
RECHERCHE DE MARQUEURS GENETIQUES DE SOUCHES DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* MULTIRESISTANTES AUX ANTIBIOTIQUES EN REPUBLIQUE CENTRAFRICAINE

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement en 2005
devant l'Université Paul Sabatier de Toulouse*

par

Laurent Xavier Marc NOUVEL
Né le 6 mai 1977 à Pau (Pyrénées-Atlantiques)

Directeur de thèse : **M. le Professeur François SCHELCHER**

JURY

PRESIDENT :
M. Henri DABERNAT

Professeur à l'Université Paul Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :
M. François SCHELCHER
M. Jean EUZEBY

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITE :
Mme Brigitte GICQUEL

Professeur de l'Institut Pasteur de Paris

MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directeur	: M.	A. MILON
Directeurs honoraires	M. M.	G. VAN HAVERBEKE J. FERNEY
Professeurs honoraires	M. M. M. M. M. M. M. M. Mme M. M. M.	L. FALIU C. LABIE C. PAVAU F. LESCURE A. RICO D. GRIESS A. CAZIEUX V. BURGAT J. CHANTAL J.-F. GUELF M. EECKHOUTTE

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. BRAUN Jean-Pierre, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
- M. CABANIE Paul, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. DARRE Roland, *Productions animales*
- M. DORCHIES Philippe, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. TOUTAIN Pierre-Louis, *Physiologie et Thérapeutique*

PROFESSEURS 1^{ère} CLASSE

- M. AUTEFAGE André, *Pathologie chirurgicale*
- M. BODIN ROZAT DE MANDRES NEGRE Guy, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. DELVERDIER Maxence, *Anatomie pathologique*
- M. ENJALBERT Francis, *Alimentation*
- M. EUZEBY Jean, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. FRANC Michel, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. HENROTEAUX Marc, *Médecine des carnivores*
- M. MARTINEAU Guy-Pierre, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*
- M. PETIT Claude, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. REGNIER Alain, *Physiopathologie oculaire*
- M. SAUTET Jean, *Anatomie*
- M. SCHELCHER François, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

PROFESSEURS 2^e CLASSE

- Mme BENARD Geneviève, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
- M. BERTHELOT Xavier, *Pathologie de la Reproduction*
- M. CONCORDET Didier, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. CORPET Denis, *Science de l'Aliment et Technologies dans les Industries agro-alimentaires*
- M. DUCOS Alain, *Zootéchnie*
- M. DUCOS DE LAHITTE Jacques, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- M. GUERRE Philippe, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mme KOLF-CLAUW Martine, *Pharmacie - Toxicologie*
- M. LEFEBVRE Hervé, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. LIGNEREUX Yves, *Anatomie*
- M. PICAVET Dominique, *Pathologie infectieuse*

INGENIEUR DE RECHERCHES

- M. TAMZALI Youssef, *Responsable Clinique équine*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

- Mme MICHAUD Françoise, *Professeur d'Anglais*
- M. SEVERAC Benoît, *Professeur d'Anglais*

MAÎTRE DE CONFERENCES HORS CLASSE

M. JOUGLAR Jean-Yves, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

MAÎTRE DE CONFERENCES CLASSE NORMALE

M. ASIMUS Erik, *Pathologie chirurgicale*
M. BAILLY Jean-Denis, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
M. BERGONIER Dominique, *Pathologie de la Reproduction*
M. BERTAGNOLI Stéphane, *Pathologie infectieuse*
Mme BOUCRAUT-BARALON Corine, *Pathologie infectieuse*
Mlle BOULLIER Séverine, *Immunologie générale et médicale*
Mme BOURGES-ABELLA Nathalie, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. BOUSQUET-MELOU Alain, *Physiologie et Thérapeutique*
Mme BRET-BENNIS Lydie, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. BRUGERE Hubert, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
Mlle CADIERGUES Marie-Christine, *Dermatologie*
Mme CAMUS-BOUCLAINVILLE Christelle, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mme COLLARD-MEYNAUD Patricia, *Pathologie chirurgicale*
Mlle DIQUELOU Armelle, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. DOSSIN Olivier, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. FOUCRAS Gilles, *Pathologie du bétail*
Mme GAYRARD-TROY Véronique, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
M. GUERIN Jean-Luc, *Elevage et Santé Avicoles et Cunicoles*
Mme HAGEN-PICARD Nicole, *Pathologie de la Reproduction*
M. JACQUIET Philippe, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. JAEG Jean-Philippe, *Pharmacie et Toxicologie*
M. LYAZRHI Faouzi, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. MARENDI Marc, *Pathologie de la reproduction*
M. MATHON Didier, *Pathologie chirurgicale*
M. MEYER Gilles, *Pathologie des ruminants*
Mme MEYNADIER-TROEGELER Annabelle, *Alimentation*
M. MONNEREAU Laurent, *Anatomie, Embryologie*
Mme PRYMENKO Nathalie, *Alimentation*
Mme RAYMOND-LETRON Isabelle, *Anatomie pathologique*
M. SANS Pierre, *Productions animales*
Mlle TRUMEL Catherine, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*
M. VERWAERDE Patrick, *Anesthésie, Réanimation*

MAÎTRE DE CONFERENCES CONTRACTUELS

Mlle BIBBAL Delphine, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
M. CASSARD Hervé, *Pathologie du bétail*
M. DESMAIZIERES Louis-Marie, *Clinique équine*
M. NOUVEL Laurent-Xavier, *Pathologie de la reproduction*

MAÎTRE DE CONFERENCES ASSOCIE

M. REYNOLDS Brice, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

M. CONCHOU Fabrice, *Imagerie médicale*
M. CORBIERE Fabien, *Pathologie des ruminants*
Mlle LACROUX Caroline, *Anatomie pathologique des animaux de rente*
M. MOGICATO Giovanni, *Anatomie, Imagerie médicale*
Mlle PALIERNE Sophie, *Chirurgie des animaux de compagnie*

A Monsieur le Professeur Henri DABERNAT

Professeur des Universités

Praticien hospitalier

Bactériologie - Virologie

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse,
Hommages respectueux.

A Monsieur le Professeur François SCHELCHER

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour

Qui nous a aidé et dirigé dans ce travail,
Qu'il trouve ici l'expression de notre reconnaissance et de notre profond respect.

A Monsieur le Professeur Jean EUZEBY

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie

Qui nous a fait l'honneur de participer à notre jury de thèse,
Qu'il trouve ici la marque de toute notre considération.

A Madame le Professeur Brigitte GICQUEL

Professeur de l'Institut Pasteur de Paris

Génétique mycobactérienne

Qui nous a proposé ce sujet et qui nous a accompagné dans son élaboration,
Pour nous avoir accueilli dans son laboratoire, pour sa générosité et sa disponibilité,
Qu'elle trouve ici l'expression de notre profonde gratitude.

Au Docteur Eric Kassa-Kelembho de l'Institut Pasteur de Bangui,

A tous ceux de l'Unité de Génétique Mycobactérienne de l'Institut Pasteur de Paris

A todos del laboratorio de genetica de mycobacterias de la Universidad de Zaragoza

A François Schelcher, Philippe Jacquet et Philippe Dorchies,
pour leurs conseils et leur accompagnement au cours de mes études.

Ainsi qu'à tout le service de Parasitologie de l'ENVT : Christelle, Françoise, Jean-Paul, Didier, Hervé, Virginie...

Et à l'ensemble du service de Pathologie des Ruminants de l'ENVT : Fabien, Christophe, Hervé, Caroline, Olivier, Arnaud, Colette, Annie, Patrick...

Aux docteurs Martinaud, Novella et Richard,
Aux docteurs Canonne et Picollier,
pour leur accueil et leur soutien tout au long de mes études.

A Christine Citti et Dominique Bergonier,
pour leur passion de la correction et de la perfection

A Marie-Christine Dokhélar,
pour son amour de la lecture et de la relecture

A Yves Nouvel,
pour sa vision de clarté venue du monde de la finance

« ... nous aussi, enveloppés que nous sommes d'une si grande nuée de témoins,
... courons avec constance l'épreuve qui nous est proposée. »

Hebreux, XII, 1.

Nere amarentzat,

A mon père,

A mes frères Benoît et Yves,

A Catherine, François, Guillaume, Marie, Sara,

A toute la famille Nouvel et toute la famille Dokhélar et associés,

Avec toute ma tendresse et mon affection.

Avec toute mon amitié,

A Olivier, Corinne et leurs enfants,
A Pascal, Sandrine et leurs enfants,
mes formidables parrains,
une deuxième famille qui m'a accueilli, réconforté, écouté...

A Frédéric et Tiphaine,

A Sébastien, Henri, Anne-Claire et tous les autres...

A tous mes amis...

« La connaissance des maladies infectieuses enseigne aux hommes qu'ils sont frères et solidaires. Nous sommes frères parce que le même danger nous menace, solidaires parce que la contagion nous vient le plus souvent de nos semblables. Nous sommes aussi à ce point de vue, quels que soient nos sentiments vis-à-vis d'eux, solidaires des animaux, surtout des bêtes domestiques. Les animaux portent souvent les germes de nos infections et, d'autre part, les pertes que causent les maladies du bétail frappent durement l'économie humaine.

Ne serait-ce pas une raison suffisante, terre à terre, égoïste, pour que les hommes regardent avec sollicitude les êtres qui les entourent [...] et s'unissent fraternellement contre l'ennemi commun. »

Charles Nicolle

Destin des maladies infectieuses, 1933. (105)

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES.....	12
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	14
LISTE DES ABREVIATIONS.....	15
INTRODUCTION.....	15
1 LE GENRE <i>MYCOBACTERIUM</i>.....	21
1.1 Caractéristiques bactériennes.....	21
1.2 Taxonomie.....	22
1.3 Ecologie et importance en médecine.....	25
2 LA TUBERCULOSE DANS LE MONDE.....	27
2.1 Répartition géographique.....	27
2.2 Impact socio-économique.....	29
2.3 Tuberculose et V.I.H.....	29
2.4 Vaccination antituberculeuse et <i>Mycobacterium bovis</i> BCG.....	30
2.5 Traitement de la tuberculose.....	34
2.5.1 La stratégie de traitement DOTS.....	34
2.5.2 Régime de traitement antituberculeux.....	35
2.6 Tuberculose, résistance et multirésistance aux antibiotiques.....	36
3 PRINCIPES MOLECULAIRES DE LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES CHEZ <i>M. TUBERCULOSIS</i>.....	39
3.1 Mécanismes d'acquisition de la résistance aux antituberculeux.....	39
3.1.1 Mutations spontanées et antibiorésistance.....	39
3.1.2 Résistance acquise, résistance primaire et multirésistance.....	40
3.1.3 Facteurs liés à l'apparition de bacilles multirésistants.....	41
3.2 Bases génétiques de la résistance aux antituberculeux chez <i>M. tuberculosis</i>	41
3.2.1 Rifampicine et rifamycines associées.....	41
3.2.2 Isoniazide et éthionamide.....	43
3.2.3 Streptomycine.....	46
3.2.4 Pyrazinamide.....	47
3.2.5 Ethambutol.....	48
3.2.6 Fluoroquinolones.....	49
3.2.7 Kanamycine, amikacine, viomycine et capréomycine.....	50
3.2.8 Cyclosérine.....	50

4	LE TYPAGE MOLECULAIRE DU COMPLEXE <i>M. TUBERCULOSIS</i>.....	53
4.1	Variabilité génétique au sein du complexe <i>M. tuberculosis</i>	54
4.2	RFLP-IS6110, technique de référence	58
4.3	Spoligotypage.....	59
4.4	MIRU-VNTR	62
5	<i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> ET SELECTION ADAPTATIVE	65
5.1	Pression de sélection et stratégies adaptatives chez <i>M. tuberculosis</i>	65
5.2	Phénotype mutateur chez <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas</i> et autres	65
5.3	Souches mutatrices chez <i>M. tuberculosis</i>	66
6	MATERIELS ET METHODES	69
6.1	Origine des souches et ADN de <i>M. tuberculosis</i>	69
6.2	Séquençage de <i>mutT1</i> , <i>mutT2</i> , <i>mutT3</i> , <i>mutT4</i> , <i>ogt</i> , <i>alkA</i> et <i>rpoB</i>	69
6.3	Spoligotypage.....	70
6.4	Analyse de dendrogrammes assistée par ordinateur	71
6.5	Estimation de la fréquence de mutation	71
7	RESULTATS	73
7.1	Polymorphisme des gènes <i>mut</i> dans une série de souches MDR.....	73
7.2	Polymorphisme au locus <i>alkA</i> dans une série de souches non MDR	75
7.3	Spoligotypage de l'ensemble des souches	76
7.4	Mesure de la fréquence de mutation	81
8	DISCUSSION	83
8.1	Une prédominance de souches Haarlem en République Centrafricaine.....	83
8.2	Détection d'une probable épidémie de tuberculose MDR.....	84
8.3	Marqueurs génétiques mis en évidence	84
8.3.1	Marqueur de souches suspectes d'être épidémiques	85
8.3.2	Marqueurs de la famille Haarlem	85
8.4	Historique évolutif du polymorphisme au locus <i>alkA</i>	86
8.5	Ada et AlkA chez <i>E. coli</i> et <i>M. tuberculosis</i>	87
	CONCLUSIONS	91
	RÉFÉRENCES	95

TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURE 1 : ESTIMATION DE L'INCIDENCE DE LA TUBERCULOSE DANS LES PAYS SURVEILLES PAR L'OMS EN 2001 (OMS, 2003 (184))	28
FIGURE 2 : GENEALOGIE DES DIFFERENTES SOUCHES DE BCG FONDEE SUR LEUR DATE DE DISTRIBUTION ET LEURS CARACTERISTIQUES MOLECULAIRES (D'APRES (5, 108)).....	32
FIGURE 3 : PREVALENCE DES CAS DE TUBERCULOSE RESISTANTE A AU MOINS UN DES 4 ANTITUBERCULEUX DE PREMIERE LIGNE DE 1994 A 1999 (OMS, 2000 (43)).....	37
FIGURE 4 : PREVALENCE DES NOUVEAUX CAS DE TUBERCULOSE RESISTANTE A AU MOINS UN DES 4 ANTITUBERCULEUX DE PREMIERE LIGNE DE 1994 A 1999 (OMS, 2000 (43)).....	37
FIGURE 5 : PREVALENCE DES NOUVEAUX CAS DE TUBERCULOSE MULTIRESISTANTE DE 1994 A 1999 (OMS, 2000 (43)).....	38
FIGURE 6 : DEVELOPPEMENT ET DIFFUSION DES ANTIBIORESISTANCES	40
FIGURE 7 : MUTATIONS OBSERVEES ENTRE LES CODONS 507 ET 533 DU LOCUS <i>rpoB</i> CHEZ 479 ISOLATS DE <i>M. TUBERCULOSIS</i> RESISTANTS A LA RIFAMPICINE	42
FIGURE 8 : PROFILS DE DIFFERENTES TECHNIQUES DE TYPAGE MOLECULAIRE CHEZ <i>M. TUBERCULOSIS</i> (82)	54
FIGURE 9 : DISTRIBUTION DES 29 IS, 2 PROPHAGES ET 7 «ELEMENTS REP13E12 SUR LE CHROMOSOME DE <i>M. TUBERCULOSIS</i> H37Rv.....	55
FIGURE 10 : CARTE DE LA SEQUENCE D'INSERTION IS6110 (1.35 KB)	58
FIGURE 11 : STRUCTURE DU LOCUS DR DANS LE GENOME MYCOBACTERIEN ET PRINCIPE DE SON AMPLIFICATION PAR PCR <i>IN VITRO</i>	60
FIGURE 12 : LES DIFFERENTES ETAPES DU SPOLIGOTYPAGE	61
FIGURE 13 : RESULTAT DU SPOLIGOTYPAGE : SPOLIGOTYPE DE 38 ISOLATS CLINIQUES	61
FIGURE 14 : CARTE DES 41 LOCI MIRU SUR LE CHROMOSOME DE <i>M. TUBERCULOSIS</i> H37Rv	63
FIGURE 15 : DENDROGRAMME DES 79 PROFILS DE SPOLIGOTYPES DIFFERENTS DES 284 SOUCHES TYPEES.	77
FIGURE 16 : REPARTITION DES SOUCHES MDR DANS LES DIFFERENTS CLUSTERS	78
FIGURE 17 : REPARTITION DES SOUCHES NON MDR DANS LES DIFFERENTS CLUSTERS	79
FIGURE 18 : DENDROGRAMME DES SPOLIGOTYPES DES CLUSTERS M, N, O, Q ET U	80
FIGURE 19 : PROPOSITION DE VOIE EVOLUTIVE POUR L'ACCUMULATION DES MUTATIONS 79 ET 337 AU LOCUS <i>alkA</i>	87
FIGURE 20 : ALIGNEMENT DES SEQUENCES PROTEIQUES D'ADA (A) ET D'ALKA (B) D' <i>E. COLI</i> AVEC CELLE D'ALKA DE <i>M. TUBERCULOSIS</i>	88
FIGURE 21 : SCHEMA DE LA REGULATION DE LA REPONSE ADAPTATIVE PAR ADA CHEZ <i>ESCHERICHIA COLI</i>	89
TABLEAU 1 : CLASSIFICATION DES MYCOBACTERIES ATYPIQUES SELON RUNYON.....	23
TABLEAU 2 : LES PROJETS DE SEQUENÇAGE DES GENOMES MYCOBACTERIENS	25
TABLEAU 3 : CRITERES DE DIFFERENTIATION DES MEMBRES DU COMPLEXE <i>M. TUBERCULOSIS</i>	53
TABLEAU 4 : DIFFERENTES METHODES DE GENOTYPAGE, TECHNIQUES EMPLOYEES ET ADN CIBLES	57
TABLEAU 5 : COUPLES D'AMORCES UTILISES POUR AMPLIFIER LES DIFFERENTES ORFs PAR PCR	69
TABLEAU 6 : VARIATIONS OBSERVEES AU NIVEAU DE 6 GENES PUTATIFS DE REPARATION DE L'ADN DE 55 SOUCHES MDR ISOLEES A BANGUI (RCA).....	74
TABLEAU 7 : SOUCHES APPARTENANT A DES FAMILLES DU COMPLEXE <i>TUBERCULOSIS</i> DEJA IDENTIFIEES	81
TABLEAU 8 : NOMBRE ET FREQUENCE DES CINQ CLUSTERS LES PLUS REPRESENTES LORS D'UNE ETUDE DE SOUCHES ISOLEES EN 1996 ET LORS DE LA PRESENTE ETUDE DE SOUCHES ISOLEES EN 1998 DANS LES MEMES CONDITIONS	83
TABLEAU 9 : POLYMORPHISME OBSERVE AU NIVEAU DES GENES DE REPARATION DE L'ADN.....	85

LISTE DES ABREVIATIONS

ABC	: ATP- <i>binding cassette</i> , cassette liant l'ATP
ADN	: Acide DésoxyriboNucléique
ARN	: Acide RiboNucléique
ARNr	: ARN ribosomal
ATP	: Adénosine Tri-Phosphate
BAAR	: Bacille Acido-Alcool-Resistant
BCG	: Bacille de Calmette et Guérin
°C	: degré Celsius
CMI	: Concentration Minimale Inhibitrice
DOTS	: <i>Directly Observed Treatment Short-course</i> , observation directe et traitement de courte durée (recommandations OMS)
DR	: <i>Direct Repeat</i> , répétition directe
DVR	: <i>Direct Variable Repeat</i> , répétition directe variable
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EDTA	: Acide Tétracétique Ethylène Diamine
ETH	: Ethambutol
G+C	: Guanine-Cytosine
Gr.	: Grec (latinisé)
IS	: <i>Insertion Sequence</i> , séquence d'insertion
INH	: Isoniazide
Kb	: Kilobases
Mb	: Megabases
MDR	: <i>Multi-Drug Resistant</i> , multirésistant aux antibiotiques
MIRU	: <i>Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit</i> , unité mycobactérienne répétée et dispersée
MMR	: <i>Methyl-directed Mismatch Repair</i> , réparation des mésappariements dus aux méthylations
MNT	: Mycobactérie Non Tuberculeuse
MOTT	: <i>Mycobacteria Other Than Tuberculosis</i> , ou MNT
<i>M. spp</i>	: <i>Mycobacterium species</i>
NAD(P)	: Nicotinamide Adénosine Dinucléotide (Phosphate), H : forme réduite, + : forme oxydée
NAT	: N-acetyl transférase
n. dim.	: nom diminutive
N.L.	: Néo-Latin
n. neut.	: nom de genre neutre

OMS : Organisation Mondiale de la Santé
ORF : *Open Reading Frame*, phase ouverte de lecture
pb : paires de bases
PCR : *Polymerase Chain Reaction*, réaction en chaîne de la polymérase
PNB : Produit National Brut
PZA : Pyrazinamide
RCA : République Centrafricaine
RD : Région de Délétion
RFLP : *Restriction Fragment Length Polymorphism*, polymorphisme de longueur de fragments de restriction
RIF : Rifampicine
SCC : *Short-Course Chemotherapy*, traitement standardisé de courte durée (recommandations OMS)
SDS : Dodécyl Sulfate de Sodium
sec : secondes
SIDA : Syndrome d'Immunodéficience Acquisée
SNP : *Single Nucleotide Polymorphism*, ou polymorphisme d'un seul nucléotide
SSPE : tampon chlorure de sodium, phosphate de sodium, EDTA
STR : Streptomycine
UFC : Unités Formant Colonie
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine
VNTR : *Variable Number Tandem Repeat*, répétition en tandem en nombre variable

INTRODUCTION

En 2000, l'Organisation des Nations Unies crée le Fond mondial de lutte contre le SIDA, la tuberculose et le paludisme pour augmenter les ressources visant à lutter contre les trois maladies infectieuses les plus dévastatrices dans le monde. Déjà en 1993, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) avait placé la tuberculose comme une priorité mondiale. En effet, la tuberculose demeure un problème majeur de santé publique. Avec deux millions de morts par an, elle reste, avec le SIDA, la première cause de mortalité d'origine infectieuse dans le monde. Un tiers de la population mondiale est infecté par *Mycobacterium tuberculosis*. Le nombre de cas de tuberculose augmenterait à l'échelle mondiale de deux pour-cent par an (39). Les personnes souffrant d'immunodépression comme les malades atteints du SIDA ont un risque considérablement plus élevé de développer la maladie après infection. Le traitement antibiotique usuel repose sur l'administration de 3 à 4 antibiotiques (rifampicine, isoniazide, pyrazinamide et éthambutol) pendant deux mois, suivi de la prise de deux antibiotiques (rifampicine et isoniazide) pendant quatre mois. La plupart des malades des pays en voie de développement n'ont pas accès à ce traitement. Beaucoup bénéficient seulement d'un traitement incomplet qui conduit à l'acquisition de résistances aux antibiotiques. Aujourd'hui, non seulement les souches résistantes à au moins un antituberculeux sont très répandues, mais des souches résistantes à tous les antituberculeux de première ligne ont émergé (41, 43, 112).

La résistance aux antituberculeux est un problème de plus en plus préoccupant (42). La multirésistance aux antibiotiques (MDR) chez *M. tuberculosis*, c'est-à-dire la résistance à au moins la rifampicine et l'isoniazide conduit à de nombreux échecs thérapeutiques et à des taux de mortalité très élevés (74, 174, 180). Certaines souches multirésistantes sont responsables d'épidémies qui atteignent essentiellement les patients atteints du SIDA (9, 47). L'émergence de telles souches pourrait gravement compromettre la réussite des programmes d'éradication de la tuberculose. La connaissance des bases moléculaires de

l'acquisition de ces multirésistances chez *M. tuberculosis* permettrait leur dépistage précoce pour la mise en place rapide d'un traitement adapté.

Le diagnostic de la tuberculose clinique et les prises de décision thérapeutiques reposent sur les outils de bactériologie classique : examen microscopique et culture bactérienne. La croissance lente des mycobactéries pathogènes et le faible pouvoir discriminant de leur caractérisation phénotypique limitent la rapidité d'adaptation thérapeutique. Les résultats d'un antibiogramme sont obtenus après 3 à 6 semaines d'incubation pour un prélèvement riche en bacilles, et après 2 à 3 mois quand une primoculture est nécessaire. Même si des méthodes de mesure de la respiration bactérienne permettent de raccourcir ce délai à une dizaine de jours après la primoculture, cela reste long (31, 69). Des techniques de typage moléculaire, basées sur le polymorphisme de certains gènes, ont donc été mises au point pour identifier plus précisément les mycobactéries, ou pour accélérer la détection des résistances aux antibiotiques.

Les bactéries sont en perpétuelle évolution pour, entre autre, s'adapter aux pressions de sélection exercées par leur environnement. Les populations bactériennes qui ont un niveau élevé de variabilité génétique ont une plus grande probabilité de survie face aux changements environnementaux (162). Chez *E. coli*, les travaux de Denamur *et al.* (36) ont montré l'existence d'une variabilité importante des gènes de réparation de l'ADN eux-mêmes générateurs de variabilité. Des souches de *Pseudomonas aeruginosa* possédant des gènes de réparation de l'ADN non fonctionnels ont été isolées en association avec un haut niveau de résistance aux antibiotiques (109). Ces souches sont caractérisées par un taux de mutation élevé leur permettant de s'adapter plus rapidement (161) et sont appelées souches mutatrices (ou souche de phénotype mutateur). Ce phénotype mutateur est lié à l'altération de gènes dits anti-mutateurs comme les gènes de réparation de l'ADN. Des variations dans de tels gènes ont été récemment décrites chez des souches de *M. tuberculosis* de la famille Beijing, souches souvent impliquées dans des épidémies de tuberculose multirésistante. Ces dernières se seraient adaptées par l'acquisition transitoire d'un phénotype mutateur (125).

Pour tester cette hypothèse, nous avons étudié le polymorphisme de gènes anti-mutateurs potentiels dans des isolats MDR et non MDR. Ainsi, après avoir discuté des connaissances actuelles sur la tuberculose, cette thèse présente des

données expérimentales sur la variabilité génétique d'isolats cliniques de *M. tuberculosis* provenant de Bangui en République Centrafricaine, dans le but d'identifier des marqueurs de souches multirésistantes aux antibiotiques.

1 LE GENRE *MYCOBACTERIUM*

Le genre *Mycobacterium* (Gr. *myces* -etis, un champignon ; n. dim. Gr. *bakterion*, une baguette (en bactériologie, un petit bacille) ; n. neut. N.L. *Mycobacterium* : une bactérie ressemblant à un champignon) est le seul genre de la famille des *Mycobacteriaceae*. Cette famille fait partie du sous-ordre des *Corynebacterineae* dans l'ordre des *Actinomycetales*. L'espèce type est *Mycobacterium tuberculosis* (Zopf, 1883) Lehmann and Neumann, 1896, souche H37Rv, déposée à l'*American Type Culture Collection*, n° ATCC 27294 (44, 58, 63).

C'est en 1896 que Lehmann et Neumann proposent le genre *Mycobacterium* incluant les bacilles de Hansen et de Koch, auparavant classés comme étant *Bacterium leprae* et *Bacterium tuberculosis*. Si plusieurs centaines d'espèces mycobactériennes ont été décrites par la suite, seulement 41 ont été retenues dans la « *Approved Lists of Bacterial Names* » publiée en 1980 par l'*International Journal of Systematic Bacteriology* (146). A ce jour, le genre *Mycobacterium* comprend cent douze espèces décrites et validées (46). L'acido-alcoolo-résistance, la présence d'acides mycoliques ayant 60 à 90 atomes de carbone et un pourcentage en G+C de 62 à 70 % constituent les trois critères utilisés a minima pour définir le genre *Mycobacterium*.

1.1 *Caractéristiques bactériennes*

Les mycobactéries sont des bacilles légèrement incurvés ou droits, de 1 à 10 µm de long et de 0,2 à 0,6 µm de diamètre. Les bactéries sont parfois assemblées en filaments ou pseudo-mycélium qui se fragmentent en bâtonnets sous agitation. Elles ne forment pas de flagelle ni d'autre appendice de type *pili* ou *fimbriae*, pas de capsule ni de spore. Du point de vue physiologique, les mycobactéries sont aérobies ou microaérophiles. La température optimale de croissance varie selon les espèces entre 30 et 45°C. Les mycobactéries synthétisent des catalases et produisent des

acides à partir de sucres par la voie oxydative. Certaines synthétisent des pigments caroténoïdes non diffusibles, conditionnées par l'exposition des cultures à la lumière visible (espèces dites photochromogènes) ou même à l'obscurité (espèces scotochromogènes) (31).

Sur milieu solide, les différentes mycobactéries donnent des colonies de types différents : colonies lisses (S) ou rugueuses (R), eugoniques (de grande taille) ou dysgoniques (petites colonies). L'aspect est variable en fonction du milieu mais reste invariant pour un milieu donné (185). Les cultures jeunes peuvent montrer des ramifications rudimentaires ; ces ramifications sont fréquemment observées avec *M. avium* en croissance dans des cellules HeLa. Les cellules de *M. tuberculosis* ont tendance à se ranger parallèlement pour constituer des « cordes » ou « serpentines » ; cette propriété est associée à la présence d'un glycolipide toxique (*cord factor*) (106).

La structure très particulière de la paroi mycobactérienne qui peut contenir jusqu'à 60 % de lipides, confère à ces organismes une extrême hydrophobicité et une haute résistance aux agents chimiques (99). Ils sont dits acido-alcool-résistants. Cette propriété constitue la base de la technique de coloration de Ziehl-Neelsen, mise au point par R. Koch et améliorée par F. Ziehl et F.C. Neelsen en 1885 : les mycobactéries colorées par la fuchsine phéniquée retiennent le colorant après un traitement par l'alcool acidifié alors que les autres bactéries sont rapidement décolorées. En outre, bien que faiblement colorées par la méthode de Gram, les mycobactéries sont considérées comme des bactéries à coloration de Gram positive (8, 31).

1.2 Taxonomie

Les mycobactéries peuvent être réparties en deux groupes taxonomiques selon leur vitesse de croissance en conditions optimales de culture. Les mycobactéries dites à croissance rapide ont un temps de génération de 2 à 5 heures et forment une colonie visible en milieu solide en moins de 7 jours, alors que les mycobactéries à croissance lente ont un temps de génération moyen de 24 heures et

mettent plus d'une semaine pour former une colonie. *M. tuberculosis* appartient à ce dernier groupe, et une colonie est observée après 3 semaines d'incubation environ.

Dès la fin du XIX^e siècle l'énorme intérêt suscité par le bacille de Koch a favorisé une sub-division taxonomique des mycobactéries basée uniquement sur les rapports de ces bactéries avec *M. tuberculosis*. D'où l'ample utilisation, encore de nos jours, des dénominations de mycobactéries atypiques (120), mycobactéries non tuberculeuse (MNT) et mycobactéries autres que *tuberculosis* (MOTT) pour les mycobactéries qui ne sont pas identifiables comme étant *M. tuberculosis* ou *M. bovis*. Il a fallu attendre les années soixante pour une classification des mycobactéries. Ainsi, selon Runyon, les mycobactéries atypiques, anonymes ou non classifiées sont artificiellement divisées en quatre groupes d'après leur vitesse de croissance et leur pigmentation (135) :

Tableau 1 : Classification des mycobactéries atypiques selon Runyon.

Groupe I	mycobactéries photochromogènes à croissance lente
Groupe II	mycobactéries scotochromogènes à croissance lente
Groupe III	mycobactéries non chromogènes à croissance lente
Groupe IV	mycobactéries à croissance rapide (pigmentées ou non)

La détermination des acides aminés et sucres composant la paroi bactérienne, et de la structure des peptidoglycanes, a conduit à la division des actinomycètes en divers groupes. Ces analyses ont mis en évidence les rapports étroits entre les familles du sous-ordre des *Corynebacterineae* (ordre des *Actinomycetales*). Tous ces micro-organismes contiennent des quantités considérables d'acide meso-diaminopimelique (meso-A 2 pm), d'arabinose, et de galactose dans leur paroi présentant le chémotype IV (*sensu* Lechevalier et Lechevalier (87)), des peptidoglycanes de type A1 γ (selon Schleifer et Kandler (138)) et des résidus d'acide muramique qui sont plutôt N-glycosylés que N-acétylés comme la plupart des autres bactéries riches en meso-A 2 pm. Les genres *Corynebacterium*, *Turicella*, *Dietzia*, *Gordonia*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Tsukamurella* et *Williamsia* (sous-ordre des *Corynebacterineae*) contiennent des acides mycoliques. Ces derniers sont des acides gras α -ramifiés, β -hydroxylés, à longue chaîne carbonée (30-90 atomes de carbone). Les acides

mycoliques non mycobactériens ont des structures relativement simples et le nombre d'atomes de carbone varie de 22 à 74. En revanche, chez les mycobactéries, le nombre d'atomes de carbone varie entre 60 et 90 et divers types structuraux sont identifiés (63).

Après les classifications phénotypiques, les mycobactéries ont été classées sur des critères génétiques. La taxonomie génétique des mycobactéries a débuté par des hybridations ADN-ADN : plus le taux de ré-appariement entre les ADN dénaturés de deux bactéries est grand, plus ces bactéries ont du matériel génétique en commun et plus elles sont proches (20). L'ADN des mycobactéries comprend un pourcentage élevé en guanine (G) et en cytosine (C). Le pourcentage en G+C varie de 62 à 70 %, sauf pour *M. leprae* dont le chromosome ne contient que 58 % de G+C. Le séquençage des ARN ribosomiaux 16S des différentes mycobactéries a permis de démontrer que leurs séquences nucléotidiques étaient effectivement très semblables. De plus, il a été possible de confirmer que la division des mycobactéries selon leur vitesse de croissance correspondait bien à une réalité phylogénique (144).

Avec le développement de la génomique, divers projets de séquençage de génomes mycobactériens sont ou ont été menés. Les génomes de ces mycobactéries sont constitués d'un seul chromosome circulaire d'une taille de 4,4 megabases pour *M. tuberculosis*, 4,35 Mb pour *M. bovis* BCG Pasteur, et 2,8 Mb pour *M. leprae*. Le génome de *M. tuberculosis* H37Rv, la souche de référence la plus utilisée en laboratoire, et qui a gardé sa pleine virulence pour les animaux d'expérimentation depuis son isolement en 1905, comprend 4 411 529 paires de bases (14). Le contenu moyen en guanine-cytosine (G+C) est de 65,6 %, si bien que certaines régions correspondent à un contenu en G+C supérieur à 80 %. La capacité codante est élevée (supérieure à 90 %), et comparable à celle des autres génomes bactériens séquencés. L'analyse bioinformatique a permis l'identification de 50 gènes codant pour des ARN stables et 3 924 gènes codant pour des protéines. La recherche d'homologie a permis d'annoter 80 % des phases ouvertes de lecture putatives comme ayant divers degrés de correspondance avec des gènes décrits précédemment ou à des séquences codant des protéines hypothétiques (23).

Tableau 2 : Les projets de séquençage des génomes mycobactériens

Souche	Institution	Consultation	Référence
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	The Sanger Institute, Institut Pasteur	http://www.sanger.ac.uk/Projects/M_tuberculosis http://genolist.pasteur.fr/TubercuList	Cole <i>et al.</i> (23)
<i>M. leprae</i> TN	The Sanger Institute, Institut Pasteur	http://www.sanger.ac.uk/Projects/M_leprae http://genolist.pasteur.fr/Leproma	Cole <i>et al.</i> (24)
<i>M. tuberculosis</i> CDC 1551	TIGR	http://www.tigr.org/tdb	Fleischmann <i>et al.</i> (52)
<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> K10	Minnesota University	http://pathogenomics.umn.edu/map_index	Li <i>et al.</i> (91)
<i>M. bovis</i> AF2122 (spoligotype 9)	The Sanger Institute, Institut Pasteur	http://www.sanger.ac.uk/Projects/M_bovis http://genolist.pasteur.fr/Bovilist	Garnier <i>et al.</i> (57)
<i>M. tuberculosis</i> 210	TIGR	http://www.tigr.org/tdb/ufmg	Projet en cours
<i>M. smegmatis</i> MC ² 155	TIGR	http://www.tigr.org/tdb/ufmg	Projet en cours
<i>M. avium</i> 104	TIGR	http://www.tigr.org/tdb/ufmg	Projet en cours
<i>M. marinum</i> M	The Sanger Institute	http://www.sanger.ac.uk/Projects/M_marinum	Projet en cours
<i>M. microti</i> OV254	The Sanger Institute, Institut Pasteur	http://www.sanger.ac.uk/Projects/M_microti	Projet en cours
<i>M. bovis</i> BCG Pasteur 1173P2	Institut Pasteur	http://www.sanger.ac.uk/Projects/M_bovis	Projet en cours
<i>M. ulcerans</i>	Institut Pasteur	http://genopole.pasteur.fr/Mulc/BuruList.html	Projet en cours

TIGR, The Institute for Genomic Research

1.3 Ecologie et importance en médecine

La plupart des mycobactéries sont des espèces saprophytes, retrouvées dans le sol et dans l'eau. Ainsi, sommes-nous exposés aux mycobactéries environnementales, lesquelles sont souvent en contact avec la peau et les muqueuses, particulièrement les épithéliums respiratoire et digestif. Témoinant de la présence des mycobactéries dans de nombreux autres écosystèmes, différentes souches de *Mycobacterium spp.* sont capables de dégrader des xénobiotiques tels que les hydrocarbures polycycliques aromatiques, le toluène, voire même un insecticide (l'endosulfan) (139, 160). Plusieurs ont été isolées chez les oiseaux et divers animaux sauvages et domestiques. Le spectre d'hôte des mycobactéries

pathogènes peut être large. Par exemple, *M. bovis*, agent de la tuberculose bovine peut être à l'origine de la tuberculose chez les humains et d'autres primates, des mammifères et certains rapaces. *M. pinnipedii*, responsable de la tuberculose chez les pinnipèdes, a également été isolé dans un cas tuberculose pulmonaire chez un dresseur d'otaries australien, un tapir (élevé en captivité à proximité d'un bassin d'otaries) et un bovin néo-zélandais (45).

En dépit de leur ample répartition dans la nature, quelques espèces sont plus fréquemment identifiées dans certaines régions géographiques. Ainsi, *M. africanum* est fréquemment isolé chez les tuberculeux en Afrique de l'Ouest et du Centre. "*M. canettii*", une espèce décrite plus récemment, semble présente préférentiellement sur le continent africain (119).

De même, *M. ulcerans*, pathogène émergent à l'origine de l'ulcère du Buruli, est une cause importante de morbidité en Afrique de l'Ouest. Contrairement aux autres pathogènes mycobactériens, *M. ulcerans* semble demeurer extracellulaire pendant l'infection. C'est la seule mycobactérie connue pour sécréter une toxine, fortement liée au pouvoir pathogène : la mycolactone (30, 59, 169).

Le pouvoir pathogène des mycobactéries environnementales, dites mycobactéries atypiques ou mycobactéries non tuberculeuses (MNT), est très variable. Ces organismes sont moins virulents pour l'homme que *M. tuberculosis* et *M. leprae*. Ils peuvent coloniser les surfaces cutanées, les muqueuses ou les sécrétions biologiques sans provoquer de maladie. L'invasion tissulaire est plus fréquente chez les personnes prédisposées suite à une réponse immunitaire locale ou systémique déficiente. Dans la plupart des cas, ces maladies ont une progression lente et des caractéristiques histopathologiques communes avec la tuberculose (73).

Parmi les espèces pathogènes strictes, deux agents infectieux majeurs, *M. leprae* et *M. tuberculosis*, sont de véritables fléaux de l'humanité, responsables respectivement de la tuberculose et de la lèpre. La tuberculose est une maladie causée par les mycobactéries appartenant au complexe d'espèce *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. pinnipedii* et "*M. canettii*"). *M. microti* est la cause d'une forme disséminée de tuberculose chez les rongeurs. La tuberculose humaine est presque toujours due à *M. tuberculosis*, *M. bovis* ou *M. africanum*.

2 LA TUBERCULOSE DANS LE MONDE

Cent vingt ans après l'identification de *M. tuberculosis* par R. Koch en 1882, la tuberculose reste une maladie préoccupante à l'échelle planétaire. Un tiers de la population mondiale est infecté par le Bacille de Koch. Cinq à dix pour cent des personnes infectées développent la maladie à un moment de leur vie. En 2002, on estime à 8,8 millions le nombre de nouveaux cas par an et à 2 millions le nombre annuel de décès dans le monde. En 2003, le nombre de cas augmentait globalement de 2,4 %. La situation est particulièrement grave dans les pays en voie de développement qui représentent près de 95 % des nouveaux cas détectés. En Afrique sub-saharienne, le nombre de cas augmente d'environ 20 % par an (39, 184).

Pour des raisons à la fois de recul économique, de détérioration des systèmes de santé, de l'application insuffisante des mesures de lutte contre la tuberculose, de la propagation du VIH et de l'émergence de bacilles tuberculeux multirésistants, la tuberculose est en augmentation dans de nombreux pays en développement (129). On estime qu'entre 2000 et 2020 :

- près d'un milliard de personnes contracteront la tuberculose,
- 200 millions de personnes tomberont malade de la tuberculose,
- la tuberculose emportera au moins 35 millions de vies (103, 154).

2.1 Répartition géographique

Selon les estimations de l'OMS en 2002, les pays à revenu faible et intermédiaire (selon la classification de la Banque Mondiale : pays ayant un PNB annuel par habitant inférieur à 2 995 dollars) représentent plus de 90 % de

l'ensemble des cas de tuberculose (anciens et nouveaux) et plus de 95 % des décès annuels (154, 184). Dans ces pays, la tuberculose est responsable de 7 % de la mortalité globale, de 20 % des morts dans la tranche d'âge des 15-59 ans et de 25 % des décès évitables parmi les adultes (39). Les régions les plus affectées par la tuberculose sont les suivantes (Figure 1) :

- l'Asie du Sud-est : on estime qu'il y a dans cette région trois millions de nouveaux cas de tuberculose chaque année, et il s'agit de la région la plus touchée ;
- l'Europe de l'Est : en Europe de l'Est, les décès dus à la tuberculose sont en augmentation, après presque 40 ans de diminution régulière ;
- l'Afrique subsaharienne : plus de 1,5 millions de cas de tuberculose apparaissent chaque année. Ce chiffre croît rapidement, en grande partie du fait de la forte prévalence du VIH (154, 184).

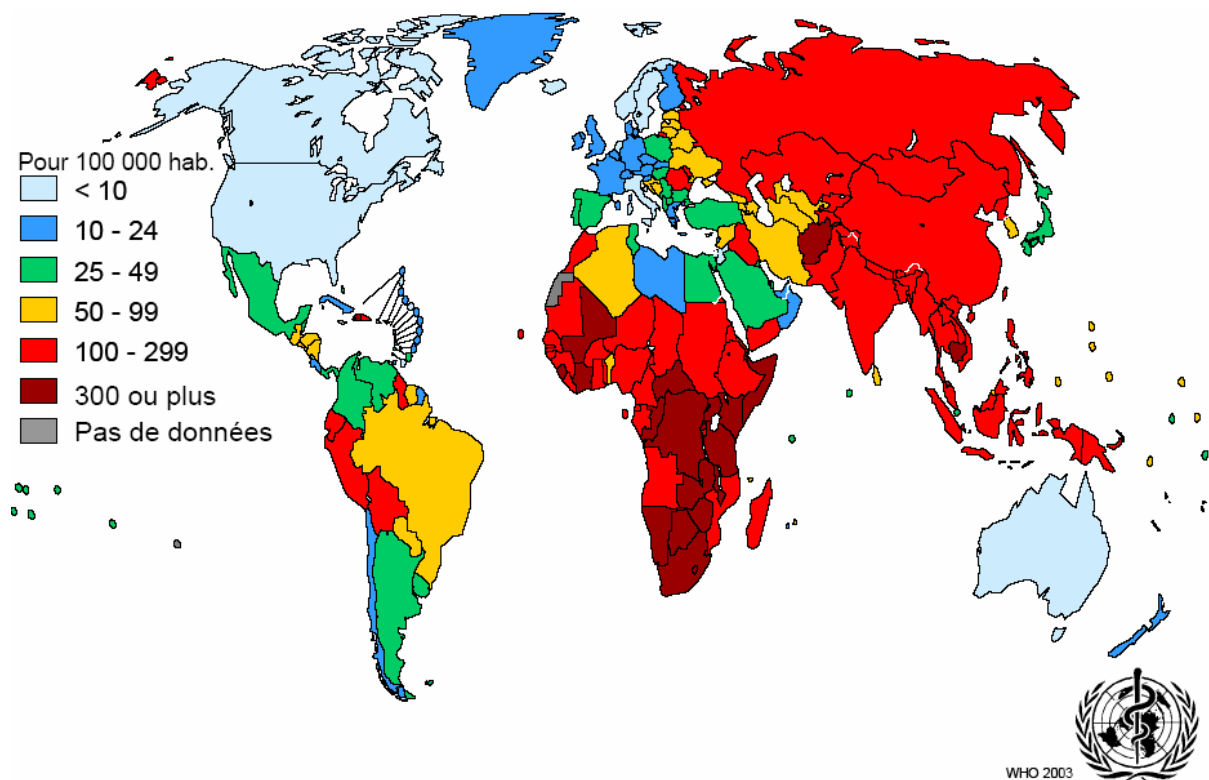


Figure 1 : Estimation de l'incidence de la tuberculose dans les pays surveillés par l'OMS en 2001 (OMS, 2003 (184))

2.2 Impact socio-économique

La pauvreté, le manque de services de santé de base, la malnutrition et les conditions de vie inadaptées sont autant de facteurs qui contribuent à la propagation de la tuberculose. En outre, la maladie et les décès dus à la tuberculose renforcent et aggravent la pauvreté dans bien des communautés. Plus de 75 % des maladies et des décès associés à la tuberculose surviennent parmi les 15-54 ans, la tranche d'âge la plus économiquement active de la population. En moyenne, un patient atteint de tuberculose perd trois à quatre mois de temps de travail en raison de sa maladie. Le manque à gagner peut aller jusqu'à 30 % du revenu annuel du foyer. Certaines familles perdent 100 % de leur revenu. On estime que la tuberculose fait baisser de 12 milliards de dollars les revenus des communautés les plus pauvres du monde (103, 153, 184).

2.3 Tuberculose et V.I.H.

La tuberculose est un fléau mondial en progression. Pourtant, à partir de 1952, avec l'apparition d'une chimiothérapie efficace, le déclin de la tuberculose était réel. Dans les pays industrialisés, le risque d'infection déclinait de 10 à 15 % et le seuil d'éradication était fixé à 2015-2030. Dans les pays en voie de développement, le taux de déclin était de 5 à 10 % en Amérique Latine, dans les Caraïbes et en Afrique du Nord. Il était au maximum de 3 % en Afrique sub-saharienne et en Asie du Sud-Est, du même ordre que le taux de croissance démographique (136).

On a assisté, dès 1986, à une recrudescence de la tuberculose dans le monde. C'est aux Etats-Unis que l'augmentation du nombre de cas est d'abord signalée (3 % en 1986, 6 % en 1990) et le rôle de l'infection à VIH paraît très vraisemblable dans cette résurgence. En Afrique Noire et en Asie du Sud-Est, l'importance de l'endémie tuberculeuse et la prévalence élevée de l'infection à VIH ont rendu cette situation plus fréquente qu'ailleurs (129). Par exemple, en République centrafricaine, la prévalence de l'infection par le VIH qui était estimée à 32 % en 1988 et à 62 % en 1994, est de 82 % en 1998 chez les patients tuberculeux hospitalisés à Bangui.

L'infection à VIH a donc entraîné une résurgence de la tuberculose dans le monde, en particulier en Afrique subsaharienne et en Asie du sud-est, continents où l'endémie tuberculeuse était encore importante en 1981. Associés l'un à l'autre, le bacille de Koch et le VIH forment une combinaison dévastatrice. Le VIH favorise une évolution rapide de l'infection primaire de la tuberculose vers une maladie active, et constitue le plus important facteur de risque connu, pour ce qui est de réactiver une infection tuberculeuse latente vers une maladie active. La tuberculose est un facteur létal majeur chez les personnes vivant avec le VIH. Un tiers des personnes infectées par le VIH développera la tuberculose (27, 183).

2.4 Vaccination antituberculeuse et *Mycobacterium bovis* BCG

L'observation par A. Calmette et C. Guérin à partir de 1908 que la culture d'une souche de *M. bovis*, en présence de bile de bœuf (utilisée à l'époque pour émulsionner les bacilles en croissance) provoquait une diminution de la virulence de cette souche, a conduit ces auteurs à imaginer la création de cultures empiriquement atténuées. Après treize années de culture, soit 230 passages successifs, de la souche virulente de *M. bovis* appelée « lait Nocard » sur de la pomme de terre additionnée de bile de bœuf, Calmette et Guérin isolent une souche atténuée de *M. bovis* : le bacille de Calmette et Guérin (BCG). Cette souche se révéla non seulement avirulente et sans réversion vers la virulence dans tous les modèles animaux testés, mais également protectrice dans une épreuve par la souche virulente. En 1921, la première immunisation chez l'homme fut pratiquée chez un nourrisson né de mère tuberculeuse. Plus tard, Calmette a montré que chez les 969 enfants nés de mère tuberculeuse ou vivant dans un environnement très contagieux et vaccinés par le BCG, la mortalité (tuberculeuse ainsi que d'origine non précisée) était seulement de 3,2 % contre 32,6 % chez un groupe comparable d'enfants non vaccinés (17). Malgré l'absence d'un consensus à propos de ces résultats (67), le BCG fut alors recommandé par la « Ligue des Nations » et administré à un nombre croissant d'enfants et d'adultes.

En 1929, une catastrophe se déroule à Lübeck en Allemagne : sur 251 enfants vaccinés par le BCG, 72 meurent de tuberculose. Cet accident discrédite le BCG. Pourtant en 1932, une commission d'enquête prouve que la souche de BCG

utilisée avait été contaminée par une souche virulente de *M. tuberculosis*, la souche Kiel, cultivée dans le même laboratoire (10). En 1948, lors de la première conférence mondiale sur le BCG, l'innocuité du vaccin est reconnue et de vastes campagnes de vaccinations sont décidées. Plus de 80 ans après le début de son utilisation, il ressort que le BCG est le vaccin qui a été le plus utilisé dans le monde, avec plus de 3 milliards de sujets vaccinés. Ce vaccin a de nombreux avantages (152) :

- il n'induit pas d'effet secondaire majeur et peut être administré dès la naissance,
- une seule dose suffit pour conférer un effet protecteur et une immunité de longue durée,
- il est peu coûteux à produire ; il est relativement stable et peut être conservé sous forme lyophilisée,
- il apporte également une protection contre la lèpre (~60 %), y compris dans les études ne montrant pas d'effet protecteur du BCG contre la tuberculose.

Toutefois, l'efficacité du BCG s'est révélée très variable selon les populations vaccinées. Les résultats les plus disparates ont été observés dans le cas d'individus adultes vaccinés, l'efficacité allant de 0 à 80 % (152). Selon une méta-analyse faisant la synthèse des différents résultats publiés, le vaccin BCG protégerait à 80 % contre les formes disséminées de tuberculose (notamment les tuberculoses méningées et miliaires particulièrement grave chez l'enfant) et seulement à 50 % contre les formes pulmonaires de la maladie (22). De plus, il n'est pas clairement établi à ce jour que le BCG ait une efficacité protectrice contre les tuberculoses liées à des réactivations de « bacilles dormants » qui constitue la majorité des cas de tuberculose chez l'adulte.

Plus récemment, des études réalisées en utilisant des souris vaccinées, ont démontré que l'immunité acquise, à médiation cellulaire, induite par la vaccination BCG est capable de protéger contre les formes disséminées de tuberculose ; elle n'est pourtant pas capable de prévenir l'infection pulmonaire initiale (107). Il est à noter que chez l'homme, l'immunité naturellement acquise, après infection et maladie tuberculeuse convenablement et efficacement traitée, n'empêche pas la réinfection exogène du poumon (175).

Outre le biais que peuvent introduire les diverses méthodes d'évaluation employées pour mesurer l'efficacité protectrice du BCG, plusieurs raisons pourraient expliquer la grande disparité des résultats. Tout d'abord, il est à noter qu'il n'existe

pas une seule souche de BCG, mais plusieurs. Exception faite de la souche Pasteur 1173P2, aucune des souches cultivées dans les laboratoires de différents pays n'a été clonée. En effet, la culture originale développée par Calmette et Guérin a donné naissance à des souches filles au fur et à mesure de sa perpétuation dans différents laboratoires (BCG souches Copenhague [Danemark], Glaxo [Royaume-Uni], Tokyo [Japon], Moreau [Brésil], Montréal [Canada], Russe, Tice [Etats-Unis], parmi d'autres). Ces différentes souches de BCG peuvent être divisées en 2 classes selon leur date d'obtention : souches précoces obtenues entre 1924 et 1926, et souches tardives obtenues après 1931.

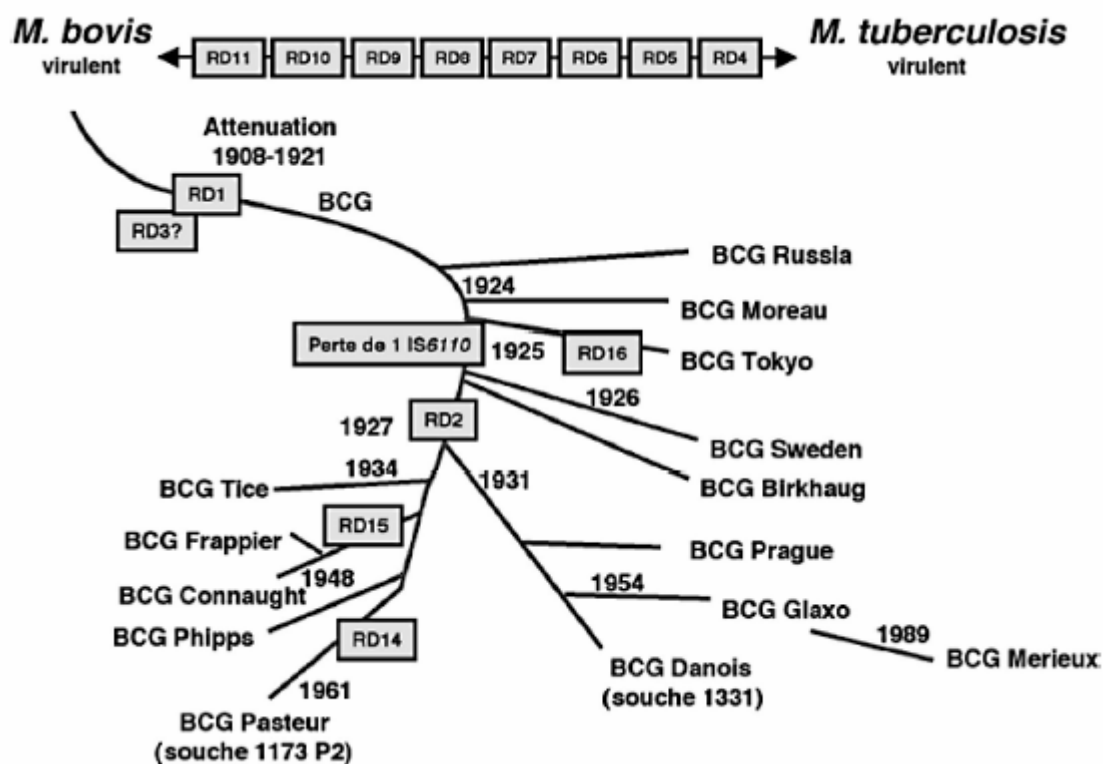


Figure 2 : Généalogie des différentes souches de BCG fondée sur leur date de distribution et leurs caractéristiques moléculaires (d'après (5, 108)).

Cette classification repose sur des différences moléculaires (Figure 2). Des différences importantes dans l'immunogénicité des souches ont pu être observées : alors que les souches tardives sont fortement immunogènes, les souches précoces sont de faible immunogénicité chez les rongeurs (85). En théorie, le fait que différentes préparations vaccinales et souches de BCG aient été utilisées dans les

études chez l'homme pourrait donc en partie expliquer les variations observées. Néanmoins, l'efficacité du BCG n'a pu être reliée à un type de souche (11).

En 1994, Colditz et al. (22) ont remarqué que l'efficacité du BCG a été plus significative dans les études réalisées dans des régions de la planète plus distantes de l'équateur. Ainsi, la latitude serait à l'origine de 41 % de la variance observée entre les études analysées (189). Différents facteurs (tels que les conditions socio-économiques, la composition génétique des populations, le climat, le régime alimentaire, l'état nutritionnel, le degré d'exposition aux mycobactéries environnementales, la virulence des souches locales de *M. tuberculosis*, la qualité de la distribution et la viabilité du BCG), varient en fonction de la latitude et peuvent influencer l'efficacité du BCG. Il a été postulé que les populations fréquemment exposées à des mycobactéries développent déjà des réponses immunitaires dirigées contre celles-ci qui peuvent en partie « masquer » l'effet protecteur de la vaccination par le BCG (114).

Hormis son efficacité controversée, la vaccination par le BCG souffre de deux autres défauts. D'une part, le BCG étant une souche vivante, son inoculation à des sujets immunodéprimés peut présenter des risques (80, 104). Néanmoins, après des études réalisées en Afrique, l'OMS recommande la vaccination à la naissance des enfants VIH+ asymptomatiques pour le SIDA. D'autre part, le fait de vacciner avec le BCG ne permet pas le dépistage de l'infection tuberculeuse, particulièrement les cas d'infection récente, où l'antibiothérapie est souhaitable. La difficulté d'utilisation de ce test chez les personnes vaccinées conduit les pays où l'incidence de la tuberculose est faible à ne pas vacciner avec le BCG. Cependant, la présence, dans ces pays, de populations à risque élevé de tuberculose, qui risquent en particulier de développer une tuberculose multirésistante, pourrait modifier cette attitude. En effet, une étude récente suggère que la vaccination par le BCG pourrait contribuer à la diminution de la morbidité/mortalité due à la tuberculose, spécifiquement, chez les sans domicile fixe non infectés par le VIH aux Etats-Unis (12).

Les récents progrès de la génétique mycobactérienne ont permis d'établir les différences moléculaires existant entre *M. tuberculosis*, *M. bovis*, et *M. bovis* BCG, ainsi qu'entre les différentes souches de BCG. L'identité de séquence ADN de *M. bovis* BCG avec les autres mycobactéries du complexe *tuberculosis* est de 99 %. Aucun retour à la virulence chez l'animal n'a été observé pour les différentes

souches de BCG, suggérant que les mutations qui les ont atténuées sont des délétions stables ou des mutations multiples et irréversibles. Trois régions de délétion (RD1, RD2, RD3) ont été caractérisées dans *M. bovis* BCG Connaught en comparaison avec *M. bovis* (92). Seize régions sont délétées dans le génome de *M. bovis* BCG Pasteur. La région RD1 est présente chez *M. tuberculosis* et *M. bovis* mais absente chez toutes les souches BCG analysées. Quatre régions (RD3, RD14 à RD16) sont absentes dans certaines souches de BCG. Neuf autres régions (RD4 à RD10, RD12 et RD13) sont présentes chez *M. tuberculosis* mais absentes chez *M. bovis* et *M. bovis* BCG (13). Seules les régions RD1 et RD3 sont absentes de toutes les souches de BCG et présentes chez *M. bovis*. Aujourd'hui, le rôle de ces mutations dans l'atténuation ou l'immunogénicité du BCG reste encore inconnu. De plus, les différences génétiques observées entre les nombreuses souches BCG n'ont pu être corrélées à l'efficacité du vaccin (92). D'importantes recherches visant à développer de nouveaux vaccins contre la tuberculose, plus efficaces que le BCG, ont été entreprises depuis une quinzaine d'années. Différentes stratégies sont employées :

- l'utilisation de protéines de *M. tuberculosis* comme vaccin sous-unité,
- l'utilisation de séquences d'ADN codant pour des antigènes protecteurs comme vaccins ADN,
- l'utilisation de nouvelles souches rationnellement atténuées de *M. tuberculosis* comme vaccin vivant (60).

2.5 Traitement de la tuberculose

2.5.1 La stratégie de traitement DOTS

L'infection tuberculeuse peut être prévenue, traitée et endiguée. L'OMS recommande de recourir à la stratégie de détection et de soins appelée DOTS (*directly observed treatment short-course*). Cette stratégie repose sur la mise en place d'un traitement standardisé (SCC, *short course chemotherapy*) dès qu'un diagnostic de tuberculose est établi par examen microscopique d'un frottis positif (présence de BAAR). Globalement, la stratégie DOTS repose sur cinq points fondamentaux :

- l'engagement des gouvernements dans un plan national de lutte contre la tuberculose,
- l'existence de services d'examen microscopique fonctionnels pour la détection des cas,
- un approvisionnement régulier et ininterrompu pour tous les antituberculeux essentiels,
- des systèmes de surveillance permettant d'évaluer le programme de lutte dans son ensemble,
- l'utilisation de schémas thérapeutiques standardisés de courte durée (6 à 8 mois) efficaces sous surveillance directe (184).

Cette stratégie permet uniquement la détection et le traitement des patients les plus contagieux à cause de la faible sensibilité de l'examen microscopique. En effet, si elle est bien conduite, cette technique détecte à peu près 50 % des malades atteints de tuberculose pulmonaire à culture positive. Par ailleurs, la SCC permet d'obtenir la guérison de 85 % des personnes diagnostiquées et peut revenir à seulement 10 dollars par personne pour l'ensemble du traitement. En prenant en compte les contraintes économiques, la stratégie DOTS a donc pour objectif principal de limiter la contagion (129, 153).

2.5.2 Régime de traitement antituberculeux

L'actuelle conduite rapide d'un régime de traitement antituberculeux (*Short Course Chemotherapy*) utilise une phase initiale de 2 mois de traitement journalier avec l'isoniazide (INH), la rifampicine (RIF), la pyrazinamide (PZA) additionné de la streptomycine ou de l'éthambutol (EMB). Ce régime est suivi d'une thérapie journalière avec l'INH plus un des autres antibiotiques de première intention pendant les 4 mois suivants. L'éthionamide (ETH), la D-cyclosérine (DCS), l'acide p-amino-salicylique, la thioacetazone, la kanamycine (KAN), la capréomycine (CAP), la viomycine (VIO), l'amikacyne (AMI) et les fluoroquinolones (FQ) sont utilisés en seconde intention pour traiter les infections causées par des souches résistantes aux médicaments communément utilisés. L'OMS conseille le recours à la stratégie DOTS de traitement dès l'observation de la maladie. Un traitement antibiotique réussi donne une conversion d'un expectorât vers une culture négative en 2 mois et une disparition des infiltrats sur le cliché radiographique en 4 à 6 mois. Les souches résistantes apparaissent quand la chimiothérapie est intermittente ou inadéquate. Des facteurs influencent le degré de réussite du traitement comme la durée et la

complexité de la thérapie, les facilités d'accès aux centres de soins, le coût du traitement, la compliance des patients, et l'efficacité des médicaments. De plus, quelques données suggèrent que certains patients VIH-positif peuvent avoir un risque élevé de développer une tuberculose résistante à la rifampicine probablement à cause de problèmes d'absorption de la molécule (110, 127).

Il est raisonnable de penser que la connaissance des bases moléculaires du phénomène de résistance aux antibiotiques permettra le développement de nouvelles molécules thérapeutiques et la mise au point de techniques rapides, sensibles et fiables pour la détection des souches résistantes. Ces deux secteurs de recherche devraient bénéficier de la séquence complète du génome de *M. tuberculosis*.

2.6 Tuberculose, résistance et multirésistance aux antibiotiques

La multirésistance aux antibiotiques est définie comme la résistance de *M. tuberculosis* au moins à l'isoniazide et à la rifampicine, les deux antituberculeux les plus puissants. Sa présence compromet gravement la guérison des malades car le traitement de ces cas est long (18 à 24 mois) et fait appel à des médicaments peu efficaces, toxiques et chers (41). Des épidémies importantes ont touché les grandes villes des Etats-Unis à la fin des années 80 (7, 62, 112). Ceci a permis d'attirer l'attention des instances internationales sur la tuberculose et particulièrement sur ses formes multirésistantes. Un programme national de surveillance de la résistance aux antituberculeux a ainsi été initié sous couvert de l'OMS et de l'Union Internationale Contre la Tuberculose et les Maladies Respiratoires (43). Cette enquête a montré que la tuberculose résistante à au moins un antituberculeux de première ligne représente 18,8 % de l'ensemble des cas entre 1994 et 1999. Elle est présente dans tous les pays prospectés mais à des niveaux variables (Figure 3).

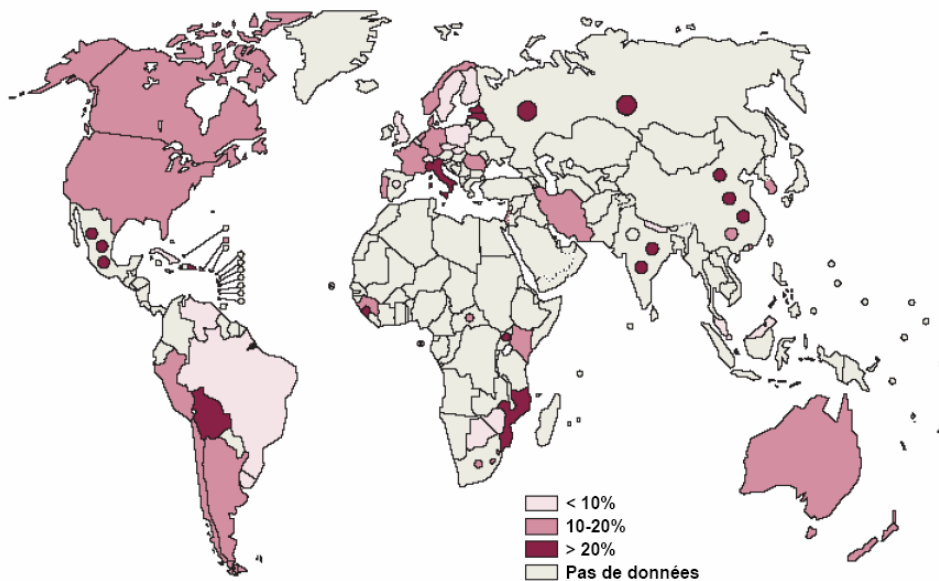


Figure 3 : Prévalence des cas de tuberculose résistante à au moins un des 4 antituberculeux de première ligne de 1994 à 1999 (OMS, 2000 (43))

Pour évaluer plus précisément l'étendue de la résistance, il est utile de distinguer les nouveaux cas des anciens. Ces deux types de cas sont respectivement constitués par les malades n'ayant jamais été traités auparavant et par les malades qui ont déjà suivi un traitement antituberculeux pendant plus d'un mois. Pour ces derniers, du fait de l'exercice d'une pression sélective, la résistance est plus élevée. En effet, la prévalence globale de la résistance est de 38,8 % alors qu'elle est de 15,9 % parmi les nouveaux cas. Les nouveaux cas représentent donc la transmission directe de bacilles résistants (Figure 4).

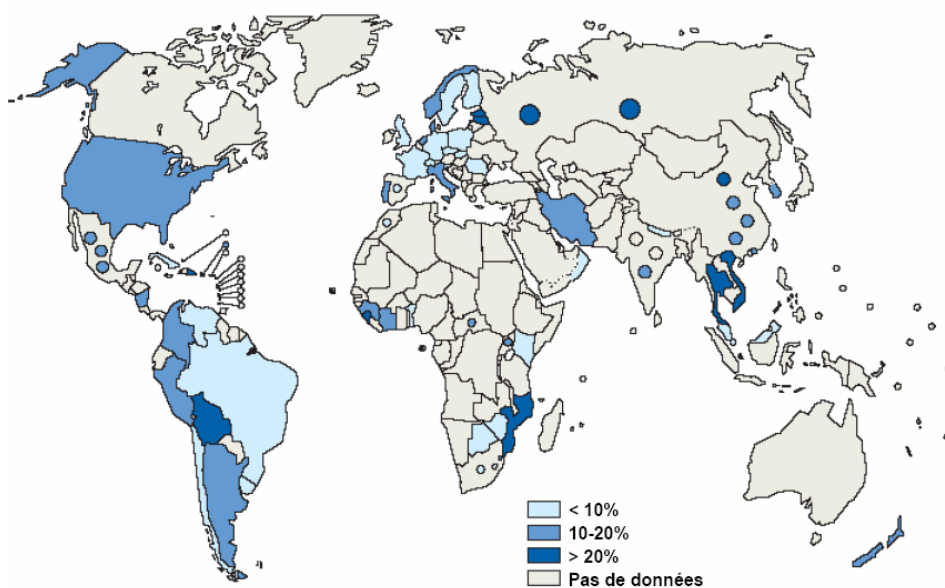


Figure 4 : Prévalence des nouveaux cas de tuberculose résistante à au moins un des 4 antituberculeux de première ligne de 1994 à 1999 (OMS, 2000 (43))

La multirésistance est impliquée dans 5,1 % des cas (2,8 % des nouveaux cas, 17,6 % des cas déjà traités). Elle est donc généralement rare. Ce fait peut être expliqué en partie par la récente disponibilité de la rifampicine dans les pays en voie de développement. Notons toutefois que le taux de multirésistance pour les nouveaux cas est supérieur à 5 % dans quelques pays comme la Chine, certains pays d'Europe de l'Est (pays baltes, différentes régions de Russie), la Côte d'Ivoire et l'Iran (Figure 5) (41, 43, 112).

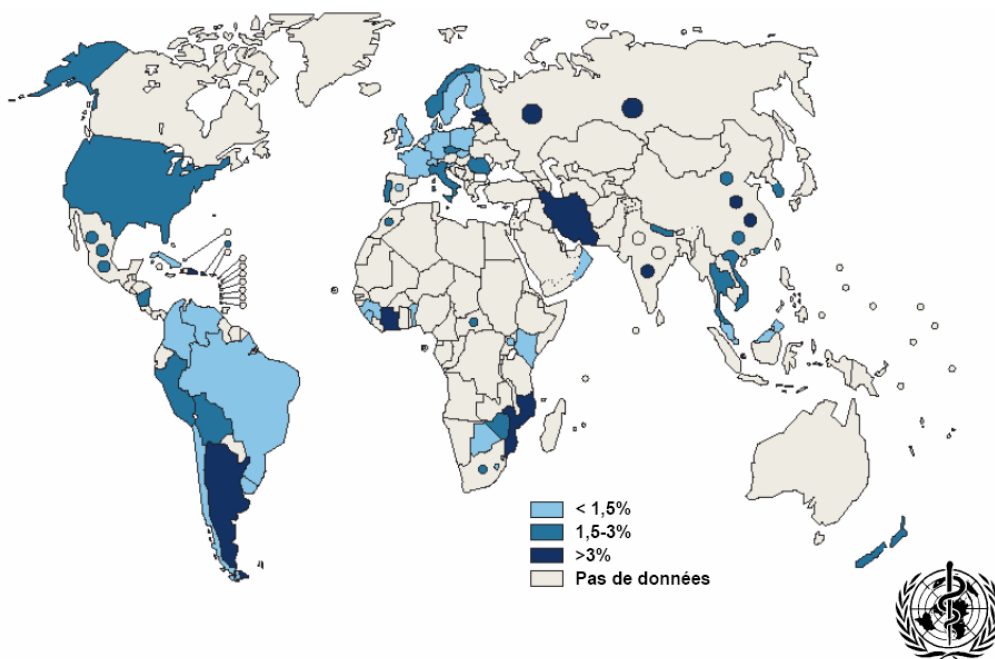


Figure 5 : Prévalence des nouveaux cas de tuberculose multirésistante de 1994 à 1999 (OMS, 2000 (43))

3 PRINCIPES MOLECULAIRES DE LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES CHEZ *M. TUBERCULOSIS*

3.1 Mécanismes d'acquisition de la résistance aux antituberculeux

La résistance de *M. tuberculosis* aux antituberculeux est l'amplification par l'action de l'homme d'un phénomène naturel. Bien qu'une résistance naturelle à un antibiotique particulier (Pyrazinamide (PZA)) existe pour *M. bovis*, les souches sauvages de *M. tuberculosis* qui n'ont jamais été exposées aux antibiotiques ne sont presque jamais résistantes. Toutefois, dans une optique de surveillance de l'antibiorésistance, l'attention se focalise sur le hasard des mutations génétiques qui mènent à l'émergence de résistances cliniques aux traitements antituberculeux.

3.1.1 Mutations spontanées et antibiorésistance

Pendant la multiplication bactérienne, les résistances se développent par des mutations spontanées et avec une fréquence déterminée. Les mutations donnant lieu à la résistance de *M. tuberculosis* à la rifampicine apparaissent à un taux de 10^{-10} par division cellulaire et conduisent à une prévalence de 1 bacille résistant sur 10^8 bacilles en milieu sans antibiotique, c'est-à-dire sans pression sélective ; le taux pour l'isoniazide est de 10^{-7} à 10^{-9} environ, donnant 1 sur 10^6 bacille résistant (66). La population bactérienne présente dans les poumons d'un patient infecté est fréquemment supérieure à 10^7 bacilles (18). Ainsi, des organismes résistants (ou mutants) évoluent en l'absence d'exposition aux antibiotiques mais sont dilués dans une majorité de mycobactéries sensibles. La présence d'antibiotique procure la pression sélective qui favorise les bacilles résistants qui se multiplient alors et deviennent prédominants, particulièrement chez des patients avec une grande charge bactérienne, c'est-à-dire, ceux en phase ouverte de tuberculose (76, 77).

3.1.2 Résistance acquise, résistance primaire et multirésistance

L'exposition à un seul antibiotique, due à un approvisionnement irrégulier, un défaut de qualité, une prescription inappropriée et/ou une faible observance du traitement, inhibe la croissance des bacilles sensibles à cet antibiotique mais permet la multiplication des organismes résistants (28, 100). Ce phénomène est appelé la résistance acquise. La transmission de ces bacilles à d'autres individus pourrait conduire au développement d'une tuberculose à bacilles résistants dès l'origine, ce phénomène est connu comme la résistance primaire. Chaque antibiotique actif contre *M. tuberculosis* peut sélectionner des résistances (18).

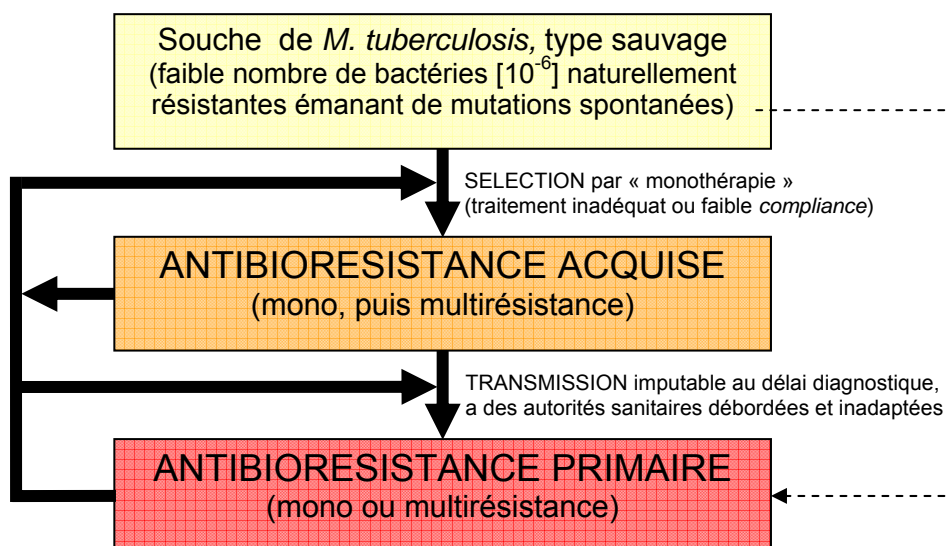


Figure 6 : Développement et diffusion des antibioresistances

La multirésistance aux antibiotiques due aux mutations spontanées est virtuellement impossible puisqu'il n'existe pas de gène unique impliqué dans un tel phénomène et que les mutations donnant lieu à une résistance aux différentes classes d'antibiotiques sont génétiquement indépendantes. Par exemple, la probabilité de mutations spontanées conférant une résistance à la rifampicine et à l'isoniazide est le produit des probabilités individuelles : $10^{-6} \times 10^{-8}$ soit 10^{-14} (78). Ceci est en fait une des raisons essentielles de l'utilisation concomitante de plusieurs antibiotiques pour le traitement de la tuberculose (21, 110).

3.1.3 Facteurs liés à l'apparition de bacilles multirésistants

L'émergence de souches multirésistantes de *M. tuberculosis* dans une population est associée à une variété de facteurs liés à l'économie, aux systèmes de santé et aux patients. Dans beaucoup de pays, les facteurs de gestion incluent le manque de validité d'une thérapie standardisée, ou sa faible exécution combinée à la pénurie fréquente ou prolongée de provision dans des zones politiquement instables ou aux ressources inadéquates. A cela peut se rajouter l'utilisation d'antituberculeux de mauvaise qualité en particulier ceux issus de la vente au comptoir ou au marché noir.

3.2 Bases génétiques de la résistance aux antituberculeux chez *M. tuberculosis*

3.2.1 Rifampicine et rifamycines associées

La rifampicine (RIF) est un dérivé semi-synthétique de la rifamycine utilisé en première intention pour le traitement de la tuberculose. Sa forte activité bactéricide sur *M. tuberculosis* en a fait une composante clé de la thérapie antituberculeuse. Les mécanismes d'action de la RIF ont été très étudiés chez *Escherichia coli*. La RIF inhibe l'initiation de la transcription en se liant à la sous-unité β de la RNA polymérase (95). Un mécanisme similaire a été démontré chez *M. smegmatis* (89).

Il est connu depuis de nombreuses années que des mutations et des délétions courtes dans une région centrale du gène de la sous-unité β de l'ARN polymérase (*rpoB*) confèrent une résistance à la RIF chez *E. coli* (79). Ceci a conduit à la caractérisation du gène *rpoB* chez *M. tuberculosis* et à l'identification d'une grande variété de mutations en lien avec la résistance à la RIF. En regroupant différentes études, Ramaswamy *et al.* (127) ont pu analyser environ 500 souches résistantes à la RIF (RIF^R) : 96 % des isolats cliniques RIF^R comportent des mutations dans une région centrale de 81 pb de *rpoB* qui altèrent la structure primaire de RpoB. Ces mutations sont absentes chez les isolats sensibles à la RIF (RIF^S). Cette région code 27 acides aminés (codons 507 à 533) et est appelée « région déterminant la résistance à la RIF » ou RRDR (*rifampicin resistance determining region*). Une

mutation au codon 531 (Ser) est retrouvée pour 43 % des souches, et une au codon 526 (His) pour 36 %. Les deux substitutions d'acides aminés les plus fréquemment rencontrées sont le remplacement de la sérine 531 par la leucine (42 %) ou par la tyrosine (23 %). Les bases génétiques de résistance restent inconnues pour 4 % des isolats car ils n'y a pas de mutation dans la RRDR (127). Par des méthodes de génétique moléculaire, la responsabilité des mutations de la RRDR a été confirmée : l'insertion des allèles mutants de *rpoB* dans *M. tuberculosis* à l'aide d'un plasmide confère une résistance à la RIF à des souches sensibles (188). Les études sur la relation entre les diverses mutations et le niveau de résistance montrent que les variations aux codons 513, 531, et 526 (à l'exception des substitutions His526Leu et His526Asn) sont généralement associées avec des concentrations minimales inhibitrices élevées (CMI > 32 µg/ml). Les résultats pour les autres mutations restent variables entre les études.

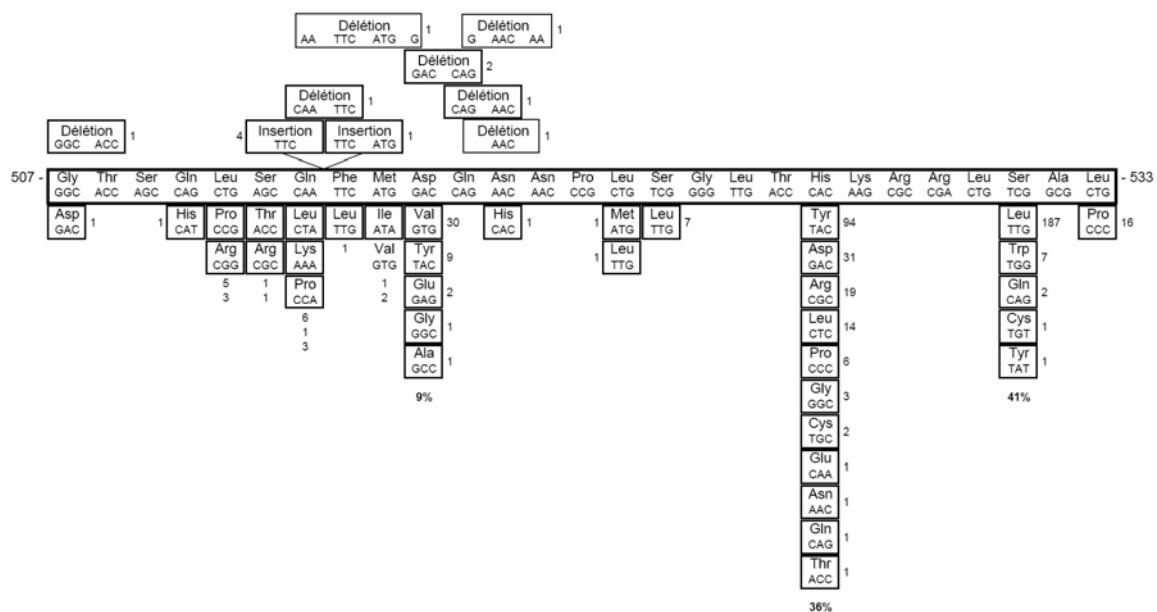


Figure 7 : Mutations observées entre les codons 507 et 533 du locus *rpoB* chez 479 isolats de *M. tuberculosis* résistants à la rifampicine

Cette figure résume les résultats d'une méta-analyse. Seuls les événements uniques sont reportés. La numérotation des codons se base sur l'alignement de la séquence *rpoB* d'*E. coli* et ne reflète donc pas les positions réelles chez *M. tuberculosis* (D'après Ramaswamy et al. (127)).

La résistance à la rifampicine croise généralement avec les autres molécules de la famille des rifamycines (rifampine, rifapentine, rifabutine). Cependant, une molécule apparentée aux rifamycines, KRM-1648 faisant l'objet de recherches pourrait être active contre certains mutants RIF^R (127). Une définition plus précise des variations chez les isolats RIF^R rencontrés dans les différentes études permettra d'affiner ces observations.

3.2.2 Isoniazide et éthionamide

L'isoniazide (INH) est un antituberculeux bactéricide utilisé en première intention. Les autres mycobactéries et procaryotes sont résistants à l'INH (INH^R), cet antibiotique est donc fréquemment utilisé pour traiter les infections par les bacilles du complexe *M. tuberculosis*. Malgré cette utilisation répandue, et l'intérêt de nombreuses recherches mobilisées sur ce sujet, son mode d'action est loin d'être élucidé. Contrairement à la rifampicine, plusieurs gènes sont impliqués. De ce fait, nous ne sommes qu'au début de la compréhension d'un mécanisme qui apparaît comme complexe (128).

3.2.2.1 *katG* et résistance à l'INH

De nombreuses études rapportent que 50 à 70 % des isolats cliniques INH^R sont porteurs de mutations au locus *katG*, mutations qui ne sont pas retrouvées chez les souches sensibles. La substitution la plus répandue affecte le codon 315. La sérine y est souvent remplacée par la thréonine mais d'autres substitutions peuvent être rencontrées. Le gène *katG* code une catalase-peroxydase. La comparaison des activités enzymatiques de KatG sauvage avec celles du mutant Ser315Thr montre que l'activité catalase de ce dernier est 6 fois plus faible alors que l'activité peroxydase est uniquement diminuée par deux. KatG (Ser-315) est ainsi plus efficace que l'enzyme KatG mutante (Thr-315) pour convertir l'INH prodrogue en sa forme active. D'ailleurs, quelques rares souches hautement résistantes à l'INH sont apparues comme étant dépourvues d'activité peroxydase. Il s'est avéré par la suite que chez ces souches, le gène *katG* était délété. La substitution en position 315 apparaît donc comme un rééquilibrage adaptatif entre la nécessité de maintenir une activité catalase-peroxydase pour lutter contre les radicaux antibactériens de l'hôte et la nécessité de minimiser la conversion de la prodrogue INH vers sa forme active. Les deux processus conduisant à la mort de la bactérie, il s'agit là d'un consensus de

survie en milieu hostile (122, 123). La forme active de l'INH est encore inconnue à ce jour, les produits stables issus de l'oxydation de l'INH par KatG n'ont pas d'activité anti-mycobactérienne. Les hypothèses actuelles supposent qu'il s'agirait d'un ou de plusieurs intermédiaires de type radicaux libres tels que le radical libre d'acyl-pyridine (128).

Les variations KatG 463-Arg et 463-Leu sont un polymorphisme répandu chez les isolats résistants et sensibles à l'INH. Il a été démontré une légère différence de sensibilité à l'INH entre ces deux allèles dans un contexte isogénique chez *M. bovis* BCG (CMI [463-Leu] de 1,0 µg/ml > [463-Arg] de 0,5 µg/ml). Ceci conforte l'observation d'une moindre sensibilité à l'INH de *M. bovis* qui est naturellement porteur de l'allèle 463-Leu mais n'a pas de conséquence clinique (127). Par ailleurs, ce polymorphisme au codon 463 de *katG* et le polymorphisme au codon 95 du gène *gyrA* permettent de subdiviser les souches de *M. tuberculosis* en divers groupes génotypiques (voir partie 4.1) (150).

3.2.2.2 Opéron *mabA-inhA* et résistance à l'INH

Les gènes *mabA* et *inhA* sont organisés en opéron. Ils codent des enzymes impliquées dans la biosynthèse des acides mycoliques. MabA partage de fortes homologies avec une 3-kétoacyl-acyl carrier protein (ACP) réductase impliquée dans la synthèse des acides gras codée par *fabG* chez *E. coli*. InhA est une énoyl réductase NADH dépendante spécifique des énoyl thio-esters à longues chaînes. Chez des souches INH^R, des mutations ont été observées dans la région promotrice située en amont de l'opéron *mabA-inhA*. L'augmentation de l'expression d'*inhA* probablement causée par ces variations serait à l'origine de la production d'un excès des cibles de l'INH conduisant ainsi à une résistance par titration de l'INH.

En outre, des mutations au locus *inhA* sont parfois mises en évidence. L'INH activée par KatG se fixe de manière covalente au NAD⁺ complexé avec InhA, la synthèse des acides mycoliques est alors inhibée (134). Les substitutions au niveau d'InhA affectent le site de fixation du NADP et diminuent son affinité pour cette molécule. En déplaçant l'équilibre $\text{InhA} + \text{NADP} \rightleftharpoons \text{complexe InhA-NAD}$ vers la gauche, ces mutations préviennent l'inhibition par l'INH (130). Ces souches souvent faiblement résistantes à l'INH sont également résistantes à l'éthionamide. Cet antibiotique est un analogue structural de l'INH parfois utilisé en seconde intention. Il partage donc certainement cette cible avec l'INH.

3.2.2.3 *kasA*

Des mutations ont aussi été observées au niveau du locus *kasA* codant une β -kétol-ACP synthase. Ces mutations préviendraient l'inhibition provoquée par la fixation covalente de l'INH active à cette enzyme complexée à une *acyl carrier protein* nommée AcpM (96). Notons que cette hypothèse sur KasA comme cible de l'INH est aujourd'hui sujette à controverses. En effet, seulement quatre mutants de *kasA* ont été isolés et leur résistance à l'INH est contestée. De plus, Kremer *et al.* (83) ont démontré que l'INH ne se retrouve pas dans le complexe formé par KasA et AcpM. En tout état de cause, 15 à 25 % des souches INH^R ne comportent pas de mutation au niveau de *katG*, *inhA* ou *kasA*. L'INH possède donc d'autres cibles non encore élucidées.

3.2.2.4 *ahp* et *oxyR*

Chez *E. coli* et *Salmonella Typhimurium*, les gènes *katG* et *ahpC* font partis d'un régulon du stress oxydatif contrôlé positivement par le régulateur transcriptionnel *oxyR*. Le gène *ahpC* code la petite sous-unité d'une alkyl-hydroperoxyde réductase et forme un opéron divergent avec *oxyR*. Chez *E. coli*, bactérie constitutivement résistante à l'INH, des mutations au niveau d'*oxyR* ou d'*ahpC* entraînent une sensibilité à l'INH. Chez les bactéries du complexe *M. tuberculosis*, la séquence d'*oxyR* est dégénérée par de multiples substitutions et délétions partielles. En revanche, *oxyR* est intact chez *M. leprae*. Ainsi, la transformation d'un cosmide porteur de la région *oxyR-ahpC* de *M. leprae* dans *M. tuberculosis* confère à ce dernier une résistance de 5 $\mu\text{g/ml}$ à l'INH (37). En corollaire de cette hypothèse attribuant en partie la sensibilité de *M. tuberculosis* à l'INH à la perte de la fonction d'OxyR, des mutations pourraient provoquer la surexpression d'autres gènes impliqués dans la voie de l'INH et ainsi compenser la perte d'*oxyR*. Des mutations de ce type ont été observées dans la région promotrice d'*ahpC*. Toutefois, leur fréquence chez les isolats à catalase positive est faible et des études biochimiques montrent que ces mutations sont à considérer plutôt comme des mutations compensatrices d'une perte de l'activité de KatG que d'OxyR (142, 143).

3.2.2.5 *ndh*

Des mutations ont été rencontrées dans le gène *ndh* codant une NADH déshydrogénase qui régule le ratio NADH/NAD⁺ (88, 98). Les mécanismes par lesquels ces mutations dans *ndh* confèrent une résistance à l'INH reste encore à préciser. Cependant, Vilcheze *et al.* (181) ont récemment apporté des orientations vers un mécanisme similaire à celui rencontré pour les substitutions au site de fixation du NADP d'InhA : les variations d'Ndh déplacent l'équilibre NADP ⇌ NAD⁺ vers la gauche, prévenant ainsi la formation d'INH-NAD inhibant InhA.

3.2.2.6 *Autres gènes et mécanismes envisageables*

L'association de la surexpression de l'arylamine N-acétyl-transférase (NAT) avec un niveau de faible résistance à l'INH a été montrée. La NAT est supposée inactiver l'INH par acétylation. Toutefois, aucune mutation n'a été mise en évidence au niveau du gène codant la NAT (116, 168).

Le séquençage de 20 gènes dont l'expression est induite par l'INH a permis de mettre en évidence des mutations dans *fadE24*, *furA*, *iniA*, *iniB*, *iniC*, *srnR*, *Rv0340*, *Rv1592c*, *Rv1772*. Parmi ces derniers, certains codent des enzymes de la famille des acides gras synthases de type II (*type II fat acid synthase*, FAS II) en lien avec la synthèse des acides mycoliques, et d'autres ont une fonction encore inconnue. Ces mutations bien que non retrouvées chez les souches sensibles à l'INH sont rares et, à l'exception de *Rv1772*, toujours associées à d'autres mutations. Leur implication directe dans la résistance à l'INH est donc incertaine d'autant plus que leur fonction biologique n'a pas encore été précisément étudiée (128). En conséquence, cela confirme la complexité des mécanismes d'actions de l'INH et ouvre des perspectives de recherches futures.

3.2.3 Streptomycine

La streptomycine est un aminocyclitol glycoside utilisé en première intention pour traiter la tuberculose. Chez *E. coli*, STR se fixe à l'ARNr 16S et affecte ainsi l'initiation et la fidélité de la traduction. Des mutations associées à la résistance à la streptomycine (STR^R) ont été identifiées au niveau du gène de l'ARNr 16S (*rrs*) et de *rpsL*, gène encodant la protéine ribosomale S12. Si les autres bactéries possèdent

de multiples copies des gènes des ARNr, les membres du complexe *M. tuberculosis* n'en ont qu'un exemplaire. De ce fait, la substitution d'un nucléotide peut potentiellement générer des antibiorésistances. Des mutations ont été observées dans la région des nucléotides 530 et 915. Ces derniers se trouvent adjacents en structure secondaire. Ceci est cohérent avec l'interaction démontrée chez *E. coli* de l'INH avec la boucle 530-915. La majorité des mutations ponctuelles produisant des mutants STR^R affectent *rpsL*. La substitution de la lysine au codon 43 par l'arginine et des substitutions Lys88Arg ou Lys88Gln sont les plus fréquemment retrouvées. Des mutations analogues ont été remarquées chez d'autres bactéries probablement à cause de la forte conservation de la protéine S12 (127). Les souches de *M. tuberculosis* à un haut niveau de résistance à la STR (CMI > 500 µg/ml) sont associées avec des mutations de *rpsL*. Celles de *rrs* sont plutôt associées à des niveaux intermédiaires (CMI < 250 µg/ml). Enfin, des souches STR^R ayant des bas niveaux de résistance (2 µg/ml < CMI < 50 µg/ml) ne présentent pas de variation à ces deux loci. En effet, 25 à 35 % des isolats ne montrent de mutation ni dans *rrs* ni dans *rpsL* suggérant de ce fait l'existence d'un mécanisme alternatif d'acquisition de la résistance à la STR. La variation de la CMI de ces souches en fonction de la présence ou non de Tween (tensioactif utilisé pour homogénéiser les cultures mycobactériennes) oriente vers une résistance associée à la perméabilité membranaire (26, 97).

3.2.4 Pyrazinamide

La pyrazinamide (PZA), analogue structural de la nicotinamide, est un antibiotique utilisé en première intention dans le traitement de la tuberculose. En milieu acide, la PZA a une activité bactéricide sur les bacilles quiescents. Il est supposé que dans l'environnement acide du phagolysosome, le bacille produit une pyrazinamidase qui convertit la PZA en acide pyrazinoïque, forme active de la PZA. La perte d'activité pyrazinamidase des isolats PZA^R conforte cette hypothèse (15, 94). Des mutations du gène codant la pyrazinamidase *pncA* ont été mises en évidence uniquement chez les souches PZA^R. La complémentation de ces souches par un allèle sauvage de *pncA* entraîne un retour de la sensibilité à la PZA. De même, la transformation de *M. bovis*, constitutivement PZA^R, avec un cosmide qui exprime une PncA fonctionnelle rend ces souches sensibles à la PZA (140). Plus de

70 % des résistants à la PZA sont porteurs de variations de PncA. Les 30 % de PZA^R non expliqués par ces mutations suggèrent toutefois qu'il existe d'autres mécanismes de résistance encore inexplorés (127).

3.2.5 Ethambutol

L'éthambutol (EMB) est un antibiotique bactéricide employé en première intention pour traiter la tuberculose. Il bloque l'incorporation des acides mycoliques à la paroi bactérienne. L'accumulation de β -D-arabino-furanosyl-1-monophosphocaprenol, intermédiaire majeur de la biosynthèse de l'arabinogalactane, observée après traitement par l'EMB suggère que ce dernier aurait pour cible une enzyme de cette voie de biosynthèse. En cohérence avec une spécificité de cible, seul le dextro-isomère de l'EMB est biologiquement actif. L'EMB serait un analogue de l'arabinose inhibant une arabinosyl transférase. L'opéron *embCAB* de 10 kb se compose de trois gènes codant des arabinosyl transférases. Il est impliqué dans la polymérisation de l'arabinose en arabinogalactane (40, 165).

Parmi les trois gènes de l'opéron *embCAB*, le séquençage d'*embB* révèle des mutations, non retrouvées chez les isolats sensibles, dans près de 70 % des souches EMB^R. Des expériences de transfert génétique réalisées chez *M. smegmatis* ont confirmé que ces mutations dans *embB* conféraient la résistance à l'EMB. Pour la grande majorité des isolats EMB^R, la méthionine au codon 306 est remplacée par la valine, l'isoleucine ou la leucine. D'autres variations ont pu être observées : Phe285Leu, Phe330Val, Thr630Leu. A l'exception de l'échange Met306Leu, les cinq autres variations sont associées à un haut niveau de résistance (CMI \geq 40 μ g/ml) (151).

D'après les analyses de la structure secondaire, EmbCAB est une protéine à 12 domaines transmembranaires. Le codon 306 est situé dans une boucle cytoplasmique d'EmbB supposée être la « région déterminant la résistance à l'EMB » (*ethambutol resistance determining region*, ERDR). Cette boucle est très conservée dans les différents EmbB des mycobactéries. Des variances dans les motifs d'acides aminés d'ERDR sont observées chez les mycobactéries naturellement résistantes à l'EMB (*M. abscessus*, *M. chelonae* et *M. leprae*). Le transfert de l'allèle *embB* de *M. abscessus* à *M. smegmatis* confère à ce dernier une augmentation de la CMI d'un facteur 500 (2).

3.2.6 Fluoroquinolones

La ciprofloxacine (CIP) et l'ofloxacine (OFX) sont des dérivés synthétiques de l'acide nalidixique couramment utilisés en deuxième intention comme antituberculeux. Ces fluoroquinolones (FQ) sont bactéricides pour *M. tuberculosis*. Leur cible est l'ADN gyrase, une ADN topoisomérase ATP-dépendante de type II qui catalyse le super-enroulement négatif de l'ADN. L'ADN gyrase est un hétérodimère composé de deux sous-unités A et deux sous-unités B codées, respectivement, par les gènes *gyrA* et *gyrB*. Les FQ se lient à l'ADN gyrase et inhibent le super-enroulement, interrompant ainsi tous les processus cellulaires dépendant de la topologie de l'ADN. Tout comme avec les autres antituberculeux, des résistances se développent rapidement en cas d'usage des FQ seules contre *M. tuberculosis* ou comme unique anti-infectieux ajouté à une thérapie défailante. Les résistances croisées sont très courantes chez les FQ. Des isolats cliniques de *M. tuberculosis* résistants aux FQ sont généralement résistants à la RIF et à un ou plusieurs autres antituberculeux de première intention.

Le clonage et le séquençage de *gyrA* et *gyrB* ont mis en évidence des mutations de *gyrA* affectant les acides aminés 90, 91 et 94. Globalement, ces mutations sont regroupées dans une région de 40 acides aminés : la « région déterminant la résistance aux quinolones » (*quinolon resistance determining region*, QRDR). Selon les études, les variations au niveau de la QRDR expliquent l'acquisition de la résistance aux FQ pour 40 à 85 % des isolats cliniques.

Des mécanismes de résistance aux FQ par diminution de la perméabilité de la paroi ou par des pompes à efflux sont décrits chez d'autres bactéries. De tels mécanismes n'ont pas encore été clairement identifiés pour *M. tuberculosis*. Cependant, la surexpression, sous pression antibiotique, d'une pompe de type *tap-like* codée par *Rv1258c* chez une souche de *M. tuberculosis* MDR a été rapportée (145). De même, il a été récemment démontré que l'expression d'un transporteur ABC (*ATP-binding cassette*) de *M. tuberculosis* codé par *Rv2686c-Rv2687c-Rv2688c* confère chez *M. smegmatis* une résistance à la CIP (115). Toutefois, le rôle des transporteurs ABC dans la résistance clinique aux FQ chez *M. tuberculosis* reste à préciser. Les gènes codant des ABC transporteurs putatifs représentent 2,5 % du génome de *M. tuberculosis*. Ces voies restent donc encore à explorer.

3.2.7 Kanamycine, amikacine, viomycine et capréomycine

La kanamycine (KAN) et l'amikacine (AMI) sont des antibiotiques de la famille des aminoglycosides qui inhibent la synthèse protéique en perturbant le fonctionnement des ribosomes. La viomycine (VIO) et la capréomycine (CAP) sont des peptides antimicrobiens qui inhibent aussi la synthèse protéique. Ces quatre molécules sont utilisées comme antituberculeux de deuxième intention.

La résistance clinique à ces molécules est assez rare probablement en lien avec leur usage peu fréquent comme antituberculeux. Tout comme pour les FQ, la plupart des organismes résistants à ces antibiotiques sont aussi résistants à des molécules utilisées en première intention. Des résistances croisées à la STR et à la KAN ou l'AMI ne sont pas observées. En revanche, les résistances entre KAN, AMI, VIO et CAP croisent parfois.

Le séquençage du gène *rrs* de souches KAN^R a mis en évidence des mutations en position 1400, 1401 ou 1483. Toutes les études rapportent la variation en 1400 comme liée à un haut niveau de résistance. Malgré la forte implication des mutations au niveau du gène *rrs*, environ 30 % des souches étudiées n'ont pas de modification de séquence à ce locus, suggérant ainsi l'existence d'un autre mécanisme de résistance.

3.2.8 Cyclosérine

La D-cyclosérine (DCS), antituberculeux de deuxième ligne, est un analogue cyclique de la D-alanine qui bloque la synthèse des peptidoglycanes, composants essentiels de la paroi bactérienne. Malgré son activité antimycobactérienne effective, la DCS est peu utilisée du fait des effets secondaires qu'elle peut entraîner, notamment des réactions neurologiques. Néanmoins, elle reste un secours utile au traitement des tuberculoses multirésistantes.

Les bases moléculaires de la résistance à cette molécule chez *M. tuberculosis* sont peu documentées. En 1969, David *et al.* (33) suggèrent que la résistance à la DCS est due à des mutations dans le gène *ddl* codant la D-Ala:D-Ala ligase (Ddl). Et en 1971, David (32) suppose que la D-alanine racemase (Alr) ne joue qu'un rôle mineur dans le mécanisme d'action de la DCS.

Quelques études ont été réalisées chez *M. smegmatis*. En 1997, Caceres *et al.* (16) isolent un mutant de *M. smegmatis* spontanément DCS^R surproduisant Alr suite à une mutation dans la région promotrice du gène correspondant. Ils démontrent également que cet allèle transféré chez *M. bovis* BCG lui confère une résistance à la DCS et que l'inhibition d'Alr par la DCS est concentration-dépendante. En 2002, toujours chez *M. smegmatis*, Chacon *et al.* (19) observent que la croissance de mutants de délétion d'*alr* est indépendante de la D-Alanine. Ceci suggère l'existence d'une autre voie de synthèse de la D-Alanine indépendante d'Alr. De surcroît, ces mutants sont hypersensibles à la DCS, impliquant qu'Alr n'est pas la cible létale responsable de l'effet bactéricide de la DCS. En 2003, Feng *et al.* (48) démontrent que Ddl est aussi inhibée de manière concentration-dépendante par la DCS et que sa surexpression dans des conditions comparables à celle utilisées pour Alr confère une résistance à la DCS. Cependant, à concentration égale en DCS, l'activité de Ddl semble être moins affectée que celle d'Alr. Le mécanisme de résistance majeur serait la surproduction d'Alr, une cible très affine mais dont la bactérie peut se passer, alors que l'effet bactéricide est dû à l'inhibition d'une cible fondamentale mais d'affinité moindre pour la DCS.

Si cette dernière étude ne prouve pas que Dlr constitue cette cible létale, cette hypothèse ne peut être exclue. La transposition de ces observations à *M. tuberculosis* et le polymorphisme de ces gènes dans les isolats cliniques de *M. tuberculosis* restent à étudier.

4 LE TYPAGE MOLECULAIRE DU COMPLEXE *M. TUBERCULOSIS*

La distinction entre les différentes espèces du complexe *M. tuberculosis* a longtemps reposé sur leurs caractéristiques phénotypiques (Tableau 3). Le faible pouvoir discriminant de ces marqueurs phénotypiques a motivé la mise au point de techniques génotypiques. Ces techniques ont pour objectif de comparer des souches sur la base de leur génome (empreinte digitale génomique) (Figure 8). Ainsi, non seulement elles permettent de distinguer les diverses espèces du complexe *M. tuberculosis*, mais aussi, elles contribuent à l'étude de la transmission de la tuberculose dans les communautés humaines (hôpitaux, prisons, laboratoires...). Elles sont utilisées en complément des méthodes épidémiologiques classiques qui restent indispensables, telle que la recherche de contacts entre malades.

Tableau 3 : Critères de différenciation des membres du complexe *M. tuberculosis*

	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. africanum</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i> BCG
Test de Lebeck	aérobie	microaérophile	microaérophile	aérobie
Niacine	+	+/-	-	-
Réduction des nitrates	+	+/-	-	-
Acide thiophène carboxylique	R	S	S	S
Pyrazinamide	S	S	R	R
Thiosemicarbazone	S	S/R	S	R
Cyclosérine	S	S	S	R
Virulence (hamster)	+	+	+	-
Virulence (rat)	-	-	+	-

+, positif ; -, négatif ; R, résistant ; S, sensible. D'après Grosset *et al.* (69)

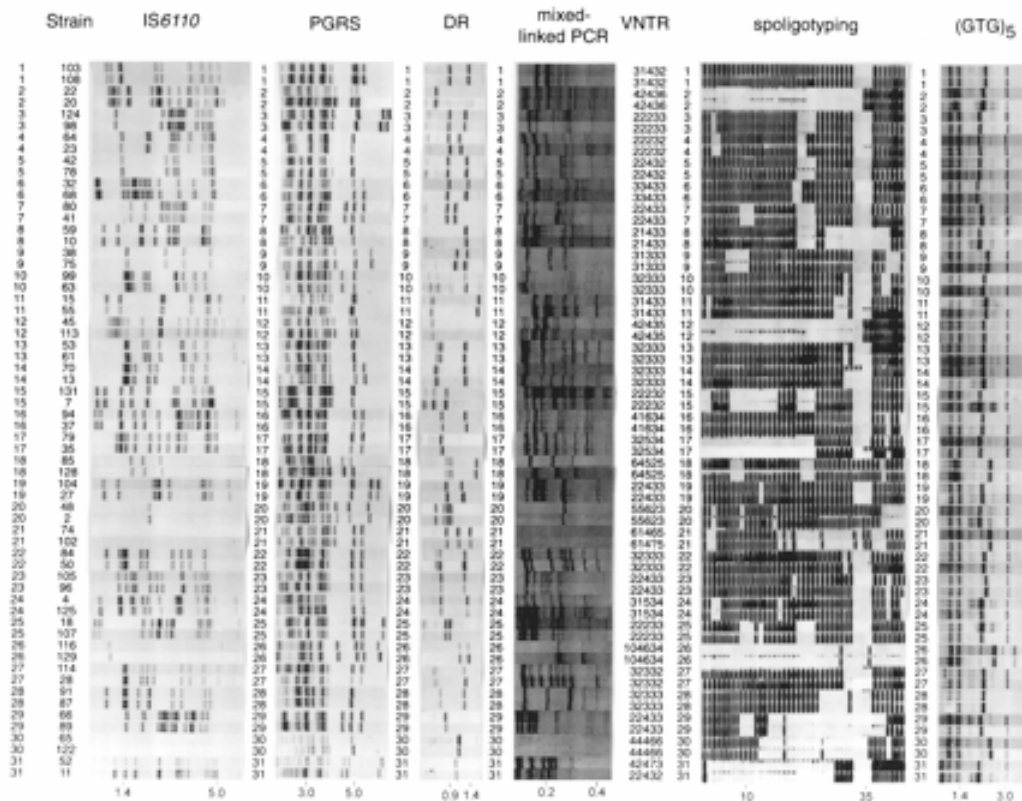


Figure 8 : Profils de différentes techniques de typage moléculaire chez *M. tuberculosis* (82)

4.1 Variabilité génétique au sein du complexe *M. tuberculosis*

Les espèces du complexe *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti* et "*M. canettii*") ont de fortes homologues de séquence ADN, des séquences d'ARNr 16S et des régions intergéniques 16S-23S très conservées entre les différentes souches (55). Les électrophorèses de digestions enzymatiques multi-loci (*multi-locus enzyme electrophoresis*, MLEE) (141) et les analyses de fragments de restrictions génomiques marqués (*restriction fragment end-labeled*, RFEL) (71, 178) témoignent de cette diversité génétique limitée. En 1997, une étude réalisée sur 842 souches par Streevatsan *et al.* (150) n'a mis en évidence que deux substitutions d'acides aminés indépendantes de l'antibiorésistance sur 26 gènes ou pseudo-gènes (2 mégabase d'ADN codant), confirmant de ce fait l'évolution quasi-clonale du complexe *tuberculosis*.

Malgré cette homogénéité génétique, un haut degré de polymorphisme est observé dans les séquences répétées tels que le nombre et la position d'éléments d'insertion (*Inserted Sequences*, IS) et les répétitions courtes. Le séquençage récent

Cinq types de séquences répétées courtes, associées avec une diversité génétique, ont été identifiés :

- les séquences polymorphes riches en G+C (*polymorphic GC-rich sequences*, PGRS) ;
- les triplets GTG répétés (GTG) ;
- les répétitions en tandem en nombre variable (*variable number tandem repeats*, VNTR) comprenant des répétitions en tandem majeures et polymorphes (*major polymorphic tandem repeats*, MPTR) et des répétitions en tandem exactes (*exact tandem repeats*, ETR) ;
- les unités mycobactériennes répétées et dispersées (*mycobacterial interspersed repetitive units*, MIRU) ;
- les répétitions directes (*direct repeat*, DR).

Diverses méthodes ont été utilisées pour détecter, caractériser et visualiser ces polymorphismes des souches du complexe *M. tuberculosis* (Figure 8). Ces méthodes s'appuient sur des techniques de profil de fragments de restrictions génomiques (RFLP), d'hybridation ADN, et/ou de PCR (Tableau 4).

Tableau 4 : Différentes méthodes de génotypage, techniques employées et ADN ciblés

Méthode	Technique	ADN cible	Reproductibilité (%)	Types obtenus	Référence
RFLP-IS6110	RFLP (<i>PvuII</i>)	IS6110	100	84	(167, 172)
RFLP-IS1081	RFLP (<i>PvuII</i>)	IS1081	100	12	(25, 177)
<i>mtp40</i>	RFLP (<i>PvuII</i>)	<i>mpcA</i> , <i>mpcB</i>	100	12	(34, 179)
<i>mpb64</i>	RFLP (<i>PvuII</i>)	<i>mpb64</i>	100	8	(90)
<i>katG</i>	RFLP (<i>PvuII</i>)	<i>katG</i>	100	5	(190, 191)
ARNr 16S	RFLP (<i>PvuII</i>)	gène de l'ARNr 16S	100	5	(176)
PGRS	RFLP (<i>AluI</i>)	PGRS	100	70	(133)
DR (RFLP)	RFLP (<i>AluI</i>)	locus DR	100	48	(72)
(GTG) ₅	RFLP (<i>HinfI</i>)	GTG	100	30	(187)
Mixed-linked PCR	LMPCR	IS6110	100	81	(70)
IS6110 inverse PCR	PCR	IS6110	6	ND	(111)
IS6110 ampliprinting	PCR	IS6110, MPTR	39	ND	(121)
DRE-PCR	PCR	IS6110, PGRS	58	63	(54)
Spoligotypage	PCR	locus DR	94	61	(29, 68, 81)
VNTR	PCR	MPTR et ETR	97	56	(56)
MIRU-VNTR	PCR	MIRU	100	78	(156)
APPCR	LMPCR	génomme entier	71		(113)
FAFLP	<i>EcoRI</i> , <i>MseI</i> , LMPCR	génomme entier	ND	ND	(1, 65, 182)
RFEL	RFEL (<i>EcoRI</i>)	génomme entier			(71, 178)
<i>oxyR</i>	PCR / Séquençage	<i>oxyR</i>	ND	ND	(149, 150)
Groupes de Musser	PCR / Séquençage	<i>katG</i> et <i>gyrA</i>	100	3	(150)

Pour chaque méthode de typage sont indiqués les techniques employées, le type d'ADN ciblé et les références bibliographiques de description de la technique.

RFLP, restriction fragment length polymorphism; PGRS, polymorphic GC-rich sequence; DR, direct repeat; PCR, polymerase chain reaction; LMPCR, link-mediated PCR; DRE, direct repetitive element; VNTR, variable numbers of tandem repeats; ETR, exact tandem repeat; MPTR, major polymorphic tandem repeat; MIRU; mycobacterial interspersed repetitive units; APPCR, arbitrarily primed PCR; Fluorescent amplified-fragment length polymorphism; RFEL, restriction fragment end-labelled; ND, non déterminé.

La reproductibilité (fraction de 31 répétitions donnant un type identique) et le nombre de types obtenus proviennent d'une étude 90 souches du complexe *M. tuberculosis* de Kremer et al. (82) à l'exception des MIRU (156).

Parmi l'ensemble de ces méthodes de typage génétique des souches du complexe *M. tuberculosis*, trois techniques sont plus fréquemment employées dans la pratique courante des laboratoires de mycobactériologie : RFLP-IS6110 (technique « gold-standard »), MIRU-VNTR et le spoligotypage.

4.2 RFLP-IS6110, technique de référence

Cette méthode d'empreinte ADN est basée sur le polymorphisme généré par la variabilité du nombre de copies et des positions sur le chromosome de la séquence d'insertion IS6110 dans les différents isolats cliniques du complexe *M. tuberculosis*. En effet, cette variabilité entraîne un polymorphisme de longueur des fragments de restriction obtenus après digestion par des endonucléases. L'empreinte ADN par RFLP-IS6110 nécessite une extraction d'ADN à partir d'une culture bactérienne, puis une digestion par l'endonucléase *PvuII*, suivie d'un Southern blot et d'une révélation par une sonde marquée spécifique de l'IS6110. La carte physique de l'IS6110 intégrée dans un locus du génome (Figure 10) montre les sites de clivage de différentes enzymes de restrictions situées dans les 1355 pb composant l'IS. Ces diverses enzymes ont successivement été utilisées pour générer des fragments de restriction. Cependant, *PvuII*, utilisée par la majorité des laboratoires, est devenue l'enzyme de référence en combinaison avec une sonde s'hybridant du côté de l'extrémité 3' de l'IS. Ainsi, les fragments obtenus mesurent au minimum 0,9 kilobases.

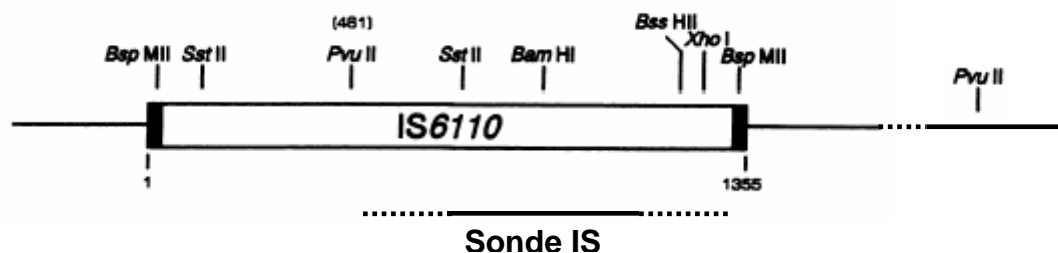


Figure 10 : Carte de la séquence d'insertion IS6110 (1.35 kb)

Les sites de clivages d'enzymes de restrictions sont mentionnés. *PvuII* clive l'IS au niveau de la base 461. Les répétitions inversées de 28 pb situées aux extrémités de l'IS sont représentées en noir. Les lignes situées de part et d'autre de l'IS représentent l'ADN chromosomique. (d'après van Embden *et al.* modifié (172))

Afin de pouvoir comparer les empreintes entre différents gels et entre laboratoires, la taille de chaque fragment doit être déterminée. Pour ce faire, il faut utiliser un marqueur de taille de 10 à 0,9 kb. Il est conseillé de combiner ces

marqueurs en standard interne (dans le même puits que l'ADN testé) et externe (seul dans un puits), et d'ajouter dans un des puits du gel l'ADN de la souche de référence Mt14323 digéré par *PvuII* qui, marqué par l'IS6110, donne 10 bandes de tailles connues correctement réparties sur la longueur du gel (172).

Pour identifier les souches, une banque de profils regroupant plus de 5 000 profils différents de souches provenant de plus de 45 pays dans le monde peut être consultée par l'Internet (132). C'est une banque ouverte créée à l'initiative de l'« *European concerted action project : New genetic markers and techniques for the epidemiology and control of tuberculosis* » et coordonnée par le *National Institute of Public Health and the Environment* (RIVM, Bilthoven, The Netherlands) à laquelle chaque laboratoire peut contribuer en y soumettant ses propres profils.

La technique de RFLP IS6110 est la technique au pouvoir de séparation des différentes souches du complexe *M. tuberculosis* le plus élevé à ce jour. Cependant, elle présente comme inconvénient d'être lourde à mettre en place en routine. De plus, elle exige de grandes quantités d'ADN et n'est donc utilisable que pour typer des souches issues de patients à culture positive. Elle est donc souvent utilisée en seconde intention pour affiner les résultats obtenus par une méthode moins discriminante mais plus rapide à mettre en œuvre.

4.3 Spoligotypage

Le spoligotypage est une méthode de typage des souches du complexe *M. tuberculosis* qui repose sur le polymorphisme existant sur un locus unique du chromosome : la région DR (DRR, *direct repeat region*). Décrite pour la première fois chez *M. bovis* BCG par Hermans *et al.* (72), cette région est uniquement présente chez les bactéries du complexe *M. tuberculosis* et comporte une ou plusieurs copies de l'IS6110 pour la grande majorité des souches. La région DR comporte de multiples répétitions courtes appelées DR (*direct repeat*) de 36 paires de bases. Chaque séquence DR flanque une séquence unique aussi appelée « *spacer* » de 35 à 41 pb. Un DR et le *spacer* adjacent forment un DVR (*direct variable repeat*) (Figure 11). Deux types de réarrangement génétique y sont observés : a)- variation d'un ou

quelques *spacers* par recombinaison homologue entre les DR ; b)- variation d'un DVR par un événement de transposition d'élément tel que l'IS6110 (68, 72).

L'ADN des DVR est amplifié *in vitro* par PCR à l'aide d'amorces spécifiques des séquences répétées de la région DR (Figure 11). Les produits de PCR obtenus sont ensuite hybridés perpendiculairement sur un jeu de 43 oligonucléotides de *spacers* connus (37 pour H37Rv, 6 pour *M. bovis* BCG) disposés en lignes. Une des amorces de PCR étant biotinyllée, les hybridations positives sont alors détectées par la peroxydase (Figures 12 et 13) (81).

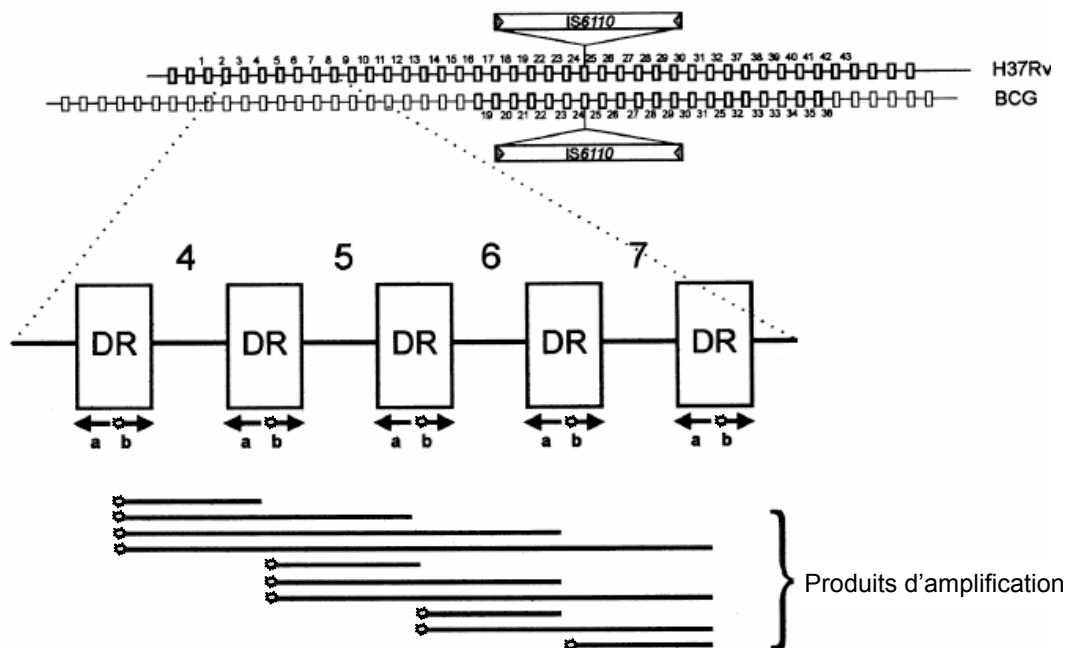
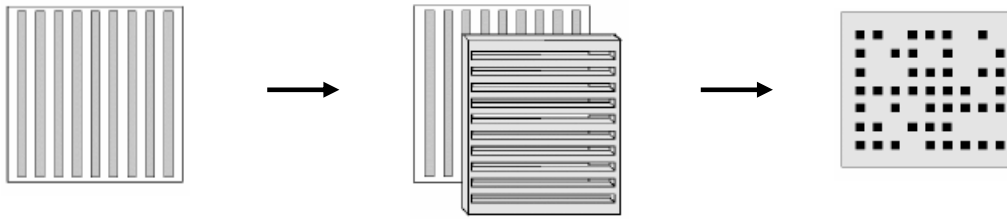


Figure 11 : Structure du locus DR dans le génome mycobactérien et principe de son amplification par PCR *in vitro*

(A) Les chromosomes de *M. tuberculosis* H37Rv et *M. bovis* BCG P3 contiennent respectivement 48 et 41 DR de 36 pb (représentés par des rectangles) espacés par des *spacers* uniques mesurant de 34 à 41 bp. Les *spacers* numérotés correspondent pour 37 à *M. tuberculosis* H37Rv et pour 6 à *M. bovis* BCG P3. Le site d'intégration de l'élément d'insertion IS6110 est représenté.

(B) a et b, oligonucléotides amorces de PCR hybridant la séquence répétée DR (b est biotinyllée en 5').



Les oligonucléotides spécifiques des différents *spacers* sont liés de manière covalente en ligne sur la membrane.

Les produits de PCR (marqués par la biotine) sont appliqués perpendiculairement pour hybridation.

Incubation de la membrane avec la peroxydase conjuguée, et exposition d'un film radiographique.

Figure 12 : Les différentes étapes du spoligotpage

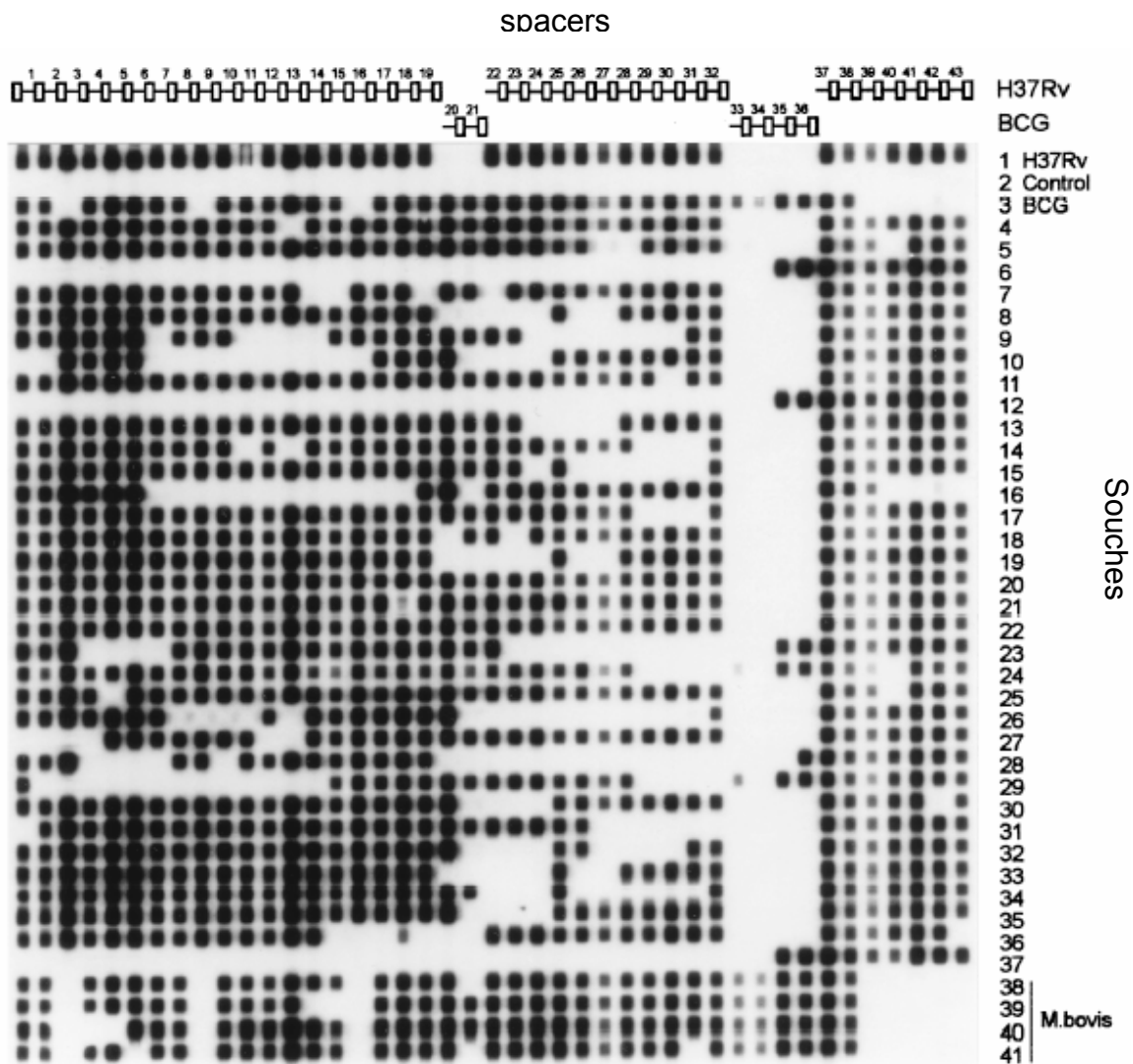


Figure 13 : Résultat du spoligotpage : spoligotype de 38 isolats cliniques

Profils d'hybridation (spoligotypes) de l'amplification d'ADN mycobactérien provenant de 35 souches de *M. tuberculosis* et 5 souches de *M. bovis*. L'ordre des *spacers* sur le film radiographique correspond à leur ordre dans le génome (locus DR représenté en haut). 1, *M. tuberculosis* H37Rv, 3, *M. bovis* BCG P3 (contrôles positifs); 2, H₂O (contrôle négatif); 4-37, isolats cliniques de *M. tuberculosis*; 38-41, isolats cliniques de *M. bovis*.

Le spoligotypage (pour spacer oligonucleotides typage) offre une alternative aux techniques RFLP et permet l'obtention rapide d'un résultat. Avec le spoligotypage, il est simultanément possible de détecter et de typer une bactérie du complexe *M. tuberculosis* dans des échantillons cliniques.

En comparaison avec la technique RFLP-IS6110, le pouvoir de discrimination du spoligotypage est plus faible pour les souches contenant cinq copies ou plus de l'IS6110. Mais il est en revanche plus élevé pour les autres souches. De ce fait, le spoligotypage est la technique de choix pour typer les souches de *M. bovis* qui comporte généralement une à deux copies de l'IS6110 (4).

Grâce à l'étape d'amplification par PCR, le spoligotypage se contente de peu d'ADN. Il n'est que peu affecté par des ADN de mauvaise qualité ou dégradés : des spoligotypes ont pu être obtenus à partir d'ADN de momies ou du premier bacille tuberculeux que R. Koch avait isolé en 1881 (53, 163, 192). L'amplification peut même se faire à partir des lames de frottis utilisées lors du diagnostic (170, 171). C'est donc une technique rapide, pratique et utilisable en routine diagnostique.

En 2001, Christophe Sola *et al.* (148) de l'Institut Pasteur de Guadeloupe ont colligé plus de 3000 profils dans une banque de donnée appelée SpolDB1 (pour Spoligotype Data Base version 1) disponible sur le site Internet du « *Centers for Disease Control and Prevention* » (147). En 2003, SpolDB3 contenait les profils de 13 008 souches provenant de plus de 90 pays répartis en 1300 "profils orphelins" (spoligotypes correspondant à un seul isolat clinique) et 813 clusters (spoligotypes regroupant de deux à plusieurs souches de profils identiques) (49, 50).

4.4 MIRU-VNTR

Les MIRU (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Units*) sont des éléments de 40 à 100 paires de bases composés de répétitions en tandem et dispersés dans les régions intergéniques du génome des bactéries du complexe *M. tuberculosis* (157). Le chromosome de *M. tuberculosis* H37Rv contient au moins 41 loci MIRU. Après analyse de la séquence de ces loci chez 31 souches du complexe *M. tuberculosis*, 12 d'entre eux montrent des variations dans le nombre de copies des répétitions en tandem, et dans la plupart des cas, des modifications de séquence des éléments

répétés (Figure 14). Les MIRU sont donc comparables aux microsatellites utilisés en génétique animale (158). Notons que deux de ces loci polymorphes sont identiques aux loci de VNTR décrits par Frothingham *et al.* (56) (MIRU 4 et ETR-D ; MIRU 31 et ETR-E).

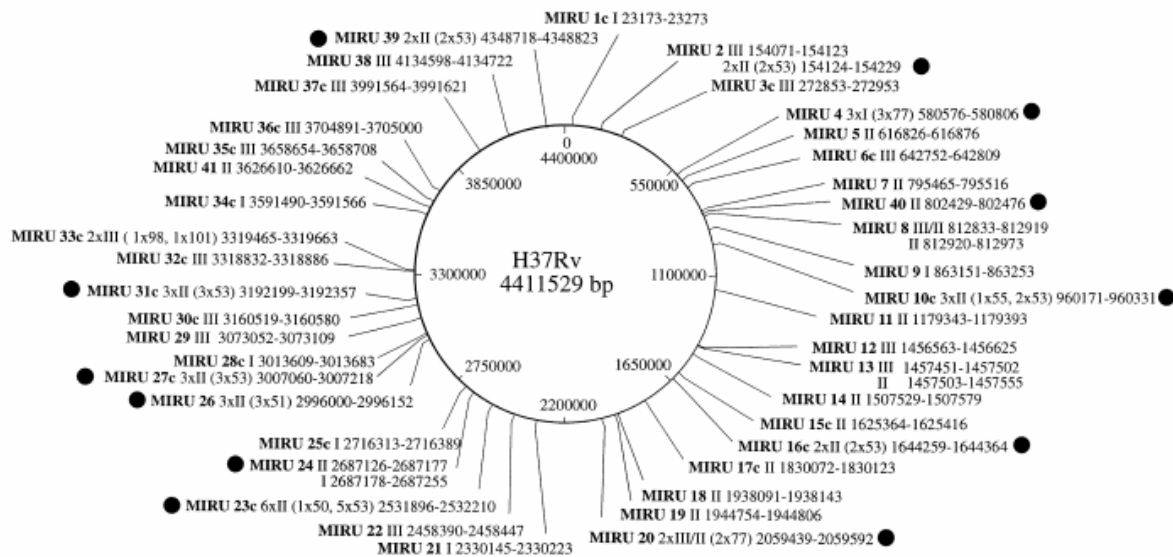


Figure 14 : Carte des 41 loci MIRU sur le chromosome de *M. tuberculosis* H37Rv

Le numéro du locus est indiqué en gras. Un 'c' désigne les MIRU orientés en sens contraire à celui défini par Cole *et al.* (23). Le type de MIRU (I, II, III) défini par Supply *et al.* (157) est indiqué en chiffre romain. La position exacte du locus est donnée après le type. Les 12 loci utilisés dans la technique MIRU-VNTR sont repérés par un rond noir. (d'après Supply *et al.*, 2000 (158))

La variabilité au niveau des MIRU-VNTR est constituée par des additions ou des délétions séquentielles d'unités de taille identique (137). De ce fait, le nombre d'unités variables peut être simplement calculé, pour chaque locus, en mesurant la taille totale du fragment amplifié par des amorces spécifiques des régions flanquantes. Ainsi, chaque souche est caractérisée par un code numérique de 12 chiffres correspondant au nombre d'unités variables existantes pour chacun des 12 loci MIRU-VNTR. Une banque de profils (MiruDB) est d'ailleurs disponible via l'Internet (155)

L'identification à ce jour de 2 à 11 allèles pour chacun des 12 MIRU-VNTR sous-tend un potentiel de $2 \cdot 10^8$ combinaisons possibles, soit un pouvoir de résolution s'approchant de celui de l'RFLP-IS6110 (93). La technique MIRU-VNTR étant indépendante du nombre de copie de l'IS6110, son pouvoir de résolution n'est pas affecté par cette variable. La réalisation de MIRU-VNTR en PCR multiplex utilisant des amorces marquées par différents fluorochromes permet la lecture des résultats à

l'aide d'un automate de séquençage d'ADN directement relié à un système informatique pour l'analyse et le calcul des profils de MIRU-VNTR (3). Le caractère automatisable de cette technique est un atout pour son utilisation à grande échelle, sous réserve d'un investissement matériel important.

5 MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS ET SELECTION ADAPTATIVE

5.1 Pression de sélection et stratégies adaptatives chez *M. tuberculosis*

Face à la pression de sélection opérée par les défenses de l'hôte ou les traitements anti-infectieux, les bactéries qui survivent et sont sélectionnées sont celles qui sont les mieux adaptées (166). Alors que les autres pathogènes Gram-positifs peuvent acquérir des phénotypes multirésistants grâce à des plasmides et des transposons, la résistance chez *M. tuberculosis* est exclusivement due à des mutations génomiques (51, 164, 174). Des souches résistantes à plus de douze antibiotiques et responsables d'épidémies ont été décrites (131). Ces souches possèdent des mutations à la fois dans les gènes impliqués dans la transcription (*rpoB* pour la résistance à la rifampicine), la traduction (*rrs* et *rpsL* pour la résistance aux aminoglycosides), la réplication (*gyrA* pour les quinolones) ou des éléments intervenant dans la synthèse des lipides de la paroi bactérienne (l'isoniazide inhibe la synthèse des acides mycoliques) (voir partie 3.2). L'ensemble de ces mutations devrait leur conférer un désavantage sélectif les rendant moins infectieuses. Afin d'expliquer qu'un tel désavantage ne soit pas observé, notamment au niveau de leur transmissibilité, l'hypothèse selon laquelle il s'agit de souches mieux adaptées qui acquièrent la multirésistance a été émise (125).

5.2 Phénotype mutateur chez *Escherichia coli*, *Pseudomonas* et autres

Les populations bactériennes qui ont un niveau élevé de variabilité génétique ont une probabilité plus élevée de survivre dans un environnement changeant. Les bactéries qui ont un taux de mutation élevé peuvent être considérées comme ayant une plus grande capacité d'adaptation. A l'intérieur d'une population bactérienne,

une proportion d'individus exprime un phénotype appelé mutateur caractérisé par un taux de mutation supérieur à la moyenne de l'ensemble de la population dont ils dérivent. Ces bactéries sont dites mutatrices. Chez *Escherichia coli* et *Shigella*, on observe une variation du pourcentage de bactéries mutatrices suivant les écotypes : les souches uropathogènes ont plus fréquemment un phénotype mutateur que les souches responsables de bactériémie (35). Néanmoins, aucune relation avec la fréquence de souches résistantes aux antibiotiques n'a été observée dans ce cas. Denamur *et al.* (36) ont montré l'existence d'une variation importante des gènes de réparation de l'ADN, eux-mêmes responsables de variabilité. Des souches mutatrices possédant des gènes de réparation de l'ADN non fonctionnels ont été isolées préférentiellement à partir de populations clonales de *Pseudomonas aeruginosa* infectant les malades souffrant de mucoviscidose et non à partir de souches responsables d'infections aiguës. Dans ce cas, la présence de ces souches mutatrices est associée à un haut niveau de résistance aux antibiotiques (109). De tels phénotypes facilitent non seulement l'acquisition de résistances aux antibiotiques mais aussi l'adaptation et la persistance bactériennes dans de nouvelles niches écologiques et l'échappement à la réponse immunitaire (102, 126, 162).

5.3 Souches mutatrices chez *M. tuberculosis*

Chez *Mycobacterium tuberculosis*, il existe peu de variations génétiques dans les séquences d'une série de gènes d'un ensemble d'isolats cliniques (150). Cependant, le typage des souches réalisé en utilisant plusieurs marqueurs génétiques comme les régions répétées a montré un polymorphisme important suggérant une variabilité différentielle suivant les loci (voir partie 4.1).

Le phénotype hypermutateur chez *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria meningitidis*, et probablement beaucoup de microorganismes, est dû à des altérations du système de réparation des mésappariements dus aux méthylations de l'ADN (*Methyl-directed mismatch repair*, MMR) (61). Une première analyse du génome de *M. tuberculosis* H37Rv n'a pas mis en évidence de gènes codant des protéines homologues à celles du système MMR d'*E. coli* (101). Il en est de même pour les autres génomes du genre *Mycobacterium* disponibles à ce jour : *M. leprae*, *M. paratuberculosis*, *M. bovis* et *M. smegmatis*. Les

Mycobactéries ayant des taux de mutations spontanées semblables aux autres pathogènes, il est donc vraisemblable qu'elles contiennent un système MMR différent de ceux décrits pour les autres microorganismes, ou bien une fidélité de la réplication plus élevée.

Outre les gènes du système MMR, la modification d'une trentaine de gènes peut conférer un phénotype mutateur chez *E. coli* (75). Parmi eux, des gènes de réparation des lésions de l'ADN résultant d'une alkylation ou d'une oxydation de nucléotides présentent des homologues chez les Mycobactéries (23, 101).

Les souches *M. tuberculosis* du génotype Beijing ont été impliquées dans de nombreuses épidémies, associées pour certaines à des résistances aux antibiotiques (6, 7). Les souches W-Beijing semblent donc posséder une prédisposition génétique pour s'adapter à leur environnement. Une étude récente (125) a d'ailleurs montré que ces souches présentent une mutation ponctuelle dans trois gènes, deux du type *mutT* (*mutT4* et *mutT2*) et *ogt*. Ces polymorphismes sont caractéristiques de la lignée phylogénétique W-Beijing. L'analyse des gènes *mut* de 55 isolats W-Beijing suggère une acquisition progressive de mutations caractérisant une voie potentielle d'évolution moléculaire de cette famille.

La présence d'allèles mutés des gènes *mutT2*, *mutT4* et *ogt* pourrait expliquer la capacité de certains types d'isolats à s'adapter rapidement à leur environnement, favorisant ainsi leur dissémination. Toutefois, ces souches ne présentent pas un phénotype mutateur (186). Elles ont vraisemblablement développé un phénotype mutateur transitoire permettant leur adaptation, puis acquis des mutations compensatrices évitant l'accumulation de mutations, certaines d'entre elles pouvant être délétères. Les mutations observées dans les gènes *mut* constitueraient alors une trace « fossile », utilisable comme marqueur génétique de souches susceptibles de devenir épidémiques et MDR. Il est aussi possible que le phénotype mutateur probablement acquis par ces souches s'exprime uniquement dans des conditions particulières, et n'ait donc pas été observé dans les conditions expérimentales utilisées.

Pour tester cette hypothèse, nous avons recherché l'existence de variations dans les gènes anti-mutateurs potentiels chez des souches ayant démontré leur adaptation : une collection d'isolats cliniques MDR provenant de Bangui en République Centrafricaine de 1993 à 2001. En République Centrafricaine, l'OMS

estime l'incidence de la tuberculose à 237 pour 100 000, avec 18,4 % de souches résistantes, 2,8 % de souches MDR et 48,5 % des patients tuberculeux coïnfectés par le VIH (Anti-tuberculosis drug resistance in the World, WHO report, 2003).

Les mutations identifiées ont ensuite été recherchées dans un ensemble de souches collectées de manière systématique en 1998 à Bangui. Le taux de mutation spontanée de ces souches a été évalué. Enfin, le typage moléculaire par la technique de spoligotypage de l'ensemble de ces souches a permis d'affiner la description des souches circulant à Bangui à cette période et de proposer un arbre phylogénétique.

6 MATERIELS ET METHODES

6.1 Origine des souches et ADN de *M. tuberculosis*

Un total de 320 isolats cliniques de *M. tuberculosis* a été étudié. Ceux-ci proviennent de la collection de l'Institut Pasteur de Bangui. Ils incluent les isolats multirésistants recueillis entre 1993 et 2001 (55 isolats) et les isolats issus de la mise en culture systématique des prélèvements de patients atteints de tuberculose (frottis BAAR+) diagnostiquée entre le 15 avril au 15 août 1998 (2 souches MDR et 263 souches non MDR). L'extraction d'ADN a été réalisée à partir d'une culture sur milieu de Lowenstein Jensen, après chauffage à 80°C pendant 20 minutes, à l'aide de phénol et de chloroforme, puis précipitation à l'éthanol (173).

6.2 Séquençage de *mutT1*, *mutT2*, *mutT3*, *mutT4*, *ogt*, *alkA* et *rpoB*

Des oligonucléotides ont été synthétisés pour amplifier les différentes ORFs correspondant aux gènes *mut* putatifs :

Tableau 5 : Couples d'amorces utilisés pour amplifier les différentes ORFs par PCR

ORF	Couple d'amorces	
<i>mutT1</i>	5'-ATCGTCGGCGTGCCGTG-3'	5'-GTCAGCGTCCTGCCCGG-3'
<i>mutT2</i>	5'-TCCGGATGATGATTACCTCC -3'	5'-TCCGCCGGGTCGGGGAC-3'
<i>mutT3</i>	5'-GTCACGTCTGTTAGGACCTC -3'	5'-CGCGCAACGGCTGCCCGG-3'
<i>mutT4</i>	5'-TCGAAGGTGGGCAAATCGTG -3'	5'-TGGGGTTCGCTGGAAGTGG-3'
<i>ogt</i>	5'-CAGCGCTCGCTGGCGCC -3'	5'-GACTCAGCCGCTCGCGA-3'
<i>alkA</i>	5'-AGCCGCGTAGGTAACCT-3'	5'-TGCTCGAGCATCCGCAG-3'
	5'-CGCATGCAGACCGCCCG-3'	5'-CACTGCACGTTGCCGAC-3'
<i>rpoB</i>	5'-TACGGTCGGCGAGCTGATCC -3'	5'-CACTGCACGTTGCCGAC-3'

Le séquençage de l'ADN a été effectué directement sur les fragments amplifiés en utilisant la méthode des terminateurs de chaînes marqués (*didéoxy-chain-termination*) avec le *Big Dye Terminator Cycle sequencing Kit* (Perkin Elmer Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) sur un thermocycleur GeneAmp PCR system 9600 (Perkin Elmer), puis à l'aide d'un système d'analyse d'ADN modèle 3100 (Applied Biosystems).

Les séquences des ORFs *mutT1*, *mutT2*, *mutT3*, *mutT4*, *ogt*, *alkA*, et *rpoB* des souches H37Rv, CDC1551 et MT103 ont été obtenues à partir des séquences publiées (23, 52, 57) disponibles sur le site web NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi).

6.3 Spoligotypage

L'ADN (environ 10 ng) est dilué dans un volume final de 50 µl contenant 20 µmol des amorces DRa (5'-CCGAGAGGGGACGGAAAC-3') et DRb (5'-GGTTTTGGGTCTGACGAC-3', biotinylé en 5'), 200 µM de chaque dNTP, 1,25 U d'ADN polymérase Taq (Roche Boehringer), du tampon spécifique de cette Taq (contenant du MgCl₂) et de l'eau pyrolysée. Les tubes sont placés dans un thermocycleur (Perkin Elmer) et soumis au cycle de températures suivant pour amplification par PCR :

3 min 96°C	} 20 cycles
1 min 96°C	
1 min 55°C	
30 sec 72°C	

Après amplification, l'ADN est hybridé sur un jeu de 43 oligonucléotides de séquences uniques issues de souches de référence (37 séquences pour *M. tuberculosis* H3Rv, 6 pour *M. bovis* BCG). Ces oligonucléotides sont déposés en lignes parallèles et liés de manière covalente sur une membrane Biodyne C activée (Isogen, Maarssen, Pays-Bas) : 20 µl des produits de PCR sont dilués dans 150 µl de tampon SSPE 2X (NaCl 6M ; NaH₂PO₄ 0,4M ; EDTA 0,04M ; pH 7,4), SDS 0,1 %, dénaturés à 96°C pendant 5 minutes et déposés en lignes

perpendiculairement aux lignes d'oligonucléotides avec un applicateur de 45 lignes (Miniblotter45, Immunetic, Cambridge, Mass.) pour hybridation pendant 1 heure à 60°C.

Le contenu de chaque canal de l'applicateur est ensuite retiré par aspiration, dans l'ordre de dépôt. La membrane est lavée deux fois 10 min à 60°C dans 250 ml de SSPE 2X, SDS 0,5 % sous agitation puis incubée pendant 1 heure à 41°C dans un tube à hybridation en présence de streptavidine liée à la peroxydase (Boehringer Mannheim) diluée au 1/4000^{ème} dans du tampon SSPE 2X, SDS 0,5 %.

Après deux lavages sous agitation à 42°C dans 250 ml de SSPE 2X, SDS 0,5 %, et deux rinçages de 5 min sous agitation dans 250 ml de SSPE 2X à température ambiante, le signal d'hybridation est révélé par le système d'électrochimiluminescence (*ECL detection kit*, Amersham, Angleterre) en incubant la membrane 1 min dans 10 ml de liquide de détection. Puis, un film radiographique (Hyperfilm ECL, Amersham, Angleterre) est exposé à la membrane placée sous plastique durant 20 min. Le film est ensuite développé manuellement par passage dans un bain de révélateur jusqu'à apparition de l'image, un bain de rinçage pendant 30 sec. et un bain de fixateur pendant 3 min.

6.4 Analyse de dendrogrammes assistée par ordinateur

L'analyse des spoligotypes de chaque isolat a été réalisée à l'aide du logiciel BioNumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgique) après enregistrement des autoradiogrammes. Chaque hybridation positive est définie par une bande. Le logiciel permet ensuite le regroupement des spoligotypes identiques, l'agencement des différents spoligotypes en fonction de leur degré de similitude (coefficient de Dice) et la comparaison à des banques de spoligotypes déjà connus (49, 50, 148).

6.5 Estimation de la fréquence de mutation

Les cultures de *M. tuberculosis* sur milieu de Lowenstein Jensen sont mises en suspension en milieu liquide 7H9 (Difco) supplémenté en Middlebrook ADC

(albumine bovine, dextrose et catalase) additionné de Tween80 0,05 %, puis cultivées pendant trois semaines à 37°C sous agitation enfin, après dilution en série, étalées sur milieu solide : agarose 7H11 enrichie en Middlebrook OADC (acide oléique, albumine, dextrose et catalase). Au bout de trois semaines à 37°C, les colonies isolées sont ensemencées dans 5 ml de milieu liquide placés pendant trois semaines à 37°C sous agitation.

Un volume de 100 µl de ces cultures clonales est alors dilué en série dans 900 µl de PBS-Tween80 0,05 % (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-6} , 10^{-7}). La formation par *M. tuberculosis* d'agrégats bactériens appelés « clumps » affecte la précision des dilutions et des dénombrements. Ainsi, les faibles différences de fréquences de mutation sont difficiles à déterminer. Pour minimiser ce phénomène, outre l'addition de Tween80 à 0,05 % dans les différentes solutions, une désagrégation manuelle des cultures est réalisée grâce à 40 cycles d'aspiration/refoulement dans une aiguille de 0,45 mm de diamètre montée sur une seringue de 1 ml. Un volume de 100 µl de chacune des dilutions est étalé sur des boîtes de Pétri (milieu 7H11, OADC) contenant différentes concentrations de rifampicine (0 ; 10 et 50 µg/ml).

Le dénombrement des colonies obtenues est réalisé après trois semaines d'incubation pour les boîtes sans antibiotique ou après cinq à six semaines pour les boîtes contenant de la rifampicine.

7 RESULTATS

7.1 Polymorphisme des gènes *mut* dans une série de souches MDR

Six ORFs possédant des similitudes avec les gènes de réparation de l'ADN *mutT*, *ogt* et *alkA* d'*E. coli* ont été séquencées chez 55 souches MDR de *M. tuberculosis* isolées à Bangui entre 1993 et 2001. Il s'agit des séquences annotées Rv2985 (*mutT1*), Rv1160 (*mutT2*), Rv0413 (*mutT3*) et Rv3908c (*mutT4*) possédant des homologies avec *mutT* et des séquences annotées *ogt* et *alkA* possédant des homologies avec les gènes d'*E. coli* du même nom (Tuberculist, <http://www.genolist.pasteur.fr/TubercuList/>). Par comparaison avec les séquences des mêmes ORFs des souches pour lesquelles le génome a été séquencé (H37Rv, CDC1551 et MT103), des variations ont été observées pour 5 ORFs (*mutT1*, *mutT2*, *mutT3*, *alkA* et *ogt*). Pour chaque gène putatif de réparation de l'ADN, les variations observées sont présentées dans le Tableau 6. Les mutations du gène *rpoB* en lien avec la sensibilité à la rifampicine y sont reportées, ainsi que l'historique tuberculeux des patients (nouveau cas / cas déjà traité contre la tuberculose auparavant) et leur statut sérologique vis-à-vis du VIH. Dans cette série de 55 souches MDR, 29,1 % proviennent de patients VIH positifs et 32,7 % de nouveaux cas de tuberculose. Aucune différence n'a été mise en évidence suivant ces critères, ils ne seront donc pas discutés par la suite.

On observe deux variations silencieuses, **GTC→GTA** codant la valine au codon 265 dans MutT1 pour 17 souches et **CTG→CTA** pour la leucine 209 dans MutT3 pour une souche ; une transition **CCG→TCG** entraînant la substitution d'une proline par une sérine en position 94 dans MutT2 chez une souche ; le remplacement d'une thréonine par une sérine en position 15 pour Ogt chez trois souches suite à une transversion **ACC→AGC** et trois substitutions dans AlkA en position 12, 79 et 337.

Tableau 6 : Variations observées au niveau de 6 gènes putatifs de réparation de l'ADN de 55 souches MDR isolées à Bangui (RCA)

Patient	ATB	nouveau cas	HIV	rpoB	mut T1	mut T2	mut T3	mut T4	ogt	efk A
1	R/I	oui	ND	Ser TCG 531 Leu TTG	wt	wt	wt	wt	wt	wt
2	R/I	ND	+	His CAC 526 Asp GAC	wt	wt	wt	wt	wt	wt
3	R/I	non	-	His CAC 526 Asp GAC	wt	wt	wt	wt	wt	wt
4	R/I/E/S	non	-	Ser TCG 531 Leu TTG	wt	wt	wt	wt	wt	wt
5	R/I/E	oui	-	Ser TCG 531 Leu TTG	Vali GTC 265 Vali GTA	wt	wt	wt	wt	ND
6	R/I/E	oui	+	His CAC 526 Tyr TAC	Vali GTC 265 Vali GTA	wt	wt	wt	wt	wt
7	R/I/E	oui	+	His CAC 526 Tyr TAC	Vali GTC 265 Vali GTA	wt	wt	wt	wt	ND
8	R/I/E	oui	+	His CAC 526 Tyr TAC	Vali GTC 265 Vali GTA	wt	wt	wt	wt	wt
9	R/I/E/S	oui	ND	His CAC 526 Asp GAC	Vali GTC 265 Vali GTA	wt	wt	wt	wt	ND
10	R/I/E/S	non	-	His CAC 526 Tyr TAC	Vali GTC 265 Vali GTA	wt	wt	wt	wt	wt
11	R/I/E/S	non	-	His CAC 526 Arg CGC	Vali GTC 265 Vali GTA	wt	wt	wt	wt	ND
12	R/I/E/S	non	-	Asp GAC 516 Vali GTC	Vali GTC 265 Vali GTA	wt	wt	wt	wt	ND
13	R/I/E/S	non	-	His CAC 526 Tyr TAC	Vali GTC 265 Vali GTA	wt	wt	wt	wt	wt
14	R/I/S	non	-	Asp GAC 516 Vali GTC	Vali GTC 265 Vali GTA	wt	wt	wt	wt	wt
15	R/I/E/S	non	-	Ser TCG 531 Leu TTG	Vali GTC 265 Vali GTA	wt	wt	wt	wt	wt
16	R/I/S	non	-	His CAC 526 Arg CGC	Vali GTC 265 Vali GTA	wt	wt	wt	wt	wt
17	R/I/S	non	-	Ser TCG 531 Leu TTG	Vali GTC 265 Vali GTA	wt	wt	wt	wt	wt
18	R/I	non	-	His CAC 526 Tyr TAC	Vali GTC 265 Vali GTA	wt	wt	wt	wt	wt
19	R/I/E/S	non	+	Ser TCG 531 Leu TTG	Vali GTC 265 Vali GTA	wt	wt	wt	wt	ND
20	R/I/E	non	+	Asp GAC 516 Vali GTC	Vali GTC 265 Vali GTA	wt	wt	wt	wt	ND
21	R/I/E/S	non	+	Ser TCG 531 Leu TTG	Vali GTC 265 Vali GTA	wt	wt	wt	wt	ND
22	R/I/S	non	+	His CAC 526 Tyr TAC	Vali GTC 265 Vali GTA	wt	wt	wt	wt	wt
23	R/I/E/S	non	+	Ser TCG 531 Leu TTG	Vali GTC 265 Vali GTA	wt	wt	wt	wt	wt
24	R/I/S	non	ND	His CAC 526 Asp GAC	Vali GTC 265 Vali GTA	wt	wt	wt	wt	wt
25	R/I/E/S	non	ND	His CAC 526 Arg CGC	Vali GTC 265 Vali GTA	wt	wt	wt	wt	wt
26	R/I/E/S	non	-	Ser TCG 531 Leu TTG	ND	ND	ND	ND	ND	ND
27	R/I/E/S	non	-	Ser TCG 531 Leu TTG	Pro CCG 94 Ser TCG	Leu CTG 209 Leu CTA	Thr ACC 15 Ser AGC	Thr ACC 15 Ser AGC	Thr ACC 15 Ser AGC	wt
28	R/I/E/S	oui	-	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
29	R/I	oui	-	Ser TCG 531 Leu TTG	wt	wt	wt	wt	wt	wt
30	R/I/E/S	non	-	Ser TCG 531 Leu TTG	wt	wt	wt	wt	wt	wt
31	R/I/E/S	oui	+	Asp GAC 516 Tyr TAC + CCC Pro 535 Ser TCC	wt	wt	wt	wt	wt	Ile ATC 12 Vali GTC
32	R/I/S	non	-	Leu CTG 511 Arg CGG + Asp GAC 516 Tyr TAC	wt	wt	wt	wt	wt	Thr ACT 337 Asn AAT
33	R/I	non	-	Ser TCG 531 Leu TTG	wt	wt	wt	wt	wt	Thr ACT 337 Asn AAT
34	R/I/E/S	ND	ND	Ser AGC 512 Ile ATC + Asp GAC 516 Tyr TAC	wt	wt	wt	wt	wt	Thr ACT 337 Asn AAT
35	R/I/S	oui	+	Ser TCG 531 Leu TTG	wt	wt	wt	wt	wt	Thr TGG 79 AMB TAG & Thr ACT 337 Asn AAT
36	R/I/E/S	oui	-	Ser TCG 531 Leu TTG	wt	wt	wt	wt	wt	Thr TGG 79 AMB TAG & Thr ACT 337 Asn AAT
37	R/I/S	non	-	Ser TCG 531 Leu TTG	wt	wt	wt	wt	wt	Thr TGG 79 AMB TAG & Thr ACT 337 Asn AAT
38	R/I/E/S	non	-	Ser TCG 531 Leu TTG	wt	wt	wt	wt	wt	Thr TGG 79 AMB TAG & Thr ACT 337 Asn AAT
39	R/I/S	ND	+	Ser TCG 531 Leu TTG	wt	wt	wt	wt	wt	Thr TGG 79 AMB TAG & Thr ACT 337 Asn AAT
40	R/I/E/S	non	-	His CAC 526 Tyr TAC	wt	wt	wt	wt	wt	wt
41	R/I	non	-	His CAC 526 Tyr TAC	wt	wt	wt	wt	wt	wt
42	R/I	oui	-	His CAC 526 Tyr TAC	wt	wt	wt	wt	wt	wt
43	R/I/E/S	oui	-	Ser TCG 531 Leu TTG	wt	wt	wt	wt	wt	wt
44	R/I/E/S	oui	ND	Ser TCG 531 Leu TTG	ND	ND	ND	ND	ND	ND
45	R/I	non	ND	His CAC 526 Tyr TAC	ND	ND	ND	ND	ND	ND
46	R/I	oui	ND	Asp GAC 516 Vali GTC	ND	ND	ND	ND	ND	ND
47	R/I	oui	ND	Leu CTG 533 Pro CGG	ND	ND	ND	ND	ND	ND
48	R/I/E/S	oui	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
49	R/I/E	non	-	Ser TCG 531 Leu TTG	ND	ND	ND	ND	ND	ND
50	R/I/E/S	non	+	Ser TCG 531 Leu TTG	wt	wt	wt	wt	wt	wt
51	R/I/E/S	non	-	His CAC 526 Tyr TAC	ND	ND	ND	ND	ND	ND
52	R/I/E/S	non	-	His CAC 526 Arg CGC	ND	ND	ND	ND	ND	ND
53	R/I/E/S	non	-	His CAC 526 Arg CGC	ND	ND	ND	ND	ND	ND
54	R/I	oui	-	His CAC 526 Tyr TAC	ND	ND	ND	ND	ND	ND
55	I/E/S	non	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ATB, Antibiogramme (R, rifampicine ; I, isoniazide ; E, éthambutol ; S, streptomycine) ; wt, type sauvage (relativement à M. tuberculosis H37Rv) ; ND, non déterminé.

Parmi les variations observées, le plus grand nombre affecte le gène putatif *alkA* : une variation Trp→amber, codon non-sens en position 79 observée chez 5 souches, toujours accompagnée d'une transition ACT→AAT conduisant à une substitution Thr→Asn en position 337. Deux souches montrent uniquement la variation 337. Par ailleurs, au niveau de ce même locus, une variation Ile→Val en position 12 suite à une transition ATC→GTC est aussi observée dans deux souches. Les vingt-trois séquences exploitables restantes pour *alkA* ont la même séquence que les génomes de *M. tuberculosis* déjà publiés.

7.2 Polymorphisme au locus *alkA* dans une série de souches non MDR

La variation non-sens observée au locus *alkA* pour 5 des 55 souches MDR étudiées est la plus susceptible d'entraîner des conséquences fonctionnelles. Aussi, la présence de polymorphisme au locus *alkA*, en particulier les variations détectées chez les souches multirésistantes, ont été recherchées dans une collection de 265 souches isolées de manière systématique à Bangui entre le 15 avril et le 15 août 1998. Le locus *alkA* a ainsi été séquencé chez 263 souches non MDR (2 souches MDR ont été exclues). Sur les 189 séquences exploitables obtenues, 24 souches sont porteuses de variations (12,7 %). Nous avons observé la variation Ile→Asn en position 12 chez deux souches (n° 186 et 202), la substitution Thr→Asn en 337 chez quatre souches (n° 44, 50, 89, 257) et la présence à la fois de la variation non-sens en position 79 et de la substitution 337 chez trois souches (n° 151, 170 et 243).

Les variations aux positions 79 et 337 sont donc simultanément retrouvées pour au moins 8 des 320 souches étudiées (MDR ou non). La séquence récente de *M. bovis* AF2122 (57) et de *M. bovis* BCG (S. Cole, résultats non publiés) a montré l'existence du polymorphisme non-sens 79 chez AF2122. Le typage des souches de Bangui a été réalisé (voir partie 7.3). Ce typage a montré que les souches de Bangui portant la variation non-sens 79 n'appartenaient pas à l'espèce *M. bovis*. La mutation 79 serait donc apparue plusieurs fois ou aurait été transférée par échange génétique. De tel échanges génétiques n'ont cependant pas été mis en évidence jusqu'à présent à l'intérieur du complexe *M. tuberculosis* (159).

7.3 Spoligotypage de l'ensemble des souches

Nous avons vérifié si les différents groupes de souches portant le même polymorphisme génique (*mutT1* ou *alkA*) sont aussi regroupés en utilisant d'autres marqueurs et recherché d'éventuels liens phylogénétiques entre les souches possédant les mêmes polymorphismes en utilisant la technique de spoligotypage. L'ensemble des 320 souches a été typé et un profil de spoligotype exploitable a été obtenu pour 284 souches (52 MDR, 232 non MDR). Nous avons identifié 79 profils différents dont 55 profils orphelins et 24 profils ou « clusters » regroupant de 2 à 56 souches. Un dendrogramme est représenté sur la Figure 15, les 24 clusters y sont identifiés par une lettre de A à X.

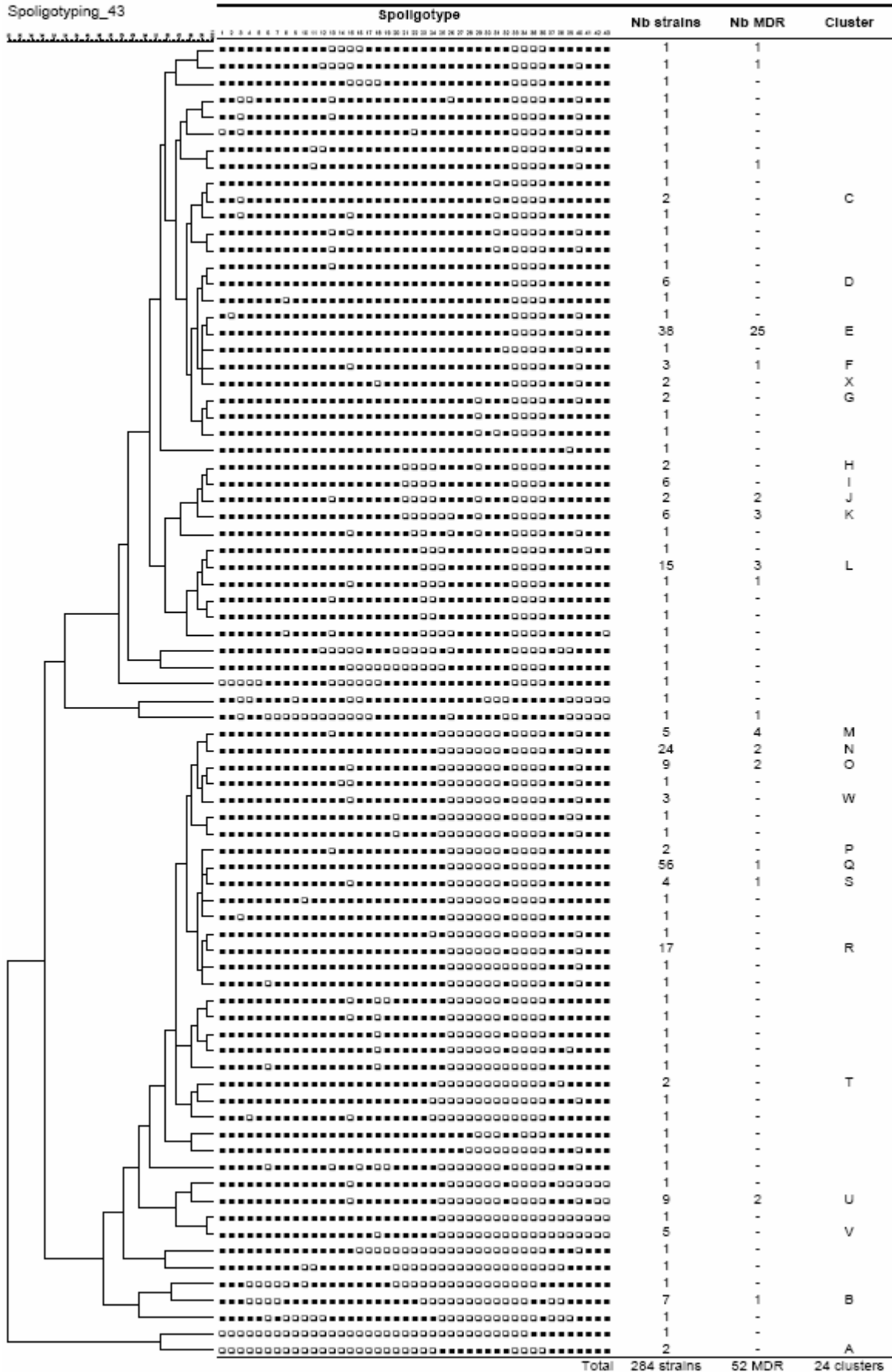


Figure 15 : Dendrogramme des 79 profils de spoligotypes différents des 284 souches typées

Les 55 souches MDR sont regroupées dans 8 clusters dont 45,5 % dans le cluster E (Figure 16). Ce cluster inclut les souches porteuses de la variation synonyme **GTC→GTA** en position 265 dans *mutT1*. Ce spoligotype est caractéristique de souches ancestrales de *M. tuberculosis*. Les profils des 232 souches non MDR sont regroupés dans 22 clusters (Figure 17). Parmi ceux-ci, le cluster E n'apparaît pas comme un cluster majeur. En outre, le cluster Q contient le plus grand nombre de souches. Le profil de ce cluster est identique au profil ST47 de la banque de donnée SpolDB3 (50). ST47 est un des trois profils types des souches appartenant à la famille Haarlem, famille ainsi nommée car identifiée pour la première fois chez un patient vivant à Haarlem aux Pays-Bas. L'appartenance à cette famille est définie par la présence du *spacer* 32 et l'absence des *spacers* 31, 33 à 36. Avec seulement un *spacer* de différence (*spacer* 13 ou 40), ce spoligotype est similaire aux clusters N et M. Ces spoligotypes sont donc caractéristiques de la famille Haarlem.

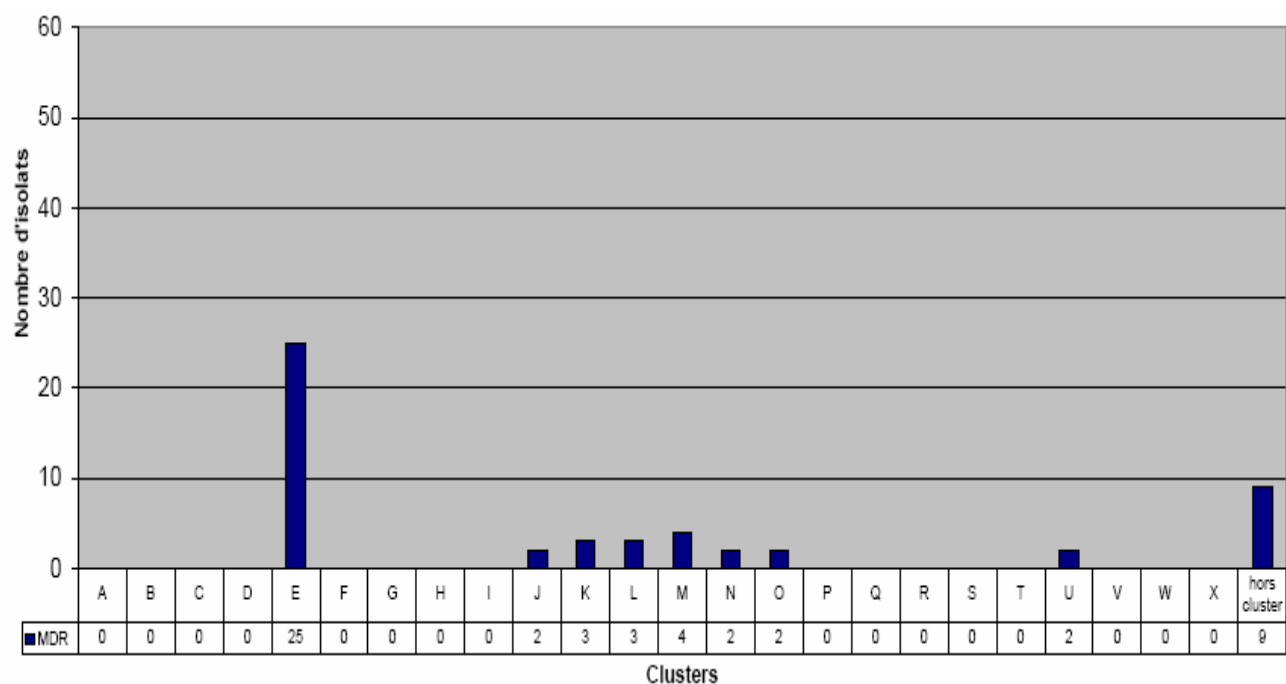


Figure 16 : Répartition des souches MDR dans les différents clusters

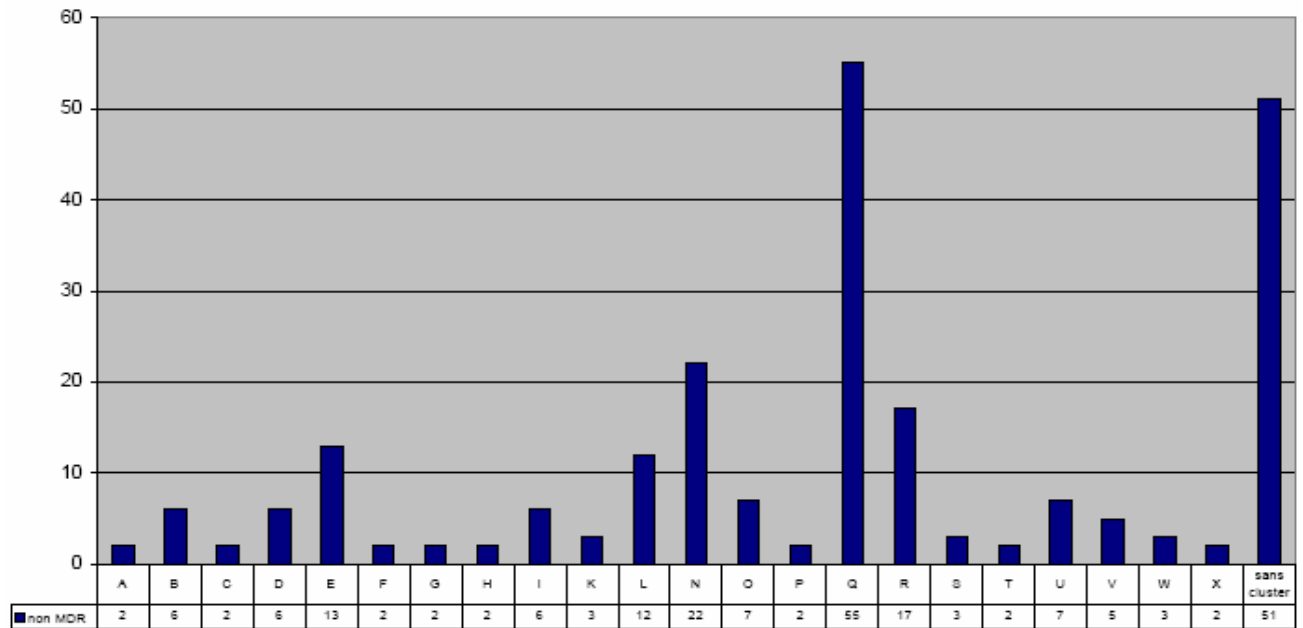


Figure 17 : Répartition des souches non MDR dans les différents clusters

Parmi les 284 souches typées (MDR ou non), les souches portant la variation non-sens au codon 79 associée à la substitution en 337 sont réparties dans ces 3 clusters : le cluster M, constitué uniquement de 5 souches (dont 4 MDR) porteuses de ce polymorphisme, le cluster N composé de 24 souches incluant deux souches porteuses (dont 1 MDR) et le cluster Q comprenant 56 souches (1 MDR) dont seulement une souche porte ces variations. La variation 337 est observée seule chez des souches des clusters N, O et U. La Figure 18 représente un dendrogramme des spoligotypes de l'ensemble des souches de ces cinq clusters. Cette figure met en évidence la proche parenté phylogénétique de ces clusters entre eux (96,6 à 98,4 % d'identité).

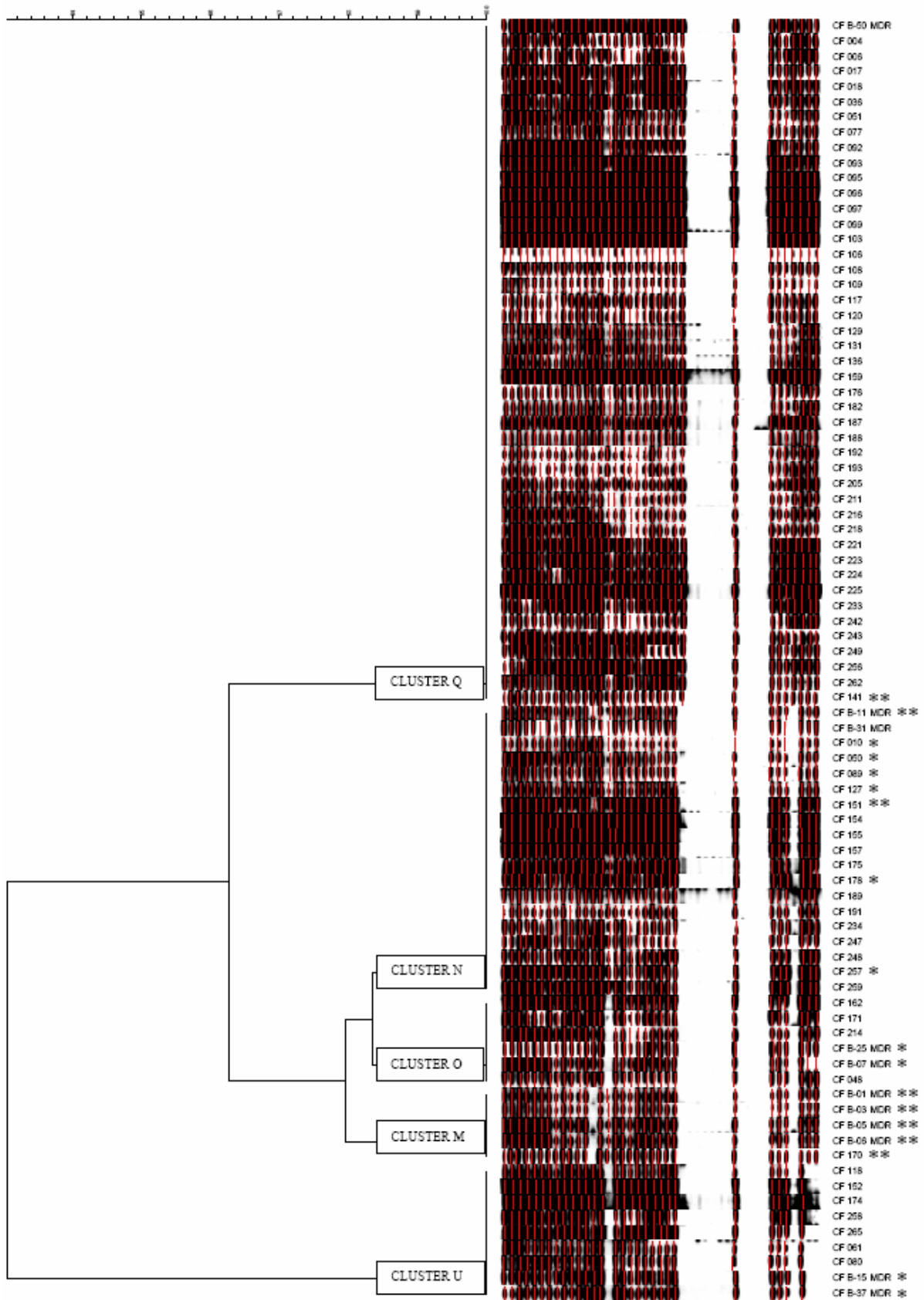


Figure 18 : Dendrogramme des spoligotypes des clusters M, N, O, Q et U

* isolats variants pour *alkA* en 337, ** isolats variants en 79 et 337

Afin de rechercher la présence de souches de familles génétiques connues et déjà répertoriées dans les banques de spoligotypes, les 865 profils de la banque de données SpolDB3 (49) ont été rentrés et annotés dans la base de données BioNumerics. La comparaison des profils des souches de Bangui étudiées ici avec ceux de la banque SpolDB3 fait apparaître 57 souches de la famille Haarlem, 155 souches très proches de cette famille (de 97 à 99 % d'identité avec les profils Haarlem types), 6 souches plus éloignées (de 85 à 97 % d'identité avec Haarlem) mais répondant aux critères d'inclusion dans la famille Haarlem (*spacer* 32 présent, 31 et 33 à 36 absents), 23 souches des types Latino-américain et Méditerranéen (LAM), 45 souches de la famille T (correspondant au profil ancestral de *tuberculosis*), 2 souches de *M. bovis*, aucune souche de *M. africanum* et seulement une souche de la famille Beijing (Tableau 7).

Tableau 7 : Souches appartenant à des familles du complexe *tuberculosis* déjà identifiées

Espèce	Famille	% d'identité	Cluster ou n° souche	Nombre de souches
<i>tuberculosis</i>	Beijing	100	7	1
	Haarlem	100	Q, 63	57
		97-99	C, M, N, O, P, R, S, T, U, V, W, X, 2,13, 53, 56, 75, 85, 123, 235, 260	155
		85-97	9, 31, 32, 168, 179 217	6
	LAM	100	I, J, L	23
T1	100	D, E, 149	45	
<i>bovis</i>		100	B9, 122	2
<i>africanum</i>		70-100	-	0

En face de chaque famille est indiqué le pourcentage d'identité du profil de spoligotype des souches avec les profils types de la famille, la lettre du cluster ou le numéro de souche (pour celles n'appartenant à aucun cluster) et le nombre de souches concernées.

LAM, famille latino-américaine et méditerranéenne ; T1, famille ancestrale de *M. tuberculosis*

7.4 Mesure de la fréquence de mutation

La fréquence de mutation de 3 souches porteuses des polymorphismes non-sens en 79 et Thr→Asn en 337, et de 7 souches de même spoligotype mais de type sauvage pour ce locus, ainsi que des souches de référence H37Rv et MT103, a été évaluée par comptage des mutants spontanément résistants à la rifampicine au sein d'une population de taille connue issue d'un même clone. Les fréquences de mutations spontanées pour la résistance à la rifampicine varient de 10^{-11} à 10^{-8} sans distinction entre les souches portant la variation Amber-79 et les autres, de même

pour les contrôles. La variabilité pour une même souche est trop grande pour mettre en évidence une différence significative de la fréquence entre les différentes souches testées et par rapport aux souches de référence. Cette étude ne met donc pas en évidence de phénotype mutateur spontané.

8 DISCUSSION

8.1 Une prédominance de souches Haarlem en République Centrafricaine

Le typage génétique de 320 isolats de *Mycobacterium tuberculosis* provenant de Bangui en République Centrafricaine, où la prévalence de la tuberculose est élevée, a permis d'évaluer leur diversité génétique. Nous avons obtenu 284 spoligotypes (52 de souches MDR et 232 non MDR). Cinquante-cinq souches bactériennes ont un profil unique et 229 souches sont regroupées parmi 24 clusters de 2 à 56 souches. Le cluster Q regroupant le plus grand nombre de souches (56 souches) correspond à un des profils caractéristiques de la famille Haarlem (ST47). De plus, 155 souches ont un profil très proche (entre 97 et 99 % d'identité avec les profils caractérisant Haarlem). Ces résultats confirment la prédominance de cette famille en Afrique noire (C. Sola, communication personnelle).

Les résultats de spoligotypage concordent avec les spoligotypes déjà obtenus sur une cohorte de souches isolées à Bangui en 1996 dans les mêmes conditions. Toutefois le spoligotype M n'y avait pas été observé. Dans les deux études, le profil des cinq clusters les plus importants en fréquences sont identiques (Q, E, N, R, L). Le Tableau 8 montre que ces fréquences sont similaires en 1996 et en 1998.

Tableau 8 : Nombre et fréquence des cinq clusters les plus représentés lors d'une étude de souches isolés en 1996 et lors de la présente étude de souches isolés en 1998 dans les mêmes conditions

Clusters	Année 1996 N=181 ; n (%)	Année 1998 N=232 ; n (%)
Q	43 (24)	55 (24)
E	29 (16)	33 (14)
N	13 (7)	20 (9)
R	13 (7)	13 (6)
L	09 (5)	11 (5)

A côté du nombre n de souches appartenant au cluster, la fréquence par rapport au nombre total de souches typées N est indiquée entre parenthèses.

La présence de différents clusters démontre l'existence du polymorphisme génétique des isolats de *M. tuberculosis*, mais aussi l'évolution des souches en République Centrafricaine. En effet, même si la fréquence des principaux clusters reste comparable à deux ans d'intervalle, une évolution est perceptible, telle l'apparition de nouveaux clusters comme le cluster M regroupant une souche sensible et quatre souches MDR.

8.2 Détection d'une probable épidémie de tuberculose MDR

Les souches MDR se retrouvent dans des clusters contenant également des souches non MDR. Notons toutefois qu'une forte proportion des MDR (45,5 %) est regroupée dans un même cluster suggérant la possibilité d'une épidémie de tuberculose MDR. Parmi les 25 souches MDR composant ce cluster, 18 sont porteuses d'une variation synonyme au codon 265 de *mutT1*. Malheureusement, les conflits militaro-politiques récemment traversés par la République Centrafricaine rendent impossible la remontée vers les données concernant les patients porteurs des souches analysées pour préciser des liens épidémiologiques de transmission des souches et confirmer l'éventualité de cette épidémie. Cependant, l'observation d'une probable épidémie due à une souche MDR particulière devrait aider à identifier les cas de tuberculose correspondants et permettre un traitement adapté de ces cas.

8.3 Marqueurs génétiques mis en évidence

Le spoligotypage des souches de *M. tuberculosis* isolées à Bangui a permis d'appréhender les relations phylogénétiques entre ces différentes souches. Le séquençage de six gènes putatifs de réparation de l'ADN (*mutT1*, *mutT2*, *mutT3*, *mutT4*, *ogt* et *alkA*) permet d'affiner la caractérisation de ces souches en faisant apparaître l'existence de variations, excepté pour *mutT4* (Tableau 9).

Tableau 9 : Polymorphisme observé sur les gènes de réparation de l'ADN

ORFs	Mutations observées	Nombre de souches porteuses
<i>mutT1</i>	Val 265 Val	20
<i>mutT2</i>	Pro 94 Ser	1
<i>mutT3</i>	Leu 209 Leu	1
<i>mutT4</i>	Pas de variation	-
<i>ogt</i>	Thr 15 Ser	3
<i>alkA</i>	Ile 12 Val	4
	Trp 79 AMB et Thr 337 Asn	8
	Thr 337 Asn	8

Le nombre de souches porteuses de la variation est indiqué dans la colonne de droite

Pro 94 Ser : la proline en position 94 est remplacée par une sérine. Val : valine, Pro : proline, Ser : sérine, Leu : leucine, Thr : thréonine, Ile : isoleucine, Trp : tryptophane, AMB : codon stop Amber, Asn : asparagine.

8.3.1 Marqueur de souches suspectes d'être épidémiques

Une variation silencieuse au codon 265 du gène *mutT1* est observée chez l'ensemble des 18 souches du cluster E pour lesquelles une séquence de *mutT1* a été obtenue. Cette variation est également observée pour deux souches n'appartenant à aucun cluster chez les MDR. Les deux profils de spoligotype de ces deux souches diffèrent de celui du cluster E uniquement par la perte d'un *spacer*. Cette variation marque donc une famille contenant une large proportion de souches MDR. Le cluster E représente 45,5 % des souches MDR et est peu représenté chez les souches non MDR (13 souches, soit 5,6 % des 232 souches typées). La variation *mutT1*-265 est donc peut être le marqueur d'une souche de tuberculose multirésistante épidémique.

8.3.2 Marqueurs de la famille Haarlem

Deux substitutions probablement uniques à la famille Haarlem sont observées dans la séquence des gènes putatifs *ogt* et *mutT3* : les mutations en position 15 chez *ogt* et en position 209 chez *mutT3* ((125) et résultats non publiés de l'Unité de Génétique Mycobactérienne, Institut Pasteur de Paris) En effet, elles sont présentes uniquement chez des souches dont le spoligotype a de fortes similitudes avec la famille Haarlem (98 à 100 % d'identité). Enfin, la mutation non-sens en position 79

d'*AlkA* accompagnée de la mutation 337 pourrait constituer le marqueur d'une branche dérivant d'un ancêtre commun à la famille Haarlem (97 à 100 % d'identité avec un profil Haarlem).

8.4 Historique évolutif du polymorphisme au locus *alkA*

Remarquons que la variation 79, sans association à la substitution 337, est aussi présente dans le génome de *M. bovis* (57). En revanche, elle est absente de celui de *M. bovis* BCG P3 (Stewart Cole, résultats non publiés) et la séquence à ce locus des deux souches de *M. bovis* rencontrées dans cette étude (souches n°122 et B9) ne met pas en évidence ce polymorphisme. Il faut donc supposer que ces substitutions font l'objet d'une pression sélective sous certaines conditions adaptatives comme la compensation d'un phénotype mutateur, ou bien une équivalence fonctionnelle des deux formes alléliques sous pression neutre apparues indépendamment à la fois chez *M. tuberculosis* et *M. bovis*. La situation observée refléterait un événement indépendant survenu à la fois chez *M. tuberculosis* et chez *M. bovis*. Ces variations pourraient aussi résulter d'un transfert génétique. En effet, les études réalisées par Denamur *et al.* (36) montrent l'existence de transferts horizontaux de gènes de réparation de l'ADN. Bien que ce type d'événement n'ait jamais été détecté chez le complexe *tuberculosis* (159), cette dernière hypothèse ne peut être exclue.

En tout état de cause, l'observation de souches portant la substitution 337 seule ou associée à la variation 79, et l'absence de souche portant uniquement la variation 79 suggèrent une évolution moléculaire séquentielle : wt → 337 → 337+79, hypothèse confortée par la proche parenté phylogénétique de ces souches que révèle l'analyse des spoligotypes. La variation 337 est observée seule chez des souches des clusters U, N, O et associée à la variation 79 dans les clusters N, Q et M. Le cluster M est uniquement constitué de souches substituées en 79 et 337. La combinaison des variations observées et des profils de spoligotype permet alors de proposer l'historique évolutif suivant de l'accumulation au locus *alkA* des polymorphismes 337 et 79 :

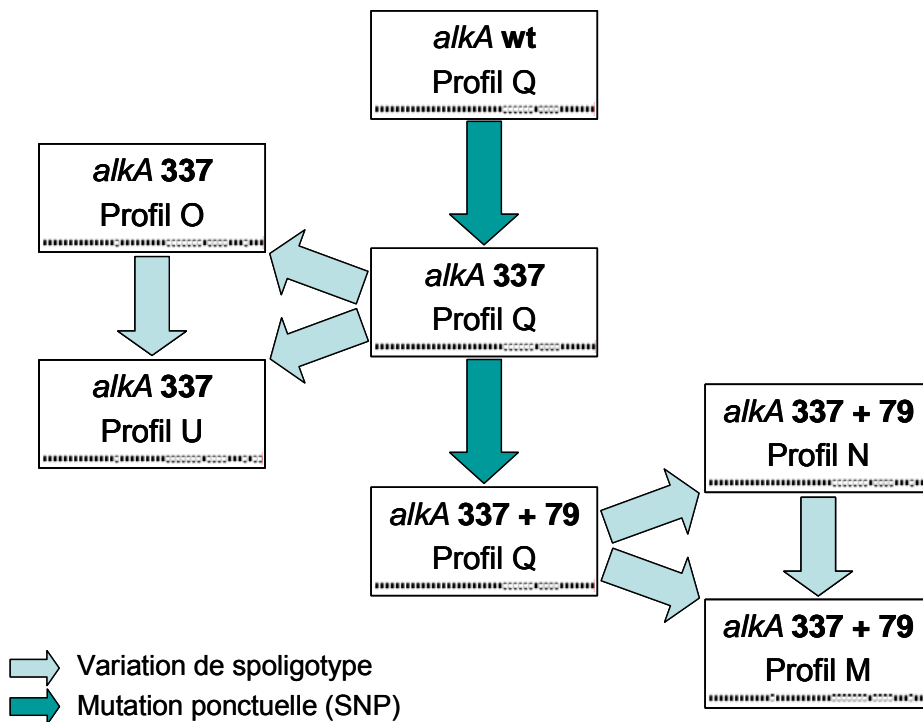


Figure 19 : Proposition de voie évolutive pour l'accumulation des mutations 79 et 337 au locus *alkA*

8.5 *Ada* et *alkA* chez *E. coli* et *M. tuberculosis*

Le gène putatif *alkA* du complexe *tuberculosis* (*alkA*-Tb) comporte en réalité de fortes homologies de séquence avec deux gènes d'*E. coli* : *alkA* et *ada*. Ces homologies sont localisées en région N-terminale pour *Ada* et C-terminale pour *AlkA* suggérant la présence chez *AlkA*-Tb de deux domaines, l'un *Ada* et l'autre *AlkA* (101). L'alignement des séquences protéiques de *Ada* et *AlkA* chez *E. coli* avec celle d'*AlkA* chez *M. tuberculosis* est présenté Figure 20.

A

```

      ## ## ## ### ##### #      ## # # # ### ##### #
Ada(E. coli) 24-DGEFVFAVRRTTGIFCRPSCRARHALRENVSFYANASEALAAGFRPCKRCQPE-75
AlkA(M. tb) 20-DGWFVAVLTTGVYCRPSCPVRPPFARNVRFLPTAAAAQGEGFRACKRCRCPD-71

```

B

```

      # # # ### ## # # # # # # # # # # #
A(E. coli) 1-MYTLNWQPPYDWSWMLGFLAARAVSSVETVADSYARSLAVGEYRGVVTA-50
A(M. tb) 201 SLRLPVRAPFAFEGVFGHLAATAVPGCEEVRDYGAYRRTLRLPWGNGIVSL 250

      # # # # # # # # # # # # # # # # #
A(E. coli) 51-IPDIARHTLHINLSAGLEPVAAECLAKMSRLFDLQCNPQI----VNGALG-96
A(M. tb) 251-TPAPDHVRCLLVLDLDFRDLMTATARCRLLDLADPEAIVEALGADPDLR-300

      ## # # ## # ### # # ## # # # # # #
A(E. coli) 97-RLGAARPGLRLPGCVDAFEQGVRAILGQLVSVAMAAKLTARVAQLYGERL-146
A(M. tb) 301-AVVGKAPGQRIPTVDEAEFAVRAVLAQQVSTKAASTHAGRLVAAYGRP-350

      # # # # # # # # # # # # # # # # #
A(E. coli) 147-DDFPEYICFPTPQRLAAADPQALKALGMPLKRAEALIHLANAALEGTLP-196
A(M. tb) 351-HDRHGALHTTFPSIEQLAEIDP-GHLAVPKARQRTINALVASLADKSLVL-399

      # # # # ## # ### # ## # # # # # #
A(E. coli) 197 TIPGDVEQAMKTLQTFPGIGRWTANYFALRGWQAKDVFLPDDYLIKQRF-246
A(M. tb) 400-DAGCDWQARGQLLALPGVGPWTAEVIAMRGLGDFDAFPASDLGLRLAAK-449

      ## # # ##### # # # # # # #
A(E. coli) 247-GMTPAQIRR----YAERWKPWRSYALLHIWYTEGWQPDEA-282
A(M. tb) 450-KLGLPAQRRALTVHSARWRPWSYATQHLWTTLEHPVNQWPPQEKIA-496

```

Figure 20 : Alignement des séquences protéiques d'Ada (A) et d'AlkA (B) d'*E. coli* avec celle d'AlkA de *M. tuberculosis*

Les séquences des génomes de *M. tuberculosis* H37Rv et d'*E. coli* : respectivement Tuberculist et Colibri, disponibles sur Internet (<http://genolist.pasteur.fr/>) ont été comparées en utilisant Water, programme d'alignement global Needleman-Wunsch (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/needle>). Les acides aminés identiques sont repérés par le signe #.

(A) les acides aminés essentiels du site actif chez *E. coli* sont encadrés, la cystéine 69 fixant les méthyles est surlignée en gris.

(B) les acides aminés impliqués dans une structure hélice-tour-hélice conservée dans d'autres ADN glycosylases et d'autres protéines liant l'ADN sont encadrés, l'acide aspartique conservé et requis pour l'activité ADN glycosylase est surligné en gris.

La variation 79 se situe dans la région homologue à Ada, en aval du site actif N-terminal. Chez *E. coli*, Ada possède à la fois une activité de réparation de l'ADN (alkyl transférase) et une activité de régulation de la réponse adaptative en tant qu'activateur de transcription d'*alkA*, *alkB*, *aidB* et *ada* lui-même (84, 86). En effet, Ada possède deux sites actifs contenant chacun une cystéine capable de fixer un groupement méthyle présent sur un ADN altéré : la cystéine en position 69 réagit avec les groupements méthyles fixés sur le squelette phospho-carboné de l'ADN et la cystéine 321 avec les méthyles fixés aux guanines (méthyl-guanine, MeG). Ces deux

réactions de transfert sont irréversibles, il s'agit donc d'une activation dite suicide pour la protéine Ada. Une fois activée par la fixation de ces deux méthyls d'origines différentes, Ada est clivée en deux parties, la partie N-terminale contenant la cystéine 69 peut alors se fixer aux régions promotrices des gènes *ada*, *aidB*, *alkA* et *alkB* pour en activer la transcription. Cette voie de régulation est résumée Figure 21. Certains mutants produisant une forme tronquée N-terminale d'Ada présentent une activation constitutive de la réponse adaptative (86). La variation 79 pourrait avoir pour conséquence une activation constitutive de la réponse adaptative chez *M. tuberculosis* et constituer la marque d'une mutation compensatrice d'un phénotype mutateur transitoire. Dans ce cas, cette mutation n'a pas les mêmes conséquences qu'une délétion du gène *alkA* ou qu'une double délétion *alkA-ogt* (38). Ainsi, même en présence d'agent alkylant, les souches mutées en 79 ne présenteraient pas de taux de mutation plus élevé que des souches ne possédant pas la mutation. L'étude de mutants uniquement délétés *alkA* et de mutants de substitution 79 dans un contexte isogénique sera utile pour valider ces hypothèses. La reconstitution de ces mutants par double échange allélique à l'aide d'un vecteur suicide pJQ200 (124) est en cours dans la souche de laboratoire H37Rv.

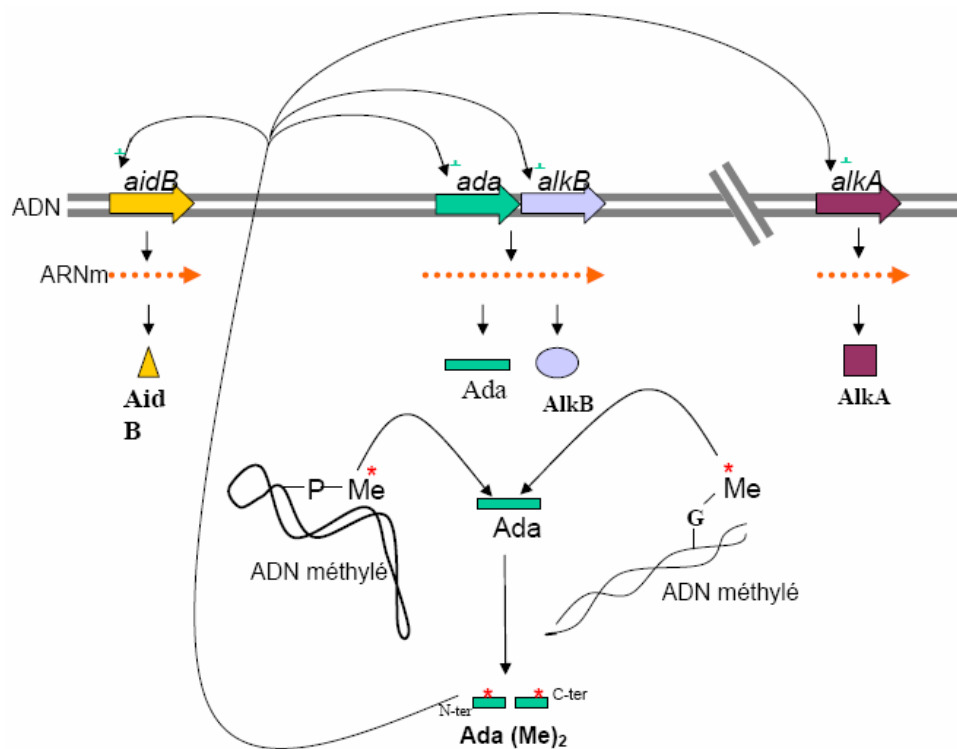


Figure 21 : Schéma de la régulation de la réponse adaptative par Ada chez *Escherichia coli* (d'après Landini et Volkert (86))

CONCLUSIONS

La diversité génétique de souches de *M. tuberculosis* isolées en République Centrafricaine a été étudiée dans le but d'identifier des marqueurs génétiques de souches multirésistantes aux antibiotiques pour un dépistage précoce utile à la mise en place rapide d'un traitement adapté. Deux types de marqueurs ont été analysés : la structure de la région DR (spoligotypage) et la présence de polymorphisme dans des gènes anti-mutateurs potentiels. Cette étude donne ainsi un état des lieux des souches circulant en République Centrafricaine. Les profils de spoligotype pourront servir lors d'études ultérieures et compléteront les données sur cette région dans les banques de génotypage. L'analyse de la séquence de six gènes putatifs de réparation de l'ADN a mis en évidence un polymorphisme pour quatre d'entre eux : *mutT1*, *alkA* et *mutT3* et *ogt*.

Une variation non-sens a été observée au codon 79 du locus *alkA* chez 8 souches. C'est la première fois qu'un tel polymorphisme est retrouvé dans un gène de réparation de l'ADN de *M. tuberculosis*. Cette variation est aussi observée chez *M. bovis* AF2122, elle pourrait donc constituer la première observation d'un possible transfert génétique horizontal dans le complexe *M. tuberculosis*, événement qui n'a encore jamais été décrit à ce jour. Les expériences de détermination de la fréquence de mutation n'ont pas donné de résultat probant du fait de la difficulté de sa réalisation sur des isolats cliniques dont la culture est parfois difficile. Des études plus approfondies sur les aspects fonctionnels de ce gène permettront peut-être de comprendre l'implication de cette variation dans la biologie des mycobactéries. Ainsi, le présent travail pose les préliminaires d'une étude de biologie fonctionnelle de l'alkyltransférase putative AlkA chez *M. tuberculosis* en démontrant l'existence de deux formes alléliques sans préjuger de leur efficacité fonctionnelle. Ces études contribueront à l'évolution des connaissances de la réponse adaptative chez les mycobactéries.

La combinaison du spoligotypage et de la variation synonyme Valine-265 au locus *mutT1* a permis de repérer une éventuelle épidémie à bacille multirésistant. La

recherche de cette variation chez les souches non MDR est en cours afin de préciser la pertinence de ce marqueur. En l'absence de données d'épidémiologie traditionnelle, il ne peut y avoir de certitude. Cependant, ces observations démontrent l'aide non négligeable que peut apporter l'épidémiologie moléculaire en matière de dépistage des épidémies et de suivi de la transmission des souches de tuberculose. Pour ces raisons, l'usage des techniques de typage moléculaire s'est aujourd'hui étendu à des laboratoires du monde entier. D'ailleurs, ce travail sur les souches de République Centrafricaine a été l'occasion du transfert de la technique de spoligotypage qui pourra désormais être réalisée sur place à l'Institut Pasteur de Bangui.

Dans leur ensemble, les travaux de génétique et de génomique sur *M. tuberculosis* et d'autres mycobactéries ont permis de recueillir une multitude d'informations sur l'organisation génétique des mycobactéries. Les mycobactéries font partie des bactéries les mieux caractérisées sur le plan génétique. A ce jour, nous disposons de la séquence complète de *M. tuberculosis* H37Rv (23), *M. leprae* (24), *M. tuberculosis* CDC 1551 (52), *M. paratuberculosis* K10 (91), *M. bovis* AF2122 (57) et celles des génomes de *M. tuberculosis* Beijing 210, *M. smegmatis*, *M. avium* 104, *M. marinum*, *M. microti*, *M. bovis* BCG et *M. ulcerans* sont sur le point d'aboutir.

Grâce à la génomique mais aussi au développement d'outils de biologie moléculaire (117, 118, 124), ces dernières années ont été marquées par la découverte et la compréhension d'éléments clefs des mécanismes moléculaires impliqués dans le pouvoir pathogène, la virulence, la protection par le BCG, la résistance aux antibiotiques... De nouvelles molécules antituberculeuses et de nouveaux vaccins sont en phase d'essai.

Les maladies transmissibles sont la résultante d'un rééquilibrage évolutif permanent imposant une vision dynamique des maladies infectieuses. La prise en compte des systèmes hôtes-parasites est indispensable dans une perspective de médecine durable. Malgré les innombrables avancées dans la connaissance de *M. tuberculosis*, l'agent étiologique de la tuberculose humaine, découvert par Robert Koch en 1881, la tuberculose reste un fléau mondial de première importance. Si des perspectives d'espérance se sont ouvertes dans la lutte contre les maladies infectieuses, la recherche se doit de rester à l'ouvrage.

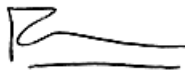
AGREMENT ADMINISTRATIF

Je soussigné, A. MILON, Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que
M. NOUVEL Laurent-Xavier, Marc
a été admis(e) sur concours en : 1998
a obtenu son certificat de fin de scolarité le : 8 juillet 2002
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

Je soussigné, F. SCHELCHER, Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,
autorise la soutenance de la thèse de :
M. NOUVEL Laurent-Xavier, Marc
intitulée :
« Recherche de marqueurs génétiques de souches de *Mycobacterium tuberculosis* multirésistantes aux
antibiotiques en République Centrafricaine »

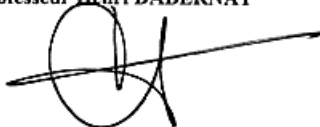
**Le Professeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Professeur François SCHELCHER**



**Vu :
Le Directeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Professeur Alain MILON**



**Vu :
Le Président de la thèse :
Professeur Henri DABERNAT**



**Vu le : 09 NOV. 2005
Le Président
de l'Université Paul Sabatier
Professeur Jean-François SAUTEREAU**



RÉFÉRENCES

1. **Ahmed, N., M. Alam, A. Abdul Majeed, S. Asad Rahman, A. Cataldi, D. Cousins, and S. E. Hasnain.** 2003. Genome sequence based, comparative analysis of the fluorescent amplified fragment length polymorphisms (FAFLP) of tubercle bacilli from seals provides molecular evidence for a new species within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Infect Genet Evol* **2**:193-9.
2. **Alcaide, F., G. E. Pfyffer, and A. Telenti.** 1997. Role of embB in natural and acquired resistance to ethambutol in mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* **41**:2270-3.
3. **Allix, C., P. Supply, and M. Fauville-Dufaux.** 2004. Utility of fast mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number tandem repeat genotyping in clinical mycobacteriological analysis. *Clin Infect Dis* **39**:783-9.
4. **Aranaz, A., E. Liebana, A. Mateos, L. Dominguez, D. Vidal, M. Domingo, O. Gonzolez, E. F. Rodriguez-Ferri, A. E. Bunschoten, J. D. Van Embden, and D. Cousins.** 1996. Spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals: a tool for studying epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol* **34**:2734-40.
5. **Behr, M. A., and P. M. Small.** 1999. A historical and molecular phylogeny of BCG strains. *Vaccine* **17**:915-22.
6. **Bifani, P. J., B. Mathema, N. E. Kurepina, and B. N. Kreiswirth.** 2002. Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains. *Trends Microbiol* **10**:45-52.
7. **Bifani, P. J., B. B. Plikaytis, V. Kapur, K. Stockbauer, X. Pan, M. L. Lutfey, S. L. Moghazeh, W. Eisner, T. M. Daniel, M. H. Kaplan, J. T. Crawford, J. M. Musser, and B. N. Kreiswirth.** 1996. Origin and interstate spread of a New York City multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clone family. *J Am Med Assoc* **275**:452-7.
8. **Bishop, P. J., and G. Neumann.** 1970. The history of the Ziehl-Neelsen stain. *Tubercle* **51**:196-206.
9. **Blazquez, J., L. E. Espinosa de Los Monteros, S. Samper, C. Martin, A. Guerrero, J. Cobo, J. Van Embden, F. Baquero, and E. Gomez-Mampaso.** 1997. Genetic characterization of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* strains from a hospital outbreak involving human immunodeficiency virus-positive patients. *J Clin Microbiol* **35**:1390-3.
10. **Bloom, B. R., and P. E. M. Fine.** 1994. The BCG experience: implications for future vaccines against tuberculosis, p. 531-557. *In* B. R. Bloom (ed.), *Tuberculosis: pathogenesis, protection and control*. American Society for Microbiology Press, Washington.
11. **Brewer, T. F., and G. A. Colditz.** 1995. Relationship between bacille Calmette-Guerin (BCG) strains and the efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. *Clin Infect Dis* **20**:126-35.
12. **Brewer, T. F., S. J. Heymann, S. M. Krumplitsch, M. E. Wilson, G. A. Colditz, and H. V. Fineberg.** 2001. Strategies to decrease tuberculosis in us homeless populations: a computer simulation model. *J Am Med Assoc* **286**:834-42.

13. **Brosch, R., S. V. Gordon, A. Pym, K. Eiglmeier, T. Garnier, and S. T. Cole.** 2000. Comparative genomics of the mycobacteria. *Int J Med Microbiol* **290**:143-52.
14. **Brosch, R., A. S. Pym, S. V. Gordon, and S. T. Cole.** 2001. The evolution of mycobacterial pathogenicity: clues from comparative genomics. *Trends Microbiol* **9**:452-8.
15. **Butler, W. R., and J. O. Kilburn.** 1983. Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide and its relationship to pyrazinamidase activity. *Antimicrob Agents Chemother* **24**:600-1.
16. **Caceres, N. E., N. B. Harris, J. F. Wellehan, Z. Feng, V. Kapur, and R. G. Barletta.** 1997. Overexpression of the D-alanine racemase gene confers resistance to D-cycloserine in *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol* **179**:5046-55.
17. **Calmette, A.** 1927. *La vaccination Préventive contre la Tuberculose*. Masson et Cie, Paris. p.
18. **Canetti, G.** 1965. Present aspects of bacterial resistance in tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* **92**:687-703.
19. **Chacon, O., Z. Feng, N. B. Harris, N. E. Caceres, L. G. Adams, and R. G. Barletta.** 2002. *Mycobacterium smegmatis* D-Alanine Racemase Mutants Are Not Dependent on D-Alanine for Growth. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:47-54.
20. **Clark-Curtiss, J. E.** 1990. Genome structure of mycobacteria, p. 77-98. In J. McFadden (ed.), *In Molecular Biology of Mycobacteria*. Surrey University Press, Surrey.
21. **Cohn, M. L., G. Middlebrook, and W. F. Russell, Jr.** 1959. Combined drug treatment of tuberculosis. I. Prevention of emergence of mutant populations of tubercle bacilli resistant to both streptomycin and isoniazid in vitro. *J Clin Invest* **38**:1349-55.
22. **Colditz, G. A., T. F. Brewer, C. S. Berkey, M. E. Wilson, E. Burdick, H. V. Fineberg, and F. Mosteller.** 1994. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature. *J Am Med Assoc* **271**:698-702.
23. **Cole, S. T., R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S. V. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, C. E. Barry, 3rd, F. Tekaia, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, S. Gentles, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, B. G. Barrell, and et al.** 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**:537-44.
24. **Cole, S. T., K. Eiglmeier, J. Parkhill, K. D. James, N. R. Thomson, P. R. Wheeler, N. Honore, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, K. Mungall, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. M. Davies, K. Devlin, S. Duthoy, T. Feltwell, A. Fraser, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, C. Lacroix, J. Maclean, S. Moule, L. Murphy, K. Oliver, M. A. Quail, M. A. Rajandream, K. M. Rutherford, S. Rutter, K. Seeger, S. Simon, M. Simmonds, J. Skelton, R. Squares, S. Squares, K. Stevens, K. Taylor, S. Whitehead, J. R. Woodward, and B. G. Barrell.** 2001. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature* **409**:1007-11.
25. **Collins, D. M., and D. M. Stephens.** 1991. Identification of an insertion sequence, IS1081, in *Mycobacterium bovis*. *FEMS Microbiol Lett* **67**:11-5.
26. **Cooksey, R. C., G. P. Morlock, A. McQueen, S. E. Glickman, and J. T. Crawford.** 1996. Characterization of streptomycin resistance mechanisms among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients in New York City. *Antimicrob Agents Chemother* **40**:1186-8.
27. **Corbett, E. L., C. J. Watt, N. Walker, D. Maher, B. G. Williams, M. C. Raviglione, and C. Dye.** 2003. The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. *Arch Intern Med* **163**:1009-21.
28. **Crofton, J., and D. A. Mitchison.** 1948. Streptomycin resistance in pulmonary tuberculosis. *Br Med J*:1009-1015.
29. **Dale, J. W., D. Brittain, A. A. Cataldi, D. Cousins, J. T. Crawford, J. Driscoll, H. Heersma, T. Lillebaek, T. Quitugua, N. Rastogi, R. A. Skuce, C. Sola, D. Van Soolingen, and V. Vincent.** 2001. Spacer oligonucleotide typing of bacteria of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: recommendations for standardised nomenclature. *Int J Tuberc Lung Dis* **5**:216-9.
30. **Daniel, A. K., R. E. Lee, F. Portaels, and P. L. Small.** 2004. Analysis of *Mycobacterium species* for the presence of a macrolide toxin, mycolactone. *Infect Immun* **72**:123-32.

31. **David, H., V. Levy-Frebault, and M. F. Thorel.** 1989. *Méthodes de laboratoire pour mycobactériologie clinique*. Institut Pasteur, Paris. p.
32. **David, H. L.** 1971. Resistance to D-cycloserine in the tubercle bacilli: mutation rate and transport of alanine in parental cells and drug-resistant mutants. *Appl Microbiol* **21**:888-92.
33. **David, H. L., K. Takayama, and D. S. Goldman.** 1969. Susceptibility of mycobacterial D-alanyl-D-alanine synthetase to D-cycloserine. *Am Rev Respir Dis* **100**:579-81.
34. **Del Portillo, P., L. A. Murillo, and M. E. Patarroyo.** 1991. Amplification of a species-specific DNA fragment of *Mycobacterium tuberculosis* and its possible use in diagnosis. *J Clin Microbiol* **29**:2163-8.
35. **Denamur, E., S. Bonacorsi, A. Giraud, P. Duriez, F. Hilali, C. Amorin, E. Bingen, A. Andremont, B. Picard, F. Taddei, and I. Matic.** 2002. High frequency of mutator strains among human uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *J Bacteriol* **184**:605-9.
36. **Denamur, E., G. Lecointre, P. Darlu, O. Tenailon, C. Acquaviva, C. Sayada, I. Sunjevaric, R. Rothstein, J. Elion, F. Taddei, M. Radman, and I. Matic.** 2000. Evolutionary implications of the frequent horizontal transfer of mismatch repair genes. *Cell* **103**:711-21.
37. **Deretic, V., W. Philipp, S. Dhandayuthapani, M. H. Mudd, R. Curcic, T. Garbe, B. Heym, L. E. Via, and S. T. Cole.** 1995. *Mycobacterium tuberculosis* is a natural mutant with an inactivated oxidative-stress regulatory gene: implications for sensitivity to isoniazid. *Mol Microbiol* **17**:889-900.
38. **Durbach, S. I., B. Springer, E. E. Machowski, R. J. North, K. G. Papavinasundaram, M. J. Colston, E. C. Bottger, and V. Mizrahi.** 2003. DNA Alkylation Damage as a Sensor of Nitrosative Stress in *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* **71**:997-1000.
39. **Dye, C., S. Scheele, P. Dolin, V. Pathania, and M. C. Raviglione.** 1999. Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. *J Am Med Assoc* **282**:677-86.
40. **Escuyer, V. E., M. A. Lety, J. B. Torrelles, K. H. Khoo, J. B. Tang, C. D. Rithner, C. Frehel, M. R. McNeil, P. J. Brennan, and D. Chatterjee.** 2001. The role of the embA and embB gene products in the biosynthesis of the terminal hexaarabinofuranosyl motif of *Mycobacterium smegmatis* arabinogalactan. *J Biol Chem* **276**:48854-62.
41. **Espinal, M. A., K. Laserson, M. Camacho, Z. Fusheng, S. J. Kim, R. E. Tlali, I. Smith, P. Suarez, M. L. Antunes, A. G. George, N. Martin-Casabona, P. Simelane, K. Weyer, N. Binkin, and M. C. Raviglione.** 2001. Determinants of drug-resistant tuberculosis: analysis of 11 countries. *Int J Tuberc Lung Dis* **5**:887-93.
42. **Espinal, M. A., A. Laszlo, L. Simonsen, F. Boulahbal, S. J. Kim, A. Reniero, S. Hoffner, H. L. Rieder, N. Binkin, C. Dye, R. Williams, and M. C. Raviglione.** 2001. Global trends in resistance to antituberculosis drugs. World Health Organization-International Union against Tuberculosis and Lung Disease Working Group on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance. *N Engl J Med* **344**:1294-303.
43. **Espinal, M. A., L. Simonsen, A. Laszlo, F. Boulahbal, S. J. Kim, A. Reniero, S. Hoffner, H. L. Rieder, N. Binkin, C. Dye, R. Williams, and M. C. Raviglione.** 2000. *Anti-tuberculosis drug resistance in the world*. World Health Organisation, Geneva. 253 p.
44. **Euzeby, J. P.** 2004, posting date. Dictionnaire de bactériologie vétérinaire - Étymologie des noms des taxons. [Online.], <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/etymologies.html>
45. **Euzeby, J. P.** 2004, posting date. Dictionnaire de bactériologie vétérinaire - *Mycobacterium pinnipedii*. [Online.], <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/mm/pinnipedii.html>
46. **Euzeby, J. P.** 2004, posting date. List of bacterial names withstanding in nomenclature - Genus *Mycobacterium*. [Online.], <http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.html>
47. **Farmer, P., J. Bayona, M. Becerra, J. Furin, C. Henry, H. Hiatt, J. Y. Kim, C. Mitnick, E. Nardell, and S. Shin.** 1998. The dilemma of MDR-TB in the global era. *Int J Tuberc Lung Dis* **2**:869-76.
48. **Feng, Z., and R. G. Barletta.** 2003. Roles of *Mycobacterium smegmatis* D-alanine:D-alanine ligase and D-alanine racemase in the mechanisms of action of and resistance to the peptidoglycan inhibitor D-cycloserine. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:283-91.

49. Filliol, I., J. R. Driscoll, D. Van Soolingen, B. N. Kreiswirth, K. Kremer, G. Valetudie, D. D. Anh, R. Barlow, D. Banerjee, P. J. Bifani, K. Brudey, A. Cataldi, R. C. Cooksey, D. V. Cousins, J. W. Dale, O. A. Dellagostin, F. Drobniowski, G. Engelmann, S. Ferdinand, D. Gascoyne-Binzi, M. Gordon, M. C. Gutierrez, W. H. Haas, H. Heersma, G. Kallenius, E. Kassa-Kelembho, T. Koivula, H. M. Ly, A. Makristathis, C. Mammina, G. Martin, P. Mostrom, I. Mokrousov, V. Narbonne, O. Narvskaya, A. Nastasi, S. N. Niobe-Eyangoh, J. W. Pape, V. Rasolof-Razanamparany, M. Ridell, M. L. Rossetti, F. Stauffer, P. N. Suffys, H. Takiff, J. Texier-Maugein, V. Vincent, J. H. De Waard, C. Sola, and N. Rastogi. 2002. Global Distribution of *Mycobacterium tuberculosis* Spoligotypes. *Emerg Infect Dis* 8:1347-9.
50. Filliol, I., J. R. Driscoll, D. van Soolingen, B. N. Kreiswirth, K. Kremer, G. Valetudie, D. A. Dang, R. Barlow, D. Banerjee, P. J. Bifani, K. Brudey, A. Cataldi, R. C. Cooksey, D. V. Cousins, J. W. Dale, O. A. Dellagostin, F. Drobniowski, G. Engelmann, S. Ferdinand, D. Gascoyne-Binzi, M. Gordon, M. C. Gutierrez, W. H. Haas, H. Heersma, E. Kassa-Kelembho, M. L. Ho, A. Makristathis, C. Mammina, G. Martin, P. Mostrom, I. Mokrousov, V. Narbonne, O. Narvskaya, A. Nastasi, S. N. Niobe-Eyangoh, J. W. Pape, V. Rasolof-Razanamparany, M. Ridell, M. L. Rossetti, F. Stauffer, P. N. Suffys, H. Takiff, J. Texier-Maugein, V. Vincent, J. H. de Waard, C. Sola, and N. Rastogi. 2003. Snapshot of moving and expanding clones of *Mycobacterium tuberculosis* and their global distribution assessed by spoligotyping in an international study. *J Clin Microbiol* 41:1963-70.
51. Finken, M., P. Kirschner, A. Meier, A. Wrede, and E. C. Bottger. 1993. Molecular basis of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: alterations of the ribosomal protein S12 gene and point mutations within a functional 16S ribosomal RNA pseudoknot. *Mol Microbiol* 9:1239-46.
52. Fleischmann, R. D., D. Alland, J. A. Eisen, L. Carpenter, O. White, J. Peterson, R. DeBoy, R. Dodson, M. Gwinn, D. Haft, E. Hickey, J. F. Kolonay, W. C. Nelson, L. A. Umayam, M. Ermolaeva, S. L. Salzberg, A. Delcher, T. Utterback, J. Weidman, H. Khouri, J. Gill, A. Mikula, W. Bishai, W. R. Jacobs Jr, Jr., J. C. Venter, and C. M. Fraser. 2002. Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. *J Bacteriol* 184:5479-90.
53. Fletcher, H. A., H. D. Donoghue, G. M. Taylor, A. G. van der Zanden, and M. Spigelman. 2003. Molecular analysis of *Mycobacterium tuberculosis* DNA from a family of 18th century Hungarians. *Microbiology* 149:143-51.
54. Friedman, C. R., M. Y. Stoeckle, W. D. Johnson, Jr., and L. W. Riley. 1995. Double-repetitive-element PCR method for subtyping *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 33:1383-4.
55. Frothingham, R., H. G. Hills, and K. H. Wilson. 1994. Extensive DNA sequence conservation throughout the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol* 32:1639-43.
56. Frothingham, R., and W. A. Meeker-O'Connell. 1998. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology* 144 (Pt 5):1189-96.
57. Garnier, T., K. Eiglmeier, J. C. Camus, N. Medina, H. Mansoor, M. Pryor, S. Duthoy, S. Grondin, C. Lacroix, C. Monsempe, S. Simon, B. Harris, R. Atkin, J. Doggett, R. Mayes, L. Keating, P. R. Wheeler, J. Parkhill, B. G. Barrell, S. T. Cole, S. V. Gordon, and R. G. Hewinson. 2003. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:7877-82.
58. Garrity, G. M., J. A. Bell, and T. G. Lilburn. 2004. Taxonomic Outline of the Procaryotes, p. 41, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Second Edition ed. Springer-Verlag, New York.
59. George, K. M., D. Chatterjee, G. Gunawardana, D. Welty, J. Hayman, R. Lee, and P. L. Small. 1999. Mycolactone: a polyketide toxin from *Mycobacterium ulcerans* required for virulence. *Science* 283:854-7.
60. Gicquel, B. 1999. Recherche de nouveaux vaccins contre la tuberculose. *Bull Acad Natl Med* 183:53-62.

61. **Giraud, A., I. Matic, M. Radman, M. Fons, and F. Taddei.** 2002. Mutator bacteria as a risk factor in treatment of infectious diseases. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:863-5.
62. **Glynn, J. R., J. Whiteley, P. J. Bifani, K. Kremer, and D. van Soolingen.** 2002. Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. *Emerg Infect Dis* **8**:843-9.
63. **Goodfellow, M., and J. Magee.** 1998. Taxonomy of Mycobacteria, p. 1-71. In P. A. Jenkins and P. R. J. Gangadharam (ed.), *Mycobacteria. Basic Aspects*. Chapman and Hall, London.
64. **Gordon, S. V., B. Heym, J. Parkhill, B. Barrell, and S. T. Cole.** 1999. New insertion sequences and a novel repeated sequence in the genome of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology* **145 (Pt 4)**:881-92.
65. **Goulding, J. N., J. Stanley, N. Saunders, and C. Arnold.** 2000. Genome-sequence-based fluorescent amplified-fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* **38**:1121-6.
66. **Grange, J. M.** 1990. Drug resistance and tuberculosis elimination. *Bull Int Union Tuberc Lung Dis* **65**:57-9.
67. **Greenwood, M.** 1928. Professor Calmette's statistical study of BCG. *Br Med Bull*:793-795.
68. **Groenen, P. M., A. E. Bunschoten, D. van Soolingen, and J. D. van Embden.** 1993. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method. *Mol Microbiol* **10**:1057-65.
69. **Grosset, J., H. Boisvert, and C. Truffot-Pernot.** 1990. Mycobactéries, p. 965-1011. In L. Le Minor and M. Véron (ed.), *Bactériologie Médicale*, Médecine-Sciences ed. Flammarion, Paris.
70. **Haas, W. H., W. R. Butler, C. L. Woodley, and J. T. Crawford.** 1993. Mixed-linker polymerase chain reaction: a new method for rapid fingerprinting of isolates of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol* **31**:1293-8.
71. **Hermans, P. W., M. Sluijter, T. Hoogenboezem, H. Heersma, A. van Belkum, and R. de Groot.** 1995. Comparative study of five different DNA fingerprint techniques for molecular typing of *Streptococcus pneumoniae* strains. *J Clin Microbiol* **33**:1606-12.
72. **Hermans, P. W., D. van Soolingen, E. M. Bik, P. E. de Haas, J. W. Dale, and J. D. van Embden.** 1991. Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Infect Immun* **59**:2695-705.
73. **Hopewell, P. C., and B. R. Bloom.** 2000. Tuberculosis and other mycobacterial diseases, p. 1043-1105. In P. J. Murray (ed.), *Textbook of Respiratory Medicine*. Saunders, Philadelphia.
74. **Horsburgh, C. R., Jr.** 2000. The global problem of multidrug-resistant tuberculosis: the genie is out of the bottle. *J Am Med Assoc* **283**:2575-6.
75. **Horst, J. P., T. H. Wu, and M. G. Marinus.** 1999. *Escherichia coli* mutator genes. *Trends Microbiol* **7**:29-36.
76. **Howard, W. L., F. Maresh, E. E. Mueller, S. A. Yanitelli, and G. F. Woodruff.** 1949. The role of pulmonary cavitation in the development of bacterial resistance to streptomycin. *Am Rev Tuberc*:391.
77. **Howlett, H. S., J. B. O'Connor, J. F. Sadusk, J. E. Swift, and F. A. Beardsley.** 1949. Sensitivity of tubercle bacilli to streptomycin: the influence of various factors upon the emergence of resistant strains. *Am Rev Tuberc*:402.
78. **Iseman, M. D., and L. A. Madsen.** 1989. Drug-resistant tuberculosis. *Clin Chest Med* **10**:341-53.
79. **Jin, D. J., and C. A. Gross.** 1988. Mapping and sequencing of mutations in the *Escherichia coli* *rpoB* gene that lead to rifampicin resistance. *J Mol Biol* **202**:45-58.
80. **Jouanguy, E., S. Dupuis, A. Pallier, R. Doffinger, M. C. Fondaneche, C. Fieschi, S. Lamhamedi-Cherradi, F. Altare, J. F. Emile, P. Lutz, P. Bordigoni, H. Cokugras, N. Akcakaya, J. Landman-Parker, J. Donnadieu, Y. Camcioglu, and J. L. Casanova.** 2000. In a novel form of IFN-gamma receptor 1 deficiency, cell surface receptors fail to bind IFN-gamma. *J Clin Invest* **105**:1429-36.

81. **Kamerbeek, J., L. Schouls, A. Kolk, M. van Agterveld, D. van Soolingen, S. Kuijper, A. Bunschoten, H. Molhuizen, R. Shaw, M. Goyal, and J. van Embden.** 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* **35**:907-14.
82. **Kremer, K., D. van Soolingen, R. Frothingham, W. H. Haas, P. W. Hermans, C. Martin, P. Palittapongarnpim, B. B. Plikaytis, L. W. Riley, M. A. Yakrus, J. M. Musser, and J. D. van Embden.** 1999. 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**:2607-18.
83. **Kremer, L., L. G. Dover, H. R. Morbidoni, C. Vilcheze, W. N. Maughan, A. Baulard, S. C. Tu, N. Honore, V. Deretic, J. C. Sacchettini, C. Locht, W. R. Jacobs, Jr., and G. S. Besra.** 2003. Inhibition of InhA activity, but not KasA activity, induces formation of a KasA-containing complex in mycobacteria. *J Biol Chem* **278**:20547-54.
84. **Labahn, J., O. D. Scharer, A. Long, K. Ezaz-Nikpay, G. L. Verdine, and T. E. Ellenberger.** 1996. Structural basis for the excision repair of alkylation-damaged DNA. *Cell* **86**:321-9.
85. **Lagranderie, M. R., A. M. Balazuc, E. Deriaud, C. D. Leclerc, and M. Gheorghiu.** 1996. Comparison of immune responses of mice immunized with five different *Mycobacterium bovis* BCG vaccine strains. *Infect Immun* **64**:1-9.
86. **Landini, P., and M. R. Volkert.** 2000. Regulatory responses of the adaptive response to alkylation damage: a simple regulon with complex regulatory features. *J Bacteriol* **182**:6543-9.
87. **Lechevalier, M. P., and H. A. Lechavlier.** 1970. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int J Syst Bacteriol*:435-443.
88. **Lee, A. S., A. S. Teo, and S. Y. Wong.** 2001. Novel mutations in *ndh* in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:2157-9.
89. **Levin, M. E., and G. F. Hatfull.** 1993. *Mycobacterium smegmatis* RNA polymerase: DNA supercoiling, action of rifampicin and mechanism of rifampicin resistance. *Mol Microbiol* **8**:277-85.
90. **Li, H., J. C. Ulstrup, T. O. Jonassen, K. Melby, S. Nagai, and M. Harboe.** 1993. Evidence for absence of the MPB64 gene in some substrains of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun* **61**:1730-4.
91. **Li, L. L., Q. Zhang, J. Bannantine, D. Alt, and V. Kapur.** 2002. The genome sequence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Presented at the 10th plant, animal and microbe genomes conference, San Diego, CA., January 12-16 2002.
92. **Mahairas, G. G., P. J. Sabo, M. J. Hickey, D. C. Singh, and C. K. Stover.** 1996. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J Bacteriol* **178**:1274-82.
93. **Mazars, E., S. Lesjean, A. L. Banuls, M. Gilbert, V. Vincent, B. Gicquel, M. Tibayrenc, C. Locht, and P. Supply.** 2001. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:1901-6.
94. **McClatchy, J. K., A. Y. Tsang, and M. S. Cernich.** 1981. Use of pyrazinamidase activity on *Mycobacterium tuberculosis* as a rapid method for determination of pyrazinamide susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* **20**:556-7.
95. **McClure, W. R., and C. L. Cech.** 1978. On the mechanism of rifampicin inhibition of RNA synthesis. *J Biol Chem* **253**:8949-56.
96. **Mdluli, K., R. A. Slayden, Y. Zhu, S. Ramaswamy, X. Pan, D. Mead, D. D. Crane, J. M. Musser, and C. E. Barry, 3rd.** 1998. Inhibition of a *Mycobacterium tuberculosis* beta-ketoacyl ACP synthase by isoniazid. *Science* **280**:1607-10.
97. **Meier, A., P. Sander, K. J. Schaper, M. Scholz, and E. C. Bottger.** 1996. Correlation of molecular resistance mechanisms and phenotypic resistance levels in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* **40**:2452-4.

98. **Miesel, L., T. R. Weisbrod, J. A. Marcinkeviciene, R. Bittman, and W. R. Jacobs, Jr.** 1998. NADH dehydrogenase defects confer isoniazid resistance and conditional lethality in *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol* **180**:2459-67.
99. **Minnikin, D. E.** 1982. Lipids: complex lipids, their chemistry, biosynthesis and roles, p. 95-184. In C. Ratledge and J. L. Stanford (ed.), *The Biology of the Mycobacteria*, vol. 1. Academic Press, London.
100. **Mitchison, D. A.** 1950. Development of streptomycin resistant strains of tubercle bacilli in pulmonary tuberculosis; results of simultaneous sensitivity tests in liquid and on solid media. *Thorax* **5**:144-61.
101. **Mizrahi, V., and S. J. Andersen.** 1998. DNA repair in *Mycobacterium tuberculosis*. What have we learnt from the genome sequence? *Mol Microbiol* **29**:1331-9.
102. **Moxon, E. R., R. E. Lenski, and P. B. Rainey.** 1998. Adaptive evolution of highly mutable loci in pathogenic bacteria. *Perspect Biol Med* **42**:154-5.
103. **Murray, C. J., and J. A. Salomon.** 1998. Modeling the impact of global tuberculosis control strategies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:13881-6.
104. **Newport, M. J., C. M. Huxley, S. Huston, C. M. Hawrylowicz, B. A. Oostra, R. Williamson, and M. Levin.** 1996. A mutation in the interferon-gamma-receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. *N Engl J Med* **335**:1941-9.
105. **Nicolle, C.** 1933. *Destin des maladies infectieuses*, France Lafayette ed. Association des anciens élèves de l'Institut Pasteur, Paris (1993). 216 p.
106. **Noll, H., H. Bloch, J. Asselineau, and E. Lederer.** 1956. The chemical structure of the cord factor of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochim Biophys Acta* **20**:299-309.
107. **North, R. J., R. LaCourse, and L. Ryan.** 1999. Vaccinated mice remain more susceptible to *Mycobacterium tuberculosis* infection initiated via the respiratory route than via the intravenous route. *Infect Immun* **67**:2010-2.
108. **Oettinger, T., M. Jorgensen, A. Ladefoged, K. Haslov, and P. Andersen.** 1999. Development of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: review of the historical and biochemical evidence for a genealogical tree. *Tuber Lung Dis* **79**:243-50.
109. **Oliver, A., R. Canton, P. Campo, F. Baquero, and J. Blazquez.** 2000. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* **288**:1251-4.
110. **Organization, W. H.** 1996. Treatment of tuberculosis: Guidelines for National Programmes WHO/TB/96.199.
111. **Otal, I., S. Samper, M. P. Asensio, M. A. Vitoria, M. C. Rubio, R. Gomez-Lus, and C. Martin.** 1997. Use of a PCR method based on IS6110 polymorphism for typing *Mycobacterium tuberculosis* strains from BACTEC cultures. *J Clin Microbiol* **35**:273-7.
112. **Pablos-Mendez, A., M. C. Raviglione, A. Laszlo, N. Binkin, H. L. Rieder, F. Bustreo, D. L. Cohn, C. S. Lambregts-van Weezenbeek, S. J. Kim, P. Chaulet, and P. Nunn.** 1998. Global surveillance for antituberculosis-drug resistance, 1994-1997. World Health Organization-International Union against Tuberculosis and Lung Disease Working Group on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance. *N Engl J Med* **338**:1641-9.
113. **Palittapongarnpim, P., S. Chomyc, A. Fanning, and D. Kunitomo.** 1993. DNA fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *J Infect Dis* **167**:975-8.
114. **Palmer, C. E., and M. W. Long.** 1966. Effects of infection with atypical mycobacteria on BCG vaccination and tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* **94**:553-68.
115. **Pasca, M. R., P. Gugliera, F. Arcesi, M. Bellinzoni, E. De Rossi, and G. Riccardi.** 2004. Rv2686c-Rv2687c-Rv2688c, an ABC fluoroquinolone efflux pump in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:3175-8.
116. **Payton, M., R. Auty, R. Delgoda, M. Everett, and E. Sim.** 1999. Cloning and characterization of arylamine N-acetyltransferase genes from *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium tuberculosis*: increased expression results in isoniazid resistance. *J Bacteriol* **181**:1343-7.

117. **Pellicic, V., M. Jackson, J. M. Reyrat, W. R. Jacobs, Jr., B. Gicquel, and C. Guilhot.** 1997. Efficient allelic exchange and transposon mutagenesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:10955-60.
118. **Pellicic, V., J. M. Reyrat, and B. Gicquel.** 1998. Genetic advances for studying *Mycobacterium tuberculosis* pathogenicity. *Mol Microbiol* **28**:413-20.
119. **Pfyffer, G. E., R. Auckenthaler, J. D. van Embden, and D. van Soolingen.** 1998. *Mycobacterium canettii*, the smooth variant of *M. tuberculosis*, isolated from a Swiss patient exposed in Africa. *Emerg Infect Dis* **4**:631-4.
120. **Pinner, M.** 1935. Atypical acid fast microorganisms. *Am Rev Tuberc*:424-445.
121. **Plikaytis, B. B., J. T. Crawford, C. L. Woodley, W. R. Butler, K. D. Eisenach, M. D. Cave, and T. M. Shinnick.** 1993. Rapid, amplification-based fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Gen Microbiol* **139**:1537-42.
122. **Pym, A. S., P. Domenech, N. Honore, J. Song, V. Deretic, and S. T. Cole.** 2001. Regulation of catalase-peroxidase (KatG) expression, isoniazid sensitivity and virulence by furA of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* **40**:879-89.
123. **Pym, A. S., B. Saint-Joanis, and S. T. Cole.** 2002. Effect of katG mutations on the virulence of *Mycobacterium tuberculosis* and the implication for transmission in humans. *Infect Immun* **70**:4955-60.
124. **Quandt, J., and M. F. Hynes.** 1993. Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria. *Gene* **127**:15-21.
125. **Rad, M. E., P. Bifani, C. Martin, K. Kremer, S. Samper, J. Rauzier, B. N. Kreiswirth, J. Blazquez, M. Jouan, D. Van Soolingen, and B. Gicquel.** 2003. Mutations in putative mutator genes of *Mycobacterium tuberculosis* strains of the W-Beijing family. *Emerg Infect Dis* **9**:838-45.
126. **Rainey, B. P., and E. R. Moxon.** 2000. Microbiology. When being hyper keeps you fit. *Science* **288**:1186-7.
127. **Ramaswamy, S., and J. M. Musser.** 1998. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tuber Lung Dis* **79**:3-29.
128. **Ramaswamy, S. V., R. Reich, S. J. Dou, L. Jasperse, X. Pan, A. Wanger, T. Quitugua, and E. A. Graviss.** 2003. Single nucleotide polymorphisms in genes associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:1241-50.
129. **Raviglione, M. C.** 2003. The TB epidemic from 1992 to 2002. *Tuberculosis (Edinb)* **83**:4-14.
130. **Rawat, R., A. Whitty, and P. J. Tonge.** 2003. The isoniazid-NAD adduct is a slow, tight-binding inhibitor of InhA, the *Mycobacterium tuberculosis* enoyl reductase: adduct affinity and drug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:13881-6.
131. **Rivero, A., M. Marquez, J. Santos, A. Pinedo, M. A. Sanchez, A. Esteve, S. Samper, and C. Martin.** 2001. High rate of tuberculosis reinfection during a nosocomial outbreak of multidrug-resistant tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* strain B. *Clin Infect Dis* **32**:159-61.
132. **RIVM** 2002, posting date. Tbase: RFLP resourcedatabase. RIVM CAonTB. [Online.], <https://hypocrates.rivm.nl/bnwww/IS6110-RFLP-bands.htm>
133. **Ross, B. C., K. Raios, K. Jackson, and B. Dwyer.** 1992. Molecular cloning of a highly repeated DNA element from *Mycobacterium tuberculosis* and its use as an epidemiological tool. *J Clin Microbiol* **30**:942-6.
134. **Rozwarski, D. A., G. A. Grant, D. H. Barton, W. R. Jacobs, Jr., and J. C. Sacchettini.** 1998. Modification of the NADH of the isoniazid target (InhA) from *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **279**:98-102.
135. **Runyon, E. H.** 1960. Unclassified mycobacteria. *Am Rev Respir Dis* **81**:428-9.
136. **Sall, A., and J. Giri.** 2003. *Afrique 2025: Quels futurs possibles pour l'Afrique au Sud du Sahara*, Karthala et Futurs africains ed. Karthala, Paris. 195 p.

137. **Savine, E., R. M. Warren, G. D. van der Spuy, N. Beyers, P. D. van Helden, C. Locht, and P. Supply.** 2002. Stability of variable-number tandem repeats of mycobacterial interspersed repetitive units from 12 loci in serial isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* **40**:4561-6.
138. **Schleifer, K. H., and O. Kandler.** 1972. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol Rev* **36**:407-77.
139. **Schneider, J., R. Grosser, K. Jayasimhulu, W. Xue, and D. Warshawsky.** 1996. Degradation of pyrene, benz[a]anthracene, and benzo[a]pyrene by *Mycobacterium sp.* strain RJGII-135, isolated from a former coal gasification site. *Appl Environ Microbiol* **62**:13-9.
140. **Scorpio, A., and Y. Zhang.** 1996. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nat Med* **2**:662-7.
141. **Selander, R. K., D. A. Caugant, H. Ochman, J. M. Musser, M. N. Gilmour, and T. S. Whittam.** 1986. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl Environ Microbiol* **51**:873-84.
142. **Sherman, D. R., K. Mdluli, M. J. Hickey, T. M. Arain, S. L. Morris, C. E. Barry, 3rd, and C. K. Stover.** 1996. Compensatory *ahpC* gene expression in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **272**:1641-3.
143. **Sherman, D. R., K. Mdluli, M. J. Hickey, C. E. Barry, 3rd, and C. K. Stover.** 1999. AhpC, oxidative stress and drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Biofactors* **10**:211-7.
144. **Shinnick, T. M., and R. C. Good.** 1994. Mycobacterial taxonomy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **13**:884-901.
145. **Siddiqi, N., R. Das, N. Pathak, S. Banerjee, N. Ahmed, V. M. Katoch, and S. E. Hasnain.** 2004. *Mycobacterium tuberculosis* isolate with a distinct genomic identity overexpresses a tap-like efflux pump. *Infection* **32**:109-11.
146. **Skerman, V. B. D., V. McGowan, and P. H. A. Sneath.** 1980. Approved Lists of Bacterial Names. *Int J of Sys Bacteriol*:225-420.
147. **Sola, C., I. Filliol, M. C. Gutierrez, I. Mokrousov, V. Vincent, and N. Rastogi** 2001, posting date. SpolDB: spoligotyping resource database. Institut Pasteur de Guadeloupe Centers for Disease Control and prevention. [Online.], http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol7no3/sola_data.htm
148. **Sola, C., I. Filliol, M. C. Gutierrez, I. Mokrousov, V. Vincent, and N. Rastogi.** 2001. Spoligotype database of *Mycobacterium tuberculosis*: biogeographic distribution of shared types and epidemiologic and phylogenetic perspectives. *Emerg Infect Dis* **7**:390-6.
149. **Sreevatsan, S., P. Escalante, X. Pan, D. A. Gillies, 2nd, S. Siddiqui, C. N. Khalaf, B. N. Kreiswirth, P. Bifani, L. G. Adams, T. Ficht, V. S. Perumaalla, M. D. Cave, J. D. van Embden, and J. M. Musser.** 1996. Identification of a polymorphic nucleotide in *oxyR* specific for *Mycobacterium bovis*. *J Clin Microbiol* **34**:2007-10.
150. **Sreevatsan, S., X. Pan, K. E. Stockbauer, N. D. Connell, B. N. Kreiswirth, T. S. Whittam, and J. M. Musser.** 1997. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:9869-74.
151. **Sreevatsan, S., K. E. Stockbauer, X. Pan, B. N. Kreiswirth, S. L. Moghazeh, W. R. Jacobs, Jr., A. Telenti, and J. M. Musser.** 1997. Ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: critical role of *embB* mutations. *Antimicrob Agents Chemother* **41**:1677-81.
152. **Stanford, J. L., and G. A. W. Rook.** 1999. Immunotherapy for mycobacterial diseases, p. 198-219. In C. Ratledge and J. W. Dale (ed.), *Mycobacteria. Molecular biology and virulence*. Blackwell Science Ltd., Oxford.
153. **Stop TB Partnership.** 2001. Part I: State of the world's TB epidemic, p. 25-104, *Global Plan to Stop TB*. World Health Organisation, Geneva.
154. **Stop TB Partnership.** 2002. *Progress Report on the Global Plan to Stop TB*. World Health Organisation, Geneva. 68 p. W.H.O. WHO/HTM/STB/2004.29.

155. **Supply, P., P. Bifani, E. Savine, F. Ewann, S. Lesjean, K. Oulmi, and C. Locht** 2002, posting date. MiruDB: VNTR resource database. Institut Pasteur de Lille INSERM U447 Institut de Biologie de Lille. [Online.], <http://www.ibl.fr/mirus/mirus.html>
156. **Supply, P., S. Lesjean, E. Savine, K. Kremer, D. van Soolingen, and C. Locht.** 2001. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol* **39**:3563-71.
157. **Supply, P., J. Magdalena, S. Himpens, and C. Locht.** 1997. Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component system operon. *Mol Microbiol* **26**:991-1003.
158. **Supply, P., E. Mazars, S. Lesjean, V. Vincent, B. Gicquel, and C. Locht.** 2000. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol Microbiol* **36**:762-71.
159. **Supply, P., R. M. Warren, A. L. Banuls, S. Lesjean, G. D. Van Der Spuy, L. A. Lewis, M. Tibayrenc, P. D. Van Helden, and C. Locht.** 2003. Linkage disequilibrium between minisatellite loci supports clonal evolution of *Mycobacterium tuberculosis* in a high tuberculosis incidence area. *Mol Microbiol* **47**:529-38.
160. **Sutherland, T. D., I. Horne, R. L. Harcourt, R. J. Russell, and J. G. Oakeshott.** 2002. Isolation and characterization of a *Mycobacterium* strain that metabolizes the insecticide endosulfan. *J Appl Microbiol* **93**:380-9.
161. **Taddei, F., I. Matic, B. Godelle, and M. Radman.** 1997. To be a mutator, or how pathogenic and commensal bacteria can evolve rapidly. *Trends Microbiol* **5**:427-8; discussion 428-9.
162. **Taddei, F., M. Radman, J. Maynard-Smith, B. Toupance, P. H. Gouyon, and B. Godelle.** 1997. Role of mutator alleles in adaptive evolution. *Nature* **387**:700-2.
163. **Taylor, G. M., G. R. Stewart, M. Cooke, S. Chaplin, S. Ladva, J. Kirkup, S. Palmer, and D. B. Young.** 2003. Koch's bacillus - a look at the first isolate of *Mycobacterium tuberculosis* from a modern perspective. *Microbiology* **149**:3213-20.
164. **Telenti, A., P. Imboden, F. Marchesi, D. Lowrie, S. Cole, M. J. Colston, L. Matter, K. Schopfer, and T. Bodmer.** 1993. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* **341**:647-50.
165. **Telenti, A., W. J. Philipp, S. Sreevatsan, C. Bernasconi, K. E. Stockbauer, B. Wieles, J. M. Musser, and W. R. Jacobs, Jr.** 1997. The emb operon, a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol. *Nat Med* **3**:567-70.
166. **Tenaillon, O., H. Le Nagard, B. Godelle, and F. Taddei.** 2000. Mutators and sex in bacteria: conflict between adaptive strategies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:10465-70.
167. **Thierry, D., A. Brisson-Noel, V. Vincent-Levy-Frebault, S. Nguyen, J. L. Guesdon, and B. Gicquel.** 1990. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. *J Clin Microbiol* **28**:2668-73.
168. **Upton, A. M., A. Mushtaq, T. C. Victor, S. L. Sampson, J. Sandy, D. M. Smith, P. V. van Helden, and E. Sim.** 2001. Arylamine N-acetyltransferase of *Mycobacterium tuberculosis* is a polymorphic enzyme and a site of isoniazid metabolism. *Mol Microbiol* **42**:309-17.
169. **van der Werf, T. S., W. T. van der Graaf, J. W. Tappero, and K. Asiedu.** 1999. *Mycobacterium ulcerans* infection. *Lancet* **354**:1013-8.
170. **van der Zanden, A. G., A. H. Hoentjen, F. G. Heilmann, E. F. Weltevreden, L. M. Schouls, and J. D. van Embden.** 1998. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex in paraffin wax embedded tissues and in stained microscopic preparations. *Mol Pathol* **51**:209-14.
171. **van der Zanden, A. G., E. M. Te Koppele-Vije, N. Vijaya Bhanu, D. Van Soolingen, and L. M. Schouls.** 2003. Use of DNA extracts from Ziehl-Neelsen-stained slides for molecular detection of rifampin resistance and spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* **41**:1101-8.
172. **van Embden, J. D., M. D. Cave, J. T. Crawford, J. W. Dale, K. D. Eisenach, B. Gicquel, P. Hermans, C. Martin, R. McAdam, T. M. Shinnick, and et al.** 1993. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* **31**:406-9.

173. **van Helden P.D., V., T.C., Warren, R.M., van Helden E.G.** 2001. Isolation of DNA from *Mycobacterium tuberculosis*, p. 19-30. In T. Parish and N. G. Stoker (ed.), *Mycobacterium tuberculosis protocols*. Humana Press, Totowa, New Jersey.
174. **van Rie, A., R. Warren, I. Mshanga, A. M. Jordaan, G. D. van der Spuy, M. Richardson, J. Simpson, R. P. Gie, D. A. Enarson, N. Beyers, P. D. van Helden, and T. C. Victor.** 2001. Analysis for a limited number of gene codons can predict drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in a high-incidence community. *J Clin Microbiol* **39**:636-41.
175. **van Rie, A., R. Warren, M. Richardson, T. C. Victor, R. P. Gie, D. A. Enarson, N. Beyers, and P. D. van Helden.** 1999. Exogenous reinfection as a cause of recurrent tuberculosis after curative treatment. *N Engl J Med* **341**:1174-9.
176. **van Soolingen, D., P. E. de Haas, R. M. Blumenthal, K. Kremer, M. Sluijter, J. E. Pijnenburg, L. M. Schouls, J. E. Thole, M. W. Dessens-Kroon, J. D. van Embden, and P. W. Hermans.** 1996. Host-mediated modification of PvuII restriction in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* **178**:78-84.
177. **van Soolingen, D., P. W. Hermans, P. E. de Haas, and J. D. van Embden.** 1992. Insertion element IS1081-associated restriction fragment length polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* complex species: a reliable tool for recognizing *Mycobacterium bovis* BCG. *J Clin Microbiol* **30**:1772-7.
178. **van Steenberg, T. J., S. D. Colloms, P. W. Hermans, J. de Graaff, and R. H. Plasterk.** 1995. Genomic DNA fingerprinting by restriction fragment end labeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:5572-6.
179. **Vera-Cabrera, L., S. T. Howard, A. Laszlo, and W. M. Johnson.** 1997. Analysis of genetic polymorphism in the phospholipase region of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* **35**:1190-5.
180. **Victor, T. C., A. van Rie, A. M. Jordaan, M. Richardson, G. D. van Der Spuy, N. Beyers, P. D. van Helden, and R. Warren.** 2001. Sequence polymorphism in the *rrs* gene of *Mycobacterium tuberculosis* is deeply rooted within an evolutionary clade and is not associated with streptomycin resistance. *J Clin Microbiol* **39**:4184-6.
181. **Vilcheze, C., T. R. Weisbrod, B. Chen, L. Kremer, M. H. Hazbon, F. Wang, D. Alland, J. C. Sacchettini, and W. R. Jacobs, Jr.** 2005. Altered NADH/NAD⁺ Ratio Mediates Coresistance to Isoniazid and Ethionamide in *Mycobacteria*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:708-20.
182. **Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, and et al.** 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* **23**:4407-14.
183. **W.H.O.** 2002. *Cadre stratégique pour réduire la co-infection tuberculose/HIV*. World Health Organisation, Geneva. 56 p. WHO/CDS/TB/2002.296.
184. **W.H.O.** 2003. *Global tuberculosis control*. World Health Organisation, Geneva. 229 p. WHO/CDS/TB/2003.316.
185. **Wayne, L. G., and G. P. Kubica.** 1986. The mycobacteria, p. 1435-1457. In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2. Williams & Wilkins, Baltimore.
186. **Werngren, J., and S. E. Hoffner.** 2003. Drug-Susceptible *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Genotype Does Not Develop Mutation-Conferred Resistance to Rifampin at an Elevated Rate. *J Clin Microbiol* **41**:1520-4.
187. **Wiid, I. J., C. Werely, N. Beyers, P. Donald, and P. D. van Helden.** 1994. Oligonucleotide (GTG)₅ as a marker for *Mycobacterium tuberculosis* strain identification. *J Clin Microbiol* **32**:1318-21.
188. **Williams, D. L., L. Spring, L. Collins, L. P. Miller, L. B. Heifets, P. R. Gangadharam, and T. P. Gillis.** 1998. Contribution of *rpoB* mutations to development of rifamycin cross-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* **42**:1853-7.
189. **Wilson, M. E., H. V. Fineberg, and G. A. Colditz.** 1995. Geographic latitude and the efficacy of bacillus Calmette-Guerin vaccine. *Clin Infect Dis* **20**:982-91.

190. **Zhang, Y., B. Heym, B. Allen, D. Young, and S. Cole.** 1992. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature* **358**:591-3.
191. **Zhang, Y., and D. Young.** 1994. Strain variation in the *katG* region of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* **14**:301-8.
192. **Zink, A. R., C. Sola, U. Reischl, W. Grabner, N. Rastogi, H. Wolf, and A. G. Nerlich.** 2003. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex DNAs from Egyptian mummies by spoligotyping. *J Clin Microbiol* **41**:359-67.

Toulouse, 2005.

NOM : NOUVEL

PRENOM : Laurent-Xavier

TITRE : RECHERCHE DE MARQUEURS GENETIQUES DE SOUCHES DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* MULTIRESISTANTES AUX ANTIBIOTIQUES EN REPUBLIQUE CENTRAFRICAINE.

RESUME :

La tuberculose humaine demeure un problème mondial de santé publique aggravé par l'émergence de souches résistantes aux antibiotiques.

Outre une synthèse des connaissances bactériologiques, épidémiologiques et moléculaires sur *Mycobacterium tuberculosis*, ce travail présente des données expérimentales sur la diversité génétique d'isolats de République Centrafricaine afin d'identifier d'éventuels marqueurs de la multirésistance aux antibiotiques (MDR).

Le séquençage de gènes anti-mutateurs potentiels a permis d'observer un polymorphisme pour 80 % des isolats MDR étudiés. La parenté phylogénétique de ces souches a été confirmée par spoligotypage. Trente pourcent des isolats MDR sont caractérisés par une mutation silencieuse dans *mutT1*. D'autre part, une mutation non sens dans *alkA* est observée chez 5 souches. Egalement présente chez *M. bovis*, celle-ci pourrait témoigner d'une évolution convergente ou d'un transfert génétique horizontal.

MOTS-CLES : TUBERCULOSE, MULTIRESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES, MUTATEUR, POLYMORPHISME GENETIQUE, GENOTYPAGE, SPOLIGOTYPAGE, EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE.

TITLE : RESEARCH OF GENETIC MARKERS FOR *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* MULTI-DRUG RESISTANT STRAINS IN CENTRAL AFRICAN REPUBLIC

ABSTRACT :

Worldwide, Human tuberculosis remains a major public health problem worsened by the emergence of drug resistant strains.

First, this work summarizes *Mycobacterium tuberculosis* current knowledge at the bacterial, epidemiological and molecular levels. Second, it assesses the genetic diversity of isolates from Central African Republic to identify markers associated with multi-drug resistant (MDR) strains.

Compared to reference strain (H37Rv), sequence variations in some putative DNA repair (so called anti-mutator) genes were observed in 80% of MDR strains studied here. Spoligotyping further confirmed that strains carrying variations are phylogenetically close. A silent mutation in *mutT1* gene characterizes 30% of MDR strains and could then offer a marker. A substitution leading to a stop codon in *alkA* is observed for 5 MDR strains. This mutation is also present in *M. bovis* sequenced strain (AF2122) and could reflect a convergent evolution or an horizontal genetic transfer.

KEY WORDS : TUBERCULOSIS, MULTIDRUG-RESISTANCE, MUTATOR, GENETIC POLYMORPHISM, GENOTYPING, SPOLIGOTYPING, MOLECULAR EPIDEMIOLOGY.
