

UNIVERSITÉ DE YAOUNDÉ I

CENTRE DE RECHERCHE ET DE
FORMATION DOCTORALE EN
SCIENCES DE LA VIE, SANTE ET
ENVIRONNEMENT

FACULTÉ DES SCIENCES



UNIVERSITY OF YAOUNDE I

CENTER FOR RESEARCH AND
DOCTORAL TRAINING IN LIFE
SCIENCES, HEALTH AND
ENVIRONMENT

FACULTY OF SCIENCES

**Laboratoire de Recherche en Tuberculose et Pharmacologie, Centre de Biotechnologie
de Nkolbisson, Université de Yaoundé I**

*Laboratory for Tuberculosis Research and Pharmacology, Biotechnology Center of
Nkolbisson, University of Yaoundé I*

**Etude de la diversité génétique au sein de la
famille de spoligotype Uganda I parmi les
souches du complexe *Mycobacterium tuberculosis*
collectées lors du projet CANTAM I**

Mémoire rédigé et présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master en Microbiologie

Option: Microbiologie Médicale

par :

DONKENG NAFACK Marlyse Rosine

Licenciée ès-Biosciences

Matricule 15R2573

sous la co-direction de

ASSAM ASSAM Jean Paul
Maître de Conférences

LYONGA ENJEMA Emilia
Chargé de Cours



Année académique 2021-2022

DÉDICACE

Je dédie ce travail à ma maman, Mme NDONFACK Antoinette

REMERCIEMENTS

À mon encadreur, Professeur **ASSAM ASSAM Jean Paul** pour son dévouement, sa disponibilité sans cesse, sa patience et son encadrement mis à notre disposition pour la coordination et le bon déroulement de ces travaux ;

À mon co-encadreur, Docteur **LYONGA ENJEMA Emilia**, pour sa disponibilité à aider, sa compréhension et son ouverture d'esprit qui m'ont permis d'arriver jusqu'ici ;

Au Chef du Département de Microbiologie, Professeur **ESSIA NGANG Jean Justin**, pour son dévouement dans la bonne coordination, la bonne gestion et le bon fonctionnement du Département ;

Au Professeur **PENLAP Véronique**, qui nous a donné accès au Laboratoire de Recherche sur la Tuberculose et Pharmacologie de Nkolbisson afin que nous puissions mener à bien ces travaux ;

À tout le personnel du Centre de Biotechnologie de Nkolbisson, de nous avoir accueillis ouvertement et d'avoir tout mis à notre disposition pour le déroulement de ces travaux ;

Aux membres du jury pour leur disponibilité et leurs attentions vis-à-vis de ce travail ;

À tout le personnel enseignant du Département de Microbiologie de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I pour leur apport en enseignements de qualité sans relâche et leurs conseils tout au long de notre cursus académique au sein du Département ;

À tous mes camarades qui de près ou de loin ont contribué avec leurs connaissances, leurs conseils et leurs encouragements afin que ce travail puisse être accompli ;

À ma famille particulièrement à ma maman Mme **NDONFACK Antoinette**, à mon papa Mr **SIKIEDJE Josué Olivier**, à mes grandes sœurs **NAGUE Majolie Flore**, **MAKAMJIEU Lydie Agathe**, **KEUMOG NAFACK Charline** et **NGNITIDEM Elodie Carole** et à mon grand frère **TELIKEUDJIEUTSA NAFACK Fabrice Leclerc** pour leur aide financière précieuse qui m'a permis d'accomplir ce travail ;

À mes amis **BAMI FEUMI Frank Junior** et **MBOUYOM Pierre-Marcel, Antoinette** et **Ekassi Eunice** qui m'ont aidé afin que ce travail puisse être rédigé.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE	I
REMERCIEMENTS	II
TABLE DES MATIÈRES	III
LISTE DES ABRÉVIATIONS	V
LISTE DES TABLEAUX	VII
LISTE DES FIGURES	VIII
LISTE DES ANNEXES	IX
RÉSUMÉ	X
ABSTRACT	XI
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTÉRATURE	4
I.1. GÉNÉRALITÉS SUR LA TUBERCULOSE.....	4
I.1.1. Définition	4
I.1.2. Pathogénèse et évolution de la tuberculose	4
I.1.3. Épidémiologie de la tuberculose	7
I.2. LE COMPLEXE <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> (CMT)	11
I.2.1. Taxonomie et classification du CMT	11
I.2.2. Caractéristiques du génome de <i>M. tuberculosis</i>	14
I.3. DIAGNOSTIC DE LA TUBERCULOSE.....	15
I.3.1. Diagnostic clinique	15
I.3.2. Diagnostic immunologique : l'intradermo-réaction (IDR) à la tuberculine - le test <i>Interferon Gamma Release Assay (IGRA)</i>	15
I.3.3. Diagnostique radiologique	16
I.3.4. Diagnostique bactériologique	17
I.4. TRAITEMENT DE LA TUBERCULOSE.....	21
I.4.1. Traitement général	21
I.4.2. Traitement de la tuberculose mono/poly/multi/ultra résistante aux antibiotiques	21
I.5. PROPHYLAXIE-VACCINATIONS : Vaccin BCG (Bacille de Calmette et Guérin).....	23
I.6. LES TECHNIQUES DE GÉNOTYPAGE EN BIOLOGIE MOLÉCULAIRE	23

I.6.1. La Technique d'IS6110 RFLP (<i>Insertion Sequence 6110 Restriction Length Fragment Polymorphism</i>)	24
I.6.2. Le Spoligotypage (<i>Spacer Oligonucleotide Typing</i>).....	24
I.6.3. La technique MIRU-VNTR (<i>Mycobacterium Interspersed Repetitive Unit Variable Number Tandem Repeat</i>).....	25
CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES	27
II.1. MATÉRIEL	27
II.2. MÉTHODES	28
II.2.1. Cadre de l'étude	28
II.2.2. Réactivation des souches sélectionnées	29
II.2.3. Collecte des données	29
II.2.4. Caractérisation génotypique des souches.	29
II.2.5. Analyses statistiques.....	33
CHAPITRE III : RÉSULTATS ET DISCUSSION	35
III.1. RÉSULTATS	35
III.1.1. Profil sociodémographique et clinique des souches.....	35
III.1.2. Caractérisation génotypique des souches	35
III.2. DISCUSSION	48
CONCLUSION, SUGGESTIONS ET PERSPECTIVES.....	50
CONCLUSION	50
SUGGESTIONS.....	51
PERSPECTIVES.....	51
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	52
ANNEXES	A

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN :	Acide désoxyribonucléique
AMK:	Amikacine
ARN:	Acide Ribonucléique
BCG :	Bacille de Calmette et Guérin
CBN	Centre de Biotechnologie de Nkolbisson
CD4+ :	Cluster De Différentiation 4 (Glycoprotéine)
CDT :	Centre de Diagnostic et de Traitement
CMT:	Complexe <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
DR :	<i>Direct Repeat</i>
EDTA :	Acide Ethylène-Diamine-Tétra-Acétique
FFP2/FFP3 :	<i>Filtering Face Piece</i> (pièce faciale filtrante)
FQ :	Fluoroquinolone
IDR :	<i>Intra Dermo Réaction</i>
IGRA:	<i>Interferon Gamma Release Assay</i>
KANN	Kanamycine
LTRP :	Laboratoire de Recherche sur la Tuberculose et Pharmacologie
MDR-TB:	<i>Multi-Drug Resistant Tuberculosis</i>
MIRU:	<i>Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit</i>
mL	Millilitre
MR :	Multi-Résistant
MTB :	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MTC	<i>Mycobacterium tuberculosis complex</i>
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
OFL :	Ofloxacin
Pdb :	Paire de base
PCR :	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PIT :	Primo-Infection Tuberculeuse
PNLT :	Programme National De Lutte Contre La Tuberculose
RFLP:	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>

RHEZ :	Rifampicine, Isoniazide, Ethambutol et Pyrazinamide
SIDA :	Syndrome de l'Immunodéficience Acquise
SM :	Streptomycine
TB:	Tuberculose
TBE :	<i>Tris-Borate-EDTA</i>
TDM:	TomoDensitoMétrie
TNF:	<i>Tumor Necrosing Factor</i>
TST:	<i>Tuberculine Skin Test</i>
µL	Microlitre
UPGMA :	<i>Unweigted Pair Group Method with Arithmetic mean.</i>
VIH :	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VNTR:	<i>Variable Number Tandem Repeat</i>
XDR:	<i>eXtreme Drug Resistance</i>

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Rapport sur le dépistage des cas de TB toutes forme confondues en 2020	10
Tableau II : Liste des 24 loci VNTR standards utilisés actuellement pour la technique MIRU-VNTR selon leur position chromosomique	26
Tableau III : Liste du matériel et leur utilisation	27
Tableau IV : Liste des réactifs et leur utilisation	28
Tableau V : Protocole de préparation du mélange réactionnel pour les réactions MIRU-VNTR.	30
Tableau VI : Programme d'amplification des MIRU-VNTR.	31
Tableau VII : Profil sociodémographique des souches sélectionnées	35
Tableau VIII : Diversité allélique du locus MIRU 04	42
Tableau IX : Diversité allélique du locus MIRU 40	42
Tableau X : Diversité allélique du locus VNTR 43	42
Tableau XI : Diversité allélique du locus VNTR 48.....	42
Tableau XII : Diversité génétique des souches du CMT au sein de la famille de spoligotype Uganda I	43
Tableau XIII : Profil MIRU-VNTR obtenu pour l'ensemble des 40 souches.....	44
Tableau XIV : Indice discriminatoire de la technique MIRU-VNTR utilisant les loci MIRU 04, MIRU 40, VNTR 43 et VNTR 48	45
Tableau XV : Taux de clustérisation au sein de la population d'étude.....	47

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Formation et progression histologique du granulome lors d'une infection à <i>M. tuberculosis</i>	5
Figure 2: Coupe Tomo Densito Métrie (TDM), A- TDM axiale montrant l'adénopathie sous-carinaire fissurée dans le tronc intermédiaire, B- TDM axiale en fenêtre osseuse montrant un complexe ganglio-pulmonaire calcifié.....	6
Figure 3: Stades d'évolution de la tuberculose après infection par <i>Mycobacterium tuberculosis</i> TST - Tuberculin Skin Test, IGRA – Interferon Gamma Release Assay.	7
Figure 4: Répartition géographique de la tuberculose en 2020.....	8
Figure 5: Taxonomie des Mycobactéries	11
Figure 6: Carte circulaire du chromosome de <i>M. tuberculosis</i> souche H37Rv.....	14
Figure 7: Images radiographiques d'un poumon sain (A), d'une tuberculose (B), image cavitaire apicale droite et des micronodules en coupe tomodensitométrie (TDM) (C), scanner de la bronche de drainage (D).....	17
Figure 8: Frottis faisant apparaître des BAARs par : (A) coloration à l'Auramine O de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (microscopie à fluorescence x1000) ou (B) selon la méthode de Ziehl-Nelsen (microscopie optique x1000),	18
Figure 9: Colonies des mycobactéries sur milieu de Löwenstein Jensen. Source	19
Figure 10 : Électrophorèses sur gel d'agarose avec le locus MIRU 04	36
Figure 11: Électrophorèses sur gel d'agarose avec le locus MIRU 40	38
Figure 12: Électrophorèses sur gel d'agarose avec le locus VNTR 43.....	40
Figure 13: Électrophorèses sur gel d'agarose avec le locus VNTR 48.....	41
Figure 14: Dendrogramme présentant la relation génétique entre les 40 souches utilisées....	46
Figure 15: Répartition des différents profils MIRU-VNTR dans les sub-clusters.....	47

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Clairance éthique accordée au projet CANTAM I.....	A
Annexe 2 : Tableau des résultats des MIRU VNTR.....	C
Annexe 3 : Tableau présentant la répartition de la population d'étude selon la résistance antituberculeux	D
Annexe 4 : Tableau présentant des dénominations de chaque sub-cluster et leurs proportions respectives.	D

RÉSUMÉ

La tuberculose (TB) est une maladie infectieuse provoquée par la mycobactérie du genre *Mycobacterium*. Elle représente l'une des menaces les plus graves pour la santé humaine. Le présent travail de recherche avait pour objectif d'étudier la diversité génétique au sein de la famille de spoligotype Uganda I parmi les souches du complexe *Mycobacterium tuberculosis* collectées lors du projet CANTAM I par la technique du MIRU-VNTR. Pour réaliser cette étude, 40 souches du CMT issues du projet CANTAM I ont été sélectionnées par convenance. Parmi ces souches, 40% provenaient des femmes (dont 70% séropositives au VIH) et 60% des hommes (dont 30% positifs au VIH). Un taux de résistance aux antituberculeux de 5% a également été noté et tous provenaient des patients de sexe féminin. Après avoir réactivé ces souches, une extraction et une amplification des ADN cibles, une détermination de la taille des amplicons a été faite par la technique de **Supply**. La diversité allélique, la diversité génétique et l'indice de discrimination ont été calculés et un dendrogramme a été généré à l'aide de l'application web *MIRU-VNTRplus*. Les diversités alléliques obtenues étaient de $h = 0$ pour le MIRU 04 qui est monomorphe ; $h = 0,49$ pour le MIRU 40, $h = 0,39$ pour le VNTR 43 et $h = 0,40$ pour le VNTR 48 qui sont de ce fait polymorphes. Les analyses moléculaires ont présenté une diversité génétique moyenne d'une valeur de 42% au sein de la famille de spoligotype Uganda I avec les quatre loci utilisés (MIRU 04, MIRU 40, VNTR 43, VNTR 48). Un taux de clustérisation de 87,5% et un indice discriminatoire de 75,9% ont également été obtenus. L'arbre phylogénétique généré a donné douze sub-clusters au sein desquels étaient répartis sept grappes constituées de 35 souches et de 5 autres cas isolés présentant des génotypes uniques. Les cas de résistance aux antituberculeux enregistrés étaient répartis dans des sub-clusters différents et par conséquent n'étaient pas liés. Il en ressort qu'il existe bel et bien une variabilité génétique au sein de la famille de spoligotype Uganda I du complexe *Mycobacterium tuberculosis*. Toutefois, le taux de discrimination observé entre les souches du spoligotype Uganda I de la famille Cameroun peut davantage être élevé en augmentant le nombre de loci les plus discriminants investigués.

Mots clés: tuberculose, spoligotype Uganda I, diversité génétique, MIRU-VNTR, projet CANTAM I.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is an infectious disease caused by a mycobacterium of the genus *Mycobacterium*. It represents one of the most serious threats to human health. The objective of the present research was to study the genetic diversity within the spoligotype family Uganda I among the strains of *Mycobacterium tuberculosis* complex collected during the CANTAM I project using the MIRU-VNTR technique. To carry out this study, 40 strains from the CANTAM I project were selected by convenience. Amongst these isolates 40% came from women (of which 70% were positive to HIV) and 60% from men (of which 30% were positive to HIV). A resistance rate to anti-tuberculosis drugs of 5% was noted and came from patients of the female gender. After reactivation and extraction of the selected stains, amplification of the target DNAs and determination of the sizes of the amplicons was done by the technique of Supply. Allelic diversity, genetic diversity and the discriminatory index of the technique were calculated and a dendrogram was generated using the web application MIRU-VNTRplus. With the four loci used (MIRU 04, MIRU 40, VNTR 43, VNTR 48), allelic diversities obtained were $h = 0$ for MIRU 04 which is monomorphic; $h = 0.49$ for MIRU 40; $h = 0.39$ for VNTR 43 and $h = 0.40$ for VNTR 48, which are therefore polymorphic. Molecular analysis showed an average genetic diversity of a value of 42% within the Uganda I spoligotype family. A clusterisation rate of 87.5% and a discriminatory index of 75.9% were also obtained. The phylogenetic tree generated gave twelve clusters within which were distributed seven sub-clusters consisting of 35 isolates and 5 other isolated cases with unique genotypes. It was also noticed that cases of resistance to antituberculosis drugs were dispersed in different sub-clusters, thus were not linked. This shows that genetic variability does exist within the Uganda I spoligotype family of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. However, the observed discriminatory index between strains of the Uganda I spoligotype may be increased by increasing the number of the most discriminating loci investigated.

Key words: *tuberculosis*, Uganda I spoligotype, genetic diversity, MIRU-VNTR, CANTAM I project.

INTRODUCTION

La tuberculose est une maladie infectieuse et contagieuse causée par les bactéries du complexe *Mycobacterium tuberculosis*. Elle reste actuellement une priorité de santé publique à l'échelle mondiale et fait l'objet d'un programme propre de l'OMS (OMS, 2019). Elle s'inscrit dans le registre de maladies dont les causes de l'échec de la réponse de traitement sont notamment la longue période de traitement (minimum 6 mois), la grande quantité de médicaments administrés (association de quatre antituberculeux) responsable du non-respect des recommandations thérapeutiques (Yombi et Olinga, 2015).

L'incidence mondiale de la tuberculose reste alarmante avec environ 10 millions de cas et 1,2 millions de décès. L'incidence des cas de tuberculoses multi-résistantes aux médicaments était estimée à 0,5 millions (OMS, 2020). Selon les estimations de l'OMS, chaque année un quart des cas de décès dû à la tuberculose provient de l'Afrique. La réduction mondiale du nombre total de décès dû à la tuberculose entre 2015 et 2018 a été de 11%, soit moins d'un tiers de l'objectif intermédiaire fixé dans la stratégie pour mettre fin à la tuberculose qui consiste à parvenir à une réduction de 35% d'ici 2020 (OMS, 2019). Le Cameroun est un pays à forte incidence de tuberculose (Nolna *et al.*, 2016) et la situation reste tout aussi préoccupante, avec 24582 cas de tuberculose toute forme confondue, 177 cas de tuberculose multi-résistante et un taux de co-infection TB-VIH de 25% selon le Programme National de Lutte contre la Tuberculose (PNLT, 2021). L'intensification de la tuberculose est favorisée par la co-infection Tuberculose-VIH ; l'émergence de nouvelles souches infectieuses ; la recrudescence de la résistance (500,000 nouveaux cas), surtout de la multi-résistance (78% de ces 500 miles nouveaux cas) et de l'ultra-résistance aux antituberculeux les plus efficaces (OMS, 2019).

Le diagnostic de la tuberculose repose sur la microscopie à la coloration de Ziehl-Neelsen, une technique peu sensible et moins spécifique et la culture. La culture permet de définir les caractéristiques phénotypiques des bacilles tuberculeux mais par contre exige un temps assez long pour donner un résultat définitif. Ainsi, le recours à des outils de diagnostic de biologie moléculaire notamment les tests de typage du CMT avec des méthodes fiables et discriminantes telles que : le RFLP, le spoligotypage et le *MIRU-VNTR* s'avèrent indispensables pour lutter efficacement contre l'expansion de la maladie et l'amélioration de la santé des populations. Ces méthodes permettent de recueillir des informations de nature différentes sur la caractéristique épidémique et sur la diversité génétique du pathogène en cause dans différentes populations. Cela facilite ainsi la prise en charge des éclosions en temps réel dans les communautés touchées (Assam *et al.*, 2011).

Plusieurs travaux effectués au Cameroun grâce à l'appui des organismes internationaux ont permis de montrer l'existence d'une diversité au sein des souches du complexe *Mycobacterium tuberculosis* dans les différentes régions investiguées. La majorité de ces travaux conduit par la technique du spoligotypage, ont montré une prédominance de la famille Cameroun (*share Type 61*) à près de 35% des souches responsables de la tuberculose et une forte régression de *M. africanum* (Niobe-Eyangoh *et al.*, 2003 ; Assam *et al.*, 2013 ; Koro *et al.*, 2013 ; Sidze *et al.*, 2013). Dans le cadre d'une coopération avec les organismes internationaux, l'Université de Yaoundé I à travers le Laboratoire de Recherche sur la Tuberculose et Pharmacologie (LTRP), du Centre de Biotechnologie de Nkolbisson (CBN), a bénéficié d'un financement de *European and Developing Countries Clinical Trials Partnership* (EDCTP) à travers le réseau *Central African Network For Tuberculosis-AIDS and Malaria* (CANTAM) nommé projet CANTAM I. Ce partenariat a été réalisé dans le but d'accroître les efforts de la recherche clinique par le typage moléculaire en vue des essais cliniques avec les nouveaux médicaments. Ces travaux ont conduit à la prédominance de la famille LAM10, suivi de la famille Haarlem ST50 et ensuite Uganda I. Sachant que toute stratégie de lutte contre la tuberculose doit reposer sur une appréciation approfondie du pathogène en cause, dont l'objectif ultime a toujours été d'éradiquer la menace principale. Aucune étude n'est allée à la suite du projet CANTAM I dans le but de se pencher sur l'hypothèse qu'il existe une diversité au sein de la famille Uganda I parmi les souches du CMT collectées au cours de ce projet. Étudier cette diversité génétique s'avère prévisionnel dans la surveillance et le contrôle de l'efficacité thérapeutique.

QUESTION DE RECHERCHE

Existe-t-il une diversité génétique au sein de la famille de spoligotype Uganda I parmi les souches du complexe *Mycobacterium tuberculosis* collectées lors du projet CANTAM I ?

HYPOTHÈSE DE RECHERCHE

Il existe une diversité génétique des souches du complexe *Mycobacterium tuberculosis* au sein de la famille Uganda I collectées lors du projet CANTAM I.

OBJECTIFS DE RECHERCHE

OBJECTIF GÉNÉRAL

L'objectif général de ce travail était d'étudier la diversité génétique au sein de la famille de spoligotype Uganda I parmi les souches du complexe *Mycobacterium tuberculosis* collectées lors du projet CANTAM I.

OBJECTIFS SPÉCIFIQUES

Les objectifs spécifiques de ce travail sont :

1. Déterminer la diversité génétique au sein de la famille de spoligotype Uganda I par la technique du *MIRU-VNTR* ;
2. Évaluer le pouvoir discriminant de cette technique par la détermination de l'indice de Hunter-Gaston et le calcul du taux de clustérisation.

CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTÉRATURE

I.1. GÉNÉRALITÉS SUR LA TUBERCULOSE

I.1.1. Définition

La tuberculose (TB) est une maladie infectieuse provoquée par une mycobactérie (*Mycobacterium tuberculosis*) qui se transmet par voie aérienne aussi bien aux enfants qu'aux adultes. Elle touche le plus souvent les poumons mais atteint aussi parfois d'autres organes et peut évoluer vers la mort si elle n'est pas traitée. (OMS, 2021).

I.1.2. Pathogénèse et évolution de la tuberculose

La transmission de la tuberculose a lieu d'un malade contagieux à une personne saine par voie aérienne. La bactérie pénètre dans l'organisme par les poumons où elle se développe éventuellement plus tard pour donner forme à la tuberculose pulmonaire, ce qui dépend des conditions de vie de l'hôte, de son âge, de son état de santé (infection à VIH, thérapie immunosuppressive). La contamination se fait par inhalation des sécrétions bronchiques de 1-5 µL projetées dans l'air par un malade contagieux (toux, éternuement ou crachat). Chaque gouttelette peut contenir de 1 à 10 cellules bactériennes (Bemba, 2016). Le risque de contamination dépend de la concentration des mycobactéries, de la virulence des bacilles, de la durée d'exposition et de l'état du système immunitaire de la personne en contact du bacille. La dose infectante minimale chez l'homme est de 10 bacilles. Une personne infectée (surtout les enfants) à 5-10% de risque en deux ans de développer la maladie contre 10% annuel dans le cas des personnes infectées par le VIH (Ramachandran *et al.*, 2000; Nakaoka *et al.*, 2006).

Le développement de la maladie évolue en trois étapes : la primo-infection, la tuberculose latente et la tuberculose active. Après inhalation par une personne saine, les bacilles atteignent les alvéoles pulmonaires et peuvent se multiplier. Le système immunitaire active ses cellules de défense pour contenir l'infection. Les bacilles sont phagocytés par les macrophages alvéolaires, suivant une réaction immunitaire innée, mais certains bacilles ne sont pas détruits et restent à l'état dormant. La multiplication des cellules bactériennes engendre la lyse du macrophage et la libération des bacilles qui seront à leur tour phagocytés par d'autres macrophages avec formation d'un foyer infectieux primaire. Les macrophages infectés produisent immédiatement des cytokines comme le TNF- (Tumor Necrosis Factor alpha), l'interféron gamma (IFN- γ) et l'interleukine12 (IL12) qui attirent les lymphocytes T avec production d'une réponse immunitaire lente (Cooper, 2009). Les lymphocytes T activés prolifèrent, exercent leur activité bactériostatique ou bactéricide et migrent vers le poumon pour

s'accumuler sur le site d'infection et former un granulome. Le granulome est ainsi constitué de macrophages alvéolaires détruits ou regroupés, de lymphocytes et d'une couronne fibroblastique (Figure 1).

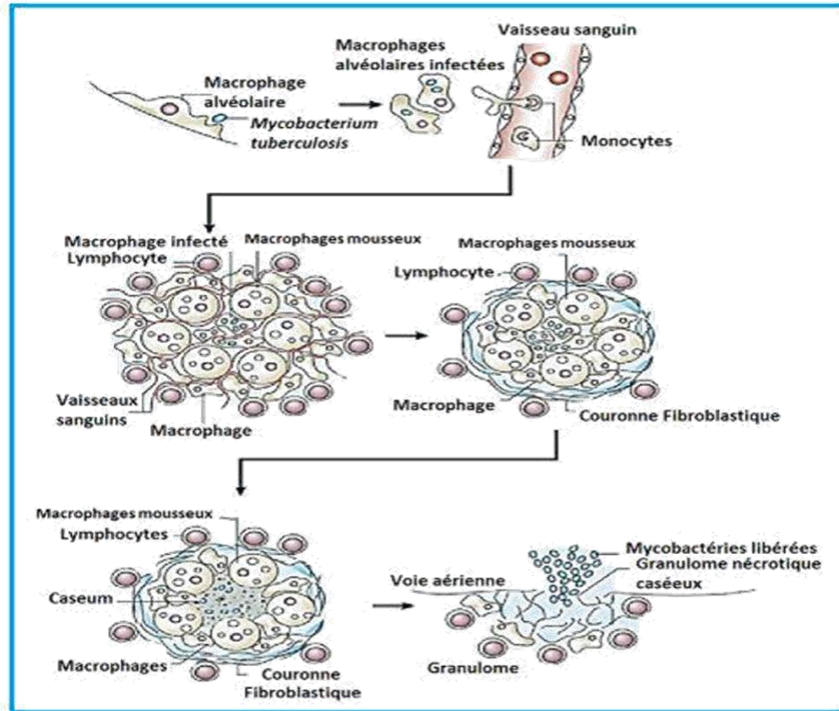


Figure 1: Formation et progression histologique du granulome lors d'une infection à *M. tuberculosis* (Russell *et al.*, 2009).

I.1.2.1 Primo-infection tuberculeuse

La primo infection tuberculeuse ou tuberculose primaire correspond aux manifestations cliniques (parfois asymptomatiques), biologiques et radiologiques observées à la suite du premier contact entre l'homme et le bacille. Les manifestations cliniques d'ordre symptomatique sont caractérisées par une altération générale associée à une toux. La tuberculose primaire peut s'accompagner d'un érythème noueux sous forme de nodule rouge situées dans le derme ou l'épiderme. Que la primo infection soit symptomatique ou asymptomatique, le virage de la réaction tuberculinique (test Intradermique Réaction,-IDR positif) et la positivité du test IGRA (Interféron-Gamma Release Assay) est la seule preuve de primo infection tuberculeuse (Barben *et al.*, 2012). La primo infection est aussi caractérisée par des anomalies radiologiques telles qu'une adénopathie médiastinale (Figure 2A) suivie

d'une opacité nodulaire du chancre d'inoculation formant un complexe ganglio-pulmonaire qui sera ultérieurement calcifié (Figure 2B).

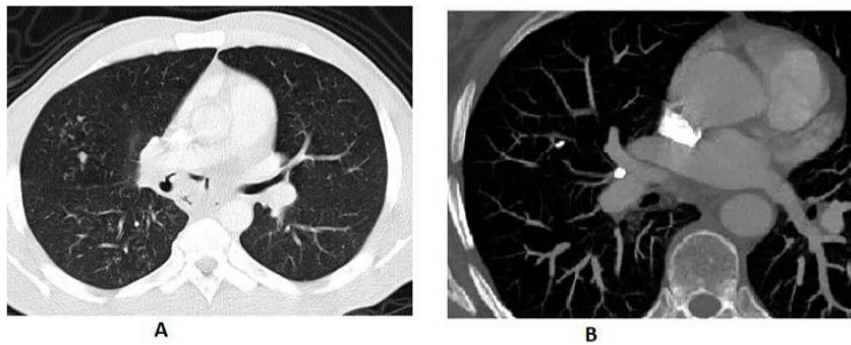


Figure 2: Coupe Tomo Densito Métrie (TDM), A- TDM axiale montrant l'adénopathie sous-carinaire fissurée dans le tronc intermédiaire, B- TDM axiale en fenêtre osseuse montrant un complexe ganglio-pulmonaire calcifié. (Carette *et al.*, 2012).

I.1.2.2. Tuberculose latente ou dormante

La tuberculose latente est la forme dormante de la maladie sans manifestation de signes cliniques accompagnée d'une absence d'anomalies sur la radiographie thoracique et une réponse positive aux tests immunologiques IDR et IGRA. La tuberculose « latente » ou « dormante » est très répandue: 1/3 de la population mondiale serait infectée par le bacille (Trajman *et al.*, 2013). A ce stade le système immunitaire, première défense de l'organisme, d'une part détruit les bactéries et d'autre part empêche leur prolifération dans les alvéoles pulmonaires. Les personnes ayant une infection latente n'ont aucun symptôme et ne sont pas contagieuses. Lorsque le système immunitaire s'affaiblit, le risque de multiplication des bactéries s'accroît entraînant l'évolution de la maladie vers une tuberculose active suivie de ses symptômes typiques (Trajman *et al.*, 2013).

I.1.2.3. Tuberculose active

La tuberculose active se définit comme l'activation, la multiplication et la propagation des bacilles tuberculeux dans l'organisme lorsque le système immunitaire du sujet infecté est défaillant. Seules 10% des personnes infectées par *Mycobacterium tuberculosis* et qui n'ont pas été traitées pour une tuberculose latente développeront une tuberculose maladie au cours de leur vie (Vynnycky *et Fine*, 2000). Le sujet infecté présente des signes cliniques tels qu'une toux persistante (>3 semaines), une douleur thoracique ou une difficulté respiratoire, des expectorations parfois teintées de sang, la fatigue, la fièvre, l'amaigrissement et des transpirations nocturnes (Figure 3 phase 1). La transition d'une tuberculose latente vers une

tuberculose active passe par un stade sub-clinique où la culture est occasionnellement positive avec une bascoscopie négative (Figure 3).

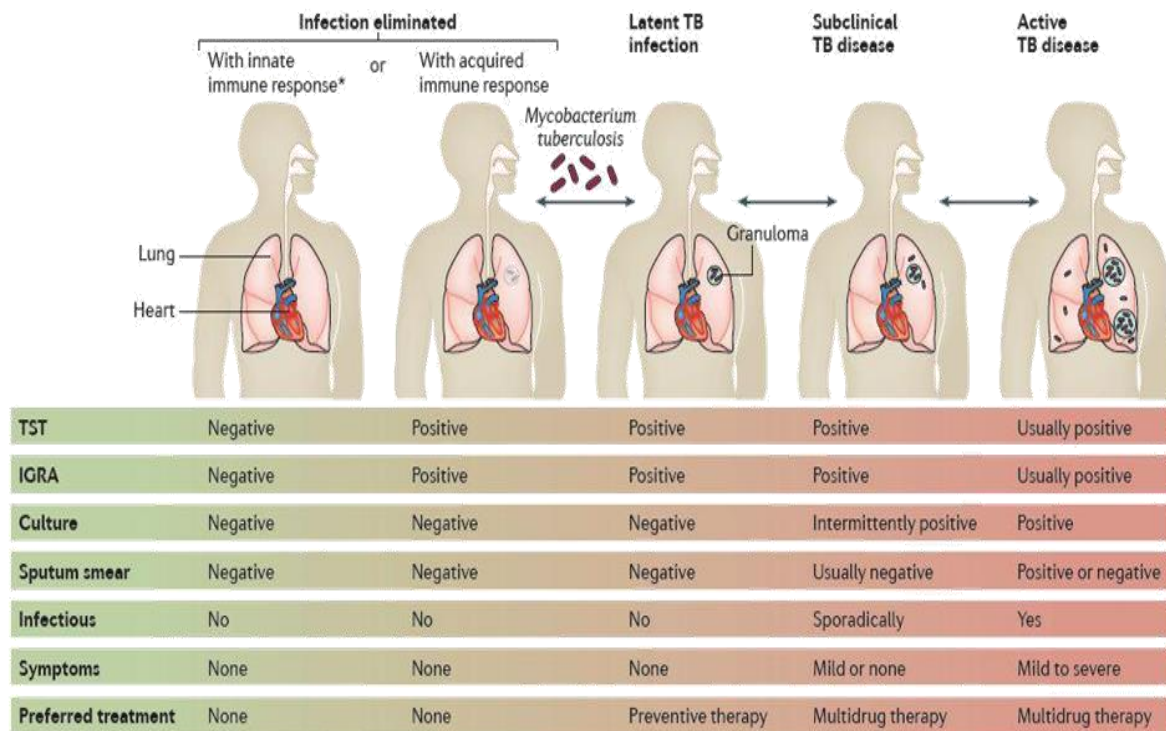


Figure 3: Stades d'évolution de la tuberculose après infection par *Mycobacterium tuberculosis* (Pai et al., 2016). TST - Tuberculin Skin Test, IGRA – Interferon Gamma Release Assay.

I.1.2.4. Tuberculose extra-pulmonaire

Bien que le système pulmonaire soit la localisation la plus fréquente de la tuberculose, une maladie extra-pulmonaire survient chez plus de 20% des patients immunocompétents, et le risque de maladie extra-pulmonaire augmente avec l'immunosuppression et chez le tout jeune enfant. Tous les organes peuvent être atteints. La localisation la plus fréquente est ganglionnaire cervicale. Les autres localisations possibles sont : méningée, péricardique, pleurale, ostéo-articulaire, génito-urinaire, péritonéale, etc. (Billy et Perronne, 2004).

I.1.3. Épidémiologie de la tuberculose

I.1.3.1. Épidémiologie mondiale

Au total, 1,5 millions de personnes sont mortes de tuberculose en 2020 (dont 214,000 présentaient une co-infection au VIH). À l'échelle mondiale, la tuberculose est la 13^e cause de mortalité et la 2^e due à une maladie infectieuse, derrière la COVID-19 et devant le SIDA (OMS,

2020). Selon les estimations, 9,9 millions de personnes ont développé la tuberculose dans le monde. Cela concerne 5,5 millions d'hommes, 3,3 millions de femmes et 1,1 million d'enfants. La tuberculose est présente dans tous les pays et toutes les tranches d'âge. Cependant c'est une maladie que l'on peut éviter et soigner (OMS, 2021).

Parmi tous les nouveaux cas de tuberculose enregistrés en 2020, 86% sont survenus dans les 30 pays présentant la plus forte charge de la maladie. Deux tiers des cas sont concentrés dans huit pays, avec l'Inde en tête, suivie de la Chine, de l'Indonésie, des Philippines, du Pakistan, du Nigéria, du Bangladesh et de l'Afrique du Sud (Figure 4). L'incidence de la tuberculose régresse d'environ 2% par an à l'échelle mondiale. La baisse cumulée entre 2015 et 2020 se chiffre à 11% soit un peu plus de la moitié de la cible fixée dans la stratégie pour mettre fin à la tuberculose qui visait une réduction de 20% entre 2015 et 2020. On estime que le diagnostic et le traitement de la tuberculose ont permis de sauver 66 millions de vies entre 2000 et 2020 (OMS, 2021).

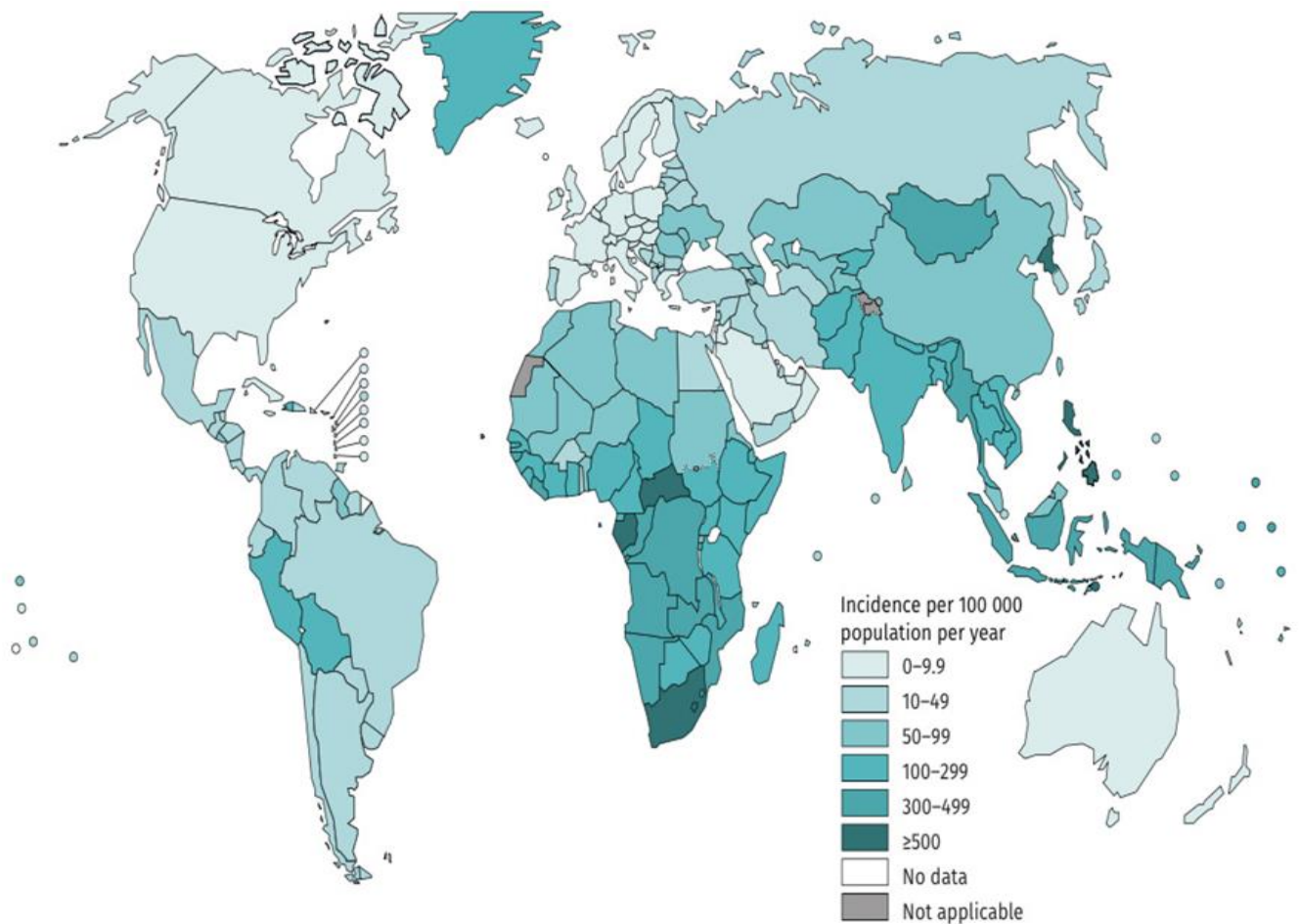


Figure 4: Répartition géographique de la tuberculose en 2020 (OMS, 2021).

I.1.3.2. Épidémiologie de la tuberculose en Afrique

La continent Africain a réalisé des progrès contre la tuberculose, en réduisant le nombre de cas de 19% entre 2015 et 2020, ce qui reflète un déclin de 4% à 10% par an en Afrique du Sud et dans plusieurs autres pays d'Afrique Australe. Néanmoins, la région a signalé 549,000 décès en 2020, ce qui représente une augmentation d'environ 2000 décès en 2019 (**OMS, 2020**).

L'Afrique abrite 17 des 30 pays les plus fortement touchés par la tuberculose dans le monde et la tendance observée dans la région fait suite à une augmentation des cas de tuberculose dans le monde due aux effets de la COVID-19 (**OMS, 2020**).

La TB est la principale cause de mortalité chez les personnes vivant avec le VIH et l'Afrique à la charge la plus élevée de tuberculose associée au VIH. Plusieurs autres facteurs, parmi lesquels figurent le financement insuffisant des programmes, l'accès limité aux outils modernes de diagnostic et la mise en œuvre à faible échelle des traitements préventifs freinent le progrès contre la tuberculose (**OMS, 2020**). Sur le continent, le Nigeria, l'Afrique du Sud mais aussi la République démocratique du Congo, avaient pour la première fois plus de 2000 cas détectés en 2020, sont les pays les plus touchés (**OMS, 2020**).

I.1.3.3. Épidémiologie de la tuberculose au Cameroun

La tuberculose constitue un sérieux problème de santé au Cameroun. En effet, le taux d'incidence estimé par l'OMS est de l'ordre de 179 nouveaux cas pour 100,000 habitants (**OMS, 2020**) avec une moyenne en valeur absolue de 46,000 nouveaux cas attendus par an, dont 10% pour la tuberculose pédiatrique. La tendance de l'incidence a diminué de 16% entre 2015 et 2019 (**PNLT, 2021**).

Les cas de tuberculose notifiés au Cameroun sont pris en charge dans le cadre du PNL. En fin d'année 2020, 22492 cas de tuberculose toutes formes confondues ont été notifiés (Tableau I) et mis sous traitement dans les 280 CDT que comptent notre pays. Les deux villes (Yaoundé et Douala) et la région de l'Extrême-nord notifient 47% des cas de TB. On note une disponibilité des médicaments de ligne 1 qui sont acquis chaque année par le budget de l'État (**PNLT, 2021**).

En dépit d'une certaine volonté politique et des efforts conjugués du programme et des partenaires nationaux et internationaux, le pays n'est pas arrivé à améliorer sa notification qui se limite à environ 50% de l'ensemble des cas attendus. La problématique de la sous notification est valable tant pour les cas sensibles que pour les cas résistants. Les difficultés d'accès aux services (barrière géographique et financière), la pauvreté, le manque d'éducation, la déperdition des patients entre les services (laboratoires, clinique et suivi) et aussi les troubles

socio-politiques ayant causé une interruption des services publics semblent constituer les facteurs qui entretiennent la sous-notification des cas. Cependant, le taux de succès du traitement a nettement progressé aux cours des années précédentes de 77% en 2010 à 86% en 2019 (cohorte 2019) (PNLT, 2021).

Le programme poursuit la modernisation du diagnostic de la TB à travers les CDT et les laboratoires de référence. A ce jour, 34 machines GeneXpert et 34 machines TB Lamp ont été acquises et sont disponibles pour assurer le diagnostic moléculaire de la TB. Un système de transport des échantillons de crachats vers les CDT et les laboratoires disposant d'un de ces outils dans les différentes régions existe et est bien organisé (PNLT, 2021).

Tableau I : Rapport sur le dépistage des cas de TB toutes forme confondues en 2020 (PNLT, 2021)

Rapport annuel sur le dépistage des tuberculeux					Année	2020	
	TPB+				TPB-	TEP	Total
	Nv. cas	Rechute	Echec	Reprise			
Total pays	13624	984	109	327	4087	3361	22492
Adamaoua	852	19	12	10	367	300	1560
Centre	874	48	2	22	407	107	1460
Yaoundé	1801	128	13	52	513	849	3356
Est	1018	31	8	16	411	125	1609
Extrême-Nord	2212	100	17	20	618	282	3249
Littoral	386	44	7	18	122	60	637
Douala	2179	286	10	108	563	751	3897
Nord	1711	121	18	29	340	171	2390
Nord-Ouest	550	48	4	23	144	197	966
Ouest	645	40	7	8	298	156	1154
Sud	693	63	1	9	109	66	941
Sud-Ouest	703	56	10	12	195	297	1273

I.1.3.4. Épidémiologie moléculaire

L'étude des souches de *Mycobacterium tuberculosis* en circulation dans des régions géographiques précises à l'aide de méthodes moléculaires est importante pour l'éradication de la tuberculose. Des recherches sur la diversité génétique du MTC ont déjà été menées dans plusieurs pays. Une étude a été menée en province du Centre Sri Lanka (pays situé en Asie accueillant un grand nombre d'immigrés venant de la Chine de l'Inde et du Bangladesh) par la méthode de MIRU-VNTR, cette étude a révélé que les 06 classes majeures en circulation dans cette zone sont : 39,33% EAI, 20% Haarlem, 8,6% Beijing, 6,5% famille T d'Europe centrale, 5,2% famille X européenne et 0,6% CAS Delhi (Weerasekera *et al.*, 2019). En Afrique du Sud plus précisément en Limpopo les résultats de l'étude par spoligotypage ont révélé que les souches en circulation dans cette zone sont : 14% Beijing, 7% LAM3, 5,1% T1 et 2,8% LAM4 (Maguga-pasha *et al.*, 2017). Au Cameroun, dans les régions du Sud, de l'Ouest et du Nord-Ouest le même type d'étude a été mené en utilisant la méthode de spoligotypage et de MIRU-VNTR. Les résultats de cette étude montrent que les souches en circulation dans ces zones sont : 34,4% LAM-10, 26,7% T1 et 7,6% Harleem3 (Assam *et al.*, 2013).

I.2. LE COMPLEXE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* (CMT)

I.2.1. Taxonomie et classification du CMT

Le CMT est un groupe d'espèces de bactéries appartenant au règne des Bactéries, à l'ordre des *Actinomycetales*, au sous ordre *Corynebacterinae*, à la famille des *Mycobacteriaceae* et au genre *Mycobacterium* (Figure 5) (Garrity *et al.*, 2004).

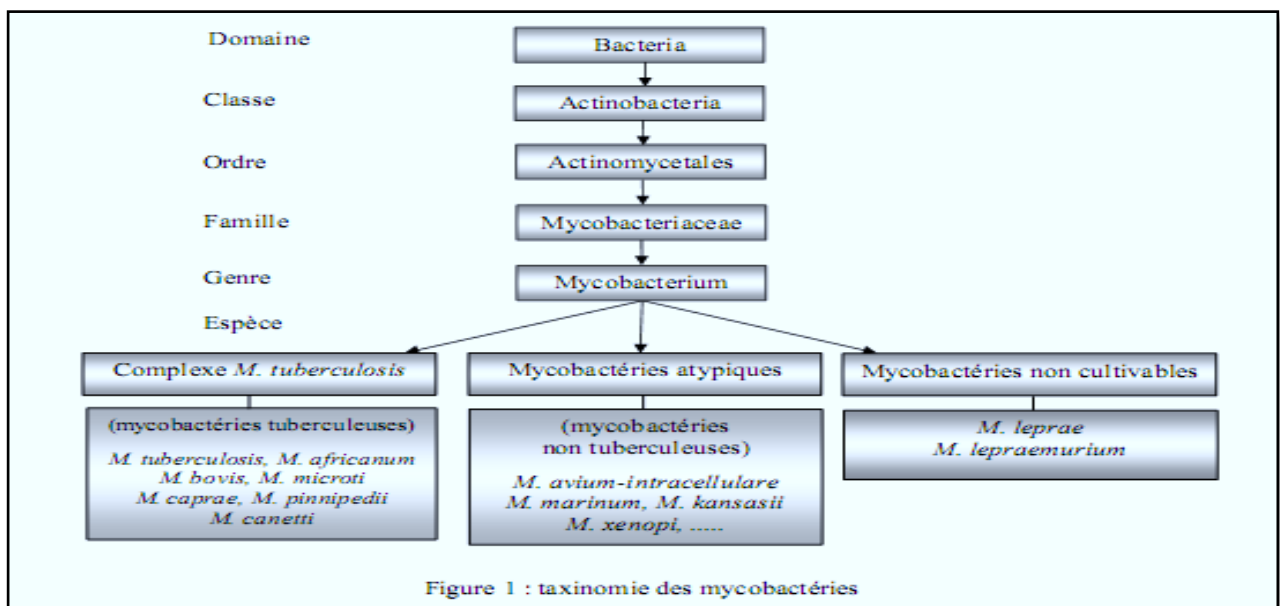


Figure 5: Taxonomie des Mycobactéries (Shinnick *et al.*, 1994).

Ce genre regroupe actuellement plus de 120 espèces différentes (**Shinnick, 1994; Tortoli, 2006**), classées en :

- Les Mycobactéries tuberculeuses ou Mycobactéries du complexe *Mycobacterium tuberculosis* encore dites Mycobactéries typiques responsables de la tuberculose humaine ou animale et regroupe principalement :
 - *Mycobacterium tuberculosis* : est la première espèce du complexe décrite par Robert Koch en 1882. C'est la bactérie la plus souvent impliquée dans la tuberculose humaine (dans 70% des cas). En milieu de culture solide, les colonies de *M. tuberculosis* présentent un aspect rugueux, sec en forme de chou-fleur. Ces bacilles mesurent entre 2 et 4 µm de long et entre 0,3 et 0,5 µm de large ; cependant, il est occasionnellement observé des cellules plus courtes ou plus longues (**Hoffmann et al., 2008**).
 - *Mycobacterium africanum* : Décrit pour la première fois en 1968, à partir d'un isolement réalisé au Sénégal chez un patient atteint de tuberculose pulmonaire, *M. africanum* est fréquemment responsable de tuberculose chez les patients vivant en Afrique sub-saharienne ou originaires de là (**Castets et al., 1968**). Au Cameroun, les premières études dans la ville de Yaoundé ont estimé que 56% des cas de tuberculose pulmonaire étaient dus à *M. Africanum* (**Huet, 1971**) .Il existe 2 variantes majeures de *M. africanum* :
 - La variante africaine I, principalement d'origine Ouest Africaine est nitratase négative ; ses colonies en milieu solide ressemblent à celles de *M. bovis* mais présentent moins de préférence au pyruvate ;
 - La variante africaine II, d'origine Est Africaine est nitratase positive ; ses colonies sur milieu solide ressemblent à celles de l'espèce *M. tuberculosis* (**Castets et al., 1968**).
 - *Mycobacterium bovis* : différencié pour la première fois de *M. tuberculosis* par Théobald Smith en 1896 par sa vitesse de croissance et sa pathogénicité pour le lapin, *M. bovis* est le principal agent de la tuberculose bovine. *M. bovis* entraîne chez les bovins les lésions tuberculeuses pulmonaires et dans 10% des cas des lésions des glandes mammaires avec passage du bacille dans le lait. La transmission chez l'Homme se fait par voies digestive et aérienne. Les bacilles de *M. bovis* sont généralement plus courts que ceux de *M. tuberculosis* et habituellement disposés en amas. Ils ont une faible tendance à présenter les

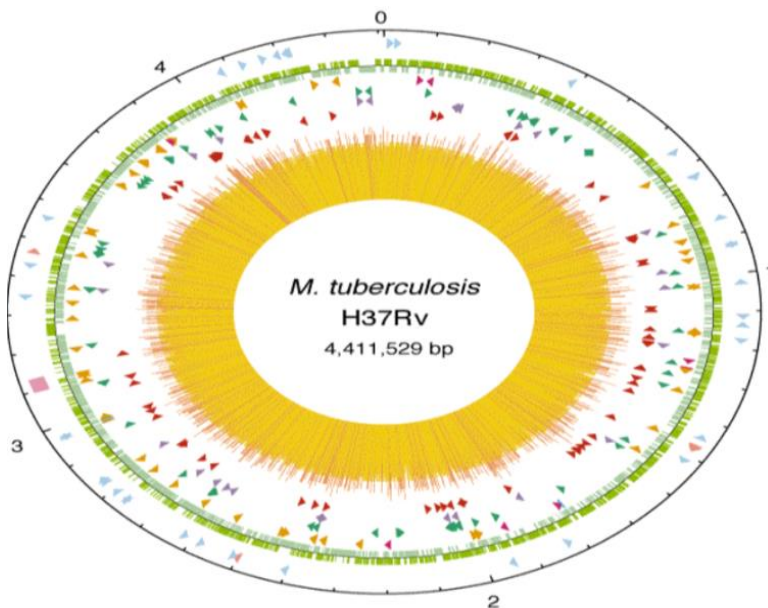
formations en chaînes. Les colonies sur milieux solides sont plates et lisses (**Norman et al., 1994**).

- *Mycobacterium canettii* : causant la tuberculose chez les hommes particulièrement chez ceux provenant ou ayant séjourné dans la corne d'Afrique. Isolé pour la première fois en 1969 par Canetti, chez un patient français d'origine rurale présentant une tuberculose pulmonaire cavitaire, *M. canetti* a été ajouté à la liste des organismes du complexe *M. tuberculosis* en 1997. Il présente des colonies lisses et à ce jour il existe peu d'informations sur son isolement (**Soolingen et al., 1997**).
- *Mycobacterium microti* : cette espèce est très largement répandue chez les rongeurs et rarement isolée des échantillons cliniques. Les quelques souches existantes en culture ont les caractéristiques de la variante africaine I de *M. africanum*. Les souches humaines ont été récemment caractérisées en utilisant de nouveaux marqueurs génétiques. (**Leao et al., 2004**).
- *Mycobacterium pinnipedi* : se retrouve en grande partie chez les pinnipèdes mais aussi chez d'autres animaux (exemple : le cochon, le lapin et le tapir). Il est également transmissible à l'Homme. Il fut décrit pour la première fois par Cousins en 2003 (**Cousins et al., 2003**).
- *Mycobacterium caprae* : les chèvres constituent le réservoir le plus fréquent de cette espèce, raison pour laquelle elle fut nommée de la sorte. *M. tuberculosis subsp. Caprae* a été identifié pour la première fois chez des chèvres en Espagne en 1999 (**Aranaz et al., 1999**).
- *Mycobacterium mungi* : récemment identifié chez les mangoustes du Botswana dont le lieu de vie est proche de celui des Hommes, *M. mungi* partagerait un ancêtre avec *Mycobacterium West Africa 2* (MWA2). Récemment découverte, seule une étude apporte des informations à cette nouvelle espèce du CMT (**Alexander et al., 2010**).
- Les Mycobactéries non tuberculeuses encore appelées Mycobactéries atypiques : sont la cause de mycobactérioses chez l'homme. Les mycobactérioses sont des infections opportunistes et non contagieuses. Les espèces les plus souvent identifiées dans le cas du SIDA sont : le groupe MAIC (*Mycobacterium Avium Intracellular Complex*). On distingue :
 - *Mycobacterium avium*

- *Mycobacterium intracellulare*
- *Mycobacterium kanasii*
- *Mycobacterium xenopi* (Bryant *et al.*, 2013).
- Les Mycobactéries non cultivables telles que les agents de la lèpre chez l'homme, les félins et le rat caractérisés par leur incapacité à être cultivés *in vitro*. On a:
 - *Mycobacterium leprae*
 - *Mycobacterium lepramurium* (Vakou, 2017; Deschaseaux, 2018).

I.2.2. Caractéristiques du génome de *M. tuberculosis*

Le génome de *M. tuberculosis* (souche de référence H₃₇Rv) a été entièrement séquencé et annoté. L'analyse a débuté en 1992 et s'est terminée en 1998 (Cole *et al.*, 1998). Le génome de *M. tuberculosis* H₃₇Rv consiste en un chromosome circulaire de 4 411 529 paires de bases (pdb) contenant environ 4000 gènes (50 gènes encodent des ARNr/ARNt et 3924 des protéines), 65% de GC et un grand nombre de séquences répétées (IS6110/MIRU-VNTR, etc...) (Figure 6). L'analyse de la séquence génomique a permis de mettre en évidence des particularités propres à *M. tuberculosis*. Ainsi, on observe que son acide désoxyribonucléique (ADN) présente une teneur élevée en guanine et cytosine (65,6% de GC) et qu'une grande partie des gènes (6% du génome) semblent coder pour des enzymes impliquées dans la synthèse et la dégradation des lipides. L'homologie entre les ADN des différentes sous-espèces du MTBC est très élevée (>99,9%) (Garnier *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2009) ce qui fait qu'il s'agit stricto sensu d'une seule espèce bactérienne.



Légende : 1, 2, 3 et 4 = différentes délimitations en millions de paires de bases ; coloration (orange, rouge, rose, bleue et verte) = séquences d'insertion, régions DR et MIRU-VNTR

Figure 6: Carte circulaire du chromosome de *M. tuberculosis* souche H37Rv (Cole *et al.*, 1998).

I.3. DIAGNOSTIC DE LA TUBERCULOSE

Le diagnostic précoce de la TB est important afin de limiter sa transmission interhumaine. Il est basé essentiellement sur les éléments suivants :

I.3.1. Diagnostic clinique

Le diagnostic de tuberculose sera privilégié pour les personnes en provenance d'une zone à forte prévalence de tuberculose, infectées par le VIH, ou encore sous traitement immunosuppresseur, ainsi que celles vivant dans l'entourage d'un patient tuberculeux. Néanmoins, quel que soit le contexte épidémiologique, l'altération de l'état général d'une personne avec perte de poids, asthénie, et fièvre modérée doit orienter le diagnostic vers une tuberculose, surtout si l'ensemble de ces signes persiste au-delà de trois semaines. Ces signes généraux peuvent aussi s'accompagner de manifestations respiratoires telles qu'une toux persistante et de plus en plus fréquente, une hémoptysie ou encore une dyspnée (**Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France, 2004**).

I.3.2. Diagnostic immunologique : l'intradermo-réaction (IDR) à la tuberculine - le test *Interferon Gamma Release Assay (IGRA)*

L'Intradermo-Réaction (IDR) ou test de Mantoux a été le premier test destiné à un diagnostic immunologique de la tuberculose latente ou active. Elle consiste en l'injection intradermique d'un volume de 0,1 mL de tuberculine (**Nayak et Acharjya, 2012**), dérivé protéinique purifié à partir de surnageant de culture de *M. tuberculosis*. La tuberculine qui contient plus de 200 antigènes partagés par *M. tuberculosis*, *M. bovis*, le BCG et certaines mycobactéries environnementales. L'IDR mesure la réponse cutanée *in vivo* due à la réaction inflammatoire, avec hypersensibilité retardée. Dans les heures suivant l'injection, il se produit un afflux de monocytes-macrophages, la formation de cellules géantes et l'afflux d'un grand nombre de lymphocytes T CD4+ qui crée une induration dermique. La lecture du diamètre d'induration se fait entre 48 et 72 heures après injection de la tuberculine (**Nayak et Acharjya, 2012**). Une IDR positive (diamètre supérieur à 5mm) traduit une infection à tuberculose latente ou déclarée chez un sujet présentant des défenses immunitaires normales, mais peut aussi être signe d'un antécédent de vaccination par le BCG, ou d'une infection à mycobactérie non tuberculeuse (**Nayak et Acharjya, 2012**). Une IDR négative traduit l'absence de contamination ou un état d'immunodépression (**Pai et O'Brien 2008**). La spécificité du test est de 70-90%, plus faible chez les personnes immunisées par le vaccin BCG (**Madhukar et al., 2006**). Ce test est encore très utilisé comme test de première intention en cas de suspicion de tuberculose.

Le test IGRA est un test sanguin qui aide au diagnostic de l'infection tuberculeuse, en mesurant la réaction immunitaire de l'hôte au *Mycobacterium tuberculosis*. Les lymphocytes T d'une personne infectée par le bacille libèrent l'interféron gamma (IFN- γ) au contact avec les trois antigènes (ESAT 6, CFP-10, Tuberculine 7,7) spécifiques de *Mycobacterium tuberculosis*. Deux tests sont commercialisés: le QuantiFERON (QFT-GIT) et le TB-SPOT (T-Spot). En pratique, les échantillons de sang sont mélangés avec les antigènes, avec un témoin négatif (tube sans antigène) et un témoin positif (tube avec mitogène stimulant de façon spécifique la production d'IFN- γ). Après plusieurs heures la concentration d'IFN- γ (QFT-GIT) ou le nombre de cellules productrices d'IFN- γ sont mesurées. Le résultat peut être positif, négatif ou indéterminé. Un test IGRA positif traduit une probable infection à *Mycobacterium tuberculosis*, qui peut être latente, en progression vers une tuberculose active, ou une récente exposition aux bacilles. Dans ce cas, il est nécessaire d'exclure l'hypothèse d'une tuberculose active par des examens cliniques, bactériologiques et radiologiques. La spécificité du test IGRA est de 90-100% même chez les personnes immunisées avec le vaccin BCG (**Madhukar et al., 2006**); ce test est donc plus efficace pour déterminer une infection à tuberculose (**Overton et al., 2018**). Malgré son coût élevé et sa complexité technique, il peut être utilisé en addition à l'IDR. Mais ce test n'est pas recommandé dans le diagnostic de la tuberculose latente chez l'enfant, les personnes infectées par le VIH et les agents de santé (**Hajoj et al., 2016**) dans les pays à revenu faible/intermédiaire et dans les zones à forte prévalence (**OMS, 2011**).

Le test IGRA comme l'IDR ne peuvent confirmer ou infirmer la maladie tuberculeuse en cas de suspicion radiologique ou clinique. Ces tests ne peuvent non plus confirmer ou exclure une tuberculose dans les cas cliniquement ou radiologiquement suspects. Ils ne permettent pas non plus de distinguer une infection tuberculeuse latente d'une tuberculose déclarée (**Madhukar et al., 2006**).

I.3.3. Diagnostique radiologique

L'examen de base lors d'une suspicion de tuberculose active est la radiographie thoracique. Lors de cet examen, trois types de lésions de morphologie et d'étendue variables, caractéristiques d'une tuberculose pulmonaire sont recherchées: les nodules, les infiltrats et les cavernes (figure 7). Ces lésions peuvent être associées. Les cavernes siègent au sein d'infiltrats alvéolaires ou macro nodules au niveau des segments supérieurs du poumon où la teneur en oxygène est élevée et favorable pour le bacille tuberculeux qui est aérobique (**Carette et al., 2012**).

Cependant un examen de radiologie positif à la tuberculose n'est pas suffisant pour confirmer la maladie, il doit être suivi d'un examen de bactériologie.

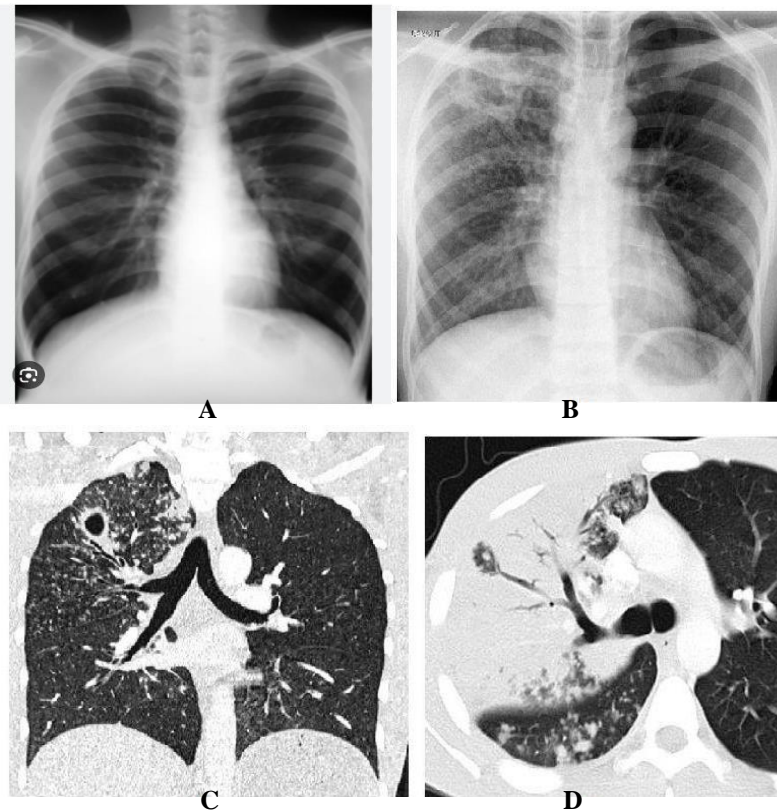


Figure 7: Images radiographiques d'un poumon sain (A), d'une tuberculose (B), image cavitaire apicale droite et des micronodules en coupe tomodensitométrie (TDM) (C), scanner de la bronche de drainage (D) (Carette *et al.*, 2012).

I.3.4. Diagnostique bactériologique

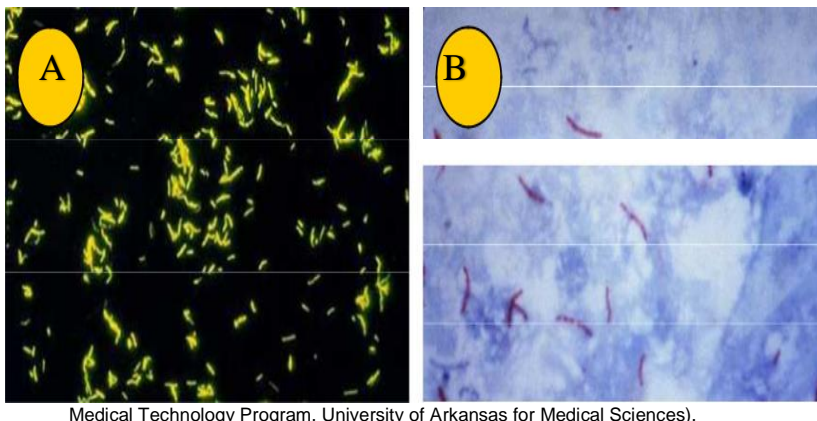
La mise en évidence de la présence de *M. tuberculosis* dans des prélèvements biologiques constitue le véritable diagnostic de tuberculose. En cas de tuberculose pulmonaire, les examens bactériologiques seront pratiqués avant tout traitement sur l'expectoration du malade trois jours de suite. Ils peuvent aussi être pratiqués sur des tubages gastriques (sécrétions bronchiques dégluties) ou des aspirations bronchiques. Pour les patients chez lesquels une localisation extra-pulmonaire de la tuberculose est soupçonnée, les prélèvements seront faits en fonction de la localisation de la maladie (Desikan, 2013).

I.3.4.1. L'examen direct : la bacilloscopie

La bacilloscopie est une méthode de diagnostic de la tuberculose basée sur un examen microscopique (fluorescent ou optique) direct des expectorations issues d'un malade tuberculeux. Cet examen est souvent le seul pratiqué dans les pays en développement de par sa

facilité d'accès, son efficacité et son faible coût. Il permet un diagnostic rapide avec une sensibilité moyenne (charge bacillaire minimale = 10000 organismes/mL de crachat (**Desikan, 2013**) pour la détection des sujets contagieux, ce qui aboutit à la mise en place précoce des mesures pour éviter la contagion. Mais la sensibilité de ce test est plus faible chez les personnes co-infectées par le VIH. L'examen requiert un prélèvement répétitif d'expectorations durant 3 jours sur lesquels on réalise un frottis coloré par la méthode de coloration de Ziehl-Neelsen (Figure 8B) ou fluorescente à l'auramine (microscopie fluorescent) (Figure 8A). Ces méthodes s'appuient sur les propriétés acido-alcool-résistantes des bacilles liées à la structure de leurs parois cellulaires. Cependant cet examen ne permet pas de différencier *Mycobacterium tuberculosis* des autres mycobactéries (**Akhtar et al., 2000**). Pour confirmer définitivement le diagnostic, la bactérie est isolée sur milieu de culture. De plus, cette méthode ne permet pas de détecter la présence de BAAR dans un prélèvement biologique pauci bacillaire puisqu'il a en effet été montré que l'examen direct ne détectait la présence de BAAR qu'à partir de 0,5 à 1,1 bactéries par microlitre de prélèvement biologique (**Saltini, 2006**).

Source: <http://ntcc.ucsd.edu> (Margaret A. Bartelt, Ph.D., MT (ASCP) SM, Diplomat A.B.M.M.,



Medical Technology Program, University of Arkansas for Medical Sciences).

Figure 8: Frottis faisant apparaître des BAARs par : (A) coloration à l'Auramine O de *Mycobacterium tuberculosis* (microscopie à fluorescence x1000) ou (B) selon la méthode de Ziehl-Nelsen (microscopie optique x1000), (Saltini, 2006**).**

I.4.4.2. La culture

Seule une culture des prélèvements pulmonaires ou extra-pulmonaires positive à *M. tuberculosis* constitue une preuve formelle du diagnostic d'une tuberculose. Celle-ci est pratiquée quel que soit le résultat de l'examen microscopique. Elle s'effectue, après une étape de décontamination par homogénéisation des prélèvements biologiques, sur milieu de culture enrichi, solide ou liquide. L'étape d'homogénéisation permet d'obtenir un prélèvement plus fluide et de décontaminer l'échantillon avant ensemencement des milieux de culture, afin que

des bactéries n'appartenant pas au genre *Mycobacterium* ne contaminent la culture. Si la mise en culture sur milieu de Löwenstein-Jensen (20-21 jours d'incubation) en constitue la méthode la plus couramment utilisée du fait de son faible coût et de sa grande sensibilité, les cultures sur milieux liquides (Middlebrook, 10-15 jours d'incubation) tendent à se développer car ils permettent de réduire sensiblement les délais de diagnostic. Sur milieu de culture solide, les principales caractéristiques macroscopiques étudiées sont la vitesse d'apparition de la colonie, le nombre de colonies, leur aspect rugueux ou lisse, la présence ou non d'une pigmentation, tandis que sur milieu liquide, c'est l'aspect du frottis qui permet d'orienter l'identification. Ainsi, sur milieu solide de Löwenstein-Jensen, les colonies de *M. tuberculosis* apparaissent en quatre à six semaines, sont d'aspect rugueux dit en « chou-fleur », de couleur crème et eugoniques (Figure 9), tandis que le frottis réalisé à partir de cultures en milieu liquide montre des colonies en corde ou en moustache avec très peu de bactéries isolées (Millet, 2011).

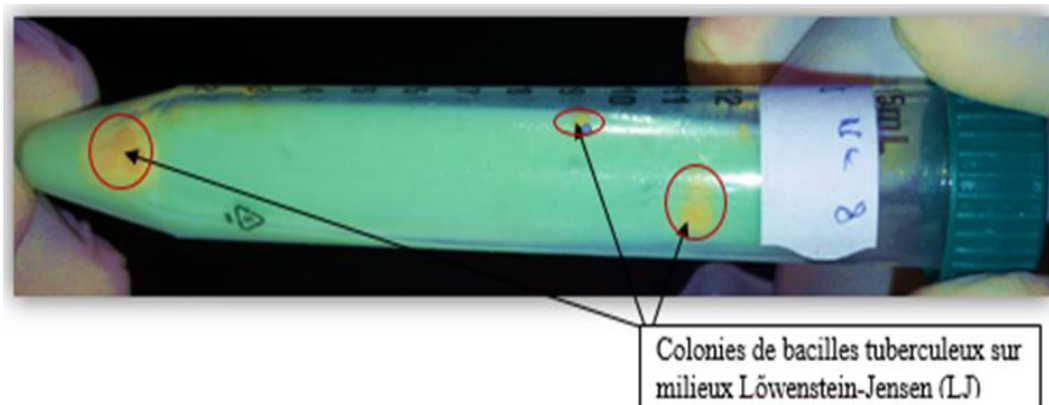


Figure 9: Colonies des mycobactéries sur milieu de Löwenstein Jensen. Source (LRTP, 10/05/2021.)

I. 3.4.3 L'identification

L'identification des colonies bactériennes se déduit de la combinaison de propriétés macroscopiques avec plusieurs outils d'investigation, tels que les tests biochimiques, les sondes nucléiques, et les tests basés sur l'amplification génique par PCR.

I.3.4.3.1. Les tests biochimiques

Ils évaluent la thermo sensibilité de la catalase, la production de niacine, la réduction des nitrates, la croissance en présence d'acide thiophène-2-carboxylique (TCH), l'activité arylsulfatasique, l'hydrolyse du Tween, l'activité β -glucosidasique et l'activité uréasique. *Mycobacterium tuberculosis* a une catalase thermolabile, produit de la niacine (ou acide nicotinique), réduit les nitrates, et pousse en présence de TCH. Les autres tests biochimiques

ont été développés pour l'identification des mycobactéries atypiques. Si l'identification n'est toujours pas formelle ou par mesure de contrôle, des outils supplémentaires existent tels que les sondes nucléiques ou les tests basés sur la PCR (Caws et Drobniewski, 2001).

I.3.4.3.2. Les sondes nucléiques

Le système AccuProbe (Gen-Probe, San Diego, USA) est une technique d'hybridation d'une sonde moléculaire sur une région cible située au niveau du gène codant pour l'ARN 16S des mycobactéries. Cette technique s'utilise sur culture en milieu solide ou liquide. Il existe des sondes pour l'identification des mycobactéries du complexe *M. tuberculosis* (CMT), du complexe *M. avium-M. intracellulare* (MAC) ainsi que des espèces *M. kansasii* et *M. goodii* (Helb *et al.*, 2010).

I.3.4.3.3 Autres développements

- **Les tests immuno-chromatographiques** : Ces tests permettent la détection de l'Antigène MPT64, protéine uniquement sécrétée par les souches du CMT (« S.DBioLINE. TB MPT64 Rapid », Standard Diagnostic et « Capilia TB Neo », Taunus laboratories). Utilisables à partir de colonies provenant de cultures sur milieu solide ou liquide, ils permettent une distinction rapide (en quelques minutes) entre les souches du CMT et les mycobactéries atypiques (Boehme *et al.*, 2010).
- **Les tests de détection et d'identification des mycobactéries à partir de prélèvements biologiques** : Ces tests sont basés sur l'amplification d'ADN (COBAS® TaqMan® MTB Test, Roche Diagnostics) ou d'ARN (AMPLIFIED MTD®, Gen-Probe ; GenoType® *Mycobacteria Direct*, Hain Lifescience), ils permettent d'identifier les bactéries du CMT dans les prélèvements à examen direct positif en quelques heures. Cependant, ces tests restent moins sensibles que la méthode de référence qui nécessite la mise en culture des prélèvements biologiques et seront donc principalement employés en première intention pour un nombre restreint de situations qui auront été préalablement définies (Caws et Drobniewski, 2001).
- **GeneXpert MTB/RIF Assay (Cepheid)** : C'est une méthode d'identification des mycobactéries du CMT et de détection de la résistance à RIF par real-time PCR multi-colorimétrique. L'ensemble de réactifs étant contenu sous forme lyophilisée dans une cartouche prête à l'emploi, cette méthodologie réduit notamment les risques de contamination et de faux positifs inhérents aux outils de biologie moléculaire (Blakemore *et al.*, 2010 ; Boehme *et al.*, 2010 ; Helb *et al.*, 2010).

I.3.4.4. L'antibiogramme

L'antibiogramme permet de déterminer la sensibilité du bacille tuberculeux aux différents antibiotiques en vue de proposer un traitement adéquat aux patients. La méthode des proportions est la méthode de référence dont le but est de mesurer la proportion de bacilles résistants qui existe dans une souche donnée sur un milieu de culture imprégné d'antibiotique (**Canetti, 1963**). On obtient cette proportion par le dénombrement de colonies qui se sont développées sur un milieu de culture contenant une concentration critique d'antibiotique par rapport aux colonies viables sur un milieu de culture sans antibiotique. La comparaison de la proportion obtenue aux proportions critiques conventionnellement définies permet de conclure à la sensibilité ou la résistance de la souche étudiée. Lorsque la proportion de mutants résistants est inférieure à 1 % pour l'isoniazide, la rifampicine, la streptomycine, l'éthambutol, et inférieure à 10 % pour le pyrazinamide, alors la souche est dite sensible dans le cas inverse, elle est résistante (**Canetti, 1963**).

I.4. TRAITEMENT DE LA TUBERCULOSE

I.4.1. Traitement général

Le traitement général de la tuberculose, dans les années 1952 après la découverte de l'isoniazide, était basé sur l'adjonction de l'isoniazide (I), la streptomycine (SM) et l'acide para-amino salicique (PAS) pour une durée de 24 mois (**Vezeris, 2014**). Après la découverte de la rifampicine (**Sensi, 1983**) et la pyrazinamide, qui sont des stérilisants partiels (**Zhang et al., 2014 ; Tasneen et al., 2011**), le traitement a été réduit à 6 mois par la combinaison de plusieurs antibiotiques en deux phases distinctes : phase d'initiation (2 mois de I, R, Z, et E) et phase de continuation (4 mois de HR) (**Falzon et al., 2017 ; Wouter et al., 2010**). La phase d'initiation peut être prolongée lorsque l'examen direct est positif, cela peut être dû à une malabsorption ou une interaction médicamenteuse. La durée du traitement peut être aussi prolongée (9 à 12 mois) en présence de formes graves de la maladie (méningite, tuberculose osseuse, miliaire) (**Zhang et Yew, 2015**).

I.4.2. Traitement de la tuberculose mono/poly/multi/ultra résistante aux antibiotiques

Ces types de résistance sont dus au non-respect thérapeutique du médecin et/ou du patient (résistance acquise) ou à une contamination directe avec des germes résistants (résistance primaire).

- La mono-résistance de la tuberculose est la résistance de *M. tuberculosis* à un seul antituberculeux de première ligne, le plus souvent à l'Isoniazide, parfois à l'Ethambutol

et rarement à la Rifampicine sauf chez les personnes infectées par le VIH. Dans ce cas, le traitement est dans un premier temps limité à trois antituberculeux de première ligne encore actifs dont Z (d'une durée de 2 mois) et dans un second temps à deux antituberculeux actifs pendant 6 mois (si mono résistant EMB) et 9 mois (si mono résistant I ou R) (**Zhang et Yew, 2015**).

- La poly-résistance est la résistance à au moins deux antituberculeux de première ligne sauf la Rifampicine et l'isoniazide. Après le résultat d'antibiogramme élargi, sont prescrits trois antituberculeux actifs dont Z et une quinolone dans un premier temps, suivi dans un second temps de deux antituberculeux dont l'activité a été confirmée pour une durée totale de 9 mois (**Zhang et Yew, 2015**).
- La multi résistance (MDR) est la résistance de *M. tuberculosis* au moins à l'Isoniazide et à la Rifampicine, les deux médicaments antituberculeux de première intention les plus efficaces. On peut néanmoins soigner et guérir la tuberculose multi résistante avec des médicaments de deuxième intention. Ces options thérapeutiques sont toutefois, plus limitées et nécessitent une administration de longue durée (jusqu'à 2ans de traitement) de médicaments à la fois chers et toxiques. Dans certains cas, une résistance plus sévère peut se développer. Lorsque les bacilles ne sont pas sensibles aux médicaments de deuxième intention les plus efficaces, les patients peuvent se trouver à court d'options thérapeutiques (**Zhang et Yew, 2015**).

En 2020, l'OMS a recommandé que les patients atteints de tuberculose multi résistante/résistante à la R soient traités selon un nouveau schéma thérapeutique, qui est plus court (9 à 11 mois) et administré exclusivement par voie orale. Les études ont montrées que les patients parviennent plus facilement à suivre ce traitement jusqu'au bout par rapport aux autre traitements dont la durée peut aller jusqu'à 20 mois. Avant de commencer ce traitement, il faut exclure toute résistance aux fluoroquinolones (**OMS, 2021**).

- L'ultra-résistance XDR (pour *eXtreme Drug Resistance*) est la résistance au moins à la Rifampicine/Isoniazide, à une quinolone et à un antituberculeux injectable (Kanamycine, Amikacine, Capréomycine). Cette forme de résistance particulièrement grave à moins de chance de guérison (**Wouter et al., 2010**). Le schéma de traitement de la tuberculose multi résistante n'est pas adapté aux patients ayant une tuberculose-XDR ou résistante aux antituberculeux de seconde intention ; il faut alors prescrire un protocole thérapeutique long auquel on peut ajouter l'un des nouveaux médicaments (bédaquiline et délamanide) (**Zhang et Yew 2015 ; Koul et al., 2008**) et adapter le

traitement en fonction du résultat de l'antibiogramme élargi et de l'évolution clinique du patient.

I.5. PROPHYLAXIE-VACCINATIONS : Vaccin BCG (Bacille de Calmette et Guérin)

Le vaccin antituberculeux préparé à partir du Bacille de Calmette et Guérin (BCG) a été mis au point entre les années 1908 et 1921 à l'Institut Pasteur de Lille. Il est encore actuellement le seul vaccin antituberculeux disponible, reste le vaccin le plus utilisé contre la TB humaine dans le monde (**Locht, 2008**) et demeure encore le vaccin le plus utilisé dans le monde (tous vaccins confondus). Le vaccin BCG est constitué de bacilles tuberculeux bovins atténués obtenu par 230 transferts successifs de la bactérie pathogène sur un milieu de culture à base de pomme de terre glycinée mélangé avec de la bile. Son injection se fait par voie intradermique. C'est un vaccin stimulant une réaction immunitaire à médiation cellulaire et humorale du sujet ne provoquant pas de pathologie (**Ait-Khaled et al., 1999**). Le vaccin BCG confère une protection chez les enfants contre les formes graves de TB (milliaire, extra pulmonaire ou méningée) mais est moins efficace pour les formes pulmonaires qui sont les plus fréquentes (**Colditz et al., 1994**). Le vaccin n'empêche pas la survenue d'une primo-infection tuberculeuse ou la réactivation d'une TB pulmonaire latente (**WHO, 2004**).

I.6. LES TECHNIQUES DE GÉNOTYPAGE EN BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

Le typage moléculaire a permis d'établir l'existence d'une diversité génétique au sein de différentes populations. Certains profils de souches particuliers comme le génotype « Beijing » ont été décrits dans certaines régions (**Soolingen et al., 1997**). Différents autres génotypes ou « familles » ont été décrits grâce à des études internationales comparant des milliers de profils obtenus dans différents pays (**Filiol et al., 2000**). Dans la plupart des régions à faible incidence de tuberculose, on observe une diversité génétique importante des souches de *M. tuberculosis*. Cette diversité est influencée par deux facteurs, d'une part un haut pourcentage relatif de réactivations endogènes et par conséquent, le reflet de génotypes présents dans la population sur une longue période et d'autre part une large proportion de patients tuberculeux retrouvés dans des populations immigrantes de différentes régions géographiques entraînant « l'importation » des génotypes différents (**Hermans et al., 1995**). En revanche, dans les régions à forte incidence de la tuberculose comme l'Asie et l'Afrique, les profils génomiques sont souvent moins variables, La plupart des cas de tuberculose sont dues à des infections récentes par des souches clonales représentant des transmissions actives parmi la population (**Hermans et al., 1995**). Parmi ces méthodes on peut citer :

I.6.1. La Technique d'IS6110 RFLP (*Insertion Sequence 6110 Restriction Length Fragment Polymorphism*)

Cette technique consiste à digérer le chromosome bactérien à l'aide d'un enzyme de restriction. Les fragments générés après avoir été séparés sur un gel d'agarose sont transférés sur une membrane avant d'être mis en présence d'une sonde composée d'un fragment de la séquence du gène de l'IS6110 (Soolingen *et al.*, 1991). Un profil de bandes de différentes tailles est ainsi observé en fonction du nombre de copies et des positions de la séquence IS6110 dans le génome de la souche analysée. Deux désavantages sont associés à cette technique. Premièrement la nécessité d'une grande quantité d'ADN impose des cultures abondantes ce qui rallonge le temps d'analyse et pose des problèmes de biosécurité. D'autre part, il a été suggéré que la capacité de discrimination de la technique soit liée au nombre de séquences IS6110 et qu'en particulier, les souches en contenant un faible nombre (seuil généralement situé à < 6) sont mal distinguées. Cette technique a été la première utilisée couramment pour le typage des souches de *M. tuberculosis* mais n'est pas parvenue à s'imposer comme un outil pour le typage de *M. bovis* (Cousins *et al.*, 1998 ; Haddad *et al.*, 2004). La raison principale étant que *M. bovis* contient une seule ou peu de séquences d'insertion IS6110, ce qui rend cette méthode peu discriminante

I.6.2. Le Spoligotypage (*Spacer Oligonucleotide Typing*)

Dans le locus appelé *Direct Repeat* (DR), contenant par ailleurs le site d'insertion présumé primaire de la séquence IS6110, se trouvent de multiples copies de séquences répétées et identiques, entre chacune desquelles on retrouve des séquences uniques (appelées spacers). L'amplification par PCR des séquences spécifiques peut être réalisée à l'aide d'un seul couple d'oligonucléotide dirigé contre les séquences répétées. L'absence ou la présence de ces séquences uniques peut alors être révélée par hybridation sur des sondes de référence immobilisées sur une membrane (Kamerbeek *et al.*, 1997). Cette technique s'appelle le spoligotypage (sp pour spacer et oligo pour oligonucléotide). Il se trouve que cette portion du génome est polymorphe et que des fragments disparaissent chez certaines souches (Aranaz *et al.*, 1996 ; Cousins *et al.*, 1998). Cette technique est facile à mettre en œuvre, c'est pourquoi elle est largement répandue. La standardisation est également aisée ce qui facilite les comparaisons entre publications. Cette technique permet de distinguer de nombreuses souches présentant un profil RFLP IS6110 identique à une seule bande. Cependant, parmi les souches à plusieurs bandes, cette technique est connue pour être moins discriminante que la RFLP (Cousins *et al.*, 1998).

I.6.3. La technique MIRU-VNTR (*Mycobacterium Interspersed Repetitive Unit Variable Number Tandem Repeat*)

Cette technique dirigée contre des séquences répétitives dispersées dans le génome aussi appelées MIRUs (*Mycobacterial Interspersed repetitive units* ; d'où le terme de MIRU-VNTR) est encore appelée MLVA (*Multi Locus Variable number tandem repeat Analysis*). Cette technique consiste à amplifier par PCR des loci génomiques qui contiennent des séquences répétées en tandem en nombre variable suivant les souches. Ces régions génomiques sont aussi appelées mini satellites par analogie à certaines séquences de génomes eucaryotes. La taille du produit d'amplification indiquera le nombre de répétitions de la région spécifique. Cette analyse, réalisée sur différents loci dispersés sur le génome de la bactérie, est à la fois simple, peu coûteuse et standardisable. Cette technique a d'abord été validée pour *M. tuberculosis* (**Frothingham et Meeker-O'Connell, 1998 ; Magdalena et al., 1998 ; Supply et al., 2001**) et ensuite pour *M. bovis* (**Roring et al., 2002, Allix et al., 2014**).

Le Tableau II ci-dessous présente les 24 loci standards de VNTR utilisés pour réaliser un MIRU-VNTR.

Tableau II : Liste des 24 loci VNTR standards utilisés actuellement pour la technique MIRU-VNTR selon leur position chromosomique (Supply, 2005)

Multiplex	Locus	Alias 1	Alias 2	Longueur de l'unité de répétition (pdb)	Paired d'amorces PCR (5' vers 3')
Mix 1	580	MIRU 4	ETRD	77	GCGCGAGAGCCCAACTGC (FAM) GCGCAGCAGAAACGCCAGC
	2996	MIRU 26		51	TAGGTCTACCDTCGAAATCTGTGAC CATAGGCGACCAGGCGAATAG (VIC)
	802	MIRU 40		54	GGGTGCTGGATGACAACGTGT (NED) GGGTGATCTCGGCGAAATCAGATA
Mix 2	960	MIRU 10		53	GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT (FAM)
	1644	MIRU 16		53	TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA CCCGTCGTGCAGCCCTGGTAC (VIC)
	3192	MIRU 31	ETRE	53	ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA GTGCCGACGTGGTCTTGAT (NED)
Mix 3	424	VNTR 42		51	CTTGGCCGGATCAAGCGCATTATT GGCAGCAGAGCCCGGGATTCTTC (FAM)
	577	VNTR 43	ETRC	58	CGAGAGTGGCAGTGGCGGTTATCT (VIC) TAGAGCGGCACGGGGGAAAGCTTAG
	2165	ETRA		75	AAATCGGTCCCACACCTTCTTAT (NED) CGAAGCCTGGGGTGCCCGCGATTT
Mix 4	2401	VNTR 47		58	CTTGAAGCCCCGGTCTCATCTGT (FAM) ACTTGAACCCCCACGCCATTAGTA
	3690	VNTR 52		58	CGGTGGAGGCGATGAACGTCTTC (VIC) TAGAGCGGCACGGGGGAAAGCTTAG
	4156	VNTR 53	QUB-4156c	59	TGACCACGGATTGCTCTAGT GCCGGCGTCCATGTT (NED)
Mix 5	2163b		QUB-11b	69	CGTAAGGGGGATGCGGGAAATAGG CGAAGTGAATGGTGGCAT (FAM)
	1955			57	AGATCCCAGTTGTCGTCTGTC (VIC) CAACATCGCCTGGTTCTGTA
	4052		QUB-26	111	AACGCTCAGCTGTCCGAT (NED) CGGCCGGTGCCGGCCAGGTCCTTCCCGAT
Mix 6	154	MIRU 2		53	TGGACTTGCAGCAATGGACCAACT TACTCGGACGCCGGCTCAAAAT (FAM)
	2531	MIRU 23		53	CTGTCGATGGCCGCAACAAAACG (VIC) AGCTCAACGGGTTTCGCCCTTTTGTC
	4348	MIRU 39		53	CGCATCGACAAACTGGAGCCAAAC CGGAAACGTCTACGCCCCACACAT (NED)
Mix 7	2059	MIRU 20		77	TCGGAGAGATGCCCTTCGAGTTAG (FAM) GGAGACCGCGACCAGGTAATTGTA
	2687	MIRU 24		54	CGACCAAGATGTGCAGGAATACAT GGGCGAGTTGAGCTCACAGAA (VIC)
	3007	MIRU 27	QUB-5	53	TCGAAAGCCTCTGCGTGCCTGCCAGTAA GCGATGTGAGCGTGCCACTCAA (NED)
Mix 8	2347	VNTR 46		57	GCCAGCCGCCGTCATAAACCT (FAM) AGCCACCCGGTGTGCCTTGTATGAC
	2461	VNTR 48	ETRB	57	ATGGCCACCCGATACCGCTTCAGT (VIC) CGACGGGCCATCTTGGATCAGCTAC
	3171	VNTR 49		54	GGTGCGCACCTGCTCCAGATAA (NED) GGCTCTATTGCTGGAGGGTTGTAC

CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES

II.1. MATÉRIEL

Pour la réalisation de ce travail, nous avons eu besoin du matériel (Tableau III) et des réactifs (Tableau IV) présenté ci-dessous :

Tableau III : Liste du matériel et leur utilisation

MATÉRIEL	UTILITÉ
MATÉRIEL BIOLOGIQUE	
Les souches collectées au cours du projet CANTAM I et conservées au CBN	Réalisation de ce travail
GROS MATÉRIEL	
Réfrigérateur (<i>LG, Expresscool</i>)	Conservation des réactifs et des souches
Congélateur (<i>Indesit</i>)	
Thermocycleur (<i>GenAmp PCR system 9700</i>)	PCR
Cuve d'électrophorèse (<i>Bio Rad</i>)	Électrophorèse
Générateur d'électrophorèse (<i>Bio Rad, N° :041BR95974</i>)	
Transilluminateur (<i>Bio Rad, N° :76S/08294</i>)	Lecture des bandes d'électrophorèse
Autoclave	Stérilisation
Hotte à flux laminaire (<i>UV Sterilizer 2400</i>)	Sécurité lors des manipulations
Centrifugeuse	Séparation au cours de l'extraction de l'ADN
Vortex (<i>VTX 3000 et Fisher scientific N° :FB15013</i>)	Homogénéisation
Plaque chauffante (<i>Rommelsbacher, AK 2099/E</i>)	Ebullition
Bain-marie (<i>Water bath, DK 420, N° :11015047</i>)	
MATÉRIEL DIDACTIQUE	
Ordinateur (<i>PB HEV</i>)	Saisie et analyse des données
Registre de paillasse	Enregistrement des données
Bloc-notes	Collecte de données
Marqueur	Étiquetage
Rame de papier (<i>Inacopia</i>)	Impression
PETIT MATÉRIEL	
Micropipettes (<i>Microlux</i>)	Pipetage de petites quantités
Embouts	
Bloc de glace	Maintenir les réactifs thermosensibles a une base température
Peignes (15 et 20 dents, <i>Bio Rad</i>)	Fabrication des puits dans le gel d'agarose
Papier aluminium	Protéger les tubes contenant les réactifs photosensibles, peser les poudres
Tubes Eppendorf (<i>Promega</i>)	Aliquotage
Chronomètre ou minuteur	Respect des procédures(Timing)
Gants, cache-nez, blouses blanches en coton	Protection
DIVERS	
Détergent liquide	Hygiène et assainissement
Eau de javel	Hygiène et assainissement
Papier hygiénique	Hygiène et assainissement
Alcool à 70°	Hygiène et assainissement

Tableau IV : Liste des réactifs et leur utilisation

Réactif	Utilisation
TBE (<i>Sigma</i>)	Extraction
One Taq Master Mixte (<i>Quiagen</i>)	PCR
Lysats d'ADN (souches sélectionnées provenant de CANTAM I)	
Amorces forward et reverse (Applied Biosystem UK)	
Eau de PCR (<i>Quiagen</i>)	
Agarose 2% (<i>Sigma</i>)	Electrophorèse
Marqueur de poids moléculaire 50pdb et 100pdb (<i>Quiagen</i>)	
Tampon de dépôt 8µl (bleu de bromophénol) (<i>Sigma</i>)	
TBE 1X (<i>Sigma</i>)	
Bromure d'éthidium 10mg/mL (<i>Sigma</i>)	

II.2. MÉTHODES

II.2.1. Cadre de l'étude

II.2.1.1. Contexte

Cette étude a été réalisée dans le cadre d'un travail de recherche pour l'obtention d'un Master en Microbiologie Médicale sur les souches isolées des patients tuberculeux à l'Hôpital Jamot de Yaoundé en 2009 dans le cadre du projet CANTAM I. Les souches ont été typées par la technique du spoligotypage, et ont été conservées au Laboratoire de Recherche en Tuberculose et Pharmacologie (LRTP) du Centre de Biotechnologie de l'Université de Yaoundé 1 (CBUYI) à Nkolbisson où nous avons réactivé les souches et effectué une analyse moléculaire sur les souches retenues.

II.2.1.2. Type et période de l'étude

Il s'agissait d'une étude transversale allant du mois de Mars au mois de Juillet 2022 portant sur les souches du CMT collectées lors du projet CANTAM I.

II.2.1.3. Site de l'étude

L'analyse moléculaire des souches a été faite au Laboratoire de Recherche sur la Tuberculose et Pharmacologie (LTRP) du Centre de Biotechnologie de Nkolbisson de l'Université de Yaoundé 1.

II.2.1.4. Population d'étude

Les souches utilisées dans notre étude ont été choisies par convenance (40 souches) selon les critères d'inclusion et de non-inclusion ci-après :

- **Critères d'inclusion** : ont été inclus dans cette étude uniquement les souches de *Mycobacterium tuberculosis* appartenant à la famille de spoligotype Uganda I collectées pendant le projet CANTAM I ;

- **Critères de non-inclusion** : N'ont pas été incluses dans cette étude toute autre famille de spoligotype collectée pendant le projet CANTAM I et celles n'appartenant pas à ce projet.

II.2.2. Réactivation des souches sélectionnées

À partir de la base des données du spoligotypage, 40 souches appartenant à la famille de spoligotype Uganda I collectées pendant le projet CANTAM I ont été sélectionnées. Ces souches étaient conservées dans le lait écrémé au LRTP. Les isolats des différentes souches conservées dans un congélateur à une température de - 80°C ont été décongelés à température ambiante puis activées sur milieu Lowenstein Jensen à 37°C pendant deux semaines dans l'étuve.

II.2.3. Collecte des données

À partir de la base de données créée par CANTAM I, les données sociodémographiques et cliniques ont été collectées.

II.2.4. Caractérisation génotypique des souches.

La caractérisation génotypique des souches nécessite au préalable une extraction de leur ADN.

II.2.4.1 Extraction de l'ADN des souches

La technique que nous avons utilisée était la thermolyse. Chaque isolat a été suspendu dans 500 µL de tampon Tris-EDTA 1X (une fois concentré), dans un tube Eppendorf de 1,5mL. Ces tubes ont ensuite été disposés sur un portoir adapté puis portés à incubation dans un bain-marie (Kotterman) préchauffé à 95°C pendant 25 minutes. Après ce délai, les tubes ont été retirés du bain marie et centrifugés à 3000 tr/min pendant 10 minutes. Le surnageant a été recueilli et conservé à -20°C pour une utilisation future (**Zhang *et al.*, 2010**).

II.2.4.2 Typage par le *MIRU-VNTR*

C'est une technique de typage moléculaire qui concerne les séquences répétitives dispersées dans le génome qu'on appelle *MIRU* (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit*). La séquence *VNTR* (*Variable Number Tandem Repeat*) est un ensemble de marqueurs important pour le génotypage de plusieurs espèces bactériennes, spécialement celles qui sont génétiquement homogènes comme les membres du complexe *Mycobacterium tuberculosis*.

a. Amplification par la PCR

Pour cette manipulation, des lysats contenant de l'ADN ont été utilisés.

- **Principe :** La PCR est basée sur le mécanisme de réplication de l'ADN *in vivo* : L'ADN bicaténaire est déroulé en ADN monocaténaire, puis dupliqué et re-enroulé selon les cycles répétitifs comprenant trois étapes (dénaturation, hybridation et élongation) (Supply, 2005).

Le génotypage par les marqueurs *VNTR* repose sur une amplification en utilisant des amorces spécifiques (Tableau V) pour les séquences flanquantes des régions *MIRU-VNTR* et sur la détermination de la taille des amplicons, après une migration par électrophorèse sur gel d'agarose. La taille de l'unité reflète le nombre de répétitions du locus *VNTR* utilisé. Le résultat final est sous forme d'un code numérique, correspondant au nombre de répétitions de chaque locus *VNTR* considéré (Supply, 2005).

- **Préparation du mélange réactionnel**

Sous une hotte préalablement stérilisée et muni de paires de gants stériles, d'une blouse blanche et tout le nécessaire adéquat pour notre manipulation (exceptée de l'ADN), nous avons préparé notre mixture. Le master mix utilisé a été constitué (Tableau V) à l'aide de la *OneTaq® 2X Master Mix with Standard Buffer (M0482)*. Les réactifs ont été sortis du congélateur et maintenus à faible température sur un bloc de glace pour éviter leur dénaturation. Le mélange réactionnel pour chaque réaction de PCR (Tableau V) a été préparé au préalable dans un tube Eppendorf de 2mL et sous la hotte de PCR (Supply, 2005). Chaque tube a été étiqueté par le nom du locus à amplifier. Le volume de chaque mixture correspond au nombre total de souches à analyser. Ainsi, pour 40 souches nous avons préparé une mixture pour 45 souches pour minimiser les erreurs de pipetage lors du dispatching dans les microtubes éppendorfs de 1,5mL. Chaque réactif a été introduit dans le tube eppendorf de 2mL de manière chronologique. Ceci a été fait pour quatre masters mixtes dont le *MIRU 04*, le *MIRU 40*, le *VNTR 43* et le *VNTR 48* comme nous le montre le Tableau V suivant :

Tableau V : Protocole de préparation du mélange réactionnel pour les réactions *MIRU-VNTR* (Supply, 2005).

Réactifs	Pour 1 réaction (µL)	Pour 45 réactions (µL)
H2O PCR	6.5	292,5
OneTaq® 2X Master Mix	12.5	562.5
Amorce forward	0.5	22.5
Amorce reverse	0.5	22.5
Volume total	20	900

Après la préparation de la mixture, vingt microlitres (20µL) ont été prélevés à l'aide d'une micropipette et distribués dans des microtubes de PCR préalablement étiquetés en

fonction du numéro correspondant à l'extrait d'ADN. Ensuite 5µL d'ADN ont été ajoutés dans la salle de dépôt des ADN pour chaque réaction, nous avons ainsi obtenu notre mélange réactionnel. Ces microtubes ont été disposés dans un thermocycleur et ont subi les conditions d'amplification précises ci-après (Tableau VI) (Supply, 2005).

Tableau VI: Programme d'amplification des MIRU-VNTR (Supply, 2005).

Nombre de cycle	Etapes	Température	Temps
01	Prédénaturation	94°C	5 min
	Dénaturation	94°C	1 min
30	Hybridation	55°C	45 secs
	Elongation	68°C	1 min
01	Elongation terminale	68°C	5 min

Le processus d'amplification a été effectué (30 cycles) pendant 2 heures de temps environ. Une fois terminé les tubes ont été retirés du thermocycleur et conservés à -20°C dans un congélateur pour des analyses électrophorétiques. Le programme d'amplification étant identique pour les couples d'amorces utilisés, 4 séries de PCR ont ainsi été réalisées pour les 4 loci testés.

b. Électrophorèse sur gel d'agarose 2%

Les produits d'amplification ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 2% afin de déterminer leur taille. Deux marqueurs de poids moléculaire de très bonne résolution (50pdb et 100pdb) ont été utilisés.

- **Principe de l'électrophorèse :** La technique de l'électrophorèse sur gel d'agarose repose sur la séparation des acides nucléiques chargés négativement sous l'effet d'un champ électrique. Cette séparation s'effectue à travers la matrice du gel d'agarose : les molécules de petites tailles se déplacent plus rapidement et migreront plus loin que les molécules de tailles supérieures (Supply, 2005).
- **Procédure :**
 - **Préparation du TBE (Tris-Borate- EDTA) 1X**

Dans une éprouvette de 250mL, 150mL d'eau distillée a été introduit puis successivement 108g de base tris; 55g d'acide borique et 9.3g d'EDTA ont été ajouté et le tout homogénéisés. Le volume a été complété à 250mL pour obtenir le tampon TBE une fois concentré (1X). Une seconde préparation du TBE 10X a été effectuée à partir de la solution de TBE 1X par dilution : en prélevant 100 mL de solution TBE 1X pour 900mL d'eau distillée (Supply, 2005).

○ **Préparation du gel et moulage**

À l'aide d'une balance électronique, 2 g d'agarose ont été pesés puis introduit dans un Erlenmeyer. Ensuite 100mL du TBE 1X ont été ajouté et le mélange (solution d'agarose 2%) a été porté à ébullition dans un microonde pendant 3 minutes jusqu'à dissolution complète. Une fois sorti du microonde, la solution d'agarose a été refroidi à 60°C et 3µL de bromure d'éthidium ont été ajouté et le mélange homogénéisé. Ensuite la solution d'agarose a été versé délicatement afin d'éviter la formation des bulles d'air dans un moule monté sur cassette munie de 2 peignes à 15 ou 20 cupules. Après solidification, les joints de coulage ont été retirés et le support contenant le gel a été transporté dans la cuve d'électrophorèse contenant au préalable une solution de TBE 1X (tampon de migration), le niveau du TBE a été vérifié et ajusté afin que le gel soit submergé. Enfin, les peignes ont été délicatement retirés tout en évitant de casser le gel (Supply, 2005).

○ **Dépôt des échantillons et migration**

Sur un papier parafilm, un volume de 8µL du tampon de dépôt (bleu de bromophenol) ont été déposés à l'aide d'une micropipette. Ensuite 10µL d'ADN amplifié par la PCR ont été ajoutés et homogénéisés. À l'aide d'une micropipette, ce mélange a été prélevé et déposé dans un puits sur la gélose posée dans la cuve d'électrophorèse. Ceci a été répété pour chaque échantillon et pour chaque MIRU-VNTR. À chaque fois, nous avons pris le soin de ne pas déposer les échantillons dans les premiers et derniers puits de chaque ligne, car ces puits ont servis de puits témoins où le mélange marqueur de poids moléculaire et tampon de dépôt ont été introduit. La migration a été faite à l'aide d'un générateur de courant (borne négative vers la borne positive). Lorsque la migration a atteint les trois-quarts de la longueur du gel (environs 1h de temps), le générateur de courant électrique a été arrêté et le moule retiré de la cuve d'électrophorèse, essoré à l'aide d'un papier mouchoir et transporté vers le trans-illuminateur pour révélation (Supply, 2005).

○ **Visualisation**

Le gel a été visualisé à l'aide d'un trans-illuminateur puis, photographié. La taille des bandes correspondant au fragment obtenu a été déterminée par comparaison à celle des marqueurs de poids moléculaire (Supply, 2005).

c. Le Contrôle qualité des analyses

Pour cette étude, un contrôle qualité a été fait au départ par une PCR de control et une électrophorèse afin de d'assurer que le protocole mis en place était correcte.

d. Précautions prises pendant les analyses

La PCR étant une technique extrêmement sensible, des précautions très rigoureuses ont été prises durant la manipulation afin d'éviter les problèmes de contamination des souches, qui auront facilement donné des résultats erronés. La préparation de la mixture de PCR a été effectuée sous une hotte de sécurité propre (non contaminée par les acides nucléiques). Le mélange réactionnel (ADN + mixture) a été fait sous une autre hotte stérilisée. Le port d'une blouse propre, d'un cache-nez, l'utilisation de matériel stérilisé (gants, micropipettes, embouts, tubes eppendorf, vortex et autres) destiné à la salle de PCR, l'utilisation des amorces spécifiques MIRU 04, MIRU 40, VNTR 43 et VNTR 48 et le respect des protocoles opératoires standards (POS) établis au laboratoire. Toutes les manipulations ont été réalisées dans de la glace afin de préserver la qualité des différents réactifs pour ceux qui étaient thermosensibles.

II.2.5. Analyses statistiques

Le logiciel Excel (Microsoft Office 2007) a servi à la création de la base des données. Le logiciel R a servi à l'analyse statistique. Le nombre de répétitions correspondant à chaque isolat a été analysé par un logiciel spécifique : MIRU-VNTR plus disponible sur le site www.miru-Vntrplus.org. La diversité allélique (h) de chaque locus, la diversité génétique, le pouvoir discriminant de la technique MIRU-VNTR et le taux de clustérisation ont été des critères utilisés au cours de cette étude pour l'analyse des résultats obtenus à partir des formules proposées par Supply en 2005. Cet outil d'exploration des données a permis de rechercher des souches similaires. De manière chronologique, l'analyse des résultats a été faite suivant les points ci-après :

II.2.5.1. Détermination du nombre de répétitions (Supply, 2005).

Le nombre de répétitions a été déterminé en comparant la taille de l'amplification issue du gel d'électrophorèse à celle contenue dans le tableau de correspondance proposé par Supply en 2005.

II.2.5.2. Détermination de la diversité allélique de chaque locus

Afin d'explorer la variabilité allélique des loci provenant des souches de la population étudiée, la diversité allélique a été calculée selon la formule suivante proposée par **Supply** en **2005** :

$$h = 1 - \sum xi^2 [n / (n-1)]$$

h : diversité allélique de chaque locus
n : nombres d'isolats testés;
xi : fréquence relative de l'allèle pour un locus i.

Si :

$h > 0.6$ le locus aura une grande diversité allélique ;

$0.2 < h < 0.6$ le locus aura une diversité allélique moyenne ;

$h < 0.2$ le locus aura une faible diversité allélique.

II.2.5.3. Détermination de la diversité génétique au sein de la population

Afin d'explorer la variabilité génétique de l'ADN mycobactérien dans la population étudiée, la diversité génétique a été calculée selon la formule suivante (**Supply, 2005**) :

$$H = \sum h/n$$

H : la diversité génétique au sein de la population ;
h : la diversité allélique ;
n : le nombre de loci testés.

II.2.5.4. Calcul du pouvoir de discrimination ou indice de Hunter-Gaston (HGDI)

Pour évaluer le pouvoir discriminant de la technique MIRU-VNTR avec ces quatre loci, l'Indice Discriminatoire de Gaston-Hunter (HGDI) a été calculé à partir de la formule suivante (**Hunter et Gaston, 1988**) :

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

Avec :
N : nombre total des souches,
Sj : nombre total de types décrits,
nj : nombre de souches appartenant au jème type
(Hunter et Gaston, 1988).

II.2.5.5. Calcul du taux de clustérisation

Ce taux permettra d'estimer les cas de tuberculose dus à une transmission récente et les cas dus à une réactivation de la maladie dans une population d'étude. Le taux de clustérisation (**Tc**) est donné par la formule suivante (**Millet, 2011**) :

$$Tc = (nc - c)/n$$

Tc : Taux de clustérisation ;
n : nombre d'isolats testés ;
c : nombre de génotypes identiques pour au moins 2 cas ;
nc : nombre de souches clustérisées.

CHAPITRE III : RÉSULTATS ET DISCUSSION

III.1. RÉSULTATS

III.1.1. Profil sociodémographique et clinique des souches

À partir de la base des données des souches utilisées provenant du CDT (Hôpital Jamot de Yaoundé) collectés pendant le projet CANTAM I, les données des souches sélectionnées pour la présente étude ont pu être recueillies et présentées (Tableau VII).

Tableau VII : Profil sociodémographique des souches sélectionnées

Caractéristique sociodémographique		Prévalence	
Sexe		Hommes (%)	Femmes (%)
		60	40
Sérologie VIH	VIH +	30	70
	VIH-	70	30
Résistance aux ATB	Isoniazide	0	2,5
	Rifampicine	0	2,5
Type de transmission	Nouveau cas	47,5	37,5
	Ancien cas	12,5	2,5

III.1.2. Caractérisation génotypique des souches

III.1.2.1. Résultats d'électrophorèse

Après amplification des quatre différents loci par PCR, une électrophorèse sur gel d'agarose a été effectuée. Après révélation à l'aide du tansilluminateur, différentes bandes de migration ont été obtenues et enfin après correspondance au tableau de référence de Supply, le nombre de répétitions a été déduit.

Avec le locus du MIRU 04, une seule taille de fragment de 350pdb a été obtenue correspondant aux allèles de 2 unités de répétitions (Tableau VIII). Ce locus n'est donc pas polymorphe dans ces souches. La Figure 10 ci-dessous nous montre le résultat d'électrophorèses des 40 souches amplifiées en utilisant le locus MIRU 04 :

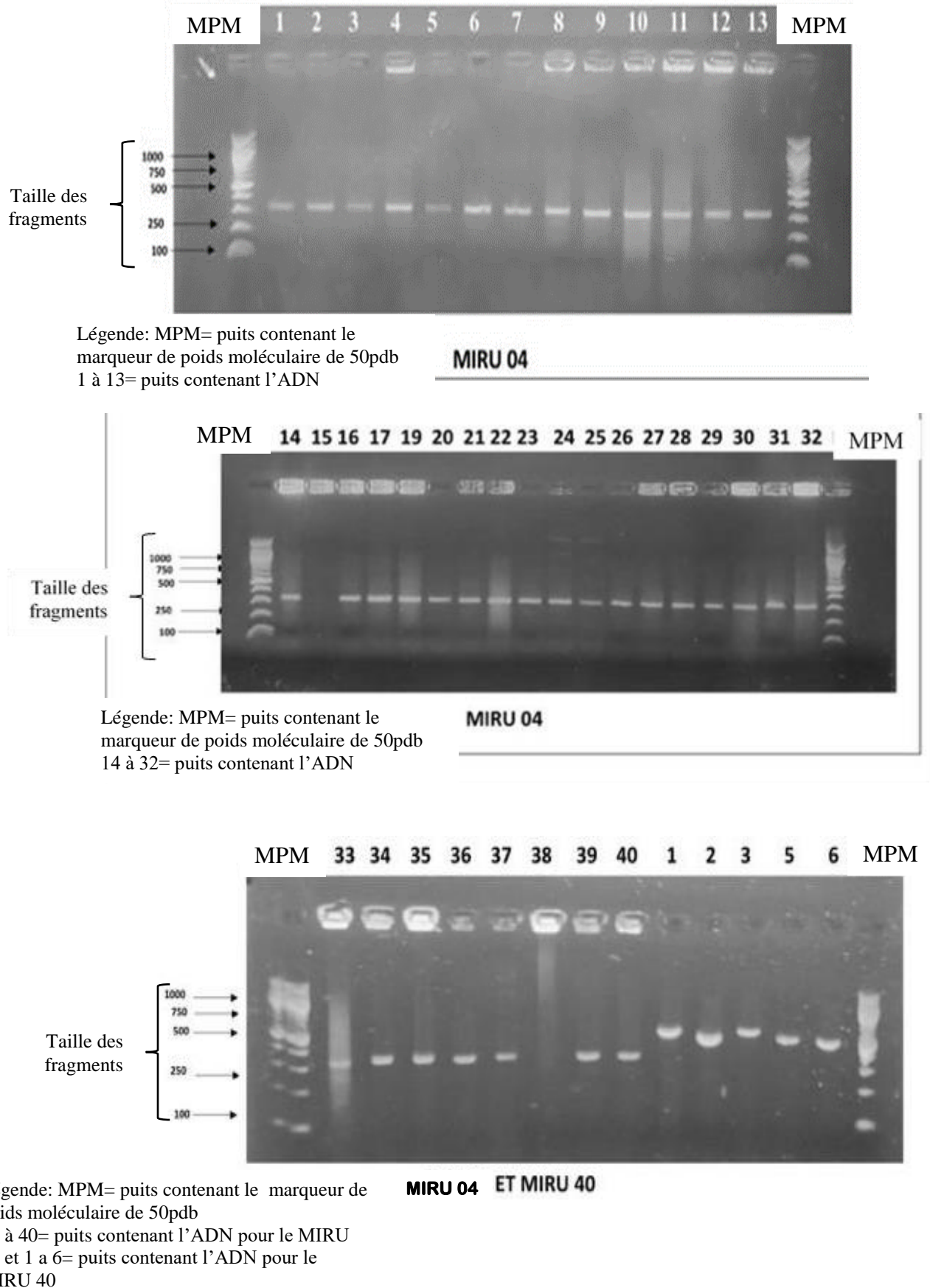
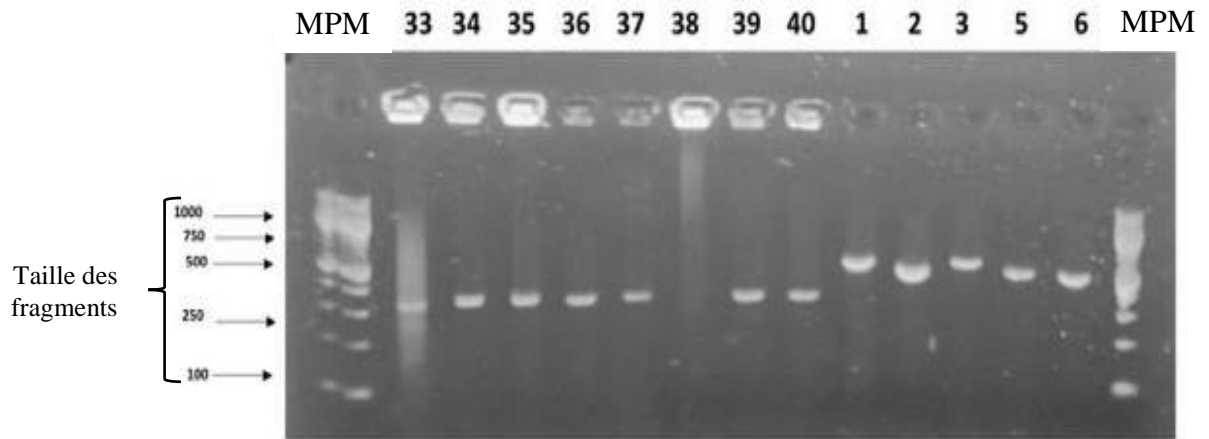
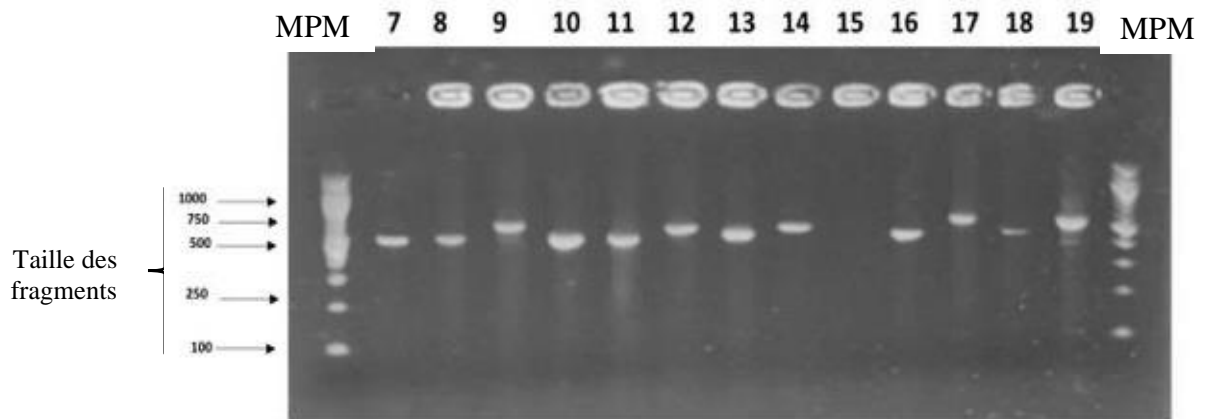


Figure 10 : Électrophorèses sur gel d'agarose avec le locus MIRU 04

Avec le locus du MIRU 40, 7 différents fragments de 400, 450, 500, 525, 550, 650 et 700pb ont été obtenus. Les fragments 400 et 450 correspondaient chacun aux allèles de 2 unités de répétition, les fragments 500, 525 et 550 quant à eux correspondaient chacun aux allèles de 3 unités de répétition et les fragments 650 et 700 correspondaient aux allèles de 4 unités de répétition (Tableau IX). Ce locus est de ce fait très polymorphe dans ces souches (Figure 11).



Légende: MPM= puits contenant le marqueur de poids moléculaire de 500pb
33 à 40= puits contenant l'ADN pour le MIRU 04 et 1 à 6= puits contenant l'ADN pour le MIRU 40



Légende: MPM= puits contenant le marqueur de poids moléculaire de 500pb
7 à 19= puits contenant l'ADN

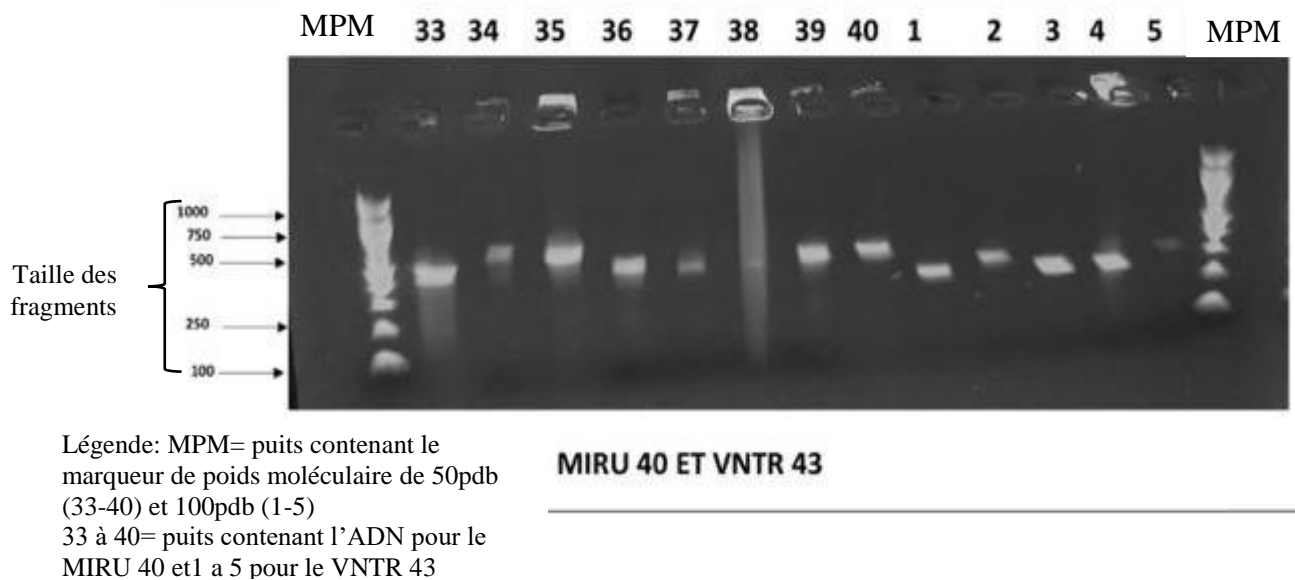
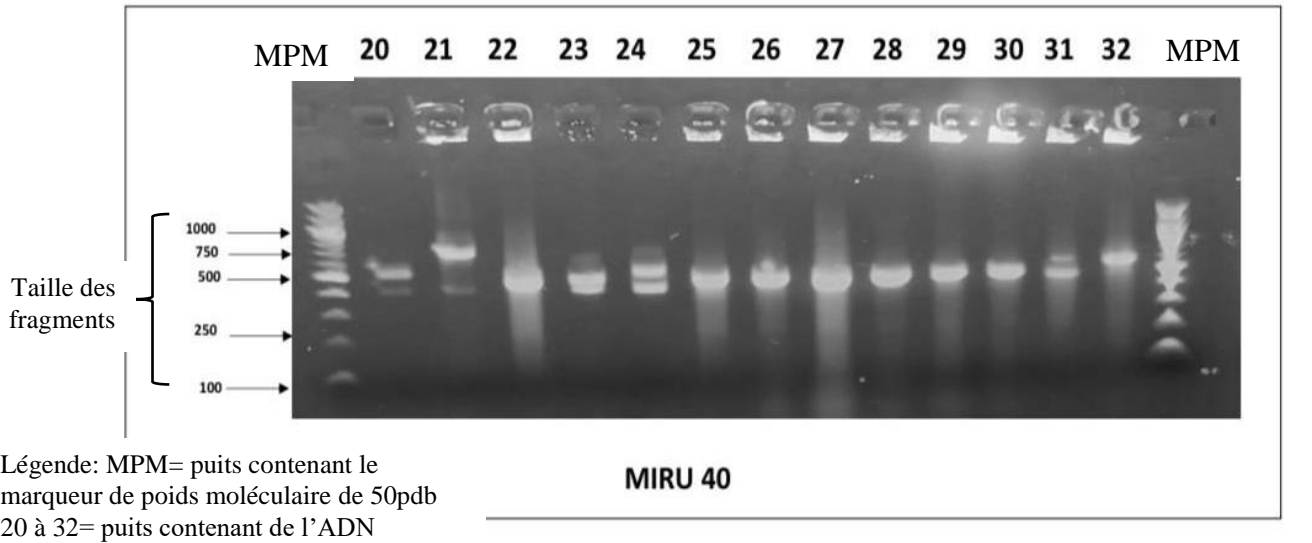
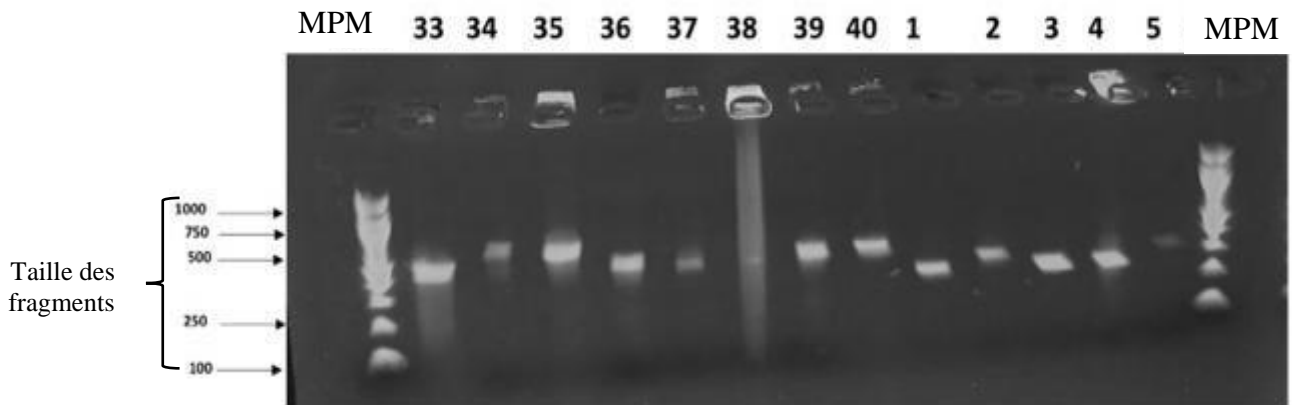


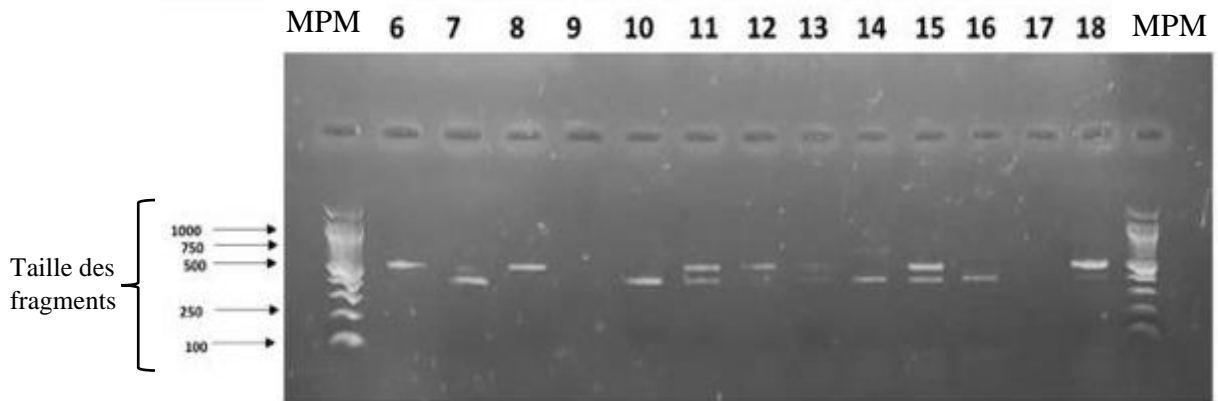
Figure 11: Électrophorèses sur gel d'agarose avec le locus MIRU 40

Quant au locus VNTR 43, 5 différents fragments de 350, 375, 400, 450 et 550pd ont été obtenus. Les fragments 350 et 375 correspondaient chacun aux allèles de 2 unités de répétition, les fragments 400 et 450 aux allèles de 3 unités de répétition et le fragment 500 à l'allèle de 4 unités de répétition (Tableau X). Ce locus est également très polymorphe dans ces souches (Figure 12).



Légende: MPM= puits contenant le marqueur de poids moléculaire de 50pdb (33-40) et 100pdb (1-5)
33 à 40= puits contenant l'ADN pour le MIRU 40 et 1 à 5 pour le VNTR 43

MIRU 40 ET VNTR 43



Légende: MPM= puits contenant le marqueur de poids moléculaire de 100pdb
6 à 18= puits contenant l'ADN

VNTR 43



Légende: MPM= puits contenant le marqueur de poids moléculaire de 100pdb
19 à 36= puits contenant l'ADN

VNTR 43

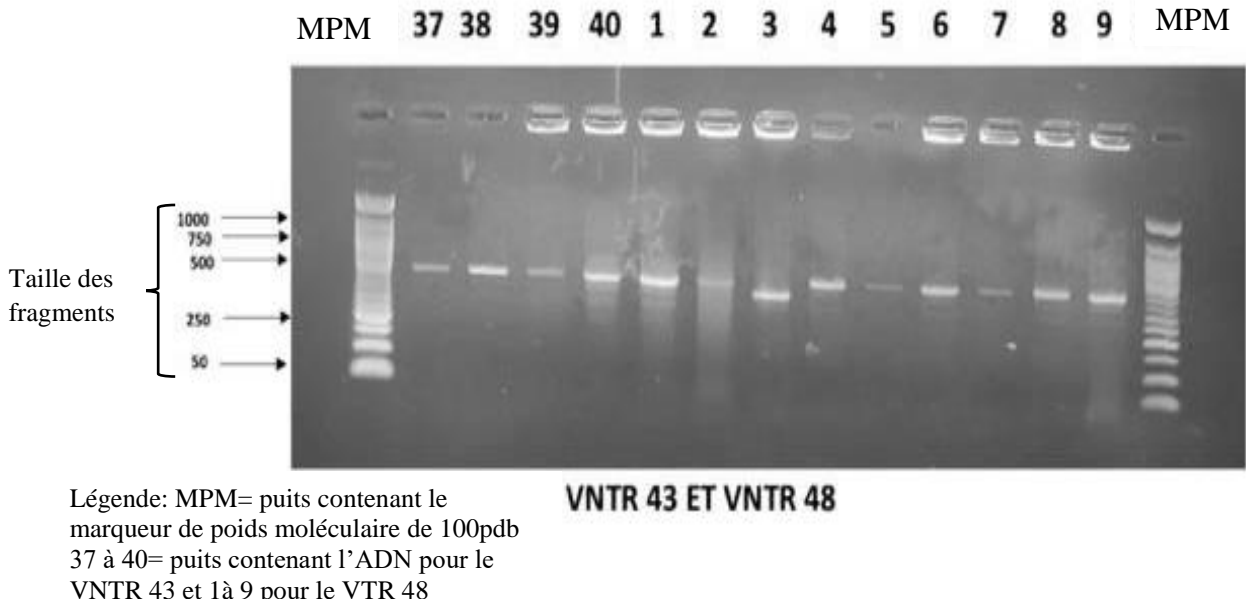
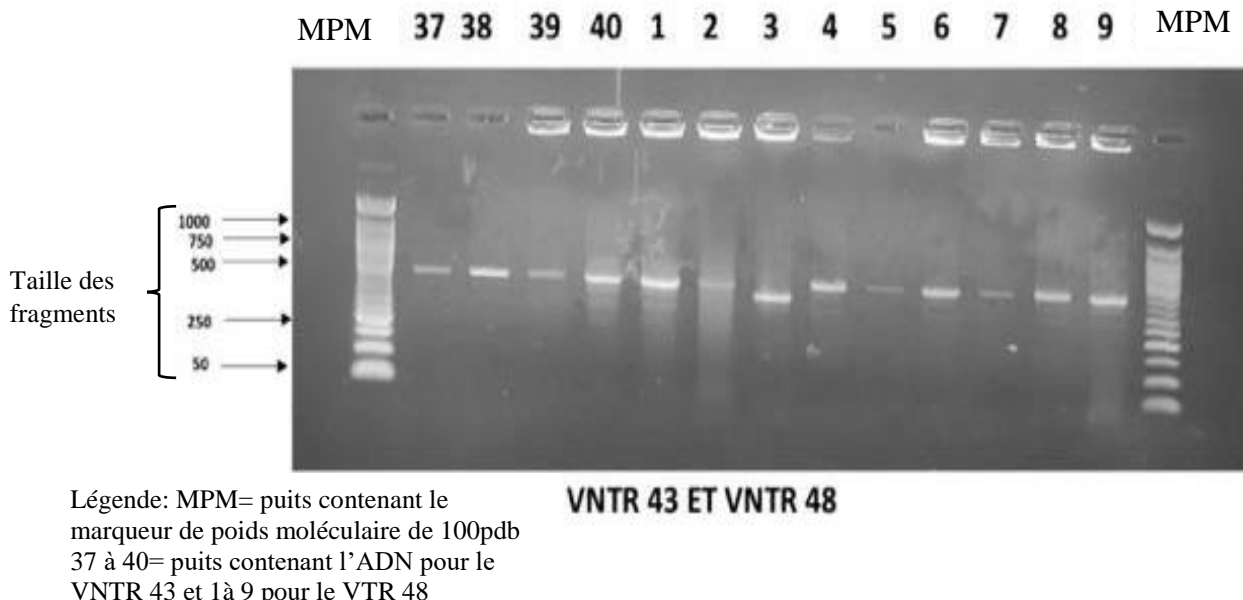


Figure 12: Électrophorèses sur gel d'agarose avec le locus VNTR 43

Enfin, le locus du VNTR 48 a donné 3 fragments de 400, 450 et 500pd. Les fragments 400 et 450 correspondaient aux allèles de 2 unités de répétition et le fragment 500 à l'allèle de 3 unités de répétition (Tableau XI). Ce locus est aussi polymorphe dans ces souches (Figure 13).



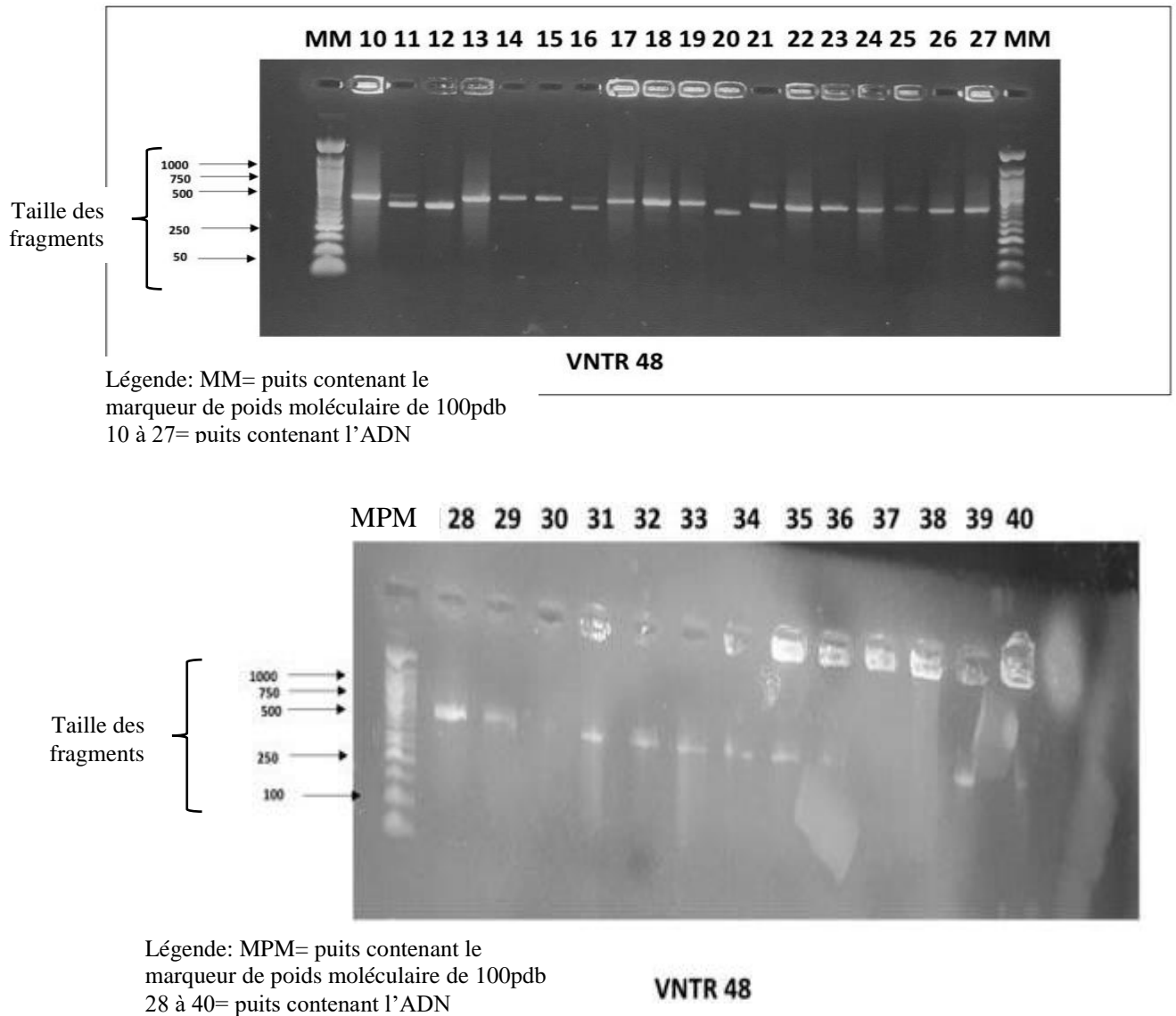


Figure 13: Électrophorèses sur gel d'agarose avec le locus VNTR 48

III.1.2.2. Détermination de la diversité allélique de chaque locus

La diversité allélique calculée pour chaque locus est fonction de la fréquence relative des allèles mis en évidence lors de la détermination du nombre de répétitions. Le typage MIRU-VNTR a été réalisé sur 40 souches de la famille de spoligotype Uganda I du CMT. La diversité allélique de chaque locus a été obtenue comme le montre les Tableaux VIII à XI :

Tableau VIII : Diversité allélique du locus MIRU 04

MIRU 04			
Unité de répétition	Nombre de répétitions	X_i	X_i^2
02	40	1,0	1,0
Total	40	1,0	
h = 0,00			

Annotation : h = Diversité allélique ; X_i = Fréquence relative de l'allèle i pour le locus étudié.

Le locus MIRU 04 présente une **faible diversité allélique** car $h < 0,2$

Tableau IX : Diversité allélique du locus MIRU 40

MIRU 40			
Unité de répétition	Nombre de répétitions	X_i	X_i^2
02	04	0,10	0,01
03	26	0,65	0,42
04	10	0,25	0,06
Total	40	1,0	0,49
h = 0,49			

Annotation : h = Diversité allélique ; X_i = Fréquence relative de l'allèle i pour le locus étudié.

Le locus MIRU 40 présente une **diversité allélique moyenne** car $0,2 < h < 0,6$

Tableau X : Diversité allélique du locus VNTR 43

VNTR 43			
Unité de répétition	Nombre de répétitions	X_i	X_i^2
02	03	0,07	0,01
03	07	0,02	0,03
04	30	0,75	0,56
Total	40	1,0	0,6
h = 0,39			

Annotation : h = Diversité allélique ; X_i = Fréquence relative de l'allèle i pour le locus étudié.

Le locus VNTR 43 présente une **diversité allélique moyenne** car $0,2 < h < 0,6$

Tableau XI : Diversité allélique du locus VNTR 48

VNTR 48			
Unité de répétition	Nombre de répétitions	X_i	X_i^2
02	12	0,30	0,09
03	28	0,70	0,49
Total	40	1,0	0,58
h = 0,40			

Annotation : h = Diversité allélique ; X_i = Fréquence relative de l'allèle i pour le locus étudié.

Le locus VNTR 48 présente une **diversité allélique moyenne** car $0,2 < h < 0,6$

III.1.2.3. Détermination de la diversité génétique au sein du CMT

Après avoir déterminé la diversité allélique au sein de chaque locus, la diversité génétique au sein du complexe *Mycobacterium tuberculosis* dans ces souches a été obtenue ainsi qu'une diversité génétique de **0,42** comme sur le Tableau XII qui suit :

Tableau XII : Diversité génétique des souches du CMT au sein de la famille de spoligotype Uganda I

Loci	Diversité allélique h
MIRU 04	0,0
MIRU 40	0,49
VNTR 43	0,38
VNTR 48	0,40
$H = \sum h/n$	0,42

III.1.2.4. Calcul du pouvoir de discrimination ou indice de Hunter-Gaston

L'indice discriminatoire de Hunter-Gaston (HGDI) (**Hunter et Gaston, 1988**) a permis de calculer le pouvoir discriminant de la technique MIRU-VNTR en utilisant les loci MIRU 04, MIRU 40, VNTR 43 et VNTR 48. L'HGDI pour l'ensemble des 40 souches du CMT a été déterminé à partir du profil MIRU-VNTR comme suit (Tableau XIII et XIV) :

Tableau XIII: Profil MIRU-VNTR obtenu pour l'ensemble des 40 souches

Nouveau code attribué aux souches	Code attribué aux souches par CANTAM	Profil MIRU-VNTR
1	085-Ca	2243
2	088-Ca	2233
3	094-Ca	2433
4	102-Ca	2433
5	129-Ca	2443
6	138-Ca	2443
7	139-Ca	2443
8	244-Ca	2443
9	271-Ca	2443
10	275-Ca	2343
11	276-Ca	2343
12	278-Ca	2343
13	302-Ca	2343
14	310-Ca	2343
15	340-Ca	2343
16	345-Ca	2343
17	348-Ca	2343
18	349-Ca	2343
19	357-Ca	2343
20	378-Ca	2343
21	379-Ca	2343
22	399-Ca	2343
23	402-Ca	2343
24	405-Ca	2343
25	447-Ca	2343
26	511-Ca	2343
27	518-Ca	2343
28	520-Ca	2343
29	529-Ca	2322
30	536-Ca	2322
31	594-Ca	2322
32	595-Ca	2322
33	600-Ca	2432
34	603-Ca	2334
35	604-Ca	2342
36	614-Ca	2342
37	660-Ca	2242
38	667-Ca	2242
39	700-Ca	2442
40	724-Ca	2442

Légende : différents profils obtenus à partir du nombre de répétitions des quatre différents loci après traitement des données.

Tableau XIV: Indice discriminatoire de la technique MIRU-VNTR utilisant les loci MIRU 04, MIRU 40, VNTR 43 et VNTR 48

Type de souche / Haplotype	Profil MIRU-VNTR	Nombre d'isolats appartenant au type j (n _j)
Haplotype I	2243	1
Haplotype II	2333	1
Haplotype III	2433	2
Haplotype IV	2443	5
Haplotype V	2343	19
Haplotype VI	2322	3
Haplotype VII	2232	1
Haplotype VIII	2432	1
Haplotype IX	2332	1
Haplotype X	2342	2
Haplotype XI	2242	2
Haplotype XII	2442	2
HGDI=0,76		

Légende : différents profils obtenus à partir du nombre de répétitions des quatre différents loci après traitement des données.

III.1.2.5. Génération du dendrogramme

À partir des profils de génotypage obtenu sous forme de nombre à quatre chiffres grâce à un logiciel approprié, un dendrogramme a été généré et l'arbre phylogénétique a été établi afin d'étudier les liens de parenté existant entre les souches de spoligotype Uganda I du CMT. Ce dendrogramme a permis d'isoler les souches qui sont phylogénétiquement proches et de faire apparaître les clusters ou grappes au sein des souches utilisées. La méthode utilisée pour la construction du dendrogramme est l'UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean*) qui est une méthode de groupement par distance. Le dendrogramme permet ainsi de décrire la relation génétique qui existe entre les 40 souches utilisées. Douze *subclusters* ont été obtenus ainsi qu'un total de 87,5% (35/40) de souches réunis en grappe dont 5 singletons (souches présentant des génotypes uniques) (Figure 14). Les différents sub-clusters obtenus ainsi que leurs fréquences d'apparition ont été représentés graphiquement (Figure 15).

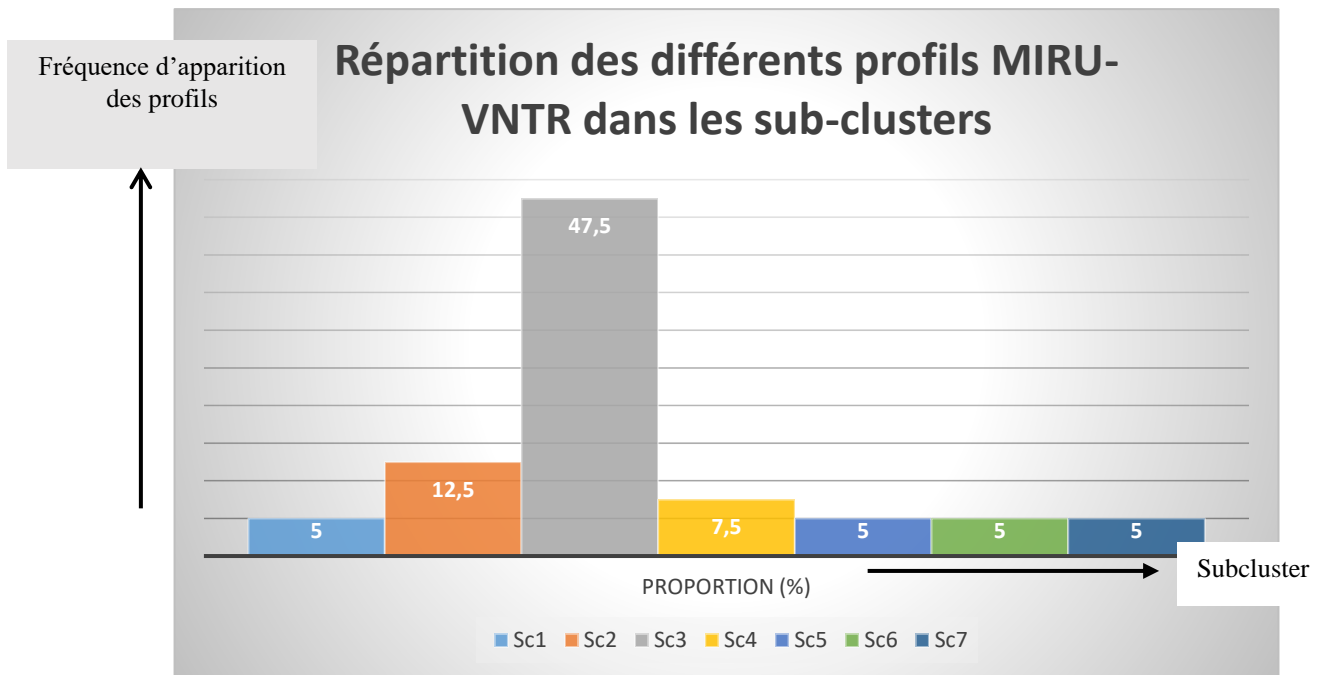


Figure 15: Répartition des différents profils MIRU-VNTR dans les sub-clusters

III.1.2.6. Résultats du taux de souches en grappes et calcul du taux de clustérisation

Le calcul du taux de souches en grappe démontre que 87,5% (35/40) (Tableau XV) de la population bacillaire présente dans le spoligotype Uganda I des souches du CMT sont inclus dans une chaîne de transmission regroupée en grappe. Le taux de clustérisation permet de connaître le taux de transmission récente ou de réactivation dans la population et se calcule en fonction du nombre de souches testées, et du nombre de souches réunies en grappe.

Tableau XV : Taux de clustérisation au sein de la population d'étude

Nombre de souches testées (n)	40
Nombre de génotypes identiques pour au moins deux cas (C)	35
Taux de clustérisation (Tc)	87,5%

Le taux de clustérisation étant élevé, permet ainsi de dire que ces souches sont liés génétiquement ou ont le même profil génétique. Une liaison de 87,5% dans la famille de spoligotype Uganda I du CMT a été obtenue.

III.2. DISCUSSION

Les résultats obtenus après calcul de la diversité allélique de chacun des quatre loci étudiés nous ont montré que, le locus MIRU 04 a été monomorphe et a présenté une faible diversité allélique ($h = 0$) ; suivi des loci MIRU 40, VNTR 43 et VNTR 48 ayant une diversité allélique moyenne ($h = 0,48$, $h = 0,38$ et $h = 0,40$ respectivement) et sont de ce fait polymorphes. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par **Assam *et al.*, en 2014** qui ont trouvé dans leurs travaux des valeurs de $h < 0,2$ pour le MIRU 04; $h = 0,74$ pour le MIRU 40 et $0,2 < h < 0,6$ pour les VNTR 43 et 48. (**Assam *et al.*, 2014**). Le locus MIRU 40 est également le locus le plus discriminant dans notre étude bien que présentant une plus faible diversité allélique comparée à celle obtenue par **Assam *et al.*, en 2014**. On note une différence de 0,25 parmi ces deux valeurs, ce qui pourrait s'expliquer par le fait que le nombre de souches utilisées dans la présente étude était faible (40 souches) comparé à celui utilisé par **Assam *et al.*, 2014** (169 souches). Cette analyse permet d'affirmer que le locus MIRU 40 permet de mieux démontrer les variations génotypiques au sein de la famille de spoligotype Uganda I. Ce locus peut ainsi être utilisé pour étudier le degré d'homologie entre les souches de *Mycobacterium tuberculosis* comparé au spoligotypage, permettant ainsi de définir les génotypes additionnels.

La diversité génétique au sein d'un spoligotype précis composé de souches génétiquement différenciables ne peut être régie par les mêmes loci que ceux appliqués à des spoligotypes différents, d'où la nécessité d'avoir recours à une technique ayant un degré de résolution significatif, tel que nous l'avons mis en évidence ici avec le *MIRU-VNTR*. Le génotypage des souches de *M. tuberculosis*, pour une communauté donnée, est très utile dans le contrôle de la tuberculose (**Assam *et al.*, 2014**) , car celui-ci permet d'identifier des cas non suspectés dus à une transmission récente de la maladie, et ressortir les loci les plus discriminants par rapport à un spoligotype précis. La diversité génétique obtenue ($H = 0,42$) au cours de ce travail démontre que l'ADN mycobactérien des souches étudiées présente une faible diversité génétique car $H < 0,6$ (**Supply, 2005**).

L'indice discriminatoire de Hunter-Gaston (HGDI) calculé au cours de ce travail a montré que la technique de *MIRU-VNTR* utilisant quatre loci était discriminante (76%) au sein de la famille de spoligotype Uganda I parmi les souches du CMT sélectionnées. Ces résultats corroborent ceux obtenus par **Assam *et al.*, en 2012** qui avaient obtenu un indice discriminatoire de 100. Nous pouvons déduire que le pouvoir discriminant de 75,9% s'est avéré être un outil de génotypage et pouvons affirmer que la technique du *MIRU-VNTR* utilisant les loci MIRU

04, MIRU 40, VNTR 43 et VNTR 48 est discriminante. Néanmoins, afin d'accroître le pouvoir discriminant obtenu, il est impératif d'augmenter le nombre de loci les plus discriminants appliqués à la diversité génétique au sein d'un spoligotype spécifique, étant donné que le pouvoir discriminant du MIRU-VNTR est proportionnel au nombre de loci évalués (**Mathema et al., 2006 ; Supply et al., 2001**). Cependant, il est important de savoir qu'une augmentation du nombre de loci pour le génotypage entraînerait un accroissement en matière de coûts, de temps et d'équipements. Par conséquent, le choix des loci est une étape importante. Partant de ce principe, la sélection des loci dans le CMT sur le territoire national comme le démontrent les études d'épidémiologie moléculaire faites au Cameroun (**Koro et al., 2013 ; Assam et al., 2013 ; Sidze et al., 2013 ; Niobe-Eyango et al., 2003**) doit prendre en compte le degré de polymorphisme ainsi que la variabilité allélique des différents loci qu'on souhaiterait amplifier.

Cette étude a permis d'évaluer le taux d'homogénéité au sein de la famille de spoligotype Uganda I des souches du CMT. Des souches analysées, 12 sub-clusters ont été regroupés dont 5 singletons. De ce fait, le dendrogramme généré a permis d'obtenir un taux de clustérisations de 87,5% ce qui est témoin d'une liaison génétique de 87,5% parmi les souches du spoligotype UGANDA I. Ceci traduit une transmission récente au sein de la famille de spoligotype Uganda I au sein du CMT. Cependant, cette transmission récente est généralement observée lorsque les souches typées ont les mêmes profils génotypiques, ou sont fortement liées (**Mathema et al., 2006**). Ce dendrogramme a également montré que les cas de résistance enregistrés au moment de l'étude n'étaient pas liés.

Par ailleurs, cette étude dévoile qu'une meilleure connaissance des familles génétiques particulièrement prédominantes aurait un avantage majeur pour la compréhension des mécanismes de transmission de la tuberculose, une visibilité sur le diagnostic, la prise en charge et une précision dynamique de la modification du protocole thérapeutique de la maladie qui par conséquent réduira le taux émergent de la résistance. L'utilisation des outils de génotypage à haute résolution et à faible coût est un atout pour les investigations d'épidémiologie moléculaire. La mise sur pied de telles stratégies pourrait fournir aux différents programmes de lutte des informations utiles sur le bacille tuberculeux permettant ainsi de réduire la fréquence d'impact dramatique de la pathologie au sein de la population.

CONCLUSION, SUGGESTIONS ET PERSPECTIVES

CONCLUSION

Parvenu au terme de ce travail, il en ressort que

La détermination de la diversité génétique au sein de la famille de spoligotype Uganda I par la technique du MIRU-VNTR a été faite en passant par l'analyse de la diversité allélique des loci. Les diversités alléliques obtenues étaient de 0 ; 0,49 ; 0,38 et 0,40 respectivement pour les loci MIRU 04, MIRU 40, VNTR 43 et VNTR 48. De ce fait le locus MIRU 04 est monomorphe et présente une faible diversité allélique tandis que les loci MIRU 40, VNTR 43 et VNTR 48 sont polymorphes et présentent une diversité allélique moyenne rendant ainsi la famille de spoligotype Uganda I hétérogène. La diversité génétique obtenue ($H = 0,42$) démontre que l'ADN mycobactérien des souches étudiées présente une faible diversité génétique ($H < 0,6$). Les souches de la famille de spoligotype UGANDA I analysées sont donc homogènes.

La détermination du pouvoir discriminant de la technique du MIRU-VNTR sur les souches appartenant à la famille de spoligotype Uganda I du CMT a été calculée au travers de la formule d'Hunter-Gaston en utilisant ces quatre loci sur l'ensemble des 40 souches testées. Une valeur de 0,76 soit 76% a été obtenue, permettant d'affirmer que le génotypage par la technique de MIRU-VNTR standardisé peut être une nouvelle référence pour le dépistage épidémiologique et phylogénétique des souches de *Mycobacterium tuberculosis* car elle est utile pour confirmer les clusters de spoligotypage et pour discriminer entre les souches. Le taux de clustérisation de 87,5% a été obtenu. Ceci traduit une transmission récente dans le CMT du spoligotype Uganda I et est généralement observé lorsque les souches typées sont fortement liées. Les cas de résistance aux antituberculeux initialement enregistrés n'ont rien à voir avec l'appartenance à un subcluster.

SUGGESTIONS

Les investigations d'épidémiologie moléculaire étant très importantes mais très coûteuses, nous suggérons :

- Au Programme National de Lutte contre la Tuberculose de prendre en compte les données portant sur l'épidémiologie moléculaire de la tuberculose pulmonaire au Cameroun afin d'améliorer la qualité du diagnostic de la maladie, de contrôler les chaînes de transmission et permettre ainsi l'établissement d'un meilleur protocole thérapeutique au sein des populations ;
- De renforcer les stratégies de lutte contre la tuberculose au Cameroun par l'amélioration de l'efficacité du système de surveillance par une appréciation approfondie du pathogène au travers le diagnostic et de traitement.
- Faire l'antibiogramme pour une prise en charge ciblée.
- La vaccination élargie contre la tuberculose doit être mis en place pour limiter la propagation de la maladie.

PERSPECTIVES

Différentes perspectives s'ouvrent au terme de ce travail. Au vu des résultats obtenus, nous envisageons pour la suite de :

- Augmenter le nombre de souches utilisées et étendre l'étude dans d'autres régions du Cameroun qui n'ont pas encore été investiguées afin de confirmer les observations faites au cours de ce travail ;
- Reprendre cette étude avec les 20 autres loci pour mieux comprendre cette dynamique moléculaire ;
- Entreprendre une collaboration avec le PNLT pour établir une carte de résistance/sensibilité des bacilles aux antituberculeux sur toute l'étendue du territoire national afin de contribuer à l'amélioration de l'efficacité du traitement antituberculeux.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ait-Khaled N. et Donald E. (1999).** Tuberculose: manuel pour les étudiants en médecine. *International Union against Tuberculosis and Lung Disease*. WHO/CDS/TB, 72:149.
- Akhtar M., Bretzel G., Boulahbal F., Dawson D., Fattorini L., Feldmann K., Frieden T., Havelkova M., Kantor I., Kim S., Kuchler R., Lamothe F., Laszlo A., Casabona N., McDougall C., Miörner H., Orefici G., Paramasivan C., Pattyn S., Reniero A., Rieder H., Ridderhof J., Rüsç-Gerdes S., Siddiqi S., Spinaci S., Urbanczik R., Vincent V. et Weyer K. (2000).** Guide technique : diagnostic de la tuberculose par examen microscopique direct des expectorations dans les pays à faibles revenus. *Union Internationale Contre la Tuberculose et les Maladies Respiratoires*, 60.
- Alexander K., Laver P., Michel A., Williams M., Helden P., Warren R. et Pittius N. (2010).** Novel *Mycobacterium tuberculosis* Complex Pathogen, *M. mungi*. *Emerging Infectious Diseases*, 16(8):1296-1299.
- Allix-Beguec C., Wahl C., Hanekom M., Nikolaïevski V., Drobniowski F., Maeda S., Herrero I., Mokrousov I., Niemann S., Kontsevaya I., Rastogui N., Samper S., Li-Hwei S., Warren R. et 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. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(1):164-72.
- Aranaz A., Liébana E., Gómez-Mampaso E., Galán JC., Cousins D., Ortega U., Blazquez J., Baquero F., Mateos U., Squarez G. et Dominguez L. (1999).** *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae*: A taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. *International Journal of Systematic Bactériology*, 49(3):1263-73.
- Aranaz U., Liébana E., Mateos U., Dominguez L., Vidal D., Domingue M., Gonzalez O., Rodriguez-Ferri E., Bunschoten A., Embden J. et Cousins D. (1996).** Typage oligonucléotidique espaceur des souches de *M. bovis* chez les bovins et autres animaux : un outil pour l'étude de l'épidémiologie de la tuberculose. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(11):2734-40.
- Assam JP., Penlap V., Cho-Ngwa F., Tedom J., Ane-Anyangwe I. et Titanji V. (2011).** *Mycobacterium tuberculosis* complex drug resistance pattern and identification of species causing tuberculosis in the West and Centre regions of Cameroon. *BioMed Central Infectious Disease*, 11 (1):94.
- Assam JP., Penlap V. et Titanji V. (2012).** Résistance et diversité génomique de la tuberculose au Cameroun : une approche épidémiologique moléculaire de la tuberculose pulmonaire. (1. Aufl). *Presses Académiques Francophones*, 101.1-201408016910.
- Assam JP., Penlap V., Cho-Ngwa F., Toukam M., Ngoh A., Kitavi M., Nzuki I., Nyonka J., Tata E., Tedom J., Skilton R., Pelle R. et Titanji V. (2013).** *Mycobacterium tuberculosis* is the causative agent of tuberculosis in the southern ecological zones of Cameroon, as shown by genetic analysis. *BioMed Central Infectious Diseases*, 13 (1):431.

Assam JP., Titanji V. et Penlap V. (2014). Résistance et diversité génomique de la tuberculose au Cameroun: Une approche épidémiologique moléculaire de la tuberculose pulmonaire. *Presses Académiques Francophones*, 264.

Barben J., Berger C., Bodmer T., Egger J-M., Merlani G., Helbling P., Janssens J., Nadal D., Nicod L., Turk A., Vukmirovic B., Zellweger J. et Zimmerli. (2012). Manuel de la tuberculose. *Ligue pulmonaire suisse*. 74.

Bemba E., Bopaka R., Moyikoua R., Ossibi-Bara R., Ebenga-Somboko N., Toungou S., Matondot P., Ossale-Abacka B., Okemba-Okombi F. et Mboussa J. (2016). Tuberculose pulmonaire à Brazzaville en hospitalisation pneumologique : impact du diagnostic tardif à l'infection au VIH sur les anomalies radiographiques. *Pan African Medical Journal*, 24 :256.

Billy C. et Perronne C. (2004). Aspects cliniques et thérapeutiques de la tuberculose chez l'enfant et l'adulte. *ECM- maladies infectieuses*, 81-98.

Blakemore R., Story E., Helb D., Kop J., Banada P., Owens M., Chakravorty S., Jones M. et Alland D. (2010). Evaluation of the analytical performance of the Xpert MTB/RIF assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(7):2495-2501.

Blanc F., Sok T., Laureillard D., Borand L., Rekacewicz C., Nerrienet E., Madec Y., Marcy O., Chan S., Prak N., Kim C., Lak K., Hak C., Dim B., Sin C., Sun S., Guillard B., Sar B., Vong S., Fernandez M., Fox L., Delfraissy J-F. et Goldfeld A. (2011). Earlier versus Later Start of Antiretroviral Therapy in HIV-Infected Adults with *Tuberculosis*. *New England Journal of Medicine*, 365(16): 1471-1481.

Boehme C., Nabeta P., Hillemann D., Nicol M., Shenai S., Krapp F., Allen J., Tahirli R., Blakemore R., Rustomjee R., Milovic A., Jones M., O'Brien S., Persing D., Ruesch-Gerdes S., Gotuzzo E., Rodrigues C., Alland D. et Perkins M. (2010). Rapid molecular detection of *tuberculosis* and rifampin resistance. *New England Journal of Medicine*, 363:1005-1015.

Bryant J., Harris S., Parkhill J., Dawson R., Diacon A., Helden P., Pym A., Mahayiddin A., Chuchottaworn C., Sanne I., Luow C., Boeree M., Hoelscher M., McHugh T., Bateson A., Hunt R., Mwaigwisya S., Wright L., Gillespie S. et Bentley S. (2013). Séquençage du génome entier pour établir une rechute ou une réinfection pour *M. tuberculosis* : une étude observationnelle rétrospective. *Lancet Respiratory Medicine*, 1(10):786-92.

Canetti G., Rist N. et Grosset J. (1963). [Mesure de la sensibilité du bacille Tuberculeux aux drogues antibacillaires par la méthode des proportions. Méthodologie, critères de résistance résultats et interprétation]. *Review of Tuberculosis and Pneumology (Paris)*, 27: 217-272.

Carette M., Mizouni L., Amri A., Merlier J., Korzek J. et Khalil A. (2012). Imagerie typique et atypique de la tuberculose bronchopulmonaire. *La Lettre de l'Infectiologue*, 27(1) :40-45.

Castets M., Boisvert H., Grumbach F., Brunel M. et Rist N. (1968). Les bacilles tuberculeux de type Africain: note préliminaire. *Revue de Tuberculose et de Pneumologie*, 32(2):179-84.

Caws M. et Drobniewski F. (2001). Molecular techniques in the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* and the detection of drug resistance. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 953:138-145.

- Colditz G., Brewer T., Berkey C., Wilson M., Burdick E. Fineberg H. et Mosteller F. (1994).** Efficacy of BCG vaccine in the prevention of *tuberculosis*: meta-analysis of the published literature. *Journal of the American Medical Association*, 271(9):698-702.
- Cole S., Brosch R., Parkhill J., Garnier T., Churcher C., Harris D., Gordon S., Eiglemeir K., Gas S., Barry C., Tekaia F., Badcock K., Basham D., Brown D., Chillingworth T., Connor R., Davies R., Devlin K., Feltwell T., Gentles S., Hamlin N., Holroyd S., Hornsby T., Jagels K., Krogh A., McLean J., Moule S., Murphy L., Oliver K., Osborne J., Quail M., Rajandream M., Rogers J., Rutter S., Seeger K., Skelton J., Squares R., Squares S., Suiston J., Taylor K., Whitehead S. et Barrell B. (1998).** Reconciling the spectrum of *Sagittarius A* with a two-temperature plasma model. *Nature* © Macmillan Publishers, 396:30.
- Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France (CSHPF). (2004).** Prévention et prise en charge de la tuberculose en France. Synthèse et recommandations du groupe de travail du Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France (2002-2003). *Revue des Maladies Respiratoires*, 20:7S13-7S106. Mis jour le 6 Septembre 2019.
- Cooper A. (2009).** Cell mediated immune responses in *Tuberculosis*. *Annual Review of Immunology*, 27:393-422.
- Cousins D., Skuce R., Kazwala R. et Embden J. (1998).** Vers une approche standardisée de l'empreinte d'ADN de *M. bovis*. Union International contre la tuberculose et les maladies respiratoires, sous-section tuberculose chez les animaux. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 2(6):471-8.
- Cousins D., Bastide R., Cataldi A., Quse V., Rougerobe S., Dow S., Duigan P., Murray A., Dupont C., Ahmed N., Collins D., Butler W., Dawson D., Rodriguez D., Loureiro J., Romano M., Alito U., Zumarraga M. et Bernardelli A. (2003)** *Tuberculosis* in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 53(5):1305-1314.
- Deschaseaux C. (2018).** Epidémiologie moléculaire de la tuberculose: étude des souches de *Mycobacterium tuberculosis* par la technique IS6110-RFLP. *Université de Lorraine*. Thèse: <https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01736927>
- Desikan P. (2013).** Sputum smear microscopy in *tuberculosis*: Is it still relevant? *Indian Journal of Medical Research*, 137(3): 442–444.
- Falzon D., Schünemann H., Harausz E., Gonzalez-Angulo L., Lienhardt C., Jaramillo E. et Weyer K. (2017).** World Health Organization treatment guidelines for drug-resistant *tuberculosis*, 2016 update. *European Respiratory Journal*, 40:1602308.
- Filliol I., Sola C. et Rastogi N. (2000).** Detection of a Previously Unamplified Spacer within the DR Locus of *Mycobacterium tuberculosis*: Epidemiological Implications. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(3):1231-4.
- Frothingham R. et Meeker-O'Connell W. (1998).** Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology (Reading)*, 144(5), 1189-1196

Garnier T., Eiglmeier K., Camus J., Medina N., Mansoor H., Pryor M., Duthoy S., Grondin S., Lacroix C., Monsempe C., Simon S., Harris B., Atkin R., Doggett J., Mayes R., Keating L., Wheeler P., Parkhill J., Barrell B., Cole S., Gordon S. et Hewinson R. (2003). The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 100(13):7877-7882.

Garrity G., Bell J. et Lilburn T. (2004). Taxonomic outline of the prokaryotes. *Bergey's manual trust*, 10.1007/bergeyoutline200405.

Haddad N., Masselot M. et Durand B. (2004). Différentiation moléculaire des isolats de *Mycobacterium bovis*. Revue des principales techniques et applications. *Research in Veterinary Science*, 10.1016/s0034-5288(03)00078-x.

Hajoj S., Varghese B., Datijan A., Shoukri M., Alzahrani A., Alkhenizan A., Alsaif A., Althawadi., Fernandez G. et Alrajhi A. (2016). Interferon Gamma Release Assay versus Tuberculin Skin Testing among Healthcare Workers of Highly Diverse Origin in a Moderate Tuberculosis Burden Country. *PLoS One*, 5(11): e0154803.

Helb D., Jones M., Story E., Boehme C., Wallace E., Ho K., Kop J., Owens M., Rodgers R., Banada P., Safi H., Blakemore R., Lan N., Jones-López E., Levi M., Burday M., Ayakaka I., Mugerwa R., McMillan B., Winn-Deen E., Christel L., Dailey P., Perkins M., Persing D. et Alland D. (2010). Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology. *Journal of Clinical Microbiology*, 48:229-2237.

Hermans P., Messadi F., Guebrexabher H., Soolingen D., Haas P., Heersma H., Neeling H., Ayoub A., Portaels F. et Frommel D. (1995). Analysis of the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* in Ethiopia, Tunisia, and The Netherlands: usefulness of DNA typing for global tuberculosis epidemiology. *Journal of Infectious Diseases*, 171(6):504-13.

Hoffmann C., Leis A., Niederweis M., Plitzko J. et Engelhardt H. (2008). Disclosure of the mycobacterial outer membrane: Cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 105(10):3963-3967.

Huet M. (1971). The bacteriology of tuberculosis in Africa south of the Sahara. *Archives of Institute Pasteur Tunisia*, 48(3):205-15.

Hunter P. et Gaston M. (1988). Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: An application of Simpson's index of diversity. *Journal of clinical Microbiology*, 26(11):2465-2466.

Kamerbeek J., Schouls L., Kolk U., Agterveld M., Soolingen D., Kuijper S., Bunschoten U., Molhuizen H., Shaw R., Goyal M. et Embden J. (1997). Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(4): 907-914.

Koro K., Kamdem F., Piam F., Noeske J., Gutierrez C., Kuaban C. et Eyangoh S. (2013). Population Dynamics of *Tuberculosis Bacilli* in Cameroon as Assessed by Spoligotyping. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(1):299-302.

- Koul A., Vranckx L., Dendouga N., Balemans W., Wyngaert I., Vergauwen K., Göhlmann H., Willebrords R., Poncelet A., Guillemont J., Bald D. et Andries K. (2008).** Diarylquinolines Are Bactericidal for Dormant Mycobacteria as a Result of Disturbed ATP Homeostasis. *Journal of Biological Chemistry*, 283(37): 25273-25280.
- Leao S., Martin A., Meija G., Palomino J., Robledo J., Telles M. et Portaels F. (2004).** Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria. *Vanden Broele, Belgium*, 164.
- Locht C. (2008).** A common vaccination strategy to solve unsolved problems of *tuberculosis* and pertussis? *Microbes and Infection*, 10(9):1051-1056.
- Madhukar P., Shriprakash K. et Keertan D. (2006).** New tools and emerging technologies for the diagnosis of *tuberculosis*: part I. Latent *tuberculosis*. *Expert Review of Molecular Diagnosis*, 6(3):413-422.
- Magdalena J., Supply P. et Locht C. (1998).** Différentiation spécifique entre *Mycobacterium bovis* BCG et les souches virulentes du complexe *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(9), 2471-2476.
- Magdalena J., Vachee A., Supply P. et Locht C. (1998).** Identification d'une nouvelle région d'AND spécifique aux membres du complexe *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(4), 937-943.
- Maguga-Phasha N., Munyai N., Mashinya F., Makgatho M, et Mbajjorgu E. (2017).** Diversité génétique et distribution des génotypes de *Mycobacterium tuberculosis* dans le Limpopo, Afrique du Sud. *BioMed Central Infectious Diseases*, 17(1) :764
- Mathema B., Kurepina N., Bifani P. et Kreiswirth B. (2006).** Molecular Epidemiology of *Tuberculosis*: Current Insights. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(4):658-685.
- Millet J. (2011).** Evaluation des marqueurs génétiques du complexe *Mycobacterium tuberculosis* combinée à l'utilisation d'outils bio-informatiques : apport en épidémiologie et phylogénie de la tuberculose, Thèse *Université des Antilles et de la Guyane*, 173.
- Nakaoka H., Lawson L., Squire S., Coulter B., Ravn P., Brock I., Hart C. et Cuevas L. (2006).** Risk for *Tuberculosis* among Children. *Emerging Infectious Diseases*, 12(9):1383-1388.
- Nayak S. et Acharjya B. (2012).** Mantoux test and its interpretation. *Indian Dermatology Online Journal* 3(1): 2-6.
- Niobe-Eyangoh S., Kuaban C., Sorlin P., Cunin P., Thonnon J., Sola C., Rastolgi N., Vincent V. et Gutierrez M. (2003).** Genetic Biodiversity of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains from Patients with Pulmonary *Tuberculosis* in Cameroon. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(6):2547-2553.
- Nolna S., Kammogne I., Ndzinga R., Afanda B., Ntonè R., Boum Y. et Nolna D. (2016).** Community knowledge, attitudes and practices in relation to *tuberculosis* in Cameroon. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 20(9):1199-204.

- Norman E., Smet K., Stoker N., Ratledge C., Wheeler P. et Dale J. (1994).** Lipid synthesis in mycobacteria: characterization of the biotin carboxyl carrier protein genes from *Mycobacterium leprae* and *M. tuberculosis*. *Journal of Bacteriology*, 176(9):2525-1931.
- OMS. (2011).** "Use of *tuberculosis* IGRA in low and middle income countries: policy statement. WHO/HTM/TB/2011.18, 70:ISBN978-92-4-150267-2.
- OMS. (2019)** Rapport Biennal de l'OMS Cameroun 2018/2019. *WHO Regional Office for Africa*, 86.
- OMS. (2020).** Global *Tuberculosis* Report. OMS/HTM/TB/2013, 11:ISBN9789241564656.
- OMS. (2021).** Rapport sur la Tuberculose dans le Monde. *OMS*, 25:ISBN978-92-4-004-162-2.
- Overton K., Varma R. et Post J. (2018).** Comparison of Interferon- γ Release Assays and the Tuberculin Skin Test for Diagnosis of *Tuberculosis* in Human Immunodeficiency Virus: A Systematic Review. *Tuberculosis and Respiratory Diseases (Seoul)*, 81(1): 59-72.
- Pai M. et O'Brien R. (2008).** New Diagnostics for latent and Active *Tuberculosis*: State of the Art and Future Prospects. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 29(5):560-8.
- Pai M., Behr M., Dowdy D., Dheda K., Divangahi M., Boehme C., Ginsberg A., Swaminathan S., Spigelman M., Getahun H., Menzies D. et Raviglione M. (2016).** *Tuberculosis*. *Nat Rev Dis Primers*, 2:16076.
- PNLT. (2021).** Rapport annuel d'activités de lutte contre la tuberculose, 2019. *Equipe PNL*T, 16.
- Ramachandran R., Swaminathan S., Baskaran G., Paramasivan C., Venkatesan P., Prabhakar R. et Datta M. (2000).** Risk of development of *tuberculosis* in HIV-infected patients. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 4(9): 839-844.
- Roring S., Scott A., Brittain D., Walker I., Hewinson G., Neill S. et Skuce R. (2002).** Development of variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium bovis*: comparison of results with those obtained by using existing exact tandem repeats and spoligotyping. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002, 40(6), 2126-2133.
- Russell D., Cardona P.-J., Mim M.-J., Allain S. et Altare F. (2009).** Foamy macrophages and the progression of the human *tuberculosis* granuloma. *Nature Immunology*, 10(9): 943-948.
- Saltini C. (2006).** Chemotherapy and diagnosis of *tuberculosis*. *Respiratory Medicine*, 100:2085-2097.
- Sensi P. (1983).** Histoire du développement de la Rifampicine. *Reviews of Infectious Diseases*, 5suppl3.s402-6.
- Shinnick T. et Good R. (1994).** Mycobacterial taxonomy. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 13(11):884-901.
- Sidze L., Mouafo L., Tekwu E., Kuaban C., Assam J.-P., Tedom J.-C., Niemann S., Frank M. et Penlap V. (2013).** Estimates of Genetic Variability of *Mycobacterium tuberculosis*

Complex and Its Association with Drug Resistance in Cameroon. *Advances in Infectious Diseases*, 03(01):55-59.

Smith N., Hewinson R., Kremer K., Brosch R. et Gordon S. (2009). Myths and misconceptions: the origin and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Reviews Microbiology*, 7:537-544.

Soolingen V., Hermans P., Hass P., Sol D. et Embden J. (1991). Occurrence et stabilité des séquences d'insertion dans les souches du complexe *Mycobacterium tuberculosis*: Evaluation d'un polymorphisme d'AND dépendant de la séquence d'insertion comme outil dans l'épidémiologie de la tuberculose. *Journal of Clinical Microbiology*, 29(11):2578-86.

Soolingen D., Hoogenboezem T., Haas P., Hermans P., Koedam M., Teppema K., Brennan P., Bessra G., Portaels F., Schouls L. et Embden J. (1997). A Novel Pathogenic Taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: Characterization of an Exceptional Isolate from Africa. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(4):1236-45.

Supply P. (2005). Multilocus Variable Number Tandem Repeat Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis*: Technical Guide. *Institut de Biologie/Institut Pasteur de Lille*. 74.

Supply P., Lesjean S., Savine E., Kremer K., Soolingen D. et Locht C. (2001). Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(10):3563-3571.

Tasneen R., Li S., Peloquin C., Taylor D., Williams K., Andries K., Mdluli K. et Nuermberger E. (2011). Sterilizing Activity of Novel TMC207- and PA-824-Containing Regimens in a Murine Model of Tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55(12): 5485-5492.

Tortoli E. (2006). The new mycobacteria: an update. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 48:159-178.

Trajman A., Steffen R. et Menzies D. (2013). Interferon-Gamma Release Assays versus Tuberculin Skin Testing for the Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection: An Overview of the Evidence. *Pulmonary Medicine*, 2013: 601737.

Vakou S. (2017). Etude environnementale et moléculaire des mycobactéries isolées au Centre et au Sud de la Côte d'Ivoire. *Université Félix Houphouët-Boigny*, 217.

Veziris N. (2014). Détection rapide du bacille tuberculeux et de sa résistance. *Infectiologie*, 26.

Vynnycky E. et Fine P. (2000). Lifetime risks, incubation period, and serial interval of tuberculosis. *American Journal of Epidemiology*, 152(3): 247– 263.

Weerasekera D., Pathirane H., Madegedara D., Dissanayake N., Thevanesam V. et Magana-Arachchi D. (2019). Evaluation of the 15 and 24-loci MIRU-VNTR genotyping tools with spoligotyping in the identification of *Mycobacterium tuberculosis* strains and their genetic diversity in molecular epidemiology studies. *Infectious Diseases*, 51(3):206-215.

World Health Organisation (WHO). (2004). BCG vaccine. *Weekly epidemiological record (WER)*, 4:25-40.

Wouter A, Bartsch P, Robert C, Fauxville-Dufaux M, Groenen G, Mouchet F, Peleman R, Rigouts L, Schandevtl W, Sergysels R, Bleyenbergh P, Eeckout A, Vandercam B, Vooren J. et Wanlin M. (2010). Diagnostic et traitement de la tuberculose, manuel pratique, recommandations destinées au corps médical. *FARES asbl*, 88.

Yombi J. et Olinga M. (2015). La tuberculose : épidémiologie, aspect clinique et traitement. *Louvain médical*. 134(10) :549-559.

Zhang Y., Zhang S., Liu X., Wen H. et Wang M. (2010). A simple method of genomic DNA extraction suitable for analysis of bulk fungal strains. *Letters In Applied Microbiology*, 51(1):114-118.

Zhang Y., Shi W., Zhang W. et Mitchison D. (2014). Mechanisms of Pyrazinamide Action and Resistance. *Microbiology Spectrum*, 2(4):MGM2-0023-2013.

Zhang S. et Yew W. (2015). Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: update 2015. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 19(11):1276-1289

ANNEXES

Annexe 1 : Clairance éthique accordée au projet CANTAM I



Comité National d'Ethique National Ethics Committee



- N° d'enregistrement : FWA IRB00001954 BP 1937, Yaoundé. Tel.(237) 22 21 12 84
- Arrêté N° 079 /A/MSP/DS du 22 octobre 1987 portant création et organisation d'un Comité d'Ethique de la Recherche (CER) impliquant les êtres humains

Yaoundé, le 25 novembre 2008

AUTORISATION N° 056/CNE/DNMBB

CLAIRANCE ETHIQUE

Le comité a examiné ce jour, le protocole intitulé : « **APPLICATION OF GENOMIC APPROACHES IN THE CHARACTERISATION OF HUMAN AND BOVINE TUBERCLE BACILLI AND IMPLICATIONS FOR DISEASE CONTROL** » introduit par Prof. Vincent P. K. TITANI et collaborateurs.

Ce projet est digne d'intérêt ; puisque les résultats attendus pourraient alimenter les bases de données scientifiques sur lesquelles se baserait l'élaboration des nouvelles stratégies de suivi au Cameroun et ailleurs. La présente version du protocole revue est en droite ligne avec la réglementation de la recherche sur les sujets humains au Cameroun, et les principes éthiques protégeant les droits et la dignité des potentiels participants à la recherche. Pour toutes ces raisons, le comité autorise pour une durée d'un an, la mise en œuvre de ladite version revue et déposée par l'investigateur principal au comité national d'éthique.

L'investigateur principal est responsable du respect scrupuleux du protocole approuvé et ne devra y apporter aucun amendement aussi mineur soit-il sans avis favorable du comité national d'éthique. Il devra informer le plus tôt possible le Comité National d'Éthique, l'autorité sanitaire du Cameroun, et le promoteur du présent projet, de la survenue de tout incident grave, ou pouvant avoir des conséquences graves, survenant lors de la mise en œuvre du présent protocole. Il devra prendre toutes dispositions nécessaires pour que seuls les co-investigateurs présentés dans ce protocole et dont les CVs sont joints, soient impliqués à la mise en œuvre. Il devra admettre toutes descentes du Comité National d'Éthique pour suivi de la mise en œuvre dudit protocole. Il est tenu, immédiatement à la fin de ce projet, d'en déposer le rapport final au Comité National d'Éthique.

La présente clairance peut être retirée en cas de non respect de la réglementation en vigueur. La mise en œuvre du projet peut être suspendue en cas de survenue d'incident grave ou pouvant avoir de conséquences graves.





COMITÉ NATIONAL D'ÉTHIQUE
NATIONAL ETHICS COMMITTEE



N° d'enregistrement : FWA 000000100-1 01/10/17 Yaoundé. Tel : 2371 221 12 04
Arrêté N° 079 /A/MSP/MS du 22 OCTOBRE 1987 portant création et organisation d'un
Comité d'Éthique sur la recherche impliquant les êtres humains.
comprof@yahooh

Yaoundé le, 15 septembre 2009

AUTORISATION N° 112/CNE/SE/09

RENOUVELLEMENT DE LA CLAIRANCE ÉTHIQUE

Le Comité National d'Éthique a réexaminé ce 15 septembre 2009, l'amendement au projet de recherche intitulé : "APPLICATION OF GENOMIC APPROACHES IN THE CHARACTERISATION OF HUMAN AND BOVINE TUBERCLE BACILLI AND IMPLICATIONS FOR DISEASE CONTROL" introduit par le Prof. Vincent P. K. Titanji, Investigateur Principal du projet.

Le comité a pris acte du remplacement d'un co-investigateur absent, de l'introduction des nouveaux co-investigateurs dans le projet, et des accords de coopération avec l'Hôpital Régional de Buea et le Centre Pasteur du Cameroun. Ces modifications ne posent aucun problème éthique à la mise en œuvre du protocole approuvé. Pour ces raisons, le comité autorise pour une durée d'un an la continuité de ce protocole de recherche.

Les rapports intermédiaires et le rapport final du projet devront être soumis au comité d'éthique et aux autorités sanitaires du Cameroun à la fin de l'étude.

En foi de quoi le présent Renouvellement de la Clairance Éthique est décerné pour servir et valoir ce que de droit.



Le Président

Lazare KAPTUE

Annexe 2: Tableau des résultats des MIRU VNTR

Code Echantillon	MIRU 04		MIRU 40		VNTR 43 (ETRA)		VNTR 48	
	Taille (pdb)	Nombre de répétitions	Taille (pdb)	Nombre de répétitions	Taille (pdb)	Nombre de répétitions	Taille (pdb)	Nombre de répétitions
1	350	2	500	3	375	2	450	2
2	350	2	400	2	400	4	450	2
3	350	2	500	3	350	2	400	2
4	350	2	500	3	350	2	450	2
5	350	2	400	2	450	3	450	2
6	350	2	400	2	550	4	450	2
7	350	2	525	3	400	3	450	2
8	350	2	525	3	550	4	450	2
9	350	2	650	4	550	4	450	2
10	350	2	525	3	400	3	500	3
11	350	2	525	3	550	4	450	2
12	350	2	650	4	550	4	450	2
13	350	2	650	4	550	4	500	3
14	350	2	650	4	400	3	500	3
15	350	2	650	4	550	4	500	3
16	350	2	650	4	400	3	450	2
17	350	2	650	4	550	4	500	3
18	350	2	650	4	550	4	500	3
19	350	2	550	3	550	4	500	3
20	350	2	550	3	550	4	500	3
21	350	2	700	4	400	3	500	3
22	350	2	550	3	550	4	500	3
23	350	2	550	3	550	4	500	3
24	350	2	550	3	550	4	500	3
25	350	2	550	3	550	4	500	3
26	350	2	550	3	550	4	500	3
27	350	2	550	3	550	4	500	3
28	350	2	550	3	550	4	500	3
29	350	2	550	3	550	4	500	3
30	350	2	550	3	550	4	500	3
31	350	2	550	3	550	4	500	3
32	350	2	550	3	550	4	500	3
33	350	2	550	3	550	4	500	3
34	350	2	700	4	550	4	500	3
35	350	2	550	3	550	4	500	3
36	350	2	550	3	550	4	500	3
37	350	2	550	3	550	4	500	3
38	350	2	550	3	550	4	500	3
39	350	2	550	3	550	4	500	3
40	350	2	450	2	550	4	500	3

Annexe 3 : Tableau présentant la répartition de la population d'étude selon la résistance antituberculeux

	HIV+	HIV-	NC	OC	I		R		E		SM		OFL		KANN	
					S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R
Hommes	3	21	19	5	24	0	24	0	24	0	24	0	24	0	24	0
Femmes	7	9	15	1	15	1	16	0	16	0	15	1	16	0	16	0

NC : new case / nouveau cas

OC : old case / ancien cas

Annexe 4 : Tableau présentant des dénominations de chaque sub-cluster et leurs proportions respectives.

Dénomination du sub-cluster	Sc1	Sc2	Sc3	Sc4	Sc5	Sc6	Sc7
Proportion (%)	5	12,5	47,5	7,5	5	5	5

Légende : Sc = sub-cluster