



Les infections à mycobactéries du complexe *Mycobacterium tuberculosis* à Libreville : profil des résistances aux antibiotiques et diversité génétique

Amel Kevin Alame Emame

► To cite this version:

Amel Kevin Alame Emame. Les infections à mycobactéries du complexe *Mycobacterium tuberculosis* à Libreville : profil des résistances aux antibiotiques et diversité génétique. Microbiologie et Parasitologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2016. Français. NNT : 2016USPCC129 . tel-01635961

HAL Id: tel-01635961

<https://theses.hal.science/tel-01635961>

Submitted on 16 Nov 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE DE DOCTORAT
de l'Université Sorbonne Paris Cité
Préparée à l'Université Paris DIDEROT

ÉCOLE DOCTORALE BioSPC (516)

Institut Pasteur – Unité de Génétique Mycobactérienne

"Les infections à mycobactéries du complexe *Mycobacterium tuberculosis* à
Libreville : profil des résistances aux antibiotiques et diversité génétique"

Par **Amel Kevin ALAME EMANE**

Thèse de doctorat de Microbiologies procaryote et eucaryote

Dirigée par le **Pr. Brigitte GICQUEL**

Présentée et soutenue publiquement à Paris, le 15 novembre 2016

JURY

Dr. Olivier DUSSURGET	Président du jury
Dr. Anandi MARTIN	Rapporteur
Dr. Beate HEYM	Rapporteur
Dr. Nathalie GRALL	Examinatrice
Dr. Mathieu PICARDEAU	Invité
Pr. Brigitte GICQUEL	Directrice de thèse
Dr. Joël Fleury DJOBA SIAWAYA	Co-directeur de thèse
Dr. Howard E. TAKIFF	Co-directeur de thèse

Les infections à mycobactéries du complexe *Mycobacterium tuberculosis* à Libreville : profil des résistances aux antibiotiques et diversité génétique.

Résumé :

Le phénomène émergent de la tuberculose multirésistante et ultrarésistante est un problème de santé publique à l'échelle mondiale. Dans les pays en développement, ce problème est accru du fait que les laboratoires de diagnostic de la tuberculose manquent d'équipement et d'outils de diagnostics pour identifier ces cas pour prescrire une chimiothérapie adaptée. La première partie de ce travail de doctorat a permis à travers le séquençage du locus *pncA*, de mettre en évidence que la résistance au Pyrazinamide survient généralement et de manière significative lorsque la souche est multirésistante, c'est-à-dire après l'acquisition de la résistance à la Rifampicine et à l'Isoniazide. Le pourcentage des souches résistantes au PZA est même plus élevé chez les souches MDR résistantes aux FQs. Dans la seconde partie de l'étude, nous proposons une méthode alternative à la culture de bacilles dans un environnement confiné de type P3. À partir d'échantillons cliniques non cultivés (expectoration) et grâce au GeneXpert MTB/RIF, au séquençage de gènes et au spoligotypage, nous avons pu identifier 19 souches multirésistantes, une transmission active de souches sensibles appartenant aux clades LAM10, T1, MANU, H3 et enfin une épidémie sous-jacente de 5 souches Beijing multirésistantes.

Mots clefs : *Mycobacterium tuberculosis*, Gabon, Libreville, GeneXpert, Séquençage, multirésistance, Famille Beijing.

Summary :

The emerging phenomenon of the MDR and XDR-TB is a worldwide public health issue. In developing countries, this problem is amplified due to the fact that TB diagnostic laboratories lack equipment and diagnostic tools to identify these cases and therefore prescribe appropriate chemotherapy. In the first part of this doctoral work, the sequencing of the *pncA* locus allowed us to show that the resistance to pyrazinamide occurs significantly when the strain is MDR, corresponding to the acquisition of resistance to Rifampicin and Isoniazid; and that after the acquisition of FQs and AGs resistance by MDR strains, this rate increases even more. In the second part of the study, we propose an alternative method to the culture of bacilli in a BSL3 confined environment. From uncultivated clinical samples (sputum) and through GeneXpert MTB/RIF, sequencing of genes and spoligotyping, we identified 19 MDR strains, active transmission of sensitive strains belonging to clades LAM10, T1, MANU, H3 and finally as well as an underlying epidemic of 5 Beijing MDR strains.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, Gabon, Libreville, GeneXpert, Sequencing, multidrug resistance, Beijing Family.

Nos « ... destinées sont dans ta main ... ».

Psaumes 31 : 15 (La Bible)

[...] entre Médecin et Scientifique. Nous voudrions montrer au Médecin-Thérapeute comment les molécules antibiotiques peuvent se frayer un chemin dans les espaces intracellulaires, s'infiltrer parmi les acteurs des voies métaboliques, atteindre leur cible et s'y fixer avec assez d'intensité pour perturber les mouvements silencieux et discrets de la vie moléculaire. Nous souhaiterons que le Biologiste, utilisant l'antibiotique comme un outil moléculaire, perçoive les soucis de ceux qui ont pour mission l'Art de prescrire : atteindre spécifiquement et avec plus d'efficacité la bactérie intruse, tout en respectant l'intégrité de ce gigantesque et transcendant assemblage de cellules qu'est l'organisme. [...]

Yvon Michel-Briand

Avant-propos dans : *Mécanismes moléculaires de l'action des antibiotiques*, 1986.

Collection de Biologie Moléculaire 6.

REMERCIEMENTS

Au terme de ces trois années de thèse ponctuées d'enthousiasme et aussi de moments de doute et de découragement, j'exprime ici ma gratitude aux personnes qui m'ont permis de mener à bien mon étude.

- Ma première intention de gratitude va à l'endroit du Pr. Brigitte GICQUEL qui a bien voulu diriger et encadrer cette thèse au sein de ton laboratoire. Je te remercie d'avantage car bien plus qu'un encadreur tu as été une mère. Merci pour la confiance, le soutien, les orientations et tes fous rires.
- Je suis particulièrement reconnaissant au Dr. Joël Fleury DJOBA-SIAWAYA du Laboratoire National de Santé Publique de Libreville sans qui cette formidable aventure n'aurait jamais été possible. Mon souhait à votre égard est que vous puissiez continuer à encadrer d'autres étudiants motivés comme vous l'avez pressenti dans mon cas.
- Catherine PIERRE-AUDIGIER, comme j'aime la surnommer en secret « force tranquille », merci pour ta simplicité, ta patience, tes conseils et tes aides précieuses. Tu es en or massif !
- À Howard E. TAKIFF, spécialiste dans l'art de la rédaction scientifique.
- À Akim SAMBOWAZA, maman Albertine, Stéphanie, Émilie ESSONO, Mme MOUSSA, Mme Sidonie LAWSON, agents du Laboratoire National de Santé Publique de Libreville ; merci pour vos aides et conseils précieux durant cette longue période de disette post-thèse parmi vous. C'est en partie grâce à vous qu'aujourd'hui ce mémoire existe. Infinie gratitude.
- C'est parce que je me rends compte que tout n'a été qu'une question de timing, je remercie spécialement Mlle Jalisca Fifi NDONG pour l'aide précieuse apportée lors des révisions en Physiologie Végétale (L2 Chimie-Biologie-Géologie) sans quoi j'aurais été recalé.
- Mes vifs remerciements vont à l'endroit de Mme Véronique CADET-DANIEL, qu'aurais-je bien pu faire sans ton aide ? Cela, je me le demande encore !

- À Natacha HAIKINE, Patricia CHARLES, (Papa) Amine NAMOUCHI, Mena SIMINO, (Maman) Noellia ALONSO RODRIGUEZ, Maria BUTCHIERI, Sandrine FAVRE-ROCHEX, Ludovic TAILLEUX, Lætitia PETIT-JENTRAU, je ne vous oublie pas non plus.
- À Gérard GAUTHIER, merci pour l'accueil, le coup de pouce pour la guitare même si au bout de 3 ans j'ai des difficultés à enchaîner les accords ;
- Mlle Emilyn COSTA CONCEIÇÃO, merci pour les coups de pouces en spoligotyping sur Luminex et la randonnée.
- Je suis très sensible à l'honneur que me font les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse.

DÉDICACES

Je dédie ce travail :

- À ma mère Mme NDANG ZO'O épouse BOBEBE ALAME, je te dois tout !
- Aux feux NTOUTOUME ALAME Sernin Elfreid et ZO'O ALAME James Donald ;
- À mon frère Bertin et à mes sœurs : Syllie, Annick, Armide, Mica, Benny ;
- À mes mères qui ont tendrement pris soins de moi : MBANG, feux m'ma Samedi et ZOUA Micale, tante Séraphine ;
- Aux Mlles Ruffinelle B. MIKOMBO LIPOT et Méline Victoire NDANG ALAME ;
- À mes amis de longue date : Gabriel EDZODZOMO-OVONO, Ulrich MBOU KASSOUPA, Mariette MAYINDZA MOUANDZA, Orphée Silany MBENG NTOUTOUME, Nathalie NSEGHE ;
- Aux étudiants de l'Université des Sciences et Techniques de Masuku de la promotion 2005 : Nous arrivâmes très nombreux, nous passâmes nombreux, nous restâmes peu et nous réussîmes très peu.
- À mes voisins de chambres universitaires : Didier Stéphane BIBALOU DITENGOU, Michel MOANDA, Ralphe, Denis ASSEY, Jeff MOUELE, Rames MBOUMBA, Ghislain Wilfried EBANG ELLA, Francis NGOYE, Parfais NGUEMAN EDZANG, Nestor ABA'A, Cynel G. MOUNDOUNGA, Juste Alex MBINDOU MOMBO, Toussaint BELL NGOMA, Quentin MOUNDOUNGA MAVOUROULOU ;
- Au groupe de Travaux Dirigés 1 (R-Force One, L.A.B.O 2005) : Bim BATSIANDZI IBANOU, Eugène AMANGUI NDIVO, Josiace C. ABESOLE, Stéphane BIBALOU DITENGOU.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	5
DÉDICACES.....	7
TABLE DES ILLUSTRATIONS	12
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	16
AVANT - PROPOS	18
INTRODUCTION.....	22
CHAPITRE I : ÉPIDÉMIOLOGIE DE LA TUBERCULOSE	23
I. Épidémiologie Mondiale de la tuberculose	23
II. Épidémiologies de la tuberculose au Gabon	25
A. Situation géographique et démographie.....	25
B. Carte sanitaire du Gabon.....	26
C. Traitement de la tuberculose.....	26
D. Évolution de la tuberculose au Gabon entre 2001 et 2013	27
E. Les obstacles à la lutte antituberculeuse efficiente au Gabon.....	29
CHAPITRE II : GÉNÉRALITÉS SUR LE COMPLEXE <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	30
I. Description du complexe <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	30
A. Taxonomie des mycobactéries.....	30
B. Les caractères morpho-génotypiques des espèces du complexe <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	33
1. Les caractères phénotypiques	33
a. Le peptidoglycane (PG).....	35
b. L'arabinogalactan (AG)	35
c. Les acides mycoliques (AM)	36
2. Les caractères génotypiques.....	36

a.	Origine de la notion de clones cellulaires	36
b.	Les éléments chromosomiques répétés employés en génotypie	36
i.	La région Direct Repeat (DR)	36
ii.	Les mini-satellites et les Mycobacterial Interspered Repetitive Units	37
iii.	Les régions de différences	39
A.	Structure de la population des souches du complexe <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	39
II.	Physiopathologie de l'infection tuberculeuse	41
A.	Transmission interhumaine de la tuberculose	42
B.	Les facteurs de risque d'infection tuberculeuse	42
C.	La primo-infection	43
1.	Déroulement de la réponse immunitaire au cours de la primo-infection	44
a.	Induction de l'immunité innée	44
b.	Induction de l'immunité adaptative	45
2.	Structure et évolution du granulome	45
3.	Devenir de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> au cours de la primo-infection	47
a.	Expression des facteurs de virulence associés à la région de différence 1 (RD1)	47
b.	Inhibition de l'apoptose des neutrophiles	48
c.	Activation tardive de la réponse immunitaire adaptative	49
CHAPITRE III : PROPHYLAXIE ET TRAITEMENT DE LA TUBERCULOSE, ACTIVITÉS ANTIBACTÉRIENNES DES ANTITUBERCULEUX ET RÉSISTANCES DES BACILLES AUX ANTITUBERCULEUX.		50
I.	Prophylaxies de la tuberculose	50
A.	Prophylaxie par le vaccin BCG	50
1.	Quelques vaccins antituberculeux en phase de développement	50
a.	Le vaccin rBCG30	51

b.	Le vaccin rBCG::ΔureC-hly+	51
c.	Le vaccin BCG::RD1	51
B.	Traitements curatifs par les chimiothérapies.....	51
1.	Chimiothérapie standardisée de première intention.....	52
2.	Chimiothérapie standardisée de seconde ligne.....	52
a.	Antibiothérapie de seconde ligne dirigée contre les tuberculoses à germes MDR	53
i.	Les traitements standardisés recommandés par l’OMS.....	53
b.	Antibiothérapie contre les germes XDR.....	54
II.	Activités antibactériennes des antituberculeux et mécanismes de résistance.....	54
A.	Les antibiotiques inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques	54
1.	La Rifampicine (RIF)	54
2.	Les fluoroquinolones (FQs)	56
B.	Les antibiotiques inhibiteurs de la synthèse de la paroi mycobactérienne.....	57
1.	L’Isoniazide (INH)	57
2.	L’Éthambutol (EMB)	58
C.	Les antibiotiques inhibiteurs de la synthèse protéique : les aminoglycosides et la capréomycine.....	58
D.	Les autres types d’antibiotiques au mode d’action non clairement définis.....	59
1.	Le pyrazinamide (PZA)	59
2.	Les nouveaux antituberculeux : la Bédaquiline (BDQ), la Délamanide (DLM) et le Linézolide.....	60
E.	Les mycobactéries du complexe Mycobacterium tuberculosis et les mutations compensatoires.....	62
III.	Les outils de diagnostic de la tuberculose.....	62
A.	Le diagnostic clinique de la tuberculose.....	62
B.	Le diagnostic in vivo de la tuberculose	63

1. L'intradermo réaction (IDR)	63
2. Les tests de libération de l'interféron gamma (Interferon gamma release assay = IGRA)	64
C. Le diagnostic in vitro de la tuberculose	65
1. La bacilloscopie ¹	65
2. La culture des mycobactéries	67
D. Détection de la tuberculose résistante.....	68
1. AntibioGramme par la méthode de phénotypie	68
2. AntibioGramme par la méthode de génotypie.....	68
a. Le test GeneXpert MTB/RIF (Xpert)	69
b. Le test d'hybridation inverse sur bandelette - Line Probe Assay de HAIN ..	71
i. Le test MTBDRplus.....	72
ii. Le test MTBDRsl 2.0	74
c. Le séquençage.....	75
E. Génotypage des souches du complexe Mycobacterium tuberculosis.....	76
1. Le spoligotypage	76
2. Le typage par Mycobacterial Interspersed Repetitive Units (MIRU) - Variable Number Tandem Repeats (VNTR).....	80
3. Typage par le polymorphisme de nucléotide unique – Single Nucleotide Polymorphism (SNP)	82
RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.....	84
Publication scientifique n°1 :	85
Publication scientifique n°2 (en cours de soumission) :	105
DISCUSSION-CONCLUSIONS GÉNÉRALES & PERSPECTIVES.....	131
BIBLIOGRAPHIE	138

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : estimations de l'incidence de la tuberculose pour les différents pays du monde ² ..	24
Figure 2 : localisation géographique du Gabon dans le monde et présentation des divisions administratives provinciales.	25
Figure 3 : présentation des 9 régions sanitaires au Gabon ⁵⁶	27
Figure 4 : schématisation de la paroi des mycobactéries montrant les trois principales couches ⁷¹	34
Figure 5 : structure et organisation du peptidoglycane des mycobactéries http://www.ebiologie.fr/upload/documents/peptidoglycane-294.jpeg	35
Figure 6 : aperçu de la structure d'un des quatre systèmes CRISPR/Cas (ici le système 1) de <i>Streptococcus thermophilus</i> DGCC7710 ⁸⁴	37
Figure 7 : position des 41 loci MIRU au sein du chromosome de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	38
Figure 8 : portion de carte chromosomique illustrant la distribution de quelques RD (ici les RD4, 3, 7, 2, 9 et 5) obtenue par la BAC à partir des clones 'X' = <i>M. bovis</i> BCG pBeloBAC11; 'XE' = <i>M. bovis</i> BCG pBACe3.6 ; 'Rv' = <i>M. tuberculosis</i> pBeloBAC11; 'Y' = <i>M. tuberculosis</i> pYUB328 ; et 'I' = <i>M. tuberculosis</i> pYUB412 ⁹³	40
Figure 9 : aperçu de l'organisation interne des RD7, 2, 8, 9 et 10. Les régions délaitées chez <i>M. tuberculosis</i> sont délimitées par les flèches ainsi que les séquences délimitant chaque délétion. Les ORFs sont représentées par les boîtes pointues qui par ailleurs indiquent le sens de la transcription. Les couleurs des boîtes reflètent la classification fonctionnelle établie par Cole et al., (1998) ⁹³	40
Figure 10 : structure de la population des mycobactéries du CMT et distribution globale des six principaux lignages ⁶⁷	41
Figure 11 : mode de transmission majeur interhumaine de la tuberculose [schéma modifié de ⁵²].....	42

Figure 12 : incidence de la région de différence 1 (RD1) de type sauvage (WT) de la souche <i>M. marinum</i> dans le processus d'infection et recrutement massif de macrophages au cours de l'élaboration des granulomes tuberculeux pulmonaires chez des larves du poisson zèbre ¹⁰⁵ , ¹¹⁶	45
Figure 13 : représentation basique de la structure et des cellules immunitaires et épithéliales impliquées dans la formations du granulome tuberculeux ¹¹³	47
Figure 14 : (versus Figure 12, souches WT pour RD1), mise en évidence de la propriété du locus RD1 à stimuler et renforcer la formation des granulomes tuberculeux pulmonaires par mutation de RD1 chez <i>M. marinum</i> ^{105, 116}	48
Figure 15 : hypothèse de l'implication de la région de différence 1 dans la virulence de <i>M. tuberculosis</i> occasionnant le recrutement supplémentaire de macrophages ¹¹³	49
Figure 16 : représentation schématique de la RDRR (rectangle jaune) où siègent les mutations associées à la résistance à la RIF au sein du gène <i>rpoB</i> et leurs fréquences d'observations ¹⁵⁰	55
Figure 17 : représentation schématique de la QRDR (petit rectangle jaune) au sein du locus <i>gyrA</i> montrant les fréquences des principales mutations associées à la résistance aux FQs ¹⁵⁰	56
Figure 18 : conversion et modes d'actions du pyrazinamide (PZA) ¹⁶⁴	60
Figure 19 : distribution et fréquences d'apparitions de SNPs au sein du gène <i>pncA</i> de <i>M. tuberculosis</i> associés à la résistance au PZA ¹⁶⁷	61
Figure 20 : tableau clinique résumant la symptomatologie de la tuberculose pulmonaire.	63
Figure 21 : schémas des principes sur la technique d'inoculation de la tuberculine et de la lecture du disque d'induration pour une IDR ¹⁷	63
Figure 22 : procédure de coloration de Ziehl-Neelsen d'un frottis en vue d'une analyse par microscopie ²³	66

Figure 23 : apparence de <i>Mycobacterium microti</i> (A) et de <i>Mycobacterim tuberculosis</i> (B et C) lors de la bacilloscopie.	67
Figure 24 : représentation des 81 pb de la RDRR du gène <i>rpoB</i> et des positions de chacune des sondes Xpert sur ladite région ¹⁵⁰	70
Figure 25 : procédure d'exécution du test Xpert MTB/RIF sur un échantillon clinique ¹⁹	70
Figure 26 : résultats et interprétation du test GeneXpert pratiqué sur un échantillon clinique à germes sensible à la RIF.	71
Figure 27 : résultats et interprétation du test GeneXpert pratiqué sur un échantillon clinique à germes résistants à la RIF.....	71
Figure 28 : représentation de la RDRR (81 pb) du locus <i>rpoB</i> (barre grisée), de la disposition chevauchante des sondes de type sauvage (rectangles blancs) et des mutations identifiées (entre parenthèses) ¹⁵⁰	72
Figure 29 : mutation S315T au sein du gène <i>katG</i> détectée par le test et associée à une résistance de haut niveau à l'INH ¹⁵⁰	73
Figure 30 : mutations au sein de la région promotrice du locus <i>inhA</i> associées à une résistance à l'INH de faible niveau ¹⁵⁰	73
Figure 31 : résultats et interprétation du test MTBDR <i>plus</i> pratiqué sur des thermolysats d'échantillons cliniques non cultivés.....	73
Figure 32 : description comparative des bandelettes du test MTBDR <i>s</i> / (versions 1.0 versus 2.0). <i>http://www.hain-lifescience.de/en/products/microbiology/mycobacteria/tuberculosis/genotype-mtbdrrsl.html.</i>	74
Figure 33 : résumé schématique de la technique d'hybridation inverse sur membrane de spoligotypage ^{198, 200, 202}	77

Figure 34 : exemple d'arbre phylogénétique non exhaustif présentant les distances génétiques entre les six principaux lignages, clades et les familles au sein du CMT par combinaison des outils de typage de SNPs et spoligotypage ⁷⁸ 78

Figure 35 : principes de la méthode de spoligotypage multiplexée appliquée au système MagPix Luminex ^{203, 204} 79

Figure 36 : exemple de résultats de spoligotypage (spoligotypes) suite à l'analyse des données générées par le logiciel (XPONENT) du MagPix..... 80

Figure 37 : exemple d'électrophorèse, d'analyse et d'interprétation des résultats par la technique de typage MIRU-VNTR à 15 loci. 81

Figure 38 : comparaison l'index d'homoplasie pour les différents outils de typage susmentionnés ⁷⁸ 82

Figure 39 : comparaison des pouvoirs discriminants des techniques de typage à travers la composition et l'organisation des arbres phylogénétiques ⁷⁸ 83

Tableau I : Taxonomie des bactéries du CMT d'après la "Taxonomie résumée des *Archaea* et *Bacteria*", selon le "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" de G. M. Garrity ⁶⁹ et la "List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature" de J.P. Euzéby (<http://www.bacterio.cict.fr>). 32

Tableau II : principales mutations du gène *gyrA* conférant la résistance aux quinolones identifiées par le test LiPA HAIN MTBDRs/ ¹⁸⁸⁻¹⁹¹ 74

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AFRI : *Africanum*

AGs : Aminoglycosides ou Glycosides

AMK : Amikacine

ARN : Acide Ribonucléique

ATB/ATBs : Antibiotique

BCG : Bacille de Calmette et Guérin

BDQ : Bédaquiline

CAP : Capréomycine

CAS : Centra Asian

CFP : Culture Filtrate

CFZ : Clofazimine

CLA : Clarythromycine

CMT : Complexe *Mycobacterium tuberculosis*

DLM : Délamanide

DOTS : Directly Observed Treatment, Short-course

DR : Direct Repeat

RDRR : Région Déterminant la Résistance à la Rifampicine

EMB : Ethambutol

ETH : Éthionamide

FQs : Fluoroquinolones ou Quinolones

IDR : Intradermo Réaction

INH : Isoniazide

ITBL : Infection Tuberculeuse Latente

kb : Kilobase

KM : Kanamycine

LFX : Lévofoxacine

LNSP : Laboratoire Nationale de Santé Publique de Libreville

LZD : Linézolide

M. : *Mycobacterium*

MFX : Moxifloxacin

MIRU : Mycobacterial Interspersed Repetitive Units

MIRU-VNTR : Mycobacterial Interspersed Repetitive Units-Variable Number of Tandem Repeat

MNT : Mycobactérie non tuberculeuse

MDR : Multi Drug Resistant / Multi Drug Resistance (se traduit par Multirésistant / Multirésistance)

MTB : *Mycobacterium tuberculosis*

OFX : Ofloxacin

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PAS : Acide Para-Aminosalicylique

pb : paire de base

PCR : Polymerase Chain Reaction – Réaction de Polymérisation en Chaîne

PNLT : Programme National de Lutte Contre la Tuberculose

PTH : Prothionamide

PZA : Pyrazinamide

QRDR : Quinolones Region Determining Resistance

RD : Région de Différence

RDRR : Région Déterminant la Résistance à la Rifampicine

RIF : Rifampicine

SIT : Spoligotyping International Type

SNP : Single Nucleotide Polymorphism

SM : Streptomycine

TB : Tuberculose

TBL : Tuberculose Latente

TBP : Tuberculose Pulmonaire

TEP : Tuberculose Extra Pulmonaire

XDR : Extensively Drug Resistant / Extensively Drug Resistance (se traduit par Ultrarésistant / Ultrarésistance)

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

VNTR : Variable Number of Tandem

Z-N : Ziehl-Neelsen

AVANT - PROPOS

À la fin du XIX^{ème} siècle, la tuberculose (TB) était déjà connue comme étant une pathologie associée à une importante morbidité et mortalité ¹. De nos jours, l'ampleur morbide et mortelle due à *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, MTB) dans le monde en dépit des mesures prophylactiques spécifiques existantes ²⁻¹² reste un problème. En effet, la TB est la seconde cause de mortalité due à un agent infectieux après le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) avec 1,6 million de décès et une prévalence de 9,6 millions de personnes à travers les cinq continents ². Pour lutter efficacement contre ce fléau, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a instauré en 1995 le programme "directly observed treatment, short-course" (DOTS) qui comprends notamment : le dépistage par des examens bactériologiques de qualité, l'emploi de chimiothérapie normalisée associée à une surveillance-supervision de la prise du traitement pour les patients, et enfin le renforcement des laboratoires spécialisés dans la surveillance des pharmaco-résistances ¹³⁻¹⁵. Cependant, si les pays industrialisés ont amélioré leurs performances dans la lutte anti-TB, la TB sévit principalement dans les pays en développement ^{2, 16} où les niveaux socio-économiques restent faibles et où l'accès aux services de santé et la prise en charge des patients demeurent insuffisants.

Le diagnostic est un ensemble de processus mis en œuvre afin d'identifier la cause à l'origine d'un trouble. Ceux relatifs au diagnostic de la TB peuvent être catégorisés en différentes entités distinctes que sont la clinique (symptomatologie), la paraclinique (radiographie), la biologie (tests immunologiques, bactériologie dont la microscopie, la culture et plus récemment la biologie moléculaire) ¹⁷⁻²³, d'autre part. La bactériologie recherche la mise en évidence du bacille de la TB ou de son acide désoxyribonucléique (ADN) permettant un diagnostic étiologique de la maladie.

La bacilloscopie ou encore le diagnostic microscopique de la TB a été développé par Ziehl et Neelsen (Z-N). Du fait de son coût et de sa technicité relativement simple à reproduire et à mettre en œuvre ²³, la bacilloscopie est de loin le principal outil d'analyse utilisé dans les pays en développement pour établir le diagnostic bactériologique et le suivi de l'efficacité des chimiothérapies chez les patients en cours de traitement ^{22, 24-26}. Mais la microscopie présente plusieurs inconvénients qui sont incompatibles avec les objectifs de la stratégie DOTS : elle ne permet pas de distinguer les espèces de mycobactéries entre elles, elle ne distingue pas la viabilité des bacilles et elle ne permet pas de déterminer la sensibilité d'une souche aux antituberculeux ²². De plus, la technique requière une charge bacillaire minimale

de 5 000 bacilles par millilitre pour que des bacilles soit visibles à l'examen microscopique et que ce dernier soit déclaré comme positif. Ainsi, sachant que l'excrétion des bacilles dans l'expectoration est intermittente, la sensibilité de la microscopie varie de 35 à 65% avec une spécificité de 97-99^{22, 25, 27}.

La culture (sur milieu solide) est utilisée depuis près de 100 ans comme étant la technique de référence pour l'établissement d'un diagnostic de certitude recommandée par l'OMS. Toutefois, sa pratique impose une expertise et des règles de sécurité. La mise en place d'une infrastructure de type P3 implique un financement important inhérent à son fonctionnement ce qui limite son implantation dans les pays en développement. De façon pratique, outre la mise en évidence des bacilles, la culture permet d'identifier l'espèce mycobactérienne à l'origine de l'infection et surtout de tester un antibiogramme permettant l'adaptation d'un traitement antituberculeux. L'inconvénient inhérent à la culture tient du fait de la croissance lente des mycobactéries du complexe *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) (temps de régénération de 24 à 38 heures)²⁸, les résultats de susceptibilité aux antituberculeux s'obtenant au terme d'une longue période d'incubation de 3 à 4 semaines supplémentaires aux 3 semaines que nécessite la première culture²⁹. De plus, la détection des résistances au pyrazinamide (PZA) est toutefois plus difficile en raison de l'activité de cet antibiotique en milieu acide qui entrave la croissance des bacilles³⁰.

La découverte de la structure de l'ADN a été à la base de nombreuses avancées techniques majeures dont la réaction de polymérisation en chaîne (PCR). La PCR associée au séquençage a permis d'identifier des mutations de gènes associées à la résistance aux antibiotiques³¹⁻³⁴. Parmi eux, le PZA dont la résistance des mycobactéries est associée à des mutations sur le gène *pncA*³⁰. La difficulté liée au test phénotypique du PZA a encouragée un diagnostic génétique et certaines études mentionnent que 72 à 97% des isolats cliniques résistants au PZA ont une mutation dans *pncA*. Cinquante pourcent des isolats multirésistants (MDR) et 93% des isolats MDR également résistants aux fluoroquinolones (FQs) sont résistants au PZA³⁵. Nous avons mené une étude visant à déterminer l'ordre d'apparition de la résistance au PZA par rapport à l'acquisition de la résistance à l'isoniazide (INH) et à la rifampicine (RIF), en d'autres termes, la résistance au PZA apparaît-elle chez les souches mono-résistantes à l'INH ou après l'acquisition de la résistance à la RIF, correspondant à l'état MDR ?

Tout particulièrement dans le domaine des mycobactéries, la révolution majeure qu'apportent ces tests reposant sur l'analyse de la macromolécule d'acide d'ADN est de s'affranchir du délai inhérent à la culture (on passe de 3 ou 4 semaines à quelques heures) pour obtenir les identifications, les sensibilités aux antituberculeux et les génotypes^{19, 27, 36}. Des études montrent qu'il est possible, à partir d'une expectoration, d'amplifier par PCR des loci pour identifier l'espèce mycobactérienne³⁶⁻³⁹ et détecter les mutations génétiques associées à des résistances aux antituberculeux^{27, 36, 40, 41} (établissement d'un antibiogramme moléculaire). Cependant, ces tests présentent des limites (spécificités de certaines amorces, faible charge mycobactérienne dans l'échantillon, inhibiteurs de la réaction PCR)^{27, 36, 37, 39, 41}. Toutefois, pour ceux d'entre eux aillant fait l'unanimité auprès de la communauté scientifique (tests LiPA, GeneXpert MTB/RIF), elles ne fournissent que les informations relatives à la sensibilité de la souche mycobactérienne à la rifampicine et/ou à l'isoniazide^{18-20, 42-44}. De ce fait, le développement et l'amélioration des techniques d'analyses par PCR apparaissent nécessaire comme l'alternative à la culture pour améliorer les performances du diagnostic de la TB, en particulier dans les pays en développement.

Parmi ces pays en développement, le Gabon est un état de l'Afrique Centrale situé sur la façade Atlantique. C'est le pays le moins peuplé de la sous-région avec une densité de 6,83 habitants au kilomètre carré⁴⁵. Le Gabon est parmi les pays à forte prévalence de TB dans le monde^{2, 46}. Le diagnostic de la TB y est assuré par la bacilloscopie et l'observation clinique des cas de succès ou d'échecs thérapeutiques et de rechutes⁴⁷⁻⁵¹. Dans cette étude, nous proposons de réaliser une description de la TB dans la capitale Libreville par la biologie moléculaire en identifiant les différents profils de résistances aux antituberculeux employés pour le traitement et en réalisant un génotypage des bacilles. Pour y parvenir, nous avons utilisé la technologie GeneXpert/Xpert (MTB/RIF, Cepheid) récemment acquise par l'Unité de Recherche et de Diagnostics Spécialisés (URDS) du Laboratoire National de Santé Publique (LNSP) de Libreville. De façon pratique, les échantillons cliniques sont analysés par l'automate GeneXpert pour confirmer le diagnostic de la TB et pour détecter la résistance à la RIF. Une partie du reste de la solution n'ayant pas servie au test GeneXpert subit un traitement spécial pour permettre d'amplifier par PCR et de séquencer certains loci dans l'objectif d'identifier les mutations conférant les résistances aux antituberculeux et le spoligotypage pour déterminer la structure de la population bacillaire.

INTRODUCTION

CHAPITRE I : ÉPIDÉMIOLOGIE DE LA TUBERCULOSE

I. Épidémiologie Mondiale de la tuberculose

La TB demeure une menace persistante et majeure en matière de santé publique mondiale. Selon l'OMS ², en 2014, environ 9,6 millions de personnes ont été infectées dont 5,6 millions d'hommes contre 3,2 millions de femmes (sexe ratio 1,7) avec approximativement 800 000 enfants (personnes âgées de moins de 15 ans). Parmi les cas prévalant chez les adultes, 1,5 million de personnes ont succombé à l'infection chronique dont 400 000 étaient atteintes du Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH). La prévalence de la TB varie grandement d'une région sanitaire OMS à une autre (Figure 1). C'est dans les pays en développement d'Asie du Sud-est, du Pacifique occidental et de l'Afrique que l'impact de la TB sur la santé publique humaine est le plus marqué ^{2, 14}. La région sanitaire pacifico-asiatique et la région africaine constituent les principaux foyers infectieux avec respectivement 58% et 28% des cas mondiaux de TB, tandis que les régions de la Méditerranée Occidentale et Euro-Américaine ne représentent que 8% et 6% de la prévalence universelle de la TB ².

Globalement, en raison de leur forte prévalence (seuil > 10 000 cas par an), 22 pays sont identifiés comme étant des états à forte incidence de TB. Ils sont localisés en Afrique (9 pays), dans le Pacifique Occidental (6 pays), en Asie du Sud-Est (3 pays), en Méditerranée Occidentale (2 pays), en Amérique (Brésil) et en Europe (Fédération de Russie). Et si d'une part, l'ensemble de ces pays compte pour 83% des cas mondiaux de TB, d'autre part l'Inde, l'Indonésie et la Chine représentent à elles seules 43% des cas globaux de TB (respectivement 23%, 10% et 10%). S'agissant de la mortalité, l'Afrique et l'Asie du Sud-Est sont particulièrement touchées ; on y enregistre respectivement 90% et 80% des décès globaux.

L'analyse détaillée des données met en relief certaines particularités épidémiologiques intrinsèques à chaque région sanitaire. L'Afrique affiche les plus fortes proportions d'incidence, de prévalence et de mortalité, respectivement de 281, 330 et 46 cas pour 100 000 habitants en partie due à la co-infection avec le VIH. Bien que la co-infection TB-VIH fasse de nombreuses victimes en Afrique et particulièrement en Afrique du Sud, Mozambique et en République Démocratique du Congo, on observe que c'est en Europe et en Asie Centrale que l'on retrouve la plus grande prévalence de TB multirésistante (TB-MDR), soit 75% des 480 000 cas mondiaux (3,3% chez les nouveaux cas et 20% chez les sujets en

échec/rechute thérapeutique)^{2, 14}. Cette partie de l'Eurasie regroupe 27 pays à forte incidence de TB-MDR dont la Biélorussie, l'Estonie, le Kazakhstan, le Kirghizistan, la Fédération de Russie, l'Ukraine, etc. La TB ultrarésistante (TB-XDR), quant à elle, représenterait 9,7% des cas de TB-MDR mondial et là encore, c'est en Eurasie (Biélorussie, Lettonie et Géorgie) que l'on retrouve les pourcentages les plus élevés, soient respectivement 29%, 19% et 15%. Sur la thématique des co-infections TB-VIH, l'Afrique compte à elle seule 32% des patients ce qui représente 74% des cas diagnostiqués à travers le monde. L'Afrique australe rassemblerait près de 50% de la prévalence des cas de co-infections TB-VIH en Afrique^{2, 14}.

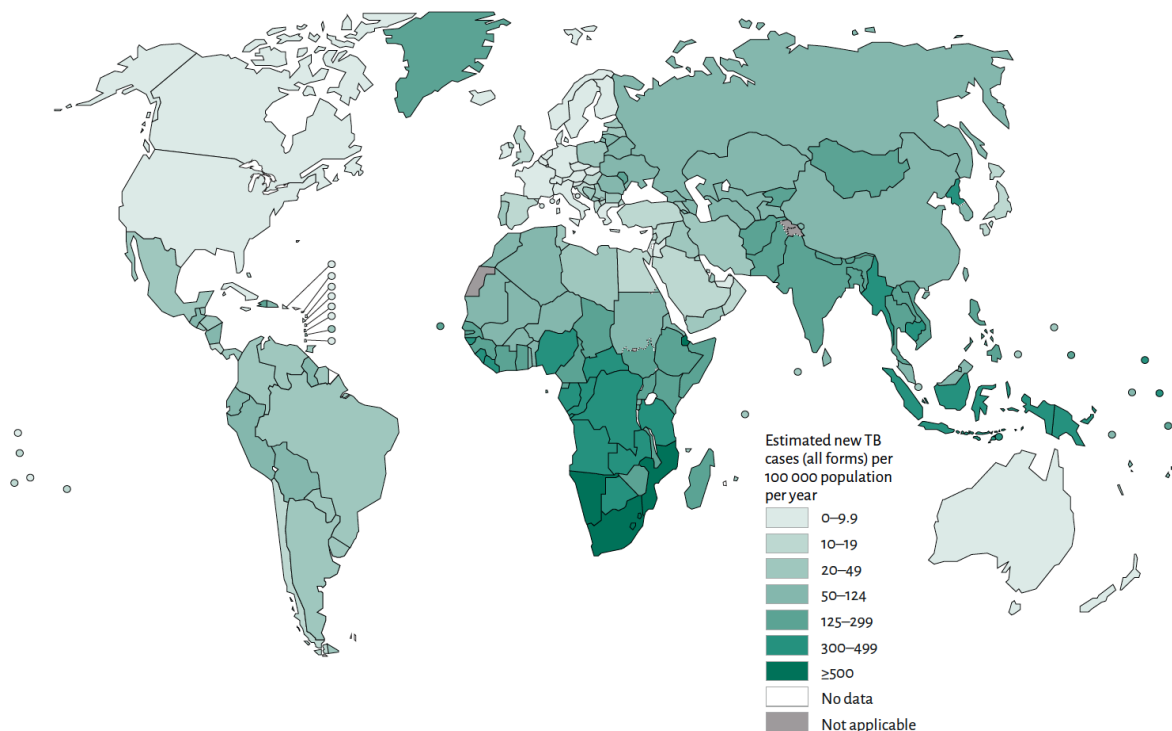


Figure 1 : estimations de l'incidence de la tuberculose pour les différents pays du monde².

En ce qui concerne le traitement, globalement, 87% des nouveaux cas ont pu être traités avec succès en 2011. En Afrique, en Amérique et en Europe, les taux d'issues thérapeutiques favorables chez les nouveaux cas de TB sont estimés à hauteur de 70% mais le taux relatif à la TB-MDR est généralement plus faible¹⁴.

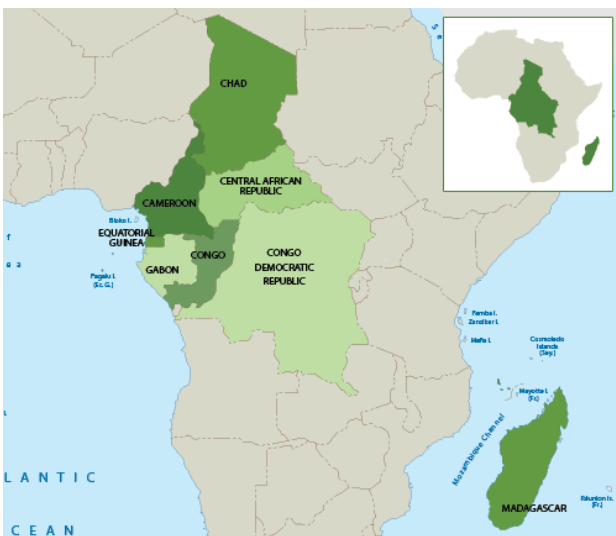
Outre la TB pulmonaire (TBP) active, il existe une autre menace qui semble être éclipsée de la scène médiatique : l'infection tuberculeuse latente (ITBL) ou TB latente (TBL). Elle se définit comme étant l'instauration et le maintien de réponses immunitaires aux antigènes de *M.*

tuberculosis acquis antérieurement et de manifestations asymptomatiques. Selon l’OMS, près d’un tiers de la population mondiale serait infectées de façon latente par *M. tuberculosis*. Bien qu’elle soit difficile à diagnostiquer, la véritable menace vient du fait qu’au cours de leur vie, 5-10% des sujets ayant une ITBL développeront une TB pulmonaire active au cours des 2-5 années post-infection^{52, 53}. De plus, ce risque d’activation est encore plus grand lorsque ces personnes réunissent certains facteurs intrinsèques critiques tels que la co-infection avec le VIH, le diabète, la malnutrition, le traitement aux immunosuppresseurs, etc.⁵⁴.

II. Épidémiologies de la tuberculose au Gabon

A. Situation géographique et démographie

Le Gabon est un pays de la zone équatoriale de l’Afrique Centrale ouvert à l’Ouest sur l’Atlantique⁴⁵ (Figure 2). Le pays s’étend sur une superficie de 267 667 km². La forêt couvre 80% du territoire national. Le pays possède une des démographies les plus faibles de la sous-région avec une population estimée à 1 671 711 habitants, soit une densité de 6,83 habitants/km²⁵⁵. Quatre-vingts pourcent de la population nationale vit en zone urbaine; les villes principales, Libreville et Port-Gentil concentrant près de 50% des habitants^{45, 55}.



<http://www.afdb.org/en/countries/central-africa/>



<http://www.e-evasion.com/carte-gabon-images/>

Figure 2 : localisation géographique du Gabon dans le monde et présentation des divisions administratives provinciales.

Gauche : vue partielle de l’Afrique présentant les états membre la région centrale. Droite : divisions administratives provinciales du Gabon.

B. Carte sanitaire du Gabon

Administrativement, le pays est divisé en 9 provinces (Figure 1, droite) ⁵⁵. Celles-ci reflètent également les 9 régions sanitaires (Figure 3) ⁵⁶. En 2013, on dénombrait dans l'ensemble du territoire 17 structures de santé de "Diagnostic et Traitement de la TB (CDT)" et 3 "Centres de Traitements (CT)" dédiés au traitement de la TB. Le "Programme National de Lutte contre la Tuberculose" (PNLT) est l'organe sanitaire en charge de la TB. Il coordonne les activités de prophylaxie et dresse le profil épidémiologique de la TB au travers des données d'examen cliniques et bactériologiques (bacilloscopie) effectués par les laboratoires des 9 régions sanitaires.

C. Traitement de la tuberculose

Dans l'ensemble, faute de pouvoir déterminer le profil de résistance de la souche étiologique, les patients nouvellement diagnostiqués sont systématiquement traités avec le régime standard de première intention de 6 mois, lequel inclut 2 mois de chimiothérapie intensive avec la RIF, l'INH, le PZA et l'Ethambutol (EMB) suivi de 4 mois de continuation avec la RIF et l'INH ^{46, 56}. Chez les patients régulièrement suivis durant le traitement, la suspicion de TB-MDR est évoquée au terme de la phase intensive lorsque l'état de santé du patient ne s'améliore pas et que la charge bacillaire dans les expectorations demeure constante comparativement avec le test initial de diagnostic ^{47, 48}. Chez les nouveaux cas de TB, la présomption de TB-MDR est établie au terme des 6 mois de traitement avec le régime de première ligne. Elle est renforcée lorsque le traitement échoue une seconde fois au terme de 8 mois de thérapie décomposée en 2 mois de traitement sous RIF, INH, PZA, EMB et la streptomycine (SM), 1 mois de RIF, INH, PZA et EMB avec enfin 5 mois de RIF et d'INH ⁵⁶.

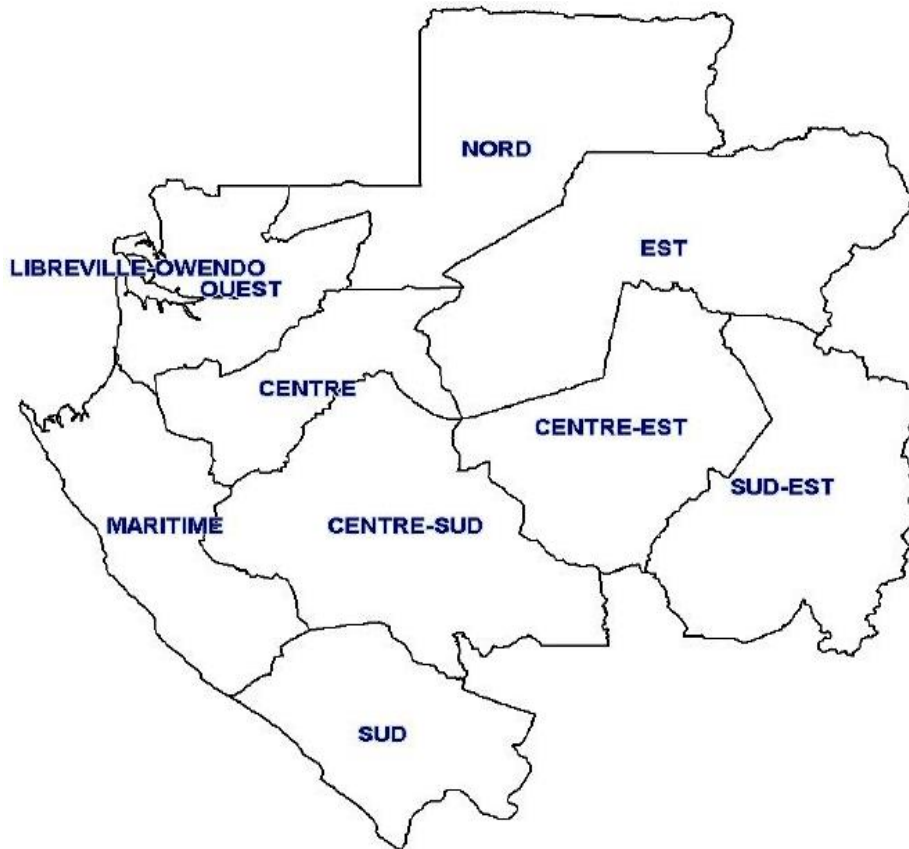


Figure 3 : présentation des 9 régions sanitaires au Gabon ⁵⁶.

D. Évolution de la tuberculose au Gabon entre 2001 et 2013

Le PNLT fût institué en 1997, c'est dès 2000 qu'apparaissent les premières véritables données épidémiologiques sur la TB au Gabon, bien que parcellaires et surtout plus focalisées sur la région sanitaire Ouest (Libreville et Owendo) et centre (Lambaréné) du fait de la présence de laboratoires équipés ⁴⁶. Entre 2001 et 2014, le nombre de cas diagnostiqués positifs par microscopie et/ou par la clinique est passé de 1 574 à 6 299 cas ; c'est dans les deux régions sanitaires citées précédemment que l'on retrouve les plus grands nombres de cas de TB pulmonaire du pays, en particulier, la région Libreville-Owendo comptant à elle seule pour 50% des cas notifiés ^{46, 48, 50}.

Selon le rapport de l'OMS, le Gabon est classé parmi les 10 pays à forte incidence de TB avec une incidence et une mortalité respective de 450 et de 55 cas pour 100 000 habitants ². La TB sévit principalement dans la tranche d'âge 15-54 ans qui représente 80% des cas notifiés à microscopie positive caractérisée par une prédominance masculine ^{2, 50}. Parmi les 6 299 cas

détectés en 2014, 15% (913) étaient en situation d'échec et de rechute ². La prise en charge des patients et donc la couverture du programme DOTS est de mauvaise qualité ; déjà en 2006, la proportion nationale de patients sous traitement perdus de vue et/ou interrompant le traitement pour diverses raisons atteignait 45% associé à un taux de guérison de 34% ^{47,48}. En raison de laboratoires sous-équipés, le PNLT ne peut pas mener à bien sa mission de diagnostic des cas de TB-MDR et UR. Les avancées dans ce domaine sont venues des initiatives des instituts de recherches privés tels que le "Centre des Recherches Médicales de Lambaréné" (CERMEL), le "Centre International de Recherches Médicales de Franceville" (CIRMF) et publiques comme l'Hôpital d'Instructions des Armées Omar BONGO ONDIMBA ^{46,56,57}. En 2012, une étude portant sur 24 patients suspectés d'avoir une TB-MDR a montré que 13 d'entre eux avaient une TB-MDR et 3 une TB-XDR confirmées par la culture ⁵⁷. Toutes présentaient en plus une résistance phénotypique à la SM, aux fluoroquinolones (FQs), la Clarythromycine (CLA), la Linézolide (LZD), l'Acide Para-aminosalicylique (PAS), l'Éthionamide (ETH), la Cyclosérine (CS) ou l'Amikacine (AMK) ⁵⁷. En 2016, une étude menée à Lambaréné sur un échantillonnage de 108 expectorations mises en culture liquide montre que 4% (4/91) des nouveaux cas et 31% (4/13) des sujets en échec/rechute thérapeutique ont une TB-MDR ⁴⁶. Sur le plan national, on estime que 10% des cas de TB seraient des TB-MDR. Selon l'OMS cette prévalence est établie à 2,2% chez les nouveaux cas et à 11% chez les sujets en échec/rechute thérapeutique ^{2,47,48}. Jusqu'à lors, le PNLT ne dispose pas de traitement contre les TB-MDR et UR ⁵⁶, mais l'OMS a récemment approuvé la mise en œuvre de tels traitements au Gabon.

La situation sur la co-infection TB-VIH est, quant à elle, assez mal documentée. De façon globale, avec une séroprévalence VIH de 4% au sein de la population gabonaise adulte (http://www.unicef.org/infobycountry/gabon_statistics.html#116), l'épidémie de TB est caractérisée par une forte charge de co-infection avec le VIH. On estime que 5-19% des patients tuberculeux sont co-infectés par le VIH ^{2,48,58}, et selon le rapport du PNLT daté de 2014, 49 et 52% de ces patients ont été mis sous cotrimoxazole (CTX) et antirétroviraux entre 2008 et 2010 ⁵⁶.

Les proportions sur les réussites et les échecs thérapeutiques sont assez mal documentées. En 2010, Toung Mve *et al.*, ⁴⁷ font mention de 34% de succès thérapeutique chez les nouveaux cas de TB pulmonaire alors que le rapport décennal du PNLT de 2014 le situe entre

57 et 68%⁵⁶.

E. Les obstacles à la lutte antituberculeuse efficiente au Gabon

La lutte contre la TB au Gabon est menée dans un contexte assez difficile où se mêlent bon nombre d'handicaps structuraux et fonctionnels. Le matériel de base fait parfois défaut, les colorants de Ziehl-Neelsen et les antibiotiques viennent souvent à manquer en raison de l'insuffisance du budget alloué^{47, 56}. De plus, la répartition du personnel et donc des compétences et des équipements entre les zones rurales et urbaines est inéquitable, en effet, cette répartition est largement déficitaire en faveur des zones rurales. Ceci contraint les populations rurales (pour ceux disposant de ressources financières suffisantes) à effectuer des déplacements vers Libreville (Ouest) ou Lambaréné (centre) pour être pris en charge par les services de santé^{51, 56}. En dehors de Libreville et de Port-Gentil (Ogooué-Maritime) qui sont entièrement des zones urbaines, les autres provinces sont semi urbaines et semi rurales. Selon une étude socio-anthropologique menée en 2013 à Lambaréné, ville semi urbaine et semi rurale, il ressort que la lutte contre la TB y est menée de manière passive. La population manque d'informations basiques pour reconnaître les symptômes de l'infection tuberculeuse, de fait, elle associe la pathologie à des croyances d'ensorcellement mystique et pratique l'automédication⁵¹. Pour 50% des 30 patients tuberculeux inclus dans l'étude, le premier choix de traitement était tourné vers la médecine traditionnelle basée sur l'emploi de plantes médicinales et pour 27% vers l'automédication. Le choix de la consultation hospitalière n'intervenait qu'en dernier recours (2 semaines à 2 ans) après le développement des symptômes compromettant leur état de santé général.

CHAPITRE II : GÉNÉRALITÉS SUR LE COMPLEXE *Mycobacterium tuberculosis*

Le genre *Mycobacterium* (*M.*) compte plus de 150 espèces de bactéries réparties en deux principaux groupes. Le premier groupe est celui des mycobactéries atypiques (MA) encore appelé mycobactéries non-tuberculeuses (MNT), pathogènes occasionnels pour l'homme. Toutefois, *M. leprae* et *M. ulcerans*, espèces non cultivables ou difficilement cultivables, se démarquent par leur pathogénicité avérée pour l'homme. Le second groupe dénommé "Complexe *Mycobacterium tuberculosis*" (CMT) compte neuf espèces mycobactériennes à savoir ⁵⁹⁻⁶² :

Les 5 membres traditionnels :

- *M. tuberculosis* (*sensu stricto*), principal agent infectieux du genre humain ;
- *M. bovis*, affecte le bétail et aussi l'homme ;
- *M. bovis*-Bacille de Calmette et Guérin (BCG), souche atténuée, employée comme vaccin contre la TB ;
- *M. africanum*, responsable des infections tuberculeuses humaines dans certaines régions d'Afrique ;
- *M. microti*, pathogène traditionnel des rongeurs, affecte aussi les humains sidéens ;

Les espèces récemment caractérisées :

- *M. canettii*, affecte l'homme ;
- *M. caprae*, affecte les chèvres ;
- *M. pinnipedii*, pathogène essentiel des pinnipèdes pouvant infecter le genre humain ;
- *M. mungii*, identifié chez les chimpanzés sauvages d'Afrique de l'Ouest.

I. Description du complexe *Mycobacterium tuberculosis*

A. Taxonomie des mycobactéries

La taxonomie classe les cellules du CMT dans le règne des procaryotes (*Bacteria*), à l'embranchement ou phylum et à la classe des *Actinobacteria*, la sous-classe des

Actinobacteridae, à l'ordre des Actinomycétales, le sous-ordre des *Corynebacterineae*, à la famille des *Mycobacteriaceae* et au genre *Mycobacterium* (Tableau I).

Au cours de ce manuscrit, par l'emploi de la terminologie **complexe *Mycobacterium tuberculosis*** nous ferons allusion aux espèces *M. tuberculosis sensu stricto*, *M. africanum* et *M. bovis*, espèces les plus fréquemment identifiées (99%) dans les cas d'infections humaines⁶³.

Le genre humain constitue sa principale niche écologique, toutefois, l'espèce peut également infecter les primates non-humains, les animaux domestiques et sauvages ayant un contact étroit avec l'homme et inversement⁶⁴⁻⁶⁶. À l'exception de *M. bovis* et *M. bovis*-BCG, les autres espèces du CMT sont naturellement sensibles au PZA. Elles sont ubiquitaire sur l'ensemble des cinq continents^{67, 68}. Leur croissance sur le milieu Löwenstein-Jensen (LJ) requière 3 ou 4 semaines au minimum (plus pour *M. bovis*).

Tableau I : Taxonomie des bactéries du CMT d’après la "Taxonomie résumée des *Archaea* et *Bacteria*", selon le "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" de G. M. Garrity⁶⁹ et la "List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature" de J.P. Euzéby (<http://www.bacterio.cict.fr>).

Règne	Embranchement	Classe	Sous-classe	Ordre	Sous-ordre	Famille	Genre					
Procaryotes	Archaea											
	Bacteria											
				Actinomycetales	Actinomycineae	Corynebacteriaceae						
					Micrococcineae							
					Corynebacterineae	Dietziaceae						
					Micromonosporineae	Mycobacteriaceae → Mycobacterium						
					Propionibacterineae	Nocardiaceae						
					Pseudonocardineae	Segniliparaceae						
					...	Tsukamurellaceae						
					Jiangellineae	Nocardiaceae						
				Bifidobacteriales								

B. Les caractères morpho-génotypiques des espèces du complexe *Mycobacterium tuberculosis*

1. Les caractères phénotypiques

Au microscope, les mycobactéries du CMT se présentent sous forme de bâtonnets d'où leur dénomination de bacilles ; ils sont légèrement incurvés et se regroupent volontiers en amas. Ils mesurent entre 1 et 10 μm de long pour 0,2 à 0,6 μm de large et ne disposent d'aucun appareil de locomotion (flagelles).

En tant que procaryote, c'est-à-dire des organismes sans noyau véritable délimité par la membrane nucléaire, les mycobactéries ont une structure physique commune à celle des autres cellules à paroi bi-membranée : présence de deux membranes superposées, la membrane interne ou membrane cytoplasmique et la membrane externe ou enveloppe cellulaire encore appelée paroi cellulaire (Figure 4). La paroi des mycobactéries présente une constitution biochimique exceptionnelle en phospholipides et en lipopolysaccharides⁷⁰. Celle-ci confère aux cellules la résistance à la lyse osmotique et à l'action de la plupart des détergents et acides usuels. Cependant les bacilles sont sensibles à l'alcool, à l'iode, au formol et aux solutions d'hypochlorites. L'enveloppe cellulaire constitue également la première ligne de défense de la mycobactérie contre l'action des antibiotiques par son imperméabilité.

L'enveloppe cellulaire se compose de trois macromolécules distinctes dont l'agencement de l'espace périplasmique vers le milieu extérieur laisse apparaître successivement les macromolécules ou couche de peptidoglycane (PG), d'arabinogalactan (AG) et celle formée par les acides mycoliques (AM/MA) (la plus externe). Agencées de la sorte, les couches forment une structure vitale pour la cellule dénommée le "complexe mycolyl-arabinogalactan-peptidoglycan" (mAGP) (Figure 4)^{70, 71}.

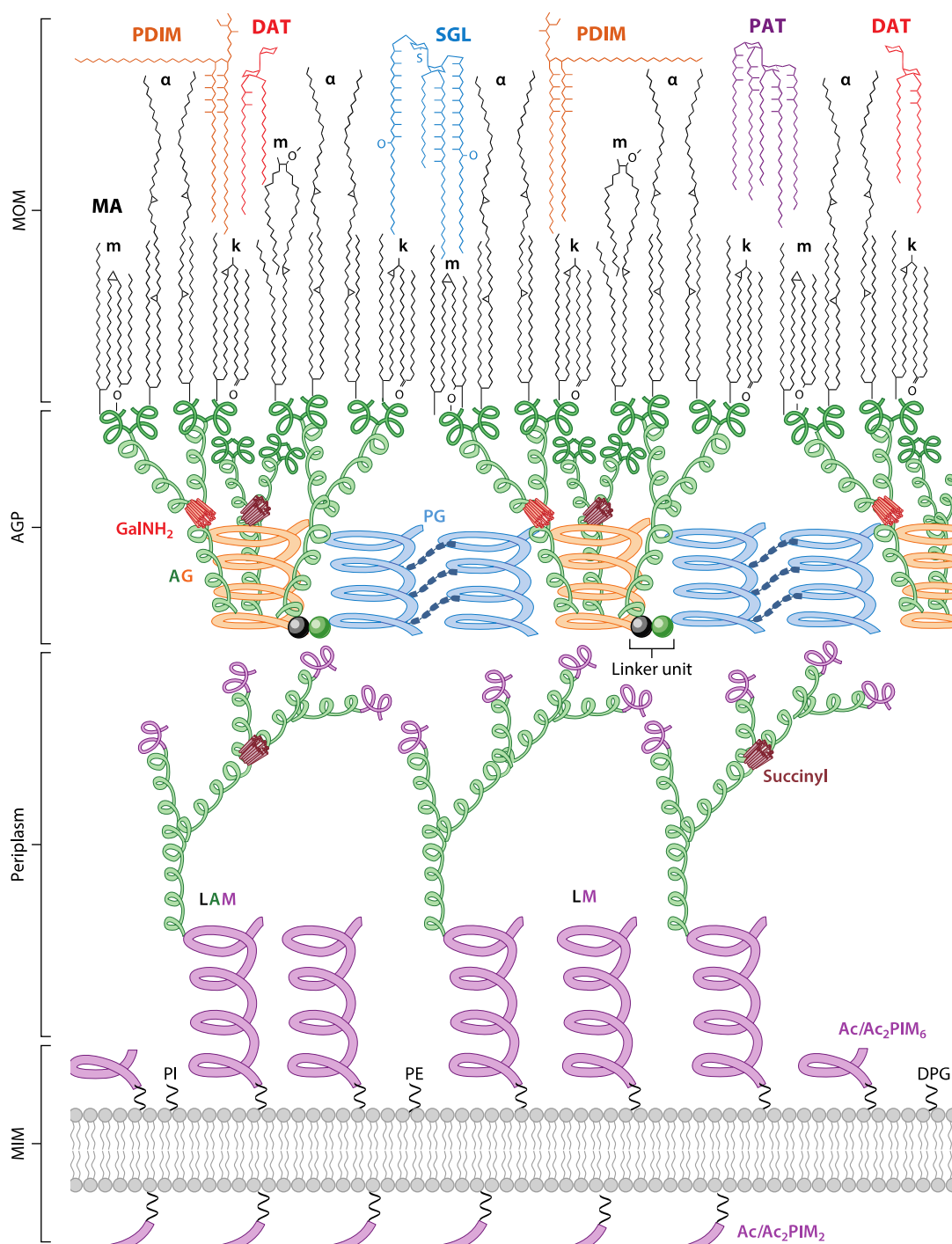


Figure 4 : schématisation de la paroi des mycobactéries montrant les trois principales couches

71.

AG = arabinogalactan ; AGP = complexe arabinogalactan-peptidoglycane ; DAT = diacyltrehalose ; DPG = diphosphatidylglycerol ; LAM = lipoarabinomannan ; LM = lipomannan ; MA = acides mycoliques ; MIM = membrane interne mycobactérienne ; MOM = membrane externe mycobactérienne ; PG = peptidoglycan.

a. Le peptidoglycane (PG)

Le peptidoglycane (PG) ou la muréine constitue l'ossature du mAGP (Figure 4 et 5). Il est constitué de N-acétyl-glucosamine (NAG) et de l'acide N-acétyl-muramique (ANAM) liés de manière alternative par des liaisons dénommées β (1 $\rightarrow$ 4). Les différents niveaux de polymérisation verticale de cette structure (NAG et ANAM), reliés par des ponts interpeptidiques (chaînes tétra-peptidiques) sont à l'origine de l'épaisseur du peptidoglycane des mycobactéries (Figure 4 et 5). Afin d'être une partie intégrante de la cellule, le peptidoglycane est relié à la membrane cytoplasmique grâce à des protéines intrinsèques et extrinsèques de la bicouche lipidique (membrane plasmique) ^{70, 71}.

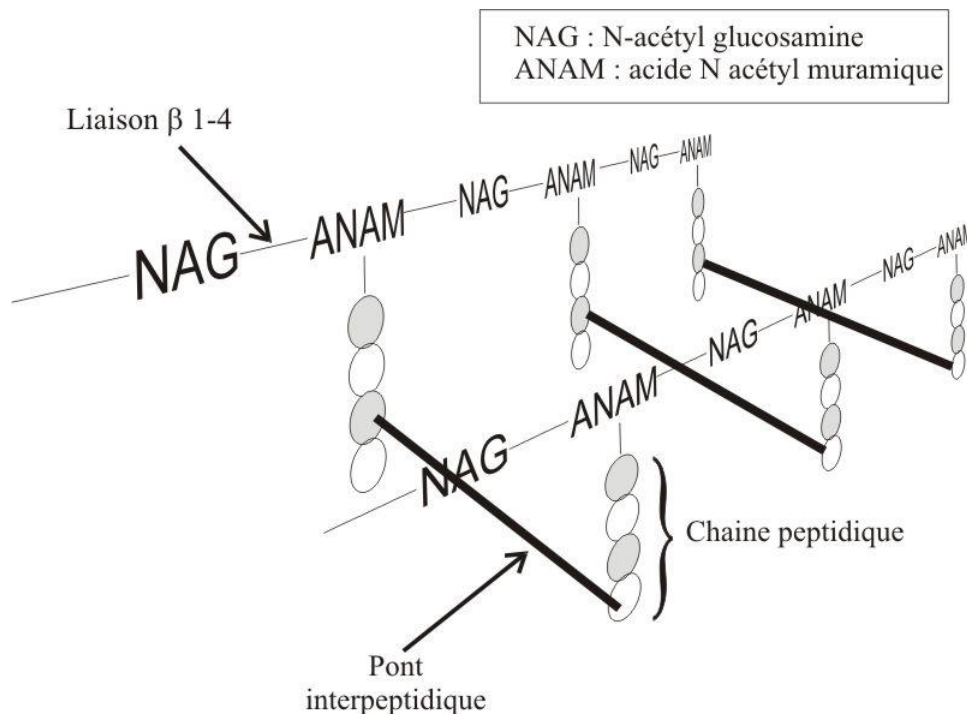


Figure 5 : structure et organisation du peptidoglycane des mycobactéries

<http://www.ebiologie.fr/upload/documents/peptidoglycane-294.jpeg>.

b. L'arabinogalactan (AG)

L'arabinogalactan (AG) est un polymère formé d'une unité de galactan (G) et de deux à trois unités d'arabinan (A). L'AG est reliée au PG par le galactan via une liaison covalente (Figure 4) ⁷¹.

c. Les acides mycoliques (AM)

Les acides mycoliques sont des acides gras saturés pourvus d'une chaîne carbonée courte (C20 à C26) α -alkylée et d'une chaîne carbonée longue (C60 à C90) et β -hydroxylée (Figure 4)^{70, 71}. L'enveloppe des bactéries des espèces du genre *Mycobacterium* est très riche en acides mycoliques. Elles représentent 20 à 45 % de la composition de la bactérie ce qui leur vaut la dénomination de mycobactérie ou de cellule mycobactérienne.

2. Les caractères génotypiques

a. Origine de la notion de clones cellulaires

Les espèces du CMT forment un groupe très compact. Cette homogénéité a été établie avec les premières études de génomique en procédant à des hybridations entre les génomes des cellules de ce groupe. Les résultats obtenus révélaient une complémentarité maximale >95% entre le génome de *M. bovis* et celui de *M. tuberculosis*^{64, 72-74}. En effet, les génomes de la souche virulente H73Rv de *M. tuberculosis* et celle de l'espèce *M. bovis* se caractérisent par une proportion élevée de guanine+cytosine (G+C), 65,6%⁷⁵.

b. Les éléments chromosomiques répétés employés en génotypie

En dépit de leur fort degré de similarité génotypique, la structure de la population bacillaire du CMT est très diversifiée⁷⁶⁻⁸⁰. La mise en évidence de cette hétérogénéité est effective en faisant usage du polymorphisme de certaines séquences spécifiques utilisées comme marqueurs génétiques⁸¹⁻⁸³.

i. La région Direct Repeat (DR)

Le locus "Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats ou CRISPR" (5 kilobases = kb) est une région chromosomique unique composée d'éléments génétiques répétés⁸³ présente aussi bien chez les *Archaea* (~90%) que chez les *Bacteria* (~40%)⁸⁴. Le locus CRISPR est souvent adjacent aux locus *cas* (Figure 6) qui codent pour des protéines de familles hétérogènes ayant des domaines fonctionnels typiques des nucléases, hélicases, polymérases

etc. Combinés, les loci CRISPR et *cas* forment le système CRISPR-Cas impliqué dans l'immunité adaptative des procaryotes face aux bactériophages et aux plasmides exogènes^{84, 85} (Figure 6).

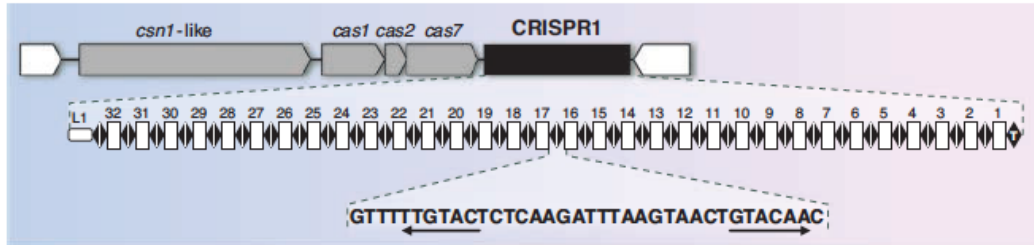


Figure 6 : aperçu de la structure d'un des quatre systèmes CRISPR/Cas (ici le système 1) de *Streptococcus thermophilus* DGCC7710⁸⁴.

Le locus CRISPR se compose de nombreux éléments répétés de séquence unique (losage noir) non contiguës dénommés Direct Repeat (DRs) de 36 pb séparés les uns des autres par des séquences uniques et variables de 35 à 41 paires de bases (pb) appelées spacers (rectangles blancs) (Figure 6). Ceux-ci correspondent à des séquences génomiques de pathogènes assimilés⁸³. Chez les espèces du CMT, le locus CRISPR, dénommé tout simplement par la région DR a été mis en évidence par Hermans *et al*,⁸⁶ chez la souche vaccinale *M. bovis*-BCG. La région DR des cellules du CMT est structurée en plusieurs éléments "Direct Variable Repeat" (DVRs) d'au moins 70 pb. Chaque DVR se compose d'une séquence DR et d'un spacer⁸³. Signalons toutefois que la région DR est un site préférentiel d'intégration des séquences d'insertion 6110 (IS6110), et la transposition de tels éléments génétiques au sein de la région DR aboutit inexorablement à la perte définitive du spacer et/ou du DVR⁸⁶. La technique mettant à profit les variations nucléotidiques de la région DR pour le génotypage des souches tuberculeuses chez l'homme est désignée sous le terme de spoligotypage.

ii. Les mini-satellites et les Mycobacterial Interspered Repetitive Units

Les mini-satellites ou Variable Number Tandem Repeat (VNTR) sont des régions du chromosome bactérien dans lesquelles une séquence particulière d'ADN est répétée en tandem de façon variable un certain nombre de fois⁸⁷⁻⁸⁹. Ces séquences sont très polymorphes et leurs nombres d'unités de répétition varient grandement au sein du génome

d'un individu et aussi entre individus, ce qui fait d'eux d'excellents marqueurs génétiques de discrimination employés en génétique animale.

Chez les mycobactéries du CMT, on note la présence de VNTRs⁹⁰ et d'autres séquences répétées dénommées Mycobacterial Interspered Repetitive Units (MIRU). Le nombre de MIRUs est estimé entre 40 et 50 unités de 40 à 100 pb^{81, 91} (Figure 7). Leur fonction demeure inconnue. Cependant, étant donné que leur position au sein des génomes mycobactériens n'est pas toujours conservée, on pense qu'elles ne joueraient aucun rôle majeur dans l'expression génique mais pourraient avoir un important rôle dans la structure ainsi que dans l'évolution du génome⁹¹. L'association des marqueurs MIRU et les autres VNTRs a permis de mettre au point la technique de typage dénommée MIRU-VNTR⁹².

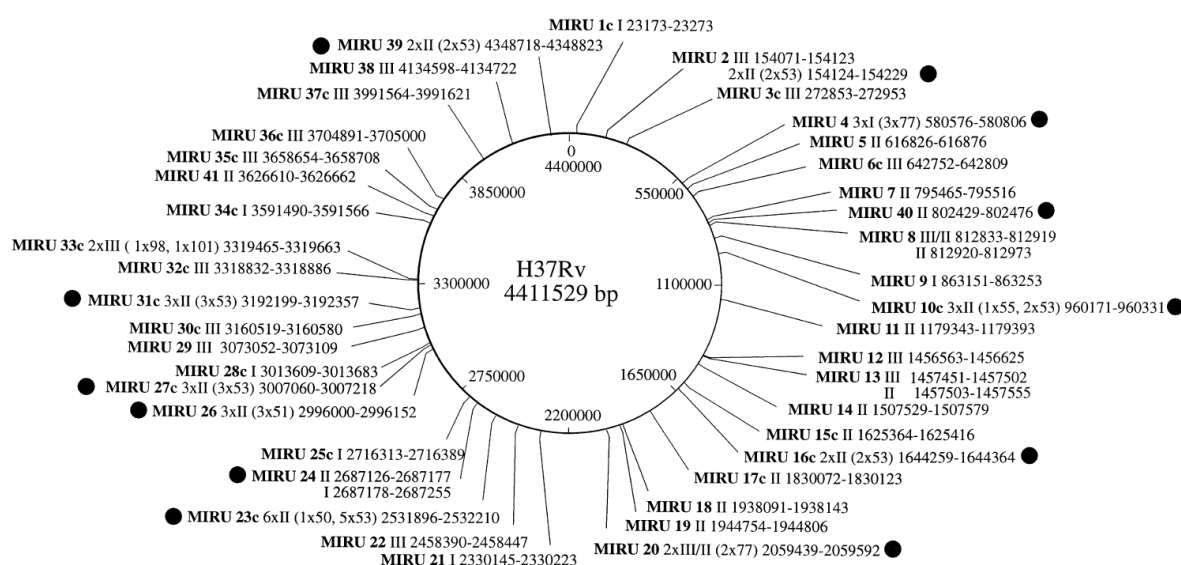


Figure 7 : position des 41 loci MIRU au sein du chromosome de *M. tuberculosis* H37Rv.

Les chiffres arabes en gras spécifient le numéro du MIRU. Le 'c' sert à signaler que l'orientation des MIRUs correspondant est inversée comparativement à celle définie par Cole et al. (1998).

Les chiffres romains identifient le groupe du MIRU (type I, II ou III). La position exacte des loci MIRU est donnée par les nombres arabes situés après le type de MIRU. Les 12 loci polymorphes/contenant des nombres variables de MIRU parmi les 31 souches analysées sont indiqués par des points noirs⁸¹.

iii. Les régions de différences

Les Régions de Différences (RD) sont des régions génétiques très polymorphes dispersées tout au long du chromosome mycobactérien (Figures 8 et 9). Au sein du CMT, on en dénombre 14 (RD1 à RD14). Elles sont longues de 2 à 13 kb et recèlent de nombreuses Open Reading Frames (ORF) codant pour diverses protéines (ESAT-6 system, Phospholipases C (MPT40), PE et PPE, etc.) dont certaines joueraient un rôle majeur dans la virulence des souches et l'activation de la réponse immunitaire de l'hôte⁹³⁻⁹⁵. Le polymorphisme de ces séquences repose essentiellement sur les phénomènes de réarrangements dus aux événements délétères uniques, irréversibles et successifs⁹³.

A. Structure de la population des souches du complexe *Mycobacterium tuberculosis*

Les mycobactéries du CMT sont des espèces dites clonales et en dépit de ce caractère, les marqueurs génétiques mentionnés précédemment révèlent que la structure de la population est fortement diversifiée et cela tant à l'échelle d'une nation, d'une région, qu'à l'échelle mondiale⁶⁷.

Jusqu'en 2013, le CMT comptait 6 principaux lignages dont les noms reflètent les aires continentales dans lesquelles ils sont représentés^{67,77} (Figure 10). Le lignage 1 (Indo-Oceanic) sévit dans les pays autour de l'océan Indien, le lignage 2 (East Asian) domine dans les pays asiatiques de l'Est, le lignage 3 (East-African-Indian) est établi dans la région Est de la corne de l'Afrique, le lignage 4 (Euro-American) se retrouve en Europe et en Amérique, les lignages 5 et 6 dénommés West-African 1 et West-African 2 prédominent respectivement en Afrique de l'Ouest, autour du golfe de Guinée et à l'Ouest de l'Afrique de l'Ouest (Sierra Leone, Sénégal, etc.)^{67,68,96}. Dans leur étude de 2013 en Éthiopie, Firdessa *et al.*,⁹⁷ ont identifié un nouveau lignage, le lignage 7. Le lignage 4 est l'unique lignage qui compte de nombreux sous-lignages qui en dehors de la zone euro-américaine prédominent dans de nombreuses régions en Afrique, au Moyen-Orient, et partiellement en Eurasie. En outre, l'Afrique est la seule région dans laquelle on retrouve l'ensemble des 6 principaux lignages (Figure 10), ce qui suggère que la région soit son berceau d'origine⁶⁷.

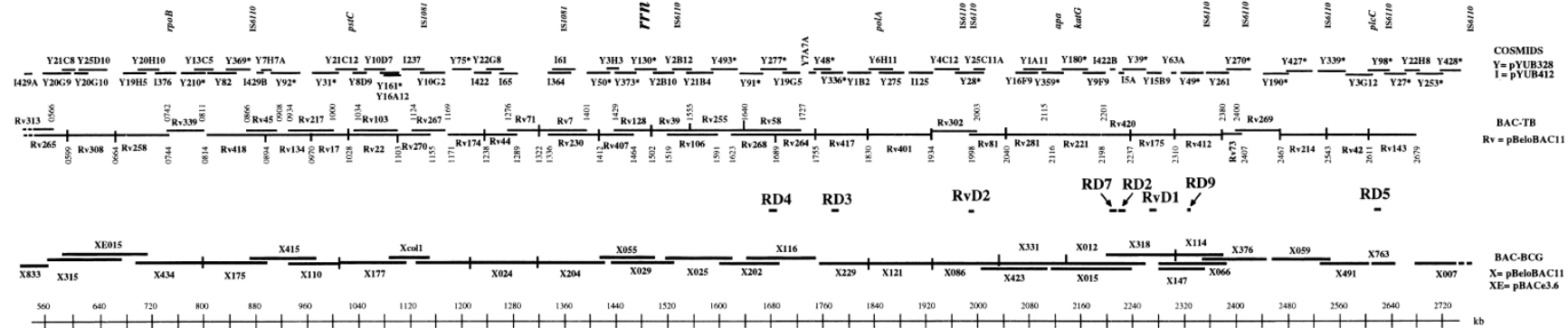


Figure 8 : portion de carte chromosomique illustrant la distribution de quelques RD (ici les RD4, 3, 7, 2, 9 et 5) obtenue par la BAC à partir des clones 'X' = *M. bovis* BCG pBeloBAC11; 'XE' = *M. bovis* BCG pBACe3.6 ; 'Rv' = *M. tuberculosis* pBeloBAC11; 'Y' = *M. tuberculosis* pYUB328 ; et 'I' = *M. tuberculosis* pYUB412 ⁹³.

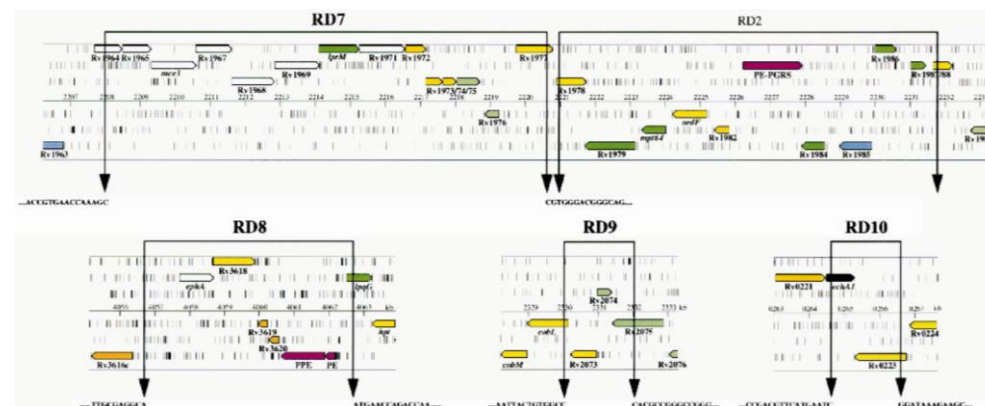


Figure 9 : aperçu de l'organisation interne des RD7, 2, 8, 9 et 10. Les régions délaitées chez *M. tuberculosis* sont délimitées par les flèches ainsi que les séquences délimitant chaque délétion. Les ORFs sont représentées par les boîtes pointues qui par ailleurs indiquent le sens de la transcription. Les couleurs des boîtes reflètent la classification fonctionnelle établie par Cole et *al.*, (1998)⁹³.

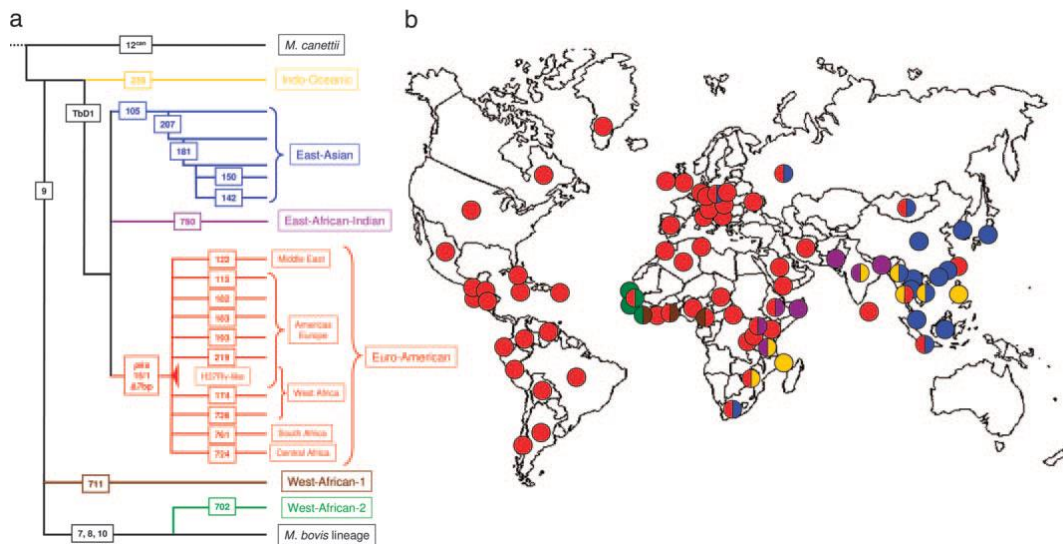


Figure 10 : structure de la population des mycobactéries du CMT et distribution globale des six principaux lignages ⁶⁷.

a. Arbre phylogénétique des six lignages du CMT établi avec le Large Sequence Polymorphisms (LSPs) basé sur les événements délétères des régions de différence (RD) **b.** Les points colorés représentent les six principaux lignages et les pays dans lesquels ils ont été mis en évidence.

II. Physiopathologie de l'infection tuberculeuse

M. tuberculosis est le principal agent étiologique de la TB humaine à travers le monde entier ⁹⁸. La contamination se fait par voie aérienne. Le tropisme du bacille est le plus souvent (70-80%) orienté vers le tissu pulmonaire : on parle dans ce cas de TBP. Outre les poumons, le bacille peut également atteindre toutes les autres parties du corps humain telles que l'appareil uro-génital (TB uro-génitale), les os (TB osseuse), la peau (TB cutanée), le système nerveux central, etc. Dans ces différents cas, on parle de tuberculose extra-pulmonaire (TEP). Bien que l'on dénombre de multiples atteintes tuberculeuses extra-pulmonaires, la TBP constitue la principale menace en matière de santé publique humaine. Elle représente la forme clinique contagieuse, responsable de la dissémination interhumaine et de décès lorsqu'elle est mal prise en charge ou lorsqu'elle n'est pas du tout traitée.

A. Transmission interhumaine de la tuberculose

La TBP est d'autant plus contagieuse que les expectorations du malade sont fréquentes et riches en bacilles, ce qui augmente au cours du développement de la maladie. Lorsqu'une personne atteinte de TBP éternue ou tousse, elle émet dans son environnement des aérosols (microgouttelettes d'expectoration) dénommées gouttelettes de Pfüggel chargées de bacilles. Dans une pièce close d'habitation quelconque, les aérosols peuvent demeurer en suspension dans l'air pendant 1 à 2 heures. Un sujet sain peut s'infecter en inhalant ces particules infectieuses (Figure 11). Comme autre mode de transmission, non pas des plus importants mais moins pris en compte, figure la re-suspension dans l'air des crachats séchés lors du balayage de sols contaminés.

Parvenus à la hauteur des alvéoles pulmonaires après avoir évité le système muco-épithélial cilié de l'arbre bronchique (Figure 11), les bacilles entament la phase de croissance induisant l'activation et la mobilisation des cellules effectrices de l'immunité innée et adaptative ; il s'agit de la primo-infection.

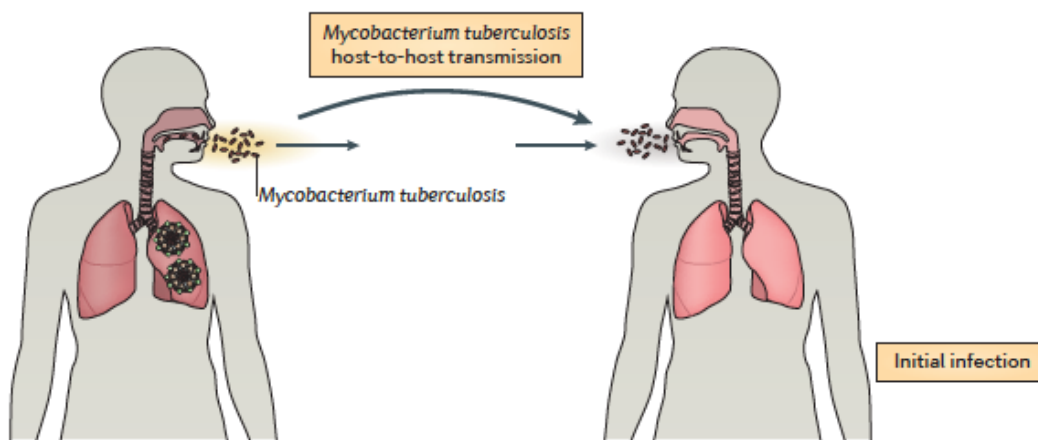


Figure 11 : mode de transmission majeur interhumaine de la tuberculose [schéma modifié de ⁵²].

B. Les facteurs de risque d'infection tuberculeuse

Le contact étroit, prolongé et fréquent avec un patient atteint de TBP est le principal facteur de risque de contracter la maladie. À une plus grande échelle, les communautés reproduisant des conditions de promiscuité assez similaires au cadre familial ou carcéral favorise la

dissémination de personne à personne, et encore plus aisément chez les sujets particulièrement susceptibles (enfants et personnes âgées, immunodéprimés, fumeurs et alcooliques, diabétiques, malnutris, etc.)¹⁴.

La susceptibilité à l'infection chez les enfants relève de l'immaturation du système immunitaire⁹⁹, tandis que les personnes âgées font face à l'immuno-sénescence (muqueuses endommagées, ralentissement de la maturation des lymphocytes, etc.).

L'immunodépression peut être iatrogène, génétique ou infectieuse. Celle due au VIH est à l'origine de la diminution de la population de lymphocytes CD4. Comme il sera mentionné plus bas, les CD4 produisent approximativement la moitié de la quantité d'interféron-gamma (INF- γ) indispensables à la formation et au maintien des granulomes matures^{100, 101}. La diminution de la quantité de CD4 chez les patients atteints du Syndrome de l'Immunodéficience Acquise (SIDA) se traduit généralement par une capacité réduite à former les granulomes qui maintiennent l'infection.

La malnutrition se caractérise par des carences nutritionnelles en éléments protéino-énergétiques associées à de carences de productions de cytokines indispensables à la coordination de la réponse immunitaire¹⁰². Le tabagisme et l'alcoolisme constituent aussi des facteurs de risque.

C. La primo-infection

La primo-infection se définit comme étant la réaction primaire de l'immunité d'un organisme au contact d'un agent pathogène. Dans le cas de la TB, elle est asymptomatique durant les 2 premiers mois post-infection en moyenne et son évolution vers la TB maladie dépend de plusieurs facteurs à la fois extrinsèques et intrinsèques¹⁰³ du sujet et de la charge infectante. Des études basées sur les modèles animaux¹⁰⁴⁻¹⁰⁷ et cellulaires¹⁰⁸ démontrent que l'hôte tout comme le pathogène déploient des mécanismes de défense¹⁰⁰ complexes afin d'assurer leur survie. Ainsi, si d'une part la mise en place du granulome pulmonaire tuberculeux, structure de cantonnement et de neutralisation des bacilles, résultant de l'équilibre entre production de cytokines et chimiokines^{100, 109} pro- et anti-inflammatoires est perçue comme la réponse adaptée de l'hôte au stimulus chronique de l'infection¹⁰⁰. D'autre part, de récentes études tendent à montrer que le pathogène orchestrerait les prompts formations de

granulomes pour non seulement échapper à la réponse immunitaire de l'hôte mais pour s'y multiplier dans les phagocytes attirés au site d'infection, occasionnant ainsi la destruction du tissu pulmonaire ¹⁰⁰ suite à l'accroissement du granulome allant jusqu'à rejoindre les vaisseaux où se déverse leur contenu.

1. Déroulement de la réponse immunitaire au cours de la primo-infection

a. Induction de l'immunité innée

Dans les macrophages pulmonaires, les bacilles inhibent la fusion de phagosomes et entament leur prolifération intracellulaire ^{53, 110, 111}. L'échec du processus phagocytaire est à l'origine de l'amorce d'un processus inflammatoire lent au cours duquel la dissémination des bacilles se fait par liquéfaction et rupture du granulome caséux à proximité de vaisseaux sanguins ou lymphatiques ou encore de bronchioles qui vont disséminer le contenu du granulome et surtout les bacilles qui vont rencontrer d'autres macrophages alvéolaires et entamer la formation de nouveaux granules ¹¹². Il est possible que des macrophages infectés soient aussi libérés lors de la rupture du granulome et attirés par chimiotactisme participent à l'édification d'autres agrégats dits agrégats secondaires (Figure 12) ^{105, 113}. Ces déversements des contenus de granulomes à proximité de vaisseaux sanguins ou lymphatiques expliqueraient l'origine des TB extra-pulmonaires.

Contrairement aux macrophages, les cellules dendritiques (DC, de l'Anglais Dendritic cells) sont moins permissives à la croissance intracellulaire des bacilles en ce sens qu'elles génèrent une bactériostase ^{114, 115}. De ce fait, les DCs ne contiendraient que des bacilles latents au cours de la phase précoce de l'infection. De plus, étant des cellules présentatrices d'antigènes (CPA), les DCs constituent l'atout indispensable de l'hôte dans l'activation de la réponse immunitaire adaptative nécessaire au contrôle de l'infection ^{99, 107, 115}.

Parvenus au foyer infectieux suite au chimiotactisme induit par la nécrose des macrophages, les neutrophiles se fauillent jusqu'au centre des agrégats cellulaires où ils phagocytent non pas les bacilles extracellulaires libres mais plutôt les débris d'apoptose ainsi que les macrophages infectés et en voie de destruction exprimant les facteurs d'efferocytose ^{106, 117}. Les neutrophiles exerceraient un rôle protecteur au cours de la phase précoce de l'infection

¹⁰⁶.

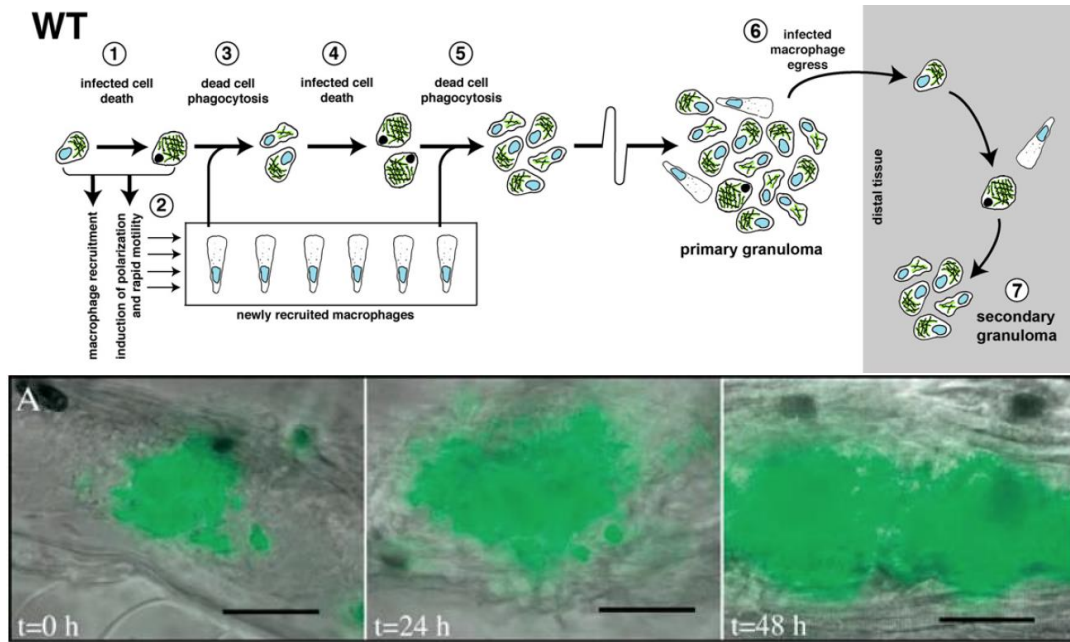


Figure 12 : incidence de la région de différence 1 (RD1) de type sauvage (WT) de la souche *M. marinum* dans le processus d'infection et recrutement massif de macrophages au cours de l'élaboration des granulomes tuberculeux pulmonaires chez des larves du poisson zèbre ^{105, 116}.

b. Induction de l'immunité adaptative

L'instauration de l'immunité adaptative lors de l'infection tuberculeuse est lente ¹⁰⁹. Elle nécessite en moyenne un mois post-infection pour être effective. Cependant, Wolf *et al*, ¹⁰⁷ observent chez la souris un important flux de DCs (infectées et saines) dans les ganglions lymphatiques de proximité dès le 14^{ème} jour post-infection. Néanmoins, les arrivées tardives des lymphocytes à la périphérie des agrégats cellulaires viennent clore l'élaboration du granulome mûre ^{100, 113} (Figure 13) et booster les processus phagocytaires ^{52, 100}, ce qui se traduit par la réduction de la charge bactérienne dans le tissu pulmonaire ¹¹².

2. Structure et évolution du granulome

Le granulome mûre se présente comme une structure massive et compacte dans laquelle des phagocytes ont subi une transformation conduisant à la formation de membranes cellulaires étroitement imbriquées les unes dans les autres, et où les cellules nécrosées et/ou en apoptose constituent le caséum (sorte d'abcès chargé de débris cellulaires et de bacilles)

se retrouvent au centre de la structure ^{113, 118} (Figure 13). La présence du caséum dans un granulome est très évocatrice d'infection à mycobactéries. Plusieurs processus peuvent alors avoir lieu :

- l'infection est maîtrisée, le granulome rétrécit et il peut éventuellement s'opérer une calcification centrale du caséum ^{109, 113, 118} : on parle d'auto-stérilisation spontanée ;
- l'expansion du caséum est freinée, les bacilles sont maintenus dans un état de réplication stationnaire ou dormant pendant plusieurs années. Ceci correspond à l'état pathologique dénommé TBL ^{109, 119} ;
- l'expansion du caséum continue inexorablement de s'étendre jusqu'à la rupture totale ^{100, 104, 107, 109, 117}. Les ruptures de granulomes sont à l'origine des cavités (observées lors de la radiographie). En outre, en présence de certains facteurs de risque, l'expansion d'un caséum auparavant latent/dormant peut être réactivé. Dans cette situation on parle de réactivation endogène de la TB ^{109, 115}.

Le granulome tuberculeux est essentiel au contrôle de l'infection tuberculeuse car sans cette structure la prolifération et la dissémination du pathogène pourraient être encore plus dramatique ^{100, 105, 113}. Néanmoins, cet impressionnant arsenal de défense marqué par des afflux contrôlés de cellules immunitaires pour endiguer et éradiquer l'infection est un équilibre fragile qui peut évoluer vers le contrôle de l'infection et la calcification, mais aussi vers un accroissement affectant des vaisseaux où leur contenu se déverse.

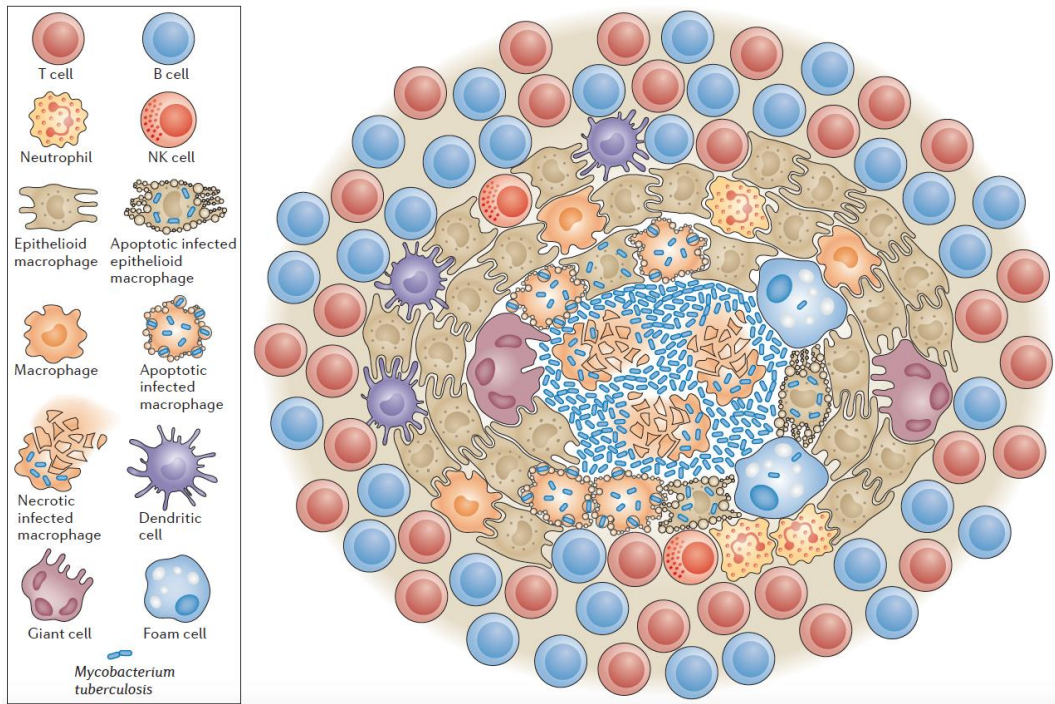


Figure 13 : représentation basique de la structure et des cellules immunitaires et épithéliales impliquées dans la formations du granulome tuberculeux ¹¹³.

3. Devenir de *Mycobacterium tuberculosis* au cours de la primo-infection

Les corrélations étroites faites entre la croissance exponentielle des bacilles et les formations des agrégats cellulaires et des granulomes ont permis d'identifier les activités des bacilles de la TB au cours des deux premières semaines post-infection ^{107, 113, 116, 119}.

a. Expression des facteurs de virulence associés à la région de différence 1 (RD1)

L'hypothèse selon laquelle la RD1 serait impliquée dans le processus de recrutements massifs de macrophages a été mise en évidence en réalisant des infections *in vivo* et *in vitro* avec des bacilles mutants (délétés) pour ce locus. Les résultats obtenus démontrent que les mutants RD1 stimulent moins les formations de granulomes (Figure 14) que les bacilles de type sauvage pour ce locus (Figure 12) ^{105, 113, 116, 120}.

Lors du processus infectieux, les bacilles expriment de nombreux facteurs de virulence ¹⁰⁴ parmi lesquels les protéines Early Secretory Antigenic Target 6 (ESAT6) et Culture Filtrate Protein 10 (CFP-10) exportées au travers du Système de Sécrétion 1 (ESX-1) dont les gènes

sont localisés au sein de la RD1^{116, 121-123}. En plus des monocytes et neutrophiles nécrosés constituant des signaux de recrutement de nouvelles cellules immunitaires, la protéine ESAT6 induit les cellules épithéliales environnantes à produire la protéine Matrix MetalloProteinase 9 (MMP9)^{113, 124} qui à son tour induit un second recrutement de cellules immunitaires au site de l'infection^{105, 106, 113} (Figure 15).

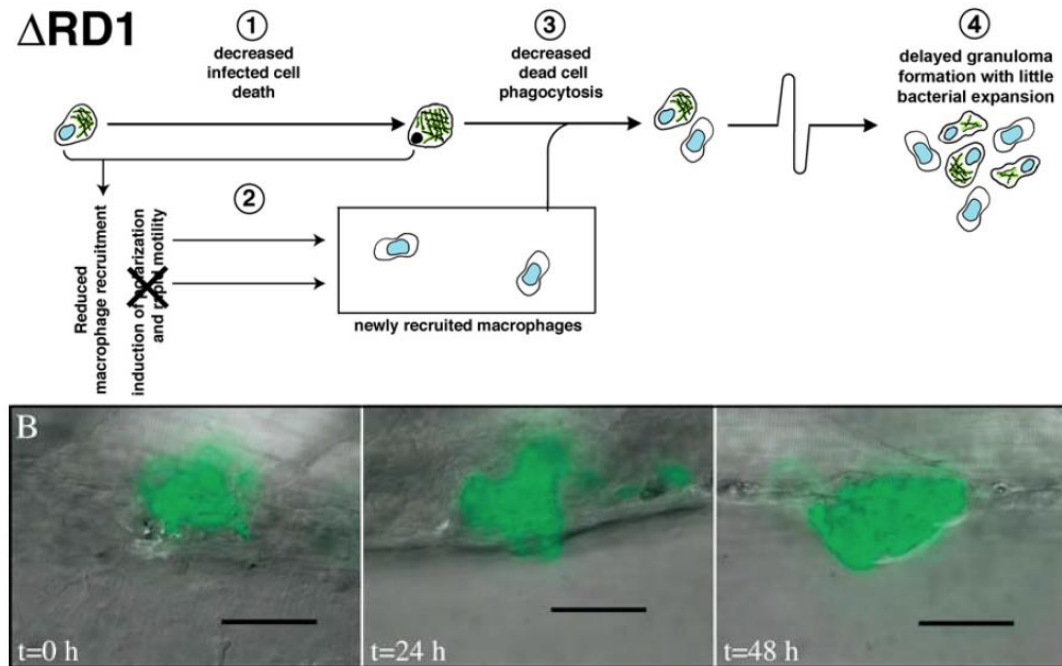


Figure 14 : (versus Figure 12, souches WT pour RD1), mise en évidence de la propriété du locus RD1 à stimuler et renforcer la formation des granulomes tuberculeux pulmonaires par mutation de RD1 chez *M. marinum*^{105, 116}.

b. Inhibition de l'apoptose des neutrophiles

L'apoptose joue un important rôle dans la réponse immunitaire innée contre les pathogènes intracellulaires persistants^{106, 125}. En effet, en phase d'apoptose, les macrophages infectés expriment des facteurs d'efférocytose qui induisent les neutrophiles à développer une activité auto-phagocytaire. Ceci se traduit par la formation des phagolysosomes chez les neutrophiles et aboutit à la destruction des bacilles^{106, 125}. Cependant, lors de la formation des granulomes, *M. tuberculosis*, au travers du gène *nuoG* inhiberait le processus d'apoptose des macrophages^{104, 125} orientant de la sorte les macrophages vers la mort cellulaire par

nécrose. Ainsi, *M. tuberculosis* stimulerait la formation des granulomes afin de s'en servir comme niches propices à sa réplication^{107, 113, 116}.

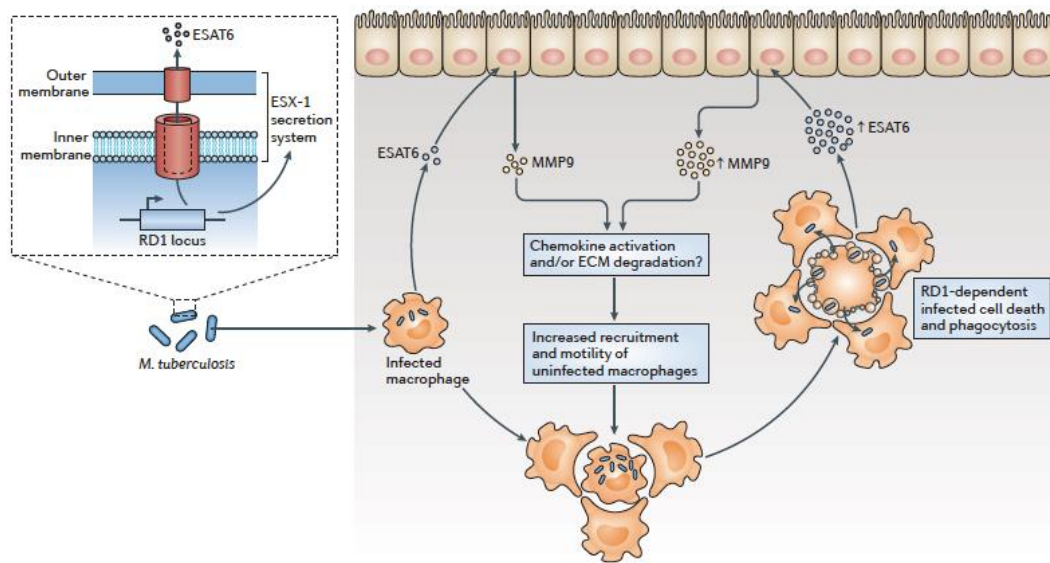


Figure 15 : hypothèse de l'implication de la région de différence 1 dans la virulence de *M. tuberculosis* occasionnant le recrutement supplémentaire de macrophages¹¹³.

c. Activation tardive de la réponse immunitaire adaptative

La maturation tardive des DCs pourrait se traduire non pas par la réduction de la localisation membranaire des complexes majeurs d'histocompatibilité de classe II (CMH II)^{109, 115}, mais par l'inhibition de la formation de ces présentateurs d'Ags mycobactériens à la surface membranaire des DCs, ce qui conduirait à de faibles stimulations des lymphocytes CD4⁺^{104, 107}. De plus, l'échappement de certains bacilles des vacuoles phagocytaires combiné à l'inhibition de l'apoptose des macrophages contribuerait grandement au retard d'acquisition d'Ags par les Cellules Présentatrices d'Ags (CPA), et aussi à la limitation de la migration des DCs vers les ganglions lymphatiques¹⁰⁸.

CHAPITRE III : PROPHYLAXIE ET TRAITEMENT DE LA TUBERCULOSE, ACTIVITÉS ANTIBACTÉRIENNES DES ANTITUBERCULEUX ET RÉSISTANCES DES BACILLES AUX ANTITUBERCULEUX.

I. Prophylaxies de la tuberculose

A. Prophylaxie par le vaccin BCG

La première étape de ce type de prophylaxie débute dès le plus jeune âge par la vaccination infantile avec le BCG, souche atténuée de l'espèce virulente *M. bovis* obtenue après 13 années de culture successives⁹. Au cours de ce laps de temps, *M. bovis* aura été délétée de plusieurs loci dont la RD1, ce qui expliquerait son caractère avirulent¹²⁰.

Le BCG induit chez l'enfant le développement d'une immunité optimale contre les manifestations cliniques typiques de la TB et aussi contre la TB disséminée telle que la méningite tuberculeuse^{9,11}. Cependant, le vaccin ne confère qu'une protection limitée dans le temps de 10 à 20 ans entre l'enfance et le jeune âge adulte. Chez les personnes adultes, l'effet protecteur du BCG est très aléatoire^{9,11}.

1. Quelques vaccins antituberculeux en phase de développement

Pour pallier la protection insuffisante conférée par le BCG, de nombreux vaccins candidats susceptibles de conférer une immunisation à long terme sont à différentes étapes de développement et d'essai clinique^{126,127}.

Ces vaccins sont développés suivant deux approches : à partir de bactéries recombinées atténuées vivantes, et à partir de sous-unités c'est-à-dire par la combinaison d'antigènes de *M. tuberculosis* ayant démontré une meilleure stimulation de la réponse immune couplés ou non à des vecteurs viraux^{9,126}. Les tests cliniques effectués jusqu'ici révèlent que la vaccination par les bactéries entières confère une plus grande protection que les vaccins à sous-unités^{9,11,126}. Cela peut s'expliquer par le fait que les bactéries recèlent un plus grand nombre d'antigènes incluant des protéines et des lipides antigéniques pouvant induire l'action des lymphocytes par les vaccins utilisés¹²⁷⁻¹²⁹. Parmi ces vaccins figurent :

a. Le vaccin rBCG30

Ce recombinant de la souche BCG surexprime l'antigène Ag85B de *M. tuberculosis*¹³⁰. Cet antigène, au même titre que la protéine ESAT6, stimule fortement les lymphocytes CD4+, type cellulaire impliqué dans le contrôle de l'infection lors de la phase précoce^{52, 100, 107, 131}. Chez le cobaye, rBCG30 a démontré une protection substantielle meilleure que le BCG. Il a passé la phase I avec succès sans engendrer d'effets secondaires importants et a également été en mesure d'améliorer l'immunogénicité chez des adultes sains. Mais son développement clinique a été interrompu car ce recombinant serait pourvu d'un gène de résistance aux ATBs¹²⁶.

b. Le vaccin rBCG::ΔureC-hly+

Encore appelé VPM1002, il est actuellement en phase d'essai clinique IIa chez les enfants. Ce BCG recombinant devrait posséder la propriété de fragiliser le phagosome le contenant par l'expression du gène de la listériolysine de l'espèce *Listeria monocytogenes*, et de créer un microenvironnement acide favorable à la listériolysine par sa déficience à produire de l'uréase (muté en *ureC*)^{126, 132}. L'action fragilisante de la listériolysine devrait permettre la translocation d'antigènes dans le cytosol des cellules infectées par *M. tuberculosis* et favoriser la présentation des antigènes par le MHCI et le phénomène d'apoptose^{127, 132}. Le vaccin a passé avec succès les essais cliniques des phases I et IIa. Actuellement, il est en essai sur une large cohorte de nouveaux nés de parents séropositifs au VIH et de mère séronégative¹²⁷.

c. Le vaccin BCG::RD1

La souche recombinée BCG::RD1 à qui on a réintroduit le locus RD1 (permettant la sécrétion du complexe ESAT6-CFP10) confère une meilleure protection chez le cobaye que la souche parentale (BCG). Il est cependant plus virulent dans le modèle murin SCID.

B. Traitements curatifs par les chimiothérapies

Le traitement curatif consiste à soigner le malade tuberculeux en faisant usage d'antibiotiques (ATBs) -- substances naturelles ou synthétiques ayant un effet inhibiteur sur la croissance des mycobactéries tuberculeuses. Les schémas thérapeutiques recommandés par

l'OMS sont basés sur l'utilisation d'une gamme restreinte d'ATBs dont les actions bactéricide et bactériostatique impactent à la fois les bacilles en croissance et les formes dormants²⁸. Mais, face aux phénomènes de plus en plus fréquents de TB-MDR et XDR, les gammes limitées de combinaisons thérapeutiques permises par la vingtaine d'antituberculeux disponible ne sont pas toujours efficaces¹³³.

On dénombre trois principales combinaisons thérapeutiques antituberculeuses adaptées respectivement aux germes sensibles (traitement de première ligne), aux germes MDR et XDR (traitement de seconde ligne).

1. Chimiothérapie standardisée de première intention

Le traitement de première ligne est administré aux patients ayant une TB à germes sensibles. L'antibiothérapie s'étale sur une période de 6 mois et se subdivise en deux phases distinctes¹³⁴ :

- La phase intensive, de 2 mois, comprend l'utilisation simultanée de la RIF, l'INH, le PZA et l'EMB.
- La phase dite de continuation, de 4 mois, avec uniquement la RIF et l'INH.

Le choix d'administrer 4 ATBs lors de la phase intensive est motivé par la présence d'une population bacillaire importante au site de l'infection qui comporte des bacilles pouvant être résistants à un ATB. La quadrithérapie vise à prévenir la sélection des bacilles résistants. Par contre, la phase de continuation est menée avec 2 ATBs car le risque d'acquisition de résistances aux ATB y est moindre du fait d'une population bacillaire qui a été considérablement réduite lors de la phase intensive.

2. Chimiothérapie standardisée de seconde ligne

La chimiothérapie de seconde ligne est destinée à traiter les TB à germes MDR, c'est-à-dire ayant acquis la double résistance à la RIF et l'INH, antituberculeux de première ligne. Il existe plusieurs combinaisons médicamenteuses spécifiquement optimisées contre les TB à germes MDR et XDR, respectivement. Ces régimes sont établis par la combinaison de différents ATBs

des groupes 2 (les agents injectables), 3 (les FQs), 4 (les agents oraux bactériostatiques de seconde ligne) et 5 (agents à rôle indéterminé dans le traitement de la TB)^{135, 136}.

a. Antibiothérapie de seconde ligne dirigée contre les tuberculoses à germes MDR

i. Les traitements standardisés recommandés par l'OMS

En vigueur depuis plusieurs décennies auparavant, l'ancien traitement de seconde ligne s'étalait sur une durée de 24 mois et incluait une phase intensive de 8 mois avec la Kanamycine (KAN, le Prothionamide (PTH), l'Ofloxacin (OFX), le PZA et la Cyclosérine ou l'EMB. La phase de continuation de 16 mois se faisait avec le PZA, la Lévofoxacin (LFX), le PTH et l'acide para-amino-salicylique (PAS).

Depuis Mai 2016, l'OMS recommande le nouveau régime thérapeutique proposé par *l'Union Internationale de Lutte contre la Tuberculose (l'Union)*^{3, 10}. Il s'agit d'un traitement court d'une durée de 9 mois qui comprend une phase intensive de 4 mois avec la KAN, la Clofazimine (CFZ), la Moxifloxacin (MFX), l'EMB, une forte dose d'INH, le PZA et le PTH, suivie de la phase de continuation (5 mois) avec la CFZ, la MFX, l'EMB et le PZA http://www.who.int/tb/Short_MDR_regimen_factsheet.pdf.

En dehors des durées de traitement apparentes, les deux types de chimiothérapies se distinguent l'un de l'autre par leurs performances thérapeutiques sur plusieurs aspects. L'ancien traitement long de 24 mois affiche des issues thérapeutiques favorables n'excédant pas souvent 55%³ et il est associé à des taux de rechutes/échec de plus de 20%, de plus, la sélection de bacilles mutants résistants y est beaucoup plus importante. En revanche, le traitement préconisé par l'Union permet d'atteindre un taux de guérison constant de plus de 85%, il est associé à un taux de cas de rechutes/échec très bas^{3, 10, 137} comparativement à l'ancien traitement de 24 mois. De plus, ce traitement ne contribuerait pas à la sélection de bacilles mutants résistants aux FQs et aux ATBs injectables : Amikacine (AMK)-Kanamycine (KAN)-Capréomycine (CAP)¹⁰, contrairement au traitement standardisé de 24 mois^{3, 10}.

b. Antibiothérapie contre les germes XDR

La TB-XDR est l'état pathologique le plus critique du fait de la résistance des germes aux ATBs les plus potentiels utilisés en thérapies de première et seconde ligne. Pour cette raison, il n'existe pas de poly-chimiothérapie clairement définie. Néanmoins, des recommandations spéciales existent quant à l'établissement d'un traitement plus adapté faisant usage de tous les ATBs ayant démontré une activité bactéricide et/ou bactériostatiques contre les bacilles de la TB ¹³⁶.

Avec l'arrivée sur le marché de nouveaux ATBs tels que la Bédaquiline (BDQ) et la Délamanide (DLM), un traitement standardisé et efficace contre la TB à germes XDR est en phase d'être établi ¹³⁸⁻¹⁴¹.

II. Activités antibactériennes des antituberculeux et mécanismes de résistance

Par sa toxicité sélective dirigée contre le pathogène, l'ATB peut se comporter soit comme un inhibiteur de croissance, on parle dans ce cas d'ATB bactériostatique, soit en tuant la bactérie, on parle alors d'ATB bactéricide. Les substances antibactériennes agissent de manière spécifique en interférant avec les processus métaboliques vitaux de la cellule dont la synthèse des protéines, de l'ADN, etc ^{28, 142, 143}. Mais suite au stress induit par les ATBs, les bacilles acquièrent des mutations ^{142, 144, 145}. Ces mutations se traduisent par la modification des sites d'action des ATBs, empêchant ceux-ci de s'y fixer ou à l'enzyme de transformer les pro-drogues en drogues ^{133, 143-146}, d'où l'origine des résistances acquises contre les ATBs.

A. Les antibiotiques inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques

1. La Rifampicine (RIF)

La RIF (1972) est une molécule bactéricide qui se fixe à la sous-unité bêta de l'ARN polymérase (ARN-pol)-ADN dépendant. Cette liaison covalente inhibe l'initiation de la transcription de l'ADN en ARN ^{28, 145}. De ce fait, la bactéricidie de la RIF est orientée uniquement sur les bactéries en phase de croissance.

Les mutations génétiques conférant la résistance à la RIF ont été identifiées dans une région précise du locus *rpoB* qui code pour l'ARN-pol ADN dépendante. Cette région de 81 pb,

dénommée Région Déterminant la Résistance à la RIF (RDRR) code pour 27 acides aminés (codon 507 à 533) et est l'endroit où surviennent 96% des mutations à l'origine de la résistance à la RIF (Figure 16)³². Parmi les mutations observées, celles aux positions 526 (H526D/Y) et 531 (S531L) sont les plus fréquentes, elles représentent 60 à 86% des mutations observées et non seulement elles confèrent de hauts niveaux de résistance à la RIF, mais encore, elles sont associées à un bas niveau de "fitness cost"^{40, 145, 147, 148}. Les substitutions aux positions 511, D516Y, 518 (plus fréquentes) et en 522 (plus rare) confèrent de bas niveaux de résistance à la RIF tout comme la mutation D516V^{40, 133, 145, 148}. La Rifabutine (RFB) est un analogue de la RIF, ainsi, les mutations 526Y et 531W confèrent une résistance croisée de haut niveau entre ces deux composés, celles 526D/Y, 531L confèrent un niveau de résistance moyen à la RFB¹⁴⁸.

De récentes études ont montrées que des mutations localisées en dehors de la RDRR confèrent elles également la résistance à la RIF. Ce sont les cas des mutations V176F et I497F^{148, 149}. En outre, environs 5% des mécanismes de résistances de *M. tuberculosis* à la RIF demeurent inconnus, suggérant des mécanismes alternatifs comme l'imperméabilité membranaire ou encore l'activité de la pompe à efflux¹⁴⁸.

La mono-résistance à la RIF est très rare, elle est de 0,6-3.9% chez les nouveaux cas de TB et ne dépasse guère 9% chez les patients antérieurement traités avec le régime de première ligne^{28, 40, 142}. En revanche, la résistance à la RIF est très fréquemment associée à la résistance à l'INH ce qui en fait un excellent indicateur de TB-MDR^{133, 142, 145}.

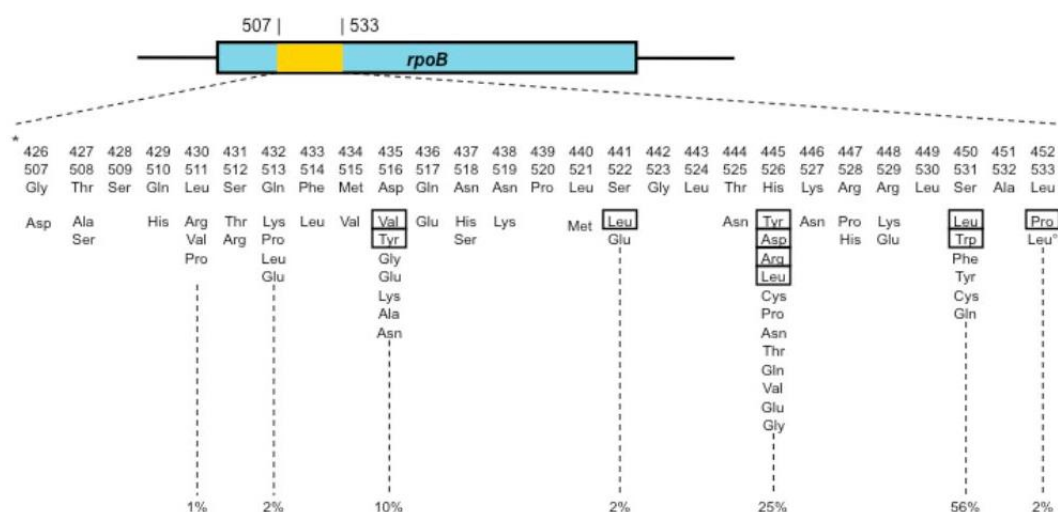


Figure 16 : représentation schématique de la RDRR (rectangle jaune) où siègent les mutations associées à la résistance à la RIF au sein du gène *rpoB* et leurs fréquences d'observations¹⁵⁰.

2. Les fluoroquinolones (FQs)

L'ADN gyrase ou topoisomérases II est une protéine impliquée aussi bien dans le super-enroulement (réduction du volume occupé) que le dépliement (pour la facilitation de la réplication, de la transcription) de l'ADN des mycobactéries. L'ADN gyrase est une protéine constituée de deux sous-unité A et B respectivement codées par les gènes *gyrA* et *gyrB*^{145, 151}. Les FQs (1962) sont des ATBs bactéricides synthétiques, ils interfèrent sur l'activité de la gyrase en se liant aux sous-unités A et B ce qui engendre le blocage de l'enzyme et donc des cassures de l'ADN. La résistance aux FQs est causée par les mutations dans *gyrA*, principalement, et aussi dans *gyrB*³¹.

Approximativement 60-90% des mutations conférant des résistances aux FQs se produisent dans la région déterminant la résistance aux FQs (FQs Region Determining Resistance = QRDR) au sein du locus *gyrA* (QRDR-A, codon 74 à 113)^{145, 152, 153} (Figure 17). Les substitutions nucléotidiques aux positions 89, 90 (A90V), 91 (S91P) et 94 (D94A/N/Y/G/H) sont les plus communément observées, par contre celles G88C et D94V le sont moins^{145, 152}. Les mutations D94G/N confèrent un haut niveau de résistance à la MFX et à la LVX tandis qu'A90V et D94A confèrent respectivement des bas niveaux de résistance à la MFX et aux FQs^{152, 154, 155}. Les mutations D94A/Y sont généralement associées à une résistance de bas niveau à la MFX et la LVX.

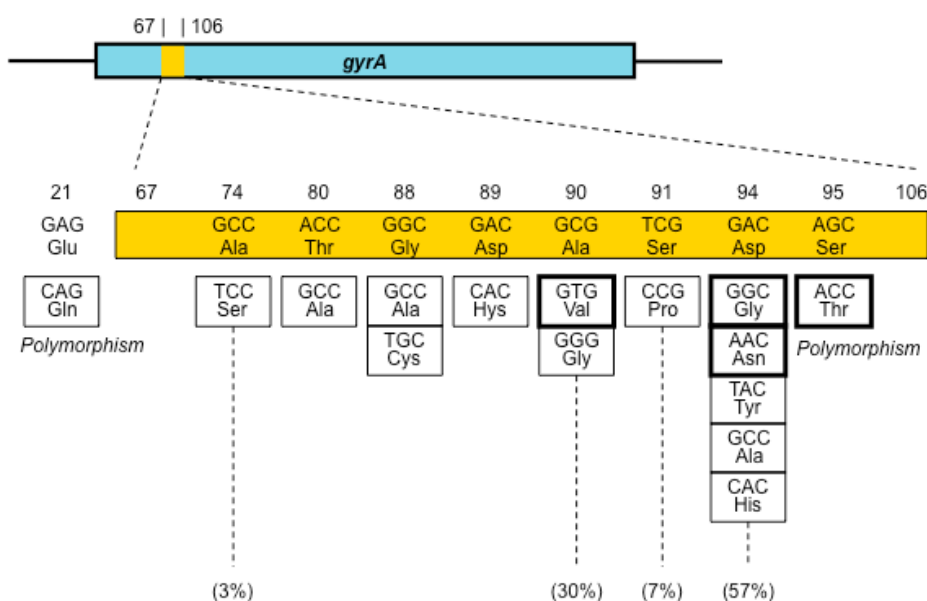


Figure 17 : représentation schématique de la QRDR (petit rectangle jaune) au sein du locus *gyrA* montrant les fréquences des principales mutations associées à la résistance aux FQs¹⁵⁰.

Comparé au locus *gyrA*, le gène *gyrB* (QRDR-B, codon 500 à 540) est moins étudié, néanmoins, à l'exception des mutations N538D et E540V associées à un haut niveau de résistance, les mutations s'y produisant sont associées à une résistance de bas niveau et elles sont généralement associées à des mutations dans *gyrA* (A90V)^{152, 153}. Les mutations N538D, D500H, T539N et A543V sont fréquemment observées chez les isolats résistants à l'Ofloxacine. En dehors de la QRDR-B, les mutations N498Q, A543V et G551R ont été identifiées comme étant associées à un bas niveau de résistance aux FQs¹⁵³.

B. Les antibiotiques inhibiteurs de la synthèse de la paroi mycobactérienne

1. L'Isoniazide (INH)

L'INH (1952) est l'un des antibiotiques (bactéricides) majeurs recommandé dans le traitement de la tuberculose, il est actif sur les cellules en division. La peroxydase-catalase (KatG), est une enzyme codée par le gène *katG*³⁴, c'est une oxydase impliquée dans la décomposition des composés oxygénés (H₂O₂, OH⁻, etc.) toxiques pour la mycobactérie. Elle permet ainsi *M. tuberculosis* de persister dans l'environnement hostile des macrophages, les principales niches³³.

L'INH étant une pro-drogue, c'est-à-dire que la forme active de l'antituberculeux est acquise après l'oxydation de la molécule par la KatG. Cette conversion du pro-drogue en drogue génère un ensemble de composés qui se lient à la protéine InhA (protéine de transport du groupe enoyl-acyl, codée par le gène *inhA*), ce qui inhibe l'élongation des acides gras et donc la biosynthèse des acides mycoliques^{34, 133}. La base moléculaire de la résistance à l'INH a été élucidée par Zhang *et al*,¹⁵⁶ en identifiant les variations nucléotidiques dans le locus *katG*. Ces variations, délétion (partielle ou totale) ou dues à des mutations faux/non-sens dans *katG* sont associées à la résistance à l'INH^{33, 156}. Outre le gène *katG*, certaines mutations dans le gène *inhA* confèrent la résistance à l'INH.

La mutation par substitution nucléotidique S315T au sein du locus *katG* est essentiellement trouvée chez les souches cliniques résistantes à l'INH. Elle est associée à un haut niveau de résistance. Le coût énergétique "fitness cost" est faible et la protéine conserve 50% de son activité^{133, 147}. Cette mutation est observée chez 50 à 95% des isolats cliniques^{142, 145}.

S'agissant du gène *inhA*, les mutations associées à la résistance surviennent dans la région du promoteur aux positions -8, -15, -24 et comptent pour 10 à 20% des résistances de bas niveau à l'INH. Ces mutations causent la surexpression de *InhA*¹⁴⁵. Un troisième gène, *ahpC* et son promoteur *oxyR-ahpC*, est aussi impliqué dans le phénomène de résistance à l'INH et compte pour 10% des résistances identifiées¹³³.

Contrairement à la RIF, le phénomène de mono-résistance à l'INH est beaucoup plus fréquent, on la rencontre chez 13,3% des isolats cliniques^{40, 142}.

Au Panama, Lanzas *et al*,¹⁵⁷ ont identifié des souches MDR non mutées en *katG* ni en *inhA* résistantes à l'INH. Le séquençage du gène *katG* de ces souches a permis d'identifier la mutation Y337C et d'encore bien d'autres pouvant être associées à la résistance à l'INH^{158, 159}. Tout comme la mutation S315T, Y337C préserve 50% de l'activité de l'enzyme dans le phénomène de résistance¹⁵⁷. Ils s'avère que les loci *katG* et *inhA* ne permettent pas toujours de déterminer la résistance à l'INH, en effet, toujours au Panama, des souches MDR se révélaient non mutées en *katG* et *inhA*¹⁶⁰.

2. L'Éthambutol (EMB)

L'EMB (1961) est une molécule bactériostatique de synthèse qui inhibe la synthèse des acides mycoliques en interférant avec l'activité de l'arabinosyl transférase, enzyme de synthèse de l'arabinogalactane de la paroi codée par le gène *embB*¹⁶¹.

Le mécanisme de résistance à l'EMB se manifeste par la surexpression d'EmbB. Dans ce processus, la mutation du codon 306 occasionne une résistance de haut niveau chez 47 à 62% des souches résistantes^{142, 145}. D'autres mutations des codons 330 et 630 confèrent également une résistance à l'EMB.

C. Les antibiotiques inhibiteurs de la synthèse protéique : les aminoglycosides et la capréomycine

Les ribosomes sont des organites cellulaires impliqués dans la traduction de l'ARNm en protéines. Ils se composent d'une grande sous-unité 50S et d'une petite sous-unité 30S. Au niveau de la sous-unité 30S, les ATBs injectables (AMK, KAN, CAP) et la Streptomycine (SM) se

lient particulièrement à l'ARN ribosomal 16S (ARNr 16S) et à la protéine ribosomale S12, respectivement codés par les loci *rrs* et *rpsL*^{28, 145}. Cette liaison ne bloque pas le processus de traduction mais induit des erreurs dans le décodage des codons au niveau du site A du ribosome. Ceci engendre la synthèse et l'accumulation de protéines non fonctionnelles, d'où l'effet létal des ATBs injectables.

Les mutations A1400G et A1401G dans *rrs* engendrent une résistance croisée de haut niveau à l'AMK et la KAN mais une résistance de bas niveau à la CAP^{145, 151, 162}. La mutation C1402T ne conférant aucune résistance à l'AMK est associée à une résistance de haut niveau à la CAP. La mutation G1484T est associée à une résistance de haut niveau à ces 3 ATBs^{151, 163}. Chez les souches Beijing non mutées en *rrs* mais résistants à la KAN, Huang *et al.*¹⁵¹ ont décrits l'existence de mutations dans le promoteur du locus *eis* associées à la résistance à la KAN (G-10A, C-12T et C-14T)^{151, 163}. Le gène *eis* code pour un aminoglycoside acétyltransférase spécifique à la KAN. Les mutations produisent une sur-expression du gène à l'origine de la résistance.

Les mutations identifiées dans le gène *rpsL* sont à l'origine de la résistance contre la SM, premier antituberculeux utilisé²⁸. On estime qu'environ 50% des souches résistantes à la SM ont une mutation dans *rpsL* dont les plus courantes sont les substitutions K43R et K88Q^{28, 145}.

D. Les autres types d'antibiotiques au mode d'action non clairement définis

1. Le pyrazinamide (PZA)

Le PZA (1952) est une molécule bactéricide et, contrairement à la RIF et à l'INH qui agissent sur les cellules en division, le PZA cible les bacilles dits quiescents d'où son pouvoir stérilisant lorsqu'elle est associée à l'INH. La pro-drogue (PZA) est convertie en sa forme active l'acide pyrazinoïque ou POA par la nicotinamidase-pyrazinamidase (PZase), enzyme codée par le gène *pncA*^{28, 133, 145, 164} (Figure 19).

L'action du POA (Figure 18) est optimale dans un environnement acide. Il se comporte comme un transporteur de cation H⁺ du milieu extracellulaire vers le cytoplasme des mycobactéries ce qui génère l'acidification du cytosol et par voie de conséquence l'inactivation de protéines de la mycobactérie, ainsi qu'une perturbation du potentiel de la membrane cytoplasmique (Figure 18)^{133, 164}. Contrairement aux autres gènes où les

mutations se produisent dans une région bien précise, pour le PZA, les mutations y conférant se produisent sur l'ensemble du gène y compris le promoteur (Figure 19). Ces mutations sont responsables de la résistance de 72 à 97% des souches au PZA¹⁴². Tout comme l'INH, le mécanisme de résistance principal est lié à la conversion de la pro-drogue dans sa forme active¹⁴⁵.

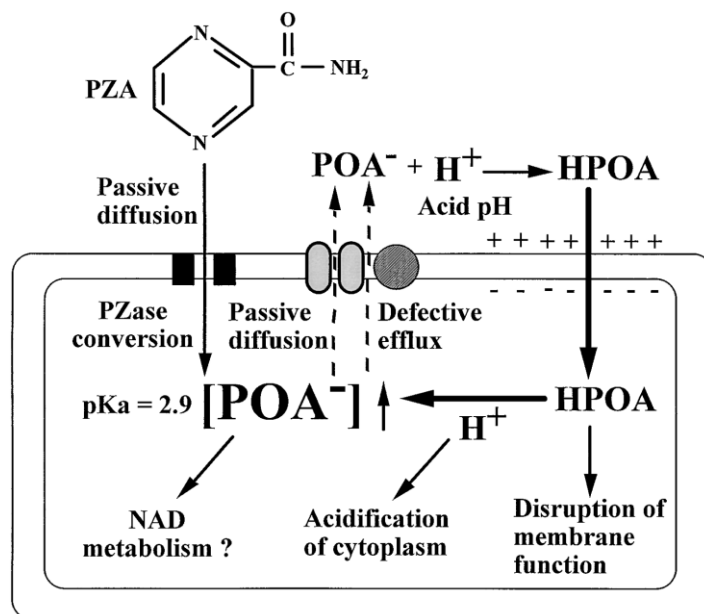


Figure 18 : conversion et modes d'actions du pyrazinamide (PZA)¹⁶⁴.

POA/POA⁻ = acide pyrazinoïque, HPOA = POA protonaté (ayant acquis un proton H⁺).

2. Les nouveaux antituberculeux : la Bédaquiline (BDQ), la Délamanide (DLM) et le Linézolide

La Délamanide (Deltyba*), la Bédaquiline (Sirturo*) et le Linézolide sont de nouveaux antituberculeux. Bien que peu d'essais cliniques aient été effectués, les molécules ont été approuvées par la « Food and Drug Administration » pour le traitement des TB-MDR et XDR lorsque les ATBs de seconde ligne se révèlent inefficaces^{138, 141, 165}. Administrés pendant 6 mois avec d'autres ATBs, ces nouveaux antituberculeux ont démontré une réelle activité antituberculeuse l'amélioration de l'état de santé de patients avec une réversion de la culture des échantillons cliniques^{138, 141, 165}. Cependant, à peine introduites en thérapeutique, on note des cas de résistance acquise^{139, 166}.

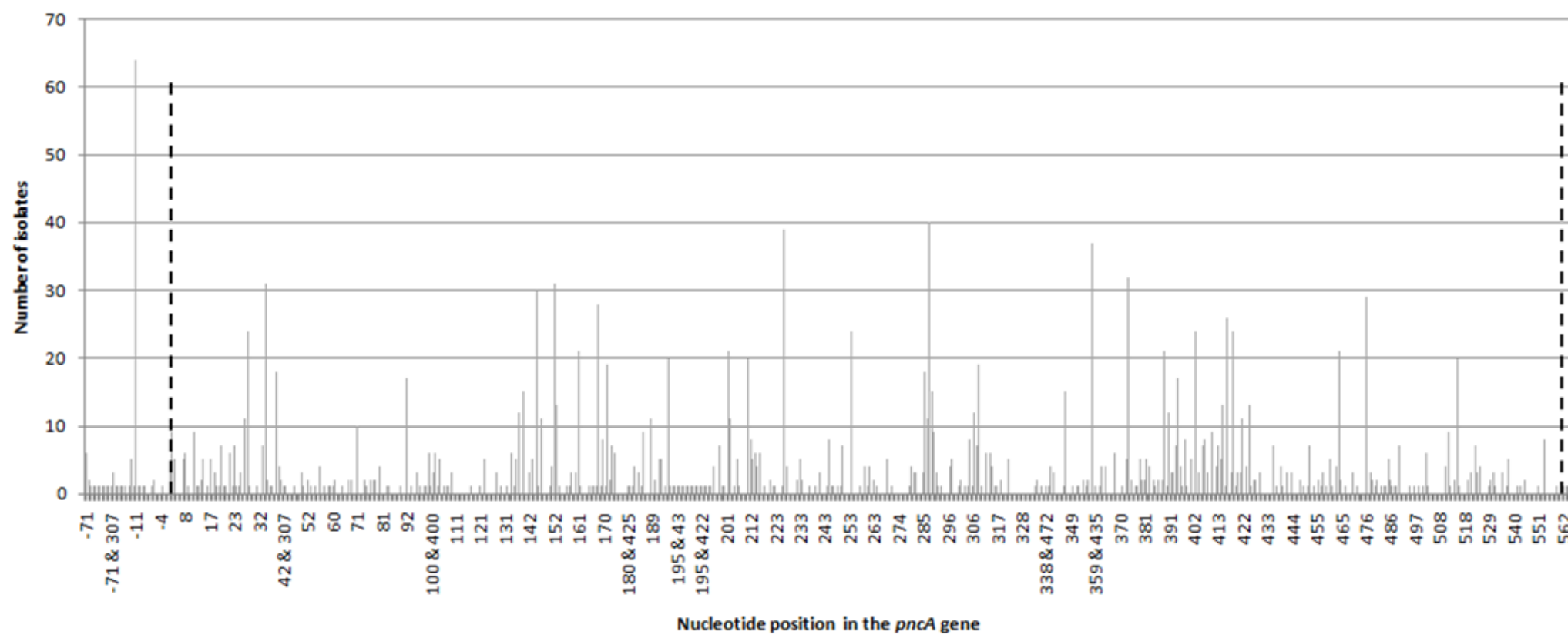


Figure 19 : distribution et fréquences d'apparitions de SNPs au sein du gène *pncA* de *M. tuberculosis* associés à la résistance au PZA¹⁶⁷.

E. Les mycobactéries du complexe *Mycobacterium tuberculosis* et les mutations compensatoires

La mutation spontanée au sein d'un gène de structure crucial conférant à la mycobactérie l'aptitude de prospérer dans un environnement médicamenteux hostile n'est pas sans risque ; en effet, selon le fond génétique des cellules mutantes (MDR ou XDR), la plupart des mutations occasionnent des coûts énergétiques "fitness costs" très hétérogènes – temps de génération plus long que la normale (24-38 heures) en absence d'ATB et multiplication moindre dans une population contenant des bacilles de type sauvage^{76, 147, 168-170}. Le cumul de mutations à l'origine de l'état de MDR et XDR auraient pu avoir pour conséquence une transmission moindre des TB-MDR et XDR¹⁷¹. Cependant, au vu de l'épidémiologie des TB-MDR et XDR dans le monde¹⁷², force est de constater qu'il n'en n'est rien. En effet, les cellules *M. tuberculosis* mutantes développent deux types d'adaptations qui ont pour conséquence la diminution du "fitness cost" des mutations associées à la résistance¹⁷¹ :

- Elles sélectionnent des mutations qui affectent très peu ou pas du tout leur "fitness cost", tels sont les cas par exemple des mutations S351L (prévaut chez 54% des isolats cliniques) et S315T des gènes *rpoB* et *katG* respectivement^{147, 169} ;
- Elles développent d'autres mutations compensatoires, et l'interaction entre ces différentes mutations fait référence à la notion d'épistasie^{76, 170, 171, 173, 174}.

III. Les outils de diagnostic de la tuberculose

A. Le diagnostic clinique de la tuberculose

Le diagnostic clinique de la TB consiste à observer les manifestations de la maladie tuberculeuse chez le malade (Figure 20). Certaines comme la toux persistante de plus de 14 jours consécutifs au moins associée à une perte de poids sont des signes évocateurs tandis que, d'autres symptômes tels que la fatigue généralisée, les sueurs nocturnes et les douleurs thoraciques viennent renforcer encore plus la présomption d'une TBP active. Cependant les personnes ayant une TB latente ne présentent pas ces manifestations cliniques et restent à risque de développer une tuberculose maladie au cours de leur vie.

Devant une symptomatologie évocatrice, la radiographie du thorax peut révéler des agrégats cellulaires caractéristiques d'une TB latente ou des lésions du tissu pulmonaire suite aux ruptures des agrégats cellulaires dans le cas de TBP active.

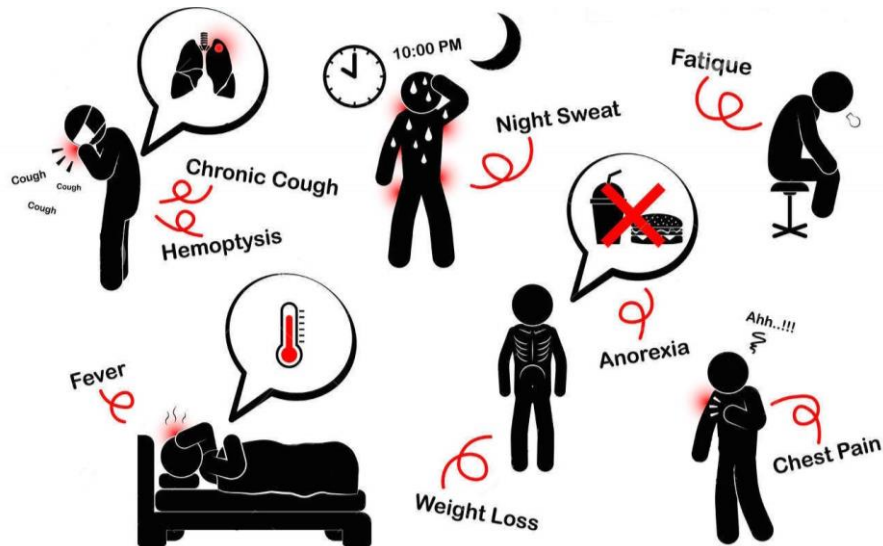


Figure 20 : tableau clinique résumant la symptomatologie de la tuberculose pulmonaire.

<https://thumbs.dreamstime.com/z/sympt-mes-de-tuberculose-51202074.jpg>

B. Le diagnostic *in vivo* de la tuberculose

1. L'intradermo réaction (IDR)

L'intradermoréaction à la tuberculine est un test cutané qui explore l'hypersensibilité de type retardée induite par l'injection sous cutanée de composants antigéniques : la tuberculine de *M. tuberculosis*¹⁷ (Figure 21). L'injection intradermique de tuberculine (dérivé protéinique purifié = DPP) est une méthode désignée pour le diagnostic de la TBL, la recherche d'une hypersensibilité induite pré- ou post-vaccinale par le BCG ainsi qu'une TB évolutive¹⁷.

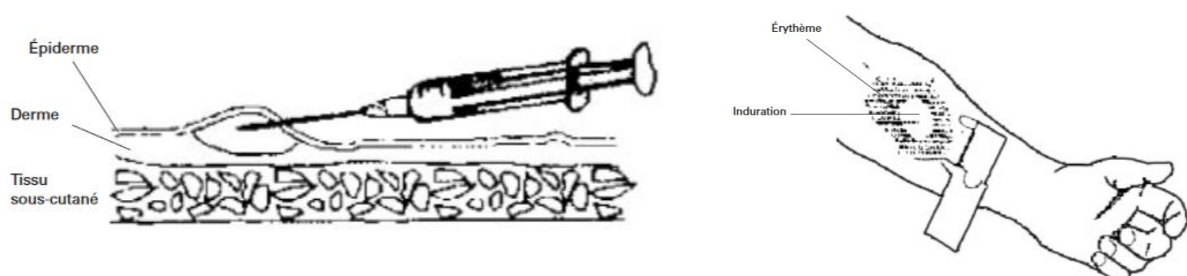


Figure 21 : schémas des principes sur la technique d'inoculation de la tuberculine et de la lecture du disque d'induration pour une IDR¹⁷.

Les tests de diagnostic *in vivo* de la TB permettent de mettre en évidence de façon indirecte la présence de *M. tuberculosis* par la détection de ses protéines produites lors de l'infection^{175, 176}.

Les phénomènes immunitaires observables 24 à 48 heures après injection de tuberculine sont marqués par l'expansion de clones de lymphocytes et à leurs effets cytokiniques et cytotoxiques, l'afflux de monocytes-macrophages, de polynucléaires basophiles, de lymphocytes B et polynucléaires éosinophiles. L'action synergique de ces cellules du système immunitaire est caractérisée par l'aspect typique de papule indurée érythémateuse dite réaction de l'IDR¹⁷. L'interprétation d'une IDR consiste à mesurer la taille de l'induration. Ainsi, l'infection tuberculeuse récente se traduit par un virage tuberculinique, c'est-à-dire l'augmentation de la réaction de l'IDR. Ce résultat, surtout s'il est associé au contact avec une personne bacillifère, s'ajoute aux arguments de diagnostics de TB. Cependant, l'IDR peut être faussement positive à cause d'un antécédent de vaccination par le BCG, ou le contact avec des mycobactéries atypiques de l'environnement. Elle peut être faussement négative par exemple en cas d'immunodépression ou en raison de l'âge du patient¹⁷. La sensibilité et la spécificité (chez les populations non vaccinées par le BCG) sont de 77% et de 97% respectivement¹⁷⁶.

2. Les tests de libération de l'interféron gamma (Interferon gamma release assay = IGRA)

Le QuantiFERON-TB Gold (Cellestis, Carnegie, Australie) et T-SPOT.TB (Oxford Immunotec, Oxford, Royaume Uni) sont deux tests permettant de mesurer la production d'interféron gamma (INF- γ) par les lymphocytes T en réponse à la présence des antigènes ESAT-6 et CFP-10 de *M. tuberculosis*^{175, 176} au cours d'une infection tuberculeuse. Compte tenu du fait que les souches vaccinales BCG et la plupart des mycobactéries atypiques ne produisent pas ces antigènes, du fait qu'elles sont dépourvues de la RD1, les tests IGRA permettent de distinguer une infection tuberculeuse d'une réaction immune à la suite d'un contact avec des bacilles atypiques ou une vaccination BCG. Les tests ont été développés dans l'intention de diagnostiquer les infections tuberculeuses latentes, ils sont cependant utilisés dans le diagnostic des infections actives^{123, 175, 176}. Les tests affichent respectivement un taux de sensibilité de 78% et 90%, de spécificité de 98% et 93%^{17, 176}.

C. Le diagnostic *in vitro* de la tuberculose

Le diagnostic *in vitro* a pour but d'appuyer la décision médicale quant à l'initiation d'un traitement antituberculeux par la mise en évidence directe de l'agent étiologique et après évaluation de la susceptibilité des bacilles aux antituberculeux.

1. La bacilloscopie¹

Le diagnostic microscopique ou bacilloscopie permet de mettre en évidence l'acido-alocolorésistance, caractère unique des bacilles à résister à la décoloration par l'emploi d'une solution acido-alcoolique et donc à retenir le colorant (la fuschine phéniquée de Ziehl) dans leur hyaloplasme. Il s'agit de la coloration de Ziehl-Neelsen (Z-N) (Figure 22, 23.A et 23.B). En lieu et place de la fuschine phéniquée, il est également possible de faire usage de l'auramine, colorant utilisé pour la technique de fluorescence (Figure 23.C).

Si la spécificité de la microscopie après coloration de Z-N, est comprise entre 97 et 99%, la sensibilité est en dessous de 60%. Elle est encore moindre chez les patients en début d'infection, chez les patients éprouvant des difficultés à émettre une expectoration de bonne qualité (TB pédiatrique = diagnostiquée à 10-15%, personnes âgées, infection naissante) et encore plus (environ 35%) chez les sujets séropositifs (faible concentration de bacilles dans l'expectoration)^{20-22, 26, 177, 178}. Ainsi, la microscopie est faussement négative chez de nombreux patients. En revanche, on note que la sensibilité de la microscopie est optimale chez des patients à un stade avancé de la maladie manifestant une charge bacillaire élevée dans l'expectoration^{20, 179}.

La microscopie à fluorescence repose sur l'affinité des fluorochromes (auramine et/ou rhodamine) envers les acides mycoliques de la paroi cellulaire. Comparativement à la coloration de Z-N, la fluorescence augmente la sensibilité de 10%¹⁷⁷. Afin de toujours améliorer la sensibilité des tests par microscopie, les méthodes chimiques (digestion, liquéfaction) et/ou physiques (sédimentation, centrifugation) développées dans le but de concentrer les bacilles dans un petit volume ont contribué à augmenter la sensibilité entre 13 et 33%^{26, 177}. En plus de leur manque de sensibilité, les tests microscopiques ne permettent pas de différencier les bactéries de la TB des autres mycobactéries (Figure 24) ni leur viabilité, ni leur sensibilité aux ATBs²².

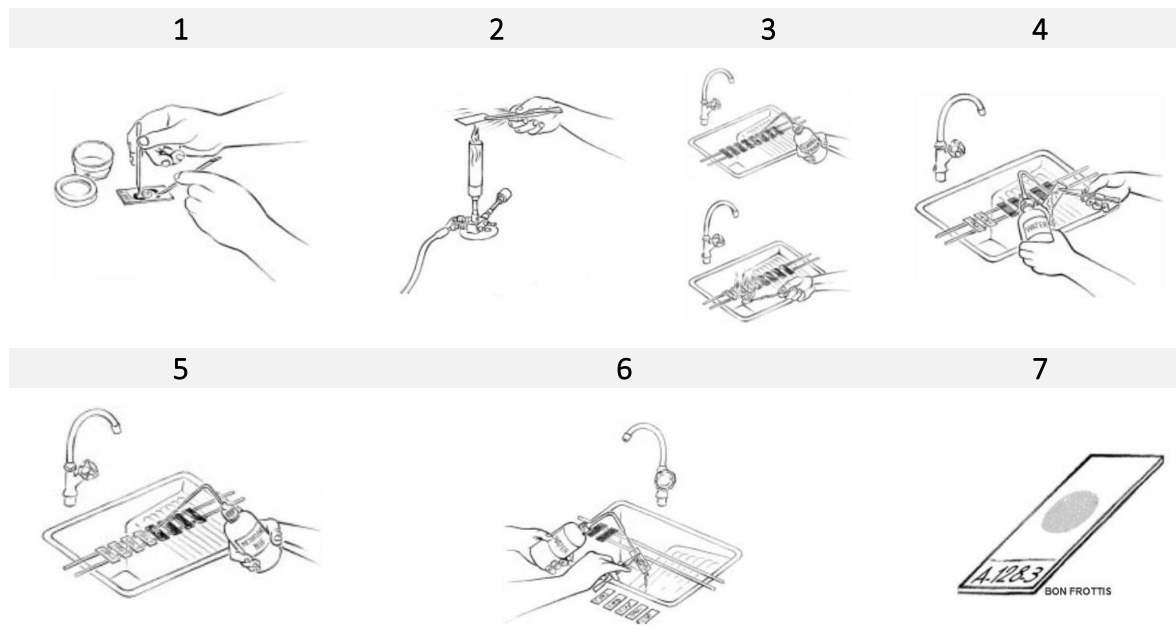
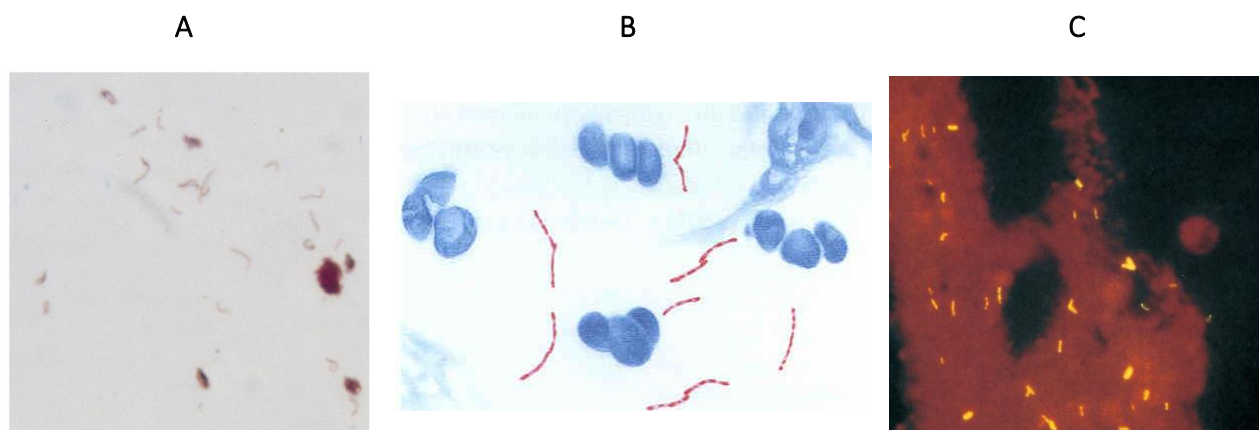


Figure 22 : procédure de coloration de Ziehl-Neelsen d'un frottis en vue d'une analyse par microscopie ²³.

Cette technique se déroule en 3 phases principales : la coloration avec la fuschine phéniquée de Ziehl, la décoloration à l'acide-alcool et la contre coloration au bleu de méthylène.

1. Étaler l'expectoration sur la zone centrale de la lame (2 cm sur 1 cm) par des mouvements circulaires à l'aide d'une anse de platine ou à usage unique. Laisser sécher le frottis à température ambiante **2.** Fixer le frottis à la chaleur en passant la lame 5 secondes au-dessus d'une flamme **3.** Recouvrir la lame par la solution de fuchsine phéniquée de Ziehl puis, chauffer légèrement la lame jusqu'à émission de vapeur. Laisser agir 5 à 10 minutes à température ambiante **4.** Laver la lame à l'eau courante et évacuer suffisamment l'excès d'eau puis appliquer la solution acido-alcoolique. Laisser en contact 2 minutes **5.** Laver le frottis à l'eau courante puis contre-colorer le frottis en recouvrant la lame avec la solution de bleu de méthylène. Laisser incubé 2 à 5 minutes à température ambiante **6.** Rincer les lames à l'eau courante, évacuer l'excès d'eau et laisser sécher les lames à température ambiante **7.** Apparence d'un frottis correctement réalisé et prêt à être lu à l'aide d'un microscope photonique.



*Mycobacterium microti*¹⁸⁰

Mycobacterium tuberculosis,

<https://www.institutpasteur.nc/la-tuberculose/>

Figure 23 : apparence de *Mycobacterium microti* (A) et de *Mycobacterim tuberculosis* (B et C) lors de la bacilloscopie.

A et B après coloration de Ziehl-Neelsen ; C, après coloration à la l'auramine.

2. La culture des mycobactéries

La culture des mycobactéries du CMT n'est possible que sur certains milieux sélectifs en micro-aérobie ou en aérobie stricte. En raison d'un temps de régénération de 20 à 38 heures environ, la culture des mycobactéries du CMT est apriori lente. Néanmoins, elle permet d'identifier les espèces de *M. tuberculosis* et de tester leur sensibilité aux antibiotiques.

Sur les milieux solides à base d'œufs (Löwenstein-Jensen et Coletsos), la culture primaire est obtenue en moyenne au terme de 2 à 4 semaines d'incubation¹⁷⁷. La susceptibilité aux ATBs est obtenue 2 à 3 semaines après inoculation des milieux.

La culture en milieux liquides améliore la croissance soit en moyenne 5 à 14 jours, selon la richesse de l'échantillon clinique^{29, 145}. Il s'agit de systèmes automatisés qui détectent la production de CO₂ ou la consommation d'O₂ par les bacilles en croissance. Un mélange d'antibiotiques est ajouté au milieu pour prévenir le risque de contamination lié au milieu liquide.

Dans le suivi de patients, contrairement à la bacilloscopie et la génotypie, la culture présente l'avantage de mettre en évidence le caractère viable de *M. tuberculosis* et de permettre la pratique d'un antibiogramme phénotypique en vue d'adapter le traitement.

D. Détection de la tuberculose résistante

La résistance aux antituberculeux est un phénomène préoccupant ¹⁷². L'antibiogramme est une technique d'analyse médicale qui vise à tester la sensibilité d'une bactérie envers un ou plusieurs ATBs. De nos jours, deux types de méthodes sont couramment employées pour déterminer la sensibilité d'une souche du CMT vis-à-vis des ATB ; il s'agit des méthodes phénotypique et génotypique ¹⁸¹.

1. Antibiogramme par la méthode de phénotypie

En phénotypie, il s'agit de cultiver une espèce mycobactérienne sur un milieu contenant un ATB à une concentration minimale connue qui inhibe la multiplication de la mycobactérie. La comparaison de la croissance ou de l'inhibition de la croissance mycobactérienne comparativement à la culture témoin obtenue sur un milieu dépourvue d'ATB (méthode de proportion de Canetti) permet d'apprécier respectivement la résistance et la sensibilité de la mycobactérie vis-à-vis de l'ATB testé. La bactérie est ainsi dite résistante ou sensible à l'ATB testé ¹⁸². La méthode des proportions est la méthode de référence pour tester l'antibiogramme des mycobactéries.

2. Antibiogramme par la méthode de génotypie

L'antibiogramme par la méthode de génotypie ou antibiogramme moléculaire repose sur l'utilisation de l'ADN des mycobactéries afin de détecter les mutations génétiques associées à des résistances aux ATBs. Contrairement à la phénotypie, l'antibiogramme réalisé par la génotypie permet de s'affranchir des longs délais inhérents à la culture et d'obtenir le profil de résistance d'une souche tuberculeuse en moins de 7 jours ¹⁸¹ et cela à partir d'échantillons cliniques non cultivés. Bien que les outils de génotypie permettent de gagner du temps pour ce qui est de l'identification des mutations associées aux résistances aux ATBs, cependant, les outils commerciaux proposés actuellement ne peuvent identifier qu'un certain nombre de mutations connues ^{19, 21, 163, 183, 184} qui se produisent dans des « hot spots » bien déterminées et relativement courtes ^{28, 145, 152}. Jusqu'à un passé très récent, ces tests commerciaux permettaient d'identifier la presque totalité des mutations génétiques conférant la résistance aux ATBs dans ces zones de hot spots identifiées. Toutefois, de nouvelles mutations associées

à des résistances ont été identifiées en dehors de ces « hot spots » et elles ne sont pas détectées par les versions actuelles de ces tests^{148, 149, 163}.

L'hétérorésistance est un phénomène où une population bacillaire suboptimale constituée de mutants coexiste avec une population très majoritaire de bacilles sensibles. Les tests de génotypie commercialisés ne permettent pas toujours la détection des mutants^{21, 149}.

a. Le test GeneXpert MTB/RIF (Xpert)

Développé en 2010, le test Xpert MTB/RIF est une grande avancée technologique qui permet la détection de *M. tuberculosis* dans les échantillons cliniques et la résistance à la RIF.

C'est un test automatisé semi-quantitatif basé sur l'amplification en temps réel semi-nichée de la région core (RDRR) du locus *rpoB* pour le diagnostic de la TB et pour la détection des mutations génétiques associés à la résistance à la RIF. L'amplification est réalisée dans un environnement clos (cartouche) en vue de minimiser les contaminations (Figure 25) entre échantillons, elle utilise 5 sondes de type sauvage fluorescentes qui couvrent la RDRR (Figure 24). Au cours du processus d'amplification, l'hybridation de chacune de ces sondes traduit le caractère sauvage de la séquence de la RDRR et donc la sensibilité de la souche à la RIF (Figure 26), mais par contre, l'absence d'hybridation d'au moins une de ces sondes traduit l'existence d'au moins une mutation (Figure 26 et 27) dans la RDRR et donc le caractère résistant du bacille à la RIF. Chaque sonde permet d'identifier un certain nombre de mutations génétiques dues à une substitution nucléotidique (Figure 24).

Chez l'adulte, la spécificité et la sensibilité du diagnostic de la TB sont de 99,2% et 90,2%, celles liées à la détection de la résistance à la RIF sont de 97,6% et de 98,1%^{20, 21}. Le statut VIH+ des patients n'affectent pas la sensibilité du test^{20, 179}. Chez l'enfant, en dépit d'échantillons paucibacillaire et/ou de volume minime fréquemment obtenus, les résultats de Nhu *et al*,¹⁷⁸ révèlent que sur les expectorations la sensibilité du test est de 50%, et de 81,8% à partir de fluides gastriques^{185, 186}.

Dans sa conception, le test Xpert ne peut identifier que les mutations siégeant dans la RDRR^{20, 145, 149}. De récentes études ont mis en évidence l'existence de mutations (V176F et I497F) en dehors de la RDRR et associées à la résistance à la RIF^{148, 149}. Bien que la détection de la

résistance à la RIF soit le marqueur de la multirésistance, le test ne permet pas d'identifier la résistance à l'INH et ni à aucun autre ATB.

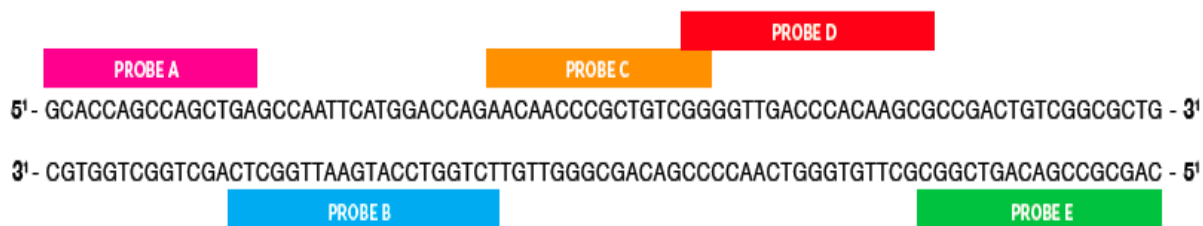


Figure 24 : représentation des 81 pb de la RDRR du gène *rpoB* et des positions de chacune des sondes Xpert sur ladite région ¹⁵⁰.

Les positions des mutations couvertes par les sondes sont ^{19, 183} :

- 510 et 511 avec la sonde A ;
- 513, 516, 516-517 avec la sonde B ;
- 522 avec la sonde C ;
- 526 avec la sonde D ; 531
- 533 avec la sonde E.

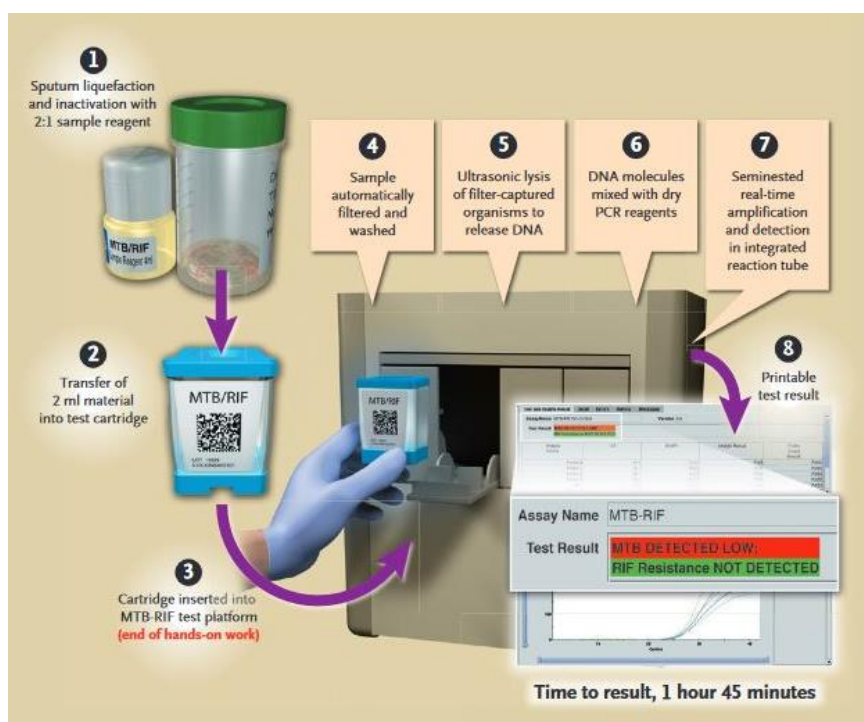


Figure 25 : procédure d'exécution du test Xpert MTB/RIF sur un échantillon clinique ¹⁹.

1. Un volume d'échantillon est liquéfié dans 2 volumes du réactif Xpert 2. Deux millilitres de cette solution sont introduits dans la cartouche Xpert 3. La cartouche est introduite dans l'automate, 4-8. Après 1h45 d'analyse, le logiciel affiche les résultats.

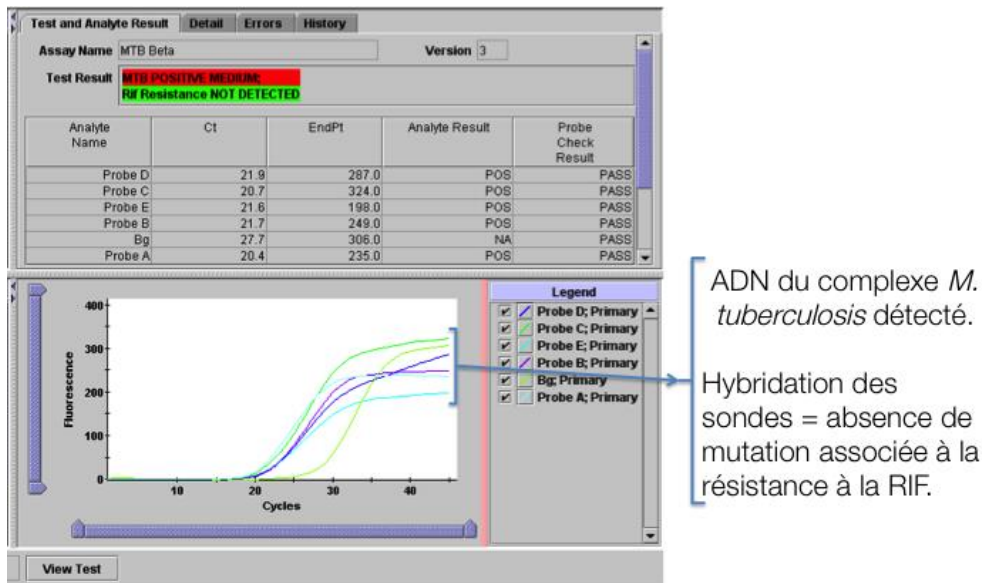


Figure 26 : résultats et interprétation du test GeneXpert pratiqué sur un échantillon clinique à germes sensible à la RIF.

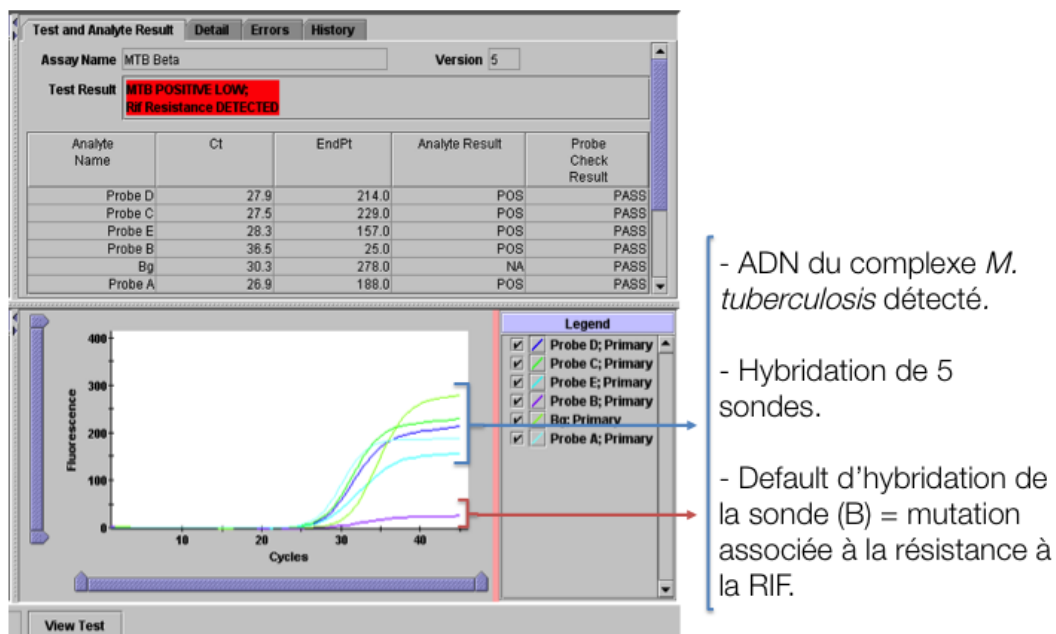


Figure 27 : résultats et interprétation du test GeneXpert pratiqué sur un échantillon clinique à germes résistants à la RIF.

b. Le test d'hybridation inverse sur bandelette - Line Probe Assay de HAIN

Le test Line Probe Assay (LiPA) développé par HAIN est une technique colorimétrique d'hybridation inverse sur bandelette permettant l'analyse de l'ADN pour la détection des mutations génétiques associées aux résistances à la RIF et à l'INH dans la version MTBDR_{plus}

2.0 (Figure 28, 29, 30 et 31)^{21, 43, 187}. La version MTBDRs/ 2.0 (Figure 32, Tableau II) permet de détecter les mutations associées aux résistances aux FQs et aux antibiotiques injectables (AMK, KAN, CAP). Les deux versions du test se pratiquent sur des d'échantillons cliniques non cultivés tels que les expectorations^{163, 184}.

De façon pratique, des portions de gènes sont amplifiées par PCR à l'aide de plusieurs couples de primers biotinylés spécifiques de la région déterminant la résistance à l'ATB (Figure 28). Les produits PCR sont mis en contact avec les sondes de type sauvage et mutée fixées sur les bandelettes et complémentaires des produits d'amplification. La réaction colorimétrique révèle l'hybridation ainsi, les hybridations uniques sur des sondes sauvages traduisent le caractère sauvage du bacille pour le gène en question. À l'inverse, l'hybridation des produits PCR sur une sonde mutée traduit le caractère muté du locus étudié (Figure 31, 32).

La sensibilité et la spécificité du test MTBDR*plus* sont 87,6% et 99,2%, celles liées à la détection de la résistance à la RIF et à l'INH sont de 94,3 et 96% puis de 95,8% et 88,9%, respectivement²¹.

Dans sa version 2.0, le test MTBDRs/ a été optimisé pour détecter, à partir d'échantillons cliniques, les mutations dans *gyrB* et dans la région promotrice du gène *eis* conférant la résistance de bas niveau à la KAN pour une sensibilité de détection de 96% et de 91,6% de spécificité^{151, 163}. Les sensibilités et spécificités sont de 91% et 100% pour l'OFX (gènes *gyrA* et *gyrB*), 89% et 77% pour les AGs (*rrs* et *eis*)^{151, 184}.

i. Le test MTBDR*plus*

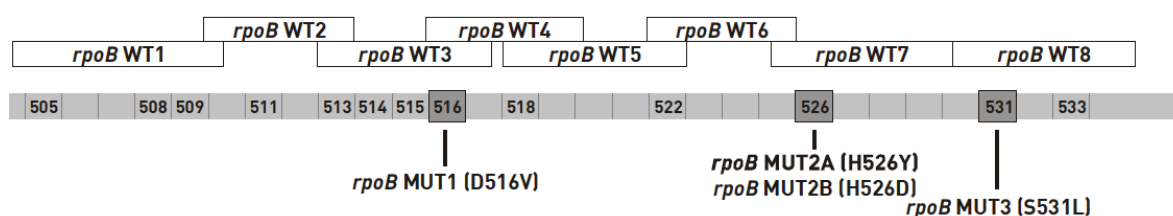


Figure 28 : représentation de la RDRR (81 pb) du locus *rpoB* (barre grisée), de la disposition chevauchante des sondes de type sauvage (rectangles blancs) et des mutations identifiées (entre parenthèses)¹⁵⁰.

failing wild type band	codon analyzed	developing mutation band	mutation
<i>katG</i> WT	315	<i>katG</i> MUT1	S315T
		<i>katG</i> MUT2	S315T2

Figure 29 : mutation S315T au sein du gène *katG* détectée par le test et associée à une résistance de haut niveau à l'INH¹⁵⁰.

failing wild type band	analyzed nucleic acid position	developing mutation band	mutation
<i>inhA</i> WT1	-15	<i>inhA</i> MUT1	C15T
	-16	<i>inhA</i> MUT2	A16G
<i>inhA</i> WT2	-8	<i>inhA</i> MUT3A	T8C
		<i>inhA</i> MUT3B	T8A

Figure 30 : mutations au sein de la région promotrice du locus *inhA* associées à une résistance à l'INH de faible niveau¹⁵⁰.

Pour la résistance à l'INH, le test ainsi conçu ne permet pas de détecter la mutation *katG* Y337C décrite au Panama chez des souches MDR¹⁵⁷, de plus, dans une autre étude, 16% des isolats résistants à l'INH ne possèdent aucune mutation, ni dans *katG* et ni dans *inhA*¹⁶⁰ suggérant l'existence d'autres mutations en d'autres gènes.

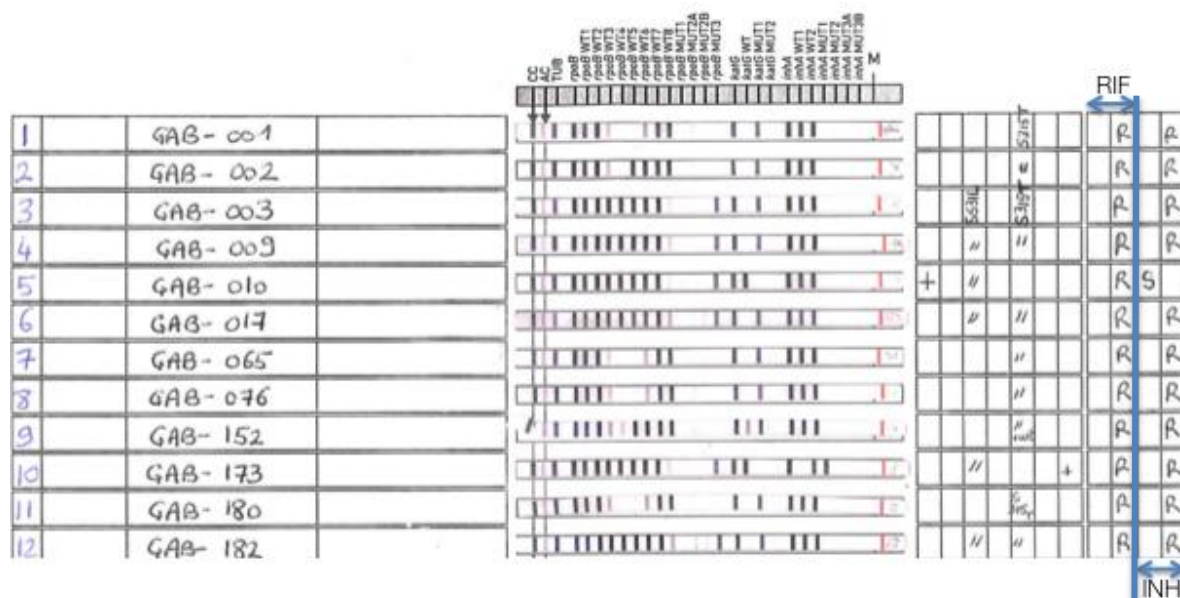


Figure 31 : résultats et interprétation du test MTBDRplus pratiqué sur des thermolysats d'échantillons cliniques non cultivés.

R = résistant ; S = sensible.

ii. Le test MTBDRs/ 2.0

Tableau II : principales mutations du gène *gyrA* conférant la résistance aux quinolones identifiées par le test LiPA HAIN MTBDRs/ ¹⁸⁸⁻¹⁹¹.

Échec d'hybridation de la sonde	Codon analysé	Sonde mutée	Mutation
<i>gyrA</i> WT1	85-90		G88S
<i>gyrA</i> WT1	85-90		G88T
<i>gyrA</i> WT2	89-93	<i>gyrA</i> MUT1	A90V
<i>gyrA</i> WT2	89-93	<i>gyrA</i> MUT2	S91P
<i>gyrA</i> WT3	92-97	<i>gyrA</i> MUT3A	D94A
<i>gyrA</i> WT3	92-97	<i>gyrA</i> MUT3B	D94N
<i>gyrA</i> WT3	92-97	<i>gyrA</i> MUT3B	D94Y
<i>gyrA</i> WT3	92-97	<i>gyrA</i> MUT3C	D94G
<i>gyrA</i> WT3	92-97	<i>gyrA</i> MUT3D	D94H

Résistance phénotypique
aux FQs

	GenoType MTBDRs/ VER 1.0	GenoType MTBDRs/ VER 2.0
	Differences between the two versions are marked in red	
Detection of	<i>M. tuberculosis</i> complex and its resistances to fluoroquinolones, aminoglycosides/cyclic peptides and ethambutol	<i>M. tuberculosis</i> complex and its resistances to fluoroquinolones and aminoglycosides/cyclic peptides
Sample Material	smear-positive pulmonary samples, cultivated samples	smear-positive and -negative pulmonary samples, cultivated samples
Ready-to-use amplification mix	-	✓
Ethambutol	Mutations in the <i>embB</i> gene that are involved in ethambutol resistance	
	✓	-
Fluoroquinolone	Mutations in the <i>gyrB</i> gene that are involved in fluoroquinolone resistance	
	-	✓
Kanamycin	Mutations in the <i>eis</i> gene that are involved in kanamycin resistance	
	-	✓

Figure 32 : description comparative des bandelettes du test MTBDRs/ (versions 1.0 versus 2.0). <http://www.hain-lifescience.de/en/products/microbiology/mycobacteria/tuberculosis/genotype-mtbdrrs.html>.

FLQ = Fluoroquinolones, AG = Aminoglycosides/Aminosides, CP = Capréomycine, EMB = Ethambutol.

c. Le séquençage

Cette méthode d'analyse consiste tout d'abord à amplifier la portion d'un locus d'intérêt par PCR, puis de déterminer la séquence nucléotidique du fragment amplifié. À l'aide de logiciels dédiés, la séquence obtenue est alors comparée à une séquence de référence de type sauvage afin de déceler ou non les changements nucléotidiques par substitution, délétion, insertion ou inversion.

Depuis son avènement dès 1975, le séquençage continue d'être à la base de nombreux savoirs et des avancées techniques majeures dans le domaine de la biologie. Dans le domaine de la TB particulièrement, il a permis de cartographier le génome de *M. tuberculosis*⁸² et de *M. bovis*¹⁹². La comparaison des génomes a révélé de nombreuses différences parmi lesquelles la corrélation entre l'avirulence de la souche vaccinale BCG et l'absence du locus RD1 au sein du génome^{95, 193}. En génotypage, le séquençage permet l'observation de gènes de séquences conservées mais assez variables entre différentes espèces et ayant permis de concevoir différents outils de typage^{81, 92, 180} pour retracer l'histoire évolutive des bacilles de la TB^{72, 94} et aussi d'identifier de nouvelles espèces et de nouveaux lignages^{97, 194}. Dans la lutte contre la TB par la chimiothérapie, on a pu associer des mutations génétiques à des résistances phénotypiques contre les antituberculeux. En raison de la plasticité du génome mycobactérien, de nouvelles mutations associées à des résistances non décrites par le passé ont pu être mises évidence^{20, 145, 149, 151}. La compilation de toutes ces connaissances a été à la base de la conception et de l'amélioration des outils de diagnostic moléculaire cités ci-dessus qui de nos jours permettent d'établir des chimiothérapies adaptées à la sensibilité du bacille. Plus récemment, le séquençage du génome entier, le « Whole Genome Sequencing » (WGS) offre de nouvelles perspectives encore plus prometteuses¹⁹⁵. En effet, la quantité d'informations (SNP) obtenue en un seul test permet de prédire la résistance aux ATBs, de déterminer le taux de mutation et le schéma évolutif de souche lors d'une épidémie, de discriminer sans ambiguïté les souches entre elles,¹⁹⁵⁻¹⁹⁷.

E. Génotypage des souches du complexe *Mycobacterium tuberculosis*

Le génotypage vise à déterminer l'identité d'une bactérie sur la base de variations génétiques de certains gènes. De nos jours, le génotypage est effectué de manière standardisée à l'aide des techniques dites d'empreinte génétique ou de séquençage^{81, 91, 198}. Parmi les techniques d'empreintes génétiques figurent le spoligotypage, le MIRU-VNTR et le SNPs typing.

1. Le spoligotypage

Le spoligotypage ou spoligotyping ou typage des spacers (DVR) est une technique de typage des mycobactéries du CMT basée sur l'hybridation inverse sur membrane de produits PCR du locus DR.

Des sondes, séquences nucléotidiques de 43 spacers : 6 de *M. bovis*-BCG et 37 de *M. tuberculosis* H37Rv^{83, 198} identifiés comme les plus polymorphes^{198, 199} et permettant de typer l'ensemble des souches du CMT sont fixées sur une membrane. La réalisation de la technique se résume brièvement comme suit (Figure 33) :

A. à l'aide de primers Dra-biotinylée et Drb, on amplifie par PCR les DVRs (séquences uniques et variables) de la région DR, **B.** Le produit PCR est constitué d'un ensemble de fragments de tailles diverses recouvrant de façon aléatoire les différentes DVRs, **C.** les produits sont mis en contact avec les sondes fixées sur la membrane. Ces sondes sont des séquences complémentaires des produits PCR obtenus avec les primers Dra et DRb. L'hybridation des produits PCR est suivie de nombreux lavages avec des solutions tampons à différentes températures aboutit à la révélation du film d'autoradiographie exposé à la chimioluminescence produite par la réaction enzymatique entre la streptavidine-peroxydase (reliée à la biotine de l'amorce Dra) et le substrat. Le résultat se présente sous la forme 43 spots horizontaux pouvant être noirs (présence du DVR) et blancs (absence du DVR) dans la région DR du génome de la mycobactérie. La combinaison alternative de ces spots dits spoligotype décrit la signature génétique propre d'un clone des espèces du CMT (Figure 33). Les spoligotypes permettent aussi de distinguer spécifiquement les 6 lignages et les différents clades (Figure 34).

En épidémiologie, en raison de son exécution aisée, le spoligotypage est la première technique utilisée pour de tracer les chaînes de transmission de TB^{78, 200, 201}. Cependant, des

faits que la région DR soit unique et le siège d'importants évènements mutationnels⁷⁸, que la variabilité des DVRs soient moindre, le spoligotypage est un outil moins discriminant que certaines autres techniques telle que le MIRU-VNTR (Figure 38) ; en effet, le spoligotypage classe les souches du CMT en 62 sous-lignages^{77, 79} (Figure 39).

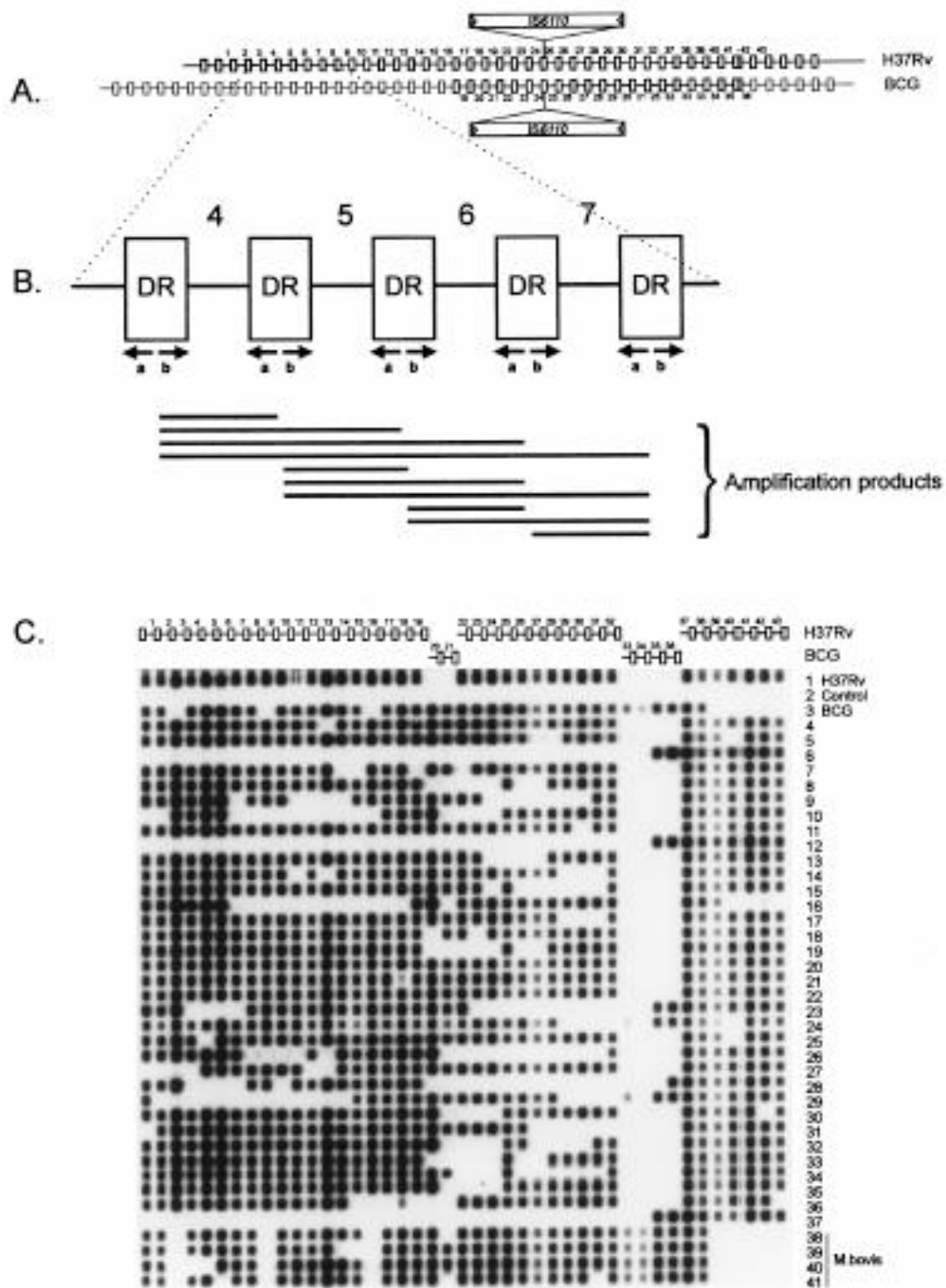


Figure 33 : résumé schématique de la technique d'hybridation inverse sur membrane de spoligotyping^{198, 200, 202}.

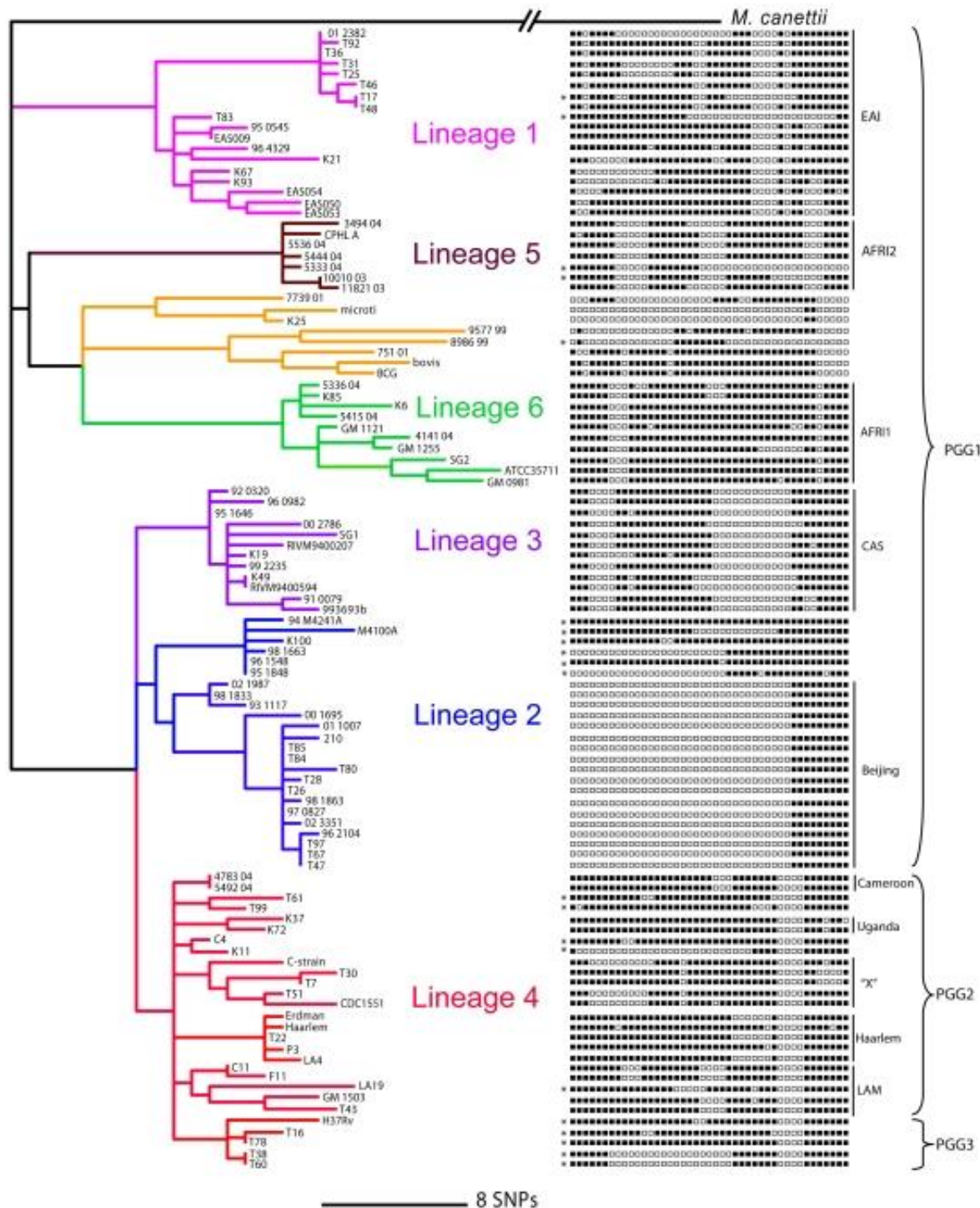


Figure 34 : exemple d'arbre phylogénétique non exhaustif présentant les distances génétiques entre les six principaux lignages, clades et les familles au sein du CMT par combinaison des outils de typage de SNPs et spoligotypage ⁷⁸.

EAI = East-African-Indian, AFR12 = *M. tuberculosis* West-African 2, AFR11 = *M. tuberculosis* West-African 1, CAS = Central Asian, LAM = Latin-American- Mediterranean, PG = Principal Genetic Group (1, 2 et 3), SNPs = Single Nucleotide Polymorphisme.

Dans la version de spoligotypage sur membrane, avec la conception de la membrane et l'exécution du test proprement dit, la technique est laborieuse, elle requière 2 jours pour le typage de 43 échantillons. Cependant, Sola *et al.*,²⁰³ ont mis au point une méthode d'analyse multiplexée mettant à profil la technologie MagPix Luminex (Figure 34). Cet outil fondé sur le principe de la cytométrie en flux, alliant l'utilisation de 43 microsphères paramagnétiques fluorescentes, chaque microsphère est couplée à un oligonucléotide. Grâce à son double système optique, l'automate MagPix excite, identifie et quantifie chacune des 43 microsphères^{203, 204}. En prenant en compte l'étape d'amplification, la méthode permet d'analyser en un seul run 96 échantillons en moins de 5 heures.

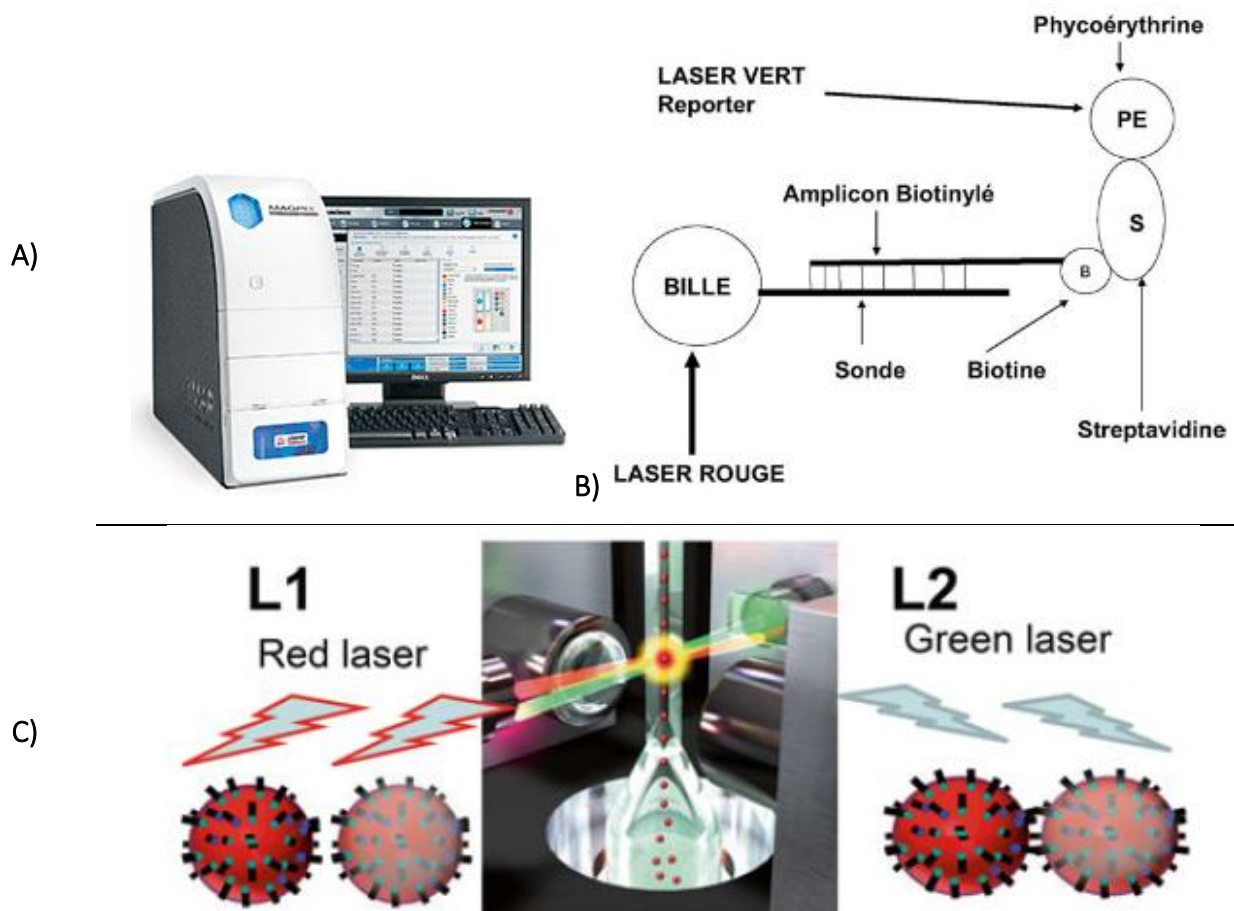


Figure 35 : principes de la méthode de spoligotypage multiplexée appliquée au système MagPix Luminex^{203, 204}.

Brièvement, les produits PCR obtenus avec les primers Dra-biotinylé et Drb sont mis à hybrider avec les 43 microsphères préalablement introduites dans les puits d'une plaque 96 puits. On y ajoute la solution de streptavidine-phycoérythrine (SA-PE) (B). Dans l'instrument

MagPix (A, vue d'ensemble), par excitation, le laser 1 (L1, rouge) reconnaître la microbille et donc le spacer couplé et la quantifie (B et C). Le laser 2 (L2, vert) quantifie la luminosité issue de la réaction enzymatique entre la biotine et la SA-PE (B et C). À la fin du test, le logiciel génère des valeurs numériques dans un fichier Excel, celles-ci, comparées à des cut-offs, valeurs seuils identifient la présence ou l'absence du spacer (Figure 35).

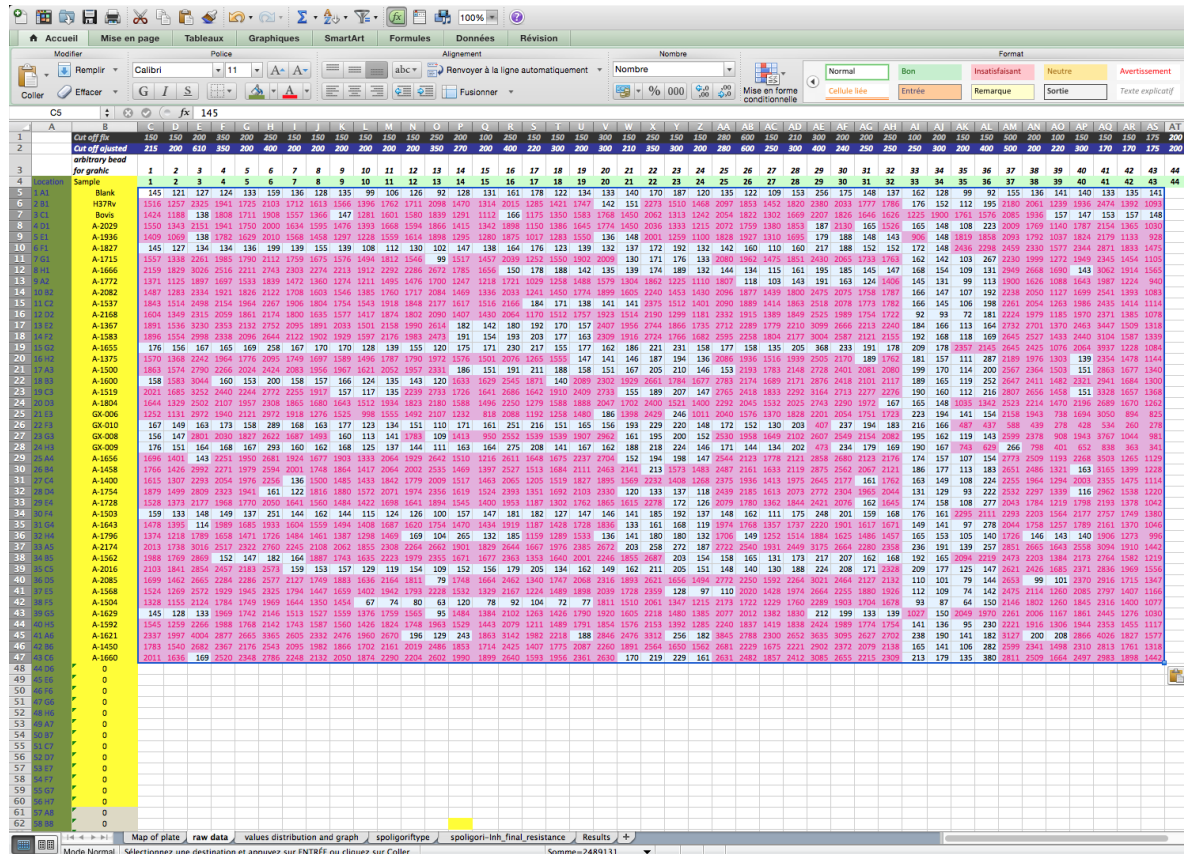


Figure 36 : exemple de résultats de spoligotypage (spoligotypes) suite à l'analyse des données générées par le logiciel (XPONNENT) du MagPix.

Le coût de cette technique est élevé et son utilisation requière une mise au point précise des paramètres. Les profils obtenus sont intermédiairement assemblables pour identification des souches sur les bases de données.

2. Le typage par Mycobacterial Interspersed Repetitive Units (MIRU) - Variable Number Tandem Repeats (VNTR)

La technique de MIRU-VNTR est basée sur l'amplification par PCR de plusieurs loci MIRU et VNTR à l'aide de diverses amorces. Elle se présente sous trois versions, celles à 12 et 15 loci,

moins discriminantes que la version à 24 loci mais nettement plus précises que le spoligotypage^{78, 205, 206} (Figure 38, 39.C et 39.D).

Cet outil de typage est grandement utilisé dans l'investigation d'épidémies de TB pour la détection d'une récente transmission, l'identification de la dissémination d'un clone mycobactérien, ainsi que pour la distinction des cas de réactivation endogène versus réinfection exogène de TB^{78, 205}. En raison du phénomène d'homoplasie moins prononcé comparativement au spoligotypage (Figure 38), le système MIRU-VNTR à 15 loci est nettement plus discriminant que le spoligotypage (Figure 39.B et 39.C). Le système à 24 loci est d'avantage plus discriminant que le système à 12 ou 15 loci⁷⁸ (Figure 39.C et 39.D). Il permet de classer les souches du CMT en 22 sous lignages, alors que le spoligotypage en définit 40 groupes^{77, 79}. Toutefois, dans les contextes d'épidémies dues à des souches génétiquement très proches, il s'est avéré que même le système MIRU-VNTR à 24 loci manque de pouvoir de discrimination^{78, 205-207}. Pour compenser cette faiblesse au sein des isolats de génotype Beijing par exemple, 4 nouveaux loci dits hypervariables ont été ajoutés au système MIRU-VNTR à 24 loci afin d'augmenter le pouvoir de résolution au sein des isolats de génotype Beijing^{207, 208}.

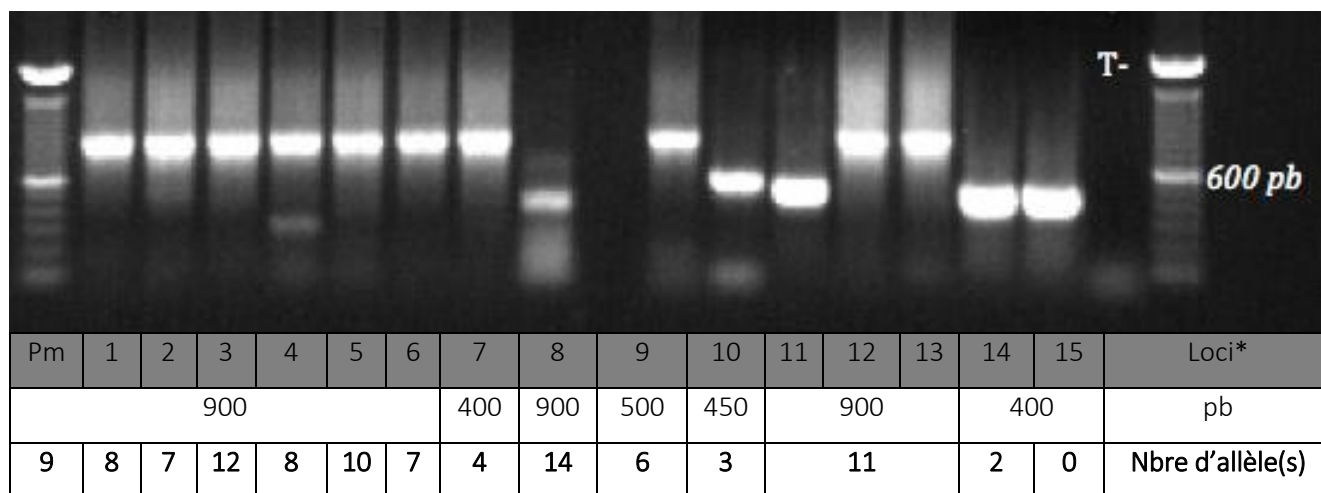


Figure 37 : exemple d'électrophorèse, d'analyse et d'interprétation des résultats par la technique de typage MIRU-VNTR à 15 loci.

Dans l'exemple ci-avant, les 15 loci sont amplifiés avec leurs amorces respectives puis les produits PCR sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose pendant 4 à 5 heures à 100 volts au moins. Une fois le poids moléculaire des amplicons déterminé (Figure 37), le tableau

de correspondance donne l'information sur le nombre de répétitions pour chaque allèle. On obtient une combinaison à 15 chiffres associée à un génotype donné.

Pm = indicateur de poids moléculaire ; pb = paire de base ; T- = témoin négatif ; Loci = il s'agit de ceux conventionnellement baptisés : 424, 577, 580, 802, 960, 1644, 1955, 2163b, 2165, 2401, 2996, 3192, 3690, 4052, 4156.

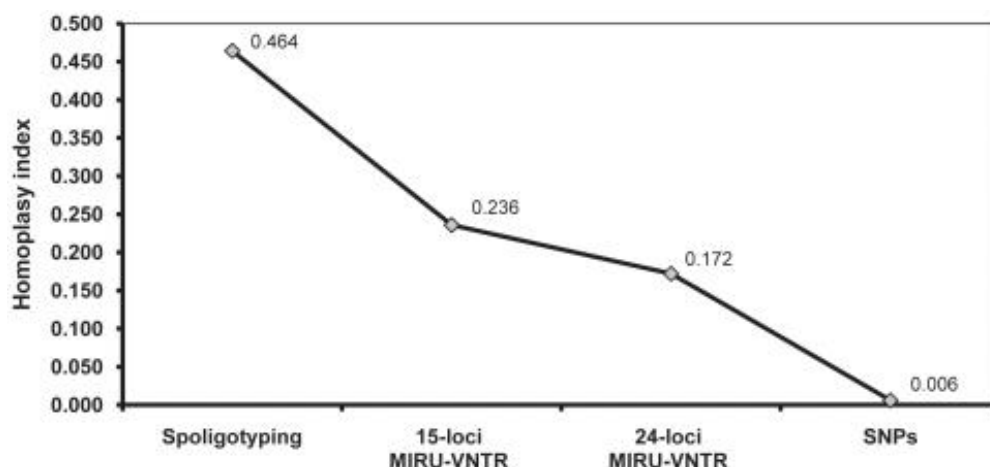


Figure 38 : comparaison l'index d'homoplasie pour les différents outils de typage susmentionnés ⁷⁸.

3. Typage par le polymorphisme de nucléotide unique – Single Nucleotide Polymorphism (SNP)

La méthode de typage par les SNPs permet une discrimination efficace des souches du CMT en les comparant sur la présence ou l'absence de mutations ponctuelles. La méthode est basée sur la PCR et emploie généralement un couple d'amorces (sens et anti-sens sauvages) associé à un second couple d'amorces ou une troisième amorce pourvue d'un SNP en vue de s'hybrider ou non à sa séquence complémentaire sur le génome mycobactérien et permettant de caractériser un lignage ou un clade ^{80, 208}. L'analyse du résultat se fait par la visualisation des amplifications sur un simple gel d'agarose affirmant la simplicité de l'outil de typage.

En vertu de leur faible degré d'homoplasie ⁷⁸ (Figure 38), les SNPs se révèlent être des marqueurs idéaux en raison de leur stabilité pour l'établissement d'une classification phylogénétique robuste des espèces du CMT ⁸⁰ (Figure 39.A) Ils permettent une identification

précise de clones au sein d'une population très homogène comme, par exemple, dans le cas du génotype Beijing^{205, 208, 209}, clade que le système MIRU-VNTR à 24 loci ne parvient pas à discriminer²⁰⁷. Cette technique de typage n'est pas optimisée pour le traçage des liens de transmissions lors d'épidémies^{78, 205}.

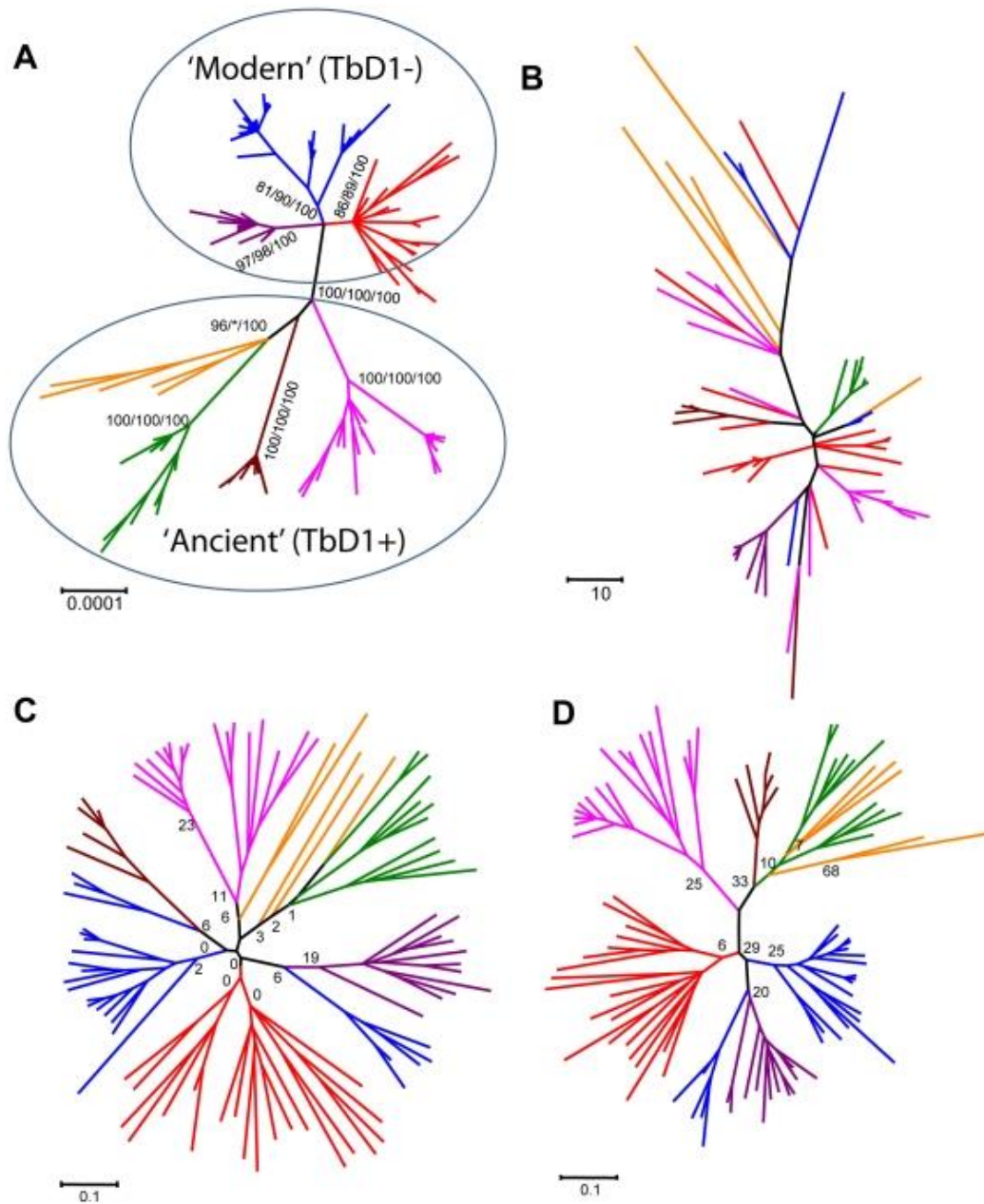


Figure 39 : comparaison des pouvoirs discriminants des techniques de typage à travers la composition et l'organisation des arbres phylogénétiques⁷⁸.

A. par l'évènement délétère TbD1 (distingue les souches dites anciennes des souches modernes)⁷⁵ associant 339 SNPs répartis en 89 gènes, **B.** par spoligotypage, **C.** par le système MIRU-VNTR à 15 loci, **D.** par le système MIRU-VNTR à 24 loci. TbD1 = délétion tuberculeuse 1, SNP = Single Nucleotide Polymorphisms.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Publication scientifique n°1 :

Le pyrazinamide (PZA) est un antibiotique pilier des chimiothérapies antituberculeuses. Il a permis de réduire le traitement de première intention, passant de 9-12 mois à 6 mois ²¹⁰. Dans les traitements recommandés de seconde ligne de 12 et 9 mois basé sur les FQs, il tient une place de choix ^{10, 211}. Grâce à son pouvoir stérilisant, le PZA se distingue des autres antituberculeux, par son activité pharmacologique dirigée contre les populations bacillaires semi-dormantes indexées dans les cas de réactivation endogène des TB à l'origine des rechutes après traitement ²¹². Cet antituberculeux est une pro-drogue, c'est-à-dire que la forme active, l'acide pyrazinoïque (POA) est acquis après l'oxydation de la PZA par la nicotinamidase/pyrazinimidase (PZase), enzyme codée par le gène *pncA* ^{164, 212}. Se présentant sous une forme anionique, l'action *in vitro* et *in vivo* du POA est optimale à pH acide = 5,5 ; et en raison de cette condition particulière, les tests de sensibilité phénotypique à la PZA sont difficilement pratiqués car l'acidité du milieu peut affecter la croissance des bacilles et donc générer de faux résultats ²¹².

Les données de la littérature font généralement état du traitement de patients atteints de TB multirésistante (MDR) et ultrarésistante (XDR) sans la connaissance préalable de la susceptibilité de la souche au PZA. Lors de cette étude, nous avons également relevé une multitude de mutations génétiques (substitution nucléotidique, délétion, insertion) conformément à la littérature où 72 à 97% des isolats cliniques résistants au PZA ont une mutation génétique dans *pncA*. Chez les souches MDR on note qu'environ 50% d'entre elles sont résistantes au PZA et que ce taux passe à 93% lorsque ces souches MDR acquièrent une mutation additionnelle leur conférant la résistance aux fluoroquinolones/quinolones (FQs) ^{35, 212, 213}. Ces observations ont orienté notre réflexion à déterminer l'ordre d'apparition de la résistance au PZA par rapport à la résistance à l'isoniazide (INH) et à l'acquisition de la résistance à la rifampicine (RIF) et aux FQs. En d'autres termes, chez les souches résistantes à l'INH, les mutations génétiques conférant la résistance au PZA surviennent-elles avant ou après l'acquisition de la résistance à la RIF ?

Pour y répondre, nous avons séquencé le locus *pncA* de 272 isolats de *Mycobacterium tuberculosis* obtenus rétrospectivement, de sensibilité phénotypique connue vis-à-vis de la RIF, de l'INH et isolés dans deux grandes villes cosmopolites : Paris (région Nord, hôpital

Bichat-Claude Bernard) soit 101/840 isolats et Shanghai (district de Songjiang, région Sud-ouest) soit 171/797 isolats. Les profils de résistance obtenus en phénotypie ont été confirmés en génotypie. Le séquençage du gène *pncA* de ces isolats a révélé des mutations chez les isolats sensibles à l'INH (1/134 = 0,7%), mono-résistants à l'INH (2/76 = 2,6%), MDR (10/34 = 29,4%), MDR et résistants aux FQs (12/22 = 54,5%), MDR et résistants aux ATBs injectables (AMK, KAN, CAP) (4/6 = 66,6%).

Les résultats expérimentaux obtenus confirment les données de littérature en montrant que les mutations conférant la résistance au PZA surviennent significativement après l'acquisition des résistances à l'INH et la RIF, correspondant à l'état de MDR. Étant de 29,4% chez les souches MDR, le taux de souches résistantes à la PZA augmente de façon progressive à 54,5% puis 66,6% chez les souches MDR résistantes aux FQs et aux ATBs injectables (AMK, KAN, CAP), respectivement ; cette tendance peut laisser supposer que les souches XDR soient toutes résistantes au PZA ²¹⁴. Bien que cela n'ait pas encore été mis en évidence chez *M. tuberculosis*, les antituberculeux dont la RIF, les agents injectables (AMK, KAN, CAP) et les FQs pourraient induire un processus de mutagenèse indirectement au travers des radicaux oxygénés issues de la respiration, un processus associé à l'induction des réponses SOS et ROS ²¹⁵. Un tel phénomène de mutagenèse a été mis en évidence chez *Escherichia coli* et *Vibrio cholerae* ^{216, 217}, cultivé en présence de concentration non létale de ces antibiotiques, des mutations génétiques surviennent dans *rpoB*, *rrs* et *gyrA/gyrB* qui confèrent la résistance à la RIF, les AGs et les FQs, respectivement.

Dans le régime thérapeutique contre le TB-MDR, les actions inhibitrices majeures des FQs et des AGs masquent celle du PZA. La mauvaise appréciation de l'activité du PZA associée à la difficulté des tests phénotypiques auront été des obstacles pour son étude. Toutefois, Chang *et al*, ²¹⁸ ont pu mettre en avant la qualité stérilisante du PZA dans le régime contre la TB-MDR basé sur les FQs. De plus, selon de récents travaux, le traitement substituant PZA par la BDQ associant la RIF et l'INH conduisait à des taux de succès thérapeutique supérieurs chez la souris ²¹⁹. À cet effet, Zhang *et al*, ²¹⁴ recommandent l'emploi du PZA dans les situations de TB-MDR à germes sensibles au PZA, mais par contre s'agissant des germes MDR et résistants au PZA, il serait important de substituer le PZA par un nouvel ATB tel que la BDQ ou la DLM. À cet effet, Bastos *et al*, ²²⁰ prônent la détermination de la sensibilité de la souche au PZA. Bien qu'aucun test de diagnostic rapide n'ait pu être encore développé pour couvrir les mutations

de l'ensemble du locus *pncA*, le séquençage et aussi le Whole Genome Sequencing (WGS) se présentent comme les solutions au problème. Comparé au séquençage de *pncA*, l'approche par le WGS est séduisante car elle permet de regarder dans son ensemble le génome de la bactérie et identifie simultanément les SNPs connus associés à la résistance aux antituberculeux et éventuellement ceux encore inconnus^{149, 195}. Ceci présage qu'en dépit des avancées techniques, l'importance de la culture subsistera afin de toujours vérifier les hypothèses faites en génotypie.

Pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* arises after rifampicin and fluoroquinolone resistance

A. K. Alame-Emane,^{*†} P. Xu,[‡] C. Pierre-Audigier,^{*§} V. Cadet-Daniel,^{*} X. Shen,[¶] M. Sraouia,[§] J. F. Djoba Siawaya,[†] H. Takiff,[#] Q. Gao,[‡] B. Gicquel^{*,**}

^{*}Unité de Génétique Mycobactérienne, Institut Pasteur, Paris, France; [†]Research and Specialised Diagnostics Unit, National Laboratory of Public Health, Libreville, Gabon; [‡]Key Laboratory of Medical Molecular Virology, Institutes of Biomedical Sciences and Institute of Medical Microbiology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai, China; [§]Laboratoire de Bactériologie, Bichat-Claude Bernard Hospital, Paris, France; [¶]Department of Tuberculosis Control, Shanghai Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shanghai, China; [#]Laboratorio de Genética Molecular, Centro de Microbiología y Biología Celular, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Caracas, Venezuela; ^{**}Emerging Bacterial Pathogens Laboratory, Institut Pasteur of Shanghai, Shanghai, China

SUMMARY

BACKGROUND: Multidrug-resistant (MDR) and extensively drug-resistant (XDR) strains of *Mycobacterium tuberculosis* (TB) constitute a major public health concern.

OBJECTIVE: To determine the timing of *pncA* mutations that confer pyrazinamide (PZA) resistance in relation to mutations conferring resistance to isoniazid (INH) and rifampicin (RMP).

DESIGN: Isolates from two major urban centres—Paris (101 strains) and Shanghai (171 strains)—were investi-

gated for the association of *pncA* mutations with resistance to drugs other than PZA.

RESULTS: The proportion of *pncA* mutations found in INH-mono-resistant strains was not increased.

CONCLUSION: *pncA* mutations associated with PZA resistance were found almost exclusively in MDR-TB strains, underlining the importance of determining PZA resistance when treating MDR- or XDR-TB.

KEY WORDS: tuberculosis; drug resistance; pyrazinamide

TUBERCULOSIS (TB) is one of the most life-threatening infectious diseases. More than 8 million people develop the transmissible pulmonary form of TB every year, with a death rate of about 25%.¹ Although efficient chemotherapy for TB has been available since 1965,² the disease remains a major public health problem, and multidrug-resistant (MDR, defined as resistance to at least rifampicin [RMP] and isoniazid [INH]) and extensively drug-resistant TB (XDR-TB, defined as MDR-TB plus resistance to any fluoroquinolone (FQ) and at least one second-line injectable agent—kanamycin [KM], amikacin [AMK] or capreomycin [CPM]) are causing increasing concern.³ Classic internationally recommended treatment for new drug-susceptible TB cases comprises a 6-month regimen in two phases: a 2-month intensive phase with INH, ethambutol (EMB), RMP and pyrazinamide (PZA), followed by a 4-month continuation phase with INH and RMP. DOTS is recommended by the World Health Orga-

nization (WHO) to ensure treatment adherence and thereby increase the cure rate and reduce the development of drug resistance.¹

Alarmingly, however, each year there are 450 000 new MDR-TB cases worldwide, and more than 10% of these cases are XDR-TB. The WHO-recommended treatment for MDR-TB comprises a 24-month regimen of an 8-month intensive phase with KM, prothionamide (PTH), ofloxacin (OFX), PZA and cycloserine or EMB, followed by a 16-month continuation phase with PZA, levofloxacin (LFX), PTH and para-aminosalicylic acid (PAS). A shorter treatment regimen has been recommended by the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, Paris, France, after a successful observational clinical trial in Bangladesh of a 9-month regimen consisting of a minimum of 4 months of KM, clofazimine (CFZ), moxifloxacin (MFX), EMB, high-dose INH, PZA and PTH, followed by 5 months of CFZ, MFX, EMB and PZA.⁴

As most RMP-resistant strains are also resistant to INH, RMP resistance is a marker for the identification of MDR-TB strains;⁵ however, studies to

AKAE, PX, CPA, QG and BG contributed equally to this article.

Correspondence to: Brigitte Gicquel, Unité de Génétique mycobactérienne, Institut Pasteur, 28 rue du Dr Roux, 75015 Paris, France. Tel: (+33) 1 45 68 88 40. Fax: (+33) 1 45 68 88 43. e-mail: bgicquel@pasteur.fr

Article submitted 7 October 2014. Final version accepted 2 February 2015.

[A version in French of this article is available from the Editorial Office in Paris and from the Union website www.theunion.org]

determine susceptibility to other drugs are not always performed. Phenotypic detection of PZA resistance is difficult and often unreliable, as the drug is active only at acid pH 5.5. As this also affects the growth of *Mycobacterium tuberculosis*,^{6,7} both false-susceptible and false-resistant results are observed.^{8–11} There is therefore generally no data on phenotypic susceptibility to PZA when treatment is administered to MDR- or XDR-TB patients, and laboratories have instead moved to *pncA* gene sequencing for the detection of PZA resistance.^{12–15}

PZA is a pro-drug that is converted to pyrazinoic acid (POA) by the pyrazinamidase/nicotinamidase enzyme encoded by the *pncA* gene of *M. tuberculosis*. POA has an excellent sterilising effect on semi-dormant tubercle bacilli,¹⁶ and mutations in *pncA* confer PZA resistance by destroying the ability of the enzyme to convert the pro-drug to POA.¹⁶ A variety of different *pncA* mutations are found in 72–97% of PZA-resistant clinical isolates; most PZA-resistant (PZA^r) strains can therefore be identified by sequencing the *pncA* gene directly from microscopy-positive clinical samples or short-term culture of clinical material.^{12,13,16–18}

Previous studies have shown that about 50% of MDR-TB isolates are resistant to PZA.¹² Our study in Cambodia revealed that 93% of MDR-TB isolates with FQ resistance are also PZA^r.¹⁹ This raised the question about the order of occurrence of PZA resistance in relation to INH resistance and the acquisition of resistance to RMP and FQ, and thus of respectively MDR- and XDR-TB. In the present study, we sought to determine when PZA resistance appeared—does PZA resistance appear in INH-resistant strains before the acquisition of RMP resistance or after? To answer this question, we investigated the presence of PZA resistance, as determined in *pncA* mutations, in INH-resistant non-MDR-TB strains isolated at Bichat-Claude Bernard Hospital in Paris and at the Shanghai Center for Disease Control and Prevention in China (Shanghai Municipal CDC), and compared this with the presence of *pncA* mutations in non-MDR-TB, INH-susceptible, non-MDR-TB INH-monoresistant and MDR-TB strains, with or without FQ or KM/AMK/CPM resistance.

Our results show that PZA resistance in INH-monoresistant strains is rare, and confirm previous findings of a high percentage of *pncA* mutations associated with PZA resistance in MDR-TB strains and a much higher percentage of *pncA* mutations in MDR-TB, FQ-resistant and MDR-TB, KM/AMK/CPM-resistant strains.^{20,21} We discuss the possibility that the accumulation of mutations could be related to exposure to RMP, FQ and KM/AMK, drugs known to induce mutations in several bacterial species.^{22,23}

METHODS

A total of 272 *M. tuberculosis* isolates were collected from hospitals in two large cities with mixed populations, Paris, France, and Shanghai, China: 101 of 840 strains were isolated at the Bichat-Claude Bernard Hospital in Paris (north region) over 4 years, and 171/797 strains were isolated in the Shanghai Songjiang District (south-west region) over 2 years. The TB rates in Paris and Shanghai were respectively 21.9²⁴ and 39.4 per 100 000 population.²⁵ In Paris, identification of mutations conferring resistance to RMP and INH was performed using the Hain GenoType® MTBDR^{plus} (Hain Lifesciences, Nehren, Germany);²⁶ in Shanghai, a dual channel real-time polymerase chain reaction (PCR) melting curve analysis-based assay was used to detect mutations conferring resistance to INH and RMP.²⁷ In both settings, phenotypic susceptibility to INH and RMP was assessed using the proportion method on Löwenstein-Jensen media, with critical concentrations of 0.2 µg/ml for INH and 40 µg/ml for RMP.

PZA resistance-conferring mutations in *pncA*¹² were identified by sequencing the entire gene using four primers: two external primers (*pncA*) and two internal primers (*pncA*-int) (Table 1). As phenotypic PZA susceptibility testing requires acid media and can be difficult and unreliable,¹⁶ molecular methods present a viable alternative^{12,13} and reduce manipulation of drug-resistant strains. To evaluate the number of MDR-TB strains that were XDR-TB, PCR amplification and sequencing was also performed on the *gyrA* and *gyrB* resistance regions and the entire *rrs* gene (see Table 1 for primers) to identify mutations associated with FQ and KM/AMK/CPM resistance, respectively.^{19,20} Genotyping was performed with spoligotyping²⁸ and mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number of tandem repeats (MIRU-VNTR),²⁹ using single nucleotide polymorphisms to differentiate Beijing strains in Paris;³⁰ in Shanghai, the deletion-targeted multiplex PCR (DTM-PCR) method was used to identify Beijing genotype strains.³¹ All results are detailed in the Appendix (Appendix Table A.1). *Ethics approval was not required as this was a retrospective study with previously isolated strains and no patients were involved.

The sample included most of the strains resistant to at least one drug that were isolated from 2008 to 2013 in the Paris hospital, and from June 2010 to June 2012 in Shanghai CDC. The strains isolated in Paris (Table 2) consisted of 16 MDR-TB, 4 MDR-TB with FQ resistance, 3 MDR-TB with KM/AMK/CPM

* The Appendix is available in the online version of this article, at <http://www.ingentaconnect.com/content/ijatld/ijatld/2015/00000019/00000006/art000>

Table 1 Primers used to amplify and sequence *pncA*, *gyrA*, *rrs* and *rpoB* genes

Genes	Antibiotics	Primers	Sequences	Amplification product size
<i>pncA</i>	Pyrazinamide	pncA2 pncA1 pncA-int2 pncA-int1	5'-CTGTCACCGGACGGATTG-3' 5'-ATCGCGATGGAACGTGATA-3' 5'-GGACTTCCATCCCAGTCTG-3' 5'-CGAAGCCGCTGTACGCTCCG-3'	950 bp
<i>gyrA</i>	Fluoroquinolones	gyrA-F gyrA-R	5'-GATGACAGACACGACGTTGC-3' 5'-GGGCTTCGGGTACCTCAT-3'	398 bp
<i>gyrB</i>		gyrB-F gyrB-R	5'-CCACCGACATCGGTGGATT-3' 5'-CTGCCACTTGAGTTGTACA-3'	428 bp
<i>rrs</i>	Aminoglycosides	rrs-F rrs-R	5'-AAACCTCTTTCACCATCGAC-3' 5'-GTATCCATTGATGCTCGC-3'	1329 bp
Entire <i>rpoB</i> gene	Rifampicin	rpoB-F rpoB-R	5'-CCGGACAGATCGTTCGCC-3' 5'-GACCGATGCGGAGTTCATC-3'	3717 bp

bp = base pair.

resistance, 28 non-MDR-TB with INH resistance — 14 high level (minimal inhibitory concentration [MIC] INH ≥ 1 mg/l) and 14 low level (MIC INH $\geq 0.2 < 1$ mg/l), 3 non-MDR-TB with RMP resistance but INH-susceptible, and a control group of 47 strains susceptible to all anti-tuberculosis drugs. Strains isolated in Shanghai (Table 2) were as follows: 21 MDR-TB, 18 MDR-TB with FQ resistance, 48 non-MDR-TB with INH resistance, 9 non-MDR-TB with RMP resistance, and a control group of 75 strains susceptible to all anti-tuberculosis drugs. Details of all mutations detected are presented in the Appendix with drug susceptibility testing and strain genotyping results.

In Paris, we observed nine different *pncA* amino acid substitutions likely associated with PZA resistance (H51R, P54Q, H71Y, T87M, G97D, T100P, Y103C, V130G, T142M), in addition to one deletion of nucleotides 122–241, one Y95STOP and one T–7G. In the Shanghai strains, we observed 10 different *pncA* amino acid substitutions likely associated with PZA resistance (H51R, S59P, T76P, K96Q, S104R, T135P, D136A, C138Y, V139G, A146T), as well as one Y103STOP, one T–7G, one A–11G and one frameshift (insertion of a C at position 394). All of these mutations have previously been described in PZAr strains except for one, D136A, which is also likely to inactivate *pncA* function. Other amino acid

substitutions in codon 136, replacing D with G, H, N or Y, have been reported in a total of 14 PZAr isolates. Appendix Table A.2 lists the previous studies describing the mutations and the frequency reported for each (www.molecularartb.org; http://www.molecularartuberculosis.org/gb/pdf/doc/Molrtb-tableau-pncA-17_12_14.pdf).

Of the 23 Paris MDR-TB strains, 11 (48%) carried a mutation in the *pncA* gene likely associated with PZA resistance. Of these, 3 also had a mutation associated with FQ resistance (2 *gyrA* A90V, D94G and 1 *gyrB* E540V) and 3 had an *rrs* mutation associated with KM/AMK/CPM resistance (A514C, A908C and A1401G). In Shanghai, 15/39 (38%) MDR-TB strains carried a mutation in *pncA*, likely associated with PZA resistance. Of these, 9 had a *gyrA* mutation associated with FQ resistance (1 A90V, 3 D94A, 2 D94G, 1 D94N, 2 D94Y). The rates of *pncA* mutations likely associated with PZA resistance in MDR-TB strains, 48% ($5 + 3 + 3 = 11/16 + 4 + 3 = 23$) in Paris and 38% ($6 + 9 = 15/21 + 18 = 39$) in Shanghai, were slightly lower than the rates (nearly 50%) reported in other countries.¹²

Only a single *pncA* mutation was found (T87M) in one of the 50 (2%) INH- and RMP-susceptible strains in Paris (Table 2). The non-MDR-TB nature of this strain was confirmed by sequencing the *rpoB* core region, which showed an RMP-susceptible M.

Table 2 Distribution of strains presenting *pncA* mutations associated with PZA resistance (by drug resistance profiles, Paris and Shanghai)

Resistance profile	Paris n/N (%)	Shanghai n/N (%)	Total n/N (%)
INH-susceptible, non-MDR-TB	1/50 (2)	0/84 (0)	1/134
INH-resistant, non-MDR-TB	0/28 (0)	2/48 (4)	2/76
MDR-TB	5/16 (31)	5/18 (28)	10/34
MDR and FQ-resistant	3/4 (75)	9/18 (50)	12/22
MDR-TB and aminoglycoside-resistant	3/3 (100)	1/3 (33)	4/6
Total	12/101 (12)	17/171 (10)	29/272 (11)

PZA = pyrazinamide; INH = isoniazid; MDR-TB = multidrug-resistant tuberculosis; FQ = fluoroquinolone.

Table 3

	MDR-TB n/N (%)	Non-MDR-TB n/N (%)
A) Numbers and percentages of Beijing strains in <i>M. tuberculosis</i> isolates		
Paris	2/23 (9)	6/78 (8)
Shanghai	33/39 (85)	100/132 (76)
B) Numbers and percentages of Beijing strains with <i>pncA</i> mutations associated with PZA resistance		
Paris	1/11 (9)	1/1 (100)
Shanghai	11/15 (73)	2/2 (100)

MDR-TB = multidrug-resistant tuberculosis; PZA = pyrazinamide.

tuberculosis genotype. No other mutation was found when the whole *rpoB* gene was sequenced.

No *pncA* mutations were found in any of the French strains with mono-INH or mono-RMP resistance, but mutations likely associated with PZA resistance were seen in 5/16 (31%) MDR-TB strains, 3/4 (75%) MDR-TB FQ-resistant strains and 3/3 (100%) of MDR-TB KM/AMK/CPM-resistant strains (Table 2). In Shanghai, *pncA* mutations likely associated with PZA resistance were absent in all 84 pan-susceptible strains, and were found in just 2/48 (4%) strains with INH resistance, but in 5/18 (28%) MDR-TB strains, 1/3 (33%) MDR-TB, KM/AMK/CPM-resistant strains and 9/18 (50%) MDR-TB, FQ-resistant strains.

The treatment history of the patients was investigated (Appendix Table A.2): about half (11/23, 48%) of the patients with a *pncA* mutation had been previously treated with anti-tuberculosis drugs. One of the two PZA^r INH-resistant, non-MDR-TB strains was from a previously treated patient, while the other was from an untreated patient.

Thus, as a strain becomes MDR-TB and then progressively develops resistance to additional drugs, there is an increased likelihood that it will also develop *pncA* mutations and PZA resistance. The scarcity of *pncA* mutations in otherwise pan-susceptible or non-MDR-TB, INH- or RMP-monoresistant strains demonstrates that *pncA* mutations generally occur after the acquisition of both INH and RMP resistance. The one pan-susceptible Paris strain with a *pncA* mutation (T87M) was unexpected and unexplained, as were the two *pncA*-mutated Shanghai strains (V139G, A146T) with mono-INH resistance, although *pncA* mutations in INH-resistant non-MDR-TB strains have been described previously.³²

The bactericidal activity of antibiotics is generally due to the induction of metabolic pathways after interaction with a specific target (for a review, see Kohanski et al.³³). Recent studies have shown that exposure of bacterial species other than *Escherichia coli* to several drugs, including aminoglycosides, RMP or FQs, encourages the production of oxygen radicals that induce the secondary oxidative species (SOS) system and thereby increases mutagenesis.²² Although

this has not been demonstrated in *M. tuberculosis*, we may hypothesise that similar mechanisms could lead to the accumulation of mutations conferring antibiotic resistance,²³ including resistance to PZA. The frequency of mutations in *pncA*-conferring PZA resistance could thus be increased in bacilli exposed to RMP, FQ and the aminoglycosides. A recent study found that *pncA* is the most variable gene in the genome, probably due to the many different mutations that can result in PZA resistance.³⁴ However, strains with *pncA* mutations appeared to be poorly transmitted, as they were not often found in clusters, suggesting that they may have some fitness cost. Because PZA has been shown to be a key component of successful drug regimens,² it is important to identify PZA resistance rapidly so that an effective treatment regimen can be instituted. This is critical to prevent the accumulation of further drug resistance and optimise the chances of curing MDR- and XDR-TB cases. Whether or not the rare *pncA* mutations in non-MDR-TB strains affect the ability of the standard drug regimen to cure the patient is unknown.

Many MDR- and XDR-TB outbreaks have been caused by strains of the Beijing family, and it has been suggested that the highly resistant Beijing strains may somehow have an increased propensity to develop drug resistance.³⁵ In our study, there was a significant number of Beijing strains only in Shanghai. A greater proportion of these Beijing strains were observed in the group of MDR-TB isolates than in the non-MDR-TB group (33/39, 85% vs. 100/132, 76%) (Table 3 A). An increased percentage of MDR-TB strains with *pncA* mutations associated with PZA resistance was found in the group of Shanghai Beijing MDR-TB strains (11/15, 73%; Table 3 B) than that published independently of the genotypes (around 50%).¹² The increased number of *pncA* mutations observed among the Shanghai MDR-TB Beijing strains may indicate a genetic background capable of accumulating resistance mutations without a reduction in fitness, as has been suggested.³⁴ The number of Beijing strains in the Paris group was too small for analysis, and the number of non-MDR-TB PZA^r strains was too small to compare genotypes.

CONCLUSION

Because of its in vivo antibiotic activity on replicating *M. tuberculosis* bacilli, its low cost and low toxicity, PZA is a standard component of the early intensive phase of anti-tuberculosis treatment for drug-susceptible as well as MDR- and XDR-TB strains.¹⁵ Our study supports this role, as *pncA* mutations associated with PZA resistance were found to be common only in MDR-TB strains, and rare in strains with isolated INH resistance, showing that *pncA* mutations occur after the acquisition of RMP resistance. It has been suggested that exposure to antibiotics such

as RMP, the FQs and aminoglycosides can generate reactive oxygen species that induce the SOS system, thereby increasing mutation frequency and facilitating the development of additional drug resistance.^{22,23} It is therefore important to determine PZA resistance when treating MDR- or XDR-TB to optimise the chances of cure and avoid the development of resistance to the remaining effective drugs. Sequencing the *pncA* gene to find mutations is a useful method for the detection of PZA resistance.

Acknowledgements

This work is part of the NAREB (Nanotherapeutics for Antibiotic Resistant Emerging Bacterial pathogens) European Research Network (Collaborative Project), supported by the European Union's Seventh Framework Program for research, technological development and demonstration under grant agreement no 604237. This work is also part of the 'Programme de recherche sur les nouvelles molécules intervenant dans la lutte contre la tuberculose' supported by the Gabonese Republic. This study was supported by the Key Project of Chinese National Programmes, China (2013ZX10003004-001), Beijing, China; the Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Project G-2005000393, Caracas, Venezuela; the Chinese Academy of Science, Beijing, China; Institut Pasteur of Shanghai, Shanghai, China; and the Institut Pasteur of Paris, France.

Conflicts of interest: none declared.

References

- World Health Organization. Global tuberculosis report, 2014. WHO/HTM/TB/2014.08. Geneva, Switzerland: WHO, 2014: p 154.
- Mitchison D, Davies G. The chemotherapy of tuberculosis: past, present and future. *Int J Tuberc Lung Dis* 2012; 16: 724–732.
- Abubakar I, Zignol M, Falzon D, et al. Drug-resistant tuberculosis: time for visionary political leadership. *Lancet Infect Dis* 2013; 13: 529–539.
- Van Deun A, Maug A K, Salim M A, et al. Short, highly effective, and inexpensive standardized treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 182: 684–692.
- Riska P F, Jacobs W R, Jr, Alland D. Molecular determinants of drug resistance in tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000; 4 (Suppl 1): S4–S10.
- Heifets L, Lindholm-Levy P. Pyrazinamide sterilizing activity in vitro against semidormant *Mycobacterium tuberculosis* bacterial populations. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145: 1223–1225.
- Zhang Y, Scorpio A, Nikaido H, Sun Z. Role of acid pH and deficient efflux of pyrazinoic acid in unique susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *J Bacteriol* 1999; 181: 2044–2049.
- Zhang Y, Permar S, Sun Z. Conditions that may affect the results of susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *J Med Microbiol* 2002; 51: 42–49.
- Simons S O, van Ingen J, van der Laan T, et al. Validation of *pncA* gene sequencing in combination with the mycobacterial growth indicator tube method to test susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 428–434.
- Piersimoni C, Mustazzoli A, Giannoni F, Bornigia S, Gherardi G, Fattorini L. Prevention of false resistance results obtained in testing the susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide with the BACTEC™ MGIT™ 960 system using a reduced inoculum. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 291–294.
- Hoffner S, Angeby K, Sturegard E, et al. Proficiency of drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* against pyrazinamide: the Swedish experience. *Int J Tuberc Lung Dis* 2013; 17: 1486–1490.
- Chang K C, Yew W W, Zhang Y. Pyrazinamide susceptibility testing in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review with meta-analyses. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 4499–4505.
- Miotto P, Cabibbe A M, Feuerriegel S, et al. *Mycobacterium tuberculosis* pyrazinamide resistance determinants: a multicenter study. *MBio* 2014; 5: e01819–01814.
- Simons S O, van der Laan T, Mulder A, et al. Rapid diagnosis of pyrazinamide-resistant multidrug-resistant tuberculosis using a molecular-based diagnostic algorithm. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20: 1015–1020.
- World Health Organization. Companion handbook to the WHO guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis. WHO/HTM/TB/2014.11. Geneva, Switzerland: WHO, 2014: p 403.
- Zhang Y, Mitchison D. The curious characteristics of pyrazinamide: a review. *Int J Tuberc Lung Dis* 2003; 7: 6–21.
- Choi J H, Lee K W, Kang H R, et al. Clinical efficacy of direct DNA sequencing analysis on sputum specimens for early detection of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in a clinical setting. *Chest* 2010; 137: 393–400.
- Streicher E M, Maharaj K, York T, et al. Rapid sequencing of the *Mycobacterium tuberculosis pncA* gene for detection of pyrazinamide susceptibility. *J Clin Microbiol* 2014; 52: 4056–4057.
- Surcouf C, Heng S, Pierre-Audigier C, et al. Molecular detection of fluoroquinolone-resistance in multidrug-resistant tuberculosis in Cambodia suggests low association with XDR phenotypes. *BMC Infect Dis* 2011; 11: 255.
- Minime-Lingoupou F, Pierre-Audigier C, Kassa-Kelembho E, et al. Rapid identification of multidrug-resistant tuberculosis isolates in treatment failure or relapse patients in Bangui, Central African Republic. *Int J Tuberc Lung Dis* 2010; 14: 782–785.
- Pierre-Audigier C, Surcouf C, Cadet-Daniel V, et al. Fluoroquinolone and pyrazinamide resistance in multidrug-resistant tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2012; 16: 221–223, i–ii.
- Baharoglu Z, Mazel D. *Vibrio cholerae* triggers SOS and mutagenesis in response to a wide range of antibiotics: a route towards multiresistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 2438–2441.
- Gillespie S H, Basu S, Dickens A L, O'Sullivan D M, McHugh T D. Effect of subinhibitory concentrations of ciprofloxacin on *Mycobacterium fortuitum* mutation rates. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56: 344–348.
- Leporc E, Carré N, Vandentorren S. Évolution de la tuberculose en Île-de-France de 2000 à 2010. *Bull Epidemiol Hebd* 2014; 8: 138–143. [French]
- Xu P, Li X, Zhao M, et al. Prevalence of fluoroquinolone resistance among tuberculosis patients in Shanghai, China. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 3170–3172.
- Crudu V, Stratan E, Romancenco E, Allerheiligen V, Hillemann A, Moraru N. First evaluation of an improved assay for molecular genetic detection of tuberculosis as well as rifampin and isoniazid resistances. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 1264–1269.
- Chen X, Kong F, Wang Q, Li C, Zhang J, Gilbert G L. Rapid detection of isoniazid, rifampin, and ofloxacin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates using high-resolution melting analysis. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 3450–3457.
- Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 907–914.

- 29 Allix-Beguec C, Harmsen D, Weniger T, Supply P, Niemann S. Evaluation and strategy for use of MIRU-VNTR_{plus}, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. J Clin Microbiol 2008; 46: 2692–2699.
- 30 Coscolla M, Gagneux S. Consequences of genomic diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. Semin Immunol 2014; 26: 431–444.
- 31 Chen J, Tsolaki A G, Shen X, Jiang X, Mei J, Gao Q. Deletion-targeted multiplex PCR (DTM-PCR) for identification of Beijing/W genotypes of *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis (Edinb) 2007; 87: 446–449.
- 32 Tan Y, Hu Z, Zhang T, et al. Role of *pncA* and *rpsA* gene sequencing in detection of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from southern China. J Clin Microbiol 2014; 52: 291–297.
- 33 Kohanski M A, Dwyer D J, Collins J J. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. Nat Rev Microbiol 2010; 8: 423–435.
- 34 Casali N, Nikolayevskyy V, Balabanova Y, et al. Evolution and transmission of drug-resistant tuberculosis in a Russian population. Nat Genet 2014; 46: 279–286.
- 35 Ford C B, Shah R R, Maeda M K, et al. *Mycobacterium tuberculosis* mutation rate estimates from different lineages predict substantial differences in the emergence of drug-resistant tuberculosis. Nat Genet 2013; 45: 784–790.

APPENDIX

Table A.1 Results of genotyping performed to identify Beijing genotype strains

Strain number	City	Drug susceptibility testing	<i>pncA</i> mutations associated with PZA resistance	<i>rpoB</i> mutations associated with RMP resistance	<i>katG</i> mutations associated with INH resistance	<i>inhA</i> mutations associated with INH resistance	<i>rrs</i> mutations associated with KM and/or AMK resistance	<i>gyrA</i> mutations associated with FQ resistance	<i>gyrB</i> mutations associated with FQ resistance	Lineage
101	Paris	MDR-TB		S531L	S315T					Beijing
1340	Paris	MDR-TB		L511P/H521Q	S315N					No Beijing
1345	Paris	MDR-TB		H526D	S315T					No Beijing
1450	Paris	MDR-TB		S531L	S315T					No Beijing
1648	Paris	MDR-TB		S531L	S315T					No Beijing
1954	Paris	MDR-TB		S531L	S315T					No Beijing
2049	Paris	MDR-TB		S531L	S315T					No Beijing
2174	Paris	MDR-TB		H526P	S315T					No Beijing
2180	Paris	MDR-TB		S531L	S315T					No Beijing
2165	Paris	MDR-TB		S531L		C15T				No Beijing
1864	Paris	MDR-TB		S531L		C15T				No Beijing
647	Shanghai	MDR-TB								Beijing
649	Shanghai	MDR-TB								Beijing
652	Shanghai	MDR-TB								Beijing
1028	Shanghai	MDR-TB								Beijing
668	Shanghai	MDR-TB								Beijing
1579	Shanghai	MDR-TB								Beijing
209	Shanghai	MDR-TB								Beijing
1886	Shanghai	MDR-TB								Beijing
598	Shanghai	MDR-TB								Beijing
684	Shanghai	MDR-TB								Beijing
756	Shanghai	MDR-TB								Beijing
878	Shanghai	MDR-TB								Beijing
883	Shanghai	MDR-TB								Beijing
1504	Paris	MDR-TB	V130G	S531L	S315T					No Beijing
1913	Paris	MDR-TB	Y95stop	S531L	S315T					Beijing
2082	Paris	MDR-TB	del nt 122–241	S531L	S315T					No Beijing
2145	Paris	MDR-TB	H51R	S531L	S315T	C15T				No Beijing
2167	Paris	MDR-TB	G97D	S531L	S315T					No Beijing
1338	Shanghai	MDR-TB	A-11G							No Beijing
779	Shanghai	MDR-TB	T76P							Beijing
492	Shanghai	MDR-TB	Y103STOP							Beijing
679	Shanghai	MDR-TB	S104R							Beijing
222	Shanghai	MDR-TB	D136A							No Beijing
1503	Paris	MDR-TB and Fqr		S531L	S315T					No Beijing
653	Shanghai	MDR-TB and Fqr						D94H		Beijing
1058	Shanghai	MDR-TB and Fqr						D94A		Beijing
shxx0560	Shanghai	MDR-TB and Fqr						D94N		Beijing
1586	Shanghai	MDR-TB and Fqr						D94N		Beijing
1587	Shanghai	MDR-TB and Fqr						D94N		Beijing
1631	Shanghai	MDR-TB and Fqr						D94N		Beijing
1661	Shanghai	MDR-TB and Fqr						D94N		Beijing
32	Shanghai	MDR-TB and Fqr						S91P		Beijing
888	Shanghai	MDR-TB and Fqr						D94N		Beijing
1796	Paris	MDR-TB and Fqr	T100P	H526D	S315T	C15T			E540V	No Beijing

Table A.1 (continued)

Strain number	City	Drug susceptibility testing	<i>pncA</i> mutations associated with PZA resistance	<i>rpoB</i> mutations associated with RMP resistance	<i>katG</i> mutations associated with INH resistance	<i>inhA</i> mutations associated with INH resistance	<i>rrs</i> mutations associated with KM and/or AMK resistance	<i>gyrA</i> mutations associated with FQ resistance	<i>gyrB</i> mutations associated with FQ resistance	Lineage
2154	Paris	MDR-TB and FQr	T142M	S531L	S315T	C15T		A90V		Beijing
2110	Paris	MDR-TB and FQr	H71Y	H526Y	S315T			D94G		No Beijing
743	Shanghai	MDR-TB and FQr	A-11G					D94G		Beijing
1429	Shanghai	MDR-TB and FQr	T-7G					D94G		Beijing
1628	Shanghai	MDR-TB and FQr	H51R					D94A		Beijing
806	Shanghai	MDR-TB and FQr	K96Q					D94A		Beijing
876	Shanghai	MDR-TB and FQr	K96Q					D94A		Beijing
22–870	Shanghai	MDR-TB and FQr	ins C at nt 394 (frameshift)					D94N		Beijing
199	Shanghai	MDR-TB and FQr	T135P					A90V		Beijing
1060	Shanghai	MDR-TB and FQr	C138Y					D94T		No Beijing
1197	Shanghai	MDR-TB and FQr	C138Y					D94T		No Beijing
105	Shanghai	MDR-TB and AGr					A514C			Beijing
2260	Shanghai	MDR-TB and AGr					A1401G			Beijing
92	Shanghai	MDR-TB and AGr	S59P				A908C			No Beijing
1505	Paris	MDR-TB and AGr	Y103C	S531W	Y155D	C15T	A514C			No Beijing
1967	Paris	MDR-TB and AGr	T – 7 G	S531L	S315T		A1401G			No Beijing
1403	Paris	MDR-TB and AGr	P54Q	Q513P	S315T	C15T				No Beijing
1875	Paris	INHr, non-MDR-TB								No Beijing
586	Shanghai	INHr, non-MDR-TB	V139G							Beijing
1364	Shanghai	INHr, non-MDR-TB	A146T							Beijing
1660	Paris	INHr, non-MDR-TB				C15T				No Beijing
1859	Paris	INHr, non-MDR-TB				C15T				No Beijing
1629	Paris	INHr, non-MDR-TB				C15T				No Beijing
2132	Paris	INHr, non-MDR-TB				C15T				No Beijing
1568	Paris	INHr, non-MDR-TB				C15T				No Beijing
1592	Paris	INHr, non-MDR-TB				C15T				No Beijing
1666	Paris	INHr, non-MDR-TB				C15T				No Beijing
1715	Paris	INHr, non-MDR-TB				C15T				No Beijing
1827	Paris	INHr, non-MDR-TB				C15T				No Beijing
1844	Paris	INHr, non-MDR-TB				C15T				No Beijing
1936	Paris	INHr, non-MDR-TB				C15T				No Beijing
2029	Paris	INHr, non-MDR-TB				T8C				No Beijing
2141	Paris	INHr, non-MDR-TB			S315T	C15T				No Beijing
1951	Paris	INHr, non-MDR-TB								No Beijing
1979	Paris	INHr, non-MDR-TB			S315T					No Beijing
1400	Paris	INHr, non-MDR-TB			S315T	C15T				No Beijing
1540	Paris	INHr, non-MDR-TB			S315T					No Beijing
1621	Paris	INHr, non-MDR-TB			S315T					No Beijing
1643	Paris	INHr, non-MDR-TB			S315T					No Beijing
1754	Paris	INHr, non-MDR-TB			S315N					No Beijing
1980	Paris	INHr, non-MDR-TB			S315T					No Beijing
2147	Paris	INHr, non-MDR-TB			S315T					No Beijing
1728	Paris	INHr, non-MDR-TB			S315T					No Beijing
1833	Paris	INHr, non-MDR-TB			S315T					No Beijing
1874	Paris	INHr, non-MDR-TB			S315T					No Beijing
1895	Paris	INHr, non-MDR-TB			S315T					No Beijing

Table A.1 (continued)

Strain number	City	Drug susceptibility testing	<i>prnA</i> mutations associated with PZA resistance	<i>rpoB</i> mutations associated with RMP resistance	<i>katG</i> mutations associated with INH resistance	<i>inhA</i> mutations associated with INH resistance	<i>rrs</i> mutations associated with KM and/or AMK resistance	<i>gyrA</i> mutations associated with FQ resistance	<i>gyrB</i> mutations associated with FQ resistance	Lineage
2085	Paris	INHr, non-MDR-TB			S315T					No Beijing
103	Shanghai	INHr, non-MDR-TB								Beijing
128	Shanghai	INHr, non-MDR-TB								No Beijing
sh090219	Shanghai	INHr, non-MDR-TB								Beijing
sh100243	Shanghai	INHr, non-MDR-TB								No Beijing
333	Shanghai	INHr, non-MDR-TB								Beijing
sh090853	Shanghai	INHr, non-MDR-TB								Beijing
sh090861	Shanghai	INHr, non-MDR-TB								Beijing
1024	Shanghai	INHr, non-MDR-TB								Beijing
sh091340	Shanghai	INHr, non-MDR-TB								Beijing
336	Shanghai	INHr, non-MDR-TB								No Beijing
431	Shanghai	INHr, non-MDR-TB								Beijing
433	Shanghai	INHr, non-MDR-TB								Beijing
sh100434	Shanghai	INHr, non-MDR-TB								Beijing
sh100666	Shanghai	INHr, non-MDR-TB								Beijing
670	Shanghai	INHr, non-MDR-TB								Beijing
879	Shanghai	INHr, non-MDR-TB								Beijing
sh100975	Shanghai	INHr, non-MDR-TB								Beijing
sh100980	Shanghai	INHr, non-MDR-TB								Beijing
1155	Shanghai	INHr, non-MDR-TB								No Beijing
1158	Shanghai	INHr, non-MDR-TB								Beijing
1224	Shanghai	INHr, non-MDR-TB								Beijing
1900	Shanghai	INHr, non-MDR-TB								No Beijing
sh101902	Shanghai	INHr, non-MDR-TB								Beijing
sh102227	Shanghai	INHr, non-MDR-TB								Beijing
sh102339	Shanghai	INHr, non-MDR-TB								No Beijing
121	Shanghai	INHr, non-MDR-TB								Beijing
254	Shanghai	INHr, non-MDR-TB								Beijing
518	Shanghai	INHr, non-MDR-TB								No Beijing
619	Shanghai	INHr, non-MDR-TB								No Beijing
629	Shanghai	INHr, non-MDR-TB								No Beijing
632	Shanghai	INHr, non-MDR-TB								No Beijing
879	Shanghai	INHr, non-MDR-TB								No Beijing
891	Shanghai	INHr, non-MDR-TB								No Beijing
926	Shanghai	INHr, non-MDR-TB								Beijing
1107	Shanghai	INHr, non-MDR-TB								Beijing
1212	Shanghai	INHr, non-MDR-TB								Beijing
1213	Shanghai	INHr, non-MDR-TB								Beijing
1304	Shanghai	INHr, non-MDR-TB								Beijing
1459	Shanghai	INHr, non-MDR-TB								Beijing
1561	Shanghai	INHr, non-MDR-TB								No Beijing
1675	Shanghai	INHr, non-MDR-TB								Beijing
1726	Shanghai	INHr, non-MDR-TB								Beijing
1885	Shanghai	INHr, non-MDR-TB								No Beijing
2107	Shanghai	INHr, non-MDR-TB								No Beijing
156	Shanghai	INHr, non-MDR-TB								Beijing
454	Shanghai	INHr, non-MDR-TB								No Beijing

Table A.1 (continued)

Strain number	City	Drug susceptibility testing	<i>pncA</i> mutations associated with PZA resistance	<i>rpoB</i> mutations associated with RMP resistance	<i>katG</i> mutations associated with INH resistance	<i>inhA</i> mutations associated with INH resistance	<i>rrs</i> mutations associated with KM and/or AMK resistance	<i>gyrA</i> mutations associated with FQ resistance	<i>gyrB</i> mutations associated with FQ resistance	Lineage
2129	Paris	INHs, RMPr								No Beijing
1670	Paris	INHs, RMPr								No Beijing
1341	Paris	INHs, RMPr						A90V		No Beijing
1458	Paris	INHs, RMPr								No Beijing
1772	Paris	INHs, RMPr								No Beijing
108	Shanghai	INHs, RMPr								Beijing
sh080241	Shanghai	INHs, RMPr								Beijing
247	Shanghai	INHs, RMPr								Beijing
646	Shanghai	INHs, RMPr								Beijing
sh100435	Shanghai	INHs, RMPr								Beijing
sh101582	Shanghai	INHs, RMPr								No Beijing
188	Shanghai	INHs, RMPr								Beijing
1216	Shanghai	INHs, RMPr								Beijing
2012	Shanghai	INHs, RMPr								Beijing
2026	Paris	INHs, RMPs	T87M							No Beijing
1534	Paris	INHs, RMPs								No Beijing
1562	Paris	INHs, RMPs								No Beijing
1353	Paris	INHs, RMPs								No Beijing
1367	Paris	INHs, RMPs								Beijing
1583	Paris	INHs, RMPs								No Beijing
1655	Paris	INHs, RMPs								No Beijing
1691	Paris	INHs, RMPs								Beijing
1945	Paris	INHs, RMPs								No Beijing
2168	Paris	INHs, RMPs								Beijing
1375	Paris	INHs, RMPs								No Beijing
1500	Paris	INHs, RMPs								No Beijing
1600	Paris	INHs, RMPs								No Beijing
1656	Paris	INHs, RMPs								No Beijing
1688	Paris	INHs, RMPs								No Beijing
1753	Paris	INHs, RMPs								No Beijing
1804	Paris	INHs, RMPs								No Beijing
1953	Paris	INHs, RMPs								No Beijing
1993	Paris	INHs, RMPs								No Beijing
1519	Paris	INHs, RMPs								No Beijing
1664	Paris	INHs, RMPs								No Beijing
1806	Paris	INHs, RMPs								No Beijing
2000	Paris	INHs, RMPs								No Beijing
2001	Paris	INHs, RMPs								No Beijing
2002	Paris	INHs, RMPs								No Beijing
2003	Paris	INHs, RMPs								No Beijing
2004	Paris	INHs, RMPs								No Beijing
2005	Paris	INHs, RMPs								No Beijing
2006	Paris	INHs, RMPs								No Beijing
2007	Paris	INHs, RMPs								No Beijing
2009	Paris	INHs, RMPs								No Beijing
2010	Paris	INHs, RMPs								No Beijing
2011	Paris	INHs, RMPs								Beijing

Table A.1 (continued)

Strain number	City	Drug susceptibility testing	<i>pncA</i> mutations associated with PZA resistance	<i>rpoB</i> mutations associated with RMP resistance	<i>katG</i> mutations associated with INH resistance	<i>inhA</i> mutations associated with INH resistance	<i>rrs</i> mutations associated with KM and/or AMK resistance	<i>gyrA</i> mutations associated with FQ resistance	<i>gyrB</i> mutations associated with FQ resistance	Lineage
2012	Paris	INHs, RMPs								No Beijing
2013	Paris	INHs, RMPs								No Beijing
2014	Paris	INHs, RMPs								No Beijing
2015	Paris	INHs, RMPs								No Beijing
2016	Paris	INHs, RMPs								No Beijing
2017	Paris	INHs, RMPs								No Beijing
2018	Paris	INHs, RMPs								No Beijing
2019	Paris	INHs, RMPs								No Beijing
2020	Paris	INHs, RMPs								No Beijing
2021	Paris	INHs, RMPs								No Beijing
2022	Paris	INHs, RMPs								No Beijing
2023	Paris	INHs, RMPs								No Beijing
98	Shanghai	INHs, RMPs								Beijing
213	Shanghai	INHs, RMPs								No Beijing
245	Shanghai	INHs, RMPs								No Beijing
246	Shanghai	INHs, RMPs								Beijing
248	Shanghai	INHs, RMPs								Beijing
439	Shanghai	INHs, RMPs								Beijing
443	Shanghai	INHs, RMPs								Beijing
504	Shanghai	INHs, RMPs								No Beijing
654	Shanghai	INHs, RMPs								No Beijing
656	Shanghai	INHs, RMPs								Beijing
764	Shanghai	INHs, RMPs								Beijing
1059	Shanghai	INHs, RMPs								Beijing
1199	Shanghai	INHs, RMPs								Beijing
1202	Shanghai	INHs, RMPs								Beijing
1346	Shanghai	INHs, RMPs								Beijing
1599	Shanghai	INHs, RMPs								Beijing
1616	Shanghai	INHs, RMPs								Beijing
1617	Shanghai	INHs, RMPs								Beijing
1690	Shanghai	INHs, RMPs								Beijing
1885	Shanghai	INHs, RMPs								Beijing
470	Shanghai	INHs, RMPs								Beijing
553	Shanghai	INHs, RMPs								Beijing
556	Shanghai	INHs, RMPs								Beijing
558	Shanghai	INHs, RMPs								Beijing
664	Shanghai	INHs, RMPs								Beijing
667	Shanghai	INHs, RMPs								Beijing
674	Shanghai	INHs, RMPs								Beijing
930	Shanghai	INHs, RMPs								No Beijing
978	Shanghai	INHs, RMPs								Beijing
984	Shanghai	INHs, RMPs								Beijing
985	Shanghai	INHs, RMPs								Beijing
1581	Shanghai	INHs, RMPs								Beijing
1669	Shanghai	INHs, RMPs								Beijing
1676	Shanghai	INHs, RMPs								Beijing
2075	Shanghai	INHs, RMPs								Beijing

Table A.1 (continued)

Strain number	City	Drug susceptibility testing	<i>pncA</i> mutations associated with PZA resistance	<i>rpoB</i> mutations associated with RMP resistance	<i>katG</i> mutations associated with INH resistance	<i>inhA</i> mutations associated with INH resistance	<i>rfs</i> mutations associated with KM and/or AMK resistance	<i>gyrA</i> mutations associated with FQ resistance	<i>gyrB</i> mutations associated with FQ resistance	Lineage
2228	Shanghai	INHs, RMPs								Beijing
2333	Shanghai	INHs, RMPs								No Beijing
2336	Shanghai	INHs, RMPs								Beijing
31	Shanghai	INHs, RMPs								Beijing
33	Shanghai	INHs, RMPs								Beijing
91	Shanghai	INHs, RMPs								No Beijing
94	Shanghai	INHs, RMPs								Beijing
108	Shanghai	INHs, RMPs								No Beijing
116	Shanghai	INHs, RMPs								No Beijing
423	Shanghai	INHs, RMPs								Beijing
438	Shanghai	INHs, RMPs								Beijing
440	Shanghai	INHs, RMPs								Beijing
541	Shanghai	INHs, RMPs								No Beijing
633	Shanghai	INHs, RMPs								Beijing
889	Shanghai	INHs, RMPs								Beijing
943	Shanghai	INHs, RMPs								Beijing
1002	Shanghai	INHs, RMPs								Beijing
1559	Shanghai	INHs, RMPs								No Beijing
1563	Shanghai	INHs, RMPs								No Beijing
1728	Shanghai	INHs, RMPs								No Beijing
1889	Shanghai	INHs, RMPs								Beijing
1891	Shanghai	INHs, RMPs								Beijing
1928	Shanghai	INHs, RMPs								No Beijing
2106	Shanghai	INHs, RMPs								No Beijing
2213	Shanghai	INHs, RMPs								No Beijing
2284	Shanghai	INHs, RMPs								Beijing
2286	Shanghai	INHs, RMPs								Beijing
158	Shanghai	INHs, RMPs								Beijing
311	Shanghai	INHs, RMPs								Beijing
315	Shanghai	INHs, RMPs								No Beijing
458	Shanghai	INHs, RMPs								Beijing
493	Shanghai	INHs, RMPs								Beijing
495	Shanghai	INHs, RMPs								No Beijing
594	Shanghai	INHs, RMPs								Beijing
595	Shanghai	INHs, RMPs								No Beijing
771	Shanghai	INHs, RMPs								Beijing
782	Shanghai	INHs, RMPs								Beijing
875	Shanghai	INHs, RMPs								Beijing
879	Shanghai	INHs, RMPs								No Beijing
885	Shanghai	INHs, RMPs								Beijing

MDR-TB = multidrug-resistant tuberculosis; FQr = fluoroquinolone-resistant; AGr = aminoglycoside-resistant; INHr = isoniazid-resistant; RMPr = rifampicin-resistant; INHs = INH-susceptible; RMPs = RMP-susceptible.

Table A.2 Nucleotides or AA substitutions associated with PZA resistance, previous treatment and genotype

Nucleotide or AA substitution	Present study			References	
	City	Isolates <i>n</i>	Previous anti-tuberculous treatment of the patient (0 new, T previous treatment)	Genotype	Isolates reported as PZA-resistant in literature <i>n</i>
A-11G	Shanghai	2	T/0	No Beijing/Beijing	61
T-7G	Shanghai	1	T	Beijing	1
H51R	Paris/Shanghai	2	T/0	Euro-American/Beijing	22
P54Q	Paris	1	T	Euro-American	5
S59P	Shanghai	1	0	Beijing	3
H71Y	Paris	1	0	Indo-Oceanic	7
T76P	Shanghai	1	0	Beijing	32

Sreevatsan, Antimicrob Agents Chemother, 1997¹
Escalante, Tubercle Lung Dis, 1998²
Mestdagh, Antimicrob Agents Chemother, 1999³
Martila, Antimicrob Agents Chemother, 1999⁴
Cheng, Antimicrob Agents Chemother, 2000⁵
Lee, J Korean Med Sci, 2001⁶
Park, BMC Infect Dis, 2001⁷
Wade, Diag Microbiol Infect Dis, 2004⁸
Portugal, Antimicrob Agents Chemother 2004⁹
Juréen, Antimicrob Agents Chemother, 2008¹⁰
Jonmalung, BMC Microbiol, 2010¹¹
Feuerriegel, BMC Microbiol, 2012¹²
Miotto, MBio, 2014¹³
Miotto, MBio, 2014¹³
Escalante, Tubercle Lung Dis 1998²
Hirano, Tubercle Lung Dis 1998¹⁴
Barco, J Antimicrob Chemother, 2006¹⁵
Somoskovi, J Clin Microbiol, 2007¹⁶
Sheen, J Clin Microbiol, 2009¹⁷
Piersimoni, J Clin Microbiol, 2013¹⁸
Miotto, MBio, 2014¹³
Barco, J Antimicrob Chemother, 2006¹⁵
Miotto, MBio, 2014¹³
Brown, Med Microbiol, 2000¹⁹
Barco, J Antimicrob Chemother, 2006¹⁵
Mphahlele, J Clin Microbiol 2008²⁰
McCammon, Antimicrob. Agents Chemother, 2005²¹
Low, Int J Tuberc Lung Dis, 2006²²
Mphahlele, J Clin Microbiol, 2008²⁰
Sheen, J Clin Microbiol, 2009¹⁷
Stoffels, Antimicrob Agents Chemother, 2012²³
Cuevas-Cordoba, Infect Genet Evol, 2013²⁴
Sreevatsan, Antimicrob Agents Chemother, 1997¹
Hirano, Tubercle Lung Dis, 1998¹⁴
Morlock, Antimicrob Agents Chemother, 2000²⁵
Lee, Korean Med Sci, 2001⁶
Tracevska, Antimicrob Agents Chemother, 2004²⁶
Rodrigues, Antimicrob Agents Chemother, 2005²⁷
McCammon, Antimicrob Agents Chemother, 2005²¹
Perdigao, Microb Drug Resistance 2008²⁸
Martin, J Antimicrob Chemother, 2008²⁹
Sheen, Clin Microbiol, 2009¹⁷
Simons, J Clin Microbiol, 2012³⁰
Cuevas-Cordoba, Infect Genet Evol, 2013²⁴
Bhujju, Infect Genet Evol, 2013³¹
Tan, J Clin Microbiol, 2014³²
Napierkowska, Int J Tuberc Lung Dis, 2014³³

Table A.2 (continued)

Nucleotide or AA substitution	Present study			References	
	City	Isolates <i>n</i>	Previous anti-tuberculous treatment of the patient (0 new; T previous treatment)	Genotype	Isolates reported as PZA-resistant in literature <i>n</i>
T87M	Paris	1	0	Euro-American	Stoffels, Antimicrob Agents Chemother, 2012 ²³
K96Q	Shanghai	2	T	Beijing	Lee, J Korean Med Sci, 2001 ¹⁶ Miotto, MBio, 2014 ¹³
G97D	Paris	1	T	Euro-American	Morlock, Antimicrob Agents Chemother, 2000 ²⁵ Lee, Int J Infect Dis, 2002 ³⁴ Huang, Antimicrob Agents Chemother, 2003 ³⁵ Martin, Antimicrob Agents Chemother, 2006 ³⁶ Mphahlele, J Clin Microbiol 2008 ²⁰ Hoffner, Int J Tuberc Lung Dis, 2013 ³⁷ Yoon, J Microbiol Biotechnol, 2014 ³⁸ Miotto, MBio, 2014 ¹³
T100P	Paris	1	0	Euro-American	Miotto, MBio, 2014 ¹³
Y103C	Paris	1	T	Euro-American	Lemaitre, Antimicrob Agents Chemother, 1999 ³⁹ Napierkowska, Int J Tuberc Lung Dis, 2014 ³³
S104R	Shanghai	1	0	Beijing	Hirano, Tubercle Lung Dis, 1998 ¹⁴ Somoskovi, J Clin Microbiol, 2007 ¹⁶ Jonmalung, BMC Microbiol, 2010 ¹¹ Simons, Clin Microbiol Infect, 2014 ⁴⁰ Hirano, Tubercle Lung Dis, 1998 ¹⁴
V130G	Paris	1	0	Euro-American	Morlock, Antimicrob Agents Chemother, 2000 ²⁵ Martin, J Antimicrob Chemother, 2008 ⁴¹ Miotto, MBio, 2014 ¹³
T135P	Shanghai	1	0	Beijing	Suzuki, Clin Microbiol, 2002 ⁴² Lee, J Korean Med Sci 2001 ⁶ Park, BMC Infect Dis, 2001 ⁷ Morlock, Antimicrob Agents Chemother, 2000 ²⁵ Tan, J Clin Microbiol, 2014 ³² Sheen, Clin Microbiol, 2009 ¹⁷ Miotto, MBio, 2014 ¹³
C138Y	Shanghai	2	T	no Beijing	Yoon, World J Microbiol Biotechnol 2014 ³⁸ Simons, Clin Microbiol Infect, 2014 ⁴⁰ Morlock, Antimicrob Agents Chemother, 2000 ²⁵ Tracevska, Antimicrob Agents Chemother, 2004 ²⁶ Somoskovi, Clin Microbiol, 2007 ¹⁶
V139G	Shanghai	1	T	Beijing	Jurén, Antimicrob Agents Chemother, 2008 ¹⁰ Morlock, Antimicrob Agents Chemother, 2000 ²⁵ Lee, Int J Infect Dis 2002 ³⁴ Martin, Antimicrob Chemother, 2006, 2008 ^{29,36} Perdigao, J Microb Drug Resistance 2008 ²⁸ Jonmalung, BMC Microbiology 2010 ¹¹ Daum, J Clin Microbiol 2012 ⁴³ Tan, J Clin Microbiol, 2014 ³² Miotto, MBio, 2014 ¹³

Table A.2 (continued)

Nucleotide or AA substitution	Present study			References	
	City	Isolates <i>n</i>	Previous anti-tuberculous treatment of the patient (0 new; T previous treatment)	Genotype	Isolates reported as PZA-resistant in literature <i>n</i>
T142M	Paris	1	T	Beijing	8
A146T	Shanghai	1	0	Beijing	4

AA = amino acid; PZA = pyrazinamide; BMC = Biomed Central.

References

- 1 Sreevatsan S, Pan X, Zhang Y, Kreiswirth B N, Musser J M. Mutations associated with pyrazinamide resistance in *pncA* of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41: 636–640.
- 2 Escalante P, Ramaswamy S, Sanabria H, et al. Genotypic characterization of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Peru. Tubercle Lung Dis 1998; 79: 111–118.
- 3 Mestdagh M, Fonteyne P A, Realini L, et al. Relationship between pyrazinamide resistance, loss of pyrazinamidase activity, and mutations in the *pncA* locus in multidrug-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 2317–2319.
- 4 Marttila H J, Marjamäki M, Vyshnevskaya E, et al. *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from northwestern Russia. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 1764–1766.
- 5 Cheng S J, Thibert L, Sanchez T, Heifets L, Zhang Y. *pncA* mutations as a major mechanism of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: spread of a monoresistant strain in Quebec, Canada. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 528–532.
- 6 Lee K W, Lee J M, Jung K S. Characterization of *pncA* mutations of pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Korea. J Korean Med Sci 2001; 16: 537–543.
- 7 Park S K, Lee J Y, Chang C L, et al. *pncA* mutations in clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Korea. BMC Infect Dis 2001; 1: 4.
- 8 Wade M M, Volokhov D, Peredelchuk M, Chizhikov V, Zhang Y. Accurate mapping of mutations of pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains with a scanning-frame oligonucleotide microarray. Diagn Microbiol Infect Dis 2004; 49: 89–97.
- 9 Portugal I, Barreiro L, Moniz-Pereira J, Brum L. *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Portugal. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 2736–2738.
- 10 Jureen P, Werngren J, Toro J C, Hoffner S. Pyrazinamide resistance and *pncA* gene mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52: 1852–1854.
- 11 Jonmalung J, Prammananan T, Leechawengwongs M, Chaiprasert A. Surveillance of pyrazinamide susceptibility among multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Siriraj Hospital, Thailand. BMC Microbiol 2010; 10: 223.
- 12 Feuerriegel S, Oberhauser B, George A G, et al. Sequence analysis for detection of first-line drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* strains from a high-incidence setting. BMC Microbiol 2012; 12: 90.
- 13 Miotto P, Cabibbe A M, Feuerriegel S, et al. *Mycobacterium tuberculosis* pyrazinamide resistance determinants: a multicenter study. MBio 2014; 5: e01819–01814.
- 14 Hirano K, Takahashi M, Kazumi Y, Fukasawa Y, Abe C. Mutation in *pncA* is a major mechanism of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Tubercle Lung Dis 1998; 78: 117–122.
- 15 Barco P, Cardoso R F, Hirata R D, et al. *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from the southeast region of Brazil. J Antimicrob Chemother 2006; 58: 930–935.
- 16 Somoskovi A, Dormandy J, Parsons L M, et al. Sequencing of the *pncA* gene in members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex has important diagnostic applications: identification of a species-specific *pncA* mutation in *Mycobacterium canettii* and the reliable and rapid predictor of pyrazinamide resistance. J Clin Microbiol 2007; 45: 595–599.
- 17 Sheen P, Mendez M, Gilman R H, et al. Sputum PCR-single-strand conformational polymorphism test for same-day detection of pyrazinamide resistance in tuberculosis patients. J Clin Microbiol 2009; 47: 2937–2943.

- 18 Piersimoni C, Mustazzolu A, Giannoni F, Bornigia S, Gherardi G, Fattorini L. Prevention of false resistance results obtained in testing the susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide with the Bactec MGIT 960 system using a reduced inoculum. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 291–294.
- 19 Brown T J, Tansel O, French G L. Simultaneous identification and typing of multi-drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates by analysis of *pncA* and *rpoB*. *J Med Microbiol* 2000; 49: 651–656.
- 20 Mphahlele M, Syre H, Valvatne H, et al. Pyrazinamide resistance among South African multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 3459–3464.
- 21 McCammon M T, Gillette J S, Thomas D P, et al. Detection by denaturing gradient gel electrophoresis of *pncA* mutations associated with pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the United States-Mexico border region. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 2210–2217.
- 22 Louw G E, Warren R M, Donald P R, et al. Frequency and implications of pyrazinamide resistance in managing previously treated tuberculosis patients. *Int J Tuberc Lung Dis* 2006; 10: 802–807.
- 23 Stoffels K, Mathys V, Fauville-Dufaux M, Wintjens R, Bifani P. Systematic analysis of pyrazinamide-resistant spontaneous mutants and clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 5186–5193.
- 24 Cuevas-Cordoba B, Xochihua-Gonzalez S O, Cuellar A, Fuentes-Dominguez J, Zenteno-Cuevas R. Characterization of *pncA* gene mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Mexico. *Infect Genet Evol* 2013; 19: 330–334.
- 25 Morlock G P, Crawford J T, Butler W R, et al. Phenotypic characterization of *pncA* mutants of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 2291–2295.
- 26 Tracevska T, Jansone I, Baumanis V, Nodieva A, Marga O, Skenders G. Spectrum of *pncA* mutations in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates obtained in Latvia. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 3209–3210.
- 27 Rodrigues Vde F, Telles M A, Ribeiro M O, Cafrune P I, Rossetti M L, Zaha A. Characterization of *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 444–446.
- 28 Perdigao J, Macedo R, Joao I, Fernandes E, Brum L, Portugal I. Multidrug-resistant tuberculosis in Lisbon, Portugal: a molecular epidemiological perspective. *Microb Drug Resist* 2008; 14: 133–143.
- 29 Martin A, von Groll A, Fissette K, Palomino J C, Varaine F, Portaels F. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* resistance to second-line drugs by use of the manual *Mycobacterium* Growth Indicator Tube system. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 3952–3956.
- 30 Simons S O, van Ingen J, van der Laan T, et al. Validation of *pncA* gene sequencing in combination with the mycobacterial growth indicator tube method to test susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 428–434.
- 31 Bhuju S, Fonseca Lde S, Marsico A G, et al. *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Rio de Janeiro reveal unusually low correlation between pyrazinamide resistance and mutations in the *pncA* gene. *Infect Genet Evol* 2013; 19: 1–6.
- 32 Tan Y, Hu Z, Zhang T, et al. Role of *pncA* and *rpsA* gene sequencing in detection of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from southern China. *J Clin Microbiol* 2014; 52: 291–297.
- 33 Napiorkowska A, Rüsche-Gerdes S, Hillemann D, Richter E, Augustynowicz-Kopec E. Characterisation of pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Poland and Germany. *Int J Tuberc Lung Dis* 2014; 18: 454–460.
- 34 Lee A S, Tang L L, Lim I H, Wong S Y. Characterization of pyrazinamide and ofloxacin resistance among drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Singapore. *Int J Infect Dis* 2002; 6: 48–51.
- 35 Huang T S, Lee S S, Tu H Z, et al. Correlation between pyrazinamide activity and *pncA* mutations in *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 3672–3673.
- 36 Martin A, Takiff H, Vandamme P, Swings J, Palomino J C, Portaels F. A new rapid and simple colorimetric method to detect pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* using nicotinamide. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58: 327–331.
- 37 Hoffner S, Angeby K, Sturegard E, et al. Proficiency of drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* against pyrazinamide: the Swedish experience. *Int J Tuberc Lung Dis* 2013; 17: 1486–1490.
- 38 Yoon J H, Nam J S, Kim K J, Ro Y T. Characterization of *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Korea and analysis of the correlation between the mutations and pyrazinamidase activity. *World J Microbiol Biotechnol* 2014; 30: 2821–2828.
- 39 Lemaitre N, Sougakoff W, Truffot-Pernot C, Jarlier V. Characterization of new mutations in pyrazinamide-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* and identification of conserved regions important for the catalytic activity of the pyrazinamidase *pncA*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1761–1763.
- 40 Simons S O, van der Laan T, Mulder A, et al. Rapid diagnosis of pyrazinamide-resistant multidrug-resistant tuberculosis using a molecular-based diagnostic algorithm. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20: 1015–1020.
- 41 Martin A, Cubillos-Ruiz A, Von Groll A, Del Portillo P, Portaels F, Palomino J C. Nitrate reductase assay for the rapid detection of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* using nicotinamide. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61: 123–127.
- 42 Suzuki Y, Suzuki A, Tamaru A, Katsukawa C, Oda H. Rapid detection of pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by a PCR-based in vitro system. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 501–507.
- 43 Daum L T, Rodriguez J D, Worthy S A, et al. Next-generation ion torrent sequencing of drug resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis* strains. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 3831–3837.
- 44 Scorpio A, Lindholm-Levy P, Heifets L, et al. Characterization of *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 540–543.
- 45 Jnawali H N, Hwang S C, Park Y K, et al. Characterization of mutations in multi- and extensive drug resistance among strains of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in Republic of Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; 76: 187–196.

R E S U M E

CADRE : Les souches multirésistantes (MDR) et ultrarésistantes (XDR) de *Mycobacterium tuberculosis* (TB) constituent un problème majeur de santé publique.

OBJECTIF : Etudier la chronologie de l'apparition des mutations de *pncA* associées à la résistance au pyrazinamide (PZA) en lien avec les mutations conférant la résistance à l'isoniazide (INH) et à la rifampicine (RMP).

MÉTHODES : L'association des mutations de *pncA* à la résistance aux drogues autres que le PZA a été analysée

sur les isolats de deux grands centres urbains, Paris (101 souches) and Shanghai (171 souches).

RÉSULTATS : Le pourcentage de mutations de *pncA* n'est pas augmenté parmi les souches monorésistantes à l'INH.

CONCLUSION : Les mutations de *pncA* associées à la résistance au PZA ont été trouvées presque exclusivement sur les souches TB-MDR, soulignant l'importance de déterminer la résistance au PZA lors du traitement de TB-MDR ou -XDR.

R E S U M E N

MARCO DE REFERENCIA: Las cepas multidrogorresistentes (MDR) y extremadamente drogorresistentes (XDR) de *Mycobacterium tuberculosis* (TB) constituyen un grave problema de salud pública.

OBJETIVO: Determinar la correlación cronológica de las mutaciones del gen *pncA* que confieren resistencia a pirazinamida (PZA), con las mutaciones que confieren resistencia a isoniazida (INH) y rifampicina.

MÉTODOS: Se investigó la asociación de mutaciones del gen *pncA* con la resistencia a medicamentos diferentes de

la PZA en los aislados clínicos provenientes de dos grandes centros urbanos, a saber, París (101 cepas) y Shanghai (171 cepas).

RESULTADOS: No se observó un aumento del porcentaje de mutaciones del gen *pncA* en las cepas monorresistentes a INH.

CONCLUSIÓN: Las mutaciones del gen *pncA* que se asociaron con resistencia a PZA, se encontraron casi de manera exclusiva en las cepas TB-MDR, lo cual pone de relieve la importancia de detectar la resistencia a PZA cuando se tratan casos de TB-MDR o -XDR.

Publication scientifique n°2 (en cours de soumission) :

Le Gabon est un pays de l'Afrique Centrale faiblement peuplé avec 1,5 million d'habitants. Il figure parmi les États du monde à forte incidence de TB avec une incidence nationale estimée à 444 cas pour 100 000 habitants ². Depuis la création du programme de lutte contre la TB (PNLT) au milieu des années 90, la microscopie après coloration de Ziehl-Neelsen demeure l'unique outil de diagnostic bactériologique pratiqué par les laboratoires publics ^{22, 26, 177}. La microscopie est rapide et peu coûteuse. Elle ne nécessite pas la mise en place des installations nécessaires à la pratique de la culture. Toutefois, elle est peu sensible, ne permet pas l'identification de l'espèce mycobactérienne et n'apporte aucune conclusion sur la sensibilité aux antituberculeux ou donnée épidémiologique ^{26, 177}. De ce fait, l'histoire de l'épidémiologie de la TB au Gabon et particulièrement à Libreville, la capitale, demeure totalement méconnue.

Pour y remédier, nous avons développé une méthodologie moléculaire mettant à contribution l'utilisation de l'automate GeneXpert MTB/RIF, le test HAIN MTBDR*plus* et le séquençage afin de diagnostiquer les TB résistantes – MDR, XDR et de géotyper les souches. L'originalité du projet a été d'utiliser le surplus du mélange GeneXpert, (réactif GeneXpert + expectoration) qui n'est pas introduit dans la cartouche, pour directement amplifier et séquencer les gènes associés à la résistance aux antituberculeux (loci *rpoB*, *katG/inhA*, *pncA*, *gyrA*, *rrs*, *rpsL*), pour les tests HAIN MTBDR*plus* et pour le spoligotypage. Ainsi, entre octobre 2014 et février 2015, nous avons collecté 159 expectorations à microscopie positive dans les 3 principaux laboratoires de diagnostic de la TB à Libreville.

Sur les 130 échantillons testés par GeneXpert, nous avons identifié 18 cas de MDR parmi lesquels 3 résistants au PZA et 1 aux FQs. Selon les informations médicales obtenues des patients, 10% (12/116) des nouveaux cas suspectés d'être des TB-MDR ainsi que 87% (7/8) des patients précédemment traités avec les antituberculeux de première ligne. Cent cinquante-neuf surplus du mélange réactif GeneXpert + expectoration ont été testés par spoligotypage. Les résultats de typage associés aux données de résistance relatent pour la période d'échantillonnage la présence des principales clades bacillaires LAM10 (42/159 = 26,4%), T1 (25/159 = 15,7%), MANU (21/159 = 13,2%) et H3 (20/159 = 12,5%), tous sensibles aux antibiotiques de première ligne. Les souches résistantes à au moins un antibiotique et les 19 isolats MDR ne sont pas tous regroupés en cluster, suggérant des acquisitions secondaires

de résistance aux antibiotiques et non à des transmissions de ces souches. Nous avons aussi caractérisé une épidémie sous-jacente de 5 souches Beijing (SIT1) MDR pouvant évoquer l'hypothèse d'une souche épidémique.

L'utilisation du surplus du mélange réactif GeneXpert + expectoration pour les tests moléculaires présente des limites. Pour les gènes *rpoB* et *katG* particulièrement, les taux de succès de PCR-séquençage pour l'identification des mutations associées aux résistances étaient de 58% (93/159) et 89% (141/159), respectivement. Toutefois, on obtient respectivement 94% (150/159) et 98% (156/159) lorsque l'on complète les analyses avec le test MTBDR*plus* v2.0 de HAIN qui détecte les mutations par hybridation différentielles. Les échecs d'amplification par PCR de certains loci peuvent être dû à la présence d'inhibiteurs dans l'échantillon, à la faible quantité d'ADN et à son altération au cours du processus de conservation avant les phases d'analyses. Cette étude a néanmoins identifié la présence de TB MDR à Libreville et soulevé la question de l'existence d'un clone Beijing parmi ces souches MDR.

Dans l'attente que la culture soit effective au Gabon, l'étape de séquençage dans la méthodologie proposée nécessite d'être repensée en vertu du faible taux de succès pour *rpoB* et *katG*. Ceci passe par l'optimisation des primers et aussi la détermination de conditions de conservation de la qualité des ADN ¹⁵⁷. Dans les études épidémiologiques réalisées à partir d'échantillons cliniques, la qualité de l'ADN est constamment considérée comme importante ^{39, 221} pour l'obtention de meilleurs résultats. Ainsi, certaines études démontrent l'applicabilité du Whole Genome Sequencing aux échantillons cliniques ²²², il en est de même de la spectrométrie de masse ^{223, 224}. Ces outils ont l'avantage de générer en un seul test une masse d'informations (révélation de SNPs) qui rassemblées permettent de discriminer avec assez de puissance les souches, et de déterminer les mutations connues associées à la résistance aux ATBs.

TITLE

The use of GeneXpert remnants for drug resistance profiling and molecular epidemiology of tuberculosis in Libreville, Gabon

Amel Kévin Alame-Emane^{1,2*}, Catherine Pierre-Audigier^{1*}, Oriane Cordelia Aboumegone-Biyogo^{2*}, Amandine Nzoghe-Mveang², Véronique Cadet-Daniel¹, Christophe Sola³, Joël Fleury Djoba-Siawaya^{2#}, Brigitte Gicquel^{1,4#} and Howard E. Takiff^{1,5#}

¹Unité de Génétique Mycobactérienne, Institut Pasteur, Paris, 75015, France

² Unité de Recherche et de Diagnostics Spécialisés, Laboratoire National de Santé Publique, BP 10736, Libreville, Gabon

³Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Univ. Paris Sud, Université Paris Saclay, 91198, Gif sur Yvette cedex, France and ⁴Beamedex® SAS, Orsay, France.

⁴ Emerging Bacterial Pathogens Laboratory, CAS Key Laboratory of Molecular Virology & Immunology, Institut Pasteur of Shanghai, Chinese Academy of Sciences, Shanghai, China

⁵Laboratorio de Genética Molecular, Centro de Microbiología y Biología Celular, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Caracas, Venezuela.

*These authors contributed equally to the performance of this work

Equal contribution and Co-corresponding authors

joel.djoba@gmail.com, brigitte.gicquel@pasteur.fr, htakiff@gmail.com

Unité de Génétique Mycobactérienne, Institut Pasteur, 25 Rue du Dr. Roux, Paris, 75015, France. 33.1. 44 38 91 53

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, Libreville, Gabon, MDR-TB, molecular epidemiology, GeneXpert, sequencing, Beijing Family, Drug Resistance.

Running title: Xpert Remnants for DST and Molecular Epidemiology

Abstract

Multidrug (MDR) and extensively drug resistant (XDR) *Mycobacterium tuberculosis* are major problems in global health. The GeneXpertMTB/RIF (Xpert) rapidly detects resistance to rifampicin (RIF-R), but detection of the additional resistance that defines MDR and XDR-TB, and for molecular epidemiology, specimen cultures and biosafe infrastructure are generally required. We sought to determine whether the remnants of sputa prepared for Xpert could be used directly to find mutations associated with drug resistance and for molecular epidemiology, and thus provide valuable information on the nature of the tuberculosis problem in Libreville, Gabon. After sputa were processed and run on the Xpert instrument, the leftovers of the samples prepared for Xpert were used for PCR amplification and sequencing to detect mutations associated with resistance to additional drugs, and for molecular epidemiology with spoligotyping and selective MIRU-VNTR. Of 130 sputum samples from Gabon tested with Xpert, 124 yielded interpretable results and 21 were determined to be RIF-R. Amplification and sequencing of the Xpert remnants confirmed 18/21 as MDR: 11/116 (9.5%) new and 7/8 (87%) previously treated TB patients. Spoligotyping and MIRU with hypervariable loci identified an MDR Beijing strain present in five samples. We conclude that the remnants of samples processed for Xpert in PCR reactions can be used to find mutations associated with the resistance to the additional drugs that define MDR and XDR-TB, and to study molecular epidemiology without the need for culturing or biosafe infrastructure.

INTRODUCTION

Tuberculosis (TB) is now the leading cause of death from an infectious disease worldwide, with an estimated 10.4 million new cases and 1.4 million deaths in 2015²²⁵. Of these, an estimated 480.000 cases were Multidrug Resistant-TB (MDR-TB) -- strains resistant to at least isoniazid (INH) and rifampin (RIF)²²⁶. There are effective multi-drug regimens^{3, 10, 137} that can cure 80% of MDR-TB in 9 months, but the MDR-TB cases must first be detected²²⁷. and if there is resistance to additional antibiotics, prompt detection is essential for instituting an effective drug regimen. When an MDR strain is also resistant to the fluoroquinolones and an injectable agent, it is termed Extensively Drug Resistant, or XDR-TB, and is unlikely to be cured

with an MDR treatment regimen. Prompt detection of this additional resistance is critical for prescribing an effective drug regimen with optimal chances for treatment success.

Africa accounts for about one quarter of the world's TB cases, but few countries in the region have detailed data on TB management and the prevalence of MDR cases ²²⁶. Gabon is a country in Central Africa with about 1.6 million inhabitants, half of whom live in the capital, Libreville ⁴⁵. The World Health Organization (WHO) estimated that in 2014 Gabon had an annual incidence of 393-497 cases, with an accompanying mortality rate of 56-93 TB deaths per 100.000 inhabitants, making it one of the ten highest incidence countries ²²⁶. Between 8 – 11% of patients are suspected of having MDR-TB ⁵¹, and a recent report from Lambaréné, Gabon found 42% of adult and 16% of pediatric TB patients co-infected with the human immunodeficiency virus (HIV) ²²⁸.

This difficult situation reflects the limits of the country's TB control program ^{48, 50, 57}; a survey in 2006 found that only 55% of patients completed the standard first line drug regimen, and a more recent study found only 53% treatment success ^{48, 57, 226, 228}. In Gabon, there is currently no public health laboratory with the capacity to perform phenotypic drug susceptibility testing ²²⁷, and MDR drug regimens are not administered with standardized protocols in most of the country. However, a WHO-approved MDR treatment program is being implemented, and therefore identification of MDR-TB cases will be a priority. The GeneXpertMTB/RIF (Xpert, Cepheid, Sunnyvale, CA, USA), was recently introduced into the country and can rapidly analyze sputum samples to detect the presence of *M. tuberculosis* bacilli and also mutations associated with resistance to rifampicin (RIF-R), a marker for MDR-TB ^{19, 229}. However, Xpert does not detect the mutations associated with the additional drug resistance that defines XDR-TB and can render standard MDR-regimens ineffective.

We report here a novel way to obtain information on additional resistance without the need for cultures or biosafe infrastructure. It first employs the Xpert to detect the presence *M. tuberculosis* bacilli and RIF-R, and then uses the remainder of the sputum samples prepared for Xpert in PCR reactions to identify mutations associated with resistance to additional drugs and to define the lineage of circulating TB strains. This strategy was used to profile the nature and the extent of drug resistance in Libreville, Gabon.

METHODS

Specimens: Between October 2014 and February 2015 159 morning sputum samples were collected from 159 new patients or patients not cured after two courses of standard first line therapy. Some had also received streptomycin. The patients presented to one of the three main TB diagnostic laboratories in Libreville: Nkembo Respiratory hospital, 124 samples; the National Public Health Laboratory, 31 samples; and the Melen regional hospital, 4 samples. The bacilli seen in all samples after Ziehl-Neelsen staining were scored as +/-, 1+, 2+ or 3+ ²³⁰. The Ethics Committee of the Gabon National Public Health Laboratory (LNSP) and the Gabonese National Bioethics Commission approved the study (Décision 23022015-1), which was part a research convention between the Institut Pasteur of Paris, France and the Government of Gabon. After a written or oral explanation, patients signed an informed consent to use their sputa in the study and provide data on socio-demography and previous TB treatment. All sputum samples were transported to the National Public Health Laboratory and processed for the Xpert assay.

Before adding the Xpert diluent, twenty nine sputum samples, 28 from new cases and one from a previously treated patient, had less than the 1 ml volume considered to be the minimum required for the Xpert ¹⁹. These samples were processed and although not assayed with the Xpert (Fig. 1), they were used in PCR reactions for sequencing and spoligotyping. After the specified volume of the 130 processed sputum samples were run on the Xpert, 375 µl of the leftover diluted samples were individually placed into 50 ml tubes containing 25 ml of phosphate buffer ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and KH_2PO_4 at 0.067 M, pH 6.8, (autoclaved) to neutralize the alkaline pH of the Xpert leftover to pH 7.0. After centrifugation at 4,500 rpm for 15 minutes, the pellets were resuspended in 100 µl 1xTE (10 mM Tris-HCl, 1 mM disodium EDTA, pH 8) and transferred to a microtube. The microtube was heated at 90°C for 30 minutes in a water-bath and frozen at -40°C for 1 hour. After thawing, the lysate was centrifuged at 8,000 rpm for 5 minutes and the supernatant was transferred to new microtube and stored at -40°C until being sent to the Unité de Génétique Mycobacterienne at the Institut Pasteur in Paris, where the rest of the studies were performed. The 29 samples not run on Xpert were similarly processed.

Detection of drug resistance mutations (Figure 1): The Polymerase Chain Reaction (PCR) was performed with primers targeting *rpoB*, *katG*, *inhA*, *pncA*, *gyrA*, *rrs* and *rpsL* (Table 1) to

detect mutations conferring resistance to RIF, isoniazid (INH), pyrazinamide (PZA), the fluoroquinolones (FQ), amikacin (AMK), kanamycin (KAN), capreomycin (CPN) and streptomycin (STR) respectively²³¹⁻²³³. The *rpoB*, *katG*, *inhA*, *pncA*, *gyrA* and *rpsL* genes were amplified in a 50 µl reaction mixture containing: 1X NH₄ buffer (Bioline) 10% DMSO, 1.5 mM MgCl₂, 0.3 µM of each primer, 200 µM dNTP, 1 U BioTaqTM DNA polymerase (Bioline) and 5 µl of the Xpert sample remnant diluted 1:10 in water. The thermocycler program was: 95°C for 5 minutes followed by 45 cycles of 95°C for 1 minute, hybridization temperature (Table 1) for 1 minute, 72°C for 1 minute, and a final extension at 72°C for 7 minutes. The *rrs* gene was amplified in a 30 µl reaction mixture containing: 1X GC buffer (TaKaRa), 400 µM dNTP, 0.4 µM of each primer, 1 U TaKaRa LA Taq (Takara Bio Inc., Japan) and 5 µl of the Xpert sample remnant diluted 1:10 in water. The amplification program was: 94°C for 5 minutes followed by 35 cycles of 94°C for 30 seconds, 59°C for 30 seconds, 72°C for 2 minutes, and a final extension at 72°C for 5 minutes. Ten microliters of each completed PCR reaction were electrophoresed on a 1% agarose gel to verify the amplification. The PCR products were sequenced with the forward and reverse amplification primers (Cochin Sequencing Platform, Paris, France). The sequencing results were aligned to the respective wild type (WT) genes of *M. tuberculosis* H37Rv using Geneious (v9.04), Mega (v6.06) or Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov). For 68 samples that did not give adequate results with sequencing, Hain GenoType[®] MTBDRplus version 2.0 (Hain Lifescience, Nehren, Germany) was used to detect mutations in *rpoB*¹⁸³, *katG* and *inhA*²¹, following the manufacturer's protocol with 5 µl of the undiluted Xpert sample remnant.

Genotyping: Spoligotyping^{198, 203} was performed with 43 spacer probes coupled to polystyrene microbeads using the Luminex MagPix[®] instrument (Luminex Corporation, Austin, Texas, USA) and Beamedex[®] reagents (Beamedex SAS, Orsay, France). The conditions for the spoligotyping PCR were: 1X MasterMix (Applied Biological Materials Inc., Richmond, BC, Canada)--containing Taq polymerase, reaction buffer, MgCl₂ and dNTPs, 200 µM of each primer, and 5 µl of the Xpert sample remnant diluted 1:10 in water, in a 30 µl final volume. The amplification program was: 95°C for 5 minutes, followed by 45 cycles of 95°C for 1 minute, 55°C for 1 minute, and 72°C for 30 seconds, with a final extension of 72°C for 7 minutes. The spoligotyping patterns obtained were sent to the online SITVITWEB database

http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/description.jsp) to identify the shared international types (SITs).

MIRU-VNTR: Typing of four MIRU-VNTR systems (1982, 3232, 3820, and 4120) reported to be hypervariable in strains of the Beijing lineage, was performed with the primers previously described^{205, 207} using HotStartTaq[®] DNA polymerase (Qiagen) reagents in a 50 µl final volume containing 1X PCR buffer, 1X Q-Solution, 500 nM dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 400 µM of each primer, 1 U HotStartTaq DNA polymerase and 5 µl of the Xpert sample remnant diluted 1:10 in water. The PCR parameters were: 95°C for 15 minutes, followed by 45 cycles of 94°C for 1 minutes, 59°C (MIRU 1982, 3820, 4102) or 60°C (MIRU 3232) for 1 minute, and 72°C for 1.5 minutes, with a final extension of 72°C for 10 minutes. Eight microliters of each amplified PCR reaction were electrophoresed on a 1% agarose gel for 60 minutes at 160 Volts.

RESULTS

Use of Xpert remnants for amplification and sequencing to find mutations conferring resistance to first- and second-line drugs:

Of the 130 samples run on the Xpert instrument, one gave no result signal, one gave an error signal, one was positive for *M. tuberculosis* but indeterminate for RIF-R, and the Xpert did not detect *M. tuberculosis* in three samples. Of the remaining 124 Xpert results, RIF-R was detected in 21 (17%), with 12 mutated at RpoB 531/536 and 9 at RpoB 516, 513 or 517/518 (Table 2 and Fig. 1).

We then wished to determine whether the leftover Xpert processed sputa could be used with other tests to obtain information on additional drug resistance. The Hain GenoType[®] MTBDR*plus* is a line blot assay that detects mutations in *rpoB*, and also in *katG*²³⁴, and *inhA*²³⁵, the most common sites for mutations that confer resistance to isoniazid (INH). The Hain assay was performed using Xpert processed leftovers to confirm Xpert *rpoB* results and identify strains with mutations conferring resistance to INH and thus MDR-TB (Table 2). Hain found *rpoB* mutations in 19/21 samples that were RIF-R by Xpert and detected the KatG S315T substitution in 14 samples and the C – 15T *inhA* promoter mutation in 8 samples, with

GAB-180 having both mutations. In one of the two *rpoB* discordant samples (GAB-059) where Hain did not confirm the presence of an *rpoB* mutation found by Xpert, Hain detected a mixed KatG profile with both WT and the S315T substitutions, suggesting that the sample could contain a mixed population. In this case the *rpoB* 516 substitution could have been hidden by a WT *rpoB* result. In GAB-191 the RIF resistance determined by Xpert was unconfirmed because there was no hybridization to the Hain test TUB control band with this sample, thus invalidating the test result.

To resolve the discordant results from Xpert and Hain, the Xpert leftovers were used in PCR reactions to amplify and sequence the same genes (Fig. 1). Readable sequence was obtained from 70/124 samples (56%) for *rpoB*, of which 12 had mutations, 110/124 samples (89%) for *katG*, of which 10 had mutations. and 87/124 (67%) samples for the *inhA*, of which 8 were mutated. All of the 12 mutated *rpoB* sequences contained the same mutations found with the Xpert and Hain, 6 showing the D516Y and 6 the S531L substitutions (Table 2). Unfortunately sequencing of the *rpoB* gene was not successful for either of the two samples where the Xpert and Hain results were discordant. For the *katG* locus, 10/18 (56%) sequences had mutations resulting in the S315T substitution and 8/18 (44%) had WT sequences. Of the 18 successful *inhA* sequences, 6 samples carried the promoter -15 C--T mutation and 12 were WT. Despite repeated attempts, it was not possible to amplify the *rpoB* gene from 9 samples, or the *katG* or *inhA* genes from 3 samples each. One sample (GAB-010) was WT by Hain for both *katG* and *inhA* but sequencing revealed the C – 15T *inhA* promoter mutation, and another, (GAB-017), in which the Hain assay detected the KatG S315T, yielded a WT *katG* sequence. In two others (GAB-002 and 180) Hain detected the C-15T *inhA* mutation that was not present in the sequence, but *katG* mutations were detected by both Hain and sequencing, so these strains were MDR. Except for these discordances, all other sequencing results agreed with mutations detected by Hain. If INH resistance is considered present when either a *katG* or *inhA* mutation was detected by sequencing or by Hain and not discordant with sequencing, 18 of the 21 samples (86%) determined to be RIF-R by Xpert would be classified as MDR. Of the remaining three, GAB-017, and GAB-191 would also be designated MDR if a mutation detected by Hain is accepted as evidence of INH resistance despite a WT sequence and an absent TB control respectively, and GAB-059 could contain two strains, one WT and one MDR.

To detect additional antibiotic resistance in the 21 samples determined by Xpert to be RIF-R, we amplified and sequenced the *pncA*, *gyrA*, *rrs* and *rpsL* genes, the sites of mutations associated with resistance to pyrazinamide, fluoroquinolones, the injectable antibiotics and streptomycin, respectively. Readable sequences could be obtained for *pncA* in 17/21 (81%) of the RIF-R samples. Of these, 13 were WT, and 4 (24%) carried mutations that resulted in the G97S substitution (2 strains), a T135P substitution and a stop codon at S88stop. For the *gyrA* gene, 20/21 (95%) samples yielded readable sequence, of which one (5%) harbored a mutation causing the D94G substitution. The *rrs* gene was amplified and sequenced from the only three samples that could contain XDR-TB: the sample with the *gyrA* mutation, the sample for which sequencing of *gyrA* sequence was unsuccessful, and a sample from a patient who had received seven months of treatment with SM. The three were WT for the *rrs* gene, showing that there were no XDR-TB cases. The *rpsL* gene was also amplified and sequenced from the sample of the patient treated with SM and was WT. However, the *rpsL* sequence from the sample with the *gyrA* mutation showed a mutation resulting in the K43R substitution, making this sample MDR FQ-R and SM-R.

Epidemiology of MDR-TB patients (Table 3). Of the 18 patients confirmed to have MDR-TB strains, 9 were male and 9 were female. The mean age was 32 years (range 18-54) and 2 patients were non-Gabonese. The medical records indicated that 7/8 (88%) patients who had been previously treated with first-line drugs had samples that were MDR. One of these 7 had the mutations associated with resistance to the FQ and SM and 2 others had mutations associated with resistance to PZA. Of the 116 patients who were new TB cases, 12 (10%) had strains that were MDR. Of these, 6/12 (50%) had not started TB treatment when the samples were taken. One of their strains had a *pncA* mutation. The remaining 6 new MDR-TB cases had begun first-line treatment 2, 3, 4 (2 patients), 6 and 8 months prior to the time the samples were obtained.

Molecular epidemiology of MDR strains. Spoligotypes were obtained for all 124 samples tested by Xpert, plus the 29 samples with volume insufficient for Xpert and the 6 samples for which Xpert analysis was unsuccessful (Figure 1). The spoligotypes of two strains grouped with *M. africanum*. West African 1. The most frequent Shared International Type (SIT) was SIT61 (Table 3), found in 42 isolates, but none of these were found to be RIF-R by any method used.

In contrast, RIF-R was found in 3 of 16 SIT50, 4 of 6 SIT1196, 2 of 6 SIT370, 3 of 6 SIT2697, 1 of 2 SIT1580, 1 of 6 SIT53, and 1 of the 17 orphans (Table 4). RIF-R was also found in the five samples with the Beijing SIT1 spoligotype, which were all MDR, as was the single sample with SIT260, which also belongs to the Beijing family. In addition to being MDR, the strain with SIT260 was also FQ-R and SM-R.

The standard VNTR-MIRU loci are poorly discriminative for Beijing strains, so to determine whether the five SIT1 Beijing MDR strains belonged to the same genotype they were analyzed with 4 MIRU-VNTR systems (1982, 3232, 3820, and 4120) reported to be hypervariable for Beijing strains^{205, 207}. With the primers for VNTR systems 1982, 3820 and 4120, all five of the Beijing MDR samples gave identical single bands (Fig. 2), suggesting that they were all the same genotype. Amplification with primers for system 3232 yielded several bands per sample and was considered uninterpretable. Sequencing gene Rv2629 showed that all five strains had the 191C genotype, described as a marker for Beijing-W clade, cluster group 2²⁰⁹.

Discussion

The Xpert technology has improved TB diagnosis and can detect RIF-R, which, as confirmed in this study, is a reliable indication of MDR-TB²³⁶. However, most methods to detect resistance beyond MDR require culturing the specimen. Cultures on solid media take more than two weeks to turn positive, while cultures in liquid media can turn positive in 7 – 10 days²³⁷ but are a greater biosafety hazard. The Hain MTBDR_{plus} can be performed directly on sputum specimens, but only detects resistance to RIF and INH. The alternative method used here for detecting INH-R conferring mutations by amplification of Xpert leftovers yielded readable sequences for *inhA* and *katG*, in 18 of the 21 strains in which Xpert detected *rpoB* mutations, thus confirming that they were MDR. There were two instances where the sequence was discordant with the Hain result (GAB-002, 0180, 010 and 017), but two of these (GAB-002 and 180) were nonetheless defined as MDR because both sequencing and Hain detected KatG 315 substitutions. The other two had confirmed *rpoB* mutations and should probably be regarded as MDR despite the discordant results. The *rpoB* discrepancy for sample GAB-059, together

with the presence of signals for both WT and mutated *katG* suggest that this sample could have contained both resistant and sensitive bacteria,

Testing for FQ resistance in MDR strains is critical because treatment failures with FQ-containing MDR regimes are more likely with FQ-R, although MDR strains with particular *gyrA* mutations may still be cured, perhaps with higher FQ doses ²³⁸. The Hain MTBDRs/ test can detect resistance to the FQ and the injectable antibiotics, and a new version, which appeared after the present study was completed, can be used directly with sputum specimens ¹⁶³. It might be worthwhile comparing its performance on Xpert leftovers with its results when used directly on sputa.

Our alternative method uses the leftovers from sputa processed for Xpert to amplify and sequence the *gyrA* gene to detect FQ resistance and the *rrs* gene to detect resistance to the injectable agents--resistance to both constituting XDR-TB. PCR is relatively easy, quick and inexpensive, and the sequencing can be done by a commercial service with the results available by Internet within about 7 days after the sputum specimen is obtained. The most expensive part might be the shipping if only a few specimens are sent at a time. Although amplification of the *rpoB* gene was successful for only 12 of 21 samples, it is unlikely that this was due to inhibitors in the stored Xpert leftovers, because Xpert gave results and amplification and readable sequence was obtained from 18/21 samples for *katG* and 20/21 samples with *gyrA*. The success rate with *rpoB* might be improved by optimizing the primers. The success with sequencing and Hain was roughly the same for sputa with 1+, 2+ or 3+ positivity, but less for sputa with less than 1+ bacilli on microscopy and would probably be worse for smear negative specimens in which Xpert detects TB and RIF-R.

Xpert leftovers were also used for molecular epidemiology studies with both spoligotyping and MIRU-VNTR. Spoligotyping with the Luminex format showed that most of the MDR strains belonged to spoligotypes that were also present in non-MDR strains. Surprisingly, there were no MDR isolates with the most frequent spoligotype, SIT61, which was seen in 26% of all isolates examined (42/159). The most alarming finding was that 6 of the 18 confirmed MDR strains belonged to SIT1 or SIT260, genotypes of the Beijing family that has been associated with many MDR-TB outbreaks ^{168, 239}. Because the MIRU-VNTR, even with 24 loci, lacks discriminative power for the Beijing family, we used VNTR loci that are

hypervariable in the Beijing lineage to confirm that the five SIT1 strains belonged to the same genotype^{205, 207}. SIT1 was only found in these 5 MDR strains and SIT260 was found only in one strain that was MDR FQ-R SM-R. This suggests that while most of the MDR strains likely developed drug resistance within Gabon, the SIT1 and the SIT260 strain may have been MDR when they were introduced into Libreville. The origin of these strains is a mystery, as reports from neighboring countries suggest that Beijing strains are not common in the region, and the ones found were generally not MDR²⁴⁰⁻²⁴². Follow-up studies are in progress to determine the extent and epidemiology of the apparent SIT1 MDR outbreak strain and to see if the MDR FQ-R SM-R SIT260 Beijing strain is also spreading.

The strategy employed in this study provided important information on the urgent tuberculosis problem in Gabon without the need for cultures or P2 or P3 biohazard facilities. While the exact percentages of MDR cases found in this study, 10% of new cases and 88% (7/8) previously treated cases may not be precise, these high rates are nevertheless ominous and likely attributable to treatment success rates of only 53 - 55% reported for first-line therapy in Gabon²²⁸. This strategy could be useful for other reference labs in low resource countries to provide information on drug resistance and molecular epidemiology. Current methods for phenotypic drug sensitivity testing of MDR and XDR strains rely on cultures requiring P3 level infrastructure to reduce the biohazards implicit in the manipulation of clinical samples. In contrast, the bacilli in samples processed for Xpert are no longer viable¹⁸³ and therefore don't require special infrastructure.

Whole genome sequencing (WGS) has been proposed as a quicker and safer alternative to phenotypic drug testing and molecular epidemiology^{243, 244}, and with advances in technology and cost reductions, WGS performed directly on clinical samples suspected to be MDR or XDR could eventually be cost-effective, even in low resource settings. In a possible future algorithm, Xpert leftovers of RIF-R samples could be sent for WGS to determine the full resistance profile, but this will require technical advances in sequencing and isolation of *M. tuberculosis* DNA^{222, 245}. Until then, the strategy used in this study could represent a viable interim solution for finding mutations associated with resistance to second and third line drugs, especially in settings where phenotypic drug sensitivity testing is not possible, and for basic or retrospective molecular epidemiology.

Acknowledgements

This work is part of the NAREB (Nanotherapeutics for Antibiotic Resistant Emerging Bacterial pathogens) European Research Network (Collaborative Project), supported by the European Union's Seventh Framework Program for research, technological development and demonstration under grant agreement No. 604237. This work is also part of the 'Programme de recherche sur les nouvelles molécules intervenant dans la lutte contre la tuberculose' supported by the Gabonese Republic. This study was also supported by: the Chinese Academy of Science, Beijing, China; Institut Pasteur of Shanghai, China; the Institut Pasteur of Paris, France; and the Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, IVIC, Caracas, Venezuela.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest other than C. Sola is an associate and founder of beamedex®

Funding:

European Commission's Seventh Framework; The Gabonese Republic; The Chinese Academy of Science; The Institut Pasteur of Shanghai, China; Institut Pasteur of Paris, France; Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, IVIC, Caracas, Venezuela.

Literature Cited

-
1. **WHO.** 2016. Global tuberculosis report 2016. World Health Organization, Geneva.
 2. **WHO.** 2015. Global tuberculosis report 2015. World Health Organization, Geneva.
 3. **Kuaban C, Noeske J, Rieder HL, Ait-Khaled N, Abena Foe JL, Trebucq A.** 2015. High effectiveness of a 12-month regimen for MDR-TB patients in Cameroon. *Int J Tuberc Lung Dis* **19**:517-524.
 4. **Aung KJ, Van Deun A, Declercq E, Sarker MDR, Das PK, Hossain MA, Rieder HL.** 2014. Successful '9-month Bangladesh regimen' for multidrug-resistant tuberculosis among over 500 consecutive patients. *Int J Tuberc Lung Dis* **18**:1180-1187.

5. **Van Deun A, Maug AK, Salim MA, Das PK, Sarker MDR, Daru P, Rieder HL.** 2010. Short, highly effective, and inexpensive standardized treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* **182**:684-692.
6. **Dye C, Williams BG.** 2000. Criteria for the control of drug-resistant tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:8180-8185.
7. **Bechtel.** 2012. Schéma Directeur National d'Infrastructure. Republique du Gabon,
8. **Cremers AL, Janssen S, Huson MA, Bikene G, Belard S, Gerrets RP, Grobusch MP.** 2013. Perceptions, health care seeking behaviour and implementation of a tuberculosis control programme in Lambarene, Gabon. *Public Health Action* **3**:328-332.
9. **Belard S, Remppis J, Bootsma S, Janssen S, Kombila DU, Beyeme JO, Rossatanga EG, Kokou C, Osbak KK, Obiang Mba RM, Kaba HM, Traore AN, Ehrhardt J, Bache EB, Flamen A, Rusch-Gerdes S, Frank M, Adegnika AA, Lell B, Niemann S, Kremsner PG, Loembe MM, Alabi AS, Grobusch MP.** 2016. Tuberculosis Treatment Outcome and Drug Resistance in Lambarene, Gabon: A Prospective Cohort Study. *Am J Trop Med Hyg* doi:10.4269/ajtmh.15-0668.
10. **Mounguengui D, Ondounda M, Lawson JMM, Fabre M, Gaudong L, Mangouka L, · CM, Nzenze JR, L'Her P.** 2012. Tuberculose multirésistante à l'hôpital d'instruction des armées de Libreville (Gabon) à propos de 16 cas (Multi-resistant tuberculosis at the hôpital d'instruction des armées de Libreville (Gabon) about 16 cases). *Bull Soc Pathol Exot* **105**:4.
11. **Nkoghe D, Mve MT, Nnegue S, Nkoume MO, Ba JI, Hypolite J, Leonard P, Kendjo E.** 2005. Séroprévalence du VIH au sein des tuberculeux de l'hôpital de Nkembo à Libreville, Gabon. *Bull Soc Pathol Exot* **98**:2.
12. **Stolp SM, Huson MAM, Janssen S, Beyeme JO, Grobusch MP.** 2013. Tuberculosis patients hospitalized in the Albert Schweitzer Hospital, Lambar en e, Gabon—a retrospective observational study. *Clinical Microbiology and Infection* **19**:3.

13. **WHO-recommandations.** 2013. Tuberculosis diagnostics Xpert MTB/RIF Test http://www.who.int/tb/features_archive/factsheet_xpert.pdf. Accessed
14. **Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, Nicol MP, Shenai S, Krapp F, Allen J, Tahirli R, Blakemore R, Rustomjee R, Milovic A, Jones M, O'Brien SM, Persing DH, Ruesch-Gerdes S, Gotuzzo E, Rodrigues C, Alland D, Perkins MD.** 2010. Rapid Molecular Detection of Tuberculosis and Rifampin Resistance. *New England Journal of Medicine* **363**:1005-1015.
15. **Pio A, Chaulet P.** 1998. Tuberculosis handbook. WHO, Geneva.
16. **Ramirez-Busby SM, Valafar F.** 2015. Systematic review of mutations in pyrazinamidase associated with pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **59**:5267-5277.
17. **Sandgren A, Strong M, Muthukrishnan P, Weiner BK, Church GM, Murray MB.** 2009. Tuberculosis drug resistance mutation database. *PLoS Med* **6**:e2.
18. **Alame-Emane AK, Xu P, Pierre-Audigier C, Cadet-Daniel V, Shen X, Sraouia M, Siawaya JF, Takiff H, Gao Q, Gicquel B.** 2015. Pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* arises after rifampicin and fluoroquinolone resistance. *Int J Tuberc Lung Dis* **19**:679-684.
19. **Helb D, Jones M, Story E, Boehme C, Wallace E, Ho K, Kop J, Owens MDR, Rodgers R, Banada P, Safi H, Blakemore R, Lan NT, Jones-Lopez EC, Levi M, Burday M, Ayakaka I, Mugerwa RD, McMillan B, Winn-Deen E, Christel L, Dailey P, Perkins MD, Persing DH, Alland D.** 2010. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology. *J Clin Microbiol* **48**:229-237.
20. **Crudu V, Stratan E, Romancenco E, Allerheiligen V, Hillemann A, Moraru N.** 2012. First evaluation of an improved assay for molecular genetic detection of tuberculosis as well as rifampin and isoniazid resistances. *J Clin Microbiol* **50**:1264-1269.

21. **Sola C, Abadia E, Le Hello S, Weill FX.** 2015. High-Throughput CRISPR Typing of *Mycobacterium tuberculosis* Complex and *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium. *Methods Mol Biol* **1311**:91-109.
22. **Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, van Embden J.** 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* **35**:907-914.
23. **Allix-Beguec C, Wahl C, Hanekom M, Nikolayevskyy V, Drobniewski F, Maeda S, Campos-Herrero I, Mokrousov I, Niemann S, Kontsevaya I, Rastogi N, Samper S, Sng LH, Warren RM, Supply P.** 2014. Proposal of a consensus set of hypervariable mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat loci for subtyping of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing isolates. *J Clin Microbiol* **52**:164-172.
24. **Luo T, Yang C, Gagneux S, Gicquel B, Mei J, Gao Q.** 2012. Combination of single nucleotide polymorphism and variable-number tandem repeats for genotyping a homogenous population of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains in China. *J Clin Microbiol* **50**:633-639.
25. **Pym AS, Saint-Joanis B, Cole ST.** 2002. Effect of *katG* mutations on the virulence of *Mycobacterium tuberculosis* and the implication for transmission in humans. *Infect Immun* **70**:4955-4960.
26. **Hazbon MH, Brimacombe M, Bobadilla del Valle M, Cavatore M, Guerrero MI, Varma-Basil M, Billman-Jacobe H, Lavender C, Fyfe J, Garcia-Garcia L, Leon CI, Bose M, Chaves F, Murray M, Eisenach KD, Sifuentes-Osornio J, Cave MD, Ponce de Leon A, Alland D.** 2006. Population genetics study of isoniazid resistance mutations and evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:2640-2649.
27. **Chakravorty S, Aladegbami B, Motiwala AS, Dai Y, Safi H, Brimacombe M, Helb D, Alland D.** 2008. Rifampin resistance, Beijing-W clade-single nucleotide polymorphism cluster

- group 2 phylogeny, and the Rv2629 191-C allele in *Mycobacterium tuberculosis* strains. *J Clin Microbiol* **46**:2555-2560.
28. **Walusimbi S, Bwanga F, De Costa A, Haile M, Joloba M, Hoffner S.** 2013. Meta-analysis to compare the accuracy of GeneXpert, MODS and the WHO 2007 algorithm for diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis. *BMC Infect Dis* **13**:507.
 29. **Martin L, Coronel J, Faulx D, Valdez M, Metzler M, Crudder C, Castillo E, Caviedes L, Grandjean L, Rodriguez M, Friedland JS, Gilman RH, Moore DA.** 2014. A field evaluation of the Hardy TB MODS Kit for the rapid phenotypic diagnosis of tuberculosis and multi-drug resistant tuberculosis. *PLoS One* **9**:e107258.
 30. **Rigouts L, Coeck N, Gumusboga M, de Rijk WB, Aung KJ, Hossain MA, Fissette K, Rieder HL, Meehan CJ, de Jong BC, Van Deun A.** 2016. Specific *gyrA* gene mutations predict poor treatment outcome in MDR-TB. *J Antimicrob Chemother* **71**:314-323.
 31. **Tagliani E, Cabibbe AM, Miotto P, Borroni E, Toro JC, Mansjo M, Hoffner S, Hillemann D, Zalutskaya A, Skrahina A, Cirillo DM.** 2015. Diagnostic Performance of the New Version (v2.0) of GenoType MTBDRsl Assay for Detection of Resistance to Fluoroquinolones and Second-Line Injectable Drugs: a Multicenter Study. *J Clin Microbiol* **53**:2961-2969.
 32. **Johnson R, Warren R, Strauss OJ, Jordaan AM, Falmer AA, Beyers N, Schaaf HS, Murray M, Cloete K, van Helden PD, Victor TC.** 2006. An outbreak of drug-resistant tuberculosis caused by a Beijing strain in the western Cape, South Africa. *Int J Tuberc Lung Dis* **10**:1412-1414.
 33. **Hanekom M, Gey van Pittius NC, McEvoy C, Victor TC, Van Helden PD, Warren RM.** 2011. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype: a template for success. *Tuberculosis (Edinb)* **91**:510-523.
 34. **Yeboah-Manu D, Asante-Poku A, Bodmer T, Stucki D, Koram K, Bonsu F, Pluschke G, Gagneux S.** 2011. Genotypic diversity and drug susceptibility patterns among *M. tuberculosis* complex isolates from South-Western Ghana. *PLoS One* **6**:e21906.

35. **Couvin D, Rastogi N.** 2015. Tuberculosis - A global emergency: Tools and methods to monitor, understand, and control the epidemic with specific example of the Beijing lineage. *Tuberculosis (Edinb)* **95 Suppl 1**:S177-189.
36. **Ouassa T, Borroni E, Loukou GY, Faye-Kette H, Kouakou J, Menan H, Cirillo DM.** 2012. High prevalence of shared international type 53 among *Mycobacterium tuberculosis* complex strains in retreated patients from Cote d'Ivoire. *PLoS One* **7**:e45363.
37. **Coll F, McNerney R, Preston MD, Guerra-Assuncao JA, Warry A, Hill-Cawthorne G, Mallard K, Nair M, Miranda A, Alves A, Perdigao J, Viveiros M, Portugal I, Hasan Z, Hasan R, Glynn JR, Martin N, Pain A, Clark TG.** 2015. Rapid determination of anti-tuberculosis drug resistance from whole-genome sequences. *Genome Med* **7**:51.
38. **Bradley P, Gordon NC, Walker TM, Dunn L, Heys S, Huang B, Earle S, Pankhurst LJ, Anson L, de Cesare M, Piazza P, Votintseva AA, Golubchik T, Wilson DJ, Wyllie DH, Diel R, Niemann S, Feuerriegel S, Kohl TA, Ismail N, Omar SV, Smith EG, Buck D, McVean G, Walker AS, Peto TE, Crook DW, Iqbal Z.** 2015. Rapid antibiotic-resistance predictions from genome sequence data for *Staphylococcus aureus* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Commun* **6**:10063.
39. **Brown AC, Bryant JM, Einer-Jensen K, Holdstock J, Houniet DT, Chan JZ, Depledge DP, Nikolayevskyy V, Broda A, Stone MJ, Christiansen MT, Williams R, McAndrew MB, Tutill H, Brown J, Melzer M, Rosmarin C, McHugh TD, Shorten RJ, Drobniewski F, Speight G, Breuer J.** 2015. Rapid Whole-Genome Sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates Directly from Clinical Samples. *J Clin Microbiol* **53**:2230-2237.
40. **Karlsson E, Larkeryd A, Sjodin A, Forsman M, Stenberg P.** 2015. Scaffolding of a bacterial genome using MinION nanopore sequencing. *Sci Rep* **5**:11996.

LEGENDS

FIGURE 1.
Flow chart showing processing of the 159 sputum samples (see below).

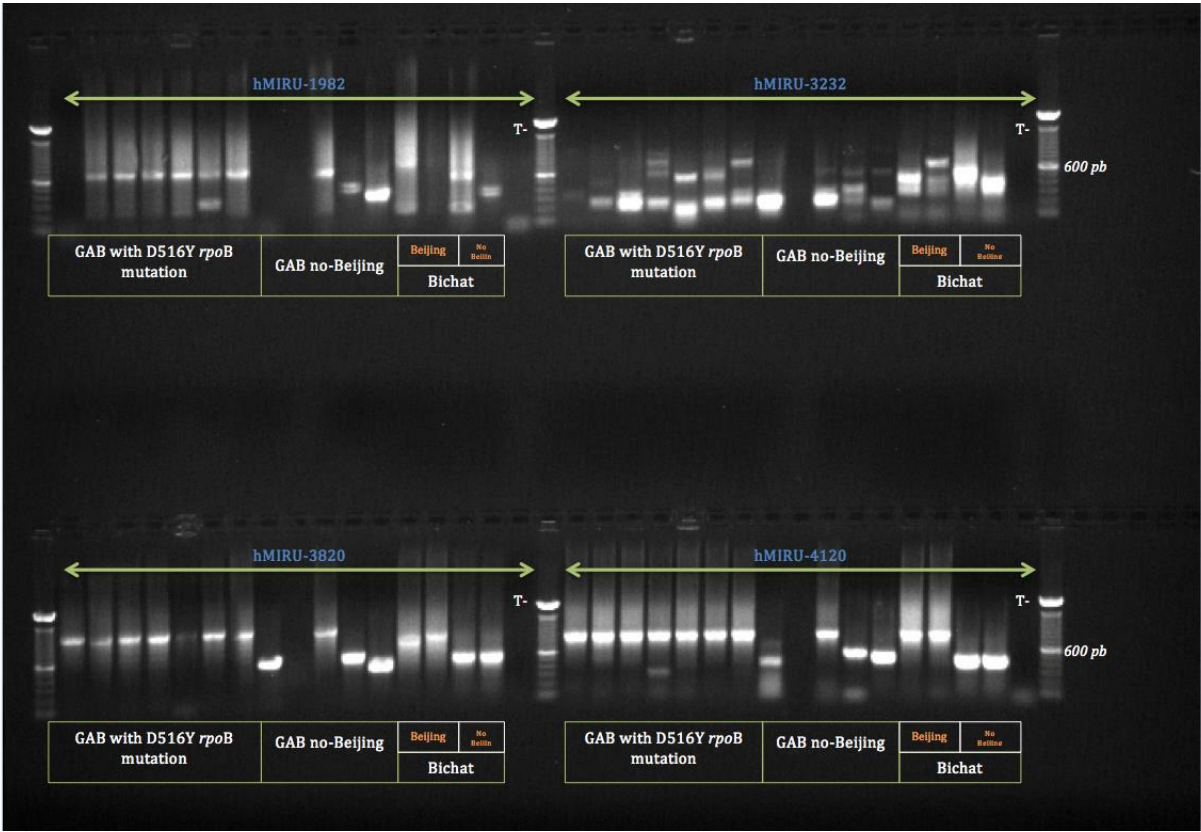


FIGURE 2.
Amplification of hypervariable MIRU-VNTR loci (1982, 3232, 3820, 4102) from samples with Beijing and non-Beijing lineage spoligotypes
Lanes 1 to 5, Gabon samples with Beijing lineage spoligotype SIT1; Lane 7, Gabon sample with Beijing lineage spoligotype SIT260; lanes 6, 8 and 11, Gabon strains with spoligotypes not belonging to the Beijing lineage; lanes A, B, strains from Paris Bichat-Claude Bernard Hospital with spoligotypes belonging to the Beijing lineage; lanes C and D strains from Paris Bichat-Claude Bernard Hospital with spoligotypes not belonging to the Beijing lineage.

Table 1: Primers used to amplify and sequence the *Mycobacterium tuberculosis* genes associated with resistance to the antibiotics indicated.

Gene	Antibiotic	Primers name	5' - 3' sequence	Hybridization temperature	Product size
<i>rpoB</i>	Rifampicin	TR1	TACGGTCGGCGAGCTGATCC	53°C	411 bp
		TR2	TACGG CGTTTCGATGAACC		
<i>katG</i>	Isoniazid	katG1	TGGCCGCGGCGGTGACATT	60°C	330 bp
		katG2	CCAGCAGGGCTCTTCGTCAG		
<i>inhA</i>	Isoniazid	inhA_promo-1	CCTCGCTGCCCAGAAAGGGA	60°C	248 bp
		inhA_promo-2	ATCCCCCGGTTTCCTCCGGT		
<i>pncA</i>	Pyrazinamide	<i>pncA</i> 1	ATCGCGATGGAACGTGATA	60°C	950 bp
		<i>pncA</i> 2	CTGTCACCGGACGGATTTG		
<i>gyrA</i>	Fluoroquinolones	<i>gyrA</i> -F	GATGACAGACACGACGTTGC	55°C	398 bp
		<i>gyrA</i> -R	GGGCTTCGGTGTACCTCAT		
<i>gyrB</i>		<i>gyrB</i> -F	CCACCGACATCGGTGGATT	54°C	427 bp
		<i>gyrB</i> -R	CTGCCACTTGAGTTTGTACA		
<i>rrs</i>	Aminoglycosides	<i>rrs</i> -F	AAACCTCTTTCACCATCGAC	59°C	1,329 bp
	Capreomycin	<i>rrs</i> -R	GTATCCATTGATGCTCGC		
<i>rpsL</i>	Streptomycin	rpsLfw	GGCCGACAAACAGAACGT	51°C	501 bp
		rpsLrev	GTTACCAACTGGGTGAC		

Table 2: Mutations determined by the GeneXpert MTB/RIF test and results of sequencing of the individual genes and the Hain MTBDR_{plus} test performed with leftovers of the Xpert processed sputum specimens.

Patient			GeneXpert results	<i>rpoB</i>		<i>katG</i> 315		<i>inhA</i> -15		<i>pncA</i>	<i>rrs</i>	<i>rpsL</i>	<i>gyrA</i>
Samples	Sex	Age	Xpert Probe & mutations detected	Sequencing	Hain test	MDR	Sequencing	Hain Test	Sequencing	Hain test	Sequencing		
GAB-001	M	54	B* and C = 516/522	D516Y	mutated (probes WT4&5 absent)	x	S315T	S315T	WT	WT	WT		WT _{S95T - E21Q}
GAB-065	F	19	B* and C = 516/522	D516Y	mutated (probe WT4 absent)	x	S315T	S315T	WT	WT	WT		WT _{S95T - E21Q}
GAB-152	F	18	B* = 516	D516Y	mutated (probe WT4 absent)	x	S315T	S315T	WT	WT	WT		WT _{S95T - E21Q}
GAB-076	F	26	C = 522	D516Y	mutated (probe WT4 absent)	x	S315T	S315T	WT	WT	WT		WT _{S95T - E21Q}
GAB-163	F	23	E = 531/533	??	S531L	x	S315T	S315T	WT	WT	??		WT _{S95T}
GAB-003	M	35	E = 531/533	S531L	S531L	x	S315T	S315T	WT	WT	WT		WT _{S95T - E21Q}
GAB-009	F	37	E = 531/533	S531L	S531L	x	S315T	S315T	WT	WT	G97S		WT _{S95T - E21Q}
GAB-182	M	32	E = 531/533	S531L	S531L	x	S315T	S315T	WT	WT	T135P		WT _{S95T - E21Q}
GAB-002	F	50	B* = 516	D516Y	mutated (probe WT4 absent)	x	S315T	S315T	WT	C-15T	WT	WT	K43R _{K121K} D94G _{S95T - E21Q}
GAB-180	M	19	B* = 516	D516Y	mutated (probe WT4 absent)	x	S315T	S315T	WT	C-15T	WT		WT _{S95T - E21Q}
GAB-014	M	30	E = 531/533	??	mutated (probe WT8 absent)	x	WT	WT	C-15T	C-15T	??	WT	??
GAB-173	M	44	E = 531/533	S531L	S531L	x	WT	WT	C-15T	C-15T	WT	WT	WT _{K121K} WT _{S95T - E21Q}
GAB-062	M	18	E = 531/533	??	S531L	x	WT	WT	C-15T	C-15T	WT		WT _{S95T - E21Q}
GAB-151	F	42	E = 531/533	??	S531L	x	WT	WT	C-15T	C-15T	WT		WT _{S95T - E21Q}
GAB-157	M	25	E = 531/533	??	S531L	x	WT	WT	C-15T	C-15T			WT _{S95T - E21Q}
GAB-010	F	28	E = 531/533	S531L	S531L	x	WT	WT	C-15T	WT	S88Stop		WT _{E21Q}
GAB-068	F	54	E = 531/533	??	S531L	x	??	S315T	??	WT	G97S		WT _{S95T - E21Q}
GAB-072	M	23	C = 522	??	mutated (probes WT3&4 absent)	x	??	S315T	??	WT			WT _{S95T - E21Q}
GAB-017	M	26	E = 531/533	S531L	S531L		WT	S315T	WT	WT	??		WT _{S95T - E21Q}
GAB-059	F	32	B* = 516	??	WT		??	WT/S315T	WT	WT	WT		WT _{S95T - E21Q}
GAB-191	??	??	B* = 516	??	TUB control absent		WT	WT	??	C-15T	??		WT _{S95T - E21Q}

M = male gender, F = female gender. ?? = PCR amplification was unsuccessful. WT = wild-type genotype. Subscript = gene polymorphism not associated with drug resistance.

*Xpert Probe B will also detect less frequent mutations affecting amino acid 513 and a 516/517 deletion¹⁸³.

Table 3. Clustered Spoligotypes

SIT	Clade	# Isolates	% of total	Spoligotype	Octal
61	LAM10-CAM	42	26.42%		777777743760771
50	H3	16	10.1%		777777777720771
53	T1	6	3.8%		777777777760771
54	MANU2	6	3.8%		777777777763771
370	T1	6	3.8%		777777747760471
1196	-	6	3.8%		777777777761771
2697	MANU2	6	3.8%		777777743763771
1	Beijing	5	3.1%		000000000003771
42	LAM9	4	2.5%		777777607760771
523	MANU_ancestor	4	2.5%		777777777777771
237	-	3	1.9%		777777777700000
378	T1	3	1.9%		777777667760771
2298	T1	3	1.9%		777777647760771
176	LAM6	2	1.3%		777737607560771
373	T1	2	1.3%		77777767760771
741	H3	2	1.3%		77777757720771
1580	T1	2	1.3%		777777747760771
1690	MANU2	2	1.3%		77777777762771
Total Clustered		120	75.5%		
Unique SITs		22	13.8%		
Orphan		17	10.7%		
Total		159	100.0%		

Table 4: Spoligotypes obtained with Xpert processed remnants of sputum samples determined RIF-R by Xpert, with patient status.

Patients			Medical information						Demography information		Laboratory and Xpert results	
Samples	Sex	Age	Spoligotype	Additional resistance	SIT	Clade	Exam	Status	District	Nationality	Microscopy score	Xpert Numeration
GAB-157	M	25	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■	INH	Orphan	-	C4	N	Akanda	Gabon	1+	Medium
GAB-065	F	19	□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■	INH	1	Beijing	D	N	Owendo	Gabon	2+	Medium
GAB-001	M	54	□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■	INH	1	Beijing	C	FR	ND	Gabon	10 AFB	Medium
GAB-072	M	23	□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■	INH	1	Beijing	C6	N	5th	Gabon	1+	Very low
GAB-076	F	26	□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■	INH	1	Beijing	C4	N	Akanda	Gabon	2+	Medium
GAB-180	M	19	□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■	INH	1	Beijing	C2	N	5th	Gabon	1+	High
GAB-003	M	35	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■	INH	50	H3	D	FR	5th	Gabon	3+	Medium
GAB-163	F	23	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■	INH	50	H3	D	N	6th	Gabon	2+	High
GAB-182	M	32	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■	INH, PZA	50	H3	C3	FR	2nd	Other	1+	Medium
GAB-014	M	30	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■	INH	53	T1	D	N	5th	Gabon	1+	Medium
GAB-002	F	50	□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■	INH, FQ, SM	260	Beijing	C	FR	5th	Gabon	3+	High
GAB-151	F	42	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■	INH	370	T1	D	N	2nd	Gabon	1+	Medium
GAB-173	M	44	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■	INH	370	T1	C5	FR	2nd	Other	7 AFB	High
GAB-068	F	54	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■	INH, PZA	1196	-	C3	N	1st	Gabon	1+	Medium
GAB-009	F	37	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■	INH, PZA	1196	-	D	FR	Owendo	Gabon	2+	High
GAB-010	F	28	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■	INH, PZA	1196	-	D	N	6th	Gabon	2+	Medium
GAB-062	M	18	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■	INH	1580	T1	D	N	2nd	Gabon	1+	Medium
GAB-017	M	26	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■	INH	2697	MANU2	D	FR	2nd	Gabon	2+	Very low
GAB-152	F	18	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■	INH	2697	MANU2	C8	N	1st	Gabon	7 AFB	Medium
GAB-059	F	32	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■	INH	2697	MANU2	D	N	5th	Gabon	1+	Low
GAB-191	ND	ND	□■■■■■□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■	INH	Orphan		ND	ND	ND	Gabon	ND	Medium

M = male gender, F = female gender. FQ = Fluoroquinolones, SM = Streptomycin, PZA = Pyrazinamide. SIT = Spoligotype International Type. D = initial diagnosis by microscopy. C = Control microscopy (the number of months under treatment with first-line drugs). N = new TB case, FR = failed or relapsed case. ND = No Data. AFB = # Acid-fast Bacilli seen. * = For this strain Hain found an S315T KatG substitution, but the sequence of *katG* was WT. # = RIF-R by Xpert but Hain detected both WT *katG* and *katG* S315T. Hain also detected C-15T while the sequence of *inhA* was WT.

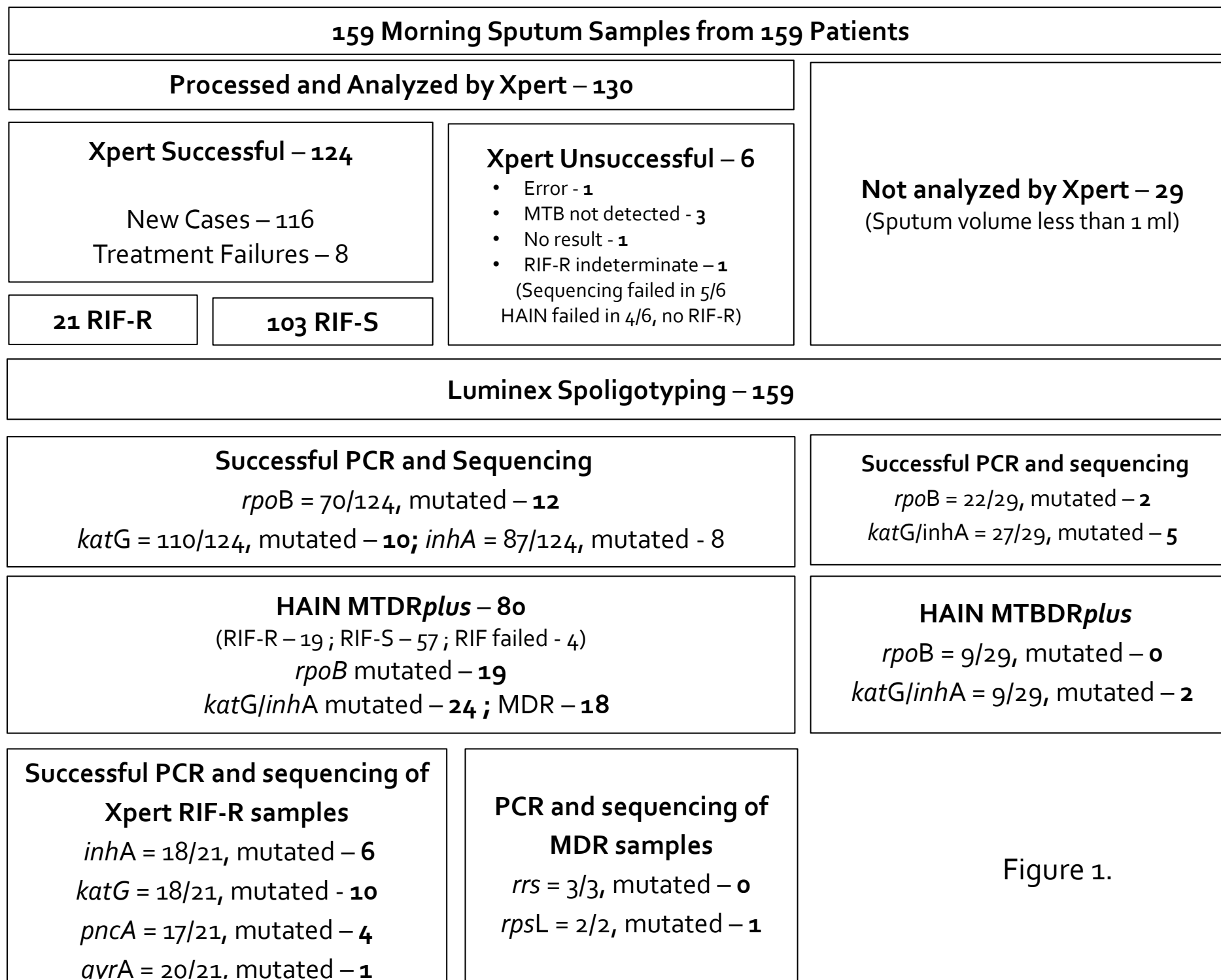
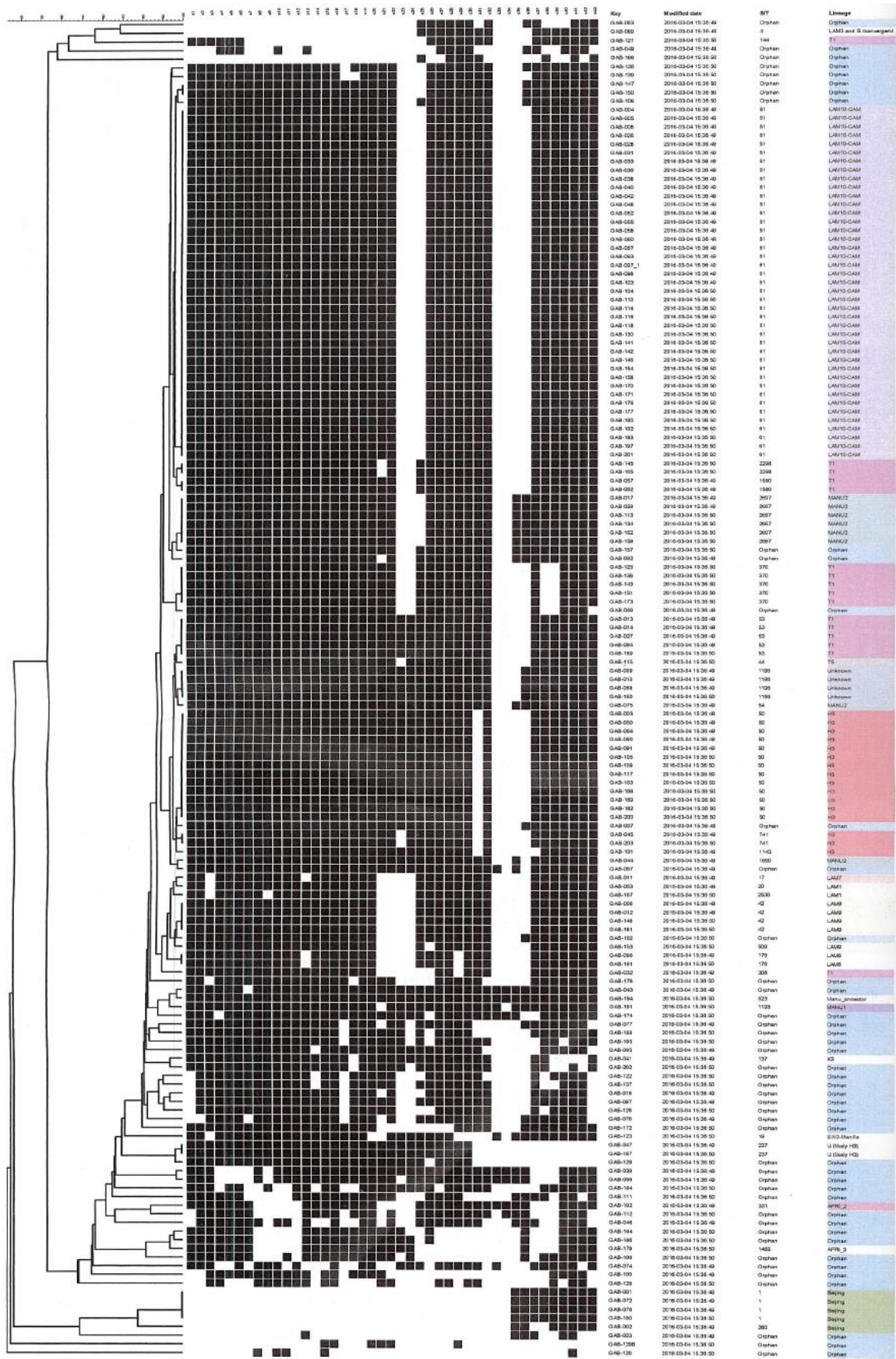


Figure 1.

Annexe : structure de la population des bacilles de la tuberculose rencontrée à Libreville au cours de notre étude par spoligotypage multiplexé sur Luminex (MagPix).



DISCUSSION-CONCLUSIONS GÉNÉRALES & PERSPECTIVES

Les antibiotiques ont révolutionné le traitement des maladies infectieuses d'origine bactérienne. Les antituberculeux sont une gamme restreinte d'ATBs ayant démontré une activité sur les bacilles de la TB. Il s'agit en particulier de l'INH, de la RIF puis des AGs et FQs. Leur utilisation mal adaptée a fait surgir des résistances à ces ATBs, ce qui constitue une situation alarmante concernant les TB-MDR et XDR²⁰. Le PZA est un antituberculeux majeur des chimiothérapies de première et de seconde ligne qui se distingue des autres antituberculeux par son action unique dirigée contre les bacilles semi-dormants responsables des cas de rechute après traitement suite à la réactivation endogène des bacilles^{164, 214}.

L'obtention du POA, la forme active du PZA, est assurée par une enzyme codée par le gène *pncA*. L'action du POA requiert un milieu acide qui entrave la croissance bactérienne lors de l'antibiogramme phénotypique et peut produire de faux résultats²¹⁴. La génétique moléculaire permet de contourner cet obstacle en détectant les mutations associées à la résistance au PZA. Les mutations génétiques associées à la résistance au PZA sont localisées sur l'ensemble de la séquence nucléotidique du gène *pncA*^{164, 212, 233}. Il n'existe pas d'autre test de diagnostic moléculaire rapide que le séquençage du gène *pncA* en entier. Pour cela, nous avons recherché la résistance au PZA par séquençage du gène *pncA* à partir de cultures d'échantillons cliniques.

Les résultats de notre première étude montrent que la résistance au PZA est rare chez les souches non MDR (sensibles et mono-résistantes à l'INH), elle est d'environ 50% chez les souches MDR. Nos résultats confirment d'autres antérieures selon lesquels la résistance au PZA survient essentiellement lorsque le bacille est MDR, c'est-à-dire après qu'il ait acquis la résistance à l'INH et à la RIF. De surcroît, ce taux de résistance au PZA augmente après l'acquisition successive de la résistance aux FQs et aux AGs. Ce taux est de 93% chez les souches MDR et résistantes aux FQs selon une précédente étude réalisée avec notre laboratoire en collaboration avec l'Institut Pasteur du Cambodge³⁵.

Chez *Escherichia coli* et *Vibrio cholerae*, des études ont montrées qu'en cultivant ces espèces en présence de RIF, FQs et AGs à des concentrations non létales, les radicaux oxygénés issus de la respiration induisent le système SOS et ROS occasionnent un phénomène de mutagénèse²¹⁵⁻²¹⁷. Bien que cela ne soit pas encore démontré chez *M. tuberculosis*, il est probable que ce phénomène puisse être à l'origine de l'accroissement du taux de résistance au PZA et à l'acquisition d'autres résistances aux antibiotiques.

De nombreux pays en développement font face au manque de financements et d'équipement des laboratoires publics, entravant l'efficacité des programmes de lutte contre la TB incluant la détection de la TB résistante (MDR et XDR) ². En Afrique, la co-infection TB-VIH est à l'origine d'un nombre croissant de cas de TB et de ses formes résistantes ². Le Gabon, pays situé en Afrique Centrale, est classé parmi les pays à plus forte incidence de TB ². Les laboratoires sont sous équipés et n'offrent que la bacilloscopie comme outil diagnostique de la TB.

L'avènement de la biologie moléculaire a permis de nombreux travaux et de nombreuses applications pratiques (par exemple GeneXpert, HAIN MTBDR*plus*) pour la détection rapide des bacilles de la TB par PCR et la reconnaissance des mutations associées aux résistances aux principaux antituberculeux. Ces méthodes ne renseignent pas sur les résistances à tous les antituberculeux. Rares sont les possibilités de génotypage en l'absence de mise en culture des échantillons.

Aussi, au cours de notre seconde étude, pour pallier le déficit technique des laboratoires et contourner la difficulté de mise en place de la culture des mycobactéries, nous avons, développé une méthodologie moléculaire, directement à partir des échantillons cliniques, pour identifier les espèces et leurs profils de résistance aux antituberculeux par séquençage et déterminer leur génotype permettant de les comparer. L'étude a été complétée par l'utilisation des autres techniques moléculaires diagnostiques recommandées par l'OMS (HAIN MTBDR*plus*). Notre étude présente l'originalité de mettre à profit le surplus de la préparation non introduite dans la cartouche pour le test GeneXpert – (mélange de l'expectoration avec le réactif Xpert, utilisé pour ce test). L'acquisition de l'automate GeneXpert par le PNLT fin 2014 a permis de mettre au point cette méthode à Libreville en collaboration avec l'Unité de Génétique Mycobactérienne de l'Institut Pasteur.

Ainsi, sur un échantillonnage de 159 expectorations, nous avons identifié 18 cas de MDR soit un pourcentage de 11,3%, taux compatible à celui estimé par l'OMS et le PNLT ^{2, 56}. La prévalence de TB-MDR à Libreville est similaire à celle de la plus part des certains pays africains. Par exemple, elle est de 11% au Bénin ²⁴⁶ où l'incidence de la TB beaucoup plus faible. Nous avons établi que le taux de MDR parmi les nouveaux cas de TB et chez les patients précédemment traités avec les ATBs de première intention est respectivement de 9,4% (11/116) et de 87% (7/8). À titre d'exemple, au Bénin la MDR primaire et secondaire

sont de 0,3% et de 10,5% ²⁴⁶ tandis qu'en Éthiopie elles sont de 2,4% et de 14,3% ²⁴⁷. Au cours de cette étude, nous avons pu observer la sensibilité et la spécificité du test GeneXpert pour la détection de la résistance à la RIF. Les résultats du test GeneXpert ont été confirmés par le test MTBDR*plus* ainsi que par le séquençage du gène *rpoB*.

De récents travaux ont montrés que des mutations localisées en dehors de la RDRR sont elles aussi associées à la résistance à la RIF ^{148, 149}. Ces mutations ne sont pas reconnues par le test GeneXpert ni par HAIN MTBDR*plus* qui n'analysent qu'une portion du locus *rpoB*, la RDRR ^{19, 21, 43, 183, 187}. Le séquençage offre la possibilité d'élargir la zone amplifiée pour détecter les mutations situées en dehors de la RDRR.

Pour détecter la résistance à l'INH, nous avons également analysé les séquences des gènes *katG* et *inhA*. Excepté des discordances pour 3 échantillons entre GeneXpert, le séquençage et HAIN MTBDR*plus*, nous avons pu également apprécier la sensibilité et la spécificité du test MTBDR*plus*. En effet, les taux de succès de PCR-séquençage étaient de 58% (93/159) et 89% (141/159) pour *rpoB* et *katG*, respectivement. En complétant les analyses avec MTBDR*plus*, ces taux sont passés à 94% (150/159) et 98% (156/159).

Même si nous avons pu mettre en évidence différents profils de résistance aux principaux ATBs, notre méthodologie n'est pas pleinement opérationnelle. En effet, nous n'avons pas pu amplifier et séquencer les loci *rpoB* et *katG* respectivement pour 41% (66/159) et 11% (18/159) des isolats. Ces scores sont particulièrement élevés comparativement à ceux d'autres travaux, mais peuvent s'expliquer par le fait que nous n'avons pas procédé à l'étape d'extraction et de purification d'ADN ^{27, 179, 221}, étapes réalisées pour les études antérieures. Ainsi, nos échantillons pourraient contenir des inhibiteurs de PCR et/ou un ADN dégradé. Ce point pourrait être amélioré notamment par l'utilisation de réactifs de transport qui conservent les bacilles et leur ADN entre le moment de leur collecte et l'acheminement jusqu'à leur analyse.

Grâce à la technologie du séquençage, nous avons recherché la présence de TB résistante au PZA parmi les MDR et surtout l'existence de TB-XDR par la détection de mutations associées aux résistances aux FQs, AGs par séquençage. Nous n'avons pas mis en évidence de TB-XDR à Libreville. Toutefois, le dépistage de ce danger doit faire partie des objectifs du PNLT. Récemment, en plus du test MTBDR*plus* qui reconnaît les TB-MDR ²¹, HAIN a développé une

nouvelle version du test MTBDRs/ directement applicable aux expectorations afin de détecter les mutations conférant la résistance aux AGs et FQs ¹⁶³ caractérisant la TB-XDR chez les cas de TB-MDR déjà avérés ou suspectés.

De récentes études décrivent de plus en plus de nouvelles mutations associées à la résistance aux antituberculeux que les tests moléculaires actuels ne peuvent pas-identifier ^{148, 149, 158-160}. D'où l'intérêt majeur du développement du Whole Genome Sequencing (WGS) comme outil de diagnostic au service de la santé publique pour les cas correspondant à une accumulation de résistances aux ATBs. Il permet d'avoir un regard sur l'ensemble du génome du bacille de la TB pour l'identification simultanée des SNPs connus associés à la résistance aux ATBs ainsi que des mutations compensatoires additionnelles ^{195, 222, 248}. S'agissant des SNPs non encore connus, le WGS offre des possibilités de prédiction du caractère résistant ou non ²⁴⁸. En génotypage, contrairement aux techniques d'empreinte génétique utilisées pour le génotypage n'analysant qu'approximativement 1% du génome mycobactérien, le WGS permet de combiner les différents loci et bien d'autres encore pour un meilleur pouvoir de discrimination ^{78, 207, 208}. Le coût encore élevé du WGS limite son accessibilité pour le Gabon et ne sera vraisemblablement utilisé que pour de nouvelles souches résistantes à de nombreux ATBs et posant d'importants problèmes thérapeutiques.

Les génotypages par spoligotyping ont montré à Libreville une population bacillaire très diversifiée comptant par ordre d'importance les clades LAM10 (Cameroon), T1, MANU (MANU1, MANU2, MANU_ancestor), Haarlem3 (H3), LAM (LAM1, LAM2, LAM5, LAM6, LAM7), Beijing, EAI (EAI2, EAI4, EAI5), S, T2, X (X1, X2, X3) et enfin *M. africanum* (AFRI_2, AFRI_3). Cette structure de population bacillaire est très similaire à celle retrouvée au Cameroun (dominée par le clade LAM10) ²⁴⁹ et en République Démocratique du Congo ²⁵⁰. La combinaison des données de résistance à celles du typage révèle que pour la période d'échantillonnage, l'épidémiologie de la TB se caractérisait par la transmission des clades LAM10 (42/159 = 26,4%), T1 (25/159 = 15,7%), MANU (21/159 = 13,2%) et H3 (20/159 = 12,5%), tous sensibles aux antibiotiques de première ligne. Pour ce qui est des 18 isolats MDR, ils sont répartis en 5 clusters à savoir le cluster Beijing (5 isolats de SIT1, 1 isolat de SIT260), T1 (4 isolats), H3 et Orphan (3 isolats chacun), MANU2 (2 isolats). Notre découverte de 5 souches Beijing MDR ayant la même mutation en *rpoB* (D516Y) soulève l'hypothèse d'une épidémie de ces souches à Libreville. De façon inquiétante, dans d'autres pays et

notamment en Afrique du Sud, les souches Beijing MDR ont un fort impact sur la santé humaine par leur transmission très active¹⁶⁸. L'origine de ces souches Beijing MDR à Libreville reste inexpliquée mais en tenant compte du caractère non MDR observé dans la région, la question se pose de leur importation.

Pour une première expérience au Gabon, le test GeneXpert a permis de détecter la résistance à la RIF et donc de prédire le caractère de MDR des TB. L'utilisation du surplus du test GeneXpert a permis une grande avancée concernant la détection des mutations associées aux résistances aux antituberculeux par le séquençage et donc la caractérisation de TB-MDR.

Les outils de biologies moléculaires utilisés dans cette étude ont été d'une grande importance dans la compréhension de la TB au Gabon. Cependant, de nombreux axes d'amélioration de la prise en charge des malades restent à développer. La reconnaissance de la maladie débute par une consultation précoce du patient. Si la TB est due à des germes sensibles aux antituberculeux, le traitement de première ligne mis en place doit être suivi scrupuleusement pour obtenir la guérison du malade en prévenant la sélection d'une TB résistante. La reconnaissance d'une TB résistante impose la mise en place d'un traitement adapté (traitement de 9 mois introduit par l'Union et recommandé par l'OMS depuis mai 2016), traitement non disponible au Gabon au moment de l'étude. Aussi, les résultats de génotypage des résistances aux ATBs obtenus lors de cette étude ont servis de support pour la rédaction d'une note conceptuelle adressée à "The Global Fund", permettant au Gabon d'obtenir un financement du Fond Mondial pour améliorer la prise en charge de la TB-MDR par le traitement avec le régime court de 9 mois. Les épidémies de bacilles MDR identifiées doivent servir de support pour mener des enquêtes autour des cas de TB-MDR et la mise en place des mesures d'isolement de ces patients lors de leur traitement.

En perspectives, nous envisageons améliorer notre méthodologie. Ces améliorations incluent la détermination des conditions de conservation des expectorations, le choix de nouvelles amorces encore plus spécifiques, et plus tard l'introduction du WGS ... etc. À l'aide de cette méthodologie, nous pourrions mener des études longitudinales pour mieux décrire l'épidémiologie de la TB au Gabon, avec une priorité sur la suspicion d'épidémie de souches Beijing MDR en vue de déterminer l'étendue de ces souches dans le pays. Les apports de diagnostics de tous ces différents outils moléculaires (GeneXpert, séquençage, HAIN MTBDR*plus*) employés dans cette étude et aussi le test HAIN MTBDR*s*/ devront faire l'objet

d'études d'évaluations de fiabilité, d'applicabilité et de coût avant qu'elles ne soient mises à profit dans le futur algorithme de diagnostic de la TB-MDR au Gabon. Ainsi, dès l'instant que la méthodologie aura été peaufinée, elle pourrait être proposée à d'autres pays qui comme le Gabon connaissent des difficultés pour le diagnostic des résistances aux ATBs et le typage de souches.

BIBLIOGRAPHIE

1. Koch R. The etiology of tuberculosis. *Berliner Klinischen Wochenschrift* 1882; **15**: 7.
2. Organization WH. Global Tuberculosis Report 2015. In: Organization WH, ed: World Health Organization, 2014; 171.
3. Van Deun A, Maug AK, Salim MA et al. Short, highly effective, and inexpensive standardized treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2010; **182**: 684-92.
4. Zumla A, Nahid P, Cole ST. Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens. *Nature reviews Drug discovery* 2013; **12**: 388-404.
5. Espinal MA, Dye C. Can DOTS control multidrug-resistant tuberculosis? *Lancet (London, England)* 2005; **365**: 1206-9.
6. Farmer P, Kim JY. Community based approaches to the control of multidrug resistant tuberculosis: introducing "DOTS-plus". *BMJ (Clinical research ed)* 1998; **317**: 671-4.
7. Van Rie A, Enarson D. XDR tuberculosis: an indicator of public-health negligence. *Lancet (London, England)* 2006; **368**: 1554-6.
8. Floyd K, Hutubessy R, Kliiman K et al. Cost and cost-effectiveness of multidrug-resistant tuberculosis treatment in Estonia and Russia. *The European respiratory journal* 2012; **40**: 133-42.
9. Andersen P, Doherty TM. The success and failure of BCG - implications for a novel tuberculosis vaccine. *Nature reviews Microbiology* 2005; **3**: 656-62.
10. Aung KJ, Van Deun A, Declercq E et al. Successful '9-month Bangladesh regimen' for multidrug-resistant tuberculosis among over 500 consecutive patients. *Int J Tuberc Lung Dis* 2014; **18**: 1180-7.
11. Doherty TM, Andersen P. Vaccines for tuberculosis: novel concepts and recent progress. *Clinical microbiology reviews* 2005; **18**: 687-702.
12. Caminero JA, Sotgiu G, Zumla A et al. Best drug treatment for multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis. *The Lancet Infectious diseases* 2010; **10**: 621-9.

13. Organization WH. What is DOTS (Directly Observed Treatment, Short Course). http://www.searo.who.int/tb/topics/what_dots/en/.
14. Glaziou P, Sismanidis C, Floyd K et al. Global epidemiology of tuberculosis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2014; **5**: a017798.
15. Lienhardt C, Glaziou P, Uplekar M et al. Global tuberculosis control: lessons learnt and future prospects. *Nature reviews Microbiology* 2012; **10**: 407-16.
16. Ben Amor Y, Nemser B, Singh A et al. Underreported threat of multidrug-resistant tuberculosis in Africa. *Emerging infectious diseases* 2008; **14**: 1345-52.
17. [Intradermal reaction to tuberculin (IDR) or tuberculin test]. *Revue des maladies respiratoires* 2003; **20**: S27-33.
18. Bodmer T, Strohle A. Diagnosing pulmonary tuberculosis with the Xpert MTB/RIF test. *J Vis Exp* 2012: e3547.
19. Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D et al. Rapid Molecular Detection of Tuberculosis and Rifampin Resistance. *New England Journal of Medicine* 2010; **363**: 1005-15.
20. Boehme CC, Nicol MP, Nabeta P et al. Feasibility, diagnostic accuracy, and effectiveness of decentralised use of the Xpert MTB/RIF test for diagnosis of tuberculosis and multidrug resistance: a multicentre implementation study. *Lancet (London, England)* 2011; **377**: 1495-505.
21. Crudu V, Stratan E, Romancenco E et al. First evaluation of an improved assay for molecular genetic detection of tuberculosis as well as rifampin and isoniazid resistances. *J Clin Microbiol* 2012; **50**: 1264-9.
22. Dezemon Z, Muvunyi CM, Jacob4 O. Staining techniques for detection of acid fast bacilli: what hope does fluorescein-diacetate (FDA) vitality staining technique represent for the monitoring of tuberculosis treatment in resource limited settings. *Herbert Open Access Journals* 2014; **10**: 6.

23. Respiratoires UICITelM. *Guide technique de Diagnostic de la tuberculose par examen microscopique direct des expectorations dans les pays à faibles revenus.*, 2000.
24. Rashid I, Mabuza LH, Govender I et al. Volume of sputum to detect acid-fast bacilli as a measure of quality for the diagnosis of pulmonary tuberculosis at the Dr George Mukhari Hospital, South Africa. *Afr J Prm Health Care Fam Med* 2011; **3**: 6.
25. Shea YR, Davis JL, Huang L et al. High sensitivity and specificity of acid-fast microscopy for diagnosis of pulmonary tuberculosis in an African population with a high prevalence of human immunodeficiency virus. *J Clin Microbiol* 2009; **47**: 1553-5.
26. Steingart KR, Ramsay A, Pai M. Optimizing sputum smear microscopy for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Expert review of anti-infective therapy* 2007; **5**: 327-31.
27. Marin M, Garcia de Viedma D, Ruiz-Serrano MJ et al. Rapid direct detection of multiple rifampin and isoniazid resistance mutations in Mycobacterium tuberculosis in respiratory samples by real-time PCR. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2004; **48**: 4293-300.
28. Blanchard JS. Molecular mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Annu Rev Biochem* 1996; **65**: 25.
29. Ghodbane R, Raoult D, Drancourt M. Dramatic reduction of culture time of Mycobacterium tuberculosis. *Scientific reports* 2014; **4**: 4236.
30. Zhang Y, Shi W, Zhang W et al. Mechanisms of Pyrazinamide Action and Resistance. *Microbiology spectrum* 2014; **2**: Mgm2-0023-2013.
31. Takiff HE, Salazar L, Guerrero C et al. Cloning and nucleotide sequence of Mycobacterium tuberculosis gyrA and gyrB genes and detection of quinolone resistance mutations. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1994; **38**: 773-80.
32. Telenti A, Imboden P, Marchesi F et al. Detection of rifampicin-resistance mutations in Mycobacterium tuberculosis. *Lancet (London, England)* 1993; **341**: 647-50.

33. Heym B, Alzari PM, Honore N et al. Missense mutations in the catalase-peroxidase gene, *katG*, are associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular microbiology* 1995; **15**: 235-45.
34. Heym B, Zhang Y, Poulet S et al. Characterization of the *katG* gene encoding a catalase-peroxidase required for the isoniazid susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of bacteriology* 1993; **175**: 4255-9.
35. Surcouf C, Heng S, Pierre-Audigier C et al. Molecular detection of fluoroquinolone-resistance in multi-drug resistant tuberculosis in Cambodia suggests low association with XDR phenotypes. *BMC Infect Dis* 2011; **11**: 255.
36. Van Der Zanden AG, Te Koppele-Vije EM, Vijaya Bhanu N et al. Use of DNA extracts from Ziehl-Neelsen-stained slides for molecular detection of rifampin resistance and spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2003; **41**: 1101-8.
37. Bidovec-Stojkovic U, Seme K, Zolnir-Dovc M et al. Prospective genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* from fresh clinical samples. *PloS one* 2014; **9**: e109547.
38. Cross LJ, Anscombe C, McHugh TD et al. A Rapid and Sensitive Diagnostic Screening Assay for Detection of Mycobacteria Including *Mycobacterium tuberculosis* Directly from Sputum without Extraction. *International journal of bacteriology* 2015; **2015**: 593745.
39. Cafrune PI, Possuelo LG, Ribeiro AW et al. Prospective study applying spoligotyping directly to DNA from sputum samples of patients suspected of having tuberculosis. *Can J Microbiol* 2009; **55**: 6.
40. Saunders NJ, Trivedi UH, Thomson ML et al. Deep resequencing of serial sputum isolates of *Mycobacterium tuberculosis* during therapeutic failure due to poor compliance reveals stepwise mutation of key resistance genes on an otherwise stable genetic background. *The Journal of infection* 2011; **62**: 212-7.
41. Ruiz M, Torres MJ, Llanos AC et al. Direct detection of rifampin- and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in auramine-rhodamine-positive sputum specimens by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2004; **42**: 1585-9.

42. Brossier F, Veziris N, Truffot-Pernot C et al. Performance of the genotype MTBDR line probe assay for detection of resistance to rifampin and isoniazid in strains of *Mycobacterium tuberculosis* with low- and high-level resistance. *J Clin Microbiol* 2006; **44**: 3659-64.
43. Hillemann D, Rusch-Gerdes S, Richter E. Evaluation of the GenoType MTBDRplus assay for rifampin and isoniazid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2007; **45**: 2635-40.
44. Richter E, Weizenegger M, Rusch-Gerdes S et al. Evaluation of genotype MTBC assay for differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J Clin Microbiol* 2003; **41**: 2672-5.
45. Bechtel. Schéma Directeur National d'Infrastructure. Republique du Gabon, 2012; 101.
46. Belard S, Remppis J, Bootsma S et al. Tuberculosis Treatment Outcome and Drug Resistance in Lambarene, Gabon: A Prospective Cohort Study. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 2016; **95**: 472-80.
47. Mve MT, Bisvigou U, Barry NCD et al. Les causes d'abandon et les motivations d'une reprise de traitement au Centre antituberculeux de Libreville (Gabon). *Cahiers Santé* 2010; **20**: 4.
48. Nkoghe D, Mve MT, Nnegue S et al. Séroprévalence du VIH au sein des tuberculeux de l'hôpital de Nkembo à Libreville, Gabon. *Bulletin de la Societe de pathologie exotique (1990)* 2005; **98**: 2.
49. Kombila DU, Moussavou-Kombila JB, Grobusch MP et al. Clinical and laboratory features of tuberculosis within a hospital population in Libreville, Gabon. *Infection* 2013; **41**: 737-9.
50. Stolp SM, Huson MAM, Janssen S et al. Tuberculosis patients hospitalized in the Albert Schweitzer Hospital, Lambarene, Gabon—a retrospective observational study. *Clinical Microbiology and Infection* 2013; **19**: 3.

51. Cremers AL, Janssen S, Huson MA et al. Perceptions, health care seeking behaviour and implementation of a tuberculosis control programme in Lambarene, Gabon. *Public health action* 2013; **3**: 328-32.
52. Nunes-Alves C, Booty MG, Carpenter SM et al. In search of a new paradigm for protective immunity to TB. *Nature reviews Microbiology* 2014; **12**: 289-99.
53. Pieters J. Mycobacterium tuberculosis and the macrophage: maintaining a balance. *Cell host & microbe* 2008; **3**: 399-407.
54. Glaziou P, Sismanidis C, Floyd K et al. Global epidemiology of tuberculosis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2015; **5**: a017798.
55. Economiques DGdISedE. Annuaire statistique du Gabon. In: Générales DdS, ed. Libreville, 2009; 268.
56. Tuberculose PNdLCL. Profil épidémiologique de la tuberculose au Gabon : 2003-2013. In: Santé DGdI, ed, 2014; 86.
57. Mounquengui D, Ondounda M, Lawson JMM et al. Tuberculose multirésistante à l'hôpital d'instruction des armées de Libreville (Gabon) à propos de 16 cas (Multi-resistant tuberculosis at the hôpital d'instruction des armées de Libreville (Gabon) about 16 cases). *Bulletin de la Societe de pathologie exotique (1990)* 2012; **105**: 4.
58. Huson MA, Kalkman R, Stolp SM et al. The impact of HIV on presentation and outcome of bacterial sepsis and other causes of acute febrile illness in Gabon. *Infection* 2015; **43**: 443-51.
59. Aranaz A, Cousins D, Mateos A et al. Elevation of Mycobacterium tuberculosis subsp. caprae Aranaz et al. 1999 to species rank as Mycobacterium caprae comb. nov., sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 2003; **53**: 1785-9.
60. Cousins DV, Bastida R, Cataldi A et al. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the Mycobacterium tuberculosis complex: Mycobacterium pinnipedii sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 2003; **53**: 1305-14.

61. Coscolla M, Lewin A, Metzger S et al. Novel Mycobacterium tuberculosis Complex Isolate from a Wild Chimpanzee *Emerging infectious diseases* 2013; **19**: 8.
62. Vasconcellos SEG, Huard RC, Niemann S et al. Distinct genotypic profiles of the two major clades of *Mycobacterium africanum*. *Infectious Diseases* 2010; **10**: 16.
63. Yuen CM, Kurbatova EV, Click ES et al. Association between Mycobacterium tuberculosis complex phylogenetic lineage and acquired drug resistance. *PloS one* 2013; **8**: e83006.
64. Aranaz A, Liebana E, Gomez-Mampaso E et al. Mycobacterium tuberculosis subsp. caprae subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the Mycobacterium tuberculosis complex isolated from goats in Spain. *International journal of systematic bacteriology* 1999; **49 Pt 3**: 1263-73.
65. Alexander KA, Laver PN, Michel AL et al. Novel Mycobacterium tuberculosis complex pathogen, M. mungi. *Emerging infectious diseases* 2010; **16**: 1296-9.
66. Alexander KA, Pleydell E, Williams MC et al. Mycobacterium tuberculosis: an emerging disease of free-ranging wildlife. *Emerging infectious diseases* 2002; **8**: 598-601.
67. Gagneux S, DeRiemer K, Van T et al. Variable host-pathogen compatibility in Mycobacterium tuberculosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006; **103**: 2869-73.
68. Collins CH, Yates MD, Grange JM. Subdivision of Mycobacterium tuberculosis into five variants for epidemiological purposes: methods and nomenclature. *The Journal of hygiene* 1982; **89**: 235-42.
69. Garrity G, Brenner DJ, Krieg NR et al. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Proteobacteria. In: Garrity G, Brenner DJ, Krieg NR et al., eds. *Systematic Bacteriology*: Springer, 2005; 2031.
70. Kieser KJ, Rubin EJ. How sisters grow apart: mycobacterial growth and division. *Nature reviews Microbiology* 2014; **12**: 550-62.

71. Jankute M, Cox JA, Harrison J et al. Assembly of the Mycobacterial Cell Wall. *Annual review of microbiology* 2015; **69**: 405-23.
72. Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M et al. A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002; **99**: 3684-9.
73. Sales ML, Fonseca AA, Jr., Sales EB et al. Evaluation of molecular markers for the diagnosis of Mycobacterium bovis. *Folia microbiologica* 2014; **59**: 433-8.
74. Tsukamura M. Numerical classification of 280 strains of slowly growing mycobacteria. Proposal of Mycobacterium tuberculosis series, Mycobacterium avium series, and Mycobacterium nonchromogenicum series. *Microbiology and immunology* 1983; **27**: 315-34.
75. Labie D. Le génome des mycobactéries : étude biologique et interprétation évolutive / Mycobacteriae : building an evolutionary scheme from genome comparison. *Médecine Sciences* 2003; **19**: 4.
76. Borrell S, Gagneux S. Strain diversity, epistasis and the evolution of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2011; **17**: 815-20.
77. Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L et al. Mycobacterium tuberculosis complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC microbiology* 2006; **6**: 23.
78. Comas I, Homolka S, Niemann S et al. Genotyping of genetically monomorphic bacteria: DNA sequencing in Mycobacterium tuberculosis highlights the limitations of current methodologies. *PloS one* 2009; **4**: e7815.
79. Ozcaglar C, Shabbeer A, Vandenberg S et al. Sublineage structure analysis of Mycobacterium tuberculosis complex strains using multiple-biomarker tensors. *BMC genomics* 2011; **12 Suppl 2**: S1.

80. Stucki D, Malla B, Hostettler S et al. Two new rapid SNP-typing methods for classifying *Mycobacterium tuberculosis* complex into the main phylogenetic lineages. *PloS one* 2012; **7**: e41253.
81. Supply P, Mazars E, Lesjean S et al. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Molecular microbiology* 2000; **36**: 762-71.
82. Cole ST, Brosch R, Parkhill J et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 1998; **393**: 537-44.
83. Groenen PM, Bunschoten AE, van Soolingen D et al. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method. *Molecular microbiology* 1993; **10**: 1057-65.
84. Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science (New York, NY)* 2010; **327**: 167-70.
85. Zhang J, Abadia E, Refregier G et al. *Mycobacterium tuberculosis* complex CRISPR genotyping: improving efficiency, throughput and discriminative power of 'spoligotyping' with new spacers and a microbead-based hybridization assay. *Journal of medical microbiology* 2010; **59**: 285-94.
86. Hermans PW, van Soolingen D, Bik EM et al. Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Infection and immunity* 1991; **59**: 2695-705.
87. Cohen JE. DNA fingerprinting for forensic identification: potential effects on data interpretation of subpopulation heterogeneity and band number variability. *American journal of human genetics* 1990; **46**: 358-68.
88. Gill P, Jeffreys AJ, Werrett DJ. Forensic application of DNA 'fingerprints'. *Nature* 1985; **318**: 577-9.
89. Hill AV, Jeffreys AJ. Use of minisatellite DNA probes for determination of twin zygosity at birth. *Lancet (London, England)* 1985; **2**: 1394-5.

90. Frothingham R, Meeker-O'Connell WA. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology (Reading, England)* 1998; **144** (Pt 5): 1189-96.
91. Supply P, Magdalena J, Himpens S et al. Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component system operon. *Molecular microbiology* 1997; **26**: 991-1003.
92. Supply P, Allix C, Lesjean S et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2006; **44**: 4498-510.
93. Gordon SV, Brosch R, Billault A et al. Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. *Molecular microbiology* 1999; **32**: 643-55.
94. Brosch R, Pym AS, Gordon SV et al. The evolution of mycobacterial pathogenicity: clues from comparative genomics. *Trends in microbiology* 2001; **9**: 452-8.
95. Behr MA, Wilson MA, Gill WP et al. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science (New York, NY)* 1999; **284**: 1520-3.
96. de Jong BC, Antonio M, Gagneux S. *Mycobacterium africanum*--review of an important cause of human tuberculosis in West Africa. *PLoS neglected tropical diseases* 2010; **4**: e744.
97. Firdessa R, Berg S, Hailu E et al. Mycobacterial lineages causing pulmonary and extrapulmonary tuberculosis, Ethiopia. *Emerging infectious diseases* 2013; **19**: 460-3.
98. Van Soolingen D. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *Journal of internal medicine* 2001; **249**: 1-26.
99. Vanden Driessche K, Persson A, Marais BJ et al. Immune vulnerability of infants to tuberculosis. *Clinical & developmental immunology* 2013; **2013**: 781320.

100. Saunders BM, Britton WJ. Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis. *Immunology and cell biology* 2007; **85**: 103-11.
101. Martinson NA, Hoffmann CJ, Chaisson RE. Epidemiology of tuberculosis and HIV: recent advances in understanding and responses. *Proceedings of the American Thoracic Society* 2011; **8**: 288-93.
102. Ravigliione M, Sulis G. Tuberculosis 2015: Burden, Challenges and Strategy for Control and Elimination. *Infectious disease reports* 2016; **8**: 6570.
103. Casanova JL, Abel L. The human model: a genetic dissection of immunity to infection in natural conditions. *Nature reviews Immunology* 2004; **4**: 55-66.
104. Blomgran R, Desvignes L, Briken V et al. Mycobacterium tuberculosis inhibits neutrophil apoptosis, leading to delayed activation of naive CD4 T cells. *Cell host & microbe* 2012; **11**: 81-90.
105. Davis JM, Ramakrishnan L. The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection. *Cell* 2009; **136**: 37-49.
106. Martin CJ, Booty MG, Rosebrock TR et al. Efferocytosis is an innate antibacterial mechanism. *Cell host & microbe* 2012; **12**: 289-300.
107. Wolf AJ, Linas B, Trevejo-Nunez GJ et al. Mycobacterium tuberculosis infects dendritic cells with high frequency and impairs their function in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2007; **179**: 2509-19.
108. Hanekom WA, Mendillo M, Manca C et al. Mycobacterium tuberculosis inhibits maturation of human monocyte-derived dendritic cells in vitro. *The Journal of infectious diseases* 2003; **188**: 257-66.
109. Zhang Q, Sugawara I. Immunology of tuberculosis. *World journal of experimental medicine* 2012; **2**: 70-4.
110. Russell DG. Mycobacterium tuberculosis: here today, and here tomorrow. *Nature reviews Molecular cell biology* 2001; **2**: 569-77.

111. Armstrong JA, Hart PD. Phagosome-lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli. Reversal of the usual nonfusion pattern and observations on bacterial survival. *The Journal of experimental medicine* 1975; **142**: 1-16.
112. Orme IM. A new unifying theory of the pathogenesis of tuberculosis. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)* 2014; **94**: 8-14.
113. Ramakrishnan L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nature reviews Immunology* 2012; **12**: 352-66.
114. Tailleux L, Neyrolles O, Honore-Bouakline S et al. Constrained intracellular survival of Mycobacterium tuberculosis in human dendritic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2003; **170**: 1939-48.
115. Jiao X, Lo-Man R, Guermonprez P et al. Dendritic cells are host cells for mycobacteria in vivo that trigger innate and acquired immunity. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2002; **168**: 1294-301.
116. Volkman HE, Clay H, Beery D et al. Tuberculous granuloma formation is enhanced by a mycobacterium virulence determinant. *PLoS biology* 2004; **2**: e367.
117. Yang CT, Cambier CJ, Davis JM et al. Neutrophils exert protection in the early tuberculous granuloma by oxidative killing of mycobacteria phagocytosed from infected macrophages. *Cell host & microbe* 2012; **12**: 301-12.
118. Flynn JL, Chan J, Lin PL. Macrophages and control of granulomatous inflammation in tuberculosis. *Mucosal immunology* 2011; **4**: 271-8.
119. Swaim LE, Connolly LE, Volkman HE et al. Mycobacterium marinum infection of adult zebrafish causes caseating granulomatous tuberculosis and is moderated by adaptive immunity. *Infection and immunity* 2006; **74**: 6108-17.
120. Hsu T, Hingley-Wilson SM, Chen B et al. The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette-Guerin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003; **100**: 12420-5.

121. McLaughlin B, Chon JS, MacGurn JA et al. A mycobacterium ESX-1-secreted virulence factor with unique requirements for export. *PLoS pathogens* 2007; **3**: e105.
122. Peng X, Sun J. Mechanism of ESAT-6 membrane interaction and its roles in pathogenesis of Mycobacterium tuberculosis. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 2015.
123. Samten B, Wang X, Barnes PF. Mycobacterium tuberculosis ESX-1 system-secreted protein ESAT-6 but not CFP10 inhibits human T-cell immune responses. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)* 2009; **89 Suppl 1**: S74-6.
124. Volkman HE, Pozos TC, Zheng J et al. Tuberculous granuloma induction via interaction of a bacterial secreted protein with host epithelium. *Science (New York, NY)* 2010; **327**: 466-9.
125. Velmurugan K, Chen B, Miller JL et al. Mycobacterium tuberculosis nuoG is a virulence gene that inhibits apoptosis of infected host cells. *PLoS pathogens* 2007; **3**: e110.
126. Tang J, Yam WC, Chen Z. Mycobacterium tuberculosis infection and vaccine development. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)* 2016; **98**: 30-41.
127. Scriba TJ, Kaufmann SH, Henri Lambert P et al. Vaccination Against Tuberculosis With Whole-Cell Mycobacterial Vaccines. *The Journal of infectious diseases* 2016.
128. Amanna IJ, Carlson NE, Slifka MK. Duration of humoral immunity to common viral and vaccine antigens. *The New England journal of medicine* 2007; **357**: 1903-15.
129. Fletcher HA, Schrager L. TB vaccine development and the End TB Strategy: importance and current status. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2016; **110**: 212-8.
130. Horwitz MA, Harth G, Dillon BJ et al. Recombinant bacillus calmette-guerin (BCG) vaccines expressing the Mycobacterium tuberculosis 30-kDa major secretory protein induce greater protective immunity against tuberculosis than conventional BCG vaccines in a highly susceptible animal model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000; **97**: 13853-8.

131. Geluk A, van Meijgaarden KE, Franken KL et al. Identification of major epitopes of Mycobacterium tuberculosis AG85B that are recognized by HLA-A*0201-restricted CD8+ T cells in HLA-transgenic mice and humans. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2000; **165**: 6463-71.
132. Grode L, Seiler P, Baumann S et al. Increased vaccine efficacy against tuberculosis of recombinant Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guerin mutants that secrete listeriolysin. *The Journal of clinical investigation* 2005; **115**: 2472-9.
133. Somoskovi A, Parsons LM, Salfinger M. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in Mycobacterium tuberculosis. *Respiratory research* 2001; **2**: 164-8.
134. Mitchison DA. The diagnosis and therapy of tuberculosis during the past 100 years. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2005; **171**: 699-706.
135. Kanabus, Annabe. Information about tuberculosis. <http://www.tbfacts.org/tb-drugs/>.
136. Organization WH. *Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis*, 2014.
137. Kuaban C, Noeske J, Rieder HL et al. High effectiveness of a 12-month regimen for MDR-TB patients in Cameroon. *Int J Tuberc Lung Dis* 2015; **19**: 517-24.
138. Guglielmetti L, Le Du D, Veziris N et al. Is bedaquiline as effective as fluoroquinolones in the treatment of multidrug-resistant tuberculosis? *The European respiratory journal* 2016.
139. Hoffmann H, Kohl TA, Hofmann-Thiel S et al. Delamanid and Bedaquiline Resistance in Mycobacterium tuberculosis Ancestral Beijing Genotype Causing Extensively Drug-Resistant Tuberculosis in a Tibetan Refugee. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2016; **193**: 337-40.
140. Lachatre M, Rioux C, Le Du D et al. Bedaquiline plus delamanid for XDR tuberculosis. *The Lancet Infectious diseases* 2016; **16**: 294.

141. Tadolini M, Lingsang RD, Tiberi S et al. First case of extensively drug-resistant tuberculosis treated with both delamanid and bedaquiline. *The European respiratory journal* 2016.
142. Zhang Y, Yew WW. Mécanismes de la résistance aux médicaments chez *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009; **13**: 12.
143. Rodwell TC, Valafar F, Douglas J et al. Predicting extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* phenotypes with genetic mutations. *J Clin Microbiol* 2014; **52**: 781-9.
144. McGrath M, Gey van Pittius NC, van Helden PD et al. Mutation rate and the emergence of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2014; **69**: 292-302.
145. Lorenzo D, Mousa SA. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and current status of rapid molecular diagnostic testing. *Acta tropica* 2011; **119**: 5-10.
146. Mitchison DA. How drug resistance emerges as a result of poor compliance during short course chemotherapy for tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 1998; **2**: 10-5.
147. Gagneux S. Fitness cost of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2009; **15 Suppl 1**: 66-8.
148. Jamieson FB, Guthrie JL, Neemuchwala A et al. Profiling of *rpoB* mutations and MICs for rifampin and rifabutin in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2014; **52**: 2157-62.
149. Heep M, Brandstatter B, Rieger U et al. Frequency of *rpoB* mutations inside and outside the cluster I region in rifampin-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Clin Microbiol* 2001; **39**: 107-10.
150. Pierre-Audigier C, Gicquel B. The Contribution of Molecular Biology in Diagnosing Tuberculosis and Detecting Antibiotic Resistance. 2011: 47.

151. Huang WL, Chi TL, Wu MH et al. Performance assessment of the GenoType MTBDRsl test and DNA sequencing for detection of second-line and ethambutol drug resistance among patients infected with multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2011; **49**: 2502-8.
152. Mayer C, Takiff H. The Molecular Genetics of Fluoroquinolone Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology spectrum* 2014; **2**: Mgm2-0009-2013.
153. Avalos E, Catanzaro D, Catanzaro A et al. Frequency and geographic distribution of *gyrA* and *gyrB* mutations associated with fluoroquinolone resistance in clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates: a systematic review. *PloS one* 2015; **10**: e0120470.
154. Li J, Gao X, Luo T et al. Association of *gyrA/B* mutations and resistance levels to fluoroquinolones in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerging microbes & infections* 2014; **3**: e19.
155. Willby M, Sikes RD, Malik S et al. Correlation between *GyrA* substitutions and ofloxacin, levofloxacin, and moxifloxacin cross-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2015; **59**: 5427-34.
156. Zhang Y, Heym B, Allen B et al. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature* 1992; **358**: 591-3.
157. Lanzas F, Ioerger TR, Shah H et al. First Evaluation of GenoType MTBDRplus 2.0 Performed Directly on Respiratory Specimens in Central America. *J Clin Microbiol* 2016; **54**: 2498-502.
158. Cade CE, Dlouhy AC, Medzihradsky KF et al. Isoniazid-resistance conferring mutations in *Mycobacterium tuberculosis* KatG: catalase, peroxidase, and INH-NADH adduct formation activities. *Protein science : a publication of the Protein Society* 2010; **19**: 458-74.
159. Gagneux S, Burgos MV, DeRiemer K et al. Impact of bacterial genetics on the transmission of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS pathogens* 2006; **2**: e61.

160. Chia BS, Lanzas F, Rifat D et al. Use of multiplex allele-specific polymerase chain reaction (MAS-PCR) to detect multidrug-resistant tuberculosis in Panama. *PloS one* 2012; **7**: e40456.
161. Telenti A, Philipp WJ, Sreevatsan S et al. The emb operon, a gene cluster of Mycobacterium tuberculosis involved in resistance to ethambutol. *Nature medicine* 1997; **3**: 567-70.
162. Alangaden GJ, Kreiswirth BN, Aouad A et al. Mechanism of resistance to amikacin and kanamycin in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1998; **42**: 1295-7.
163. Tagliani E, Cabibbe AM, Miotto P et al. Diagnostic Performance of the New Version (v2.0) of GenoType MTBDRsl Assay for Detection of Resistance to Fluoroquinolones and Second-Line Injectable Drugs: a Multicenter Study. *J Clin Microbiol* 2015; **53**: 2961-9.
164. Zhang Y, Mitchison D. The curious characteristics of pyrazinamide: a review. *Int J Tuberc Lung Dis* 2003; **7**: 6-21.
165. Jaramillo E, Weyer K, Raviglione M. Linezolid for extensively drug-resistant tuberculosis. *The New England journal of medicine* 2013; **368**: 290.
166. Bloemberg GV, Keller PM, Stucki D et al. Acquired Resistance to Bedaquiline and Delamanid in Therapy for Tuberculosis. *The New England journal of medicine* 2015; **373**: 1986-8.
167. Whitfield MG, Soeters HM, Warren RM et al. A Global Perspective on Pyrazinamide Resistance: Systematic Review and Meta-Analysis. *PloS one* 2015; **10**: e0133869.
168. Johnson R, Warren R, Strauss OJ et al. An outbreak of drug-resistant tuberculosis caused by a Beijing strain in the western Cape, South Africa. *Int J Tuberc Lung Dis* 2006; **10**: 1412-4.
169. Gagneux S, Long CD, Small PM et al. The competitive cost of antibiotic resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Science (New York, NY)* 2006; **312**: 1944-6.

170. Fenner L, Egger M, Bodmer T et al. Effect of mutation and genetic background on drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2012; **56**: 3047-53.
171. Cohen T, Sommers B, Murray M. The effect of drug resistance on the fitness of *Mycobacterium tuberculosis*. *The Lancet Infectious diseases* 2003; **3**: 13-21.
172. Organization WH. Global tuberculosis report 2015. World Health Organization, 2015; 204.
173. MacLean RC, Vogwill T. Limits to compensatory adaptation and the persistence of antibiotic resistance in pathogenic bacteria. *Evolution, medicine, and public health* 2014; **2015**: 4-12.
174. de Vos M, Muller B, Borrell S et al. Putative compensatory mutations in the *rpoC* gene of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* are associated with ongoing transmission. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2013; **57**: 827-32.
175. Moing VL. Intérêts et limites des tests de détection de l'interféron γ dans le diagnostic de la tuberculose. *La Lettre du Pneumologue* 2012; **15**: 4.
176. Pai M, Zwerling A, Menzies D. Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update. *Annals of internal medicine* 2008; **149**: 177-84.
177. Perkins MD, Cunningham J. Facing the crisis: improving the diagnosis of tuberculosis in the HIV era. *The Journal of infectious diseases* 2007; **196 Suppl 1**: S15-27.
178. Nhu NT, Ha DT, Anh ND et al. Evaluation of Xpert MTB/RIF and MODS assay for the diagnosis of pediatric tuberculosis. *BMC Infect Dis* 2013; **13**: 31.
179. Matee M, Mtei L, Lounasvaara T et al. Sputum microscopy for the diagnosis of HIV-associated pulmonary tuberculosis in Tanzania. *BMC public health* 2008; **8**: 68.
180. van Soolingen D, van der Zanden AG, de Haas PE et al. Diagnosis of *Mycobacterium microti* infections among humans by using novel genetic markers. *J Clin Microbiol* 1998; **36**: 1840-5.

181. Loiez-Durocher C, Vachee A, Lemaitre N. [Drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: diagnostic methods]. *Annales de biologie clinique* 2000; **58**: 291-7.
182. Canetti G, Froman S, Grosset J et al. MYCOBACTERIA: LABORATORY METHODS FOR TESTING DRUG SENSITIVITY AND RESISTANCE. *Bulletin of the World Health Organization* 1963; **29**: 565-78.
183. Helb D, Jones M, Story E et al. Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology. *J Clin Microbiol* 2010; **48**: 229-37.
184. Bang D, Andersen SR, Vasiliauskiene E et al. Performance of the GenoType MTBDRplus assay (v2.0) and a new extended GenoType MTBDRsl assay (v2.0) for the molecular detection of multi- and extensively drug-resistant Mycobacterium tuberculosis on isolates primarily from Lithuania. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 2016.
185. Singh S, Singh A, Prajapati S et al. Xpert MTB/RIF assay can be used on archived gastric aspirate and induced sputum samples for sensitive diagnosis of paediatric tuberculosis. *BMC microbiology* 2015; **15**: 191.
186. Gous N, Scott LE, Khan S et al. Diagnosing childhood pulmonary tuberculosis using a single sputum specimen on Xpert MTB/RIF at point of care. *South African medical journal = Suid-Afrikaanse tydskrif vir geneeskunde* 2015; **105**: 1044-8.
187. Hernandez-Neuta I, Varela A, Martin A et al. Rifampin-isoniazid oligonucleotide typing: an alternative format for rapid detection of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2010; **48**: 4386-91.
188. Matrat S, Veziris N, Mayer C et al. Functional analysis of DNA gyrase mutant enzymes carrying mutations at position 88 in the A subunit found in clinical strains of Mycobacterium tuberculosis resistant to fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**: 4170-3.
189. Kocagoz T, Hackbarth CJ, Unsal I et al. Gyrase mutations in laboratory-selected, fluoroquinolone-resistant mutants of Mycobacterium tuberculosis H37Ra. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; **40**: 1768-74.

190. Cheng AF, Yew WW, Chan EW et al. Multiplex PCR amplicon conformation analysis for rapid detection of *gyrA* mutations in fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 596-601.
191. Aubry A, Veziris N, Cambau E et al. Novel gyrase mutations in quinolone-resistant and -hypersusceptible clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*: functional analysis of mutant enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**: 104-12.
192. Garnier T, Eiglmeier K, Camus JC et al. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003; **100**: 7877-82.
193. Guinn KM, Hickey MJ, Mathur SK et al. Individual RD1-region genes are required for export of ESAT-6/CFP-10 and for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular microbiology* 2004; **51**: 359-70.
194. Brudey K, Gutierrez MC, Vincent V et al. *Mycobacterium africanum* genotyping using novel spacer oligonucleotides in the direct repeat locus. *J Clin Microbiol* 2004; **42**: 5053-7.
195. Takiff HE, Feo O. Clinical value of whole-genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis*. *The Lancet Infectious diseases* 2015; **15**: 1077-90.
196. Lee RS, Behr MA. The implications of whole-genome sequencing in the control of tuberculosis. *Therapeutic advances in infectious disease* 2016; **3**: 47-62.
197. Roetzer A, Diel R, Kohl TA et al. Whole genome sequencing versus traditional genotyping for investigation of a *Mycobacterium tuberculosis* outbreak: a longitudinal molecular epidemiological study. *PLoS medicine* 2013; **10**: e1001387.
198. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 1997; **35**: 907-14.
199. Sorek R, Kunin V, Hugenholtz P. CRISPR--a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Nature reviews Microbiology* 2008; **6**: 181-6.

200. Mihret A, Bekele Y, Loxton AG et al. Diversity of Mycobacterium tuberculosis isolates from new pulmonary tuberculosis cases in Addis Ababa, Ethiopia. *Tuberculosis research and treatment* 2012; **2012**: 892079.
201. Smith NH, Crawshaw T, Parry J et al. Mycobacterium microti: More diverse than previously thought. *J Clin Microbiol* 2009; **47**: 2551-9.
202. Zhang Y, Coyne MY, Will SG et al. Single-base mutational analysis of cancer and genetic diseases using membrane bound modified oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* 1991; **19**: 3929-33.
203. Sola C, Abadia E, Le Hello S et al. High-Throughput CRISPR Typing of Mycobacterium tuberculosis Complex and Salmonella enterica Serotype Typhimurium. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* 2015; **1311**: 91-109.
204. Moalic V, Mercier B, Ferec C. Technologie Luminex™ : principe, applications, et perspectives. *Immuno-analyse & Biologie spécialisée* 2004; **19**: 7.
205. Luo T, Yang C, Gagneux S et al. Combination of single nucleotide polymorphism and variable-number tandem repeats for genotyping a homogenous population of Mycobacterium tuberculosis Beijing strains in China. *J Clin Microbiol* 2012; **50**: 633-9.
206. Asante-Poku A, Nyaho MS, Borrell S et al. Evaluation of customised lineage-specific sets of MIRU-VNTR loci for genotyping Mycobacterium tuberculosis complex isolates in Ghana. *PloS one* 2014; **9**: e92675.
207. Allix-Beguec C, Wahl C, Hanekom M et al. Proposal of a consensus set of hypervariable mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat loci for subtyping of Mycobacterium tuberculosis Beijing isolates. *J Clin Microbiol* 2014; **52**: 164-72.
208. Zhao LL, Xiao TY, Sun Q et al. Mutations in lysX as the new and reliable markers for tuberculosis Beijing and modern Beijing strains. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)* 2016; **97**: 33-7.

209. Chakravorty S, Aladegbami B, Motiwala AS et al. Rifampin resistance, Beijing-W clade-single nucleotide polymorphism cluster group 2 phylogeny, and the Rv2629 191-C allele in *Mycobacterium tuberculosis* strains. *J Clin Microbiol* 2008; **46**: 2555-60.
210. A controlled trial of 6 months' chemotherapy in pulmonary tuberculosis. Final report: results during the 36 months after the end of chemotherapy and beyond. British Thoracic Society. *British journal of diseases of the chest* 1984; **78**: 330-6.
211. Organization WH. The shorter MDR-TB regimen. 2016: 2.
212. Chang KC, Yew WW, Zhang Y. Pyrazinamide susceptibility testing in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review with meta-analyses. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2011; **55**: 4499-505.
213. Pierre-Audigier C, Surcouf C, Cadet-Daniel V et al. Fluoroquinolone and pyrazinamide resistance in multidrug-resistant tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2012; **16**: 221-3, i-ii.
214. Zhang Y, Chiu Chang K, Leung CC et al. 'Z(S)-MDR-TB' versus 'Z(R)-MDR-TB': improving treatment of MDR-TB by identifying pyrazinamide susceptibility. *Emerging microbes & infections* 2012; **1**: e5.
215. Andersson DI, Hughes D. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nature reviews Microbiology* 2014; **12**: 465-78.
216. Baharoglu Z, Krin E, Mazel D. RpoS plays a central role in the SOS induction by sublethal aminoglycoside concentrations in *Vibrio cholerae*. *PLoS genetics* 2013; **9**: e1003421.
217. Baharoglu Z, Mazel D. *Vibrio cholerae* triggers SOS and mutagenesis in response to a wide range of antibiotics: a route towards multiresistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2011; **55**: 2438-41.
218. Chang KC, Leung CC, Yew WW et al. Pyrazinamide may improve fluoroquinolone-based treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2012; **56**: 5465-75.

219. Ibrahim M, Andries K, Lounis N et al. Synergistic activity of R207910 combined with pyrazinamide against murine tuberculosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2007; **51**: 1011-5.
220. Bastos ML, Hussain H, Weyer K et al. Treatment outcomes of patients with multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis according to drug susceptibility testing to first- and second-line drugs: an individual patient data meta-analysis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2014; **59**: 1364-74.
221. Bidovec-Stojković U, Seme K, Žolnir-Dovč M et al. Prospective Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* from Fresh Clinical Samples. *PloS one* 2014; **9**: 10.
222. Brown AC, Bryant JM, Einer-Jensen K et al. Rapid Whole-Genome Sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates Directly from Clinical Samples. *J Clin Microbiol* 2015; **53**: 2230-7.
223. Bouakaze C, Keyser C, Gonzalez A et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based single nucleotide polymorphism genotyping assay using iPLEX gold technology for identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex species and lineages. *J Clin Microbiol* 2011; **49**: 3292-9.
224. El Khechine A, Couderc C, Flaudrops C et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry identification of mycobacteria in routine clinical practice. *PloS one* 2011; **6**: e24720.
225. WHO. *Global tuberculosis report 2016*. Geneva: World Health Organization, 2016.
226. WHO. *Global tuberculosis report 2015*. Geneva: World Health Organization, 2015.
227. Dye C, Williams BG. Criteria for the control of drug-resistant tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97**: 8180-5.
228. Belard S, Remppis J, Bootsma S et al. Tuberculosis Treatment Outcome and Drug Resistance in Lambarene, Gabon: A Prospective Cohort Study. *Am J Trop Med Hyg* 2016.

229. Organization-recommandations WH. Tuberculosis diagnostics Xpert MTB/RIF Test http://www.who.int/tb/features_archive/factsheet_xpert.pdf.
230. Pio A, Chaulet P. Tuberculosis handbook. Geneva: WHO, 1998.
231. Ramirez-Busby SM, Valafar F. Systematic review of mutations in pyrazinamidase associated with pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2015; **59**: 5267-77.
232. Sandgren A, Strong M, Muthukrishnan P et al. Tuberculosis drug resistance mutation database. *PLoS medicine* 2009; **6**: e2.
233. Alame-Emane AK, Xu P, Pierre-Audigier C et al. Pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* arises after rifampicin and fluoroquinolone resistance. *Int J Tuberc Lung Dis* 2015; **19**: 679-84.
234. Pym AS, Saint-Joanis B, Cole ST. Effect of *katG* mutations on the virulence of *Mycobacterium tuberculosis* and the implication for transmission in humans. *Infect Immun* 2002; **70**: 4955-60.
235. Hazbon MH, Brimacombe M, Bobadilla del Valle M et al. Population genetics study of isoniazid resistance mutations and evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**: 2640-9.
236. Walusimbi S, Bwanga F, De Costa A et al. Meta-analysis to compare the accuracy of GeneXpert, MODS and the WHO 2007 algorithm for diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis. *BMC Infect Dis* 2013; **13**: 507.
237. Martin L, Coronel J, Faulx D et al. A field evaluation of the Hardy TB MODS Kit for the rapid phenotypic diagnosis of tuberculosis and multi-drug resistant tuberculosis. *PLoS One* 2014; **9**: e107258.
238. Rigouts L, Coeck N, Gumusboga M et al. Specific *gyrA* gene mutations predict poor treatment outcome in MDR-TB. *J Antimicrob Chemother* 2016; **71**: 314-23.

239. Hanekom M, Gey van Pittius NC, McEvoy C et al. Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype: a template for success. *Tuberculosis (Edinb)* 2011; **91**: 510-23.
240. Yeboah-Manu D, Asante-Poku A, Bodmer T et al. Genotypic diversity and drug susceptibility patterns among M. tuberculosis complex isolates from South-Western Ghana. *PloS one* 2011; **6**: e21906.
241. Couvin D, Rastogi N. Tuberculosis - A global emergency: Tools and methods to monitor, understand, and control the epidemic with specific example of the Beijing lineage. *Tuberculosis (Edinb)* 2015; **95 Suppl 1**: S177-89.
242. Ouassa T, Borroni E, Loukou GY et al. High prevalence of shared international type 53 among Mycobacterium tuberculosis complex strains in retreated patients from Cote d'Ivoire. *PloS one* 2012; **7**: e45363.
243. Coll F, McNerney R, Preston MD et al. Rapid determination of anti-tuberculosis drug resistance from whole-genome sequences. *Genome medicine* 2015; **7**: 51.
244. Bradley P, Gordon NC, Walker TM et al. Rapid antibiotic-resistance predictions from genome sequence data for Staphylococcus aureus and Mycobacterium tuberculosis. *Nature communications* 2015; **6**: 10063.
245. Karlsson E, Larkeryd A, Sjodin A et al. Scaffolding of a bacterial genome using MinION nanopore sequencing. *Sci Rep* 2015; **5**: 11996.
246. Trébucq A, Anagonou S, Gninafon M et al. Prévalence de la résistance primaire et acquise de Mycobacterium tuberculosis aux antituberculeux au Bénin après 12 ans d'utilisation des traitements courts. *INT J TUBERC LUNG DIS* 1999; **3**: 5.
247. Hamusse SD, Teshome D, Hussen MS et al. Primary and secondary anti-tuberculosis drug resistance in Hitossa District of Arsi Zone, Oromia Regional State, Central Ethiopia. *BMC public health* 2016; **16**: 593.
248. Walker TM, Kohl TA, Omar SV et al. Whole-genome sequencing for prediction of Mycobacterium tuberculosis drug susceptibility and resistance: a retrospective cohort study. *The Lancet Infectious diseases* 2015; **15**: 1193-202.

249. Koro-Koro F, Simo YK, Piam FF et al. Population Dynamics of Tuberculous Bacilli in Cameroon as Assessed by Spoligotyping. *Journal of Clinical Microbiology* 2013; **51**: 4.
250. Fenner L, Gagneux S, Kabuya G et al. Mycobacterium tuberculosis genetic diversity and drug resistance conferring mutations in the Democratic Republic of Congo. *East African Medical Journal* 2011; **88**: 7.

Résumé :

Le phénomène émergent de la tuberculose multirésistante et ultrarésistante est un problème de santé publique à l'échelle mondiale. Dans les pays en développement, ce problème est accru du fait que les laboratoires de diagnostic de la tuberculose manquent d'équipement et d'outils de diagnostics pour identifier ces cas pour prescrire une chimiothérapie adaptée. La première partie de ce travail de doctorat a permis à travers le séquençage du locus *pncA*, de mettre en évidence que la résistance au Pyrazinamide survient généralement et de manière significative lorsque la souche est multirésistante, c'est-à-dire après l'acquisition de la résistance à la Rifampicine et à l'Isoniazide. Le pourcentage des souches résistantes au PZA est même plus élevé chez les souches MDR résistantes aux FQs. Dans la seconde partie de l'étude, nous proposons une méthode alternative à la culture de bacilles dans un environnement confiné de type P3. À partir d'échantillons cliniques non cultivés (expectoration) et grâce au GeneXpert MTB/RIF, au séquençage de gènes et au spoligotypage, nous avons pu identifier 19 souches multirésistantes, une transmission active de souches sensibles appartenant aux clades LAM10, T1, MANU, H3 et enfin une épidémie sous-jacente de 5 souches Beijing multirésistantes.

Mots clefs : *Mycobacterium tuberculosis*, Gabon, Libreville, GeneXpert, Séquençage, multirésistance, Famille Beijing.

Summary :

The emerging phenomenon of the MDR and XDR-TB is a worldwide public health issue. In developing countries, this problem is amplified due to the fact that TB diagnostic laboratories lack equipment and diagnostic tools to identify these cases and therefore prescribe appropriate chemotherapy. In the first part of this doctoral work, the sequencing of the *pncA* locus allowed us to show that the resistance to pyrazinamide occurs significantly when the strain is MDR, corresponding to the acquisition of resistance to Rifampicin and Isoniazid; and that after the acquisition of FQs and AGs resistance by MDR strains, this rate increases even more. In the second part of the study, we propose an alternative method to the culture of bacilli in a BSL3 confined environment. From uncultivated clinical samples (sputum) and through GeneXpert MTB/RIF, sequencing of genes and spoligotyping, we identified 19 MDR strains, active transmission of sensitive strains belonging to clades LAM10, T1, MANU, H3 and finally as well as an underlying epidemic of 5 Beijing MDR strains.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, Gabon, Libreville, GeneXpert, Sequencing, multidrug resistance, Beijing Family.