qui étaient respectivement de 0,98 et 0,44.

Tableau XXV : Pouvoir discriminatoire cumulatif et index de transmission récente résultant de l'addition successive de locus MIRU-VNTR dans la famille Cameroun.

Combinaison locus	Locus VNTR	VNTR alias	h	Index de transmission récente	Taux de formation de grappes	HGDI (cumulatif)
1	QUB11b	2163b	0,747	0,876	0,926	0,836
2	Mtub39	3690	0,747	0,696	0,820	0,947
3	MIRU40	802	0,605	0,665	0,814	0,957
4	ETRA	2165	0,585	0,646	0,801	0,959
5	MIRU16	1644	0,473	0,627	0,782	0,96
6	QUB26	4052	0,408	0,609	0,777	0,962
7	MIRU26	2996	0,259	0,59	0,758	0,965
8	MIRU10	960	0,201	0,59	0,764	0,965
9	MIRU27	3007	0,182	0,571	0,739	0,966
10	ETRC	577	0,14	0,553	0,714	0,97
11	Mtub21	1955	0,095	0,528	0,696	0,974
12	MIRU31	3192	0,025	0,522	0,690	0,975
13	Mtub34	3171	0,012	0,516	0,684	0,975
14	MIRU39	4348	0,012	0,516	0,684	0,975
15	Mtub04	424	0,012	0,509	0,670	0,975
16	Mtub29	2347	0,012	0,509	0,670	0,975
17	MIRU20	2059	0,012	0,509	0,670	0,975

La combinaison des loci QUB11b, Mtub39, MIRU40, ETRA, MIRU16, QUB26, MIRU26, MIRU10, MIRU27, ETRC, Mtub21, MIRU31, Mtub34, MIRU39 et Mtub04

pourrait servir de schéma de typage alternatif pour subtyper les isolats de la famille Cameroun après caractérisation par le spoligotypage.

III.2.3 Mode de circulation des souches dans la population

Les cas s'étant révélés porteurs de la même souche bactérienne, donc potentiellement issus d'une même source de contamination, sont appelés « cas en grappe », et l'ensemble des souches ayant un profil génétique identique définit une grappe, ou « cluster ». Ces grappes définissent une chaîne infectieuse potentielle.

Au total 40 grappes ont été identifiées en combinant les résultats du spoligotypage et du typage MIRU-VNTR. Vingt-huit des 40 grappes soit 70% des grappes comprenaient moins de 5 souches. On a noté cependant des grappes de grande taille ; 1 grappe de 27 souches, 1 grappe de 15 souches, et 1 grappe de 13 souches (Figure 40).

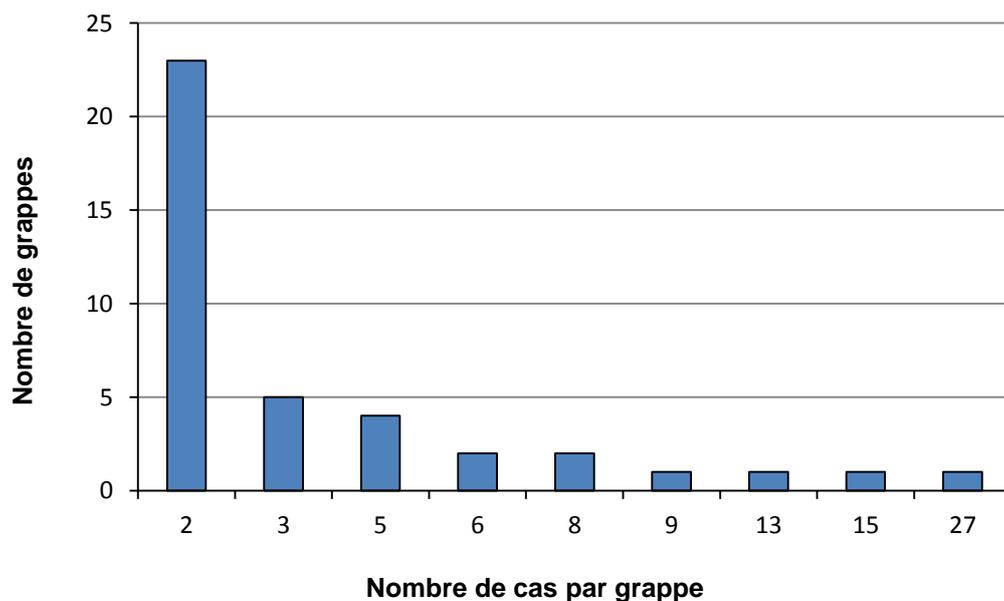


Figure 40 : Taille de différentes grappes identifiées par typage moléculaire

III.2.3.1 Facteurs associés à la transmission récente définie par la formation des grappes

Au total, 173 (58%) cas se sont révélés porteurs de la même souche (spoligotypes et profils MIRU-VNTR identiques) et constituaient des cas en grappes.

L'analyse de l'association entre les variables socio-démographiques (âge, statut marital, genre), cliniques (sérologie VIH, traitement antituberculeux antérieur, contact avec un patient tuberculeux, tuberculose résistante) et biologiques (famille génétique) par régression logistique a montré que la seule variable associée à la formation des grappes était la famille génétique (Tableau XXVI). Les isolats de la famille Cameroun (RC= 2,33 IC95% [1,06-5,13]) et de la famille Haarlem (RC= 2,34 IC95% [0,96-5,68]) sont plus susceptibles de former les grappes que les familles génétiques Uganda/Ghana/Delhi CAS.

Tableau XXVI : Relation entre les caractéristiques socio-démographiques, cliniques et biologiques et la formation des grappes : Analyse univariée

	N=297	Isolats en grappes		RC [IC95%]	p-valeur
		N=173	%		
Famille génétique					<0,001
LAM	10	5	50	1,14 [0,27-4,79]	
Cameroun	161	108	67,1	2,33 [1,06-5,13]	
Familles non décrites	11	2	18,2	0,25 [0,05-1,38]	
Haarlem	64	43	67,2	2,34 [0,96-5,68]	
WAF1/WAF2	9	0	0	-	
X/Non définie	12	2	16,7	0,23 [0,04-1,23]	
Uganda/Ghana/Delhi	20	14	46,7	Ref	
Age (années)					0,23
[15,25)	72	39	54,2	1,00 [0,52-1,93]	
[25,35)	102	60	58,8	1,21 [0,66-2,22]	
[45,85]	51	36	70,6	2,03 [0,95-4,34]	
[35,45)	72	39	54,2	Ref	
Genre					0,72
Féminin	134	80	59,7	1,09 [0,68-1,73]	
Masculin	163	94	57,7	Ref	
Statut matrimonial					0,84
En couple	79	47	59,5	1,05 [0,62-1,78]	
Seul	218	127	58,3	Ref	
Sérologie VIH					0,67
Positif	86	52	60,5	1,12 [0,67-1,86]	
Négatif/Pas de données	211	122	57,8	Ref	
Résistance					0,81
Résistant	28	17	60,7	1,10 [0,50-2,44]	
Sensible	269	157	58,4	Ref	
Traitement TB antérieur					0,36
Cas antérieurement traité	35	23	65,7	1,41 [0,67-2,95]	
Nouveau cas	262	151	57,6	Ref	
Contact avec un patient TB					0,17
Oui	67	44	65,7	1,47 [0,83-2,60]	
Non/Pas de données	230	130	56,5	Ref	

Les isolats de *M. africanum* (WAF1/WAF2) étaient tous des cas isolés (absence de grappes). En effet, le dendrogramme des souches de *M. africanum* (Figure 41) montre 9 profils uniques. Cinq (55,5%) des cas de tuberculose dus à *M. africanum* étaient co-infectés par le VIH.

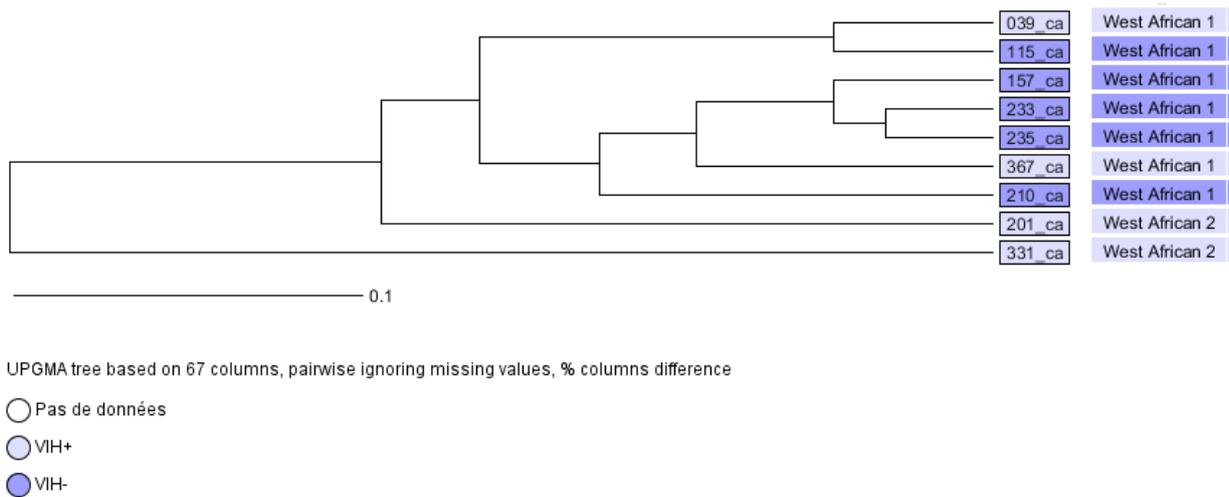


Figure 41: Dendrogramme des isolats de *Mycobacterium africanum*

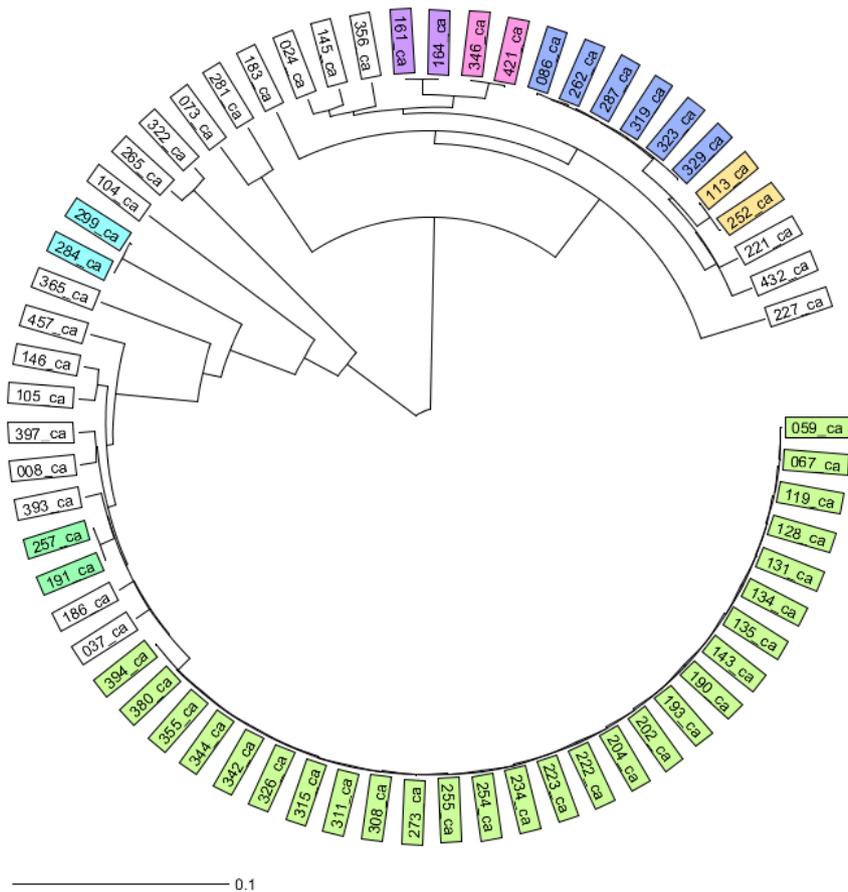
III.2.3.2 Etude des éventuels liens épidémiologiques dans les grappes majeures

Pour une meilleure lisibilité, les dendrogrammes ont été représentés pour chaque famille génétique identifiée par spoligotypage et typage MIRU-VNTR et des analyses de transmission ont été réalisées pour les clones majeurs.

En absence de données d'une enquête de contact, les cas étaient classés en 3 catégories selon que le lien épidémiologique était probable, possible ou non déterminé. Les cas présents dans une même grappe, déclarant avoir été en contact avec un patient tuberculeux et résidant dans une même aire géographique étaient susceptibles d'avoir des liens épidémiologiques probables tandis que ceux déclarant n'avoir pas été en contact avec un patient tuberculeux et résidant dans une même géographique ou exerçant la même profession étaient susceptibles d'avoir des liens épidémiologiques possibles.

III.2.3.2.1 La famille Haarlem

Le dendrogramme de la famille Haarlem a montré 21 souches isolées et 7 grappes totalisant 43 isolats (Figure 42).



UPGMA tree based on 67 columns, pairwise ignoring missing values, % columns difference

Figure 42 : Dendrogramme circulaire des isolats de la famille Haarlem

Chaque couleur indique une grappe différente ; les cas isolés sont représentés en blanc

Les liens épidémiologiques ont été présumés pour 13 cas de tuberculose appartenant à la grappe majeure de 27 isolats de la famille Haarlem.

- Les patients 59, 311 et 326 ont déclaré n'avoir pas été en contact avec un patient tuberculeux et résident tous dans le quartier Manguier : Lien épidémiologique possible ;
- Les patients 67, 119 et 190 ont déclaré n'avoir pas été en contact avec un patient tuberculeux et résident tous dans le quartier Nlongkak : Lien épidémiologique possible ;

- Les patients 143 et 234 ont déclaré n'avoir pas été en contact avec un patient tuberculeux et résident à Ekounou et Nkomo respectivement : Lien épidémiologique possible ;
- Les patients 131, 193, 223, 308 et 344 ont déclaré avoir été en contact avec un patient tuberculeux et résident pour 4 d'entre eux dans le quartier Soa et pour le dernier à Eleveur : Lien épidémiologique probable.

III.2.3.2.2 La famille Cameroun

Le dendrogramme circulaire des isolats appartenant à la famille Cameroun montre 79 profils différents dont 53 souches à profils uniques et 26 grappes totalisant 108 isolats (Figure 43). L'étude des éventuels liens épidémiologiques a été réalisée dans 2 grappes A et B contenant respectivement 15 et 5 isolats. Ces deux grappes ont été choisies car la disponibilité des informations sur le lieu de résidence des patients impliqués pourrait permettre de faire des hypothèses sur les liens épidémiologiques.

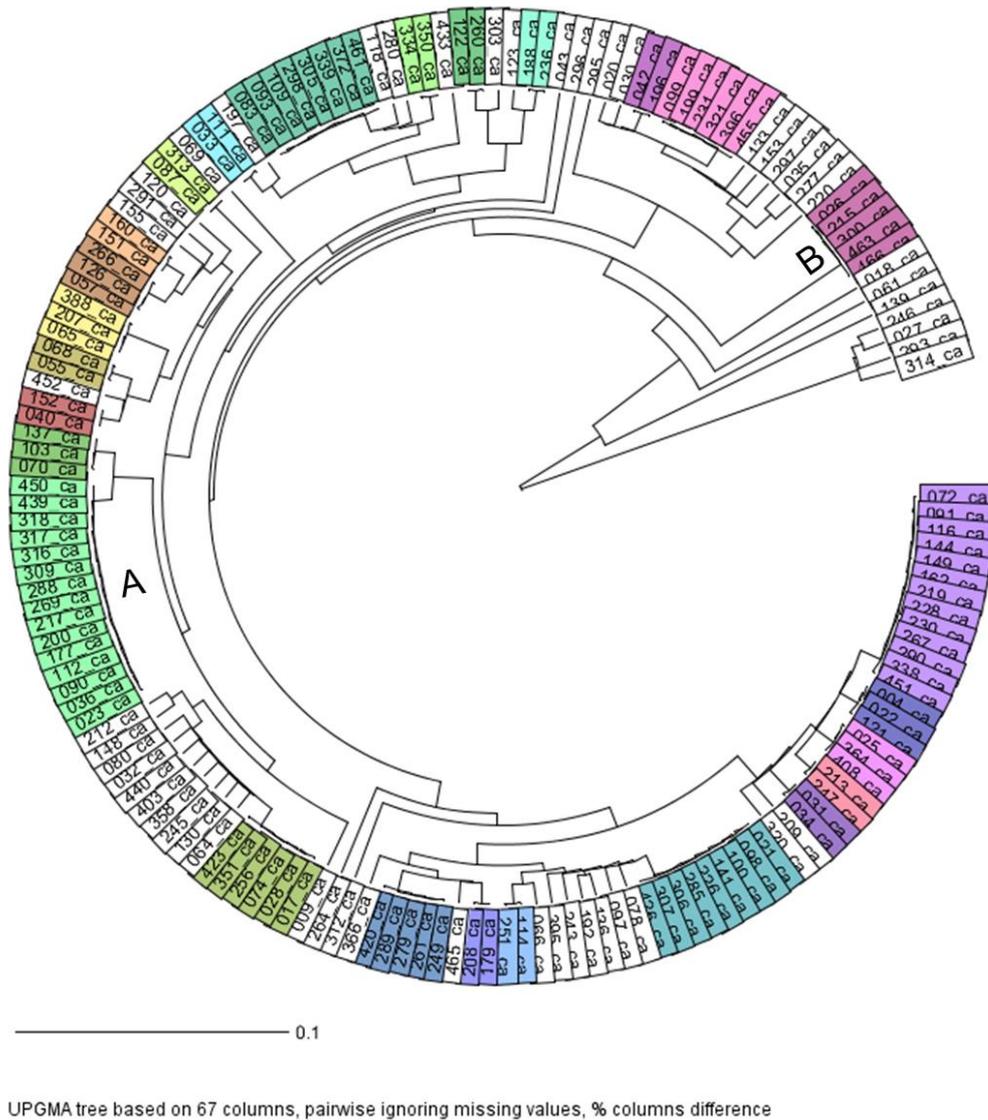


Figure 43 : Dendrogramme des isolats de la famille Cameroun obtenu par spoligotypage et typage MIRU-VNTR

Chaque couleur indique une grappe différente ; les cas isolés sont représentés en blanc

- Dans la grappe A, les patientes 36 et 90 exerçant comme ménagères, toutes deux de sérologie VIH+ ont déclaré avoir été en contact avec un patient tuberculeux et résident respectivement à Mvog Ada et à Mvog Mbi suggérant un lien épidémiologique possible. Par ailleurs, les patients 112, 309 et 318 ont déclaré n'avoir pas été en contact avec un patient tuberculeux tous antérieurement traités et âgés d'au moins 50 ans.
- Dans la grappe B, nous sommes en présence de 5 cas de tuberculose ayant déclaré avoir été en contact avec un patient tuberculeux et exerçant comme

ménagères pour 3 d'entre eux et 2 élèves ; 2 des 5 cas résident à Ngousso. Ces données suggèrent un cas de lien épidémiologique probable.

III.2.1 Discussion partielle

Cette partie du travail avait pour objectif d'étudier la diversité génétique des souches du complexe *M. tuberculosis* et leur mode de circulation afin de mieux comprendre la dynamique de transmission de la tuberculose dans la région du Centre au Cameroun.

Le spoligotypage a été décrit comme un marqueur taxonomique remarquable du fait de la spécificité des signatures (spoligotypes) pour les différentes espèces du complexe *Mycobacterium tuberculosis* (Vincent and Guttierrez, 2000). Cependant, seules les signatures de *M. tuberculosis* et *M. bovis* ont été bien définies jusqu'à ce jour. L'absence des espaceurs 33-36 est caractéristique de l'espèce *tuberculosis sensus stricto*. L'espèce *bovis* est caractérisée par l'absence des espaceurs 39-43 tandis que l'absence des espaceurs 8, 9 et 39 est commune mais pas spécifique à l'espèce *africanum* (Streicher et al., 2007). L'identification des différentes espèces a été réalisée par comparaison des signatures de spoligotypage avec celle des souches de référence présentes dans la base de données SpolDB4 et à travers le dendrogramme généré avec les données de typage MIRU-VNTR. On a ainsi pu mettre en évidence que la tuberculose dans la région du Centre est essentiellement (96,7%) causée par l'espèce *M. tuberculosis*. *M.africanum* ne représente que 3% des isolats et *M. bovis* 0,3%. Cette observation corrobore celles de Assam-Assam et al., 2011 et Niobe-Eyangoh et al., 2003 qui avait montré une nette régression de *M. africanum* au profit de *M. tuberculosis* dans la région de l'Ouest Cameroun. Assam Assam et al., 2013 avait également rapporté une régression de *M. africanum* sur un échantillon très réduit dans la région du Centre. *M. africanum* est passé de 56% dans l'étiologie de la tuberculose humaine au Cameroun en 1971 à 9% en 2003 (Niobe-Eyangoh et al., 2003). Cependant, les facteurs qui contribuent à cette régression restent inconnus. En dépit de la forte prévalence de la tuberculose bovine au Cameroun (Njanpop-Lafourcade et al., 2001), l'espèce *bovis* reste faiblement impliquée dans les cas de tuberculose humaine. La même observation a été faite dans la région Ouest du Cameroun où un seul isolat avait été identifié dans une collection de 455 souches du complexe *tuberculosis* (Niobe-Eyangoh et al., 2003), de même au Burkina Faso, (Godreuil et al., 2007) ont relevé une absence de *M. bovis* dans une collection de 120 isolats. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les infections tuberculeuses dues à *M. bovis* sont le plus souvent à localisation

extrapulmonaire (Godreuil et *al.*, 2007), or seuls les échantillons des patients tuberculeux pulmonaires ont été inclus dans l'étude.

Les données de spoligotypage et de typage MIRU-VNTR sont en faveur d'une structure de la population très diversifiée au sein du complexe *M. tuberculosis*. On a pu identifier 12 familles génétiques dont 3 (Cameroun, Haarlem et Uganda I) représentent à elles seules 84,2% des isolats. Les 15,8% d'isolats restants ont été regroupés en 9 familles génétiques dont 3 non pas encore décrites. Parmi les nouvelles familles génétiques, on retrouve les familles Cameroon_H37Rv like, Uganda_like et New-1. Afanas'ev et *al.*, 2011 ont associé la forte hétérogénéité au sein des isolats du complexe *M. tuberculosis* dans une étude réalisée en Russie à une augmentation du flux migratoire dans ce pays. Dans la région du Centre-Cameroun, cette grande diversité au sein des isolats du complexe *Mycobacterium tuberculosis* contraste avec la forte homogénéité observée dans les pays de forte endémicité tuberculeuse. En Asie du Sud-Est, la structure de la population est dominée par la famille Beijing qui représente à elle seule 75 à 90% des cas de tuberculose selon les régions (Wang et *al.*, 2011, Yuan et *al.*, 2013, Zhang et *al.*, 2012) et caractérisée par très peu de familles génétiques circulantes. Parmi les 298 isolats ayant donné des résultats de génotypage exploitables, 161 (54,0%) appartenaient à la famille Cameroun, le génotype ST61 (128/161 ; 79,5% des isolats de la famille Cameroun) étant le plus représenté. Une première étude sur la diversité génétique de *Mycobacterium tuberculosis* réalisée dans la région de l'Ouest sur 455 isolats avait montré une large prédominance (42%) du spoligotype ST61 caractérisé par l'absence des espaceurs 23-25 et 33-36 qui avait été baptisé alors « famille Cameroun » (Niobe-Eyangoh et *al.*, 2003). La prédominance du spoligotype ST61 qui résulterait d'une expansion récente (Niobe-Eyangoh et *al.*, 2003) a été rapportée du Burkina Faso (30%) (Godreuil et *al.*, 2007), au Bénin (21%) (Affolabi et *al.*, 2009), du Nigeria (52%) (Thumamo et *al.*, 2011) au Tchad (33%) (Diguimbaye et *al.*, 2006). Bien que les raisons exactes de la sélection de cette famille et sa dissémination soient inconnues, il a été suggéré que la vaccination BCG qui est une pratique courante au Cameroun pourrait jouer un rôle dans la sélection de la famille Cameroun au profit des autres familles génétiques (Niobe-Eyangoh et *al.*, 2003). La prédominance de la famille Cameroun serait limitée sur la côte Ouest africaine et

dans la région caribéenne. En revanche, une étude conduite en Sierra Leone, un pays de la côte Ouest africaine a reporté seulement 4% des souches appartenant à la famille Cameroun (Homolka et al., 2008). La seconde famille la plus fréquente au sein des isolats du complexe *M. tuberculosis* dans cette étude était la famille Haarlem (23%). Il a été rapporté que cette famille est très répandue en Afrique centrale où l'on penserait qu'elle ait été introduite pendant la colonisation européenne (Filliol et al., 2002). Malgré le nombre d'immigrants chinois relativement important installé au Cameroun, nous avons noté une absence de la famille Beijing. Il a été rapporté que la famille Beijing est très rare dans les pays de la côte Ouest - Africaine (Niobe-Eyangoh et al., 2003). Une étude réalisée au Bénin a rapporté 10,3% des souches appartenant à la famille Beijing et ce génotype était associé à une résistance à la streptomycine (Affolabi et al., 2009). Même les mouvements de population du fait des échanges commerciaux entre le Cameroun et le Bénin n'ont pas favorisé l'importation de ces souches au Cameroun. Les familles Uganda I et Ghana circulant au Cameroun seraient probablement des cas importés de la maladie.

Les efforts de contrôle de la tuberculose en direction de la prévention de la transmission active de la maladie dans la communauté diffèrent de ceux déployés pour la prévention des réactivations des infections latentes. De ce fait, l'apport du génotypage pour les programmes de lutte contre la tuberculose réside dans la compréhension de la dynamique de transmission à travers une estimation de la contribution relative de la transmission active (versus les réactivations) dans l'épidémiologie de la maladie. En épidémiologie de la tuberculose, la transmission récente s'oppose à la réactivation endogène pour expliquer l'apparition des cas de tuberculose. L'épidémiologie moléculaire est basée sur l'hypothèse que les patients infectés par une même souche de *M. tuberculosis* sont le résultat d'une transmission récente, alors que ceux infectés par des souches uniques (dans l'échantillon de souches considéré) sont des cas d'activation ou de réactivation d'une tuberculose plus ancienne (Schurch and van Soolingen, 2012). Sous cette hypothèse, l'index de transmission récente est une mesure de la transmission active dans la population étudiée. Cependant, l'interprétation traditionnelle de l'index de transmission récente comme mesure de la transmission active dans la population est controversée (Glynn

et *al.*, 1999). En plus de la mesure de l'index de transmission récente, l'évaluation de la contribution de la transmission active dans l'épidémiologie de la maladie dans une population donnée devrait tenir compte de la taille des grappes et de la diversité génétique des souches dans la population étudiée (Murray, 2002).

Dans cette étude, nous avons noté une grande diversité de souches dans la région du Centre du Cameroun avec 164 génotypes différents parmi les 298 isolats génotypés avec succès. Cent vingt-quatre des 164 génotypes étaient uniques et les 40 autres constituaient des grappes regroupant 173 isolats et résultant en un index de transmission récente de 44%. Toutefois, malgré la présence de larges grappes (une grappe de 27 souches dans la famille Haarlem, une grappe de 15 souches et une autre de 13 souches dans la famille Cameroun), 70% des grappes avaient moins de 4 isolats. Cette observation contraste fortement avec l'hypothèse selon laquelle la structure de population de *M. tuberculosis* dans les pays de forte endémicité est relativement homogène avec peu de souches circulantes (Hermans et *al.*, 1995). Par ailleurs, certaines études réalisées en contexte de forte endémicité tuberculeuse ont montré une grande diversité au sein des isolats de *M. tuberculosis* (Warren et *al.*, 2006) ; ce qui a conduit Murray explorer l'influence de la prévalence de la tuberculose latente sur la distribution des grappes. Le modèle développé par Murray prédit que les zones de forte endémicité tuberculeuse pourraient avoir une diversité relativement grande en raison d'une prévalence élevée de la tuberculose latente qui conduit à une augmentation de l'incidence de la tuberculose active due à une augmentation des cas de réactivation. Braden et *al.*, ont également émis l'hypothèse selon laquelle une grappe pourrait résulter d'une réactivation simultanée d'infections appartenant à une même chaîne infectieuse potentielle et acquises dans un passé lointain. Sous cette hypothèse, les cas appartenant à une même grappe ne traduisent pas nécessairement des cas de transmission récente. Si l'hypothèse de l'importance de la réactivation des infections latentes pourrait justifier la grande diversité et la faible taille des grappes observées dans cette étude, les réactivations seraient le résultat de l'infection à VIH. La comparaison de la taille des grappes entre les deux grandes familles (Cameroun et Haarlem) qui représentaient plus des trois quarts des souches de *M. tuberculosis* circulants a montré que la famille Cameroun était plus diversifiée avec plus de grappes de petite taille que la famille Haarlem. Nous avons également noté que la co-infection TB-VIH était moins fréquente dans

famille Haarlem comparée à la famille Cameroun (20,3% contre 33,5%). L'épidémiologie de la tuberculose dans la région du Centre pourrait donc être le reflet d'une combinaison de la transmission active et des réactivations d'infections tuberculeuses latentes dues au VIH. Les interventions du programme de lutte contre la tuberculose devraient être orientés à la fois vers la réduction de la transmission active dans la population (détection et le traitement des cas actifs) et la réactivation (dépistage des infections latentes).

La présence de quelques grappes de grande taille suggèrerait la présence de chaînes de transmission en cours dans la communauté, d'où la nécessité d'identifier les facteurs de risque associés pour développer des stratégies de lutte adaptées. Plusieurs études particulièrement dans les pays développés ont montré une association entre le jeune âge, le genre masculin et la sérologie VIH et la formation de grappes (Afanas'ev et *al.*, 2011). A l'inverse, les études réalisées dans les pays en voie de développement n'ont rapporté aucune association entre ces facteurs et la formation de grappes (Affolabi et *al.*, 2009, Niobe-Eyangoh et *al.*, 2003, Godreuil et *al.*, 2007). Néanmoins, des travaux publiés au Bénin (Affolabi et *al.*, 2009) et en Guinée équatoriale (Tudo et *al.*, 2004b) ont montré une association entre la résistance aux antituberculeux et la formation de grappes. Dans cette étude, le seul facteur associé à la formation des grappes était la famille génétique avec des tendances plus élevées de former des grappes dans les familles Cameroun $RC=2,33$ (95%IC [1,06-5,13]) et Haarlem $RC=2,34$ (95%IC [0,96-5,68]) comparées aux autres familles génétiques. Des hypothèses sur les liens épidémiologiques n'ont pu être établies dans toutes les grappes majeures. En effet, la transmission entre patients peut s'opérer à l'occasion des contacts occasionnels (dans un taxi, à l'école, dans un bar, dans une formation sanitaire, au marché etc.) difficiles à repérer. De plus, la contamination pourrait avoir eu lieu à un moment donné dans le passé et la durée relativement courte de l'étude ne permet pas d'identifier les cas index et tous les cas secondaires. Ces liens épidémiologiques pourraient être révélés par des investigations autour des cas. Cependant, pour des contraintes pratiques, nous n'avons pu réaliser une enquête de contact.

Aucune association n'a été retrouvée entre les génotypes et la résistance aux antituberculeux d'une part et entre les génotypes et l'infection à VIH d'autre part.

Une étude conduite au Swaziland avait émise l'hypothèse selon laquelle l'infection à VIH qui induit une immunodéficience, modifie la relation sympatrique qui existe entre *M. tuberculosis* et son hôte humain avec une tendance à l'augmentation de l'infection à VIH chez les patients tuberculeux infectés par un genotype de *M. tuberculosis* allopatrique (Fenner et *al.*, 2013).

Le typage MIRU-VNTR a permis de mettre en évidence 4 cas de tuberculose impliquant plusieurs souches encore appelés infections mixtes définies par la présence de 2 ou plusieurs versions alléliques à 2 ou plusieurs loci MIRU (Supply et *al.*, 2006). Ces infections mixtes pourraient être à l'origine d'échecs thérapeutiques en cas de profils de sensibilité différents. Des échecs de PCR ont été observés pour certains isolats au niveau d'un locus. Les loci les plus impliqués étaient le locus Mtub39 et le locus Qub11b qui ont donné respectivement 25 et 5 échecs de PCR parmi les 298 souches étudiées. Ces observations sont rapportées dans la littérature et pourraient s'expliquer par des délétions chromosomiques ou des polymorphismes nucléotidiques dans les séquences complémentaires aux amorces (Shamputa et *al.*, 2010). La variabilité au niveau d'un locus MIRU-VNTR spécifique varie en fonction de l'endémicité ou la prédominance de clones dans certaines régions géographiques. La diversité allélique pour chaque locus MIRU-VNTR a été évaluée pour l'ensemble des isolats et pour les isolats appartenant à la famille *Cameroun*.

Au sein des isolats de la famille *Cameroun*, 8 loci se sont révélés non informatifs. Il s'agissait des loci MIRU4, Mtub30, QUB4156, MIRU2, MIRU20, MIRU23, MIRU24 et ETR-B. Dans son étude sur la caractérisation moléculaire des souches de la famille *Cameroun*, (Niobe-Eyangoh et *al.*, 2004) avait observé que les loci MIRU2, MIRU4, MIRU20, MIRU23 et MIRU24 ne présentaient pas de variations dans leur nombre de copies. Par contre, les loci MIRU10, MIRU31 et MIRU39 qui semblaient « gelés » selon ses observations, ont présenté des variations dans leur nombre de copies dans cette étude. Nous avons observé 3 allèles différents pour le MIRU10, et 2 allèles différents pour chacun des MIRU31 et MIRU39. Cette observation suggère une possible évolution dans la famille *Cameroun* dix ans après sa caractérisation. Il est important de noter que le pouvoir discriminatoire du typage MIRU-VNTR dans le format à 24 loci était aussi élevé (0,97) que celui obtenu avec la combinaison avec spoligotypage (0,98). Nous avons identifié un set minimal de 15

loci permettant de discriminer les isolats dans la famille Cameroun avec un pouvoir discriminatoire (0,975) aussi élevé que celui obtenu avec le schéma à 24 loci. Ce schéma alternatif de typage pourrait permettre d'économiser les ressources pour sous-typer les isolats appartenant à la famille Cameroun après la réalisation du spoligotypage.

III.3 CARACTERISATION DES MUTATIONS ASSOCIEES A LA RESISTANCE A L'ISONIAZIDE, A LA RIFAMPICINE ET A LA STREPTOMYCINE ET ANALYSE DES LIENS GENETIQUES ENTRE LES SOUCHES RESISTANTES

III.3.1 Mutations conférant la résistance à l'isoniazide

Les tests de sensibilité à l'isoniazide ont été réalisés à 0,2 µg/mL et 1 µg/mL permettant ainsi de définir des résistances de bas et de haut niveau respectivement. Au total 18 isolats du complexe *Mycobacterium tuberculosis* résistants à l'isoniazide ont été amplifiés et séquencés pour la recherche des mutations au niveau des gènes *katG*, *inhA* et *ahpC*.

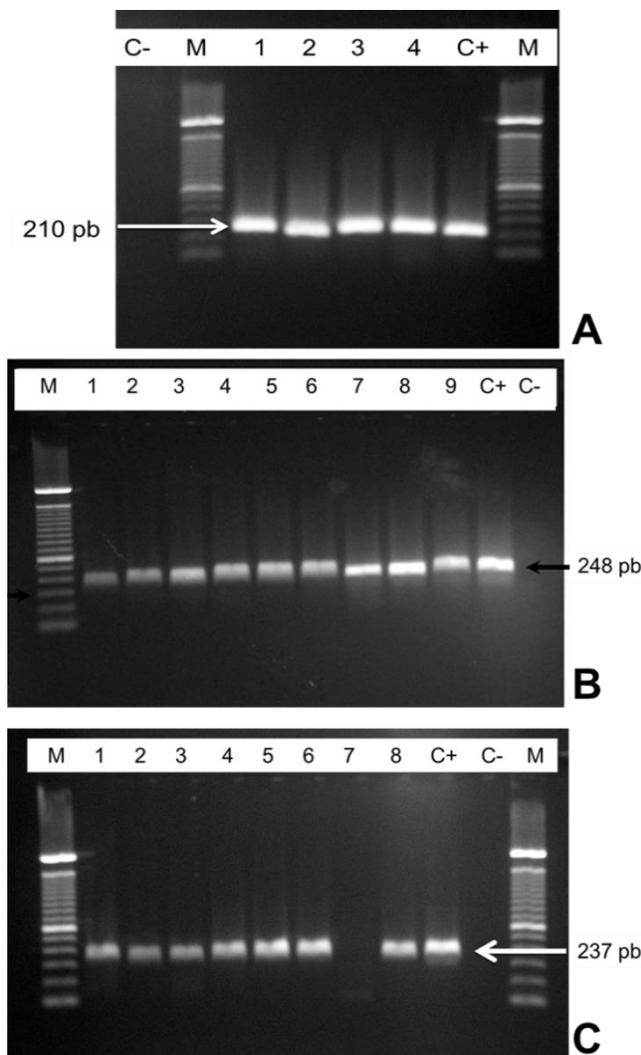


Figure 44: Profil d'électrophorèse des produits de PCR amplifiant le gène *katG* (A), le gène *inhA* (B) et le gène *ahpC* (C).

1-9 : échantillons, M : Marqueur de poids moléculaire (100 pb), C- : Contrôle négatif (mix PCR sans ADN), C+ : Contrôle positif (*M. tuberculosis* H37Rv).

Après amplification et migration sur gel d'agarose des régions amplifiées des gènes *katG*, *inhA* et *ahpC*, le profil d'électrophorèse montre des bandes uniformes attendues respectivement à 210 pb, 248 pb et 237 pb (Figure 44).

Les isolats n'ayant présenté aucune mutation dans les 3 gènes étudiés pour la résistance à l'isoniazide ont été amplifiés à l'aide d'amorces permettant d'amplifier tout le cadre de lecture du gène *katG*. Après électrophorèse, le profil a montré pour 3 des 4 échantillons le fragment attendu de 2400 pb (Figure 41). Ce fragment était absent pour un des échantillons où on a observé un fragment d'amplification de plus petite taille, signe d'une possible délétion partielle au niveau du gène.

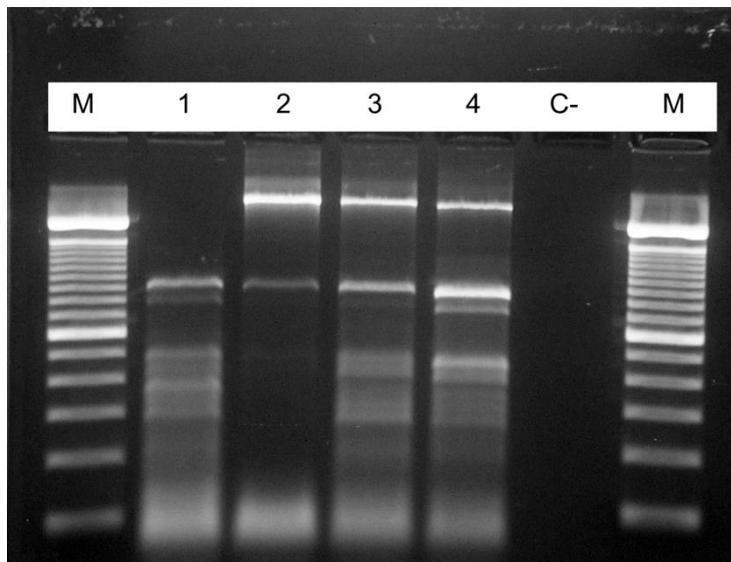


Figure 45: Profil d'électrophorèse d'amplification du gène *katG* pour les isolats n'ayant pas présenté de mutations dans la région 315

1-4 : échantillons, M : Marqueur de poids moléculaire (1 kb), C- : Contrôle négatif (mix PCR sans ADN).

III.3.1.1 Polymorphismes dans le gène *katG*

Parmi les 18 isolats résistants à l'isoniazide, 10 présentaient une résistance de haut niveau et 8 une résistance de bas niveau.

Des 10 isolats présentant une résistance de haut niveau, 9 (90%) ont présenté des altérations génétiques au niveau du gène *katG*. Ces altérations étaient de deux types, 8 (80%) avaient une mutation ponctuelle affectant le codon 315 du gène et un isolat a présenté une délétion partielle au niveau du gène (Tableau XXVII). Parmi les 8 isolats altérés au niveau du gène *katG315*, 4 présentaient une mutation

additionnelle dans la région promotrice du gène *inhA* (2 en position -15C→T et 2 en position -47 G→C). La mutation affectant le codon 315 aboutissait au changement de G en C (AGC → ACC) résultant à la substitution de la sérine en thréonine (Figure 46). La mutation *katG315* n'a été observée chez aucun isolat de faible niveau de résistance. Cette mutation semble donc être associée à une résistance à l'isoniazide de haut niveau. Aucun des isolats sensibles à l'isoniazide n'a présenté une mutation au niveau du gène *katG*. Ainsi, pour la détection de la résistance de haut niveau à l'isoniazide, la mutation/altération du gène *katG* a une spécificité de 100% et une sensibilité de 90%.

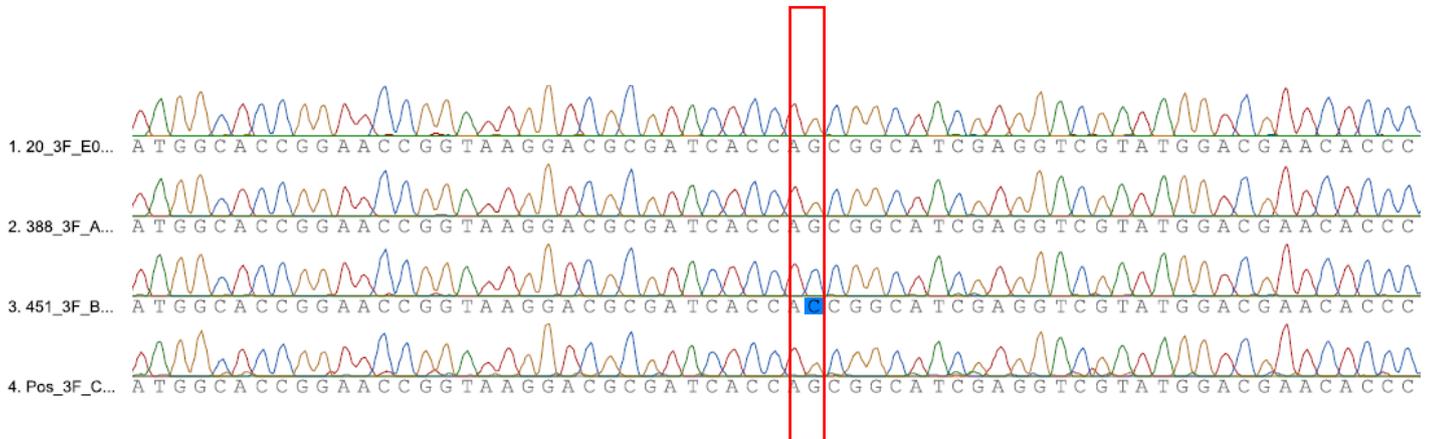


Figure 46: Mutation affectant le gène *katG* en position 315 AGC → ACC

III.3.1.2 Polymorphismes dans le gène *inhA*

Deux types de mutations ont été observés dans la région promotrice du gène *inhA*. Une mutation aboutissant à la transition de C en T en position -15 en amont du gène (Figure 47) a été observée pour 4 des 8 isolats de bas niveau de résistance soit 50%. La substitution de G en C en position -47 en amont du gène était présente chez 2 isolats de haut niveau de résistance (ces isolats présentaient la mutation *katG315*), et chez 9 isolats sensibles à l'isoniazide (Tableau XXVII). La mutation -15C→T du gène *inhA* a été observée chez 2 isolats de haut niveau de résistance. Cependant, ces isolats avaient une mutation *katG315* additionnelle. La mutation -15C→T semble donc être associée à une résistance à l'isoniazide de faible niveau. Aucun des isolats sensibles à l'isoniazide n'a présenté la mutation -15C→T au niveau du gène *inhA*. Ainsi, pour la détection de la résistance de bas niveau à

l'isoniazide, la mutation/altération du gène *katG* a une spécificité de 100% et une sensibilité de 50%.

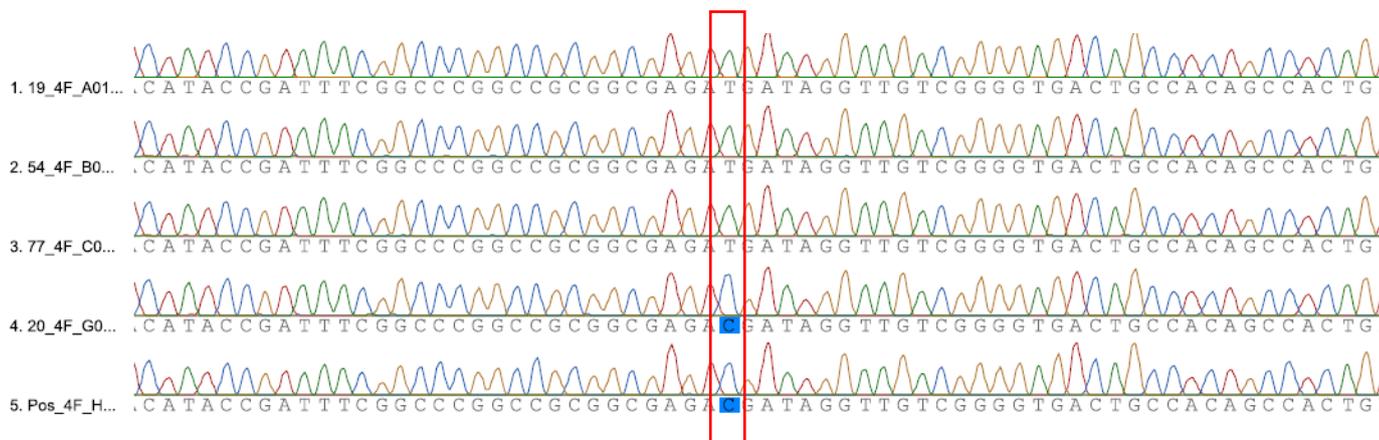


Figure 47: Mutation affectant la région promotrice du gène *inhA* en position -15
C→T

III.3.1.3 Polymorphismes dans le gène *ahpC*

La mutation observée dans la région promotrice du gène *ahpC* était une substitution de G par A en position -32 (Figure 48). Cette mutation était présente chez un isolat de faible niveau de résistance (Tableau XXVII).

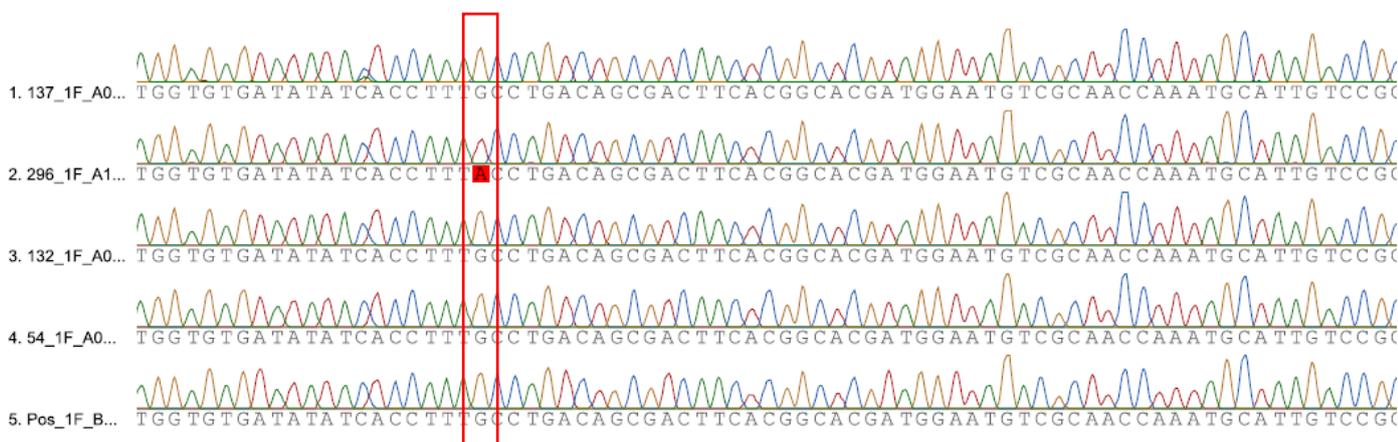


Figure 48 : Mutation affectant la région promotrice du gène *ahpC* en position -32
G→A

Tableau XXVII : Caractéristiques mutationnelles des isolats au niveau des gènes *katG*, *inhA* et *ahpC*

Phénotype	Type et localisation des mutations						Nombre d'isolats	
	<i>katG</i>		<i>inhA</i>		<i>ahpC</i>		haut niveau	bas niveau
	nucléotide	aminoacide	nucléotide	aminoacide	nucléotide	aminoacide		
50 INH^S	Type sauvage	-/-	Type sauvage	-/-	Type sauvage	-/-	-/-	-/-
	315 AGC →ACC	Ser→Thr	Type sauvage	-/-	Type sauvage	-/-	5	0
	Délétion partielle	-/-	Type sauvage	-/-	Type sauvage	-/-	1	0
	315 AGC →ACC	Ser→Thr	-15C →T	-/-	Type sauvage	-/-	2	0
18 INH^R	315 AGC →ACC	Ser→Thr	-47G →C	-/-	Type sauvage	-/-	2	0
	Type sauvage	-/-	-15C →T	-/-	Type sauvage	-/-	0	4
	Type sauvage	-/-	Type sauvage	-/-	-32G→A	-/-	0	1
	Type sauvage	-/-	Type sauvage	-/-	Type sauvage	-/-	0	3

INH^R : isolat résistant à l'isoniazide Ser : Serine Thr : Threonine

III.3.2 Mutations conférant la résistance à la rifampicine

Les tests de sensibilité à la rifampicine sur milieu Löwenstein Jensen ont permis de détecter 5 isolats présentant un phénotype de résistance. Ces isolats ont été séquencés dans une région de 128 pb du gène *rpoB*.

Après amplification et migration sur gel d'agarose de la région amplifiée du gène *rpoB*, le profil électrophorétique a montré des bandes uniformes attendues à 128 pb (Figure 49).

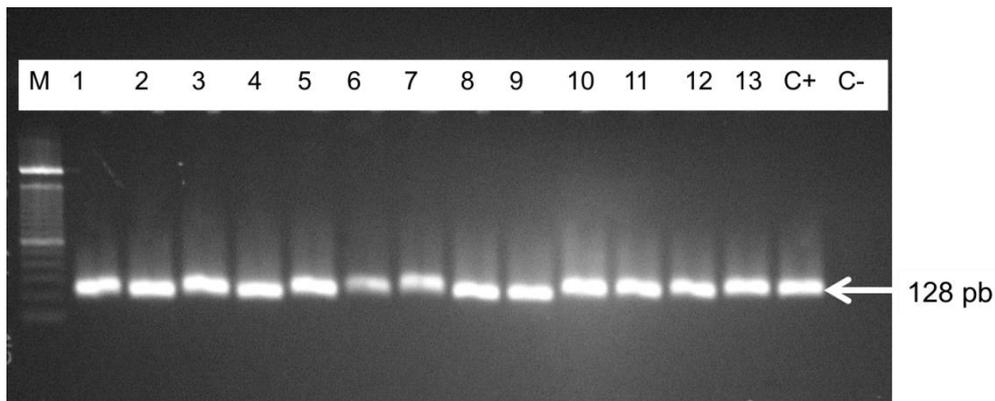


Figure 49 : Profil d'électrophorèse des produits de PCR amplifiant le gène *rpoB*

1-13 : échantillons, M : Marqueur de poids moléculaire (100 pb), C- : Contrôle négatif (mix PCR sans ADN), C+ : Contrôle positif (*M. tuberculosis* H37Rv).

Des altérations ont été observées chez 4 des 5 (80%) isolats résistants à la rifampicine. Les mutations identifiées affectaient exclusivement le codon 531 et aboutissaient à la transition de la cytosine en guanine résultant en une substitution de la serine en leucine (Figure 50). Toutes les 2 souches MDR ont présenté la mutation *rpoB531* (Tableau XXVIII).

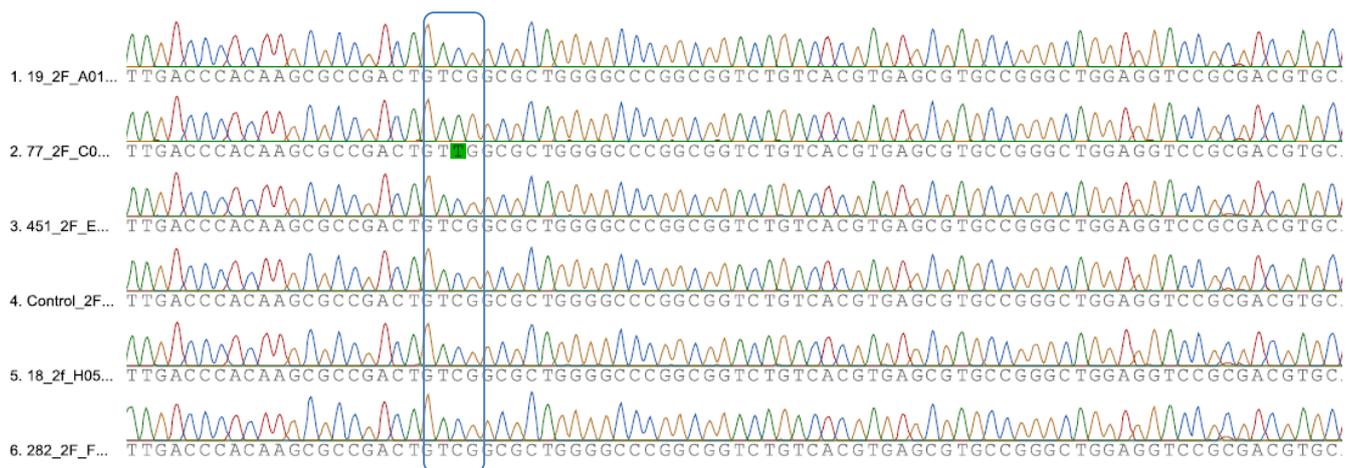


Figure 50 : Mutation affectant le gène *rpoB* en position 531 TCG → TTG

Une mutation dans le gène *rpoB* a été observée chez un isolat sensible à la rifampicine. Il s'agissait d'une transition de la guanine en thymine au niveau du codon 516 aboutissant à la substitution de l'aspartate en tyrosine (Figure 51).



Figure 51 : Mutation affectant le gène *rpoB* en position 516 GAC → TAC

III.3.3 Mutations conférant la résistance à la streptomycine

Au total 7 isolats ayant présenté un phénotype de résistance à la streptomycine ont été amplifiés et séquencés pour la recherche des mutations au niveau des gènes *rrs* et *rpsL*.

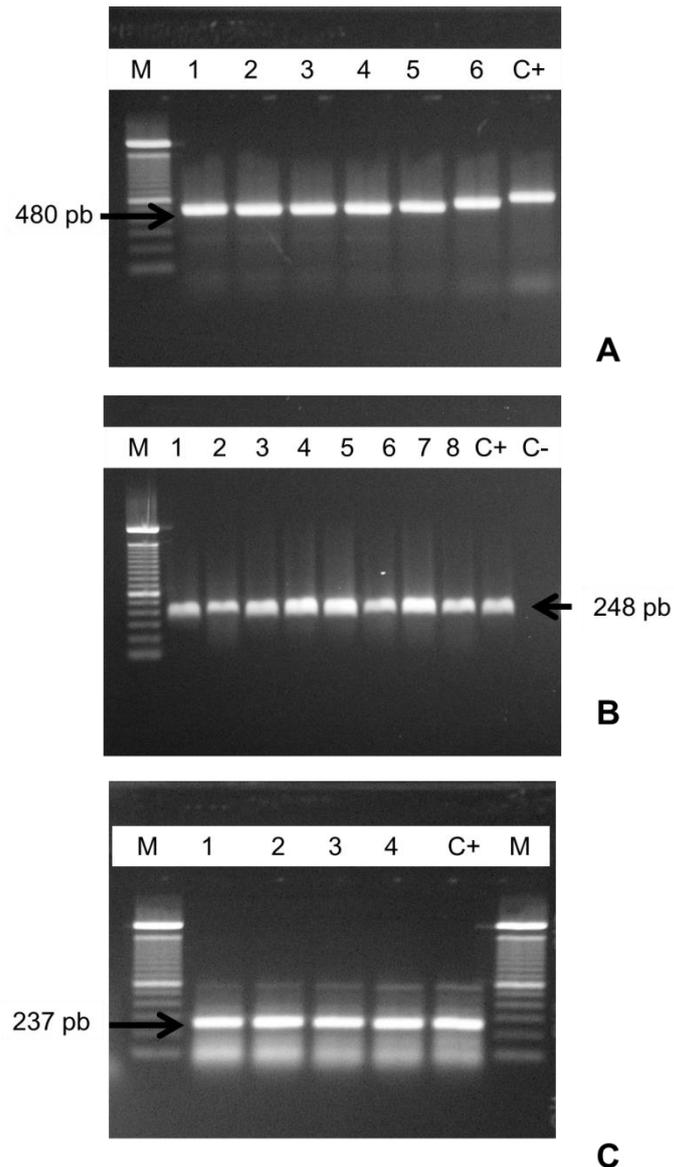


Figure 52 : Profil d'électrophorèse des produits de PCR amplifiant le gène *rpsL* (A), la boucle *rrs 530* (B) et la boucle *rrs 912* (C).

1- : échantillons, M : Marqueur de poids moléculaire (100 pb), C- : Contrôle négatif (mix PCR sans ADN), C+ : Contrôle positif (*M. tuberculosis* H37Rv).

Après amplification et migration sur gel d'agarose des régions amplifiées des gènes *rpsL*, *rrs 530* et *rrs 912*, le profil électrophorétique a montré des bandes uniformes attendues respectivement à 500 pb, 248 pb et 237 pb (Figure 52).

Toutes les souches résistantes à la streptomycine n'ont montré aucune mutation dans le gène *rrs*, tandis que pour le gène *rpsL* seul un isolat était génotypiquement altéré (Tableau XXIX). Il s'agit d'une substitution de l'adénine en

guanine au niveau du codon 43 (**AAG** → **AGG**) qui a abouti à la substitution de la lysine par l'arginine (Figure 53). Aucun des isolats sensibles à la streptomycine n'a présenté cette mutation.

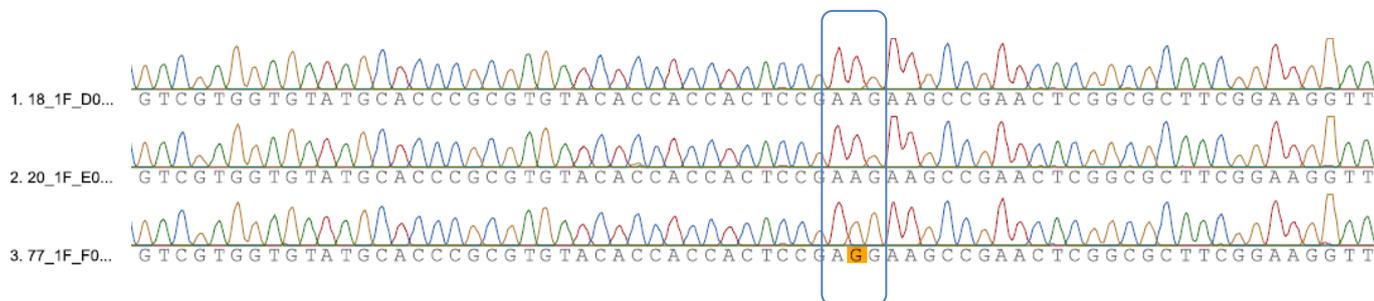


Figure 53 : Mutation affectant le gène *rpsL* en position 43 **AAG** → **AGG**

Tableau XXVIII : Caractéristiques mutationnelles des isolats au niveau du gène *rpoB*

Phénotype	Changement de nucléotide	Changement d'acide aminé	Type de résistance	No d'isolats
50 RIF^S	516 GAC →TAC	Asp →Tyr	-/-	1
5 RIF^R	531 TCG →TTG	Ser → Leu	MDR	2
	531 TCG →TTG	Ser → Leu	RIF	1
	531 TCG →TTG	Ser → Leu	RIF-SM	1
	Type sauvage	-/-	RIF	1
RIF ^R : isolat résistant à la rifampicine Aspartate Tyr : Tyrosine	RIF ^S : isolat sensible à la rifampicine MDR : isolat multirésistant	Ser : Serine RIF : Rifampicine	Leu : Leucine SM : Streptomycine	Asp :

Tableau XXIX : Caractéristiques mutationnelles des isolats au niveau des gènes *rpsL* et *rrs*

Phénotype	Type et localisation des mutations						No d'isolats
	<i>rpsL</i>		Boucle <i>rrs</i> 530		Boucle <i>rrs</i> 912		
	Nucléotide	Acide aminé	Nucléotide	Acide aminé	Nucléotide	Acide aminé	
50 SM^S	Type sauvage	-/-	Type sauvage	-/-	Type sauvage	-/-	
	43 AAG →AGG	Lys→Arg	Type sauvage	-/-	Type sauvage	-/-	1
7 SM^R	Type sauvage	-/-	Type sauvage	-/-	Type sauvage	-/-	1
	Type sauvage	-/-	Type sauvage	-/-	Type sauvage	-/-	4
	Type sauvage	-/-	Type sauvage	-/-	Type sauvage	-/-	1
SM ^R : isolat résistant à la streptomycine	SM ^S : isolat sensible à la streptomycine	Lys : Lysine	Arg : Arginine				

III.3.4 Analyse des liens génétiques entre les souches résistantes

Pour une meilleure lisibilité dans l'analyse des liens génétiques entre les souches résistantes, un dendrogramme a été représenté pour tous les isolats résistants ainsi que les différentes mutations identifiées et le statut des patients par rapport à un traitement antituberculeux antérieur (Figure 54). Le dendrogramme montre que parmi les 28 isolats résistants, 20 (71,4%) ont des profils génétiques uniques tandis que les 8 autres étaient regroupés en 3 grappes (2-4 isolats par grappe) résultant en un index de transmission récente de 0,17. La plus grande grappe comprenait 4 isolats appartenant à la famille Cameroun dont 2 monorésistants à l'INH, 1 monoresistant à la KAN et 1 polyrésistant INH-SM.

Cependant, seuls les cas en grappes présentant des profils de résistance et des mutations associées identiques suggéraient fortement des cas de transmission probable patient-patient. Ainsi les 2 cas en grappe de la famille Cameroun monrésistants à l'INH et portant la même mutation Ser315Thr suggèrent une transmission patient-patient probable. De même, dans la grappe de la famille Cameroun comprenant 4 cas dont 2 monorésistants à l'INH portant la mutation Ser315Thr, on pourrait être en présence d'un cas de transmission patient-patient probable. Les 3 isolats multirésistants appartiennent à la famille Cameroun (n=2) et à une famille non définie (n=1) et sont tous des cas isolés.

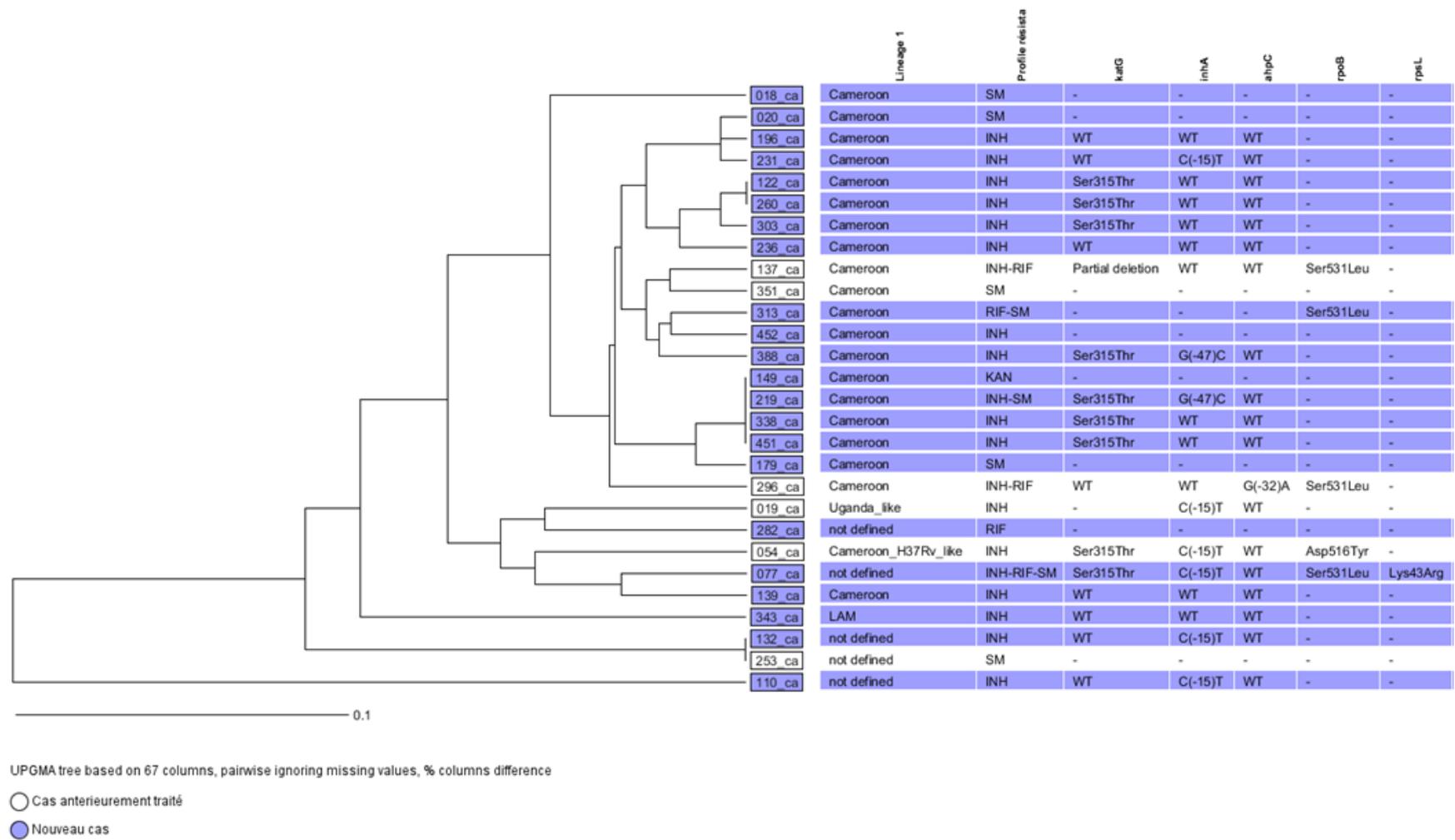


Figure 54 : Dendrogramme des 28 isolats résistants à au moins un antituberculeux

III.3.5 Discussion partielle

Cette partie avait pour objectif de caractériser les mutations associées à la résistance aux antituberculeux de première ligne afin d'évaluer le potentiel des marqueurs moléculaires dans la prédiction de la résistance à l'isoniazide, la rifampicine et la streptomycine et d'étudier les liens génétiques entre les souches résistantes.

La distribution de la résistance chez les nouveaux et les cas antérieurement traités a montré une fréquence de résistance plus élevée chez les cas antérieurement traités. Cependant, on a noté que cette différence n'était pas statistiquement significative ; au sens large, on pourrait dire qu'il existe un risque de développer une résistance aussi bien après une chimiothérapie antituberculeuse que d'être infecté par une souche déjà résistante. Il devient par conséquent urgent de trouver des méthodes qui soient capables de détecter rapidement les cas de résistance afin d'éviter la diffusion de souches résistantes dans la communauté. Dans notre contexte de pays à faibles ressources, la résistance aux antituberculeux n'est évaluée que dans le laboratoire de référence par culture de *M. tuberculosis* sur milieu solide en présence d'antibiotiques. Cette méthode est très lente et laborieuse, nécessitant plusieurs semaines pour obtenir des résultats. La connaissance des bases génétiques de la résistance aux antituberculeux a permis le développement de nouveaux tests moléculaires pour la détection des mutations associées à une résistance aux antituberculeux (Garcia de Viedma, 2003).

Parmi les techniques moléculaires utilisées pour détecter les mutations, le séquençage de l'ADN est le plus largement appliqué. Les mécanismes moléculaires expliquant la résistance n'étant pas clairement élucidés pour tous les antituberculeux (Abadi et al., 2009), le séquençage présente l'avantage, par rapport aux méthodes qui utilisent des sondes d'ADN, de permettre la détection des mutations inconnues. La majorité des isolats de cette étude provenait de l'hôpital Jamot, Centre de référence pour le Diagnostic et le Traitement des maladies pulmonaires à travers le Cameroun. Par conséquent, les données obtenues dans cette étude pourraient être représentatives des souches de *Mycobacterium tuberculosis* circulant dans cette région.

Deux mécanismes moléculaires ont principalement été associés à la résistance à l'isoniazide ; les mutations dans le gène *katG* codant pour la catalase peroxydase responsable de l'activation de l'isoniazide et les mutations dans le gène *inhA*, la cible finale éventuelle de l'isoniazide activé (Guo et al., 2006). Dans cette étude, 10 (55,6%) des isolats résistants à INH étaient altérés au niveau du gène *katG*. Parmi ces 10 isolats génétiquement altérés, 9 présentaient une mutation au niveau du codon 315. Cette mutation Ser315Thr du gène *katG* a été rapportée comme la plus fréquente dans les isolats de *Mycobacterium tuberculosis* en Russie (76,9%) (Afanas'ev et al., 2007), au Maroc (68,6%) (Chaoui et al., 2009), dans les isolats de la famille LAM au Cameroun (Penlap et al., 2010) et aussi en Corée (49,1%) (Cho et al., 2009). La fréquence et le type de mutation conférant une résistance à l'isoniazide varient entre les régions géographiques (Afanas'ev et al., 2007). Une étude menée en Guinée équatoriale a signalé l'absence de mutations dans le gène *katG* chez les isolats de *Mycobacterium tuberculosis* (Tudo et al., 2004). Il a été suggéré par Kiepiela et al., 2000 que la détection moléculaire de la résistance à l'isoniazide soit effectuée par l'analyse du codon 315 du gène *katG*. Dans cette étude, 4/18 (22,2%) des isolats résistants à l'isoniazide sans altération génétique au niveau du gène *katG* ont présenté des mutations dans le gène *fabG1-inhA*. On a observé une corrélation entre le type des mutations et le niveau de résistance à l'isoniazide. Plusieurs autres études ont rapporté que des mutations dans le gène *inhA* ou sa région promotrice sont habituellement associées à une faible résistance à l'INH. Par ailleurs, les isolats résistants à INH et présentant des mutations au niveau gène *inhA* pourraient avoir des mutations supplémentaires dans le gène *katG*, leur conférant ainsi un niveau élevé de résistance à l'INH (Zhang and Yew, 2009). Il serait intéressant de combiner les mutations *katG315* et -15C→T du gène *inhA* dans la détection moléculaire de la résistance à l'isoniazide. Trois isolats résistants à l'isoniazide n'ont présenté aucune mutation dans les trois loci analysés. Cette discordance entre les résultats phénotypiques et génotypiques de résistance pourrait être attribuée à la présence d'autres mutations situées soit à l'extérieur de la région cible sélectionnée, soit dans les gènes autres que ceux sélectionnés.

Un fragment de 128 pb du gène *rpoB* couvrant les codons 507 à 533 a été amplifié et séquencé pour la détection des mutations chez les souches résistantes à la rifampicine. Quatre (80%) des 5 souches résistantes à la rifampicine ont présenté

des mutations dans la RRDR. Il s'agissait des altérations affectant le codon 531 où le nucléotide C'était remplacé par le nucléotide T. Cette mutation a également été reportée comme étant la plus fréquente (68%) dans des isolats de *Mycobacterium tuberculosis* de la famille LAM au Cameroun (Penlap et al., 2010). Bien que le nombre de souches résistantes analysé était relativement faible, les résultats sont similaires à ceux rapportés en Russie (Afanas'ev et al., 2007), aux Etats-Unis (Campbell et al., 2011), en Tunisie (Soudani et al., 2007), au Ghana (Homolka et al., 2010) et en Allemagne (Hillemann et al., 2005). Toutes les souches multirésistantes avaient une mutation au niveau du gène *rpoB*. Le gène *rpoB* pourrait être utilisé comme un marqueur de la multirésistance pour les souches de *M. tuberculosis*. Cette observation avait également été rapportée par (Penlap et al., 2010) pour les souches de la famille LAM au Cameroun.

Une des souches résistantes à la rifampicine n'a présenté aucune mutation dans la région *Rifampicin Resistance Determining Region* (RRDR) du gène *rpoB*. Il a été rapporté que 10% environ des souches rifampicine résistantes ne présentent pas des mutations dans la RRDR (Ramaswamy and Musser, 1998). La résistance naturelle à la rifampicine dans certains isolats de *M. avium* et *M. intracellulare* résulte d'une perméabilité insuffisante de la paroi cellulaire et la présence d'une barrière d'exclusion, suggérant que ces éléments peuvent également jouer un rôle important dans *M. tuberculosis* (Zaczek et al., 2009). Il a été rapporté que la mutation affectant le codon 516 du gène *rpoB*, résultant en la substitution de l'aspartate en tyrosine, induit une résistance avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'ordre de 12,5 à 25 µg/mL en système BACTEC 460-TB (Zaczek et al., 2009). Dans cette étude, le test de sensibilité à la rifampicine a été réalisé à une concentration de 40 µg/mL en milieu Löwenstein Jensen. Cela peut expliquer pourquoi la souche hébergeant cette mutation dans notre collection était phénotypiquement sensible à la rifampicine.

Dans le cas de la résistance à la streptomycine, aucune souche étudiée n'a montré une altération dans le gène *rrs*. Seul un isolat a présenté la mutation la plus fréquente lys43 → Arg dans le gène *rpsL*. Les isolats cliniques ne montrant aucun des mutations dans des gènes *rrs* et *rpsL* ont été décrits dans la littérature (Tudo et al., 2010). Cela a été attribué à des mécanismes alternatifs, comme des mutations dans le gène *gidB* (Silva et al., 2001) ou les pompes à efflux (Okamoto et al., 2007).

Les mutations *katG315* et *rpoB* ont montré de très bonnes sensibilités pour la détection de la résistance de haut niveau à l'isoniazide et la résistance à la rifampicine respectivement. Cependant, la corrélation entre le phénotype de résistance à la streptomycine et les marqueurs moléculaires *rpsL* et *rrs* reste faible. D'où la nécessité de conduire des études phénotypiques et génotypiques au niveau national afin d'identifier les marqueurs moléculaires les plus appropriés pour la détection de la résistance aux antituberculeux.

La détection moléculaire des résistances associée au typage moléculaire des souches correspondantes pourrait permettre d'identifier des chaînes de transmission dans la communauté et d'émettre des hypothèses sur le mode de circulation des souches résistantes. Dans les régions du monde où la prévalence des résistances aux antituberculeux est élevée, la structure de la population de *M. tuberculosis* est caractérisée par une expansion clonale et une faible diversité génétique (Gandhi et al., 2014) . Il apparaissait alors intéressant d'avoir l'image génotypique de la baisse du niveau de résistance dans la région du Centre au Cameroun. Parmi les 28 isolats résistants à au moins un antituberculeux, 20 avaient des profils génétiques distincts. Cette observation est en faveur d'une diversité génétique élevée au sein des souches résistantes. De plus, on n'a pu mettre en évidence aucune transmission de tuberculose multirésistante de patient à patient. L'absence d'expansion clonale associée à la baisse de la résistance aux antituberculeux seraient donc le reflet de la réorganisation du programme national de lutte contre la tuberculose.

Au terme de ce travail dont l'objectif était de décrire l'épidémiologie moléculaire de la tuberculose et de caractériser les mutations associées aux résistances à l'isoniazide, à la rifampicine et à la streptomycine ; nous pouvons dégager les points suivants :

- La fréquence de co-infection TB-VIH dans la population d'étude est de 29,1%. Elle est significativement associée au jeune âge et au genre féminin. La fréquence de résistance bien que élevée (9,41%) n'est pas alarmante comparée à certains pays de la région Subsaharienne. Bien que la fréquence de résistance soit plus élevée chez les cas déjà traités (17,14%) comparée aux nouveaux cas (8,42%), la différence observée n'était pas statistiquement significative.
- Les souches du complexe *Mycobacterium tuberculosis* circulant dans la région du Centre appartiennent à 12 familles génétiques dont les plus importantes sont les familles Cameroun (54%), Haarlem (21,5%) et Uganda I (8,7%). L'épidémiologie de la tuberculose dans cette région serait le reflet d'une combinaison de transmission active et de réactivations d'infections tuberculeuses latentes dues au VIH. Un set minimal de 15 loci permet de discriminer les isolats de la famille Cameroun aussi bien les isolats que le format à 24 loci.
- Les mutations *rpoB*, *katG315* et -15C→T du gène *inhA* ont montré de bonnes sensibilité et spécificité pour la détection de la résistance à la rifampicine et à l'isoniazide. Ces données sont en faveur de l'utilisation des techniques moléculaires comme le GeneXpert pour la détection de RIF^R et l'inclusion des mutations *katG315* et -15C→T pour la détection de INH^R. L'absence d'expansion clonale associée à la baisse de la résistance aux antituberculeux seraient le reflet de la réorganisation du programme national de lutte contre la tuberculose.

Les conclusions de ce travail ouvrent la voie vers de nouvelles perspectives qu'il conviendrait d'explorer à l'avenir pour une meilleure compréhension des caractéristiques de la tuberculose et de son agent causal au Cameroun. Ainsi, nous proposons de :

- Réaliser une étude d'épidémiologie moléculaire sur une durée plus longue afin de mieux apprécier la dynamique de transmission de la maladie ;
- Réaliser des études de phylogénie approfondies (à travers le séquençage complet du génome) pour suivre l'évolution de la famille *Cameroun* ;
- L'utilisation des systèmes d'information géographiques (SIG) pour modéliser la transmission dans la communauté ;
- Réaliser des enquêtes de contact en complément des études moléculaires ;
- Etudier la résistance à la Pyrazinamide ;
- Investiguer d'autres marqueurs moléculaires pour la détection de la résistance à l'isoniazide et à la streptomycine.

GLOSSAIRE

Analyse de grappes : analyse des données de typage obtenues sur un ensemble d'isolats bactériens dans le but de les regrouper selon leur similitude.

Complexe clonal: groupe d'isolats bactériens présentant un haut degré de similitude, idéalement sur la base de quasi- identité des profils de bandes d'un échantillonnage du génome. Le degré de similitude étant fonction de l'espèce étudiée, du marqueur épidémiologique et du cadre spatio-temporel de l'étude.

Dendrogramme: arbre binaire réalisé sur un nombre d'isolats pour une méthode de typage donnée et illustrant une analyse de grappes. En fonction de l'algorithme utilisé, chaque arbre représente les relations possibles entre les isolats inclus dans l'analyse. La base de l'arbre est constituée de toutes les comparaisons par paires entre les isolats inclus.

Dynamique de transmission : Etude des facteurs affectant la circulation et variabilité d'une population de micro-organismes dans le temps et l'espace et y compris les interactions entre ces facteurs.

Empreinte génétique : Motif, profil ou signature spécifique qui résulte de l'application d'une ou plusieurs méthodes de typage sur un isolat bactérien. Ces empreintes génétiques sont utilisées pour évaluer les liens épidémiologiques entre des isolats.

Épidémiologie : discipline qui a pour objet l'influence de divers facteurs (constitution individuelle, environnement, mode de vie, milieu social) sur les maladies, notamment sur leur fréquence, distribution et étiologie, ainsi que sur tout autre phénomène biologique ou social déterminé.

Epidémiologie moléculaire : Discipline qui a émergé en grande partie de l'intégration de la biologie moléculaire, la médecine clinique, les statistiques et l'épidémiologie. En substance, l'épidémiologie moléculaire se concentre sur le rôle des facteurs de risque génétiques et environnementaux, au niveau moléculaire / cellulaire ou biochimique, dans l'étiologie et la distribution de la maladie au sein des

populations. Plus spécifiquement pour les maladies infectieuses, l'épidémiologie moléculaire tente d'utiliser une approche multidisciplinaire pour identifier les facteurs qui déterminent les causes des maladies, la propagation / diffusion et la distribution (dans le temps et dans l'espace). Ceci est principalement réalisé en associant les caractéristiques épidémiologiques avec les propriétés biologiques des isolats cliniques récupérées à partir d'individus symptomatiques (Mathema et al., 2006).

Marqueur moléculaire : séquence d'ADN pouvant permettre de mettre en évidence un polymorphisme ou une mutation dans un génome donné. Sur cette base, il constitue un puissant outil dans l'identification des espèces, la détection des résistances et même les relations entre les isolats.

Pouvoir discriminatoire : probabilité moyenne qu'un système de typage attribue un type différent à deux souches non reliées, choisies au hasard, au sein d'un taxon donné. Il doit être > à 95% (risque maximal toléré de 5% de classer de manière incorrecte des isolats non liés épidémiologiquement dans le même type).

Résistance primaire : Résistance à un ou plusieurs antibiotiques observée chez un patient n'ayant jamais reçu auparavant de traitement antituberculeux.

Résistance secondaire : Résistance à un ou plusieurs antibiotiques observée chez un patient ayant déjà reçu un traitement anti-tuberculeux (soit plus de deux mois de traitement spécifique).

ANNEXE 1: CLAIRANCE ETHIQUE



COMITÉ NATIONAL D'ETHIQUE NATIONAL ETHICS COMMITTEE



N° d'enregistrement : FWA IRB00001954 BP 1937, Yaoundé, Tel: (237)-221 12 84
Arrêté N° 079 /A/MSP/DS du 22 OCTOBRE 1987 portant création et organisation d'un
Comité d'Ethique sur la recherche impliquant les êtres humains

cnecprot@yahoo.fr

Yaoundé, le 2 octobre 2009

AUTORISATION N° 126/CNE/SE/09

CLAIRANCE ETHIQUE

Le Comité National d'Ethique a examiné ce jour, le projet de recherche intitulé : *"HIV Prevalence, Anti-tuberculosis Drug Resistance and Molecular Studies of Mycobacterium Tuberculosis in Smear Positive Pulmonary Tuberculosis Patients in Yaoundé and Mbalmayo, Centre Region of Cameroon"* introduit par le Prof. Penlap Beng Véronique, Investigatrice Principale.

Le sujet a une valeur sociale certaine. Sa mise en œuvre sera une contribution significative à la prise en charge des patients souffrant de la tuberculose au Cameroun. Le protocole de recherche présenté présume un projet scientifiquement valide. Le projet comporte un risque minime pour les participants : prélèvement de sang veineux. Cependant, ce prélèvement sera effectué par un personnel médical qualifié, dans des conditions strictes d'asepsie. Les CVs des investigateurs les décrivent capables de mettre en œuvre le protocole. Le projet est ainsi en droite ligne avec la réglementation de la recherche sur les êtres humains au Cameroun et les principes éthiques protégeant les droits et la dignité des potentiels participants à la recherche.

Pour ces raisons, le comité a approuvé pour une période d'un an la mise en œuvre de ce projet.

L'investigatrice principale est responsable du respect scrupuleux du protocole approuvé et ne devra y apporter aucun amendement aussi mineur soit-il sans avis favorable du Comité National d'Ethique. Elle est appelée à collaborer pour toutes descentes du Comité National d'Ethique pour suivi de la mise en œuvre dudit protocole. Les rapports annuels et le rapport final du projet devront être soumis au comité d'éthique et aux autorités sanitaires du Cameroun à la fin de l'étude.

La présente clairance peut être retirée en cas de non respect de la réglementation en vigueur et des recommandations sus-évoquées.

En foi de quoi la présente Clairance Ethique est délivrée pour servir et valoir ce que de droit.

LE PRÉSIDENT
FOLMAYÈS
FONDATION LAZARE KAPTUE
BP. 1937 YAOUNDE - CAMEROUN
TEL: (237) 221 12 84

ANNEXE 2 : AUTORISATION ADMINISTRATIVE

REPUBLIQUE DU CAMEROUN
Paix – Travail – Patrie

MINISTERE DE LA SANTE PUBLIQUE

SECRETARIAT GENERAL

DIVISION DE LA RECHERCHE
OPERATIONNELLE EN SANTE

N° 030-64 /AAR/MINSANTE/SG/DROS/CRC/JA

REPUBLIC OF CAMEROON
Peace – Work Fatherland

MINISTRY OF PUBLIC HEALTH

SECRETARIAT GENERAL

DIVISION OF HEALTH
OPERATIONS RESEARCH

Yaoundé, le

20 JAN. 2010

Le MINISTRE

AU

PROF. KUABAN CHRISTOPHER,

CONSEILLER MEDICAL

HOPITAL JAMOT, YAOUNDE

Objet : Autorisation Administrative de Recherche

N° 631.7-10

Après examen du projet de recherche intitulé «HIV Prevalence, Anti-tuberculosis Drug Resistance and Molecular studies of Mycobacterium Tuberculosis in Smear Positive Pulmonary Tuberculosis patients in Yaoundé and Mbalmayo, Centre region of Cameroon», que vous avez introduit au nom de Prof. Penlap Mbeng Véronique du laboratoire de tuberculose du Centre de Biotechnologie de l'Université de Yaoundé 1 et à votre nom propre en qualité d'investigateur principal,

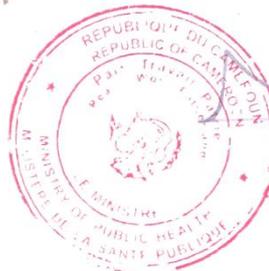
J'ai l'honneur de vous signifier l'Autorisation Administrative à démarrer cette recherche. Vous voudrez bien noter que la Division de la Recherche Opérationnelle en Santé est chargée du suivi de la conformité aux principes de bioéthique de ce projet et devra être tenue informée de vos activités, ainsi que des conclusions de cette recherche. Le Ministère de la Santé publique se réserve par ailleurs le droit d'effectuer des missions de suivi de la mise en œuvre du projet et d'arrêter celui-ci en cas de non respect du protocole approuvé et auquel cette Autorisation est donnée.

Toute nouvelle découverte au cours de cette recherche devra être signalée à l'Administration avant publication et les deux parties, le Projet CAMTAM et l'Administration détiendront les droits de propriété intellectuelle.

Toute modification du présent protocole devra être signalée à l'Administration après une nouvelle approbation par le comité d'éthique. Le numéro de votre autorisation Administrative sus référencée devra être cité dans vos courriers ultérieurs.

Copies :

- MINRESI
- CAB/MINSANTE/SESP
- SG/MINSANTE
- DROS
- DLM
- DRSP/Centre Concernés
- Archives / chrono



André MAMA FOU DA

ANNEXE 3 : LETTRE D'ACCORD DE L'HÔPITAL JAMOT DE YAOUNDE

REPUBLIQUE DU CAMEROUN
Paix - Travail - Patrie

MINISTÈRE DE LA SANTÉ PUBLIQUE

SECRETARIAT GENERAL

HOPITAL JAMOT DE YAOUNDE

REPUBLIC OF CAMEROON
Peace - Work - Fatherland

MINISTRY OF PUBLIC HEALTH

SECRETARY GENERAL'S OFFICE

JAMOT HOSPITAL OF YAOUNDE

N° 664 /ATT/MINSANTE/SG/11/YDE

ATTESTATION

Je soussigné, Dr Christophe AYISSI, Directeur de l'Hôpital Jamot de Yaoundé, atteste avoir donné mon accord de principe pour la conduite des travaux de recherche portant sur " HIV prevalence, antituberculosis drug resistance and molecular studies of Mycobacterium tuberculosis in smear positive pulmonary tuberculosis patients in Yaoundé and Mbalmayo, Centre Région of Cameroon " à l'Hôpital Jamot. Ceci bien entendu à condition que les investigateurs (Prof. KUABAN Christopher et Prof. PENLAP BENG Véronique) aient obtenu la clairance éthique et l'autorisation administrative de recherche des autorités compétentes.

Cette attestation est délivrée à la demande des investigateurs dudit projet de recherche pour servir et valoir ce que de droit./-

Fait à Yaoundé, le 15 SEPT 2004

LE DIRECTEUR
DE L'HÔPITAL JAMOT DE YAOUNDE



Dr. Ayissi Christophe

ANNEXE 4 : LETTRE D'ACCORD DE L'HÔPITAL DE DISTRICT DE MBALMAYO

MINISTÈRE DE LA SANTÉ PUBLIQUE
MINISTRY OF PUBLIC HEALTH
HÔPITAL DE DISTRICT DE MBALMAYO
MBALMAYO DISTRICT HOSPITAL
Tél/Fax : 228 14 58 117 / 147



REPUBLIQUE DU CAMEROUN
REPUBLIC OF CAMEROON
PAIX - TRAVAIL - PATRIE
PEACE - WORK - FAITHRIANO

V/Réf n°

N° *ASA* / L/MSP/DPSPC/SSD/HD/MBYO/L

Mbalmayo, le 7 SEPT 2009

ATTESTATION

Je soussigné, Docteur FOUDA François Xavier, Directeur de l'Hôpital de District de Mbalmayo, atteste avoir donné mon accord de principe pour la conduite des travaux de recherche portant sur « HIV prevalence, antituberculosis drug resistance and molecular studies of *Mycobacterium tuberculosis* in smear positive pulmonary tuberculosis patients in Yaoundé and Mbalmayo, Centre Region of Cameroon » à l'hôpital de District de Mbalmayo. Ceci bien entendu à condition que les investigateurs (Prof. KUABAN Christopher et Prof. PENLAP BENG Véronique) aient obtenu la clairance éthique et l'autorisation administrative de recherche des autorités compétentes.

Cette attestation est délivrée à la demande des investigateurs dudit projet de recherche pour servir et valoir ce que de droit.

LE DIRECTEUR



ANNEXE 5 : QUESTIONNAIRE DE COLLECTE DE DONNÉES

A. IDENTIFICATION DE LA FORMATION SANITAIRE ET DU MALADE

1. Nom de la formation sanitaire : _____

2. Noms et Prénoms du malade : _____

3. Date d'enregistrement : ____ / ____ / _____

B. ASPECTS SOCIO-DEMOGRAPHIQUES DU MALADE

4. Age (en années) |__|__|

5. Sexe: 1= Masculin 2= Féminin |__|

6. Statut matrimonial
1= Célibataire 2= Veuf/veuve 3= Divorcé |__|

4= Marié monogame 5= Marié polygame

7. Niveau d'instruction:
1= Illettré 2= Ecole primaire 3= Secondaire 4= Universitaire |__|

8. Résidence: 1= Rurale 2= Urbaine |__|

9. Profession : _____

C. ANTECEDENTS DE TUBERCULOSE

10. Notion de contact avec un tuberculeux connu
1= Oui 2= Non 3= Ne sait pas |__|

11. Le malade a-t-il déjà été traité pour la tuberculose
1= Oui 2= Non 3= Ne sait pas |__|

Si non ou ne sait pas, passer aux questions 16 et 17

Si oui à la question 13: Répondre aux questions 12 à 15

12. Combien de fois ce malade a-t-il déjà été traité pour la tuberculose

1= Une fois 2= Deux fois 3= trois fois ou plus

|_|

13. Durée du traitement déjà reçu (en mois) lors du premier traitement

|_|_|

14. Durée du traitement déjà reçu (en mois) lors du deuxième traitement

|_|_|

15. Durée du traitement déjà reçu (en mois) lors du troisième traitement

|_|_|

16. Le malade a-t-il déjà été traité pour une toux persistante pendant une durée de 4 semaines ou plus et par une association d'au moins trois médicaments

1= Oui 2= Non

|_|

17. Le malade a-t-il déjà reçu des injections IM en association avec d'autres médicaments ou non pendant une durée > 4 mois pour traiter une toux persistante

1= Oui 2= Non

|_|

D. AUTRES ANTECEDENTS DU MALADE

18. Le malade a-t-il déjà été transfusé dans un passé récent?

1= Oui 2= Non

|_|

19. Si oui, dans quelle année? _____

20. Le malade a-t-il été déjà en prison?

1= Oui 2= Non

|_|

21. Si oui, dans quelle année? _____

E. EPISODE TUBERCULEUX ACTUEL

22. Durée des symptômes au moment du diagnostic (en mois)

|_|_|

23. Date de l'examen du crachat N°1

|_|_|_|_|_|_|_|

24. Résultats de l'examen de 3 crachats

1= Rares BAAR 2= 1+ 3= 2+ 4= 3+

Crachats N°1

Crachats N°2

Crachats N°3

Nom du Médecin ayant rempli le questionnaire:

Date: ___ / ___ / ___

Signature

|

|

|

|

ANNEXE 6 : FORMULAIRE DE LABORATOIRE

A. IDENTIFICATION DU MALADE

1. Noms et Prénoms du malade : _____

2. N° du malade dans le registre du laboratoire de Mycobactéries : _____

3. Date d'enregistrement : ____ / ____ / ____

4. Age du malade (en années) : _____

5. Sexe : 1= Masculin 2= Féminin

|__|

|__|

B. DONNÉES DU LABORATOIRE DES MYCOBACTERIES

6. Examen direct du crachat

1= Rares BAAR 2= 1+ 3= 2+ 4= 3+

|__|

7. Résultats de la culture :

1= Positive 2= Négative 3= Contaminée

|__|

8. Type de mycobactérie identifiée

Mycobacterium tuberculosis = 1

Mycobacterium africanum = 2

Mycobacterium bovis = 3

Mycobactérie atypique = 4

|__|

9. Si mycobactérie atypique, laquelle? _____

10. Antibiogramme: 1= Sensible 2= résistant

Rifampicine

|

Isoniazide

|

Streptomycine

|

Ethambutol

|

Kanamycine

|

Ofloxacine

|

D. DONNÉES DU LABORATOIRE DE VIROLOGIE

11. Sérologie VIH

1= Positive 2= Négative 3= Indéterminée

|

ANNEXE 7 : NOTE D'INFORMATION

Tuberculosis is quite common in Cameroon. It is an infectious and contagious disease caused by a germ called *M. tuberculosis*. This germ is specific to human beings. When a person is infected he can harbour the infection without necessarily falling sick. An infected person falls sick when his defences are broken down. Presently, HIV infection is the most powerful risk factor that increases the likelihood of the development of tuberculosis in a person previously infected with the tuberculosis germ. Tuberculosis if poorly treated can result in drug resistant disease. This form of tuberculosis is quite expensive and difficult to treat.

We are researchers in public health. We want to know if among patients with tuberculosis in your hospital, there are some who are infected by HIV or have drug resistant disease.

The objective of this study is to assess the magnitude of HIV infection and anti-tuberculosis drug resistance in patients with pulmonary tuberculosis attending the hospital in which you are being treated. This will help us to better conceive and plan appropriate means of prevention and care for patients were it to be shown that these two problems exist in a high number of patients attending this hospital.

Methods and duration of study

The study will be undertaken in the Jamot Hospital of Yaoundé and the District Hospital of Mbalmayo, over a period of 12 months.

Each patient with smear positive pulmonary tuberculosis who accepts to participate in the study will sign an informed consent form. He will then be interviewed by the medical officer in charge before he commences treatment. The interview will be based on questions contained on a pre-established questionnaire form. The questions asked will seek information on the socio-demographic characteristics of each patient (age, sex, residence (rural/ urban), occupation etc.) and whether he/ she has been previously treated for tuberculosis, had had any contact with a known tuberculosis patient etc. At the end of the interview a blood sample (10mL) will be obtained from each patient to determine his/ her HIV status. He/ she will also be asked to submit a fresh morning sample of sputum that will be studied in the laboratory to determine if his/ her disease is caused by drug resistant germs or not.

Risks and advantages for participating in the study

The risk to the patient in this study from the collection of clinical specimens (10mL of blood and sputum) is negligible. As concerns the management of personal information got from the participants, we guarantee that this will be treated with utmost confidentiality.

No financial compensation will be given to participants in the study. Patients discovered as being HIV positive will be referred to the competent medical services of the hospital for management at their own expense. Counselling will be provided to those who are HIV negative as to how they can avoid being contaminated. Patients who are discovered to have multidrug resistant tuberculosis will be referred to the Jamot Hospital for specialized management. In this centre, medications for multidrug resistant tuberculosis will be given free of charge to patients.

Confidentiality

Confidentiality among all participants will be protected by assigning each patient a unique identification number. Names will not be included on specimens from the two hospitals to the laboratory. Interviews will be identified by numbers only on the questionnaire forms and will be conducted in each hospital by the medical officer in-charge. Care will be taken to ensure that potentially sensitive information got from the participants is not traceable by name.

ANNEXE 8: FICHE DE CONSENTEMENT ECLAIRE

I, the undersigned _____ certify that I have been informed orally and by a written note of the nature, objectives and methods of the study entitled “ HIV Prevalence, Anti-tuberculosis drug resistance and molecular studies of TB in smear positive pulmonary tuberculosis patients in Yaoundé and Mbalmayo, Centre Region of Cameroon”. I have obtained satisfactory answers to questions asked. I have also understood what the investigators require of me and what will happen if I participate in the study.

Name of the informer

Date

Signature

Name of the participant

Date

Signature

ANNEXE 9: PROCEDURE OPERATOIRE STANDARDISEE DU SPOLIGOTYPAGE**Preparation of the PCR mixture**

The gene is first amplified with the Dra and Drb primers that anneal to sites within the DR and directed outwards. DRs are direct repeat sequences of 36 bp.

Dra: 5' biotin ggT TTT ggg TCT gAC gAC 3'

Drb: 5' CCg AgA ggg gAC ggA AAC 3'

The Dra primer is labeled with biotin. The biotin group binds to streptavidin, which is in turn coupled to peroxidase, thus making it possible to detect any amplification products. The primers can be stored in aliquots at -20°C.

In a sterile room, prepare the Mix for the number of reactions plus:

- one *M. tuberculosis* H37Rv control
- one *M. Bovis* BCG control
- one negative control

For 10 reactions:

		For 10 reactions	Final concentration
H2O		149 µL	-
Tp chelating	5X	100 µL	1X
MgCl₂	50 mM	70 µL	7 Mm
Primer 1	5 µM	40 µL	0.4 µM
Primer 2	5 µM	40 µL	0.4 µM
dNTP	2,5 mM	80 µL	0.4 mM
Tth polymerase	5U/µl	1 µL	0.5 U/µL

Place 48 µL of the mixture into each 0.5 mL sterile tube. In another room, add 2 µL of DNA.

PCR program

Step	Time	Temperature	Number of cycles
1	3 min	96°C	1 cycle
2	1 min	96°C	30 cycles
	1 min	55°C	
	30 sec	72°C	
3	5 min	72°C	1 cycle

Preparation of the membranes for typing

The membrane must always be held by their edges. Rinse the membrane twice in about 250 mL of 2xSSPE / 0.1%SDS at 60°C for five minutes.

Place the membrane in the miniblotted that has been cleaned with soap and water and rinsed thoroughly, on a support cushion (that acts as joint) such that the side with the oligonucleotides (spacers) on the membrane (use the date in the bottom right corner as a marker).

Note:

The membrane must be placed so that it is exactly aligned with the ink in the upper and lower slots, so that the slots cross all the lines of oligonucleotides (spacers) fixed to the membrane. Tighten the screws to close the press.

1. Dilute 20 µL of each of the PCR products (maximum of 43/membrane) in 150 µL of 2x SSPE/0.1%SDS buffer.
2. Include one negative control (TE alone) and two positive controls (DNAs from the strain H37Rv and from *M. Bovis* BCG).
3. Heat each tube at 100°C for 10 minutes, then immediately place on ice.
4. Use a vacuum pump to remove all the residual liquid from each of the slots of the miniblotted.
5. Fill the first slot of the miniblotted (1) with 150 µL buffer containing 2x SSPE/0.1%SDS.
6. Fill the remaining slots one by one (max. 43) with 150 µL (approximately) of the diluted PCR products, kept at 4°C until loading. Note the loading order.
7. When filling the slots, be careful to not introduce air bubbles (pipette slowly, up and down, to avoid introducing bubbles). Each line must be completely filled,

but care must be taken not to contaminate the slots underneath as this might lead to the contamination neighboring lots (use absorbent paper to eliminate excess).

8. Fill the last slots of the miniblotted with 150 μ L buffer containing 2xSSPE/0.1%SDS. The samples must always be surrounded by buffer to prevent leaking.
9. Incubate the membrane at 60°C for one hour, keep the miniblotted horizontal throughout and do NOT shake to prevent overflow (and therefore contamination of one line by another).
10. Remove the samples from the slots by aspiration, in the same order as they were filled.
11. When all the slots are totally empty, disassemble the miniblotted and carefully remove the membrane.
12. Wash the membrane twice in 250 mL of 2xSSPE/5%SDS at 60°C for 10 minutes in a container with shaking.
13. Place the membrane in a hybridization bottle, such that the side containing the oligonucleotides (spacers) is on the inside of the tube.
14. Check that the membrane is at the temperature below 42°C for 10 minutes, in a container with shaking.
15. Rinse the membrane twice in 250 mL of 2xSSPE for at least 5 minutes at room temperature in a container with shaking.
16. Immediately before required, prepare 40 mL of E.C.L detection liquid by mixing 20 mL of each of the solutions supplied in the kit.
17. Incubate the membrane in 40 mL of E.C.L detection liquid for 2 minutes with gentle manual shaking so that the all of the membrane is in uniform contact with the liquid (the membranes repel water). Remove excess reagent with Whatman paper.
18. Place the membrane in an autoradiography cassette inside a plastic sleeve. Remove any air bubbles, taking care not to create static electricity.
19. Expose an E.C.L film (Hyperfilm-ECL, Amersham) to the inside of the membrane containing the oligonucleotides in a cassette for 1 minute.
20. Develop the film.

21. Expose another film for 5 minutes and then another for 20 minutes so that even weak signals are all detected.
22. Wash the membrane twice in 250 mL of 20 mM EDTA pH 8 for 50 minutes at room temperature in a container with shaking.
23. Until the dehybridisation step, store the membrane at 4°C in a sealed plastic pouch or wrapped in Saran-wrap, to prevent it from drying out.

Interpretation

The membrane and is read by recording the presence or absence of signals at the sites of DNA/DNA hybridizations. Results can be interpreted using appropriate software.

Dehybridization of the membranes

The membranes can be re-used if the oligonucleotides can be freed of the attached PCR products. Since the oligonucleotides (spacers) are covalently fixed to the membrane, the removal method must be highly stringent.

Wash the membrane three times by incubating it in 250 mL of 1% SDS at 85°C for 30 minutes in a container with shaking.

Wash the membrane twice in 250 mL of 20 mM EDTA pH 8 for 15 minutes at room temperature in a container with shaking.

Store membrane at 4°C in a sealed pouch or wrapped in a Saran-wrap, to prevent it from drying out, until re-use.

Appendices

Preparation of the buffers

All the buffers must be preheated to the desired temperature before use (42°C, 62°C or 80°C).

2xSSPE/0.1%SDS 60°C

100 mL SSPE 20x + 5 mL SDS 20% + H₂O qsq 1 litre

2xSSPE/0.5%SDS 60°C

100 mL SSPE 20x + 25 mL SDS 20% + H₂O qsq 1 litre

Prepare 2 L for 2 membranes

2xSSPE/0.5%SDS **42°C**

100 mL SSPE 20x + 25 mL SDS 20% + H₂O qsq 1 litre

Prepare 2 L for 2 membranes

2xSSPE **Room temperature**

200 mL SSPE 20x + H₂O qsq 2 litres

EDTA 20 mM **Room temperature**

40 mL EDTA 0.5 M + H₂O qsq 1 litre

Materials

- Membrane kit:
- Positive control 1
- Positive control 2
- Primer Dra and Primer Drb
- Spoligo-membrane
- Miniblotter MN45
- Foam cushions
- Streptavidin-POD conjugate
- ECL detection liquid
- Hyperfilm ECL
- SSPE 20X
- SDS

ANNEXE 10: PROCEDURE OPERATOIRE STANDARDISEE DU TYPAGE MIRU-VNTR

Reagents and Chemicals

For analysis of the PCR fragments on a DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA); Mapmarker 1000 size standard (Bioventures, USA).

- MIRU-VNTR Typing Kit (GenoScreen, Lille, France)
Components: PCR mix 1-8, Positive control, store at -20°C (avoid multiple freeze-thaw cycles).

Software

For the analysis of the data required from an automated sequencer;

- GeneMapper (Applied Biosystems, Foster City, CA)

Biological material

- *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates.
Positive control (included in the kit), contains DNA from *Mycobacterium bovis* BCG.

PCR

Sample preparation

Dilute the DNA samples in MilliQ water to achieve a DNA concentration of 1-10 ng/μl. Prepare a total volume of at least 20 μl. The MilliQ water used for the DNA dilutions is the negative control. The positive control from the GenoScreen kit diluted 1:5 in MilliQ water is used.

Prepare a structured plan in advance how to pipette the samples and controls.

1. Fill out each of the eight ready-to-use mixes, following your personal pipette plan. Add 8 mL PCR mix to each well.
2. Fill out the diluted DNA following your personal pipette plan. Add 2 μl of DNA sample or control to each well (or tube).
3. Close the plate (or tubes).
4. Spin down to remove air bubbles from the mix.

PCR program

Step	Time	Temperature	Number of cycles
1	15 min	95°C	1 cycle
2	1 min	94°C	40 cycles
	30 sec	59°C	
	1 min 30 sec	72°C	
3	10 min	72°C	1 cycle

Sample preparation for automated fragment analysis (sequencer)

1. Spin down the sample plate containing the PCR products.
2. Open the plate and transfer 1 µL of each well in a new 96-well plate.
3. Dilute the PCR products 5 times by adding 49 µL of MQ and close the plate.
4. Spin down the sample plate containing the diluted PCR products.
5. Add 0,2 µL Mapmarker 1000 ROX and 10 µL Formamide Hi Di.
6. Close the plate.
7. Close the original sample plate also, and store this plate in the freezer (-20°C).

Note: In case of problems, the PCR products can be used again.

8. Centrifuge the plate to remove air bubbles.
9. Denature the PCR products at 95°C for 5 minutes and keep on ice before loading.
10. Load the 96-well plate on the sequencer.
11. Start the fragment analysis as described in the sequencer manual.

Determination of the number of repeats

To facilitate automated allele calling, the sizes of the fragments of the marker and an allele calling table for each VNTR locus should be set in the software when it is used for the first time.

Edit and save the MapMarker1000 size marker standard peak labels to the software.

The sizes of the fragments of the marker are supplied by the manufacturer.

Edit and save the expected sizes and the corresponding expected number of repeats of the various possible fragments for each of the different VNTR loci.

Analysis of the data

Import the raw data from the sequencer per PCR mix type.

Start the analysis of the software for the mix type imported.

Check all the results interpreted by the software and, if applicable, correct it.

Quality control

In each assay, a positive and a negative control should be included. The VNTR results of *the M. tuberculosis* control strain H37Rv or the positive control from the commercial kit should be identical to the VNTR type shown below. The negative control should not give any peaks, in case of peaks which interfere with the sample results, reject the results of the complete run.

Tableau: Expected repeat numbers for each of the 24 VNTR loci of the control strains.

Locus	Repeats pos.control	Locus	Repeats pos.control
MIRU04	2	QUB11b	3
MIRU26	5	VNTR1955	1
MIRU40	2	QUB26	5
MIRU10	2	MIRU02	2
MIRU16	3	MIRU23	4
MIRU31	3	MIRU39	2
VNTR42	0	MIRU20	2
VNTR43	6	MIRU24	2
ETRA	5	MIRU27	3
VNTR47	2	VNTR46	2
VNTR52	2	VNTR48	5
VNTR53	0	VNTR49	3

- Abbadi, S. H., Sameaa, G. A., Morlock, G. & Cooksey, R. C. *Molecular identification of mutations associated with anti-tuberculosis drug resistance among strains of Mycobacterium tuberculosis*. Int J Infect Dis, 13(6): 673-678, (2009).
- Afanas'ev, M. V., Ikryannikova, L. N., Il'ina, E. N., Kuz'min, A. V., Larionova, E. E., Smirnova, T. G., Chernousova, L. N. & Govorun, V. M. *Molecular typing of Mycobacterium tuberculosis circulated in Moscow, Russian Federation*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 30(2): 181-191, (2011).
- Afanas'ev, M. V., Ikryannikova, L. N., Il'ina, E. N., Sidorenko, S. V., Kuz'min, A. V., Larionova, E. E., Smirnova, T. G., Chernousova, L. N., Kamaev, E. Y., Skorniakov, S. N., Kinsht, V. N., Cherednichenko, A. G. & Govorun, V. M. *Molecular characteristics of rifampicin- and isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from the Russian Federation*. J Antimicrob Chemother, 59(6): 1057-1064, (2007).
- Affolabi, D., Anyo, G., Faihun, F., Sanoussi, N., Shamputa, I. C., Rigouts, L., Kestens, L., Anagonou, S. & Portaels, F. *First molecular epidemiological study of tuberculosis in Benin*. Int J Tuberc Lung Dis, 13(3): 317-322, (2009).
- Agger, E. M., Rosenkrands, I., Olsen, A. W., Hatch, G., Williams, A., Kritsch, C., Lingnau, K., von Gabain, A., Andersen, C. S., Korsholm, K. S. & Andersen, P. *Protective immunity to tuberculosis with Ag85B-ESAT-6 in a synthetic cationic adjuvant system IC31*. Vaccine, 24(26): 5452-5460, (2006).
- Alcaide, F., Benitez, M. A., Escriba, J. M. & Martin, R. *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 Microbiol, 38(1): 398-401, (2000).
- Allix-Beguec, C., Harmsen, D., Weniger, T., Supply, P. & Niemann, S. *Evaluation and strategy for use of MIRU-VNTRplus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of Mycobacterium tuberculosis complex isolates*. J Clin Microbiol, 46(8): 2692-2699, (2008).
- Almeida da Silva, P. & Aínsa, J. A. *Drugs: structure, pharmacokinetics and toxicity*. Tuberculosis 2007: From Basic Science to Patient Care Palomino, J. C., Leao, C. S. & Ritacco, V.: 593-633, [www.TuberculosisTextbook.com], consulté le 24/02/2013. (2007).
- Almeida Da Silva, P. E. & Palomino, J. C. *Molecular basis and mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: classical and new drugs*. J Antimicrob Chemother, (2011).
- Alvarez-Freites, E. J., Carter, J. L. & Cynamon, M. H. *In vitro and in vivo activities of gatifloxacin against Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother, 46(4): 1022-1025, (2002).
- Aranaz, A., Liebana, E., Gomez-Mampaso, E., Galan, J. C., Cousins, D., Ortega, A., Blazquez, J., Baquero, F., Mateos, A., Suarez, G. & Dominguez, L. *Mycobacterium tuberculosis subsp. caprae subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the Mycobacterium tuberculosis complex isolated from goats in Spain*. Int J Syst Bacteriol, 49 Pt 3: 1263-1273, (1999).
- Assam-Assam, J. P., Penlap, V. B., Cho-Ngwa, F., Tedom, J. C., Ane-Anyangwe, I. & Titanji, V. P. *Mycobacterium tuberculosis complex drug resistance pattern*

- and identification of species causing tuberculosis in the West and Centre regions of Cameroon. *BMC Infect Dis*, 11: 94, (2011).
- Assam Assam, J. P., Penlap Beng, V., Cho-Ngwa, F., Toukam, M., Ngho, A. A., Kitavi, M., Nzuki, I., Nyonka, J. N., Tata, E., Tedom, J. C., Skilton, R. A., Pelle, R. & Titanji, V. P. *Mycobacterium tuberculosis is the causative agent of tuberculosis in the southern ecological zones of Cameroon, as shown by genetic analysis*. *BMC Infect Dis*, 13: 431, (2013).
- Banu, S., Honore, N., Saint-Joanis, B., Philpott, D., Prevost, M. C. & Cole, S. T. *Are the PE-PGRS proteins of Mycobacterium tuberculosis variable surface antigens?* *Mol Microbiol*, 44(1): 9-19, (2002).
- Baril, L., Caumes, E., Truffot-Pernot, C., Bricaire, F., Grosset, J. & Gentilini, M. *Tuberculosis caused by Mycobacterium africanum associated with involvement of the upper and lower respiratory tract, skin, and mucosa*. *Clin Infect Dis*, 21(3): 653-655, (1995).
- Barnes, P. F. & Cave, M. D. *Molecular epidemiology of tuberculosis*. *N Engl J Med*, 349(12): 1149-1156, (2003).
- Bastida, R., Loureiro, J., Quse, V., Bernardelli, A., Rodriguez, D. & Costa, E. *Tuberculosis in a wild subantarctic fur seal from Argentina*. *J Wildl Dis*, 35(4): 796-798, (1999).
- Bercion, R. & Kuaban, C. *Initial resistance to antituberculosis drugs in Yaounde, Cameroon in 1995*. *Int J Tuberc Lung Dis*, 1(2): 110-114, (1997).
- Blanchard, J. S. *Molecular mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis*. *Annu Rev Biochem*, 65: 215-239, (1996).
- Boehme, C. C., Nabeta, P., Hillemann, D., Nicol, M. P., Shenai, S., Krapp, F., Allen, J., Tahirli, R., Blakemore, R., Rustomjee, R., Milovic, A., Jones, M., O'Brien, S. M., Persing, D. H., Ruesch-Gerdes, S., Gotuzzo, E., Rodrigues, C., Alland, D. & Perkins, M. D. *Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance*. *N Engl J Med*, 363(11): 1005-1015, (2010).
- Brito, R. C., Mello, F. C., Andrade, M. K., Oliveira, H., Costa, W., Matos, H. J., Lourenco, M. C., Rolla, V. C., Fonseca, L., Ruffino Netto, A. & Kritski, A. L. *Drug-resistant tuberculosis in six hospitals in Rio de Janeiro, Brazil*. *Int J Tuberc Lung Dis*, 14(1): 24-33, (2010).
- Brosch, R., Gordon, S. V., Billault, A., Garnier, T., Eiglmeier, K., Soravito, C., Barrell, B. G. & Cole, S. T. *Use of a Mycobacterium tuberculosis H37Rv bacterial artificial chromosome library for genome mapping, sequencing, and comparative genomics*. *Infect Immun*, 66(5): 2221-2229, (1998).
- Brosch, R., Gordon, S. V., Marmiesse, M., Brodin, P., Buchrieser, C., Eiglmeier, K., Garnier, T., Gutierrez, C., Hewinson, G., Kremer, K., Parsons, L. M., Pym, A. S., Samper, S., van Soolingen, D. & Cole, S. T. *A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(6): 3684-3689, (2002).
- Bruchfeld, J., Aderaye, G., Palme, I. B., Bjorvatn, B., Ghebremichael, S., Hoffner, S. & Lindquist, L. *Molecular epidemiology and drug resistance of Mycobacterium tuberculosis isolates from Ethiopian pulmonary tuberculosis patients with and without human immunodeficiency virus infection*. *J Clin Microbiol*, 40(5): 1636-1643, (2002).
- Brudey, K., Driscoll, J. R., Rigouts, L., Prodinger, W. M., Gori, A., Al-Hajoj, S. A., Allix, C., Aristimuno, L., Arora, J., Baumanis, V., Binder, L., Cafrune, P., Cataldi, A., Cheong, S., Diel, R., Ellermeier, C., Evans, J. T., Fauville-Dufaux,

- M., Ferdinand, S., Garcia de Viedma, D., Garzelli, C., Gazzola, L., Gomes, H. M., Gutierrez, M. C., Hawkey, P. M., van Helden, P. D., Kadival, G. V., Kreiswirth, B. N., Kremer, K., Kubin, M., Kulkarni, S. P., Liens, B., Lillebaek, T., Ho, M. L., Martin, C., Mokrousov, I., Narvskaia, O., Ngeow, Y. F., Naumann, L., Niemann, S., Parwati, I., Rahim, Z., Rasolof-Razanamparany, V., Rasolonalona, T., Rossetti, M. L., Rusch-Gerdes, S., Sajduda, A., Samper, S., Shemyakin, I. G., Singh, U. B., Somoskovi, A., Skuce, R. A., van Soolingen, D., Streicher, E. M., Suffys, P. N., Tortoli, E., Tracevska, T., Vincent, V., Victor, T. C., Warren, R. M., Yap, S. F., Zaman, K., Portaels, F., Rastogi, N. & Sola, C. *Mycobacterium tuberculosis complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology*. BMC Microbiol, 6: 23, (2006).
- Brzostek, A., Sajduda, A., Sliwinski, T., Augustynowicz-Kopec, E., Jaworski, A., Zwolska, Z. & Dziadek, J. *Molecular characterisation of streptomycin-resistant Mycobacterium tuberculosis strains isolated in Poland*. Int J Tuberc Lung Dis, 8(8): 1032-1035, (2004).
- Camacho, L. R., Ensergueix, D., Perez, E., Gicquel, B. & Guilhot, C. *Identification of a virulence gene cluster of Mycobacterium tuberculosis by signature-tagged transposon mutagenesis*. Mol Microbiol, 34(2): 257-267, (1999).
- Campbell, P. J., Morlock, G. P., Sikes, R. D., Dalton, T. L., Metchock, B., Starks, A. M., Hooks, D. P., Cowan, L. S., Plikaytis, B. B. & Posey, J. E. *Molecular Detection of Mutations Associated with First and Second-Line Drug Resistance Compared with Conventional Drug Susceptibility Testing in M. tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother, (2011).
- Camus, J. C., Pryor, M. J., Medigue, C. & Cole, S. T. *Re-annotation of the genome sequence of Mycobacterium tuberculosis H37Rv*. Microbiology, 148(Pt 10): 2967-2973, (2002).
- Canetti, G., Fox, W., Khomenko, A., Mahler, H. T., Menon, N. K., Mitchison, D. A., Rist, N. & Smelev, N. A. *Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes*. Bull World Health Organ, 41(1): 21-43, (1969).
- Castets, M., Boisvert, H., Grumbach, F., Brunel, M. & Rist, N. *[Tuberculosis bacilli of the African type: preliminary note]*. Rev Tuberc Pneumol (Paris), 32(2): 179-184, (1968).
- Cauthen, G. M., Dooley, S. W., Onorato, I. M., Ihle, W. W., Burr, J. M., Bigler, W. J., Witte, J. & Castro, K. G. *Transmission of Mycobacterium tuberculosis from tuberculosis patients with HIV infection or AIDS*. Am J Epidemiol, 144(1): 69-77, (1996).
- Cavanagh, R., Begon, M., Bennett, M., Ergon, T., Graham, I. M., De Haas, P. E., Hart, C. A., Koedam, M., Kremer, K., Lambin, X., Roholl, P. & Soolingen Dv, D. *Mycobacterium microti infection (vole tuberculosis) in wild rodent populations*. J Clin Microbiol, 40(9): 3281-3285, (2002).
- Chaoui, I., Sabouni, R., Kourout, M., Jordaan, A. M., Lahlou, O., Elouad, R., Akrim, M., Victor, T. C. & El Mzibri, M. *Analysis of isoniazid, streptomycin and ethambutol resistance in Mycobacterium tuberculosis isolates from Morocco*. J Infect Dev Ctries, 3(4): 278-284, (2009).
- Chaulet, P., Boulahbal, F. & Grosset, J. *Surveillance of drug resistance for tuberculosis control: why and how?* Tuber Lung Dis, 76(6): 487-492, (1995).

- Cheng, S. J., Thibert, L., Sanchez, T., Heifets, L. & Zhang, Y. *pncA mutations as a major mechanism of pyrazinamide resistance in Mycobacterium tuberculosis: spread of a monoresistant strain in Quebec, Canada*. Antimicrob Agents Chemother, 44(3): 528-532, (2000).
- Cho, E. H., Bae, H. K., Kang, S. K. & Lee, E. H. *Detection of isoniazid and rifampicin resistance by sequencing of katG, inhA, and rpoB genes in Korea*. Korean J Lab Med, 29(5): 455-460, (2009).
- Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S. V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C. E., 3rd, Tekaiia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Krogh, A., McLean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Osborne, J., Quail, M. A., Rajandream, M. A., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Sulston, J. E., Taylor, K., Whitehead, S. & Barrell, B. G. *Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence*. Nature, 393(6685): 537-544, (1998).
- Corbett, E. L., Watt, C. J., Walker, N., Maher, D., Williams, B. G., Raviglione, M. C. & Dye, C. *The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic*. Arch Intern Med, 163(9): 1009-1021, (2003).
- Cosivi, O., Meslin, F. X., Daborn, C. J. & Grange, J. M. *Epidemiology of Mycobacterium bovis infection in animals and humans, with particular reference to Africa*. Rev Sci Tech, 14(3): 733-746, (1995).
- Cousins, D. V., Bastida, R., Cataldi, A., Quse, V., Redrobe, S., Dow, S., Duignan, P., Murray, A., Dupont, C., Ahmed, N., Collins, D. M., Butler, W. R., Dawson, D., Rodriguez, D., Loureiro, J., Romano, M. I., Alito, A., Zumarraga, M. & Bernardelli, A. *Tuberculosis in seals caused by a novel member of the Mycobacterium tuberculosis complex: Mycobacterium pinnipedii sp. nov.* Int J Syst Evol Microbiol, 53(Pt 5): 1305-1314, (2003).
- Cousins, D. V., Williams, S. N., Reuter, R., Forshaw, D., Chadwick, B., Coughran, D., Collins, P. & Gales, N. *Tuberculosis in wild seals and characterisation of the seal bacillus*. Aust Vet J, 70(3): 92-97, (1993).
- Conseil Supérieur de l'Hygiène Publique France (CSHPF). *Diagnostic clinique et bactériologique de la tuberculose*. Med Mal Infect, 34: 364 - 370, (2004a).
- Conseil Supérieur de l'Hygiène Publique France (CSHPF). *[Tuberculin intradermal reaction (IDR) or tuberculin test]*. Med Mal Infect, 34(8-9): 358-363, (2004b).
- Dalla Costa, E. R., Ribeiro, M. O., Silva, M. S., Arnold, L. S., Rostirolla, D. C., Cafrune, P. I., Espinoza, R. C., Palaci, M., Telles, M. A., Ritacco, V., Suffys, P. N., Lopes, M. L., Campelo, C. L., Miranda, S. S., Kremer, K., da Silva, P. E., Fonseca Lde, S., Ho, J. L., Kritski, A. L. & Rossetti, M. L. *Correlations of mutations in katG, oxyR-ahpC and inhA genes and in vitro susceptibility in Mycobacterium tuberculosis clinical strains segregated by spoligotype families from tuberculosis prevalent countries in South America*. BMC Microbiol, 9: 39, (2009).
- Dautzenberg, B. & Bouvet, E. *Tuberculose et infections à mycobactéries atypiques (SIDA exclu)*. Pneumologie. Aubier, M., Fournier, M. & Pariente, R. Flammarion, Médecine-Sciences. 38: 349-363, (1996).
- de Jong, B. C., Antonio, M., Awine, T., Ogungbemi, K., de Jong, Y. P., Gagneux, S., DeRiemer, K., Zozio, T., Rastogi, N., Borgdorff, M., Hill, P. C. & Adegbola, R. A. *Use of spoligotyping and large sequence polymorphisms to study the*

- population structure of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in a cohort study of consecutive smear-positive tuberculosis cases in The Gambia. *J Clin Microbiol*, 47(4): 994-1001, (2009).
- de Jong, B. C., Antonio, M. & Gagneux, S. *Mycobacterium africanum*--review of an important cause of human tuberculosis in West Africa. *PLoS Negl Trop Dis*, 4(9): e744, (2010).
- Delogu, G. & Brennan, M. J. *Comparative immune response to PE and PE_PGRS antigens of Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*, 69(9): 5606-5611, (2001).
- Diguimbaye, C., Hilty, M., Ngandolo, R., Mahamat, H. H., Pfyffer, G. E., Baggi, F., Tanner, M., Schelling, E. & Zinsstag, J. *Molecular characterization and drug resistance testing of Mycobacterium tuberculosis isolates from Chad*. *J Clin Microbiol*, 44(4): 1575-1577, (2006).
- Drlica, K. *Mechanism of fluoroquinolone action*. *Curr Opin Microbiol*, 2(5): 504-508, (1999).
- Dye, C. *Global epidemiology of tuberculosis*. *Lancet*, 367(9514): 938-940, (2006).
- Espitia, C., Lacleste, J. P., Mondragon-Palomino, M., Amador, A., Campuzano, J., Martens, A., Singh, M., Cicero, R., Zhang, Y. & Moreno, C. *The PE-PGRS glycine-rich proteins of Mycobacterium tuberculosis: a new family of fibronectin-binding proteins?* *Microbiology*, 145 (Pt 12): 3487-3495, (1999).
- Fenner, L., Egger, M., Bodmer, T., Furrer, H., Ballif, M., Battegay, M., Helbling, P., Fehr, J., Gsponer, T., Rieder, H. L., Zwahlen, M., Hoffmann, M., Bernasconi, E., Cavassini, M., Calmy, A., Dolina, M., Frei, R., Janssens, J. P., Borrell, S., Stucki, D., Schrenzel, J., Bottger, E. C. & Gagneux, S. *HIV infection disrupts the sympatric host-pathogen relationship in human tuberculosis*. *PLoS Genet*, 9(3): e1003318, (2013).
- Feuerriegel, S., Oberhauser, B., George, A. G., Dafaie, F., Richter, E., Rusch-Gerdes, S. & Niemann, S. *Sequence analysis for detection of first-line drug resistance in Mycobacterium tuberculosis strains from a high-incidence setting*. *BMC Microbiol*, 12: 90, (2012).
- Filliol, I., Driscoll, J. R., Van Soolingen, D., Kreiswirth, B. N., Kremer, K., Valetudie, G., Anh, D. D., Barlow, R., Banerjee, D., Bifani, P. J., Brudey, K., Cataldi, A., Cooksey, R. C., Cousins, D. V., Dale, J. W., Dellagostin, O. A., Drobniewski, F., Engelmann, G., Ferdinand, S., Gascoyne-Binzi, D., Gordon, M., Gutierrez, M. C., Haas, W. H., Heersma, H., Kallenius, G., Kassa-Kelembho, E., Koivula, T., Ly, H. M., Makristathis, A., Mammina, C., Martin, G., Mostrom, P., Mokrousov, I., Narbonne, V., Narvskaya, O., Nastasi, A., Niobe-Eyangoh, S. N., Pape, J. W., Rasolofo-Razanamparany, V., Ridell, M., Rossetti, M. L., Stauffer, F., Suffys, P. N., Takiff, H., Texier-Maugein, J., Vincent, V., De Waard, J. H., Sola, C. & Rastogi, N. *Global distribution of Mycobacterium tuberculosis spoligotypes*. *Emerg Infect Dis*, 8(11): 1347-1349, (2002).
- Filliol, I., Driscoll, J. R., van Soolingen, D., Kreiswirth, B. N., Kremer, K., Valetudie, G., Dang, D. A., Barlow, R., Banerjee, D., Bifani, P. J., Brudey, K., Cataldi, A., Cooksey, R. C., Cousins, D. V., Dale, J. W., Dellagostin, O. A., Drobniewski, F., Engelmann, G., Ferdinand, S., Gascoyne-Binzi, D., Gordon, M., Gutierrez, M. C., Haas, W. H., Heersma, H., Kassa-Kelembho, E., Ho, M. L., Makristathis, A., Mammina, C., Martin, G., Mostrom, P., Mokrousov, I., Narbonne, V., Narvskaya, O., Nastasi, A., Niobe-Eyangoh, S. N., Pape, J. W., Rasolofo-Razanamparany, V., Ridell, M., Rossetti, M. L., Stauffer, F., Suffys,

- P. N., Takiff, H., Texier-Maugein, J., Vincent, V., de Waard, J. H., Sola, C. & Rastogi, N. *Snapshot of moving and expanding clones of Mycobacterium tuberculosis and their global distribution assessed by spoligotyping in an international study.* J Clin Microbiol, 41(5): 1963-1970, (2003).
- Flores, A. R., Parsons, L. M. & Pavelka, M. S., Jr. *Genetic analysis of the beta-lactamases of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium smegmatis and susceptibility to beta-lactam antibiotics.* Microbiology, 151(Pt 2): 521-532, (2005).
- Frothingham, R. & Meeker-O'Connell, W. A. *Genetic diversity in the Mycobacterium tuberculosis complex based on variable numbers of tandem DNA repeats.* Microbiology, 144 (Pt 5): 1189-1196, (1998).
- Gagneux, S., DeRiemer, K., Van, T., Kato-Maeda, M., de Jong, B. C., Narayanan, S., Nicol, M., Niemann, S., Kremer, K., Gutierrez, M. C., Hilty, M., Hopewell, P. C. & Small, P. M. *Variable host-pathogen compatibility in Mycobacterium tuberculosis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 103(8): 2869-2873, (2006).
- Gandhi, N. R., Brust, J. C., Moodley, P., Weissman, D., Heo, M., Ning, Y., Moll, A. P., Friedland, G. H., Sturm, A. W. & Shah, N. S. *Minimal diversity of drug-resistant Mycobacterium tuberculosis strains, South Africa.* Emerg Infect Dis, 20(3): 426-433, (2014).
- Garcia de Viedma, D. *Rapid detection of resistance in Mycobacterium tuberculosis: a review discussing molecular approaches.* Clin Microbiol Infect, 9(5): 349-359, (2003).
- Garcia, L., Alonso-Sanz, M., Rebollo, M. J., Tercero, J. C. & Chaves, F. *Mutations in the rpoB gene of rifampin-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates in Spain and their rapid detection by PCR-enzyme-linked immunosorbent assay.* J Clin Microbiol, 39(5): 1813-1818, (2001).
- Gillespie, S. H. *Evolution of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: clinical and molecular perspective.* Antimicrob Agents Chemother, 46(2): 267-274, (2002).
- Glynn, J. R., Bauer, J., de Boer, A. S., Borgdorff, M. W., Fine, P. E., Godfrey-Faussett, P. & Vynnycky, E. *Interpreting DNA fingerprint clusters of Mycobacterium tuberculosis.* European Concerted Action on Molecular Epidemiology and Control of Tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis, 3(12): 1055-1060, (1999).
- Godreuil, S., Torrea, G., Terru, D., Chevenet, F., Diagbouga, S., Supply, P., Van de Perre, P., Carriere, C. & Banuls, A. L. *First molecular epidemiology study of Mycobacterium tuberculosis in Burkina Faso.* J Clin Microbiol, 45(3): 921-927, (2007).
- Groenen, P. M., Bunschoten, A. E., van Soolingen, D. & van Embden, J. D. *Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of Mycobacterium tuberculosis; application for strain differentiation by a novel typing method.* Mol Microbiol, 10(5): 1057-1065, (1993).
- Guo, H., Seet, Q., Denkin, S., Parsons, L. & Zhang, Y. *Molecular characterization of isoniazid-resistant clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis from the USA.* J Med Microbiol, 55(Pt 11): 1527-1531, (2006).
- Heep, M., Rieger, U., Beck, D. & Lehn, N. *Mutations in the beginning of the rpoB gene can induce resistance to rifamycins in both Helicobacter pylori and Mycobacterium tuberculosis.* Antimicrob Agents Chemother, 44(4): 1075-1077, (2000).

- Heifets, L. *Conventional methods for antimicrobial susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis*. Multidrug-resistant tuberculosis. Bastian, I. & Portaels, F. Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academic Publishers, (2000).
- Heifets, L., Linder, T., Sanchez, T., Spencer, D. & Brennan, J. *Two liquid medium systems, mycobacteria growth indicator tube and MB redox tube, for Mycobacterium tuberculosis isolation from sputum specimens*. J Clin Microbiol, 38(3): 1227-1230, (2000).
- Helb, D., Jones, M., Story, E., Boehme, C., Wallace, E., Ho, K., Kop, J., Owens, M. R., Rodgers, R., Banada, P., Safi, H., Blakemore, R., Lan, N. T., Jones-Lopez, E. C., Levi, M., Burday, M., Ayakaka, I., Mugerwa, R. D., McMillan, B., Winn-Deen, E., Christel, L., Dailey, P., Perkins, M. D., Persing, D. H. & Alland, D. *Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology*. J Clin Microbiol, 48(1): 229-237, (2010).
- Hermans, P. W., Messadi, F., Guebrexabher, H., van Soolingen, D., de Haas, P. E., Heersma, H., de Neeling, H., Ayoub, A., Portaels, F., Frommel, D. & et al. *Analysis of the population structure of Mycobacterium tuberculosis in Ethiopia, Tunisia, and The Netherlands: usefulness of DNA typing for global tuberculosis epidemiology*. J Infect Dis, 171(6): 1504-1513, (1995).
- Hillemann, D., Kubica, T., Agzamova, R., Venera, B., Rusch-Gerdes, S. & Niemann, S. *Rifampicin and isoniazid resistance mutations in Mycobacterium tuberculosis strains isolated from patients in Kazakhstan*. Int J Tuberc Lung Dis, 9(10): 1161-1167, (2005).
- Hoffner, S. E., Svenson, S. B., Norberg, R., Dias, F., Ghebremichael, S. & Kallenius, G. *Biochemical heterogeneity of Mycobacterium tuberculosis complex isolates in Guinea-Bissau*. J Clin Microbiol, 31(8): 2215-2217, (1993).
- Homolka, S., Meyer, C. G., Hillemann, D., Owusu-Dabo, E., Adjei, O., Horstmann, R. D., Browne, E. N., Chinbuah, A., Osei, I., Gyapong, J., Kubica, T., Ruesch-Gerdes, S. & Niemann, S. *Unequal distribution of resistance-conferring mutations among Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium africanum strains from Ghana*. Int J Med Microbiol, 300(7): 489-495, (2010).
- Homolka, S., Post, E., Oberhauser, B., George, A. G., Westman, L., Dafaee, F., Rusch-Gerdes, S. & Niemann, S. *High genetic diversity among Mycobacterium tuberculosis complex strains from Sierra Leone*. BMC Microbiol, 8: 103, (2008).
- Hunter, P. R. & Gaston, M. A. *Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity*. J Clin Microbiol, 26(1): 2465 - 2466, (1988).
- Jarlier, V. & Nikaido, H. *Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics*. FEMS Microbiol Lett, 123(1-2): 11-18, (1994).
- Johansen, S. K., Maus, C. E., Plikaytis, B. B. & Douthwaite, S. *Capreomycin binds across the ribosomal subunit interface using tlyA-encoded 2'-O-methylations in 16S and 23S rRNAs*. Mol Cell, 23(2): 173-182, (2006).
- Kamerbeek, J., Schouls, L., Kolk, A., van Agterveld, M., van Soolingen, D., Kuijper, S., Bunschoten, A., Molhuizen, H., Shaw, R., Goyal, M. & van Embden, J. *Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium tuberculosis for diagnosis and epidemiology*. J Clin Microbiol, 35(4): 907-914, (1997).

- Kent, P. T. & Kubica, G. P. *Public Health Mycobacteriology. A guide for the level III laboratory*. Atlanta GA, CDC, (1985).
- Kiepiela, P., Bishop, K. S., Smith, A. N., Roux, L. & York, D. F. *Genomic mutations in the katG, inhA and aphC genes are useful for the prediction of isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis isolates from Kwazulu Natal, South Africa*. *Tuber Lung Dis*, 80(1): 47-56, (2000).
- Kremer, K., van Soolingen, D., Frothingham, R., Haas, W. H., Hermans, P. W., Martin, C., Palittapongarnpim, P., Plikaytis, B. B., Riley, L. W., Yakrus, M. A., Musser, J. M. & van Embden, J. D. *Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of Mycobacterium tuberculosis complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility*. *J Clin Microbiol*, 37(8): 2607-2618, (1999).
- Kuaban, C., Bercion, R., Jifon, G., Cunin, P. & Blackett, K. N. *Acquired anti-tuberculosis drug resistance in Yaounde, Cameroon*. *Int J Tuberc Lung Dis*, 4(5): 427-432, (2000a).
- Kuaban, C., Bercion, R. & Koulla-Shiro, S. *HIV seroprevalence rate and incidence of adverse skin reactions in adults with pulmonary tuberculosis receiving thiacetazone free anti-tuberculosis treatment in Yaounde, Cameroon*. *East Afr Med J*, 74(8): 474-477, (1997).
- Kuaban, C., Bercion, R., Noeske, J., Cunin, P., Nkamsse, P. & Ngo Niobe, S. *Anti-tuberculosis drug resistance in the West Province of Cameroon*. *Int J Tuberc Lung Dis*, 4(4): 356-360, (2000b).
- Kumar, V. G., Urs, T. A. & Ranganath, R. R. *MPT 64 Antigen detection for Rapid confirmation of M.tuberculosis isolates*. *BMC Res Notes*, 4: 79, (2011).
- Langermans, J. A., Doherty, T. M., Vervenne, R. A., van der Laan, T., Lyashchenko, K., Greenwald, R., Agger, E. M., Aagaard, C., Weiler, H., van Soolingen, D., Dalemans, W., Thomas, A. W. & Andersen, P. *Protection of macaques against Mycobacterium tuberculosis infection by a subunit vaccine based on a fusion protein of antigen 85B and ESAT-6*. *Vaccine*, 23(21): 2740-2750, (2005).
- Laurenzo, D. & Mousa, S. A. *Mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis and current status of rapid molecular diagnostic testing*. *Acta Trop*, (2011).
- Lawn, S. D., Kerkhoff, A. D., Vogt, M. & Wood, R. *Diagnostic accuracy of a low-cost, urine antigen, point-of-care screening assay for HIV-associated pulmonary tuberculosis before antiretroviral therapy: a descriptive study*. *Lancet Infect Dis*, 12(3): 201-209, (2012).
- Levy-Frebault, V. V. & Portaels, F. *Proposed minimal standards for the genus Mycobacterium and for description of new slowly growing Mycobacterium species*. *Int J Syst Bacteriol*, 42(2): 315-323, (1992).
- Lipin, M. Y., Stepanshina, V. N., Shemyakin, I. G. & Shinnick, T. M. *Association of specific mutations in katG, rpoB, rpsL and rrs genes with spoligotypes of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates in Russia*. *Clin Microbiol Infect*, 13(6): 620-626, (2007).
- Mathema, B., Kurepina, N. E., Bifani, P. J. & Kreiswirth, B. N. *Molecular epidemiology of tuberculosis: current insights*. *Clin Microbiol Rev*, 19(4): 658-685, (2006).
- Maus, C. E., Plikaytis, B. B. & Shinnick, T. M. *Molecular analysis of cross-resistance to capreomycin, kanamycin, amikacin, and viomycin in Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 49(8): 3192-3197, (2005).

- Miesel, L., Weisbrod, T. R., Marcinkeviciene, J. A., Bittman, R. & Jacobs, W. R., Jr. *NADH dehydrogenase defects confer isoniazid resistance and conditional lethality in Mycobacterium smegmatis*. J Bacteriol, 180(9): 2459-2467, (1998).
- Mikhailovich, V., Lapa, S., Gryadunov, D., Sobolev, A., Strizhkov, B., Chernyh, N., Skotnikova, O., Irtuganova, O., Moroz, A., Litvinov, V., Vladimirskii, M., Perelman, M., Chernousova, L., Erokhin, V., Zasedatelev, A. & Mirzabekov, A. *Identification of rifampin-resistant Mycobacterium tuberculosis strains by hybridization, PCR, and ligase detection reaction on oligonucleotide microchips*. J Clin Microbiol, 39(7): 2531-2540, (2001).
- Miltgen, J., Morillon, M., Koeck, J. L., Varnerot, A., Briant, J. F., Nguyen, G., Verrot, D., Bonnet, D. & Vincent, V. *Two cases of pulmonary tuberculosis caused by Mycobacterium tuberculosis subsp canetti*. Emerg Infect Dis, 8(11): 1350-1352, (2002).
- Mitchison, D. A. *Basic mechanisms of chemotherapy*. Chest, 76(6 Suppl): 771-781, (1979).
- Mitchison, D. A. *[Mechanisms of the action of drugs in the short-course chemotherapy]*. Bull Int Union Tuberc, 60(1-2): 36-40, (1985).
- Moghazeh, S. L., Pan, X., Arain, T., Stover, C. K., Musser, J. M. & Kreiswirth, B. N. *Comparative antimycobacterial activities of rifampin, rifapentine, and KRM-1648 against a collection of rifampin-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates with known rpoB mutations*. Antimicrob Agents Chemother, 40(11): 2655-2657, (1996).
- Montoro, E. & Rodriguez, C. *Global burden of tuberculosis*. Tuberculosis 2007: From Basic Science to Patient Care. Palomino, J. C., Leao, C. S. & Ritacco, V.: 263-282, (2007).
- Mostowy, S., Cousins, D., Brinkman, J., Aranaz, A. & Behr, M. A. *Genomic deletions suggest a phylogeny for the Mycobacterium tuberculosis complex*. J Infect Dis, 186(1): 74-80, (2002).
- Murray, M. *Determinants of cluster distribution in the molecular epidemiology of tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 99(3): 1538-1543, (2002).
- Musser, J. M. *Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights*. Clin Microbiol Rev, 8(4): 496-514, (1995).
- N'Guessan, K., Dosso, M., Nahoua, I., Koffi, M. S. & Kouakou, J. *Primary resistance to antituberculosis drugs: trends in Cote d'Ivoire from 1995 to 2006*. Med Mal Infect, 38(4): 231-232, (2008).
- Nguyen, L. & Pieters, J. *Mycobacterial subversion of chemotherapeutic reagents and host defense tactics: challenges in tuberculosis drug development*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 49: 427-453, (2009).
- Niemann, S., Richter, E. & Rusch-Gerdes, S. *Biochemical and genetic evidence for the transfer of Mycobacterium tuberculosis subsp. caprae Aranaz et al. 1999 to the species Mycobacterium bovis Karlson and Lessel 1970 (approved lists 1980) as Mycobacterium bovis subsp. caprae comb. nov.* Int J Syst Evol Microbiol, 52(Pt 2): 433-436, (2002a).
- Niemann, S., Rusch-Gerdes, S., Joloba, M. L., Whalen, C. C., Guwatudde, D., Ellner, J. J., Eisenach, K., Fumokong, N., Johnson, J. L., Aisu, T., Mugerwa, R. D., Okwera, A. & Schwander, S. K. *Mycobacterium africanum subtype II is associated with two distinct genotypes and is a major cause of human tuberculosis in Kampala, Uganda*. J Clin Microbiol, 40(9): 3398-3405, (2002b).

- Niobe-Eyangoh, S. N., Kuaban, C., Sorlin, P., Cunin, P., Thonnon, J., Sola, C., Rastogi, N., Vincent, V. & Gutierrez, M. C. *Genetic biodiversity of Mycobacterium tuberculosis complex strains from patients with pulmonary tuberculosis in Cameroon*. J Clin Microbiol, 41(6): 2547-2553, (2003).
- Niobe-Eyangoh, S. N., Kuaban, C., Sorlin, P., Thonnon, J., Vincent, V. & Gutierrez, M. C. *Molecular characteristics of strains of the cameroon family, the major group of Mycobacterium tuberculosis in a country with a high prevalence of tuberculosis*. J Clin Microbiol, 42(11): 5029-5035, (2004).
- Njanpop-Lafourcade, B. M., Inwald, J., Ostyn, A., Durand, B., Hughes, S., Thorel, M. F., Hewinson, G. & Haddad, N. *Molecular typing of Mycobacterium bovis isolates from Cameroon*. J Clin Microbiol, 39(1): 222-227, (2001).
- Nkoghe, D., Toung Mve, M., Nnegue, S., Okome Nkoume, M., Iba, B. J., Hypolite, J., Leonard, P. & Kendjo, E. *[HIV seroprevalence among tuberculosis patients in Nkembo Hospital, Libreville, Gabon. Short note]*. Bull Soc Pathol Exot, 98(2): 121-122, (2005).
- Okamoto, S., Tamaru, A., Nakajima, C., Nishimura, K., Tanaka, Y., Tokuyama, S., Suzuki, Y. & Ochi, K. *Loss of a conserved 7-methylguanosine modification in 16S rRNA confers low-level streptomycin resistance in bacteria*. Mol Microbiol, 63(4): 1096-1106, (2007).
- Olsen, A. W., Williams, A., Okkels, L. M., Hatch, G. & Andersen, P. *Protective effect of a tuberculosis subunit vaccine based on a fusion of antigen 85B and ESAT-6 in the aerosol guinea pig model*. Infect Immun, 72(10): 6148-6150, (2004).
- ONUSIDA. *Rapport mondial: Rapport ONUSIDA sur l'épidémie mondiale du SIDA*. Geneve (2010).
- Pai, M., Riley, L. W. & Colford, J. M., Jr. *Interferon-gamma assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review*. Lancet Infect Dis, 4(12): 761-776, (2004).
- Palomino, J. C. *Molecular detection, identification and drug resistance detection in Mycobacterium tuberculosis*. FEMS Immunol Med Microbiol, 56(2): 103-111, (2009).
- Penlap, B. V., Victor, T., Warren, R., Jordaan, A., Tedom, Eyangoh, S. & Titanji, V. *Evidence of drug resistance among the LAM-Cameroon family in Mycobacterium tuberculosis isolates from Yaoundé, Cameroon*. Journal of Cameroon Academy of Sciences 9(1): 11-15, (2010).
- Pfyffer, G. E., Welscher, H. M., Kissling, P., Cieslak, C., Casal, M. J., Gutierrez, J. & Rusch-Gerdes, S. *Comparison of the Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) with radiometric and solid culture for recovery of acid-fast bacilli*. J Clin Microbiol, 35(2): 364-368, (1997).
- Phillips, M. S. & von Reyn, C. F. *Nosocomial infections due to nontuberculous mycobacteria*. Clin Infect Dis, 33(8): 1363-1374, (2001).
- Pym, A. S., Brodin, P., Brosch, R., Huerre, M. & Cole, S. T. *Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines Mycobacterium bovis BCG and Mycobacterium microti*. Mol Microbiol, 46(3): 709-717, (2002).
- Ramaswamy, S. & Musser, J. M. *Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in Mycobacterium tuberculosis: 1998 update*. Tuber Lung Dis, 79(1): 3-29, (1998).

- Ramaswamy, S. V., Reich, R., Dou, S. J., Jasperse, L., Pan, X., Wanger, A., Quitugua, T. & Graviss, E. A. *Single nucleotide polymorphisms in genes associated with isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother, 47(4): 1241-1250, (2003).
- Rattan, A., Kalia, A. & Ahmad, N. *Multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis: molecular perspectives*. Emerg Infect Dis, 4(2): 195-209, (1998).
- Rieder, H. L. *Bases épidémiologiques de la lutte antituberculeuse 1ère édition*. Paris, (1999).
- Rossau, R., Traore, H., De Beenhouwer, H., Mijs, W., Jannes, G., De Rijk, P. & Portaels, F. *Evaluation of the INNO-LiPA Rif. TB assay, a reverse hybridization assay for the simultaneous detection of Mycobacterium tuberculosis complex and its resistance to rifampin*. Antimicrob Agents Chemother, 41(10): 2093-2098, (1997).
- Rouillon, A., Perdrizet, S. & Parrot, R. *La transmission du bacille tuberculeux. L'effet des antibiotiques*. Revue française des Maladies Respiratoires, 4: 241-272, (1976).
- Runyon, E. H. *Anonymous mycobacteria in pulmonary disease*. Med Clin North Am, 43(1): 273-290, (1959).
- Sangare, L., Diande, S., Kouanda, S., Dingtoumda, B. I., Mourfou, A., Ouedraogo, F., Sawadogo, I., Nebie, B., Gueye, A., Sawadogo, L. T. & Traore, A. S. *Mycobacterium tuberculosis drug-resistance in previously treated patients in Ouagadougou, Burkina Faso*. Ann Afr Med, 9(1): 15-19, (2011).
- Schurch, A. C. & van Soolingen, D. *DNA fingerprinting of Mycobacterium tuberculosis: From phage typing to whole-genome sequencing*. Infect Genet Evol, 12(4): 602-609, (2011).
- Schurch, A. C. & van Soolingen, D. *DNA fingerprinting of Mycobacterium tuberculosis: from phage typing to whole-genome sequencing*. Infect Genet Evol, 12(4): 602-609, (2012).
- Scorpio, A. & Zhang, Y. *Mutations in pncA, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus*. Nat Med, 2(6): 662-667, (1996).
- Shamputa, I. C., Lee, J., Allix-Beguec, C., Cho, E. J., Lee, J. I., Rajan, V., Lee, E. G., Min, J. H., Carroll, M. W., Goldfeder, L. C., Kim, J. H., Kang, H. S., Hwang, S., Eum, S. Y., Park, S. K., Lee, H., Supply, P., Cho, S. N., Via, L. E. & Barry, C. E., 3rd. *Genetic diversity of Mycobacterium tuberculosis isolates from a tertiary care tuberculosis hospital in South Korea*. J Clin Microbiol, 48(2): 387-394, (2010).
- Shamputa, I. C., Rigouts & Portaels, F. *Molecular genetic methods for diagnosis and antibiotic resistance detection of mycobacteria from clinical specimens*. APMIS, 112(11-12): 728-752, (2004).
- Sharma, S. K. & Mohan, A. *Multidrug-resistant tuberculosis*. Indian J Med Res, 120(4): 354-376, (2004).
- Sherman, D. R., Mdluli, K., Hickey, M. J., Arain, T. M., Morris, S. L., Barry, C. E., 3rd & Stover, C. K. *Compensatory ahpC gene expression in isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis*. Science, 272(5268): 1641-1643, (1996).
- Shinnick, T. M. & Good, R. C. *Mycobacterial taxonomy*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 13(11): 884-901, (1994).
- Silva, P. E., Bigi, F., Santangelo, M. P., Romano, M. I., Martin, C., Cataldi, A. & Ainsa, J. A. *Characterization of P55, a multidrug efflux pump in Mycobacterium bovis*

- and *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 45(3): 800-804, (2001).
- Smith, I. *Mycobacterium tuberculosis pathogenesis and molecular determinants of virulence*. *Clin Microbiol Rev*, 16(3): 463-496, (2003).
- Smith, K. C., Armitige, L. &Wanger, A. *A review of tuberculosis: reflections on the past, present and future of a global epidemic disease*. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 1(3): 483-491, (2003).
- Soini, H. &Musser, J. M. *Molecular diagnosis of mycobacteria*. *Clin Chem*, 47(5): 809-814, (2001).
- Sola, C., Filliol, I., Gutierrez, M. C., Mokrousov, I., Vincent, V. &Rastogi, N. *Spoligotype database of Mycobacterium tuberculosis: biogeographic distribution of shared types and epidemiologic and phylogenetic perspectives*. *Emerg Infect Dis*, 7(3): 390-396, (2001).
- Sola, C., Horgen, L., Goh, K. S. &Rastogi, N. *Molecular fingerprinting of Mycobacterium tuberculosis on a Caribbean island with IS6110 and DRr probes*. *J Clin Microbiol*, 35(4): 843-846, (1997).
- Soudani, A., Hadjfredj, S., Zribi, M., Masmoudi, A., Messaoud, T., Tiouri, H. &Fendri, C. *Characterization of Tunisian Mycobacterium tuberculosis rifampin-resistant clinical isolates*. *J Clin Microbiol*, 45(9): 3095-3097, (2007).
- Sreevatsan, S., Pan, X., Stockbauer, K. E., Williams, D. L., Kreiswirth, B. N. &Musser, J. M. *Characterization of rpsL and rrs mutations in streptomycin-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from diverse geographic localities*. *Antimicrob Agents Chemother*, 40(4): 1024-1026, (1996).
- Sreevatsan, S., Pan, X., Zhang, Y., Kreiswirth, B. N. &Musser, J. M. *Mutations associated with pyrazinamide resistance in pncA of Mycobacterium tuberculosis complex organisms*. *Antimicrob Agents Chemother*, 41(3): 636-640, (1997a).
- Sreevatsan, S., Stockbauer, K. E., Pan, X., Kreiswirth, B. N., Moghazeh, S. L., Jacobs, W. R., Jr., Telenti, A. &Musser, J. M. *Ethambutol resistance in Mycobacterium tuberculosis: critical role of embB mutations*. *Antimicrob Agents Chemother*, 41(8): 1677-1681, (1997b).
- Streicher, E. M., Victor, T. C., van der Spuy, G., Sola, C., Rastogi, N., van Helden, P. D. &Warren, R. M. *Spoligotype signatures in the Mycobacterium tuberculosis complex*. *J Clin Microbiol*, 45(1): 237-240, (2007).
- Streicher, E. M., Warren, R. M., Kewley, C., Simpson, J., Rastogi, N., Sola, C., van der Spuy, G. D., van Helden, P. D. &Victor, T. C. *Genotypic and phenotypic characterization of drug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from rural districts of the Western Cape Province of South Africa*. *J Clin Microbiol*, 42(2): 891-894, (2004).
- Supply, P., Allix, C., Lesjean, S., Cardoso-Oelemann, M., Rusch-Gerdes, S., Willery, E., Savine, E., de Haas, P., van Deutekom, H., Roring, S., Bifani, P., Kurepina, N., Kreiswirth, B., Sola, C., Rastogi, N., Vatin, V., Gutierrez, M. C., Fauville, M., Niemann, S., Skuce, R., Kremer, K., Loch, C. &van Soolingen, D. *Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 44(12): 4498-4510, (2006).
- Supply, P., Mazars, E., Lesjean, S., Vincent, V., Gicquel, B. &Locht, C. *Variable human minisatellite-like regions in the Mycobacterium tuberculosis genome*. *Mol Microbiol*, 36(3): 762-771, (2000).

- Tacquet, A. & Tison, F. [New technic of isolation of mycobacteria by sodium laurylsulfate]. *Ann Inst Pasteur (Paris)*, 100: 676-680, (1961).
- Tattevin, P. *Le traitement de la tuberculose en 2007*. *Med Mal Infect*, 37: 617 - 628, (2007).
- Telenti, A., Honore, N., Bernasconi, C., March, J., Ortega, A., Heym, B., Takiff, H. E. & Cole, S. T. *Genotypic assessment of isoniazid and rifampin resistance in Mycobacterium tuberculosis: a blind study at reference laboratory level*. *J Clin Microbiol*, 35(3): 719-723, (1997a).
- Telenti, A., Imboden, P., Marchesi, F., Schmidheini, T. & Bodmer, T. *Direct, automated detection of rifampin-resistant Mycobacterium tuberculosis by polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 37(10): 2054-2058, (1993).
- Telenti, A., Philipp, W. J., Sreevatsan, S., Bernasconi, C., Stockbauer, K. E., Wieles, B., Musser, J. M. & Jacobs, W. R., Jr. *The emb operon, a gene cluster of Mycobacterium tuberculosis involved in resistance to ethambutol*. *Nat Med*, 3(5): 567-570, (1997b).
- Thumamo, B. P., Asuquo, A. E., Abia-Bassey, L. N., Lawson, L., Hill, V., Zozio, T., Emenyonu, N., Eko, F. O. & Rastogi, N. *Molecular epidemiology and genetic diversity of Mycobacterium tuberculosis complex in the Cross River State, Nigeria*. *Infect Genet Evol*, 12(4): 671-677, (2011).
- Tortoli, E., Mariottini, A. & Mazzarelli, G. *Evaluation of INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2: improved reverse hybridization multiple DNA probe assay for mycobacterial identification*. *J Clin Microbiol*, 41(9): 4418-4420, (2003).
- Tortoli, E. & Palomino, J. C. *New diagnostic methods*. *Tuberculosis 2007: from basic science to patient care*. Palomino, J. C., Cardoso, R. F. & Ritacco, V.: 441-466, (2007).
- Tortoli, E., Simonetti, M. T. & Lavinia, F. *Evaluation of reformulated chemiluminescent DNA probe (AccuProbe) for culture identification of Mycobacterium kansasii*. *J Clin Microbiol*, 34(11): 2838-2840, (1996).
- Tudo, G., Gonzalez, J., Obama, R., Rodriguez, J. M., Franco, J. R., Espasa, M., Simarro, P. R., Escaramis, G., Ascaso, C., Garcia, A. & Jimenez de Anta, M. T. *Study of resistance to anti-tuberculosis drugs in five districts of Equatorial Guinea: rates, risk factors, genotyping of gene mutations and molecular epidemiology*. *Int J Tuberc Lung Dis*, 8(1): 15-22, (2004).
- Tudo, G., Rey, E., Borrell, S., Alcaide, F., Codina, G., Coll, P., Martin-Casabona, N., Montemayor, M., Moure, R., Orcau, A., Salvado, M., Vicente, E. & Gonzalez-Martin, J. *Characterization of mutations in streptomycin-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates in the area of Barcelona*. *J Antimicrob Chemother*, 65(11): 2341-2346, (2010).
- van Doorn, H. R., An, D. D., de Jong, M. D., Lan, N. T., Hoa, D. V., Quy, H. T., Chau, N. V., Duy, P. M., Tho, D. Q., Chinh, N. T., Farrar, J. J. & Caws, M. *Fluoroquinolone resistance detection in Mycobacterium tuberculosis with locked nucleic acid probe real-time PCR*. *Int J Tuberc Lung Dis*, 12(7): 736-742, (2008).
- van Embden, J. D., Cave, M. D., Crawford, J. T., Dale, J. W., Eisenach, K. D., Gicquel, B., Hermans, P., Martin, C., McAdam, R., Shinnick, T. M. & et al. *Strain identification of Mycobacterium tuberculosis by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology*. *J Clin Microbiol*, 31(2): 406-409, (1993).

- van Soolingen, D., Hoogenboezem, T., de Haas, P. E., Hermans, P. W., Koedam, M. A., Teppema, K. S., Brennan, P. J., Besra, G. S., Portaels, F., Top, J., Schouls, L. M. & van Embden, J. D. *A novel pathogenic taxon of the Mycobacterium tuberculosis complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa*. Int J Syst Bacteriol, 47(4): 1236-1245, (1997).
- van Soolingen, D., Kremer, K. & Hermans, P. *Molecular epidemiology: breakthrough achievements and future prospects*. Tuberculosis 2007: from basic science to patient care. Palomino, J. C., Cardoso Leao, S. & Rittaco, V., (2007).
- van Soolingen, D., Qian, L., de Haas, P. E., Douglas, J. T., Traore, H., Portaels, F., Qing, H. Z., Enkhsaikan, D., Nymadawa, P. & van Embden, J. D. *Predominance of a single genotype of Mycobacterium tuberculosis in countries of east Asia*. J Clin Microbiol, 33(12): 3234-3238, (1995).
- van Soolingen, D., van der Zanden, A. G., de Haas, P. E., Noordhoek, G. T., Kiers, A., Foudraine, N. A., Portaels, F., Kolk, A. H., Kremer, K. & van Embden, J. D. *Diagnosis of Mycobacterium microti infections among humans by using novel genetic markers*. J Clin Microbiol, 36(7): 1840-1845, (1998).
- Viana-Niero, C., Gutierrez, C., Sola, C., Filliol, I., Boulahbal, F., Vincent, V. & Rastogi, N. *Genetic diversity of Mycobacterium africanum clinical isolates based on IS6110-restriction fragment length polymorphism analysis, spoligotyping, and variable number of tandem DNA repeats*. J Clin Microbiol, 39(1): 57-65, (2001).
- Vincent, V. *Taxonomie des mycobactéries*. Revue Française des Laboratoires, 273, (1995).
- Vincent, V., Brown-Elliott, B., Jost, K. C. & Wallace, R. J. *Phenotypic and genotypic identification*. Manual of Clinical Microbiology 8th edition. Murray, P. R., Tenover, J. C., Tenover, J. C., Tenover, J. C. & Tenover, J. C. Washington, DC, ASM Press, (2003).
- Vincent, V. & Gutierrez, M. C. *Principe et intérêt du typage moléculaire appliqué à Mycobacterium tuberculosis*. Revue Française des Laboratoires, 320: 25 - 30, (2000).
- Wade, M. M. & Zhang, Y. *Mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis*. Front Biosci, 9: 975-994, (2004).
- Wang, J., Liu, Y., Zhang, C. L., Ji, B. Y., Zhang, L. Z., Shao, Y. Z., Jiang, S. L., Suzuki, Y., Nakajima, C., Fan, C. L., Ma, Y. P., Tian, G. W., Hattori, T. & Ling, H. *Genotypes and characteristics of clustering and drug susceptibility of Mycobacterium tuberculosis isolates collected in Heilongjiang Province, China*. J Clin Microbiol, 49(4): 1354-1362, (2011).
- Warren, R. M., Gey van Pittius, N. C., Barnard, M., Hesselning, A., Engelke, E., de Kock, M., Gutierrez, M. C., Chege, G. K., Victor, T. C., Hoal, E. G. & van Helden, P. D. *Differentiation of Mycobacterium tuberculosis complex by PCR amplification of genomic regions of difference*. Int J Tuberc Lung Dis, 10(7): 818-822, (2006).
- Wells, A. Q. & Oxon, D. M. *Tuberculosis in wild voles*. Lancet, 1: 1221, (1927).
- WHO-IUATLD. *Antituberculosis drug resistance in the world. Report no 4*. surveillance, Geneva, Switzerland. WHO/HTM/TB/2008, (2008).
- World Health Organization (WHO). *Laboratory services for tuberculosis control : Microscopy Part II*. Geneva, WHO, (1998a).
- World Health Organization (WHO). *Laboratory services for tuberculosis control: Culture Part III*. Geneva, WHO, (1998b).

- World Health Organization (WHO). *Global tuberculosis control: WHO report 2011*. WHO/HTM/TB/2011.16. Geneva, Switzerland, (2010).
- World Health Organization (WHO). *Global tuberculosis report 2012*. WHO/HTM/TB/2012.6. Geneva, Switzerland, (2012).
- Williams, D. L., Spring, L., Gillis, T. P., Salfinger, M. & Persing, D. H. *Evaluation of a polymerase chain reaction-based universal heteroduplex generator assay for direct detection of rifampin susceptibility of Mycobacterium tuberculosis from sputum specimens*. Clin Infect Dis, 26(2): 446-450, (1998).
- Yone, E. W., Kuaban, C. & Kengne, A. P. *[Impact of HIV infection on the evolution of tuberculosis among adult patients in Yaounde, Cameroon]*. Rev Pneumol Clin, 68(6): 338-344, (2012).
- Yuan, X., Zhang, T., Kawakami, K., Zhu, J., Zheng, W., Li, H., Deng, G., Tu, S. & Liu, W. *Genotyping and clinical characteristics of multidrug and extensively drug-resistant tuberculosis in a tertiary care tuberculosis hospital in China*. BMC Infect Dis, 13: 315, (2013).
- Zaczek, A., Brzostek, A., Augustynowicz-Kopec, E., Zwolska, Z. & Dziadek, J. *Genetic evaluation of relationship between mutations in rpoB and resistance of Mycobacterium tuberculosis to rifampin*. BMC Microbiol, 9: 10, (2009).
- Zanetti, S., Ardito, F., Sechi, L., Sanguinetti, M., Molicotti, P., Delogu, G., Pinna, M. P., Nacci, A. & Fadda, G. *Evaluation of a nonradiometric system (BACTEC 9000 MB) for detection of mycobacteria in human clinical samples*. J Clin Microbiol, 35(8): 2072-2075, (1997).
- Zhang, J., Mi, L., Wang, Y., Liu, P., Liang, H., Huang, Y., Lv, B. & Yuan, L. *Genotypes and drug susceptibility of Mycobacterium tuberculosis Isolates in Shihezi, Xinjiang Province, China*. BMC Res Notes, 5: 309, (2012).
- Zhang, Y., Heym, B., Allen, B., Young, D. & Cole, S. *The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of Mycobacterium tuberculosis*. Nature, 358(6387): 591-593, (1992).
- Zhang, Y., Wade, M. M., Scorpio, A., Zhang, H. & Sun, Z. *Mode of action of pyrazinamide: disruption of Mycobacterium tuberculosis membrane transport and energetics by pyrazinoic acid*. J Antimicrob Chemother, 52(5): 790-795, (2003).
- Zhang, Y. & Yew, W. W. *Mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis*. Int J Tuberc Lung Dis, 13(11): 1320-1330, (2009).

