

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Hassiba Benbouali de Chlef

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie



THÈSE

Présentée pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Génomique Microbienne

Par

Feriel BOUZIANE

Thème :

Mécanismes moléculaires de résistance aux antituberculeux chez *Mycobacterium tuberculosis*

Soutenue le 11/07/2024, devant le jury composé de :

Mohammed El Amine BEKARA	MCA	Université de Chlef	Président
Rachida ALLEM	Professeur	Université de Chlef	Directeur de Thèse
Belaid BOUAZZA	Professeur	Université de Tizi-Ouzou	Examinateur
Benali SETTI	Professeur	Université de Chlef	Examinateur
Mammar KHAMES	MCA	Université de Médéa	Examinateur
Mouna ZIANI	MCA	Université de Chlef	Examinatrice
Mohammed SEBAIHIA	Professeur	Université de Chlef	Invité d'honneur

2023-2024

Remerciements

Avant tout je remercie **Dieu, ALLAH tout puissant**, et miséricordieux, qui m'a donné la force, le courage et la patience d'accomplir ce Modeste travail

Je tiens à remercier ma directrice de thèse **Professeur Rachida ALLEM**, pour le temps, la patience, la disponibilité et la confiance qu'elle m'a témoignée en acceptant la direction scientifique de mes travaux.

Mes remerciements les plus respectueux s'adressent aux :

Professeur Mohammed SEBAIHIA, de m'avoir ouvert les portes afin de suivre cette formation doctorale, de m'avoir fait bénéficier de ses grandes compétences scientifiques et d'avoir fait l'honneur d'accepter de siéger dans ce jury comme membre invité.

Professeur Emmanuelle CAMBAU de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, permis d'intégrer l'équipe de bactériologie en France et d'avoir accepté de codiriger ce travail.

Professeur Djamel YALA, pour sa précieuse collaboration à l'institut Pasteur d'Alger.

Merci à toute l'équipe du laboratoire de bactériologie de l'hôpital Lariboisière à Paris en particulier **Sylvain KUMANSKI, Docteur Laurent RASKINE, Mme Isabelle DUPRIEZ, Mme Fabienne MEUNIER et Docteur Faiza MOUGARI** .

J'adresse mes remerciements au **Docteur Mohammed El Amine BEKARA**, qui a accepté de présider ce jury. Vous m'honorez en présidant ce jury et en évaluant mon travail. Merci pour votre temps, et veuillez accepter ma sincère gratitude et mon respect.

J'adresse mes remerciements également aux **membres du jury** ;

Professeur Belaid BOUAZZA, pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant d'être membre de mon jury de thèse. Je tiens à l'assurer de ma profonde reconnaissance pour l'intérêt qu'il porte à ce travail.

Professeur Benali SETTI, pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de me consacrer son temps en examinant le manuscrit. J'en suis honoré et je lui exprime ma profonde reconnaissance.

Docteur Mammam KHAMES , pour l'honneur qu'il m'a fait pour sa participation à mon jury de thèse. Je tiens à l'assurer de ma profonde reconnaissance pour l'intérêt qu'il porte à ce travail.

Docteur Mouna ZIANI, je vous remercie d'avoir accepté d'évaluer ce travail ; vous avez tout mon respect et ma profonde gratitude.

Je remercie également, Monsieur le vice doyen de la post graduation, **Docteur Abderrezak Kamel TOUBAL**, pour son professionnalisme et sa disponibilité avec les doctorants.

Dédicace

Je dédie tout particulièrement ce modeste travail à ma défunte **Grand-Mère MAMA DIDA** qui m'a toujours encouragé.

A **mes chers parents**, qui ont été toujours là pour moi, pour leur soutien inconditionnel, qui grâce à eux je suis là aujourd'hui.

A **mes chers enfants** « **Neila Ilyana** » et « **Mohamed Nael** », et **mon cher époux** « **Zico** ».

A **mes chers petits frères** « **Mohamed** », « **Walid** » et « **Nassim** »

A **mon grand-père** « **Papa Sido** », à **ma chère tante** « **Nanou** » et **mon oncle** « **Moun** »

A **ma meilleure amie et soeur** « **Anfoula** » et **ma belle-sœur** « **Feriel** »,

Merci à tous pour votre présence et votre amour. Je vous aime tellement ma famille, sans vous je ne serai jamais arrivé.

Table des matières

Remerciements
Dédicace.....
Résumé
Abstract
ملخص.....
Publication et communication :
Liste des abréviations.....
Liste des tableaux
Liste des figures
Introduction générale.....	1
I. Synthèse bibliographique.....	4
1.1 <i>Historique et généralités sur la maladie et l'agent de la tuberculose</i>	<i>4</i>
1.2 <i>Taxonomie de Mtb.....</i>	<i>5</i>
1.3 <i>Caractères bactériologiques de Mtb</i>	<i>6</i>
1.4 <i>Enveloppe mycobactérienne.....</i>	<i>7</i>
1.5 <i>Génome de Mtb</i>	<i>8</i>
1.6 <i>Facteurs de virulence de Mtb.....</i>	<i>8</i>
1.7 <i>Réservoir et transmission de Mtb.....</i>	<i>9</i>
1.8 <i>Etapes de développement de la tuberculose.....</i>	<i>9</i>
1.8.1 <i>Primo-infection tuberculeuse</i>	<i>9</i>
1.8.2 <i>Infection tuberculeuse latente.....</i>	<i>9</i>
1.8.3 <i>Tuberculose active.....</i>	<i>10</i>
1.8.3.1 <i>Tuberculose pulmonaire</i>	<i>11</i>
1.8.3.2 <i>Tuberculose extra-pulmonaire.....</i>	<i>12</i>
1.9 <i>Facteurs de risque de développement de la tuberculose active</i>	<i>13</i>
1.10 <i>Diagnostic de la tuberculose.....</i>	<i>13</i>
1.10.1 <i>Diagnostic clinique.....</i>	<i>14</i>
1.10.2 <i>Radiographie thoracique</i>	<i>14</i>
1.10.3 <i>Examen microscopique de frottis</i>	<i>15</i>
1.10.4 <i>Méthode de diagnostic par culture</i>	<i>15</i>
1.10.5 <i>Méthodes de diagnostic moléculaire</i>	<i>16</i>
1.10.5.1 <i>Tests basés sur la PCR.....</i>	<i>16</i>
1.10.5.2 <i>Tests basés sur les sondes linéaires.....</i>	<i>18</i>
1.10.5.3 <i>Tests basés sur LAMP</i>	<i>19</i>

1.10.6 Tests immunologiques.....	20
1.10.6.1 Détection des anticorps.....	21
1.10.6.2 Détection des antigènes.....	21
1.10.7 Nouveaux tests de diagnostic.....	21
1.10.7.1 Tests basés sur les CRISPR.....	21
1.10.7.2 Tests basés sur la spectrométrie de masse.....	22
<i>1.11 Traitement de la tuberculose.....</i>	<i>23</i>
1.11.1 Traitement de la tuberculose latente.....	23
1.11.2 Traitement de la tuberculose active.....	24
1.11.3 Traitements des <i>Mtb</i> multirésistantes.....	25
<i>1.12 Résistance de <i>Mtb</i> aux antibiotiques.....</i>	<i>26</i>
1.12.1 Résistance intrinsèque.....	26
1.12.2 Résistance acquise de <i>Mtb</i> aux antibiotiques.....	30
<i>1.13 Antituberculeux, modes d'action et mécanismes de résistance.....</i>	<i>30</i>
1.13.1 Antituberculeux de première ligne.....	30
1.13.2 Antituberculeux de deuxième ligne.....	34
1.13.3 Nouveaux antituberculeux.....	37
1.13.4 Mécanisme de multirésistance aux antituberculeux chez <i>Mtb</i>	41
<i>1.14 Méthodes de détection de la résistance aux antituberculeux chez <i>Mtb</i>.....</i>	<i>41</i>
1.14.1 Méthodes phénotypiques.....	41
1.14.2 Méthodes génotypiques.....	42
1.14.2.1 Tests basés sur la PCR.....	42
1.14.2.2 Tests basés sur LPA.....	42
1.14.2.3 Tests basés sur LAMP.....	43
1.14.2.4 Tests basés sur le séquençage du génome.....	44
1.14.2.5 Tests basés sur la spectrométrie de masse.....	46
<i>1.15 Typage des souches de <i>Mtb</i>.....</i>	<i>46</i>
1.15.1 Méthodes de typage des souches de <i>Mtb</i>	47
1.15.2 Lignées majeures du complexe <i>M. tuberculosis</i>	51
<i>1.16 Épidémiologie de la tuberculose.....</i>	<i>52</i>
<i>1.17 Mesures de prévention et de contrôle de la tuberculose.....</i>	<i>53</i>
1.17.1 Vaccination.....	53
1.17.2 Stratégies internationales de lutte contre la tuberculose.....	54
II. Matériel et méthodes.....	56
2.1 Lieu, période et population d'étude.....	56
2.2 Prélèvements.....	56
2.3 Identification microscopique par coloration de Ziehl-Neelsen.....	56
2.3.1 Protocole.....	57
2.4 Isolement de <i>Mtb</i>	59

2.4.1 Décontamination des échantillons.....	59
2.4.2 Culture de <i>Mtb</i> sur milieu solide.....	59
2.4.3 Analyse des résultats de la croissance.....	60
2.5 Identification de <i>Mtb</i>	60
2.6 Test phénotypique de sensibilité aux antibiotiques.....	60
2.7 Test génotypique de sensibilité aux antibiotiques.....	61
2.7.1 Tests de sondes linéaires.....	62
2.7.2 Séquençage des gènes conférant la résistance aux antituberculeux par la méthode Sanger.....	68
2.7.3 Séquençage NGS ciblé basé sur des amplicons.....	71
2.7.4 Typage des isolats de <i>Mtb</i> par MIRU-VNTR.....	77
III. Résultats.....	77
3.1 Caractéristiques des patients et des prélèvements.....	77
3.2 Isolement et identification de <i>Mtb</i>	77
3.3 Test phénotypique de sensibilité aux antibiotiques.....	78
3.4 Analyse génotypique de la résistance à la rifampicine et à l'isoniazide.....	81
3.5 Analyse génotypique de la résistance aux autres agents antituberculeux de première ligne et secondes lignes.....	84
3.6 Analyse génotypique de la résistance aux agents antituberculeux par séquençage de nouvelle génération basé sur des amplicons.....	87
3.7 Génotypage MIRU-VNTR.....	89
IV. Discussion.....	91
Conclusion générale.....	99
Références bibliographiques.....	101
ANNEXES.....	125

Résumé

La tuberculose, causée par *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), continue d'être un problème majeur de santé publique à l'échelle mondiale.

Les objectifs de cette étude étaient la caractérisation des profils phénotypiques et génotypiques ainsi que la diversité génétique de *Mtb* résistants aux antibiotiques isolés en Algérie.

Dix isolats de *Mtb* multirésistants (MDR-TB) et un isolat mono-résistant à l'isoniazide (MR-TB), isolés à partir de patients algériens atteints de tuberculose pulmonaire et extra-pulmonaire, ont été inclus dans cette étude.

La détermination des profils phénotypiques de résistance des isolats a été réalisée par la méthode de proportion indirecte (MPI) sur gélose. Les mutations associées à la résistance aux antituberculeux ont été mises en évidence par la combinaison des tests de sondes linéaires, GenoType® MTBDRplus v2 et GenoType®MTBDRsl v2, le séquençage par la méthode de Sanger et le séquençage de nouvelle génération ciblant des amplicons de 15 locus. La diversité génétique des isolats a été caractérisée par la méthode de génotypage MIRU-VNTR.

Les mutations les plus couramment associées à la résistance à la rifampicine (*rpoB* S531L), l'isoniazide (*katG* S315T et C15T dans le promoteur de *inhA*), la streptomycine (*rpsL* K43R, *gidB* V139A ou L16R et *rrs* A514C), l'éthambutol (*embB* M306V ou M306I), la pyrazinamide (*pncA* V155A ou T142M) et à l'ofloxacine (*gyrA* A90V), ont été identifiées. D'autres nouvelles et rares mutations ont été également trouvées dans les gènes *rpoB* (délétion 512-513-514), *katG* (S315R, M126I/R496L), *gidB* (V124G, E92A, V139A, G37V) et *gyrA* (P8A).

L'analyse MIRU-VNTR a révélé que les souches de *Mtb* les plus répandues dans cette étude appartenaient aux lignées Cameroon (36%), et de Haarlem (36%), suivi par les lignées LAM (18%) et S (9%).

Cette étude a établi, pour la première fois, les déterminants génétiques de résistances aux antituberculeux et la diversité génétique de la population de *Mtb* en circulation en Algérie. Bien que les résultats de cette étude puissent être utiles pour la mise en œuvre de mesures de contrôle de la tuberculose en Algérie, d'autres études d'épidémiologie moléculaire plus élargies sont nécessaires pour mieux comprendre l'épidémiologie de la tuberculose en Algérie.

Mots clés: Tuberculose; *Mycobacterium tuberculosis*; Résistance aux antibiotiques; Mutations associées aux résistances; Génotypage, Algérie.

Abstract

Tuberculosis, caused by *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), continues to be a major public health problem worldwide.

The objectives of this study were the characterization of the phenotypic and genotypic profiles as well as the genetic diversity of antibiotic-resistant *Mtb* isolated in Algeria.

Ten multidrug-resistant *Mtb* (MDR-TB) and one mono-isoniazid-resistant isolate (MR-TB), isolated from Algerian patients with pulmonary and extra-pulmonary tuberculosis, were included in this study.

Determination of the phenotypic resistance profiles of the isolates was carried out by the indirect proportion method on agar. Mutations associated with resistance to anti-tuberculosis drugs were identified by a combination of linear probe tests, GenoType® MTBDRplus v2 and GenoType® MTBDRsl v2, by the Sanger sequencing method and by amplicon-based next generation sequencing targeting 15 loci. The genetic diversity of the isolates was characterized by the MIRU-VNTR genotyping method.

Mutations most commonly associated with resistance to rifampicin (*rpoB* S531L), isoniazid (*katG* S315T and C15T in the *inhA* promoter), streptomycin (*rpsL* K43R, *gidB* V139A or L16R and *rrs* A514C), ethambutol (*embB* M306V or M306I), pyrazinamide (*pncA* V155A or T142M) and ofloxacin (*gyrA* A90V), have been identified.

Other novel and rare mutations were also found in the *rpoB* (deletion 512-513-514), *katG* (S315R, M126I/R496L), *gidB* (V124G, E92A, V139A, G37V) and *gyrA* (P8A) genes.

MIRU-VNTR analysis revealed that the most prevalent *Mtb* strains in this study belonged to the Cameroon and Haarlem lineages (36% each), followed by the LAM (18%) and S (9%) lineages.

This study established, for the first time, the genetic determinants of anti-tuberculosis drugs resistance and the genetic diversity of the *Mtb* population circulating in Algeria. Although the results of this study could be useful for the implementation of tuberculosis control measures in Algeria, other larger molecular epidemiology studies are necessary to better understand the epidemiology of tuberculosis in Algeria.

Keywords: Tuberculosis; *Mycobacterium tuberculosis*; Multidrug-resistance; Resistance-associated mutations; Genotyping; Algeria.

ملخص

السل هو مرض ناجم عن *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb)، والذي لا يزال يمثل مشكلة كبرى للصحة العامة على المستوى العالمي.

تضمنت أهداف هذه الدراسة تحديد السمات المظهرية والأنماط الجينية بالإضافة إلى التنوع الجيني لمضادات المتفطرة السلية المقاومة للمضادات الحيوية المعزولة في الجزائر.

تم تضمين عشرة عزلات من *Mtb* متعددة المقاومة (MDR-TB) وعزلة أحادية المقاومة للأيزونيازيد (MR-TB) للمرضى الجزائريين المصابين بالسل الرئوي وغير الرئوي في هذه الدراسة. تم تحقيق تحديد الأنماط الظاهرية لمقاومة العزلات باستخدام طريقة التناسب غير المباشر (MPI).

تم إثبات الطفرات المرتبطة بمقاومة السل كدليل من خلال الجمع بين اختبارات المسبار الخطية، GenoType® 2MTBDRplus v2 و GenoType® MTBDRsl v2، والتسلسل بواسطة طريقة سانجر وتسلسل الجيل الجديد من التضخيم في الموقع 15. تم تمييز التنوع الجيني للعزلات من خلال طريقة التتميط الجيني MIRU-VNTR. الطفرات الإضافية المرتبطة بمقاومة الريفامبيسين (*rpoB* S531L)، والأيزونيازيد (*katG* S315T et C15T) في المعزز (*inhA*)، والستربتومييسين (*gidB* V139A، *rpsL* K43R أو *L16R* et *rrs* A514C)، والثامبوتول (*embB* M306V أو *M306I*)، البيرازيناميد (*pncA* V155A أو *T142M*) والأوفلوكساسين (*gyrA* A90V)، تم تحديدهما. تم العثور أيضًا على طفرات جديدة ونادرة أخرى الجينات *rpoB* (الحذف 512-513-514)، (*katG* (S315R, M126I R496L)

(*gidB*، *gyrA* (P8A)، *gyrA* و (*V139A*، *E92A*، *V124G*، *G37V*). أظهر تحليل MIRU-VNTR أن طبقات MTB الأكثر تقدمًا في هذه الدراسة المرتبطة بخطوط الكاميرون (36٪) وهارلم (36٪) تليها خطوط لام (18٪) و س (9٪). هذه الدراسة قيد التنفيذ، لأول مرة، المحددات الوراثية لمقاومة السل والتنوع الوراثي لسكان MTB المتداولة في الجزائر. وبما أن نتائج هذه الدراسة فعالة في تنفيذ تدابير مكافحة السل في الجزائر، فإن الدراسات الأخرى لعلم الأوبئة الجزيئية بالإضافة إلى التوسعات ضرورية لفهم علم وبائيات السل في الجزائر.

الكلمات المفتاحية: السل؛ السل الفطري؛ مقاومة المضادات الحيوية؛ الطفرات المرتبطة بالمقاومات؛ الصفحة الجينية، الجزائر.

Publication et communication :

Ce travail a fait l'objet :

-d'une publication internationale :

First genetic characterisation of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Algeria.

Auteurs : Ferial Bouziane , Rachida Allem, Mohammed Sebahia, Sylvain Kumanski, Faiza Mougari., Wladimir Sougakoff, Laurent Raskine, Djamel Yala, Emmanuelle Cambau

Revue : Journal of Global Antimicrobial Resistance 19 (2019) 301–307

-d'une communication internationale:

Mécanismes de résistance aux anti-tuberculeux chez *Mycobacterium tuberculosis*.

Auteurs : Ferial Bouziane , Rachida Allem, Mohammed Sebahia, Sylvain Kumanski, Faiza Mougari., Wladimir Sougakoff, Laurent Raskine, Djamel Yala, Emmanuelle Cambau

1^{er} Congrès international et 10^{èmes} Journées nationales de la SAMIC – Mai, 2021, Hôtel Aurassi –Alger

Liste des abréviations

AC	Contrôle d'amplification
ADN	Acid Désoxyribonucléique
AMK	Amikacine
ARNr	ARN ribosomal
BAAR	Bacille Acido-Alcool-Résistant
BCG	Bacille Calmette-Guérin
BDQ	Bédaquiline
C°	Degré Celsius
CAP	Capréomycine
CC	Contrôle conjugué
CFX	Ciprofloxacine
CMT	Complexe <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats</i>
DHFS	dihydrofolate synthase
DHPS	Dihydropteroate synthase
DLM	Delamanide
DOTS	<i>Directly Observed Treatment Short-Course</i>
DR	<i>Direct Repeat</i>
EMB	Ethambutol
ERDR	<i>Ethambutol Resistance-Determining Region</i>
ETH	Ethionamide
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FQ	Fluoroquinolones
GC	<i>Guanine-Cytosine</i>
GFX	Gatifloxacine
INH	Isoniazide
IS	<i>Insertion Sequence</i> (Séquence d'insertion)
KAN	Kanamycine
LEFX	Lévofloxacine
LJ	Lowenstein-Jensen
LPA	<i>Line Probe Assay</i> (test d'hybridation inverse sur bandelette)
MDR	<i>Multi Drug Resistant</i> (multi-résistant)
MDR-TB	<i>Multiple Drug-Resistant Tuberculosis</i>
MXF	Moxifloxacine
MGIT	<i>Mycobacteria Growth Indicator Tube</i>
Min	Minute
MIRU	<i>Mycobacterial Interspersed Repetitive Units</i>
MIRU-VNTR	<i>Mycobacterial Interspersed Repetitive Units-Variable Number of Tandem Repeat</i>
MLVA	<i>Multiple Loci VNTR Analysis</i>
MNT	mycobactéries non tuberculeuses
MPI	Méthode de Proportion Indirecte
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MTBC	<i>Mycobacterium tuberculosis complex</i>
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
OFX	Ofloxacine
OMS	<i>Organisation mondiale de la Santé</i>
PAS	Acide <i>p</i> -aminosalicylique
Pb	paires de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Réaction de Polymérisation en Chaîne)

PGRS	<i>Polymorphic GC-Rich Repetitive Sequence</i>
PNB	<i>Para-Nitrobenzoic Acid</i> (acide para-nitro benzoïque)
POA	Acide pyrazinoïque
PTM	Pretomanide
PZA	Pyrazinamide
QRDR	<i>Quinolone Resistance-Determining Regions</i> (Régions déterminants la résistance aux quinolones)
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RIF	Rifampicine
RRDR	<i>Rifampicin Resistance Determining Region</i> (Région déterminant la résistance à la rifampicine)
SLI	<i>Second-Line Injectable</i> (agent injectable de deuxième ligne)
SLID	<i>Second-Line Injectable Drugs</i> (agents injectables de deuxième ligne)
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>
STR	Streptomycine
TCH	<i>Thiophene-2-Carboxylic Acid Hydrazide</i> (Acide Thiophène-2-Carboxylique)
TE	Tris-EDTA
trs/min	Tours par minute
UFC	<i>Unité formant colonie</i>
UICTMR	Union Internationale Contre la Tuberculose et les Maladies Respiratoires
VIH	<i>Virus de l'immunodéficience humaine</i>
VIO	Viomycine
VNTR	<i>Variable Number of Tandem Repeats</i>
WGS	<i>Whole Genome Sequencing</i>
XDR	<i>Extensively Drug-Resistant</i>
XDR-TB	<i>Extensively Drug-Resistant Tuberculosis</i>

Liste des tableaux

Tableau 1. Modes d'action et mécanismes de résistance des principaux agents antituberculeux	40
Tableau 2. Méthodes génotypiques de tests de sensibilité aux antibiotiques chez <i>Mtb</i>	44
Tableau 3. Interprétations des résultats de la coloration de Ziehl-Neelsen selon les recommandations de l'UICTMR.....	58
Tableau 4. Programme d'amplification par PCR.....	65
Tableau 5. Amorces utilisées pour l'amplification par PCR et pour le séquençage par la méthode de Sanger des 11 gènes de résistance.	68
Tableau 6. Mélange réactionnel de la PCR.....	69
Tableau 7. Mélange réactionnel de la PCR.....	73
Tableau 8. Protocole de préparation d'une courbe étalon.	75
Tableau 9. Mélange réactionnel de la PCR.....	78
Tableau 10. Phénotypes de résistances des isolats de <i>Mtb</i>	79
Tableau 11. Phénotype de résistances des isolats de <i>Mtb</i> et caractéristiques des patients et prélèvements.....	80
Tableau 12. Analyse génotypique de la résistance à la rifampicine et à l'isoniazide.....	82
Tableau 13. Analyse génotypique de la résistance à la streptomycine, ethambutol, pyrazinamide, ofloxacine, amikacine et la kanamycine.....	85
Tableau 14. Comparaison des résultats génotypiques obtenus par le séquençage sanger et le séquençage nouvelle génération.....	88

Liste des figures

Figure 1. Représentation schématique de l'enveloppe mycobactérienne	8
Figure 2. Aperçu de l'infection à <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	11
Figure 3. Différentes méthodes de diagnostic de la tuberculose	14
Figure 4. Procédure du test genexpert mtb/rif.	17
Figure 5. Représentation de la séquence de la région centrale du gène <i>rpob</i> et l'emplacement des sondes moléculaires utilisées par le genexpert	17
Figure 6. Principe du test de sondes linéaires (LPA).	18
Figure 7. Schéma des résultats de tests de sondes linéaires LPA par genotype MTBC	19
Figure 8. Principe du test LAMP	20
Figure 9. Diagramme schématique du diagnostic de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> basé sur la technologie CRISPR.....	22
Figure 10. Schéma de fonctionnement de la spectrométrie de masse Maldi-Tof	23
Figure 11. Principaux traitements contre la tuberculose	26
Figure 12. Mécanismes d'action des antibiotiques et les mécanismes de résistances chez <i>MTB</i>	27
Figure 13. Exemples de mutations dans des gènes de <i>Mtb</i> conférant une résistance aux antituberculeux indiqués	30
Figure 14. Un aperçu schématique sur un flux de travail simplifié pour l'utilisation du wgs	45
Figure 15. Principe de la méthode de spolypotypage	47
Figure 16. Principe de la méthode de génotypage IS6110-RFLP	48
Figure 17. Principe du génotypage MIRU-VNTR	50
Figure 18. Phylogénie et distribution à l'échelle mondiale des six principales lignées du complexe <i>M. tuberculosis</i> associées à l'homme.	52
Figure 19. Estimations de l'incidence de la tuberculose en 2023	53
Figure 20. Évolution des stratégies mondiales de lutte contre la tuberculose	56
Figure 21. Représentation de la région déterminant la résistance à la RIF (RRDR) du gène <i>rpob</i> ciblé par le test genotype MTBDRplus	62
Figure 22. Schéma représentatif des bandelettes du test genotype MTBDRplus v2.0	63
Figure 23. Illustration simplifiée du principe et étapes du test genotype MTBDRplus	64
Figure 24. Interprétation des résultats du test genotype® MTBDRplus	67
Figure 25. Représentation schématique des amorces de la réaction PCR pour la préparation d'une bibliothèque d'amplicons « de base ».	72
Figure 26. Exemple d'amorces utilisées dans la PCR.....	73
Figure 27. Représentation schématique du processus de pyroséquençage par la technologie roche/454.....	77
Figure 28. Exemple d'un résultat positif d'un isolat de <i>Mtb</i> par examen microscopique après coloration de Ziehl-Neelsen	77
Figure 29. Exemple d'une culture positive d'un isolat de <i>Mtb</i> sur milieu LJ.	78
Figure 30. Fréquences de résistance aux antituberculeux.	79
Figure 31. Résultats du test genotype® MTBDRplus v2.....	81
Figure 32. Résultats du test genotype® MTBDRslv2.....	84
Figure 33. Dendrogramme obtenu après analyse MIRU-VNTR des 11 souches <i>Mtb</i>	89
Figure 34. Répartition géographique des lignées de <i>Mtb</i> identifiées dans cette étude par MIRU-VNTR.	90

Introduction générale

Introduction générale

La tuberculose, causée par *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), est un problème de santé publique mondial. L'organisation mondiale de la santé (OMS) estime qu'approximativement 2 milliards de personnes sont infectées par *Mtb*, parmi eux, 9 millions développent la tuberculose et plus de 1,5 million meurent de la tuberculose chaque année (WHO, 2023).

Malgré les objectifs fixés par l'OMS pour mettre un terme à l'épidémie de la tuberculose d'ici à 2030 (WHO, 2015), la maladie continue de sévir dans plusieurs régions du monde, y inclut l'Algérie. Le problème de la tuberculose est compliqué davantage par l'émergence de souches de *Mtb* résistantes aux antibiotiques, en particulier des souches multirésistantes (MDR-TB) et ultra-résistantes (XDR-TB) (Seung *et al.*, 2015).

Il a été estimé qu'environ un cinquième des patients tuberculeux dans le monde étaient porteurs d'isolats résistants à au moins un agent antituberculeux majeur (Dheda *et al.*, 2017). Les MDR-TB et XDR-TB constituent une menace réelle pour les mesures actuelles de lutte contre la tuberculose. Le traitement de la tuberculose dû aux MDR-/XDR-TB est beaucoup plus complexe (nécessitant une longue durée de traitement, d'environ deux ans) et coûteux (jusqu'à 50 à 200 fois le coût) que le schéma thérapeutique classique, et son taux d'échec est très élevé (environ 50 %) (Zhang *et al.*, 2021; Pedersen *et al.*, 2023). L'émergence de souches de *Mtb* pratiquement incurables est devenue une réalité et doit être prise au sérieux (Chattu & Soosanna, 2016; Dheda *et al.*, 2017).

La résistance aux antibiotiques chez *Mtb* est principalement acquise par accumulation de mutations chromosomiques spontanées dans les gènes cibles, qui affectent directement le site de liaison cible de l'antibiotique, interfèrent avec les enzymes mycobactériennes impliquées dans l'activation de l'antibiotique ou provoquent une surexpression de la protéine cible (Palomino & Martin, 2014).

Le diagnostic précoce de *Mtb* et de sa résistance aux antibiotiques constitue une base fondamentale pour le traitement approprié des patients tuberculeux et le contrôle de la tuberculose (Tawfick *et al.*, 2023).

Le traitement de la tuberculose devrait idéalement être guidé par les résultats des tests phénotypiques de susceptibilité aux antibiotiques. Cependant, les méthodes standards basées sur la culture sont laborieuses et très lentes, nécessitant plusieurs semaines pour obtenir des résultats. Pour surmonter les contraintes liées à l'exécution des tests phénotypiques de susceptibilité aux antibiotiques, plusieurs tests génotypiques ont été développés pour la détection rapide des mutations associées à la résistance aux antibiotiques et la prédiction des phénotypes de résistances chez *Mtb* (**Tawfick et al., 2023**). Un autre aspect de la gestion et du contrôle de la tuberculose est une bonne connaissance de l'épidémiologie de la maladie.

Durant les dernières deux décennies, le développement de plusieurs méthodes d'épidémiologie moléculaire basées sur la PCR et le séquençage de nouvelle génération, en combinaison avec des analyses génotypiques, phylogénétiques et épidémiologiques ont contribué de manière significative à la compréhension de l'épidémiologie de la tuberculose, en fournissant des informations sur les souches responsables d'épidémies et la dynamique de leur transmission (**Niemann & Diel, 2014; Varma-Basil & Nair, 2017; Mokrousov, 2019; Acharya et al., 2020**).

De plus, les méthodes de typage moléculaire, tels que le spoligotypage et MIRU-VNTR, ont permis de séparer le complexe *Mtb* en plusieurs lignées génétiques distinctes, qui présentent de grandes différences dans leur répartition géographique à l'échelle mondiale ainsi que dans leurs caractéristiques cliniques et épidémiologiques, particulièrement en matière de virulence, transmission et résistance aux antibiotiques (**Scott, 2004; Ei et al., 2016; Wiens et al., 2018**). Ainsi, la connaissance des lignées de *Mtb* en circulation dans un pays ou une région et la compréhension de leurs caractéristiques cliniques et épidémiologiques est un autre aspect très important dans la lutte contre la tuberculose.

De nombreuses études d'épidémiologie moléculaire ont été réalisées dans différents pays (**Pourostadi et al., 2018; Woodman et al., 2019; Chisompola et al., 2020; Kone et al., 2020**); par contre, de telles études font jusqu'à présent défaut en Algérie, pays à prévalence modérée de tuberculose, selon l'OMS (**WHO, 2023**). Les quelques études épidémiologiques sur la tuberculose en Algérie se sont limitées jusque-là sur la description du nombre de cas dans certaines régions du pays et les données démographiques associées (**Nacef et al., 2015; Selmane & L'Hadj, 2020**).

C'est pour cette raison que cette étude a été réalisée, et dont les objectifs généraux étaient de mieux comprendre l'épidémiologie moléculaire de la tuberculose humaine en Algérie, à travers la détermination des génotypes de souches de *Mtb* circulants ainsi que leurs profils phénotypiques et génotypiques de résistances aux antituberculeux.

Les objectifs spécifiques étaient :

- ✓ L'isolement et l'identification des isolats de *Mtb* à partir de patients atteints de tuberculose pulmonaire et extra-pulmonaire.
- ✓ La détermination des profils phénotypiques de résistance des isolats aux antituberculeux couramment utilisés dans le traitement de la tuberculose.
- ✓ La mise en évidence des mutations associées à la résistance aux antituberculeux par des méthodes génotypiques.
- ✓ La caractérisation de la diversité génétique des isolats de *Mtb*.

Synthèse bibliographique

I. Synthèse bibliographique

1.1 Historique et généralités sur la maladie et l'agent de la tuberculose

La tuberculose, une maladie infectieuse causée par *Mtb*, est l'une des 10 principales causes de décès dans le monde, responsable de près d'un million de décès chaque année. La tuberculose est une maladie ancienne qui frappe l'humanité depuis l'Antiquité et qui reste encore aujourd'hui un problème majeur de santé publique.

L'existence de la tuberculose semble aussi ancienne que celle du genre humain, il a été émis l'hypothèse qu'une progéniture précoce de *Mtb* aurait infecté les premiers hominidés en Afrique de l'Est il y a trois millions d'années (**Gutierrez et al., 2005**) ; et que l'ancêtre commun des souches modernes de *Mtb* aurait apparu pour la première fois il y a 20.000-15.000 ans (**Kapur et al., 1994; Brosch et al., 2002**).

Les premiers documents écrits décrivant la tuberculose, datant d'il y a 3300 et 2300 ans, ont été trouvés en Inde et en Chine. Dans la Grèce antique, la tuberculose était bien connue et appelée « Phtisis ». Hippocrate a décrit Phtisis comme une maladie mortelle en particulier chez les jeunes adultes, définissant avec précision ses caractères cliniques et les lésions pulmonaires tuberculeuses typiques. Des écrits de Claudius Galen ont été également retrouvés, un célèbre médecin de l'Empire Romain, où il décrit les symptômes associés à la tuberculose (**Barberis et al., 2017**).

Après le déclin de l'Empire romain, la tuberculose était répandue en Europe aux VIII^e et XIX^e siècles, comme en témoignent plusieurs découvertes archéologiques. Les médecins byzantins Aetius d'Amida, Alexandre de Tralles et Paul d'Égine ont décrit les formes pulmonaires et glandulaires de la tuberculose, tandis que dans l'Empire arabe, Avicenne a supposé la nature contagieuse de la tuberculose (**Barberis et al., 2017**).

A la fin du 18^e siècle et le début du 19^e siècle, l'endémie de tuberculose atteint son apogée en Europe, avec un taux de mortalité pouvant atteindre 900 décès pour 100 000 habitants par an, avec des taux plus élevés chez les jeunes. Cette crise sanitaire peut s'expliquer par les conditions sociales particulièrement problématiques, telles que des milieux de travail extrêmement défavorisés, la surpopulation, des installations sanitaires primitives, la malnutrition et d'autres facteurs de risque, étaient intimement associées à la maladie. La même progression de la maladie est observée en Amérique du Nord (**Barberis et al., 2017**).

En 1865, le médecin Jean-Antoine Villemin prouve expérimentalement la transmission de la tuberculose et affirme en conséquence que cette maladie, de nature jusqu'alors inconnue, est due à un microbe invisible avec les moyens techniques de l'époque. A l'époque, ses déclarations furent fortement controversées (**Daniel et al., 1994**).

En 1882, le célèbre bactériologiste Allemand, Robert Koch isola l'agent causal de la tuberculose par culture *in vitro* et l'a surnomma « Bacille de Koch » ou BK; puis il a pu reproduire la maladie chez les animaux avec la souche cultivée, prouvant que le germe est bien responsable de la maladie (**Gradmann, 2001**). Le 24 mars 1882, il présente ses résultats à la Société de physiologie de Berlin (Etiologie de la tuberculose) marquant une étape importante dans la lutte contre la tuberculose (**Barberis et al., 2017**). Le nom de *Mycobacterium tuberculosis* fut donné à la bactérie en 1886 (**Grange, 1982**).

1.2 Taxonomie de *Mtb*

Selon le *Bergey's Manual of systematic Bacteriology* 2005, l'espèce *Mtb* fait partie du règne des procaryotes (*Bacteries*), classe des *Actinobacteria*, sous-classe des *Actinobacteridae*, ordre des *Actinomycetales*, sous-ordre des *Corynebacterineae*, famille des *Mycobacteriaceae* et le genre *Mycobacterium* (**Tortoli, 2019**).

Le genre *Mycobacterium* est considéré comme l'unique genre de la famille des *Mycobacteriaceae*. Au sein de ce genre, il existe près de 188 espèces (**Rastogi et al., 2001**). Suite à des analyses de phylogénétique moléculaire, une révision du genre *Mycobacterium* a été proposée pour inclure, quatre nouveaux genres (*Mycolicibacter*, *Mycolicibacillus*, *Mycolicibacterium* et *Mycobacteroides*) dans la famille des *Mycobacteriaceae*, en plus du genre *Mycobacterium*. Un grand nombre d'espèces en ont été soit exclues ou reclassées dans les quatre nouveaux genres (**Tortoli, 2006; Tortoli, 2019; Tortoli et al., 2019**).

Bien que la publication des noms issus de ce remaniement ait été réalisée en conformité avec les critères de validité habituels dans ce domaine, il n'a pas rencontré l'adhésion de l'ensemble de la communauté scientifique. Certains y voient une source de confusion, sans remettre en cause la validité des travaux de l'équipe de Gupta, de ce fait les anciennes dénominations demeurent applicables (**Tortoli, 2006; Tortoli, 2019; Tortoli et al., 2019**).

En bactériologie médicale, il existe classiquement trois groupes de mycobactéries au sein du genre *Mycobacterium*:

- ✓ Les espèces du complexe *Mycobacterium tuberculosis* (CMT).
- ✓ L'espèce *Mycobacterium leprae* ou bacille de Hansen, agent de la lèpre.
- ✓ Les espèces environnementales, les espèces de mycobactéries atypiques ou non tuberculeuses (MNT) sont des pathogènes opportunistes de l'homme, à l'origine d'infections dans des contextes particuliers d'immunodépression ou d'iatrogénie.

Le CMT comprend diverses espèces et sous-espèces bactériennes étroitement apparentées, notamment :

- *Mycobacterium tuberculosis stricto sensu*: ou BK, principale sous-espèce du CMT et l'agent causal de la tuberculose humaine.
- *Mycobacterium africanum*: agent responsable, le plus souvent, de la tuberculose humaine en Afrique de l'ouest.
- *Mycobacterium bovis*: agent responsable de la tuberculose chez les bovins et parfois chez l'homme.
- *Mycobacterium microti*, *caprae* et *pinnipedii*: agents responsables de la tuberculose chez les rongeurs, les chèvres et les mammifères marins.
- *Mycobacterium canetti*: agent responsable de tuberculose humaine, cette sous-espèce est très rare, majoritairement isolée à Djibouti (**Coscolla & Gagneux, 2014; Tortoli, 2006; Tortoli, 2019; Tortoli et al., 2019**).

1.3 Caractères bactériologiques de *Mtb*

Les mycobactéries sont très différentes des autres bactéries tant par leur caractère morphologique, leur croissance, leur génotype que par leur sensibilité aux antibiotiques. L'appellation *Mycobacterium* est due à la croissance en pseudo mycélium. *Mtb* est un bacille fin de 2 à 4 µm de longueur et de 0,2 à 0,5 µm de largeur, légèrement incurvé, aux extrémités arrondies, aérobie ou microaérophile, immobile, non capsulé, non sporulé, catalase négative. *Mtb* fait partie des bactéries intracellulaires facultatives, sa croissance est particulièrement lente avec un temps de doublement qui varie entre 16 et 20 heures (**Woods & Washington, 1987**).

La croissance de *Mtb* est très lente avec un temps de génération moyen de 15 à 20 heures. Il s'agit d'un taux extrêmement lent par rapport à d'autres bactéries. De plus, *Mtb* est un germe exigeant et ne pousse pas sur les milieux de culture conventionnels, mais nécessite des milieux très enrichis. Le plus utilisé est un milieu solide sélectif à base d'œuf, qui est le milieu de Loewenstein-Jensen. Sur ce milieu, la bactérie produit des colonies de teinte crème-beige, sèches, à surface rugueuse, en chou-fleur, tout à fait caractéristiques (**Woods & Washington, 1987**).

1.4 Enveloppe mycobactérienne

Les mycobactéries sont caractérisées par la présence d'une enveloppe cellulaire épaisse et complexe, de composition et d'architecture inhabituelles. Cette particularité confère à l'enveloppe une extrême hydrophobie, une haute résistance aux agents chimiques et un caractère acido-alcool-résistant. Cette dernière propriété constitue la base de la technique de coloration de Ziehl Neelsen (**Brennan & Nikaido, 1995**).

Cette enveloppe comprend quatre couches principales (**Figure 1**): (i) la membrane interne, (ii) le complexe peptidoglycane-arabinogalactane (AGP), (iii) la membrane externe et (iv) la capsule. La membrane interne est constituée d'une bicouche de phospholipides et de glucides. La membrane externe est composée d'acides mycoliques, qui sont une série d'acides gras hydroxylés à longue chaîne et de poids moléculaire élevé, uniques aux mycobactéries, et jouent un rôle essentiel dans la structure centrale de la paroi cellulaire.

Ils sont hydrophobes et rendent l'organisme plus résistant aux dommages chimiques et à la déshydratation. Les acides mycoliques forment avec le complexe AGP un complexe appelé mAGP. À l'extérieur de la membrane externe se trouve une capsule composée principalement de glucides complexes tels que l' α -D-glucane et le D-arabino-D-mannane, de lipides et de protéines (**Figure 1**).

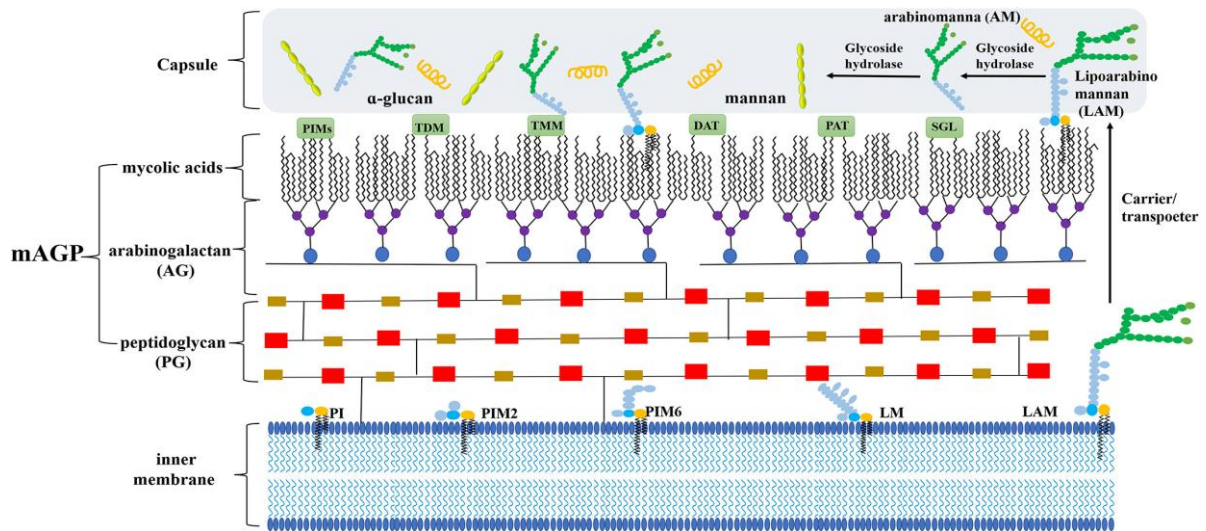


Figure 1 : Représentation schématique de l'enveloppe mycobactérienne (**Gong *et al.*, 2023**).

1.5 Génome de *Mtb*

La séquence complète du premier génome de *Mtb* a été publiée en 1998, il s'agit de celui de la souche virulente H73Rv (**Cole *et al.*, 1998**). Le génome est constitué d'un chromosome circulaire de 4 411 529 paires de bases (pb), riche en GC (65,6%), et code pour environ 4000 gènes.

Les mycobactéries du CMT partagent plus de 99,9% d'identité au sein de leur ADN génomique. Cependant, certaines régions de leurs génomes sont très polymorphes, soit en terme de leur structure, taille, nombre ou emplacement. Quatre groupes principaux peuvent être distingués, à savoir les séquences d'insertion (IS), les répétitions en tandem (RT), les répétitions directes (DR, *Direct Repeats*) intercalées par des espaceurs, et les séquences répétitives polymorphes riches en GC (PGRS, *Polymorphic GC-Rich Repetitive Sequence*) (**Bespiatykh *et al.*, 2021**).

1.6 Facteurs de virulence de *Mtb*

Comparativement à d'autres agents pathogènes bactériens, qui peuvent produire des facteurs de virulence spécifiques ou des toxines, la virulence de *Mtb* dépend principalement des composants de l'enveloppe cellulaire, particulièrement la teneur élevée en acide mycolique de la capsule externe, pour établir une infection et survivre dans une variété de cellules (macrophages alvéolaires), de tissus et d'environnements (**Smith, 2003; Forrellad *et al.*, 2013**).

1.7 Réservoir et transmission de *Mtb*

L'homme demeure actuellement le seul réservoir naturel de *Mtb*. La transmission est interhumaine et se fait par voie aérienne. Ce qui signifie donc que seule la forme pulmonaire de la tuberculose est transmissible. La tuberculose se transmet lorsqu'une personne atteinte d'une tuberculose pulmonaire en phase active tousse ou éternue, expulsant des fines gouttelettes contenant des bacilles tuberculeux dans l'air, qui sont ensuite inhalés par une autre personne dans les poumons. Moins souvent, le mode de transmission peut se faire suite à la formation d'aérosols lors de la manipulation de lésions tuberculeuses ou d'objets souillés dans les hôpitaux et laboratoire (Long & Schwartzman, 2014 ; Churchyard *et al.*, 2017).

1.8 Etapes de développement de la tuberculose

Le développement de la tuberculose peut passer par trois étapes : primo-infection tuberculeuse (PIT), infection tuberculeuse latente (ITL) et tuberculose active (TA) ; dont les présentations cliniques sont assez variées et dépendent d'un certain nombre de facteurs liés à l'hôte et à la virulence de la souche en cause (Figure 2) (Sakamoto, 2012; Delogu *et al.*, 2013 ; Rahlwes *et al.*, 2023).

1.8.1 Primo-infection tuberculeuse

Le premier contact de *Mtb* avec un hôte est connu sous le nom de primo-infection tuberculeuse (PIT). Durant la PIT, les mycobactéries inhalées dans le poumon sont soit rapidement éliminées par le système immunitaire de l'hôte et l'infection sera résolue, ou entrent dans un état de latence, et dans les deux cas elles ne provoquent pas de maladie et l'infection passe donc inaperçue (Figure 2). La PIT se produit dans 90 % des individus immunocompétents. Cependant, durant la PIT, une immunité spécifique se développe et une réaction cutanée positive à la tuberculine peut être observée (Ryndak & Laal, 2019; Rahlwes *et al.*, 2023).

1.8.2 Infection tuberculeuse latente

Chez certains groupes de population (30%) la PIT peut se développer en infection tuberculeuse latente (ITL), un état dans lequel les humains sont infectés par *Mtb* sans aucun symptôme clinique (Rahlwes *et al.*, 2023). Durant l'ITL, les mycobactéries dans les alvéoles pulmonaires seront phagocytées par les macrophages alvéolaires. Les macrophages se rassemblent en petits amas avec d'autres cellules immunitaires pour former des granulomes,

qui enveloppent les bactéries pour limiter les lésions tissulaires et la dissémination des mycobactéries (**Figure 2**). Ce granulome (avec une zone centrale de nécrose caséuse) contenant des bactéries est appelé lésion primaire ou foyer de Ghon (**Delogu et al., 2013**). Chez la plupart des individus infectés, le foyer de Ghon entre dans un état de latence. Cet état est connu sous le nom de TP.

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime qu'un quart de la population mondiale est infecté de manière latente par *Mtb* (**WHO, 2018**). La durée de l'ITL est variable, chez les personnes en bonne santé l'ITL peut durer toute leur vie ; alors que chez 5 à 10% de personnes l'ITL pourrait progresser vers une tuberculose active à un moment donné de leur vie (**Kiazyk & Ball, 2017; Shah & Dorman, 2021 ; Rahlwes et al., 2023**).

1.8.3 Tuberculose active

La tuberculose active survient soit après quelques semaines suite à une PIT, ou le plus souvent, après des mois ou des années suite à une réactivation d'une ITL, due à une immunosuppression chez l'hôte, conduisant à une maladie symptomatique et à une transmission à un nouvel hôte pour démarrer un nouveau cycle d'infection. Durant la TP, les granulomes dans le poumon contenant les mycobactéries se désagrègent pour former des aérosols qui peuvent infecter d'autres personnes par expectoration (**Figure 2**).

Les personnes avec une ITL représentent un important réservoir de nouveaux cas de tuberculose active, en effet, la réactivation de l'ITL est la cause la plus courante de tuberculose active, représentant 90% des cas de tuberculose active. La TA affecte généralement certaines sous-populations qui présentent certains facteurs de risque de de la tuberculose active, comme les patients immunodéprimés (infectés par le VIH), les personnes âgées ou les enfants de moins de 5 ans, les personnes atteintes de maladies pulmonaires chroniques, les fumeurs et les personnes qui injectent les drogues par voie intraveineuse (**Sakamoto, 2012; Rahlwes et al., 2023**).

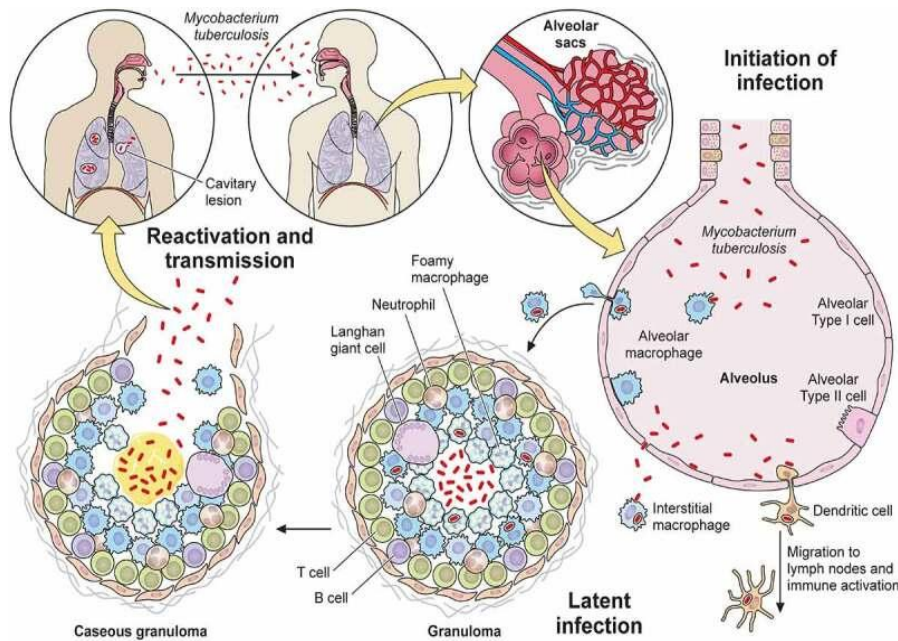


Figure 2 : Aperçu de l'infection à *Mycobacterium tuberculosis*.

Quand les bactéries pénètrent dans l'espace alvéolaire des poumons, elles seront phagocytées par les macrophages alvéolaires. Les macrophages, les cellules dendritiques et d'autres cellules immunitaires se rassemblent en petits amas pour former des granulomes qui enveloppent les bactéries. La tuberculose active survient soit après une primo-infection, soit après une réactivation due à un déficit immunitaire, conduisant à une maladie symptomatique et à une transmission à un nouvel hôte pour démarrer un nouveau cycle d'infection (Rahlwes *et al.*, 2023).

La tuberculose affecte généralement les poumons; cependant, tous les organes peuvent être infectés. Il existe donc deux types de manifestations cliniques de la tuberculose active, la tuberculose pulmonaire (TP) et la tuberculose extra-pulmonaire (TEP) (Delogu *et al.*, 2013 ; Sharma *et al.*, 2023).

1.8.3.1 Tuberculose pulmonaire

La tuberculose pulmonaire (TP) est la forme clinique la plus fréquente de la tuberculose active (présente dans plus de 85 % des cas). Comme elle est aussi la forme principale de la dissémination des bacilles.

Les symptômes de la TP dans les poumons évoluent progressivement et s'aggravent en quelques semaines. Ils peuvent inclure : toux, crachats de sang ou de mucus, douleurs thoraciques, douleurs respiratoires ou de toux, fièvre, frissons, sueurs nocturnes, perte de poids, perte d'appétit, fatigue et malaise (Delogu *et al.*, 2013 ; Sharma *et al.*, 2023).

1.8.3.2 Tuberculose extra-pulmonaire

La tuberculose affecte principalement les poumons, mais dans certaines conditions, la bactérie peut se propager des poumons à d'autres organes pour causer la tuberculose extra-pulmonaire (TEP). La TEP représente environ 15 à 20% de tous les cas de tuberculose active dans le monde. Les enfants en bas âge courent un risque plus élevé de développer une TEP (**Kandola & Meena, 2014; Cantres-Fonseca *et al.*, 2018; Singh *et al.*, 2018**).

La TEP résulte de la propagation hématogène et lymphatique des bacilles tuberculeux vers d'autres organes, pour créer ainsi de nouveaux foyers infectieux. Bien que n'importe quel organe peut être atteint de TEP ; cependant, la TEP qui affecte la peau, les os et les muscles est la plus courante. La TEP de la tête et du cou comprend la méningite (cerveau), la lymphadénite cervicale (cou), la tuberculose oculaire (œil) et buccale (bouche et langue).

La TEP du thorax comprend la pleurésie (pleure) et la péricardite (péricarde). La TEP de l'abdomen et du système génito-urinaire comprend la tuberculose abdominale (tractus gastro-intestinal, péritoine, ganglion lymphatique et viscères, tels que le foie, la rate et le pancréas) et génito-urinaire (reins et voies urinaires; organes reproducteurs masculins et féminins) (**Kandola & Meena, 2014; Cantres-Fonseca *et al.*, 2018; Singh *et al.*, 2018**).

La TEP connue sous le nom de tuberculose miliaire est une forme mortelle de tuberculose disséminée développée par propagation hématogène à partir d'un locus primaire. Elle peut affecter les nourrissons, les jeunes enfants et les personnes âgées présentant des comorbidités prédisposantes, telles que la malnutrition, l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), le traitement par immunosuppresseurs, le diabète, l'insuffisance rénale chronique et les tumeurs malignes (**Ray *et al.*, 2018**).

Puisqu'il existe plusieurs formes de TEP, les symptômes de ces formes dépendent des organes touchés. La plupart des cas présentent des symptômes systémiques tels que la fièvre, une perte de poids, des sueurs nocturnes et du malaise ainsi que des symptômes spécifiques en fonction de l'organe touché (**Kandola & Meena, 2014; Cantres-Fonseca *et al.*, 2018; Singh *et al.*, 2018**).

Contrairement à la TP, la TEP n'est pas transmissible, sauf si elle est associée à une TP. En général, la TEP est plus difficile à diagnostiquer que la TP et nécessite souvent des procédures invasives pour obtenir des échantillons de tissus et/ou de liquides (**Lam *et al.*, 2016**).

1.9 Facteurs de risque de développement de la tuberculose active

Comprendre les facteurs de risque de la tuberculose et leur prévalence est une importante étape dans le contrôle et la prévention de la maladie. Le développement de la tuberculose est un processus multifactoriel et complexe qui implique un grand nombre de facteurs de risque (Davies, 2005; Lönnroth *et al.*, 2009; Narasimhan *et al.*, 2013).

Les groupes à haut risque comprennent les personnes immunodéprimées, les personnes en contact étroit avec des personnes atteintes de tuberculose active, les enfants, les personnes âgées, les personnes vivant dans des zones où la TB est endémique, les personnes mal nourri, les personnes qui vivent ou travaillent dans de mauvaises conditions, le personnel de soin, les personnes travaillant dans des conditions de surpeuplement (employés et résidents de certaines institutions telles que les prisons, les internats et les établissements d'hébergement pour personnes âgées), patients atteints de maladies chroniques (diabète, certains types de cancer, maladies rénales chroniques), les patients sous traitement aux corticostéroïdes, les fumeurs, les sans-abri, les alcooliques et les toxicomanes (Davies, 2005; Lönnroth *et al.*, 2009; Narasimhan *et al.*, 2013).

1.9 Diagnostic de la tuberculose

La détection de *Mtb* est un élément essentiel dans le contrôle de la tuberculose. Le diagnostic est important non seulement pour le patient, mais aussi pour le grand public, car un traitement et une prise en charge rapide du patient réduira la propagation de l'agent infectieux dans la communauté.

Dans la plupart des pays du monde, le diagnostic de la tuberculose est consacré exclusivement aux patients atteints de la TA. Les outils de diagnostic de la TA comprennent principalement la présence de symptômes et signes cliniques caractéristiques de la maladie, la radiographie thoracique, l'examen microscopique de frottis, la culture des mycobactéries et, plus récemment, les méthodes moléculaires et immunologiques (Figure 3) (Chegou *et al.*, 2011; Shenai, 2015; Caulfield & Wengenack, 2016; Dong *et al.*, 2022 ; Huang *et al.*, 2022).

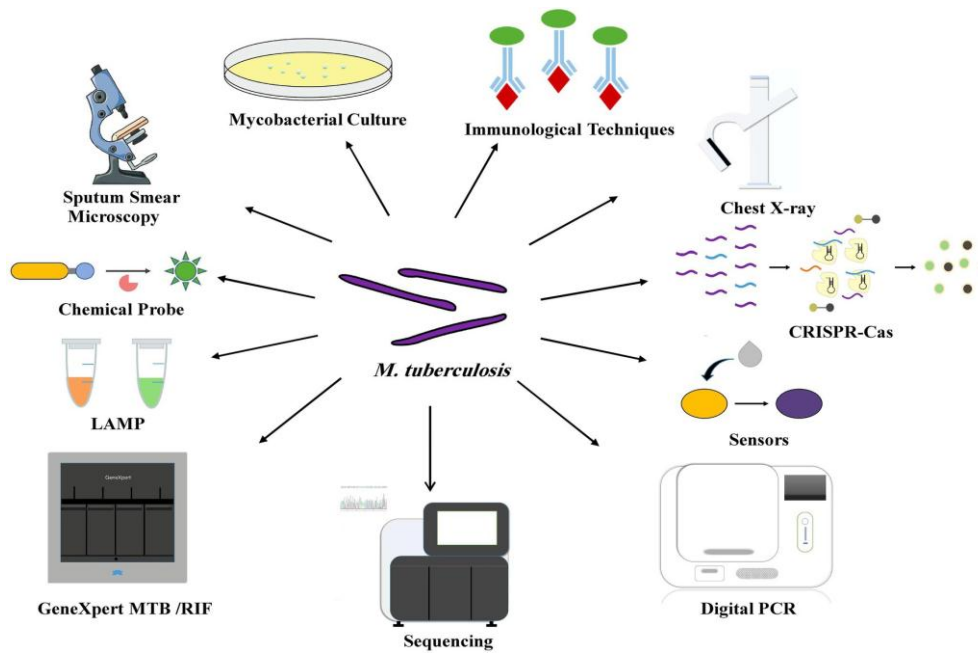


Figure 3 : Différentes méthodes de diagnostic de la tuberculose (Dong *et al.*, 2022)

1.10.1 Diagnostic clinique

La tuberculose touche principalement le système respiratoire inférieur ; par conséquent, les patients présentent généralement les symptômes et signes d'une maladie pulmonaire. Les principaux symptômes de la TP sont toux chronique productive, hémoptysie, fièvre légère, sueurs nocturnes, perte d'appétit, malaises, fatigue et perte de poids (Al-Humadi *et al.*, 2017). La tuberculose peut également se manifester sous forme extra pulmonaire, dont les symptômes dépendent des organes impliqués (Brodie & Schluger, 2005; Al-Zamel, 2009).

1.10.2 Radiographie thoracique

Les signes radiologiques courants de la TBP (infiltrats épars, cavitation, consolidation et épanchement pleural) sont observés dans des proportions variables selon les patients. Bien qu'utiles, les résultats radiologiques ne fournissent pas toujours une prédiction précise de la maladie (Burrill *et al.*, 2007; Piccazzo *et al.*, 2014; Nachiappan *et al.*, 2017).

1.10.3 Examen microscopique de frottis

Avec cette méthode, les mycobactéries dans les échantillons de crachat sont colorées par le colorant Ziehl-Neelsen (ZN) et examinés sous microscope optique. Les mycobactéries apparaissent comme des bâtonnets roses ou rouges. Bien que cette méthode soit rapide et peu coûteuse, elle manque à la fois de sensibilité et de spécificité. De plus, la microscopie ne permet pas la distinction entre les différentes espèces de mycobactéries, ou entre formes viables et non viables de *Mtb*, ou entre *Mtb* sensibles ou résistants aux antibiotiques. Cependant, dans de nombreux pays en voie de développement, l'examen microscopique de frottis a été, et toujours reste la principale, ou généralement la seule méthode de diagnostic de la tuberculose disponible (Singhal & Myneedu, 2015; Abdelaziz *al.*, 2016).

1.10.4 Méthode de diagnostic par culture

Avec la méthode de diagnostic par culture, *Mtb* est généralement cultivée et identifiée sur des milieux de culture soit solide, généralement le milieu de Lowenstein-Jensen, ou liquides. En général, les mycobactéries se développent plus rapidement dans un bouillon que sur des milieux gélosés.

La méthode de culture sur milieu Lowenstein-Jensen qui a été développée il y a plus de 100 ans, reste la méthode de référence en matière de diagnostic de la tuberculose dans le monde. Cependant, en raison de la croissance particulièrement lente du *Mtb*, la culture est très lente à produire des résultats. Le délai d'apparition des colonies est entre 3 et 4 semaines d'incubation en moyenne, au-delà de 8 semaines d'incubation, si aucune croissance n'est observée, la culture est considérée comme négative (Al-Zamel, 2009; Kassaza *al.*, 2014; Sarmiento *al.*, 2014).

Les méthodes de culture ont été améliorées par le développement de plateformes commerciales pour faciliter le test et réduire les délais des résultats à quelques jours. Trois de ces plateformes ont été approuvées par la Food and Drug Administration (FDA) pour la culture semi-automatique de mycobactéries en bouillon : le système BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson Microbiology Systems), le système VersaTREK (Trek Diagnostic Systems) et le MB/BacT Alert 3D (bioMérieux) (Martin *al.*, 2011; Yuksel *al.*, 2011; Procop, 2017). A noter, que toutes les approches basées sur la culture de *Mtb* sont également utilisées pour tester la sensibilité de la bactérie aux antibiotiques.

1.10.5 Méthodes de diagnostic moléculaire

Plus récemment, le développement des méthodes de diagnostic moléculaire a beaucoup amélioré le diagnostic de la tuberculose. Contrairement à l'examen microscopique de frottis et à la culture, les tests moléculaires ont montré des avantages considérables, elles sont plus spécifiques, sensibles et rapides, réduisant le durée du diagnostic, et permettent également la détection simultanée de *Mtb* et de la résistance aux antibiotiques.

Les tests moléculaires peuvent être réalisés par une variété de méthodes telles que la réaction en chaîne par polymérase (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) conventionnelle, la PCR en temps réel (RT-PCR, *Real Time PCR*), les tests GeneXpert, les tests de sondes linéaires (LPA, *Line Probe Assays*), le test d'amplification isotherme médiée par les boucles (LAMP, *Loop-Mediated Isothermal Amplification assay*), la spectrométrie de masse et le séquençage du génome entier (Dicks & Stout, 2019; Machado *et al.*, 2019; Acharya *et al.*, 2020; MacLean *et al.*, 2020; Dong *et al.*, 2022).

1.10.5.1 Tests basés sur la PCR

GeneXpert MTB/RIF (Cepheid) est un système de diagnostic automatisé, basé sur la PCR nichée en temps réel, pour la détection simultanée de *Mtb* et la résistance à la rifampine (RIF) directement dans les crachats, produisant des résultats en 2 heures (Figure 4). C'est la méthode de détection de *Mtb* la plus utilisée en diagnostic moléculaire (Bunsow *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2015; Dorman *et al.*, 2018).

Les amorces du test GeneXpert MTB/RIF amplifient une région « centrale » de 81 pb du gène *rpoB*, codant pour la sous-unité β de l'ARN polymérase, puis la région « centrale » amplifiée est hybridée avec cinq sondes qui se chevauchent (A, B, C, D et E) afin de détecter les mutations associées à la résistance au RIF (Figure 5) (Bunsow *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2015; Dorman *et al.*, 2018). En 2010, l'OMS a approuvé l'utilisation du Xpert MTB/RIF dans les pays où la tuberculose est endémique (WHO, 2011).

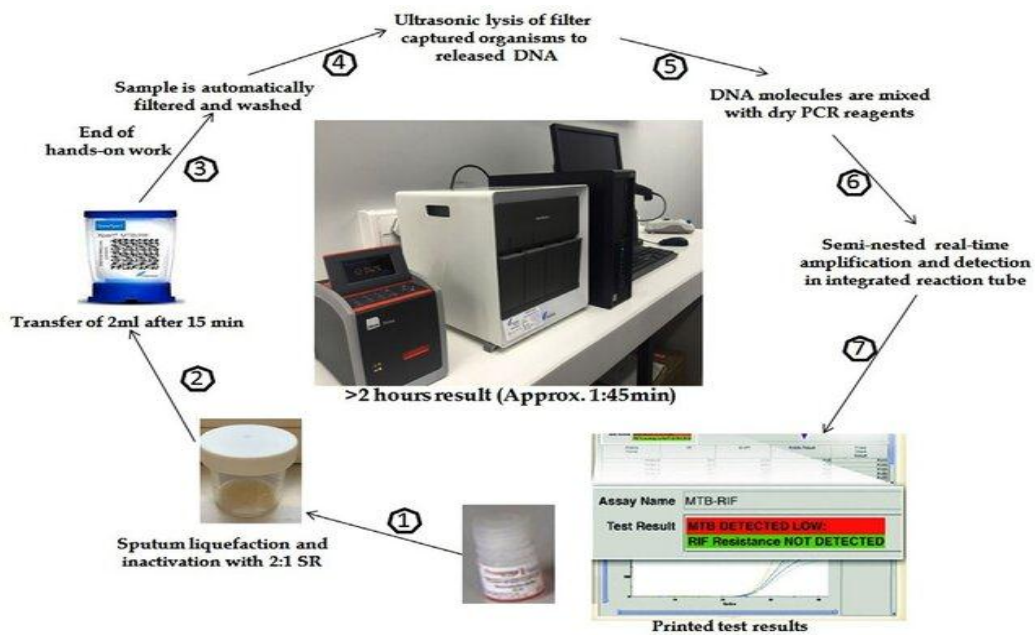


Figure 4 : Procédure du test GeneXpert MTB/RIF(Irfan & Bisht, 2022).

Mélanger un volume de l'échantillon de crachat avec un volume de réactif de traitement, puis incuber à température ambiante pendant 15 min. Transférer 2 à 3 ml du mélange dans la cartouche GeneXpert, puis charger la cartouche dans l'instrument. Les étapes d'extraction, d'amplification et de détection de l'ADN se déroulent automatiquement dans l'instrument, et à la fin, l'utilisateur reçoit le résultat du test .

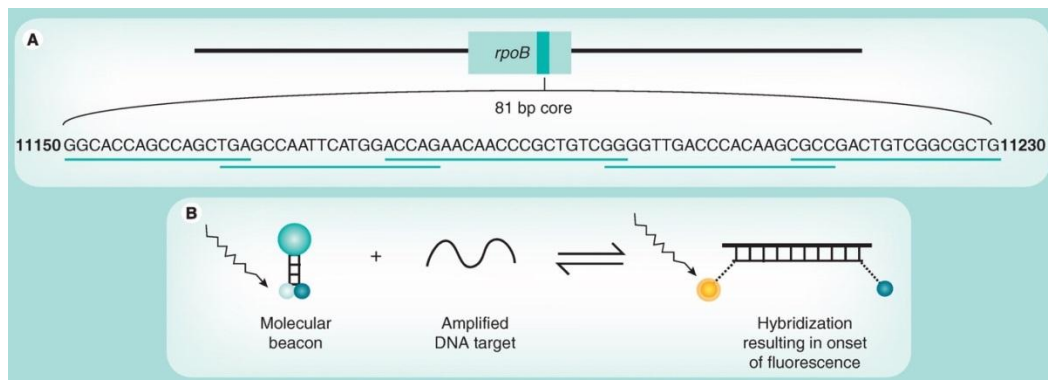


Figure 5 :Représentation de la séquence de la région centrale du gène *rpoB* et l'emplacement des sondes moléculaires utilisées par le GeneXpert (Lawn & Nicol, 2011).

1.10.5.2 Tests basés sur les sondes linéaires

Les tests de sondes linéaires (LPA, *Line Probe Assays*), appelés également tests d'hybridation inverse sur bandelette, utilisent des bandelettes en nitrocellulose contenant des sondes spécifiques à l'ADN de *Mtb*. Ces sondes ont été désignées afin d'identifier la bactérie, ou ses déterminants génétiques de résistance, ou les deux à la fois (Somoskovi, 2013; Acharya *et al.*, 2020).

Premièrement, les régions d'ADN d'intérêts (ciblées par les sondes) sont amplifiées par PCR en utilisant des amorces marquées à la biotine, puis hybridées aux sondes fixées sur la bandelette. Après hybridation et lavage, un conjugué streptavidine-enzyme est ajouté (Figure 6). Celui-ci va se fixer à la biotine des ADN hybridés. Après une réaction enzymatique, les bandes sur la bandelette seront détectées par colorimétrie. Ce profil va permettre l'identification de la bactérie (Figure 7) (Somoskovi, 2013; Acharya *et al.*, 2013).

En 2008, l'OMS a certifié et approuvé le test de LPA comme méthode moléculaire pour le diagnostic rapide de la tuberculose et la détection simultanée de la résistance à la RIF et à l'INH (WHO, 2016).

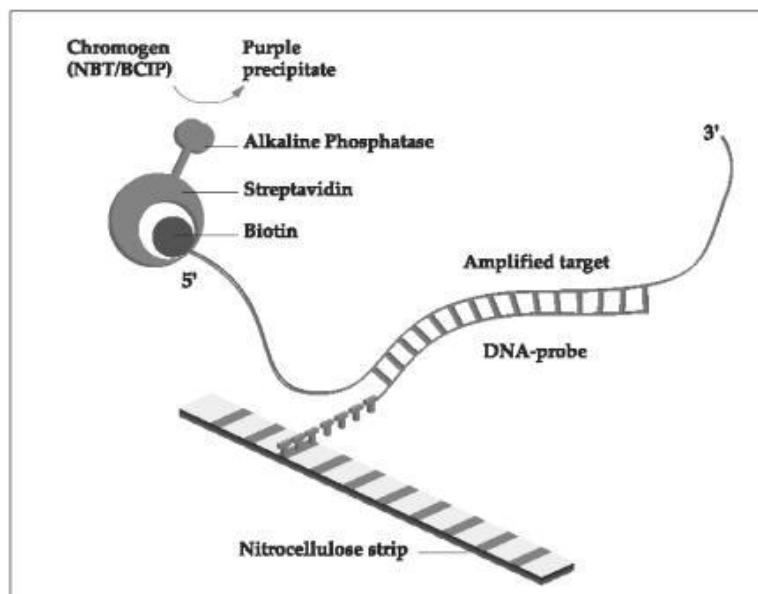


Figure 6 : Principe du test de sondes linéaires (LPA) (Sablon & Shapiro, 2005).

Les sondes immobilisées sur des bandelettes de membrane de nitrocellulose, permettant l'identification, sont représentées par des lignes parallèles. Des fragments d'ADN de la bactérie sont amplifiés et biotinylés, puis hybridés aux sondes immobilisées. La streptavidine marquée à la phosphatase alcaline est ensuite ajoutée et va se lier à la biotine des ADN hybridés. L'incubation avec un chromogène entraîne le développement de la couleur.

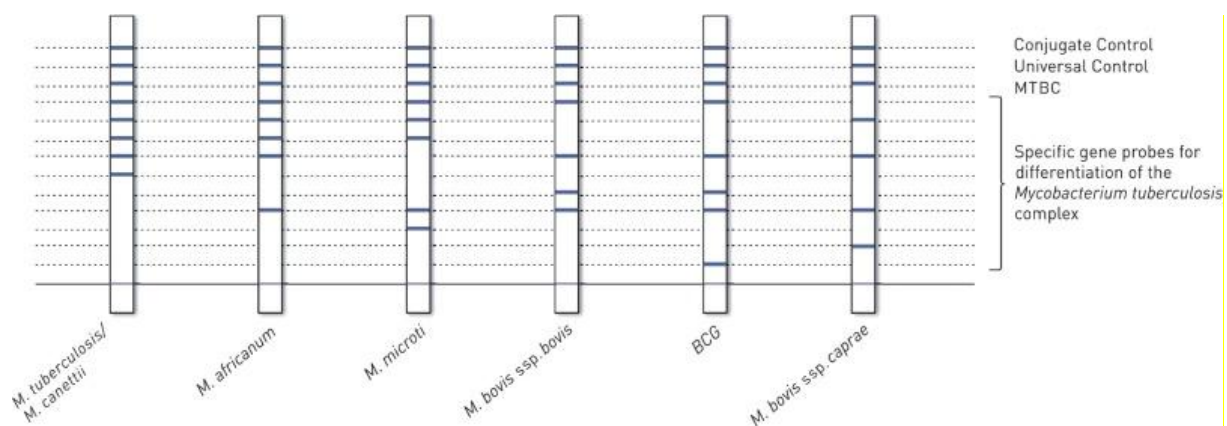


Figure 7 : Schéma des résultats de tests de sondes linéaires LPA par GenoType MTBC (Hain Lifescience) (Caulfield & Wengenack, 2016).

Les bandes sur les bandelettes représentent les positions des sondes d'ADN pour détecter et différencier les membres du complexe *M. tuberculosis*.

Récemment, plusieurs tests LPA pour la détection simultanée de *Mtb* et sa résistance aux antibiotiques directement dans des échantillons cliniques ont été développés et plusieurs d'entre eux sont disponibles sous forme de kits commerciaux, dont les plus utilisés actuellement sont les tests GenoType® (Hain Lifescience, Allemagne), commercialisés sous différentes versions (MTBC, MTBDR, MTBDRplus V1 et V2 et MTBDRsl V2) et le test INNO-LiPA®Rif.TB (Fujirebio Innogenetics, Belgique) (Cirillo *et al.*, 2004 ; Ling *et al.*, 2008; Tortoli & Marcelli, 2007 ; Mäkinen *et al.*, 2006).

1.10.5.3 Tests basés sur LAMP

Le test d'amplification isotherme médiée par les boucles (LAMP, *Loop-Mediated Isothermal Amplification assay*) est un type de test d'amplification d'acide nucléique, simple, rapide, spécifique et peu coûteux, qui utilise l'ADN polymérase et un ensemble d'amorces spécialement conçues pour détecter la présence d'ADN pathogène dans un échantillon de patient (Notomi *et al.*, 2000).

Dans cette méthode, 4 amorces différentes spécialement conçues pour reconnaître 6 régions distinctes sur un gène cible. L'amplification n'aura lieu que si toutes les amorces se lient à leurs régions cibles (**Figure 8**). Contrairement à la PCR, la LAMP est beaucoup plus simple à réaliser car la réaction se déroule à une température constante, entre 60 à 65°C, éliminant ainsi le besoin d'un thermocycleur (Pham *et al.*, 2018).

De nombreux kits LAMP sont désormais disponibles sur le marché pour l'identification de *Mtb* en ciblant certains gènes, tels que *gyrB*, *rrs*, *rimM*, *hspX*, *mpb64*, *sdaA* ou *IS6110* (Eddabra & Ait Benhassou, 2018).

Le kit TB-LAMP, développé par Eiken Chemical Company Ltd (Tokyo, Japon), a été conçu pour détecter *Mtb* en ciblant le gène *gyrB* et la séquence d'insertion (IS, *Insertion Sequence*) 6110 dans le génome de *Mtb*. TB-LAMP a été recommandé par l'OMS depuis 2016 comme test de remplacement de l'examen microscopique des frottis pour le diagnostic de la tuberculose pulmonaire (OMS, 2016).

Comparé aux autres tests génotypiques, TB-LAMP, est un test manuel, moins cher, relativement rapide (nécessite moins d'une heure) et plus facile à utiliser et interpréter les résultats (le résultat peut être lu à l'œil nu sous une lumière ultraviolette) ; des qualités qui rendent ce test idéal pour ses applications dans les pays à ressources limités (Pham *et al.*, 2018).

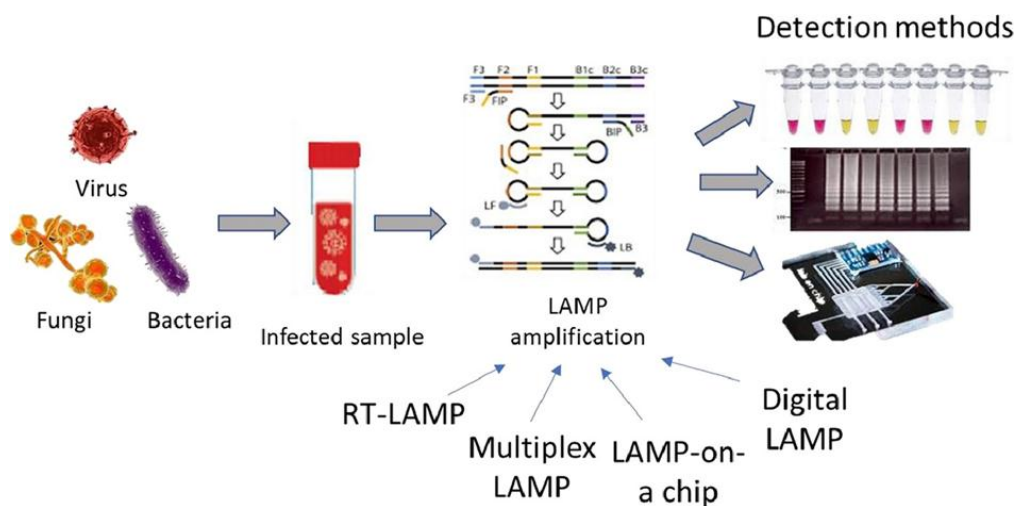


Figure 8 : Principe du test LAMP (Garg *et al.*, 2022).

1.10.6 Tests immunologiques

Les tests immunologiques reposent sur la détection des anticorps contre des antigènes de *Mtb* (tests sérologiques), ou détection des antigènes spécifiques à *Mtb* (Chan *et al.*, 2000; Teixeira *et al.*, 2007; Halliday *et al.*, 2019).

1.10.6.1 Détection des anticorps

Les tests sérologiques reposent sur la détection des anticorps des antigènes *Mtb* par la réponse immunitaire humorale. Le test le plus connu est le test cutané à la tuberculine. Cependant, ce test ne peut pas distinguer entre une vaccination par le BCG ou une infection à *Mtb*.

En raison de la faible sensibilité et spécificité du diagnostic, l'OMS ne recommande aucun test sérologique commercial pour le diagnostic de la tuberculose (**Pottumarthy *et al.*, 2000; Steingart *et al.*, 2011**).

1.10.6.2 Détection des antigènes

La présence d'antigènes de *Mtb* peut être détectée à partir d'échantillons cliniques par la technique de dosage d'immunoabsorption par enzyme liée (ELISA, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) ou par des tests immunochromatographiques. Plusieurs tests basés sur la détection de différents antigènes de *Mtb* ont été développés. Les principaux avantages des tests immunologiques sont leur rapidité (les résultats peuvent être disponibles en quelques heures) et leur simplicité (**Bekmurzayeva *et al.*, 2013; Halliday *et al.*, 2019**).

1.10.7 Nouveaux tests de diagnostic

1.10.7.1 Tests basés sur les CRISPR

Une nouvelle technologie qui vient d'être appliquée au diagnostic de la tuberculose est basée sur les systèmes CRISPR-cas (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) ou courtes répétitions en palindrome regroupées et régulièrement espacées (**Ai *et al.*, 2019**). Les tests CRISPR-MTB permettent la détection soit de l'ARN de *Mtb* avec cas13a (REF), soit de l'ADN avec cas12a dans des échantillons cliniques (**Figure 9**) (**Qi *et al.*, 2022**). Les tests CRISPR-MTB ont le potentiel d'améliorer le diagnostic de la tuberculose, en montrant une grande spécificité et sensibilité. De plus, ils peuvent aider à surmonter les obstacles au diagnostic dans les pays à ressources limitées en raison de leurs coûts, simplicités et rapidités (**Qi *et al.*, 2022**).

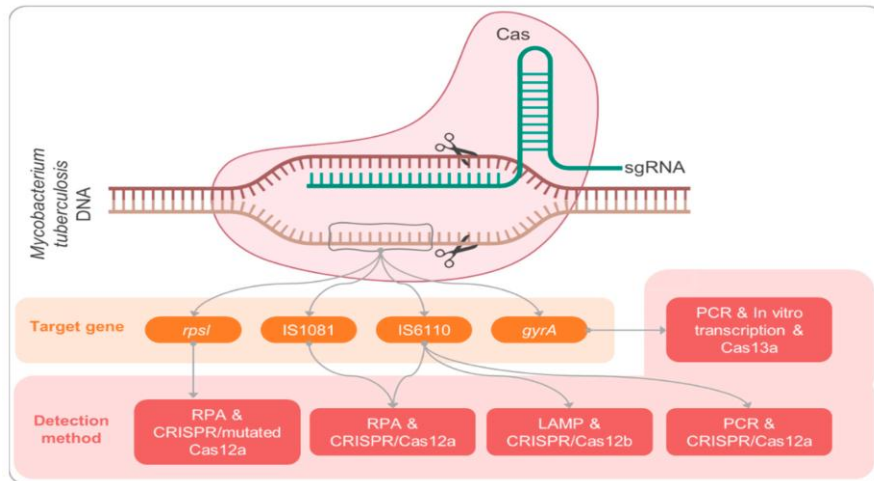


Figure 9 : Diagramme schématisique du diagnostic de *Mycobacterium tuberculosis* basé sur la technologie CRISPR (Qi *et al.*, 2022).

1.10.7.2 Tests basés sur la spectrométrie de masse

Ces dernières années, la spectrométrie de masse MALDI-TOF MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight Mass Spectrometry*) est devenue largement utilisée pour l'identification des bactéries à partir d'échantillons cliniques et plus récemment appliquée à l'identification des mycobactéries (Neuschlova *et al.*, 2017 ; Torres-Sangiao *et al.*, 2021).

Cette technique détermine la composition en protéines d'un isolat bactérien afin de l'identifier. Les protéines extraites sont mélangées à une matrice et ionisées au laser. Les protéines ionisées sont séparées en fonction de leur rapport masse/charge, ce qui donne lieu à un spectre de pics protéiques spécifique à l'organisme étudié (Figure 10). Ce spectre sert d'« empreinte digitale » qui peut être comparée à une base de données de spectres d'isolats identifiés. Il existe actuellement deux plateformes MALDI-TOF agréées par l'Administration des Aliments et des Médicaments des USA (FDA, *Food and Drug Administration*) pour l'identification des mycobactéries, le MALDI Biotyper (Bruker Corporation) et le Vitek MS (BioMérieux) (Torres-Sangiao *et al.*, 2021).

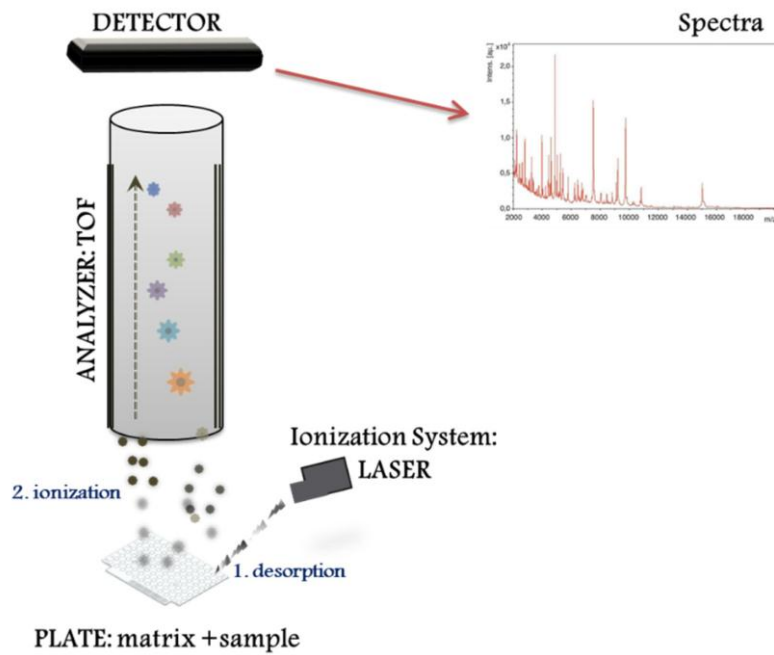


Figure 10 : Schéma de fonctionnement de la spectrométrie de masse MALDI-TOF (Torres-Sangiao *et al.*, 2021).

1.11 Traitement de la tuberculose

1.11.1 Traitement de la tuberculose latente

Le traitement préventif des cas de la TL a pour objectif de diminuer le risque de l'évolution vers une tuberculose active et de réduire le risque de transmission de l'infection à d'autres individus.

Les patients avec une TL ne sont pas systématiquement traités, en particulier dans les pays en voie de développement. La décision de traiter les personnes atteintes de TL doit prendre en compte le rapport bénéfice/risque pour chaque sujet, comme doit prendre en compte également la toxicité potentielle du traitement en fonction de l'âge et les comorbidités du patient (Fox *et al.*, 2017).

L'OMS recommande le traitement des patients atteints de TL présentant un haut risque d'évolution vers une TA (Kim & Kim, 2018), comme par exemple, les individus récemment contaminés, les patients VIH positif et les migrants arrivants des pays endémiques au cours des 2 années précédentes (Ai *et al.*, 2016). Avant d'entamer le traitement prophylactique de la TL, le clinicien doit exclure une TA chez le patient (Hasan *et al.*, 2018).

En effet, le traitement de la TA implique généralement l'usage de quatre antibiotiques anti-tuberculeux afin de réduire la probabilité de résistance acquise aux antibiotiques, alors que pour la TL, une monothérapie ou une bithérapie est recommandée, ceci s'explique par le risque faible d'induire une résistance étant donné le petit nombre de bactéries impliquées dans la TL (**Chaisson, 2003**).

Parmi les schémas thérapeutiques de la TL, une monothérapie à base de l'INH pendant au moins 6 à 9 mois (5 mg/kg/jour). Cette monothérapie permettrait de réduire l'incidence de la TL avec un effet protecteur estimé de 60 à 90% (**Kim & Kim, 2018**). Depuis, plusieurs nouveaux schémas thérapeutiques ont été évalués dans le cadre d'essais cliniques, et donc des traitements alternatifs de courte durée pour la TL ont été établies, comme une bithérapie à base de RIF et INH pendant 3 mois, ou de la RIF en monothérapie pendant 4 mois (**Sterling et al., 2020**).

1.11.2 Traitement de la tuberculose active

Le traitement standard actuel contre la TA a été mis en œuvre dans les années 1980. Le régime thérapeutique standard dure 6 mois, Il se déroule en deux phases. Il repose sur l'administration des antituberculeux de première ligne, RIF, INH, ethambutol (EMB), pyrazinamide (PZA) (**Figure 11**) (**Silva et al., 2020**).

La première phase d'une durée de 2 mois, est dite intensive, le patient suit une quadrithérapie antituberculeuse, associant les anti-tuberculeux suivants : INH, RIF, PZA et EMB, soit le schéma dit « 2HRZE » (**Brett et al., 2020**). Cette phase a pour objective d'éliminer la majorité des bacilles présents dans les lésions, afin d'éviter la sélection de mutants résistants aux antibiotiques et de supprimer rapidement la contagiosité du malade (**Nahid et al., 2016**). La posologie est la suivante : INH 5 mg/kg, RIF 10 mg/kg, EMB 15-20 mg/kg et PZA 15-30 mg/kg, quotidiennement (**Hall et al., 2009**).

La seconde phase est dite, phase de continuation, d'une durée de 4 mois, consiste en associant 2 antituberculeux majeurs : INH et RIF, aux mêmes posologies, selon le schéma « 4HR » (**Brett et al., 2020**). Cette seconde étape a pour objectif d'assurer la stérilisation complète des lésions, ceci afin d'éviter la rechute de la maladie (**Nahid et al., 2016**).

En résumé, le traitement de la TA est axé sur l'amélioration de l'état clinique du patient, empêcher l'émergence de la résistance aux antibiotiques et la prévention de la rechute de la maladie (**Rabahi et al., 2017**).

De plus, il existe un intérêt réel à utiliser une polychimiothérapie, en effet, un patient traité avec de l'INH et RIF aura une très faible chance de développer des mutants résistants à chaque antibiotique (double mutant), puisque, la survenue de chaque mutation étant indépendante **(Veziris & Robert 2010)**.

L'association médicamenteuse pour traiter la tuberculose se présente sous deux formes dissociée et combinée (médicament combinant plusieurs antituberculeux). La forme combinée présente l'avantage d'assurer une meilleure observance, éviter une monothérapie et ainsi garantir l'effet synergique des différents antibiotiques. Leur inconvénient est l'impossibilité de moduler les doses en fonction du terrain du patient.

1.11.3 Traitements des *Mtb* multirésistantes

Mtb multi-résistantes (MDR-TB, *Multiple Drug Resistant Mtb*) sont définies comme les souches de *Mtb* résistantes à au moins deux des principaux antituberculeux de première intention, l'INH et la RIF. Les souches MDR-TB ont commencé à augmenter dès 1985 **(Vilcheze & Jacobs, 2014)**.

Parmi les souches MDR-TB, environ 9% sont ultra-résistantes (XDR-TB, *Extensively Durg Resistant Mtb*). XDR-TB est définie comme une souche de MDR-TB qui est également résistante à tous les FQ et à au moins un des trois antituberculeux injectables de deuxième ligne, AMK, KAN et CAP **(Millard et al., 2015)**.

Les XDR-TB sont plus difficile à traiter que les MDR-TB, et entraîne souvent une rechute ou un échec du traitement, constituent un véritable défi thérapeutique, nécessitant une chimiothérapie prolongée et coûteuse. Un patient infecté par une souche MDR-TB ou XDR-TB doit être traité avec des antituberculeux de deuxième ligne **(Figure 11)**.

Le schéma thérapeutique conventionnel de 18 à 24 mois a été reconduit et varie désormais entre 9 et 24 mois en fonction de l'éligibilité de chaque patient, comme les antécédents de tuberculose et l'exposition aux médicaments **(Figure 11) (Dookie et al., 2018)**. En plus de la durée du traitement qui est relativement longue, les anti-tuberculeux de deuxième intention utilisés pour traiter les MDR-TB et XDR-TB sont plus chers, moins efficaces et plus toxiques que les anti-tuberculeux de première intention. Par conséquent, les résultats du traitement de la MDR-TB sont médiocres, avec un taux d'échec d'environ 46% **(Jang & Chung, 2020)**.

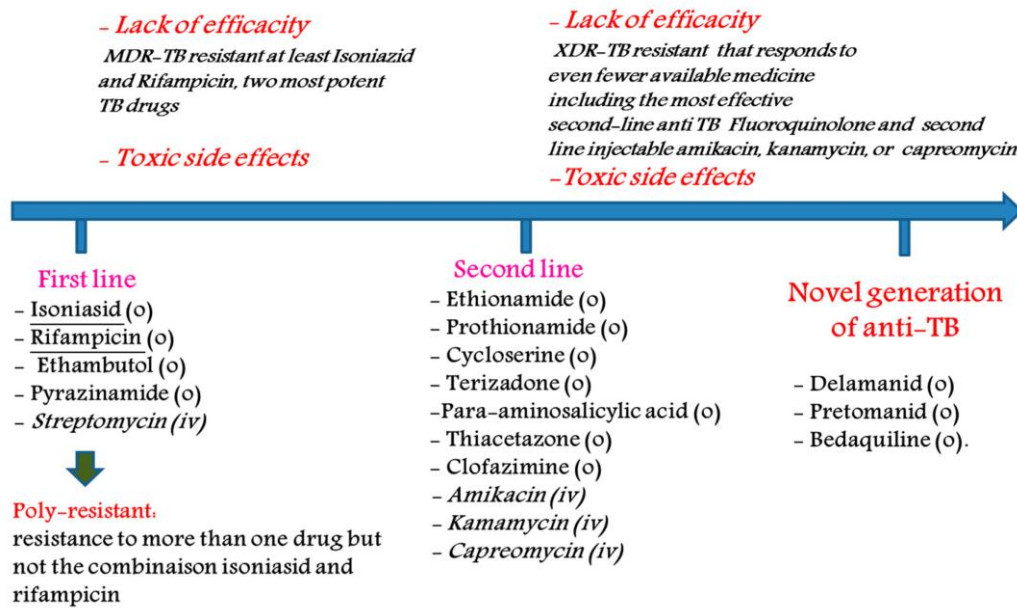


Figure 11: Principaux traitements contre la tuberculose (o : oral, iv : administration intraveineuse) (Mignani *et al.*, 2018)

1.12. Résistance de *Mtb* aux antibiotiques

La plupart des antibiotiques actuels contre la tuberculose sont utilisés depuis plus d'un demi-siècle. La mauvaise utilisation de ces antibiotiques a permis le développement de souches résistantes à un, plusieurs ou à tous les antibiotiques antituberculeux. Le quatrième rapport de l'OMS a estimé qu'à l'échelle mondiale 20% des nouveaux cas de tuberculose étaient résistants à un antibiotique, 5% étaient MDR-TB et 11% étaient résistants à la streptomycine (STR) (Wright & Zignol, 2008).

A l'instar des autres bactéries, *Mtb* a développé plusieurs mécanismes différents de résistance aux antibiotiques. Ces mécanismes sont de type intrinsèque ou acquis, et dont des exemples sont décrits dans les sections qui suivent (Nasiri *et al.*, 2017).

1.12.1 Résistance intrinsèque

La résistance intrinsèque, ou naturelle, fait référence à une propriété innée d'une espèce bactérienne qui rend un antibactérien, ou un groupe d'antibactériens, moins efficace. Il est important de noter que les mécanismes de résistance intrinsèques sont généralement présents chez tous (ou presque tous) les membres d'une espèce bactérienne (Blair *et al.*, 2015 ; Peterson & Kaur, 2018).

Les membres du genre *Mycobacterium* sont connus depuis longtemps pour leur résistance intrinsèque à un large éventail d'antibiotiques, tels que les β -lactamines, les macrolides, les cyclines, les sulfamides et les glycopeptides (Veziris *et al.*, 2005 ; Gygli *et al.*, 2017). Les mécanismes de résistance intrinsèque de *Mtb* aux antibiotiques sont multiples (Poulton & Rock 2022) et sont montrés dans la **Figure 12** et sont décrits ci-dessous.

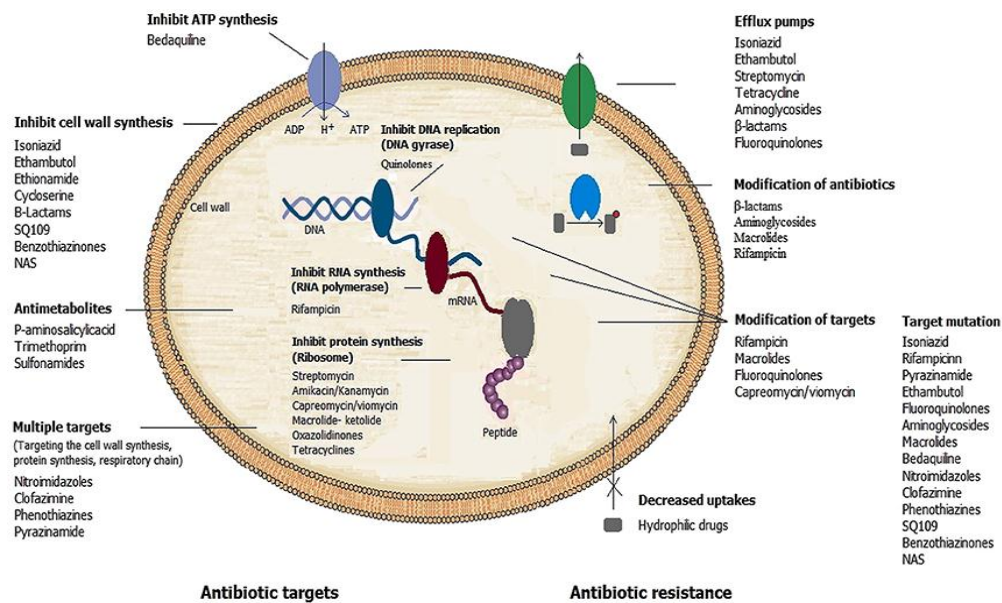


Figure 12 : Mécanismes d'action des antibiotiques et les mécanismes de résistances chez *Mtb* (Nasiri *et al.*, 2017).

- Imperméabilité de la paroi cellulaire

Le niveau élevé de résistance intrinsèque des mycobactéries à un ensemble diversifié d'antibiotiques a généralement été attribué à la relative imperméabilité de l'enveloppe mycobactérienne, distincte de celle des espèces bactériennes classiques à Gram négatif ou à Gram positif (Gygli *et al.*, 2017; Poulton & Rock, 2022).

En plus de l'imperméabilité de l'enveloppe mycobactérienne, *Mtb* est également doté d'autres mécanismes de résistance intrinsèque aux antibiotiques, y inclut les pompes à efflux, la modification de la cible des antibiotiques et l'inactivation des antibiotiques (**Figure 12**).

- Pompes à efflux

Outre l'imperméabilité de la paroi cellulaire, les pompes à efflux sont des protéines membranaires qui expulsent activement un large éventail de composés à travers l'enveloppe bactérienne (**Figure 12**). Ces pompes à efflux sont responsables de la résistance intrinsèque des mycobactéries à de nombreux médicaments antituberculeux tels que les fluoroquinolones, la tétracycline, les aminosides (**Singh et al., 2020 ; Li et al., 2015 ; Nasiri et al., 2017**).

Cinq familles de pompes à efflux qui diffèrent selon leur organisation membranaire et la source d'énergie utilisée peuvent être distinguées : la famille des ABC transporteurs « ATP Binding Cassette », la superfamille des « Major Facilitator » (MFS), la famille des « Small Multidrug Resistance » (SMR), la famille « Multidrug And Toxic compound Extrusion » (MATE), et enfin, la famille des « Resistance Nodulation Division » (RND) (**Sun et al., 2014**). Les pompes d'efflux MFS, ABC, RND et SMR ont été identifiées chez *Mtb* (**Soni et al., 2020 ; Viljoen et al., 2017**).

Un grand nombre d'études ont démontré l'implication des pompes à efflux dans le développement de la résistance aux médicaments dans les isolats XDR-TB et MDR-TB (**2015a ; Singh et al., 2020**).

- Modification de la cible des antibiotiques

La résistance intrinsèque des mycobactéries à plusieurs antibiotiques importants peut également être due à la modification des sites cibles par des enzymes spécifiques (**Figure 12**). Par exemple, la protéine MurA, une des deux principales enzymes impliquées dans la biosynthèse du peptidoglycane, est normalement inhibée par l'antibiotique fosfomycine par formation d'une liaison covalente avec un résidu cystéine en position 115 dans son site actif. Cependant, *Mtb* est naturellement résistant à la fosfomycine, car ce résidu cystéine est substitué par un acide aspartique (**Alderwick et al., 2015 ; Moraes et al., 2015**).

Un autre exemple est celui du gène *erm37* de *Mtb* responsable de la résistance naturelle inductible aux macrolides, ce gène code pour une enzyme qui méthyle le site de liaison de l'érythromycine à l'ARNr 23S, modifiant ainsi la cible et empêchant la liaison des macrolides (**Andini & Nash, 2006 ; Madsen et al., 2005**).

De plus, les enzymes transpeptidases, impliquées dans la biosynthèse du peptidoglycane de la paroi bactérienne, sont inhibées par les β -lactamines. *Mtb*, possède deux types de transpeptidases, les D,D-transpeptidases et les L,D-transpeptidases. Les L,D-transpeptidases qui sont responsables de la biosynthèse de la majorité des peptidoglycanes de *Mtb*, sont

résistantes à l'action des antibiotiques de la famille des B-lactamines, les céphalosporines et les pénicillines. Cependant, cette enzyme est inactivée par les carbapénèmes, une autre classe des β -lactamines (**Gokulan et al., 2018 ; Tolufashe et al., 2019**).

En outre, les protéines de répétition de pentapeptidique, codées par le gène *mfpA* (*Mycobacterium fluoroquinolone resistance protein A*), confèrent une résistance intrinsèque aux quinolones en se liant à l'ADN gyrase (la cible) et la protègent de l'action des quinolones (**Hegde et al., 2005 ; Tao et al., 2013**).

- Inactivation enzymatique des antibiotiques

Mtb possède plusieurs enzymes capables modifier de antibiotiques de différentes classes, y compris les β -lactamines, les aminosides et les macrolides (**Figure 12**) (**Wang et al., 2006 ; Wivagg et al., 2014**). Par exemple, la résistance aux β -lactamines est principalement due à la production d'une β -lactamase de classe A codée par le gène chromosomique *blaC* (**Feiler et al., 2013**). *Mtb* code également au moins trois autres β -lactamases, à savoir BlaS, Rv0406c et Rv3677c, mais celles-ci possèdent des activités β -lactamases plus faibles (**Nguyen, 2016**).

Les β -lactamases *blaC* des mycobactéries ont un spectre de substrats étendu (BLSE) incluant les carbapénèmes, ces antibiotiques sont généralement résistants aux β -lactamases des autres bactéries pathogènes (**Hugonnet & Blanchard, 2007 ; Tremblay et al., 2010**). De plus, les inhibiteurs de la β -lactamase tels que l'acide clavulanique sont moins efficaces contre BlaC que d'autres enzymes de classe A (**Hugonnet & Blanchard, 2007**). Bien que les β -lactamases mycobactériennes puissent hydrolyser les carbapénèmes, un membre de la famille des carbapénèmes, le méropénème, a été signalé comme actif *in vitro* en association avec l'acide clavulanique sur les souches de *Mtb* ultra-résistante (**Hugonnet et al., 2009 ; Mainardi et al., 2011**).

La production de l'enzyme aminoglycoside 2'-N-acétyltransférase AAC (2') est impliquée dans la résistance aux aminosides chez *Mtb* (**Ainsa et al., 1997**). Cette enzyme est capable d'acétyler tous les aminosides connus portant le groupement 2' hydroxyle comprenant la néomycine, la kanamycine, la gentamycine, la tobramycine et la ribostamycine (**Vetting et al., 2002**).

1.12.2 Résistance acquise de *Mtb* aux antibiotiques

La résistance acquise aux antibiotiques fait référence à la résistance à un antibiotique particulier auquel la bactérie était auparavant sensible. Puisqu'il n'existe aucune preuve d'un transfert horizontal de gènes chez *Mtb*, toutes les résistances acquises aux antibiotiques (de première et de deuxième ligne) chez *Mtb* sont dues à des mutations spontanées dans les cibles de certains antibiotiques, ou dans des enzymes activatrices de certains antibiotiques, ou les deux à la fois (**Figure 13**) (**Brossier et al., 2017a ; Smith et al., 2013**).

De nombreuses mutations dans des gènes conférant un haut niveau de résistance acquise aux antituberculeux ont été bien caractérisées chez *Mtb* (**Figure 13**).

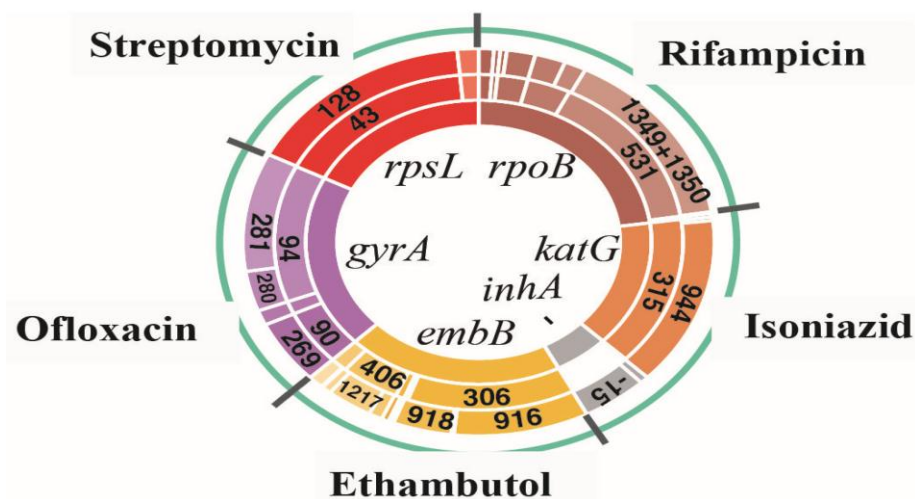


Figure 13 :Exemples de mutations dans des gènes de *Mtb* conférant une résistance aux antituberculeux indiqués (**Jia et al., 2021**)

1.13 Antituberculeux, modes d'action et mécanismes de résistance

Les antituberculeux, leurs modes d'action et les mécanismes de leurs résistances sont montrés dans le **Tableau 1** et sont détaillés ci-dessous.

1.13.1 Antituberculeux de première ligne

- Rifampicine

La RIF, l'un des majeurs antituberculeux, est un produit semi-synthétique dérivé d'un composant naturel, la rifamycine, obtenue à partir de *Ammycolatopsis mediterranei* (**Nigam et al., 2014**). La RIF est un antituberculeux bactéricide et à large spectre qui agit en inhibant

l'initiation de la transcription de l'ADN en se liant de façon covalente à la sous-unité β de l'ARN polymérase (codée par le gène *rpoB*) (Levin & Hatfull, 1993).

Cette molécule fut introduite dans le traitement anti-tuberculeux en 1972. Sa forte activité bactéricide sur *Mtb* en a fait une composante clé de la thérapie anti tuberculeuse. La RIF a radicalement changé le traitement de la tuberculose. Son action rapide a permis d'écourter le traitement de 18 mois à 6 mois (Mitchison, 1992). La RIF est inscrite sur la liste des Médicaments essentiels de l'OMS à la 7^e édition de la Pharmacopée européenne.

Mécanisme de résistance à la rifampicine

Le mécanisme de résistance à la RIF a été le premier mécanisme caractérisé de résistance aux antituberculeux chez *Mtb* (Telenti *et al.*, 1993). La résistance à la RIF chez *Mtb* est due à des mutations dans le gène *rpoB*. Ces mutations surviennent chez *Mtb* avec une fréquence de $10^{-7/-8}$ (Zhang & Yew 2015). La majorité de ces mutations sont localisées dans une courte région de 81 pb, entre les codons 507-533, du gène *rpoB* appelée RRDR (*Rifampicin Resistance Determining Region*) (Dookie *et al.*, 2018). Les mutations dans les codons 531, 526 et 516 sont associées à un haut niveau de résistance à la RIF, alors que les mutations dans d'autres codons (511, 518, 522, 533) confèrent un bas niveau de résistance à la RIF (Hirani *et al.*, 2020).

La résistance à la RIF est considérée comme un marqueur de multirésistance chez *Mtb*, en effet, la mono-résistance à la RIF a rarement été reportée, 90% des souches de *Mtb* résistantes à la RIF sont aussi résistantes à l'INH (Ioannidis *et al.*, 2011). En plus d'une résistance de haut niveau à la RIF (CMI > 32 $\mu\text{g/ml}$), les mutations du gène *rpoB* entraînent également une résistance croisée avec toutes les rifamycines, et parfois la rifabutine (certaines souches résistantes à la RIF sont sensibles à la rifabutine) (Jamieson *et al.*, 2014).

L'absence de mutation dans la région RRDR du gène *rpoB* chez les isolats de MDR-TB, indique l'implication d'autres rares mutations en dehors de la région RRDR, ou l'existence d'autres mécanismes de résistance à la RIF inconnus (Zaw *et al.*, 2018).

- Isoniazide

Mécanisme d'action

L'INH est un antituberculeux synthétique de première ligne le plus largement utilisé. L'INH agit en inhibant la synthèse des acides mycoliques, un composant essentiel de la paroi cellulaire bactérienne. L'INH exerce un effet bactéricide sur les mycobactéries en croissance rapide (durant la TA) et un effet bactériostatique sur les bactéries dormantes (durant la TL)

(Zhang & Yew, 2015). L'INH est une pro-drogue, qui nécessite une étape d'activation par la catalase peroxydase (KatG) **(Jagielski et al., 2013)**. L'INH ainsi activé inhibe l'activité d'une énoyl-ACP réductase NADH-dépendante (InhA) impliquée dans la biosynthèse des acides mycoliques. **(Banerjee et al., 1994, Marrakchi et al., 2000).**

Mécanisme de résistance

En accord avec son mode d'action, les mécanismes de résistance sont associés à des mutations dans deux gènes *katG* et *inhA*. La substitution d'une serine par une tyrosine au niveau du codon 315 S315T du gène *katG* est la plus courante (chez 50 à 95% des isolats cliniques de *Mtb* résistants à l'INH) **(Zhang & Yew, 2009)**.

Les mutations dans le gène *inhA* confèrent également une résistance croisée vis à vis l'ETH, un antibiotique structurellement proche de l'INH **(Banerjee et al., 1994 ; Vilcheze & Jacobs, 2014)**. Plusieurs études ont rapporté la contribution de mutations dans d'autres gènes *kasA*, l'*oxyR-ahpC* et *furA-katG* dans la résistance de certains isolats à l'INH. Cependant, leurs rôles exacts dans la résistance à l'INH reste à démontrer **(Dookie et al., 2018)**.

La résistance à l'INH est la forme de résistance aux antituberculeux la plus rencontrée; elle se produit avec une fréquence de l'ordre de 10^{-6} , qui est beaucoup plus élevée que celle de la plupart des antituberculeux **(Siddiqi et al., 2007)**.

- Ethambutol

Mécanisme d'action

L'EMB interfère avec la synthèse de la paroi mycobactérienne par inhibition de l'enzyme arabinosyl transférase, impliquée dans la synthèse de l'arabinogalactan et du lipoarabinomannan, les polysaccharides majeurs de la paroi mycobactérienne (EmbB) **(Alcaide et al., 1997)**. Le gène *embB* qui code pour l'arabinosyl transférase fait partie d'un opéron comprenant trois gènes *embC*, *embA*, et *embB* **(Telenti et al., 1997)**.

Mécanisme de résistance

La résistance à l'EMB chez *Mtb* est associée à des mutations au niveau de l'opéron *embCAB*, en particulier le gène *embB* **(Ramaswamy et al., 2000 ; Telenti et al., 1997)**. La majorité des mutations sont détectées dans une région de 576 pb du gène *embB*, nommée ERDR (*Ethambutol Resistance-Determining Region*), principalement les mutations M306L, M306I et M306V **(Alcaide et al., 1997 ; Zhang Z et al., 2014 ; Brossier et al., 2015)**.

D'autres mutations au niveau des codons 406 et 497 du gène *embB* peuvent être aussi associées à la résistance au EMB (Zhao *et al.*, 2015).

- Pyrazinamide

Mécanisme d'action

Le PZA diffère de la plupart des agents antituberculeux par son activité stérilisante sur les bacilles de *Mtb* semi-dormants (persistants) (Mitchison, 1979). Le PZA, comme l'INH, est une pro-drogue qui doit être convertie en sa forme active pour être actif. Cette activation enzymatique du PZA est catalysée par la pyrazinamidase (PZase) codée par le gène *pncA* chez *Mtb*, pour produire un métabolite actif qui est l'acide pyrazinoïque (POA) (Jureen *et al.*, 2008).

Le mode d'action exact du PZA reste mal compris. Aucune cible spécifique n'a encore été identifiée (Stehr *et al.*, 2015). Bien que la cible finale du PZA activé n'ait pas encore été trouvée, un modèle de mécanisme d'action a été proposé.

Le PZA traverse la paroi cellulaire mycobactérienne par diffusion passive et est converti par la PZase présente dans le cytoplasme en POA, qui est ensuite libérée dans le milieu extracellulaire, où elle est transformée en une forme HPOA non chargée, qui rentre dans la cellule et s'accumule dans le cytoplasme de la bactérie et provoque des dommages cellulaires, entraînant la mort cellulaire due à l'acidification intracellulaire (Stoffels *et al.*, 2012).

Mécanisme de résistance

Les mutations survenant dans le gène *pncA* sont considérées comme le mécanisme majeur de résistance au PZA (Khan *et al.*, 2019, Sengstake *et al.*, 2017). Les mutations identifiées au sein de ce gène sont diverses, avec 600 mutations uniques dans 400 positions rapportées à ce jour, et sont retrouvés dans 72 à 99% des isolats résistants au PZA. Les mutations sont variées (substitutions, insertions et délétions) et réparties sur toute la longueur du gène *pncA* (Whifield *et al.*, 2015, Miotto *et al.*, 2014).

Cependant, un petit nombre de souches de *Mtb* résistantes au PZA, sont dépourvues de mutation dans le gène *pncA*, suggérant l'existence d'autres mécanismes de résistance (Simons *et al.*, 2012).

Pour résumer, les mutations dans les gènes cibles, *rpoB*, *katG*, *inhA*, *embB*, *rpsL*, *rrs* et *pncA* sont les principaux mécanismes conférant la résistance de *Mtb* aux antituberculeux de première ligne RMP, INH, EMB, SM, SM et PZA, respectivement.

1.13.2 Antituberculeux de deuxième ligne

- Les fluoroquinolones

Mécanisme d'action

Les fluoroquinolones (FQ) sont des antituberculeux bactéricides à large spectre actuellement utilisés comme traitement de deuxième intention contre les *Mtb* multi-résistantes (Alangaden & Lerner 1997). Les FQ plus anciens, tels que la ciprofloxacine (CFX) et l'ofloxacine (OFX), sont des dérivés synthétiques de l'acide nalidixique et sont très efficaces comme agents antibactériens. Les FQ de nouvelle génération tels que la lévofloxacine (LFX), la moxifloxacine (MFX) et la gatifloxacine (GFX), sont des agents antituberculeux plus puissants, constituant un ajout relativement récent à l'arsenal contre *Mtb* (Dheda *et al.*, 2017).

La cible cellulaire des FQ chez *Mtb* est l'ADN gyrase, une topoisomérase de type II qui contrôle le surenroulement négatif de l'ADN bactérien. Du fait, qu'il existe une seule topoisomérase chez *Mtb*, elle est probablement la cible principale des FQ chez cet organisme.

L'enzyme active est un tétramère, constitué de deux sous-unités A et deux B codées respectivement par les gènes *gyrA* et *gyrB*. Des études ont montré que l'inhibition de l'activité de l'ADN gyrase par les FQ entraîne une inhibition de la réplication, de la transcription et de la réparation de l'ADN, provoquant la mort cellulaire (Aubry *et al.*, 2004 ; Takiff *et al.*, 1994) .

Mécanisme de résistance

La résistance aux FQ résulte de mutations dans des régions spécifiques des gènes *gyrA* ou *gyrB*, appelée, régions déterminantes de la résistance aux quinolones (QRDR, *Quinolone Resistance-Determining Regions*) (Takiff *et al.*, 1994).

Les isolats de *Mtb* résistants aux FQ contiennent plus fréquemment des mutations dans le gène *gyrA*, en particulier au niveau du codon 90 (A90) ou du codon 94 (D94), mais aussi occasionnellement au niveau du codon 74 (A74), du codon 88 (G88) et du codon 91 (S91) (Ajbani *et al.*, 2011 ; Chen *et al.*, 2012 ; Sun *et al.*, 2008) ; les mutations dans le gène *gyrB* sont aussi associées à la résistance aux FQ mais sont présentes dans une petite minorité de souches cliniques (Avalos *et al.*, 2015). Les pompes à efflux ont également été signalées comme médiateurs de résistance aux FQ (Escribano *et al.*, 2007).

- Les aminosides

Streptomycine

Mécanisme d'action

La streptomycine (STR), un aminoside à spectre large découvert en 1943, a été le premier antibiotique utilisé dans le traitement de la tuberculose pulmonaire. Cependant, peu de temps après son introduction, des souches de *Mtb* résistantes à la STR sont apparues, en raison de l'utilisation exclusive de cet antibiotique pour le traitement de la tuberculose (**Barry, 2011**).

La STR n'est plus utilisée en première intention dans la plupart des pays aujourd'hui, y compris en Algérie, du fait de son administration parentérale exclusive et de sa toxicité rénale et auditive dose-dépendante. Cependant, la STR est utilisée en deuxième intention en cas de tuberculose résistante à la RIF ou en cas d'atteinte de la fonction hépatique, gênant l'utilisation des autres antituberculeux de première ligne potentiellement hépatotoxiques (**Grosset & Singer, 2013**).

La STR fonctionne en inhibant la synthèse des protéines en se liant d'une manière irréversible à la protéine 12S et à l'ARNr 16S, qui se trouvent dans la sous-unité 30S du ribosome (**Grosset & Singer, 2013**).

Mécanisme de résistance

La résistance à la streptomycine est principalement associée à des mutations dans le gène *rpsL* qui code pour la protéine ribosomale 12S, avec des mutations prédominantes au niveau des codons 43 (A/G, Lys→Arg, Thr) et 88 (A/G/C, Lys→Gln, Arg, Thr) et le gène *rrs* codant pour l'ARNr 16S, avec des mutations qui se trouvent plus fréquemment dans la boucle 530 et la région 912 (**Wang et al., 2019 ; Tudo et al., 2010**).

Amikacine, kanamycine et capréomycine

Mécanisme d'action

Les trois antibiotiques de la famille des aminosides, amikacine (AMK), kanamycine (KAN) et capréomycine (CAP), font partie du groupe des antituberculeux injectable de seconde ligne nommé SLID (*Second-Line Injectable Drugs*). Elles sont des molécules clés pour le traitement de la MDR-TB (**Brossier et al., 2017b**). En effet, le traitement de la MDR-TB est basé sur l'association des fluoroquinolones et SLID (**Falzon et al., 2011**).

La KAN et son dérivé AMK agissent par inhibition de la synthèse protéique en se liant à l'ARNr 16S de la sous-unité ribosomale 30S de la bactérie (Georghiou *et al.*, 2012). La CAP inhibe aussi la synthèse protéique, en se liant à l'interface entre la sous-unité 30S et la sous-unité 50S du ribosome mycobactérien.

Mécanisme de résistance

La résistance croisée aux SLID (AMK, KAN et CAP) est connue pour être causée par des mutations aux positions 1401, 1402 et 1484 dans le gène *rrs* codant pour l'ARNr 16S avec les profils d'expression différents: la substitution *rrs* A1401G est associée à la résistance à la CAP avec des disparités dans les niveaux de résistance, et une résistance de haut niveau à l'AMK et à la KAN. La substitution *rrs* C1402T cause une résistance de bas niveau à la KAN et une résistance de haut niveau à la CAP, mais n'existe pas chez les mutants résistants à l'AMK. Alors que, la substitution *rrs* G1484T cause une résistance de haut niveau à l'AMK, à la KAN et à la CAP (Maus *et al.*, 2005a ; Reeves *et al.*, 2015) .

- Ethionamide

Mécanisme d'action

L'éthionamide (ETH) est un agent bactéricide uniquement vis-à-vis de *Mtb*, qui est utilisé dans le traitement de la MDR-TB (Vilcheze & Jacobes, 2014 ; Zhang & Yew, 2015).

Comme l'INH et la PZA, l'ETH est également une pro-drogue qui est activée par une monooxygénase (EthA) pour produire un métabolite actif, ETH-NAD (Baulard *et al.*, 2000 ; Vannelli *et al.*, 2002). Une fois activé, le mode d'action de l'ETH est très similaire à l'INH (Vilcheze & Jacobs 2014). La forme active de l'ETH, ETH-NAD, inhibe l'activité de l'énoyl-ACP réductase NADH-dépendante (InhA), conduisant à une inhibition de la biosynthèse de l'acide mycolique (Banerjee *et al.*, 1994 ; Wang *et al.*, 2007).

Mécanismes de résistance

Les principaux mécanismes de résistance à l'ETH sont dûs à des mutations dans le gène qui code pour la protéine cible InhA, qui confèrent également une co-résistance à l'INH (Zhang & Yew 2015). De même, des mutations conduisant à une activité réduite de l'EthA, l'enzyme activatrice de l'ETH, entraînent une résistance accrue à l'ETH, tout comme les mutations dans *KatG*, l'enzyme activatrice de l'INH, qui confèrent une résistance à l'INH (Morlock *et al.*, 2003).

- Acide *p*-aminosalicylique

Mécanisme d'action

L'acide *p*-aminosalicylique (PAS), un composé synthétique, a été l'un des premiers antibiotiques utilisés dans le traitement de la tuberculose. Cependant, l'utilisation du PAS a considérablement diminué car des agents plus puissants et plus sûrs sont devenus disponibles. Actuellement, le PAS n'est utilisé que comme traitement de deuxième intention, en combinaison avec d'autres antibiotiques, contre la MDR-TB (**Lehmann, 1946 ; Luo et al., 2019**).

Bien que le PAS soit utilisé depuis plus de 70 ans pour le traitement de la tuberculose, son mécanisme d'action n'est pas entièrement compris. Le PAS est suspecté d'être un inhibiteur de la synthèse de l'acide folique (**Zhang Y & Yew, 2015 ; Dookie et al., 2018 ; Luo et al., 2019**).

Mécanismes de résistance

Les mécanismes de résistance à PAS ne sont pas encore bien élucidés. Il a été rapporté que la résistance au PAS est due à des mutations dans le gène *folC*, qui code pour la dihydrofolate synthase (DHFS), une enzyme impliquée dans la voie de synthèse de l'acide folique (**Luo et al., 2019 ; Zhao et al., 2014**).

Des mutations dans le gène de la thymidylate synthase A (ThyA), une autre enzyme impliquée dans la voie de biosynthèse de l'acide folique, ont été également signalées comme responsables de la résistance au PAS (**Mathys et al., 2009 ; Rengarajan et al., 2004**).

1.13.3 Nouveaux antituberculeux

L'émergence des MDR-TB et XDR-TB ainsi que les schémas thérapeutiques complexes et multi-médicamenteux pour leurs traitements, qui sont souvent associés à effets secondaires graves, représentent un défi majeur pour les programmes de lutte contre la tuberculose, ce qui a intensifié la demande pour de nouvelles approches thérapeutiques. Alors qu'aucune nouvelle molécule n'avait été mise sur le marché pendant une quarantaine d'années (**Pushkar et al., 2023**).

Cette recherche a fait des grands progrès récemment par le développement de trois nouveaux agents antituberculeux prometteurs, comme la bédaquiline (BDQ), la delamanide (DLM) et la prétomanide (PTM), offrant des perspectives d'amélioration et de simplification

des traitements. De plus, des anciennes molécules réutilisés, tels que la linézolide (LZD), la rifapentine et la clofazimine (CFZ), ont également renforcé l'arsenal d'agents alternatifs pour le traitement des MDR-TB.

- **Bedaquiline**

Mécanisme d'action et de résistance

La BDQ inhibe l'activité de l'ATP synthétase, une enzyme indispensable à la production d'énergie dans tous les organismes vivants, en ciblant spécifiquement la protéine AtpE, une sous-unité transmembranaire de l'ATP synthase. La BDQ est efficace à la fois contre les bacilles de *Mtb* en répllication ou en état de dormance (**Pontali et al., 2016 ; Pontali et al., 2017**).

La BDQ a suscité de grandes attentes avec le potentiel de raccourcir la durée du traitement contre MDR-TB et de diminuer les taux d'échec thérapeutique. La BDQ a été approuvée par les autorités réglementaires et recommandé par l'OMS pour le traitement des MDR-TB depuis 2013, et à la fin de 2018, plus de 50 pays l'utilisaient (**WHO, 2020**).

En conséquence de l'élargissement de l'utilisation de la BDQ, une résistance acquise a été signalée, sous forme de mutations dans le gène cible du BDQ (*atpE*) (**Huitric et al., 2010**) ou des mutations dans le gène Rv067810,13, qui code pour un régulateur de la pompe à efflux MmpL5-MmpS5 (**Andries et al., 2014**).

- **Delamanide**

Mécanisme d'action et de résistance

La delamanide (DLM), un nitroimidazole bicyclique, qui confère une activité mycobactéricide en inhibant la synthèse des acides mycoliques de la paroi cellulaire. La DLM est un antibiotique à spectre étroit capable d'éliminer uniquement les CMT.

La DLM est une pro-drogue qui est activée par une nitroréductase dépendante de la déazaflavine (F420) codée par le gène *ddn*. La résistance au DLM est également apparue par des mutations dans cinq gènes (*ddn*, *fbiA*, *fbiB*, *fbiC* et *fgd1*) qui codent pour les principales protéines et coenzymes de la biosynthèse et la modification du F420 (**Khoshnood et al., 2021**).

- **Prétomanide**

Mécanisme d'action et de résistance

La pretomanide (PTM), un autre nitroimidazole, est un nouvel agent antimycobactérien qui a été introduit en 2019. PTM s'est révélé très actif contre les *Mtb* lorsqu'il est associé à

d'autres agents antituberculeux, la BDQ et la LNZ, pour le traitement des MDR-TB et XDR-TB.

Le PTM est un antibiotique à spectre étroit exerçant un effet bactéricide sur les *Mtb* répliatifs et non répliatifs, en inhibant la synthèse des acides mycoliques de la paroi cellulaire. Comme la DLM, la PTM est une pro-drogue qui nécessite une activation par la nitroréductase dépendante de la déazaflavine (F420) codée par le gène *ddn*. Les mutations dans les gènes *ddn*, *fbiA*, *fbiB*, *fbiC*, *fbiD* et *fgd1* sont aussi liées à la résistance à la PTM (**Pushkar et al., 2023**).

- Linézolide

Mécanisme d'action et de résistance

La linézolide (LZD) est un antibiotique de synthèse appartenant à la classe des oxazolidinones, qui agit en inhibant la synthèse des protéines, par sa liaison à la sous-unité ribosomale 50S (**Richter et al., 2007**).

Des mutations dans le gène *rrl*, codant l'ARNr 23S, et le gène *rplC*, codant pour la protéine ribosomale L3, ont été identifiées comme responsable de la résistance au LZD (**Beckert et al., 2012 ; Lee et al., 2012 ; Wasserman et al., 2019**).

**Tableau 1 : Modes d'action et mécanismes de résistance des principaux agents antituberculeux
(Brossier *et al.*, 2017 ; Moreno-Molina *et al.*, 2019) .**

Anti-tuberculeux	CMI µg/ml	Effet sur la bactérie	Mécanisme d'action	Gène impliqué dans la résistance	Fonction du gène
Rifampicine	0.05-1	bactéricide	Inhibition de la synthèse de l'ARN	<i>rpo B</i>	Sous-unité β de l'ARN polymérase
Isoniazide	0.02-0.2	bactéricide	Inhibition de la biosynthèse de l'acide mycolique	<i>kat G</i> <i>inh A</i>	Catalase peroxydase, protéine réductase 2- trans-enoyl-acyl
Ethambutol	1_5	bactériostatique	Inhibition de la synthèse de l'arabinogalactan	<i>emb B</i> <i>ubiA</i>	Arabinosyl transférase, synthase decaprenyl-phosphate 5-phosphoribosyltransferase
Pyrazinamide	16-100	bactéricide à ph acide	inhibition de la trans-translation des protéines inhibition des transports et énergie membranaire, inhibition de la synthèse du pantothénate et du Co enzyme A	<i>pnc A</i> <i>rps A</i> <i>pan D</i>	pyrazinamidase protéine ribosomale S1 aspartate décarboxylase
Streptomycine	2_8	bactéricide	Inhibition de la synthèse des protéines	<i>rps L</i> <i>rrs</i> <i>gidB</i>	protéine ribosomale S12 ARNr16S 7-méthylguanosine(m(7)G) méthyltransférase
Ofloxacine	0,5-2.5	bactéricide	Inhibition de la synthèse de l'ADN	<i>gyr A</i> <i>gyr B</i>	sous-unité A de l'ADN gyrase sous-unité B de l'ADN gyrase
Amikacine/ kanamycine	2_4	bactéricide	Inhibition de la synthèse des protéines	<i>rrs</i> promoteur <i>eis</i> <i>whib 7</i>	ARNr16S aminoglycoside acétyltransférase régulateur transcriptionnel
Capréomycine	2_4	bactéricide	Inhibition de la synthèse des protéines	<i>rrs</i> <i>tly A</i>	ARNr16S 2'-O-méthyltransférase
Ethionamide	2.5-10	bactériostatique	Inhibition de la biosynthèse de l'acide mycolique	<i>eta A/ethA</i> <i>eth R</i> <i>inhA</i>	flavin monooxygenase répresseur de transcription protéine réductase 2-trans-enoyl-acyl
Acide para-aminosalicylique	1_8	bactériostatique	Inhibition de la biosynthèse de l'acide folique	<i>thy A,</i> <i>folC</i> <i>rib D</i>	thymidylate synthase, dihydrofolate synthase enzyme impliquée dans la biosynthèse de la riboflavine

1.13.4 Mécanisme de multirésistance aux antituberculeux chez *Mtb*

Aucune mutation spécifique conférant une multirésistance à *Mtb* n'a été décrite. Les souches MDR-TB et XDR-TB sont le résultat d'une accumulation séquentielle de mutations indépendantes, conférant chacune une résistance à un antibiotique différent (**Ramaswamy & Musser, 1998**).

1.14 Méthodes de détection de la résistance aux antituberculeux chez *Mtb*

Le contrôle et la prévention du fardeau croissant de la tuberculose dépendent en grande partie sur un accès universel aux tests de sensibilité aux agents antituberculeux. Il existe un certain nombre d'approches phénotypiques et génotypiques pour tester la sensibilité aux antibiotiques chez *Mtb*; cependant, chacune présente des avantages et des inconvénients (**Naidoo et al., 2023**).

1.14.1 Méthodes phénotypiques

Les méthodes phénotypiques, basées sur la culture, reposent sur la détection de la résistance phénotypique en évaluant la croissance bactérienne en présence d'antibiotiques et peuvent être classées en deux catégories, manuelles et automatisées. Les tests manuels comprennent la diffusion de disque, le test de gradient et la microdilution en bouillon (**Joloba et al., 2014**).

Ces méthodes conventionnelles ont été améliorées sous forme de plateformes commerciales automatiques pour faciliter le traitement d'un grand nombre d'échantillons, comme le système de culture liquide BACTEC™ MGIT (*Mycobacteria Growth Indicator Tube*), développé par Becton Dickinson. Avec ce système, un échantillon est ajouté au MGIT en présence d'une concentration donnée d'agent antituberculeux.

La croissance bactérienne est détectée automatiquement par fluorescence due à la consommation d'oxygène par *Mtb*. Selon la présence ou absence de croissance, la bactérie est désignée comme résistante ou susceptible à l'antituberculeux testé. Le test par MGIT est plus rapide que les méthodes manuelles avec une durée moyenne de 7 à 9 jours pour obtenir des résultats (**Yusoof et al., 2022**).

Les techniques basées sur la culture restent la norme de référence actuelle pour le diagnostic de sensibilité aux agents antituberculeux ; cependant, elles présentent encore

plusieurs limites, notamment, en terme de leurs susceptibilités aux contaminations et leurs lenteurs, générant des résultats plusieurs semaines après le prélèvement des échantillons, ce qui retarde considérablement les résultats au détriment des patients.

1.14.2 Méthodes génotypiques

Les méthodes génotypiques de tests de sensibilité aux antibiotiques détectent des mutations spécifiques associées aux résistances dans l'ADN de *Mtb*. Ces méthodes présentent de nombreux avantages par rapport aux méthodes phénotypiques, notamment des résultats rapides, la standardisation des tests et un débit élevé (Veziris *et al.*, 2005 ; Brossier *et al.*, 2017).

La détection génotypique de la résistance est simple pour certains antituberculeux dont la résistance est liée à un seul gène, alors qu'elle peut être plus compliquée pour d'autres antituberculeux dont la résistance est associée à plusieurs déterminants génétiques (Brossier *et al.*, 2017). Plusieurs tests génotypiques sont commercialisés, sous forme de kits rapides pour détecter *Mtb* et profiler la résistance aux antituberculeux (tableau2), permettant une accélération du diagnostic et du traitement. Ces tests sont basés soit sur la PCR, LPA ou LAMP (Dong *et al.*, 2022).

Certains de ces kits sont applicables pour la détection simultanée de l'organisme lui-même ainsi que ses déterminants génétiques de résistance aux antituberculeux ; et donc, leurs principes de fonctionnement ont été abordés dans la section « 1.10 Diagnostic de la tuberculose » ci-dessus ; et par conséquent, dans les sections qui suivent nous allons seulement les citer et décrire leurs applications dans l'identification des mutations conférant les résistances aux antituberculeux.

1.14.2.1 Tests basés sur la PCR

Le test GeneXpert MTB/RIF (Cepheid, USA), qui est le premier test moléculaire de tuberculose approuvé par l'OMS en 2010, est un test basée sur la PCR en temps réel qui est couramment utilisé pour la détection rapide des mutations dans le gène *rpoB* qui confère la résistance à la RIF (Lawn, & Nicol, 2011, WHO, 2011).

1.14.2.2 Tests basés sur LPA

Les tests LPA, ou test d'hybridation inverse sur bandelettes, utilisent des sondes nucléotidiques immobilisées sur un support solide pour détecter des mutations spécifiques

conférant une résistance au *Mtb* (Somoskovi, 2013). Plusieurs tests LPA ont été désignés pour cibler différentes combinaisons de mutations, dont les plus populaires sont les tests GenoType® (Hain Lifescience, Allemagne), commercialisés sous différentes versions (MTBDR, MTBDRplus v1/v2 et MTBDRsl v1) et le test INNO-LiPA®Rif.TB (Fujirebio Innogenetics, Belgique).

Par exemple, le test Genotype MTBDR cible des mutations dans les gènes *rpoB* et *katG* pour la détection de la résistance au RIF et INH, respectivement. Le test GenoType® MTBDR plus v1 et v2 ciblent des mutations dans les gènes *rpoB* (RIF), *katG* et la région promotrice du gène *inhA* (INH). Le test Genotype MTBDRsl v1 cible *gyrA* QRDR (FQ), *rrs* 1400 region (SLID) et *embB* codon 306 (EMB). Le GenoType® MTBDRsl V2 cible *gyrA* et *gyrB* QRDR (FQ), *rrs* 1400 region (SLID) et *eis* promoter (KAN) (Machado *et al.*, 2019).

1.14.2.3 Tests basés sur LAMP

Les tests basés sur LAMP ont été conçus pour détecter *Mtb* directement à partir d'échantillons de crachat ; cependant, leurs utilité dans le diagnostic de la résistance est en cours d'évaluation dans différents laboratoires. Ces tests sont manuels, faciles à utiliser, ne nécessitent pas d'équipement spécialisé et peuvent répondre à la demande de diagnostic dans les zones aux ressources limitées où la tuberculose est endémique (Liu *et al.*, 2021).

Tableau 2 : Méthodes génotypiques de tests de sensibilité aux antibiotiques chez *Mtb* (Machado *et al.*, 2019)

Assay	Type	Target	Drug	specefities		
INNO-LiPARif.TB	Line probe assay	RpoB RRDR	RIF	5 WT probes		
	DNA.STRIP technology			4 MUT probes –D516V (R2); H526Y(R4a); Genotype MTBDR H526D (R4b), S531L(R5)		
Genotype MTBDR	Line probe assay	RpoB RRDR	RIF	5 WT probes		
				4 MUT probes – D516V (MUT1); H526Y (MUT2A), H526D (MUT2B), S531L(MUT3)		
	DNA.STRIP technology	Kat G codon 315	INH	1 WT probe		
				2MUT probes –S315T1(ACC), MUTS315T2(ACA)		
Genotype MTBDRplus VER 1.0 and VER 2.0	Line probe assay	RpoB RRDR	RIF	8 WT probe		
						4 MUT probes - D516V (MUT1); H526Y (MUT2A), H526D (MUT2B), S531L(MUT3)
	DNA.STRIP technology	katG codon 315	INH	1 WT probe		
						2MUT probes –S315T1(ACC), MUTS315T2(ACA)
		inha promoter	INH	2 WT probe		
					4 MUT probes - D516V (MUT1); H526Y (MUT2A), H526D (MUT2B), S531L(MUT3)	
Genotype MTBDRsl VER 1.0	Line probe assay	Gyr A QRDR	FQ	3 WT probe		
				6 MUT probes-A90V (MUT1) ; S91P (MUT2); D94A (MUT3A), D94N/Y (MUT3B) , D94G (MUT3C), D94H (MUT3D)		
	DNA.STRIP technology	rrs 1400 region	SLID	2 WT probe		
						2 MUT probes- A1401G(MUT 1); G 1484 T (MUT 2) dectected by the simultaneous absence of hybridization with WT1 and MUT1
		emb B codon 306	EMB	1 WT probe		
					2 MUT probes-M306I (MUT1A) ; M306V (MUT1B)	
Genotype MTBDRsl VER 2.0	Line probe assay	Gyr A QRDR	FQ	same as Genotype MTBDRplus VER 1;0		
	DNA.STRIP technology	rrs 1400 region	SLID	3 WT probes		
						1 MUT probe-C-14T(MUT1) G-37TMUT-abcence of hybridazation with WT1 C-12T and G-10A MUT- abcence of hybridazation with WT2 C-2AMUT-- abcence of hybridazation with WT3
		gyr B QRDR	FQ	1 WT probe		
					2 MUT probes – N583D (MUT1); E540V (MUT2).	
AID TB Resistance	Line probe assay	RpoB RRDR	RIF	3 WT probes		
				3 MUT probes-D516V/Y; H526Y/D/R; S531L/W.		
	DNA.STRIP technology	kat G codon 315	INH	1 WT probe		
						1 MUT probe-S315T(ACC/A)
						1 WT probe cover positions -15, -16, -8
	inhA promoter	INH	1 MUT probe cover positions -15, -16, -8			
				2 WT probes		

1.14.2.4 Tests basés sur le séquençage du génome

Bien que les méthodes moléculaires actuelles permettent une détection rapide des mutations conférant les résistances aux antibiotiques chez *Mtb*; cependant, elles sont conçues pour cibler des mutations spécifiques et manquent donc de flexibilité. De plus, ces méthodes ne permettent pas de détecter toutes les mutations chez les souches multirésistantes.

Par contre, l'approche du séquençage du génome entier (WGS, *Whole Genome Sequencing*) par NGS a démontré un potentiel exceptionnel pour la détection de toutes les mutations présentes dans le génome d'une manière exhaustive et avec un très grand niveau de précision, permettant ainsi une prédiction fiable et complète du phénotype de résistance des souches de *Mtb* (**Figure 14**). Grace à la réduction substantielle du coût de séquençage par les

technologies NGS, les approches basées sur le WGS, qui étaient généralement confinées aux laboratoires de recherche, sont de plus en plus adoptées dans les laboratoires cliniques et de santé publique (Cohen *et al.*, 2019).

Le WGS est actuellement considéré comme une alternative prometteuse aux méthodes moléculaires existantes, en offrant des niveaux de sensibilité et de spécificité très élevées. Cependant, l'utilisation de cette approche n'est pas généralisée, en étant actuellement limitée dans les pays à revenus élevés, et n'est pas encore standardisée et validée. De plus, WGS nécessite des équipements coûteux, une infrastructure adéquate et un personnel qualifié, limitant leur accessibilité dans les pays à faibles revenus, où le fardeau de la tuberculose est généralement le plus lourd (de Araujo *et al.*, 2023).

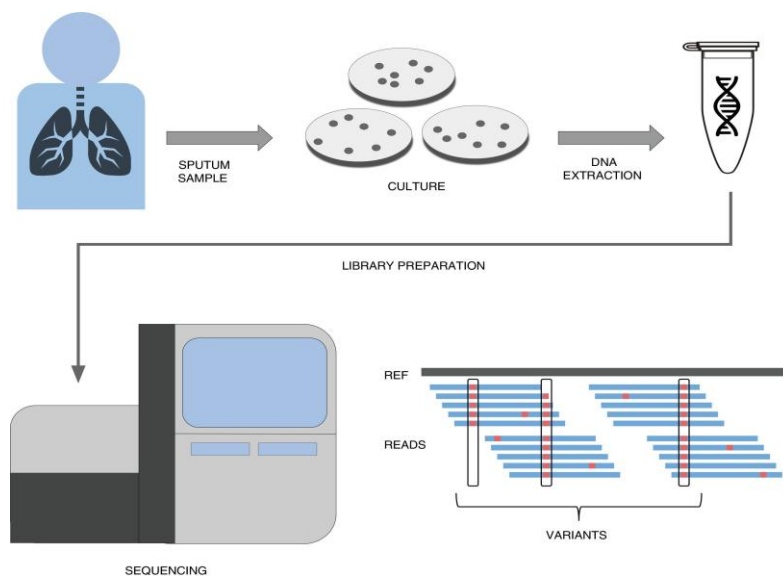


Figure 14 : Aperçu schématisé sur un flux de travail simplifié pour l'utilisation du WGS dans l'identification des mutations conférant les résistances aux agents antituberculeux.

(Moreno-Molina *et al.*, 2019).

Après le prélèvement d'un échantillon sur le patient, généralement des crachats, les bactéries sont cultivées dans des plaques pendant 3 à 4 semaines, puis leur ADN génomique est extrait et séquençé par une des plateformes de séquençage NGS. L'analyse bioinformatique finale consiste à comparer les séquences obtenues avec une séquence de référence et à identifier les variations nucléotidiques. Les variations nucléotidiques sont comparées dans les bases de données de résistance pour prédire le profil de résistance de l'isolat.

1.14. 2.5 Tests basés sur la spectrométrie de masse

Le MALDI-TOF MS est une autre approche prometteuse, introduite récemment pour l'identification rapide et simultanée de *Mtb* et de la résistance aux antituberculeux directement dans les crachats. Cependant, l'utilisation du MALDI-TOF MS est actuellement confinée au sein de laboratoires dotés d'un spectromètre de masse (**Lange *et al.*, 2014 ; Ceyskens *et al.*, 2017**).

1.15. Typage des souches de *Mtb*

En épidémiologie de *Mtb*, comme pour toutes les bactéries pathogènes, l'enjeu clé est de définir la source de l'infection et de révéler ses voies de transmission. Pour que cela soit accompli, la capacité de discriminer et de suivre les souches de *Mtb* est d'une importance cruciale.

Avant que les techniques moléculaires ne soient disponibles, les premières méthodes de typage pour discriminer entre les souches de *Mtb* reposaient sur des caractéristiques phénotypiques, biochimiques et sérologiques. L'utilité de ces méthodes est sérieusement limitée par la variabilité phénotypique des mycobactéries.

Par conséquent, des techniques basées sur l'ADN pour analyser des marqueurs génétiques qui sont uniques et relativement stables pour chaque souche ont été développées. Cependant, l'homogénéité très remarquable des bactéries du CMT sur le plan génétique et l'absence de transfert horizontal de gènes a rendu difficile la discrimination au niveau de la souche même au moyen d'approches de typage moléculaire.

Cependant, les récentes améliorations des approches de typage moléculaire ont révolutionné l'épidémiologie moléculaire de *Mtb*, en mettant en évidence l'existence des différences génétiques entre les lignées, sous-lignées et souches de *Mtb*, qui peuvent avoir une grande influence sur leur physiologie, virulence, immunogénicité et résistance aux antibiotiques (**Jagielski *et al.*, 2014 ; Ei *et al.*, 2016**). Plusieurs méthodes de typage moléculaire ont été développées pour différencier entre les souches du CMT. Ces méthodes sont généralement basées sur l'analyse du polymorphisme dans de marqueurs génétiques dans le chromosome de *Mtb*. Les plus couramment utilisées actuellement sont le spoligotypage, IS6110-RFLP et MIRU-VNTR

1.15.1 Méthodes de typage des souches de *Mtb*

- Spoligotypage

Le locus DR dans l'ADN de *Mtb* est constitué de plusieurs copies d'une séquence conservée de 36 pb (les DRs), séparées par plusieurs séquences uniques de 34–41 pb, appelées espaceurs.

Le spoligotypage détecte la variabilité dans le locus DR par amplification de ce locus par PCR utilisant des amorces marquées et spécifiques aux DRs. Les produits de PCR sont hybridés sur une membrane contenant 43 oligonucléotides correspondant aux espaceurs de *Mtb*. La présence ou l'absence de chacun de ces 43 espaceurs dans la région DR de l'isolat analysé sera représentée comme un profil de signaux d'hybridation (**Figure 15**). Le spoligotypage a été développé il y a environ 30 ans et reste toujours une technique de génotypage populaire pour typer les isolats du CMT, due à sa simplicité, rapidité et son coût moins cher (**Gori et al., 2005**).

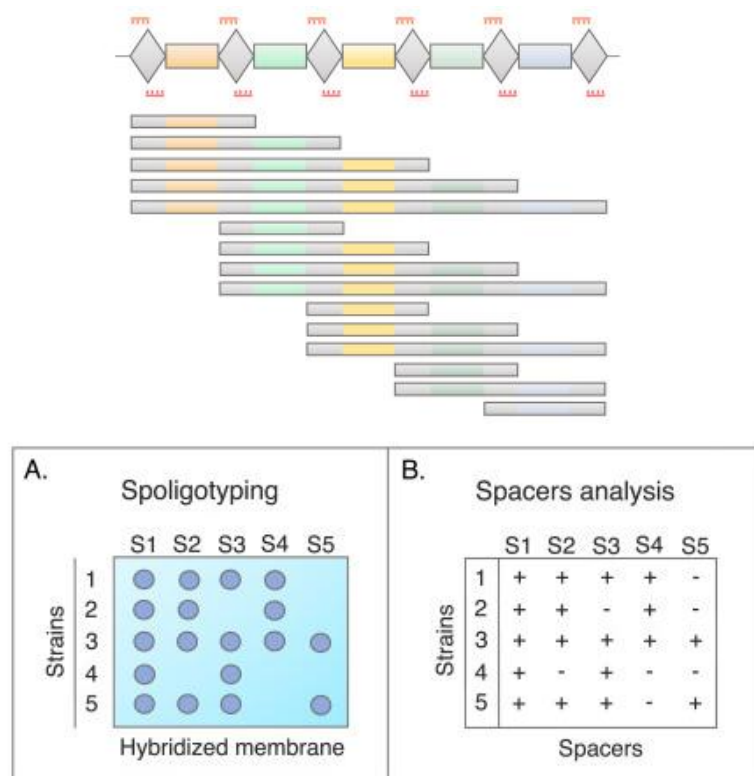


Figure 15 : Principe de la méthode de spoligotypage (**Muzyukina et al., 2023**).

IS6110-RFLP

IS6110 est une séquence d'insertion présente en plusieurs copies à différents endroits dans le génome des mycobactéries du CMT. IS6110 est spécifique au CMT, et donc constitue un

marqueur moléculaire important, qui est utilisé comme cible dans la méthode de typage des souches du CMT, *IS6110*-RFLP.

IS6110-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) est basée sur la digestion de l'ADN génomique par l'enzyme de restriction *PvuII*, qui coupe la séquence *IS6110* une seule fois, pour générer des fragments d'ADN qui sont séparés par électrophorèse sur gel, puis transférés sur une membrane. Les fragments d'ADN sont ensuite hybridés avec une sonde marquée et complémentaire au *IS6110*.

En conséquence, chaque fragment d'ADN obtenu après digestion comprend une partie d'une *IS6110* attaché à l'ADN flanquant (**Figure 16**). Ainsi, les souches de CMT qui présentent des différences dans le nombre et l'emplacement des sites d'insertion des *IS6110* produisent des profils de bandes différents (**Warren *et al.*, 2009**).

IS6110-RFLP est une méthode de typage hautement discriminatoire et reproductible, qui a montré une résolution plus élevée que le spoligotypage. Cependant, cette technique est relativement lente et laborieuse (**Warren *et al.*, 2009**).

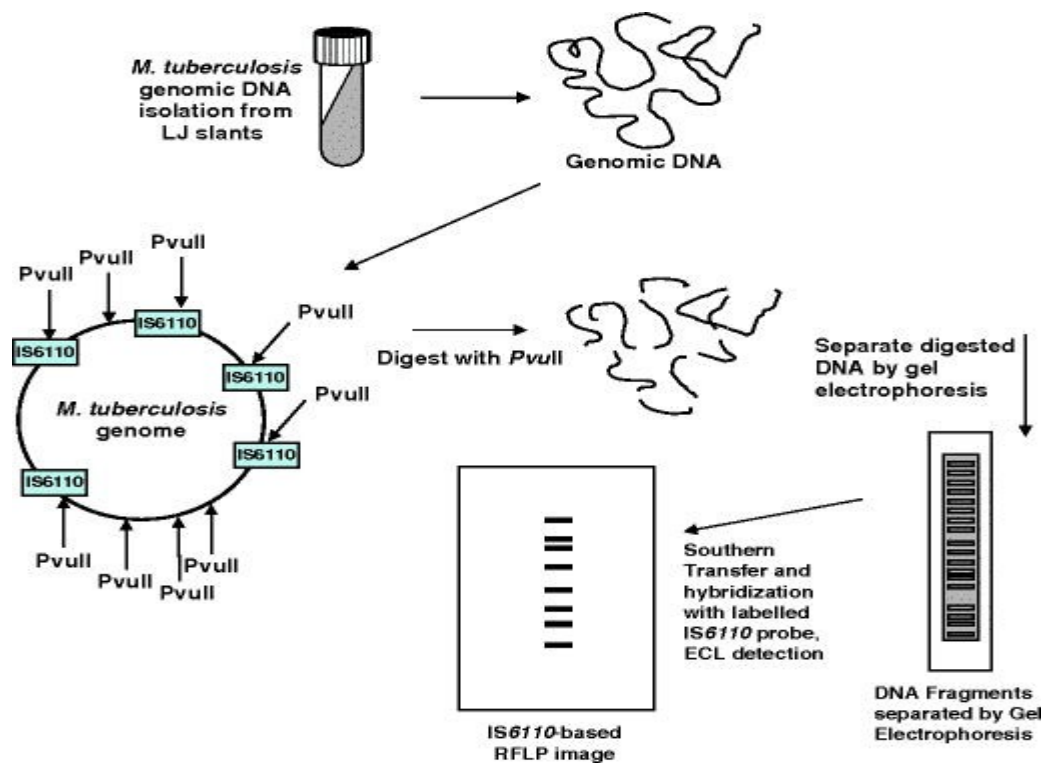


Figure 16 :Principe de la méthode de génotypage *IS6110*-RFLP (**Warren *et al.*, 2009**).

- Empreinte basée sur la PCR des IS6110

L'IS6110 est également un marqueur moléculaire cible dans d'autres méthodes actuellement utilisées pour le typage moléculaire de *Mtb*, comme la méthode d'empreinte basée sur la PCR des IS6110.

Cette méthode suit un protocole en quatre étapes comprenant (i) la fragmentation de l'ADN génomique à l'aide d'enzymes de restriction ; (ii) la ligature de ces fragments d'ADN avec des courtes séquences nucléotidiques appelées adaptateurs ; (iii) amplification des produits de ligature avec une amorce spécifique de l'IS6110 et une deuxième amorce complémentaire à l'adaptateur ; et (iv) analyse des amplicons. Les profils d'amplicons obtenus sont comparés entre différentes souches afin d'établir les liens de parenté entre elles (**Van Embden et al., 1993**).

MIRU-VNTR

Les MIRU (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Units*) sont de petites séquences d'ADN de 40 à 100 pb dispersées dans le génome, appelées VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*), qui sont sous forme de répétitions en tandem et dont le nombre de copies est très variable parmi les membres du CMT (**Bull et al., 2003**).

Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit Variable Number Of Tandem Repeats (MIRU-VNTR) est une méthode de typage de type MLVA (*Multiple Loci VNTR Analysis*) spécifique au *Mtb*, qui est utilisé dans le génotypage des souches en analysant le nombre de copies de VNTR présentes dans 12 ou 24 locus connus comme étant hypervariables (**Supply et al., 2006**). Les locus VNTR ciblés sont amplifiés par PCR multiplex avec un ensemble d'amorces spécifiques aux régions flanquâtes de chaque locus. Les fragments ainsi obtenus sont séparés par électrophorèse capillaire. Puisque la longueur des MIRU est connue, la taille des ADN amplifiés reflète le nombre de copies MIRU qu'ils portent.

Les tailles des ADN amplifiés sont analysés par un logiciel qui les convertit en code numérique à plusieurs chiffres (appelé code MIRU-VNTR), dans lequel chaque chiffre correspond au nombre de répétitions à chaque locus analysé (**Figure 17**). Le code MIRU-VNTR obtenu est comparé aux codes MIRU-VNTR provenant de laboratoires du monde entier qui sont stockés dans une base de données.

MIRU-VNTR est une méthode de typage rapide, sensible, fiable, reproductible, qui permet de distinguer les souches avec un haut niveau de discrimination, ce qui la rend bien adaptée aux enquêtes à grande échelle (Ei *et al.*, 2016).

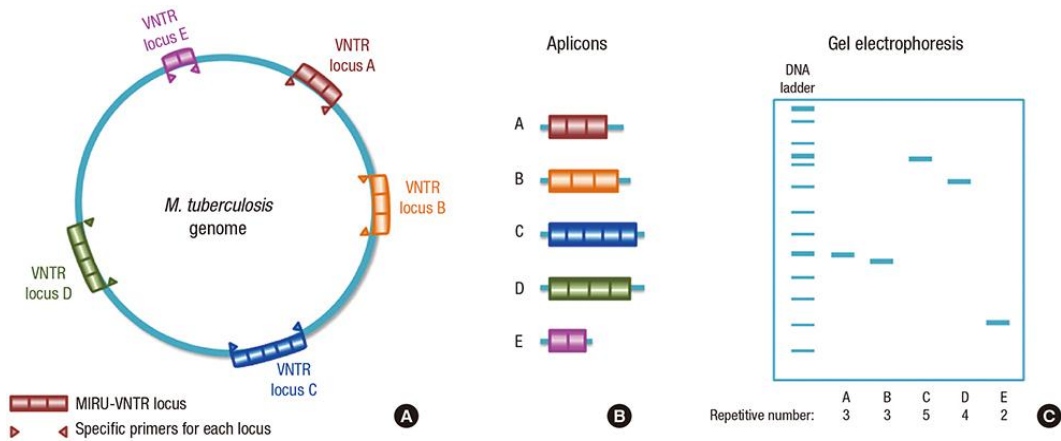


Figure 17 : Principe du génotypage MIRU-VNTR (Ei *et al.*, 2016)

(A) Les locus MIRU-VNTR de différents nombre de copies de répétitions dans le génome de *M. tuberculosis* sont amplifiés par des amorces spécifiques pour chaque locus. (B) Différentes tailles d'amplicons après PCR. (C) Après électrophorèse sur gel, des bandes d'ADN peuvent être observées avec différentes tailles qui reflètent le nombre de copies de répétitions dans chaque locus VNTR.

- Typage par séquençage du génome entier

Il est bien connu que la séquence d'un génome entier fournit des informations détaillées et précises sur l'organisme (Land Cirillo *et al.*, 2015). Très récemment, le séquençage des génomes entiers (WGS, *Whole Genome Sequencing*) par les technologies de séquençage de nouvelle génération (NGS, *Next Generation Sequencing*) s'est révélé comme une approche prometteuse pour la détection rapide de *Mtb* et des mutations associées à la résistance aux antituberculeux et comme un puissant outil de génotypage pour les investigations épidémiologiques sur *Mtb* (Cirillo *et al.*, 2016; Comas, 2017 ;Cabibbe *et al.*, 2018; Meehan *et al.*, 2019).

WGS permet d'identifier les divers polymorphismes dans les génomes, y compris les polymorphismes de nucléotides simples (SNP, *Single Nucleotide Polymorphisms*); ce qui est particulièrement très utile du point de vue épidémiologique, car cela permet de distinguer entre les différentes lignées de *Mtb* avec la plus haute résolution possible. Ainsi, l'approche basée sur le WGS par NGS est en train d'être progressivement introduite dans les investigations en

santé publique pour la détection des épidémies et des événements de transmission (**Van Goethem et al., 2019**).

Dans cette optique, un grand nombre de séquences génomiques complètes de souches de *Mtb* ont été générées et comparées à travers le monde pour identifier les SNPs et d'autres variations génétiques, ce qui a amélioré énormément la compréhension de la diversité génétique et de la phylogénie de *Mtb* (**Nikolayevskyy et al., 2016**).

1.15.2 Lignées majeures du complexe *M. tuberculosis*

Les mycobactéries du CMT associées à l'homme sont divisées en sept lignées majeures, qui diffèrent par leur répartition géographique, étant endémiques dans différentes régions du monde, conduisant à l'hypothèse qu'ils sont spécifiquement adaptés à différentes populations humaines (**Figure 18**). Ces lignées ont montré également des caractéristiques distinctes en termes de virulence, transmissibilité, résistance aux antituberculeux, interaction avec l'hôte, de latence et d'efficacité du vaccin (**Coscolla & Gagneux, 2014**).

Certaines de ces lignées sont plus répandues que d'autres à l'échelle mondiale, particulièrement les lignées 2 et 4, qui sont plus largement distribuées. La lignée 2 (également connue sous le nom de lignée d'Asie de l'Est) prédomine en Asie de l'Est, mais est également présente en Asie centrale, en Russie et en Afrique du Sud. La lignée 4 (également connue sous le nom de lignée euro-américaine) est fréquente dans les populations d'Asie, d'Europe, d'Afrique et d'Amérique.

Les lignées 1 et 3 ont montré une répartition géographique plus restreinte, limitées à l'Afrique de l'Est, à l'Asie Centrale, du Sud et du Sud-Est (**Figure 18**). Les lignées les plus restreintes géographiquement sont les lignées 5 à 7, qui sont toutes associées à des régions spécifiques d'Afrique (**Figure 18**).

Les lignées 5 et 6 se trouvent presque exclusivement en Afrique de l'Ouest. La lignée 6 est présente principalement dans la partie occidentale de l'Afrique de l'Ouest, tandis que la lignée 5 domine plus à l'est dans les régions bordant le golfe de Guinée. De même, la lignée 7

récemment découverte est confinée à l'Éthiopie (Coscolla & Gagneux, 2014). Ces lignées majeures ont été également subdivisées en sous-lignées (Coscolla & Gagneux, 2014).

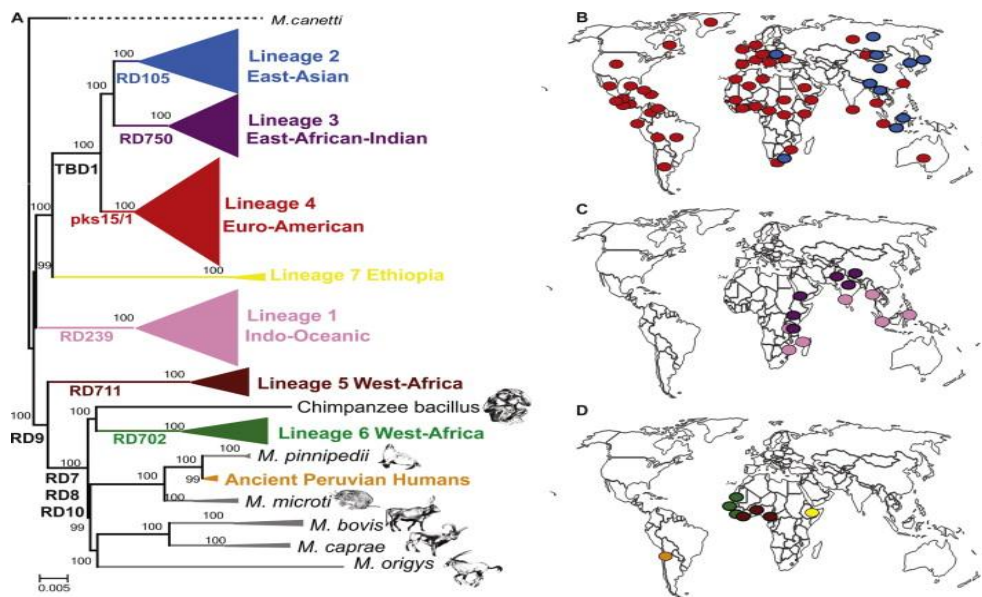


Figure 18 : (A) Phylogénie et distribution à l'échelle mondiale des six principales lignées du complexe *M. tuberculosis* associées à l'homme. (B-D) les lignées dominantes par région (Coscolla & Gagneux, 2014).

1.16 Épidémiologie de la tuberculose

Les estimations actuelles de la charge mondiale de la tuberculose sont basées sur les résultats d'enquêtes annuelles menées par l'OMS dans tous les pays du monde (Figure 19). En 2022, 10,6 millions de cas de tuberculose active (dont 167 000 VIH positives) et 1,3 million de décès sont survenus dans le monde (WHO, 2023).

La plupart des cas de tuberculose estimés en 2022 sont survenus en Asie du Sud Est (46%), suivie par l'Afrique (23%) et le Pacifique occidental (18%) ; tandis que de plus petites proportions de cas sont survenues dans la région de la Méditerranée orientale (8,1%), l'Amérique (3,1%) et l'Europe (2,2 %) (WHO, 2023).

Le taux d'incidence (nouveaux cas pour 100 000 habitants par an) dans le monde était 133, avec une augmentation de 3,9% entre 2020 et 2022. Le taux d'incidence le plus élevé (234 pour 100 000 habitants) a été enregistré dans la région de l'Asie du Sud Est (WHO, 2023).

La tuberculose pulmonaire représentait 83% des cas de tuberculose active dans le monde. En 2022, la fréquence estimée des MDR-TB et XDR-TB était de 4.4% parmi tous les cas testés. Trois pays représentaient 42% du total estimé de nombre de personnes ayant développé une MDR/RR-TB au cours de 2022 dans le monde : Inde (27%), Philippines (7,5%) et la Fédération de Russie (7,5%) (WHO, 2023).

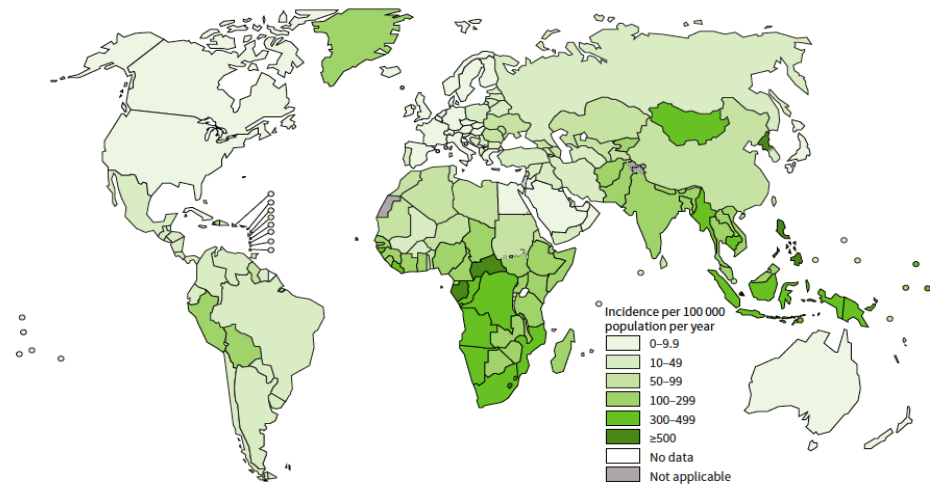


Figure 19 : Estimations de l'incidence de la tuberculose en 2023 (WHO, 2023).

En Algérie, le nombre total de cas déclarés de tuberculose en 2022 était de 18 420, avec une incidence de 51 cas pour 100 000 habitants, soit 405 cas de moins qu'en 2021. La fréquence estimée de cas de MDR-TB en 2022 était de 2,1%. Avec ces chiffres, l'Algérie est classée par l'OMS comme pays avec une incidence "moyenne" (WHO, 2023).

1.17 Mesures de prévention et de contrôle de la tuberculose

1.17.1 Vaccination

Le vaccin BCG a été préparé à l'Institut Pasteur de Lille, en France, en 1921 par Calmette et Guérin et consiste en une souche vivante atténuée de *M. bovis*, une sous-espèce étroitement apparentée de *Mtb*. L'utilisation clinique du vaccin BCG a commencé dans les années 1920, et a été incorporé au calendrier vaccinal des enfants en 1974. La première voie d'administration était orale, suivie par la voie sous-cutanée puis intradermique (Fatima et al., 2020).

Le vaccin BCG est efficace chez les enfants et principalement contre les formes sévères de tuberculose. Cependant, la protection offerte diminue avec le temps (environ 10 à 20 ans après

la vaccination), au moment où la personne présente le risque maximum d'exposition à la maladie (**Franco-Paredes *et al.*, 2006**).

Après son l'introduction du premier vaccin BCG, plusieurs pays ont produit leurs propres vaccins à base de différentes souches locales de BCG. (**Fatima *et al.*, 2020**).

Les résultats d'essais cliniques sur ces différents vaccins BCG étaient très divergentes, certains de ces essais ont montré leur efficacité, alors que d'autres non.

Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer l'échec de la vaccination par le BCG, telles que la localisation géographique, la génétique de l'hôte et la souche de BCG utilisée. Ainsi, l'efficacité du vaccin contre la tuberculose est souvent remise en question.

Malgré les résultats contradictoires des essais cliniques, le vaccin BCG reste le seul vaccin autorisé pour la prévention de la tuberculose chez l'homme, et est ainsi le vaccin le plus largement utilisés au monde (**Fatima *et al.*, 2020**).

Dans certains pays industrialisés à faible incidence de tuberculose, comme la France, l'Allemagne et l'Espagne, la vaccination des enfants par le BCG n'est plus obligatoire, mais recommandé pour les personnes à risque (**Zwerling *et al.*, 2011**). En Algérie, la vaccination par le BCG est obligatoire, elle doit être administrée au plus tôt possible après la naissance du nouveau-né.

1.17.2 Stratégies internationales de lutte contre la tuberculose

Malgré les programmes de vaccination de masse par le BCG pendant des décennies dans le monde, la tuberculose n'est toujours pas éradiquée, et reste l'une des maladies infectieuses humaines les plus dévastatrices, causant plus de décès que le virus du VIH. Ce qui indique que le vaccin BCG est clairement insuffisant pour lutter contre la tuberculose à l'échelle mondiale.

En 1991, l'OMS a déclaré la tuberculose comme un problème majeur de santé publique mondiale (**WHO, 1991**), et a ensuite été déclarée une urgence mondiale en 1993 (**Nakajima, 1993**).

Après des décennies de négligence dans la lutte contre la tuberculose, de nouveaux efforts mondiaux pour contrôler cette maladie ont commencé. En 1994, une stratégie internationale de lutte contre la tuberculose, appelée « *Directly Observed Therapy Short Course* » (DOTS) ou « traitement de courte durée sous observation directe », a été lancée par l'OMS (WHO, 1994), et a été adoptée par de nombreux pays.

Outre la vaccination obligatoire par le BCG, les objectifs de la stratégie DOTS en matière de politique de lutte contre la tuberculose sont de réduire la mortalité, la prévalence et l'incidence de la tuberculose.

La base de cette politique de lutte contre la tuberculose repose sur la détection précoce des cas, le traitement approprié des cas par une thérapie de courte durée sous observation directe, pour garantir que les patients terminent le traitement afin de prévenir le développement de la résistance aux antituberculeux dans la communauté, ainsi que l'enregistrement et la notification des cas et des résultats du traitement (**Figure 20**).

Bien que cette stratégie ait contribué à la diminution de la prévalence de la tuberculose et du taux de mortalité dans de nombreuses régions du monde ; cependant, beaucoup restait à faire encore pour parvenir à son élimination mondiale. Par conséquent, l'OMS a lancé plusieurs autres stratégies de prévention de la tuberculose. En 2006, l'OMS a lancé la stratégie Halte à la tuberculose « *Stop TB Strategy* » (Raviglione & Uplekar, 2006), comprenant six éléments, y inclut le programme de base DOTS, et de nouveaux éléments ciblant la MDR-TB et la co-infection *Mtb*/VIH (**Figure 20**).

La dernière de ces stratégies, baptisée « *End-TB Strategy* » ou stratégie pour mettre fin à la tuberculose, a été lancée par l'OMS en 2016 (WHO, 2015). Les composants essentiels de cette stratégie sont: a) l'identification et le traitement des personnes atteintes de TA ; b) recherche et dépistage des personnes qui ont été en contact avec des cas tuberculeux afin de déterminer si elles ont été infectées par *Mtb* ou étaient atteintes de TA et leur fournir un traitement approprié ; et c) dépistage des populations afin de détecter les individus atteints d'une TL et de leur fournir un traitement pour prévenir la progression vers une TA (**Figure 20**).

L'introduction pour la première fois du concept de prévention, principalement basé sur les objectifs spécifiques pour 2035 fixés par cette stratégie étaient une réduction de 90% du

nombre de décès dus à la tuberculose et une réduction de 80% de l'incidence de la tuberculose (nouveaux cas pour 100 000 habitants par an), par rapport aux niveaux de 2015.

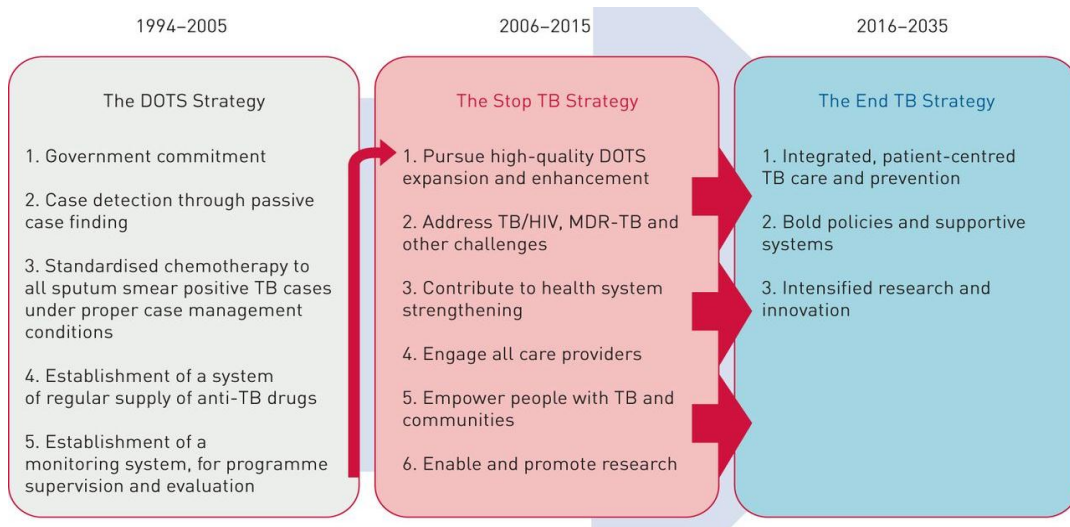


Figure 20 : Évolution des stratégies mondiales de lutte contre la tuberculose (TB). DOTS: directly observed therapy, short course; MDR: multidrug resistant (**Matteelli *et al.*, 2018**)

Matériel et méthodes

II. Matériel et méthodes

2.1 Lieu, période et population d'étude

Cette étude, qui été réalisée entre Décembre 2014 à Décembre 2015, avait comme objectif l'analyse des déterminants génétiques de la résistance aux antituberculeux chez des isolats cliniques de *Mtb* isolées à partir de patients atteints de tuberculose pulmonaire et extra-pulmonaire en Algérie.

La partie des analyses bactériologiques a été réalisée au Laboratoire de Référence de la Tuberculose et des Mycobactéries à l'Instit Pasteur d'Alger, et la partie des analyses moléculaires a été réalisée au Centre National de Référence (CNR) des Mycobactéries et de la Résistance des Mycobactéries aux Antituberculeux - Laboratoire de Bactériologie-Hôpital Lariboisière- Paris, France (équipe IAME, UMR 1137, INSERM et à l'Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France).

2.2 Prélèvements

Dans le cas d'une suspicion d'une tuberculose pulmonaire, les échantillons analysés sont l'expectoration spontanée (crachat), tubage gastrique ou aspiration bronchique. Dans le cas d'une suspicion d'une forme extra-pulmonaire, les urines, le liquide céphalo-rachidien, biopsies tissulaires ont été analysés.

2.3 Identification microscopique par coloration de Ziehl-Neelsen

L'examen microscopique après coloration de Ziehl-Neelsen permet de déterminer de manière rapide la présence des mycobactéries dans les échantillons cliniques. La technique est basée sur le caractère de bacille acido-alcool-résistant (BAAR), dû à la présence d'acides mycoliques dans leurs parois cellulaires. Les acides mycoliques donnent aux mycobactéries une plus grande affinité pour le colorant primaire, la fuchsine, et une résistance à la décoloration par une solution d'acide-alcool.

La fuchsine est utilisée comme colorant primaire dû au fait qu'elle est liposoluble et pénètre la paroi cellulaire. Puisque toutes les mycobactéries sont colorables au Ziehl-Neelsen, un résultat positif ne permet pas de distinguer entre *Mtb* et les mycobactéries non tuberculeuses (MNT).

La coloration de Ziehl-Neelsen a été réalisée en suivant le protocole de l'Union Internationale Contre la Tuberculose et les Maladies Respiratoires (UICTMR) « Diagnostic de la tuberculose par examen microscopique direct des expectorations dans les pays à faibles revenus » (UICTMR, 2000).

2.3.1 Protocole

- Préparation du frottis

Préparer un frottis de chaque échantillon en étalant l'expectoration régulièrement sur la zone centrale de la lame grâce à un mouvement continu de rotation sur une surface d'environ 20 mm sur 10 mm puis sécher la lame à l'air durant environ 30 min.

- Fixation du frottis

Fixer le frottis par passage de la lame sous une flamme du Bec-Bensen 5 fois pendant environ 4 Sec en veillant que la face d'étalement soit tournée vers le haut afin de ne pas détruire les bacilles par la chaleur.

- Coloration

- ✓ Couvrir le frottis fixé sur la lame avec une solution de fuchsine phéniquée de Ziehl à 0,3% et éliminer l'excès de solution de coloration.
- ✓ Chauffer la lame sous une flamme d'un bec Bunsen, et laisser à température ambiante pendant 5 min.
- ✓ Rincer la lame délicatement avec de l'eau distillée stérile pour éliminer l'excès de fuchsine phéniquée. Le frottis doit montrer une couleur rouge.

- Décoloration

Couvrir la lame avec de l'acide sulfurique à 25 % et laisser agir pendant 3 min.

- Contre-coloration

Couvrir la lame avec la solution de contre-coloration, le bleu de méthylène à 0,3%, et laisser agir pendant 1 min, puis rincer la lame avec de l'eau distillée stérile et laisser sécher à l'air.

- **Observation sous microscope**

- ✓ Déposer une goutte d'huile d'immersion sur le frottis, puis observer sous microscope optique avec un grossissement de 40X.
- ✓ Les BAAR apparaissent en rouge vif ou rose sur un fond bleu. Leur forme est très variable (filaments courts ressemblant à des coques ou filaments allongés).
- ✓ L'observation sous microscope fournit des informations qualitatives (présence ou pas des bacilles, aspect des bacilles) et quantitatives (nombre de BAAR), qui sont utiles pour déterminer rapidement le degré de contagiosité du patient.

Les résultats sont interprétés suivant l'échelle de positivité recommandée par UICTMR, (Tableau 3).

Tableau 3 :Interprétations des résultats de la coloration de Ziehl-Neelsen selon les recommandations de l'UICTMR.

Nombre de BAAR	Résultat	Interprétation
Pas de BAAR sur au moins 100 champs	0	Frottis négatif
1 à 9 BAAR sur 100 champs*	nombre réel de BAAR**	Frottis douteux
10 à 99 BAAR sur 100 champs	+	Frottis faiblement positif
1 à 10 BAAR par champ sur au moins 50 champs†	++	Frottis moyennement positif
> 10 BAAR par champ sur au moins 20 champs†	+++	Frottis fortement positif

*Il est recommandé de refaire un nouveau frottis du même échantillon d'expectoration et de le réexaminer.

**Il est recommandé de noter le nombre réel de BAAR.

2.4 Isolement de *Mtb*

2.4.1 Décontamination des échantillons

La plupart des échantillons cliniques d'expectorations contiennent une variété de micro-organismes qui peuvent rapidement contaminer *Mtb*. Par conséquent, il est nécessaire de décontaminer les échantillons avant de procéder à la mise en culture de *Mtb*, pour favoriser la croissance des mycobactéries. Plusieurs méthodes de décontamination des crachats avant l'isolement de *Mtb* peuvent être utilisées (**Burdz *et al.*, 2003**).

Nous avons utilisé la méthode de Petroff modifiée, une méthode de décontamination standard largement utilisée, qui est basée sur l'utilisation du NaOH à 4%.

Un volume de 2 ml d'échantillon de crachat a été transféré dans un tube et mélangé avec 4 ml de solution de NaOH à 4 %. Le mélange a été homogénéisé par agitation pendant 15 min, puis incubé à 37°C pendant 30 min pour fluidification et décontamination. Après décontamination, les échantillons ont été neutralisés avec l'acide sulfurique à 4%. Le pH du mélange a été mesuré avec un indicateur de pH.

Le mélange est ensuite centrifugé à 3000 trs/min pendant 15 min. le culot est récupéré et lavé à l'eau distillée suivi d'une deuxième centrifugation, le surnageant est éliminé, le culot est récupéré et suspendu dans 3 ml d'eau distillée stérile.

2.4.2 Culture de *Mtb* sur milieu solide

La méthode de culture des mycobactéries sur milieu solide Lowenstein-Jensen (LJ) est considérée comme la méthode de référence pour le diagnostic de la tuberculose et des résistances aux antituberculeux en laboratoire. Le seuil de détection de cette technique est de 10 à 100 bacilles/ml d'échantillons (**Guillet-Caruba *et al.*, 2014**).

Les suspensions d'échantillons décontaminées ont été inoculées dans un milieu sélectif solide LJ et incubés à 37°C en position horizontale pendant 4 à 6 semaines. Les tubes étaient initialement laissés ouverts pendant 3 à 4 jours pour l'oxygénation du milieu et l'évaporation complète de la partie liquide de l'inoculum, puis fermés durant toute la durée du reste de la période d'incubation.

Chaque échantillon, a étéensemencé dans 2 tubes. Un tube de la souche de référence *Mtb* H37Rv a étéensemencé en parallèle comme témoin positif.

2.4.3 Analyse des résultats de la croissance

Une Première inspection a été réalisée après la première semaine pour éliminer les tubes contaminés, ensuite la croissance mycobactérienne a été évaluée chaque semaine pendant 8 semaines. Après huit semaines, les cultures sans croissance mycobactérienne ont été considérées comme négatives.

2.5 Identification de *Mtb*

Les tests de l'hydrazide de l'acide thiophène- 2-carboxylique (TCH) et de l'acide para-nitro benzoïque (PNB) sont des méthodes conventionnelles d'identification des mycobactéries en permettant de différencier entre les mycobactéries du CMT et les mycobactéries non tuberculeuses (MNT) (**Giampaglia *et al.*, 2005**).

Pour réaliser les tests TCH/PNB, les mycobactéries ont été cultivées dans des milieux de culture LJ contenant TCH (2µg/ml) ou PNB (500 µg/ml). Les résultats sont interprétés comme suit : *Mtb*: TCH (+ résistantes), PNB (- sensibles); MNT: TCH (+), PNB (+) ; *M. bovis*: TCH (-), PNB (-) (**Giampaglia *et al.*, 2005**).

2.6 Test phénotypique de sensibilité aux antibiotiques

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques des isolats de *Mtb* a été réalisée par la méthode de proportion indirecte (MPI) sur gélose, qui consiste à déterminer la proportion de bacilles résistants par rapport au totalensemencé (**Canetti *et al.*, 1963**).

Un inoculum (4 à 10 colonies) de la culture primaire sur milieu LJ a été prélevé et mis dans un ballon contenant des billes avec 4 ml d'eau distillée stérile, et bien mélangé par agitation. Cette suspension mycobactérienne est retirée et placée dans un tube.

La concentration de la suspension est ajustée par l'ajout d'eau distillée stérile, tout en comparant son opacité avec celle d'une suspension étalon contenant 1 mg/ml (soit environ 10^6 à 10^7 unités formant colonie (UFC)/ml) de BCG.

A partir de cette préparation (suspension mère), nous avons préparé des dilutions 10^{-2} et 10^{-4} pour avoir un nombre de colonies comptables, chaque dilution est inoculée dans 3 tubes de géloses LJ, 2 tubes témoins sans antibiotiques et 1 tube additionné d'un des agents antituberculeux suivant : INH (0,2mg/l), STR (4 mg/l), RIF (40mg/l), EMB (2 mg/l), KAN (30mg/l) et OFX (2mg/l), puis incubées à 37°C.

Une première lecture a été effectuée après 3 semaines et une lecture définitive après 4 à 6 semaines d'incubation. La lecture consiste à compter le nombre de colonies observées sur le milieu contenant l'agent antituberculeux [Résistants (R)] et le nombre de colonies sur le milieu sans agent antituberculeux [Résistant+Sensibles (S+R)]. La proportion de bacilles résistants (%R) à un agent antituberculeux donné a été déterminée et exprimée en pourcentage de la population totale testée selon la formule suivante : $\%R = R / S+R$.

La proportion de bacilles résistants calculée est comparée avec la proportion critique définie et adoptée pour chaque antibiotique par le « Comité d'experts de la Tuberculose de l'OMS », dans le septième rapport de l'OMS publié en 1960 (Canetti *et al.*, 1963). Si l'isolat testé montre un %R inférieur à la proportion critique, la souche est considérée sensible. Dans le cas inverse, elle est résistante.

Cette proportion est fixée à 1% pour l'INH, RIF, EMB et STR, car l'agent antituberculeux n'était plus efficace lorsque plus de 1% de la population mycobactérienne était résistante à la concentration critique d'un antituberculeux testé. Tandis que la proportion critique de l'OFX était de 10% (Canetti *et al.*, 1963).

2.7 Test génotypique de sensibilité aux antibiotiques

Les isolats de *Mtb* qui ont montré des profils de résistances aux antituberculeux ont été retenus pour déterminer leurs mécanismes génotypiques de résistances, en utilisant les tests de sondes linéaires (LPA, *Line Probe Assays*), appelés également tests d'hybridation inverse sur bandelette (Ling *et al.*, 2008).

2.7.1 Tests de sondes linéaires

Nous avons utilisé les kits commerciaux GenoType® MTBDRplus v2 et GenoType®MTBDRsl v2 pour l'identification génétique simultanée des mycobactéries du MTC et de leurs résistances aux antibiotiques.

Le kit GenoType® MTBDRplus v2 permet d'identifier les mutations génétiques associées à la résistance à l'INH et la RIF (**Miotto *et al.*, 2008**), en ciblant le gène *katG* (au niveau du codon 315) et le promoteur du gène *inhA* (des nucléotides -16 à -8 en amont) pour l'INH, et la région RDRR (du codon 505 à 533) du gène *rpoB*, pour la RIF (**Figure 21**).

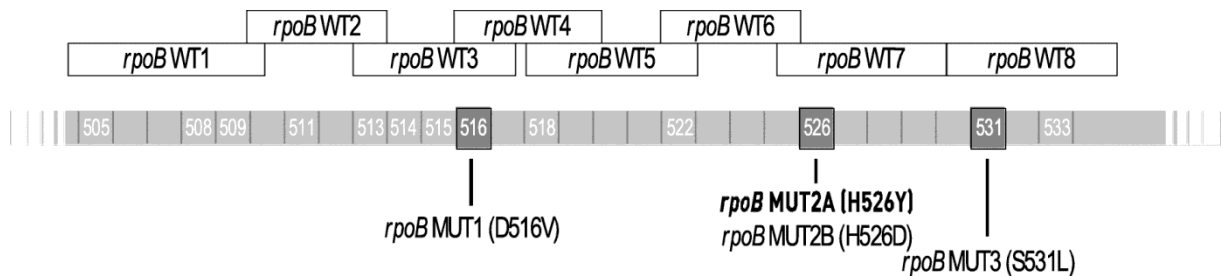
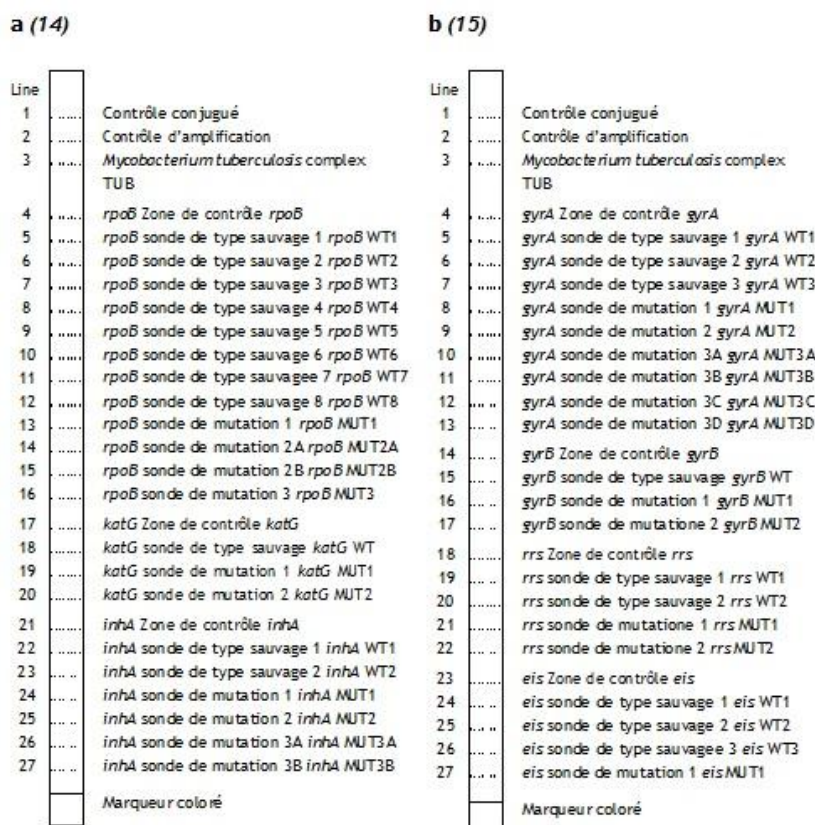


Figure 21 : Représentation de la région déterminant la résistance à la RIF (RDRR) du gène *rpoB* ciblée par le test GenoType MTBDRplus (**Sinha *et al.*, 2020**).

**RpoB* WT1-8 : Sondes *rpoB* type sauvage ; *rpoB* MUT1-3 : sondes *rpoB* mutées.

Le kit GenoType® MTBDRsl v2 cible les mutations dans quatre régions : (i) les régions QRDR des gènes *gyrA* (du codon 85 au 96) et *gyrB* (du codon 536 au 541), associées à la résistance aux FQ ; (ii) le gène *rrs* (au niveau des positions 1401, 1402 et 1484) pour la détection de la résistance croisée aux antituberculeux injectables (AMK, KAN et CAP) et la viomycine (VIO), et (iii) le promoteur du gène *eis* (nucléotides -37 à -2 en amont) pour la détection de la résistance de bas niveau à la KAN (**Figure 22**).



4

Figure 22 : Schéma représentatif des bandelettes du test GenoType MTBDRplus et GenoType MTBDRsl V2.0 (<https://www.hainlifescience.de/en/products/microbiology/mycobacteria/tuberculosis/genotype-mtbdrsl.html>).

Le principe de ces deux tests est le même (**Figure 23**), il repose sur l'amplification par PCR multiplex de régions d'ADN qui contiennent des mutations responsables de la résistance aux antituberculeux à l'aide d'amorces biotinylées, puis les produits de la PCR sont hybridés avec des sondes fixées sur une bandelette de nitrocellulose et spécifiques aux séquences sauvages et aux séquences mutées des régions ciblées. Après l'hybridation, les bandes sur la bandelette sont révélées par colorimétrie (**Figure 23**).

Si l'isolat possède la forme non mutée de la région d'ADN ciblé, un signal d'hybridation positive avec la sonde détectant spécifiquement la forme non mutée de la région d'ADN sera obtenu. Par contre, en cas de la présence de mutation dans la région d'ADN ciblé, un signal d'hybridation positive avec la sonde détectant spécifiquement cette mutation sera obtenu.

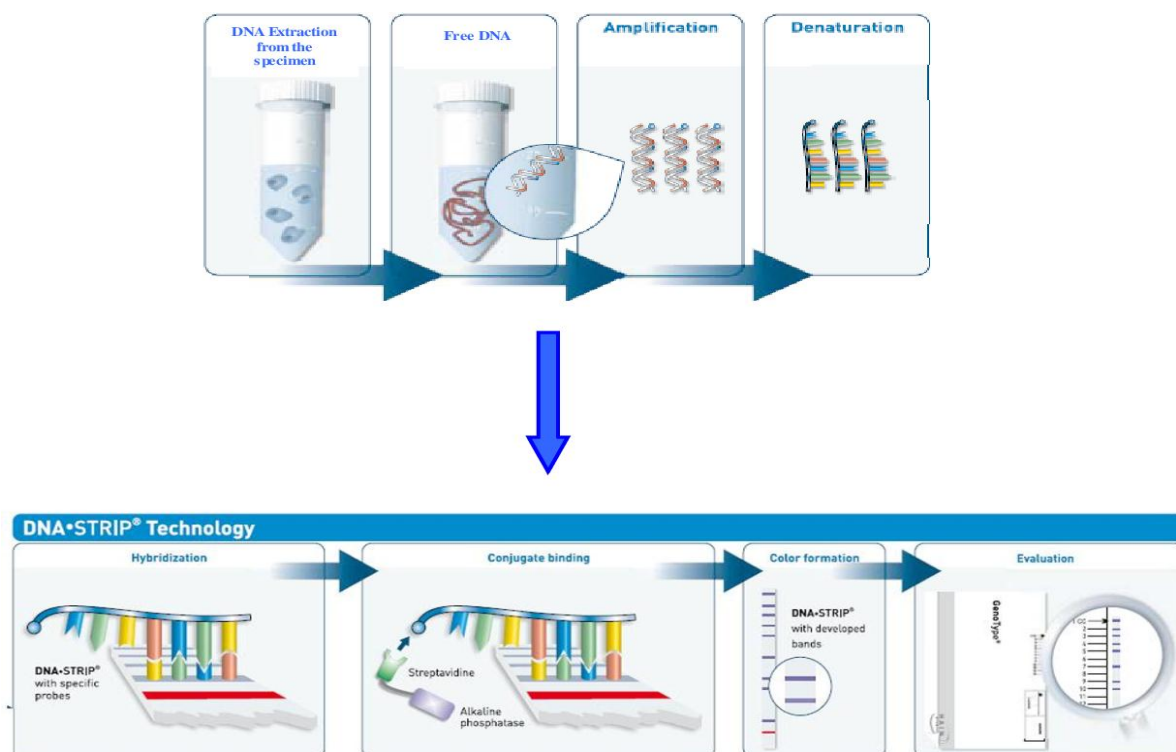


Figure 23 : Illustration simplifiée du principe et étapes du test GenoType MTBDRplus (Barnard. *et al.*, 2012).

Les tests GenoType® ont été réalisés suivant le protocole du fabricant, en utilisant les réactifs inclus dans les kits (Hain-Lifesciences, 2012).

Protocole des tests GenoType®

- Extraction et dosage de l'ADN génomique

L'ADN génomique des isolats de *Mtb* a été isolé par la méthode du choc thermique. Des colonies fraîches ont été suspendues dans 400 µl de tampon Tris-EDTA (TE) et mélangées vigoureusement au vortex pendant au moins 10 sec. La suspension a été incubée pendant 40 min à 95°C puis centrifugée pendant 5 min à 12 000 trs/min. Un volume de 150µl du surnageant contenant l'ADN a été transféré dans un tube et conservé à -20°C.

La concentration et la qualité de l'ADN ont été évaluées par mesure de l'absorbance à 260 nm à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDrop-1000.

- Amplification

L'ADN de chaque isolat étudié est amplifié par PCR multiplex. Les réactions de PCR ont été réalisées dans un volume total de 50 µl contenant: 5µl d'ADN, 10 µl de mélange d'amplification A (AM-A), contenant du tampon, les nucléotides et la Taq polymérase, et 35µl de mélange d'amplification B (AM-B), qui contient les amorces biotinylées, les sels et un colorant. Le programme d'amplification du thermocycleur est montré dans le **tableau 4**.

Tableau 4 :Programme d'amplification par PCR

Température	Durée	Nombre de cycle
95°C	15 min	1
95°C	30 Sec	10
65°C	2 min	
95°C	25 Sec	20
50°C	40 Sec	
70°C	40 Sec	
70°C	8 min	1

- Dénaturation

Pour la dénaturation de l'ADN amplifié, mettre 20 µl de chaque d'ADN amplifié dans un puit, et mélanger par pipetages répétés avec 20µl de solution de dénaturation (DEN), puis incubé pendant 5 min à température ambiante.

- Hybridation

Après dénaturation, les amplicons marqués à la biotine sont hybridés aux sondes monobrins fixés sur la bandelette.

- Ajouter 1 ml de tampon d'hybridation (HYB) préchauffé à 37°C à l'ADN dénaturé, puis agiter doucement sur un plateau agitateur jusqu'à ce que la solution ait une couleur homogène.
- Placer une bandelette dans chaque puit. Les bandes doivent être entièrement recouvertes par la solution et la face contenant les sondes doit être tournée vers le haut.
- Placer le plateau dans une plateforme d'agitation TwinCubator® et incubé pendant 30 min à 45 °C.

- Aspirer complètement le tampon d'hybridation.
- Ajouter 1 ml de solution de lavage stricte (STR) à chaque bandelette et incubé pendant 15 min à 45°C dans la plateforme TwinCubator®, puis éliminer complètement la solution de lavage.

Les étapes suivantes sont effectuées à température ambiante.

- Rincer la bandelette une fois avec 1 ml de solution de rinçage (RIN) pendant 1 min par agitation dans la plateforme TwinCubator®, puis éliminer la solution de rinçage.
- Ajouter 1 ml de conjugué streptavidine-phosphatase alcaline dilué à chaque bandelette et incubé pendant 30 min sous agitation sur la plateforme TwinCubator®.
- Laver chaque bandelette deux fois pendant 1 min avec 1 ml de solution de rinçage (RIN) et une fois pendant 1 min avec 1 ml d'eau distillée sous agitation sur la plateforme TwinCubator®.
- Ajouter 1 ml de substrat dilué à chaque bandelette et incubé à l'abri de la lumière sans agitation pendant environ 20 min.
- Arrêter la réaction en rinçant brièvement deux fois avec de l'eau distillée.
- Retirez la bandelette à l'aide d'une pince, puis laisser sécher entre deux couches de papier absorbant.

Les bandes seront observées là où l'amplicon et la sonde s'étaient hybridés.

Evaluation et interprétation des résultats du test GenoType® MTBDRplus

- Coller la bandelette dans le champ désigné sur la fiche d'évaluation (fournie avec le kit), en alignant les bandes CC et AC (**Figure 24**).
- Chaque bandelette contient 27 zones de réaction (sondes) (**Figure 24**), dont trois contrôles : contrôle conjugué (CC), contrôle d'amplification (AC), complexe *Mtb* (TUB) et trois contrôles de locus : locus *rpoB*, *katG*, et *inhA*. Les 21 bandes restantes sont des zones de réaction de type sauvage (WT) et de mutation, dont huit *rpoB* WT (WT1-WT8), quatre bandes MUT (*rpoB* MUT D516V, *rpoB* MUT H526Y, *rpoB* MUT H526D et *rpoB* MUT S531L), une bandes *katG* WT, deux bandes mutantes (*katG* MUT S315T1 et *katG* MUT S315T2), deux *inhA* WT et quatre bandes mutantes (*inhA* MUT C15T, *inhA* MUT A16G, *inhA* MUT T8C et *inhA* MUT T8A).

Les résultats ont été interprétés selon les instructions du fabricant (Hain-Lifesciences, (2012). Les six bandes de contrôle doivent apparaître sur la bandelette pour valider le résultat. Dans le cas contraire, le résultat était considéré comme invalide.

Lorsque toutes les bandes WT étaient présentes et qu'aucune bande de mutation n'était présente, l'isolat a été signalé comme non résistant. L'absence de bande WT s'accompagne généralement de la présence d'une bande de mutation, indiquant la présence de résistance. La détection de bandes WT et de mutations est considérée comme une hétérorésistance ; tandis que l'absence de bandes WT et de mutations est considérée comme une résistance déduite.

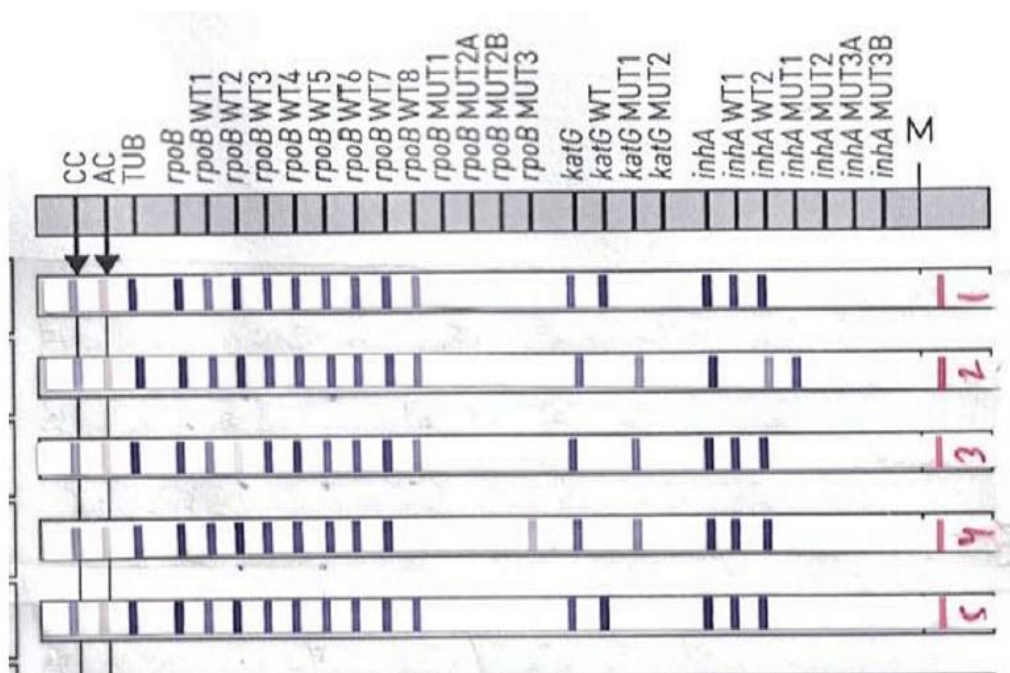


Figure 24 : Interprétation des résultats du test GenoType® MTBDR plus
(Ranjan *et al.*, 2023)

Piste 1. Sensible à la rifampicine et à l'isoniazide.

Piste 2. mono-résistant à l'isoniazide dû aux mutations *katG* S315T1 et *inhA* C15T.

Piste 3. Multirésistant avec mutation dans la région 510-513 du gène *rpoB* et dans *katG* S315T1.

Piste 4. Multirésistant avec mutation *rpoB* S531L et *katG* S315T1

Piste 5. Sensible à la rifampicine et à l'isoniazide

2.7.2 Séquençage des gènes conférant la résistance aux antituberculeux par la méthode Sanger

Des paires d'amorces ont été désignées pour amplifier 11 loci (*rpoB*, *KatG*, *inhA*, promoteur de *inhA*, *rpsL*, *rrs*, *gidB*, *embB*, *pncA*, *gyrA* et *gyrB*) associés à la résistance aux antituberculeux. Les séquences d'amorces sont listées dans le **tableau 5**. Le design des amorces a été fait avec l'équipe du service de bactériologie à l'hôpital Lariboisière.

Pour les gènes *rpoB*, *embB*, *rrs*, *gyrA* et *gyrB* seules les régions incluant les mutations les plus fréquentes conférant des résistances ont été séquencées. Pour *katG*, *rpsL*, *inhA*, *pncA*, *gidB*, les gènes en entier ont été séquencés.

Tableau 5 : Amorces utilisées pour l'amplification par PCR et pour le séquençage par la méthode de Sanger des 11 gènes de résistance.

Gène	Amorce	Sequence (5'-3')	Taille de l'amplifiat (pb)	Tm(°C)
<i>rpoB</i>	rpoB1-F	GAGGGTCAGACCACGATGAC	375	54
	MTR-R	TCGATCGGGCACATCCGG		
<i>katG</i>	katG1-S	AACACCAACTCCTGGAAGGA	395	51
	KatG1-AS	TCGGGCCAGCTGTTAAGCGG		
	katG2-S	ATCCGGATGGCGTGGCACGC	375	60
	KatG2-AS	GGTCCGGGTTGCCGTTCCGGC		
	katG3-S	AGATGGGGCTGATCTACGTG	363	53
	katG3-AS	CCGTCTTGGCGGTGTATTG		
	katG4-S	GAGTTCGCCAAGGCCTGGTA	356	53
	katG4-AS	ACTTTGATGTTCCCCGGCG		
	katG5-S	TGCGTCGCAGGAACAAACCG	375	55
	katG5-AS	ATAGACCTCGACAAGCGCCC		
Promoteur <i>inhA</i>	pinhA-F	CGGCGGAAGATCCGCGTCG	375	55
	pinhA-R	ATGGGGGTTTGGCCCCCTCA		
<i>inhA</i>	INH1-S	CACAAGGACGCACATGACA	371	51
	INH1-AS	CCTTGCCATCGAAGCATAAC		
	INH2-S	TGCATTCGATTGGGTTTCATG	288	55
	INH2-AS	AGATTCGAACGCACACCGT		
INH3-S	CGTATTCGTATGCTTCGATG	589	55	
INH3-AS	CGAAATGCAGGTAGTGCTC			
<i>embB</i>	embB1-F	CGACGCCGTGGTGATATTCG	375	55
	embB1-R	ACATAGGTGACCAGCGAGC		
	embB2-F	AGCAAACCCGCCTACTGGGC	355	55

	embB2-R	TTGGCGCGAACCCCTGGTGGC		
	embB3-F	CTGGTTCGCGCAACCGGATGG	375	57
	embB3-R	ATCAGGCTCGACGAGTACGT		
<i>pncA</i>	pncA1-F	GGCGTCATGGACCCTATATC	561	56
	pncA2-R	CCAACAGTTCATCCCGGTTTC		
<i>rpsL</i>	rpsL1-S	CAACCATCCAGCAGCTGGTC	385	55
	rpsL1-AS	CGTAGACCGGGTCGTTGACC		
<i>rrs</i>	TB53	GATGACGGCCTTCGGGTTGT	230	54
	TB54	GGCGATACGGGCAGACTAG		
	TB55	GTAGTCCACGCCGTAACGG	240	57
	TB56	TAGGCGTTCCTTGTGGCCT		
<i>gidB</i>	gidB-F	GTCCCTCCACTCGCCATC	400	58
	gidB-R	GTCCCTCCACTCGCCATC		
<i>gyrA</i>	gyrA-S	GATGTCTAACGCAACCCT	376	50
	gyrA-AS	CGGTGGGTCATTGCCCTGGCG		
<i>gyrB</i>	gyrB-S	GAGTTGGTGC GGCGTAAGAG	375	50
	gyrB-AS	ACACATGCCCGTTCTC		

- **Amplification par PCR**

Le mélange réactionnel de la PCR a été préparé comme montré dans le **tableau 6**.

Tableau 6 : Mélange réactionnel de la PCR

Réactif	Volume par échantillon (μl)
Go Taq Green MM (Promega) (2X)	12,5
Amorce sens (10pmol/ μ l)	1
Amorce anti-sens (10pmol/ μ l)	1
ADN	2
Eau	8,5
Volume final	25

L'amplification a été réalisée dans un thermocycleur Eppendorf Mastercycler gradient programmé comme suit : dénaturation initiale 94°C pendant 5 min, 35 cycles de 94°C pendant 30 Sec , 54°C à 60°C (en fonction des amorces) pendant 30 Sec, 72°C pendant 30 Sec, et une extension finale à 72°C pendant 10 min.

La taille des produits de la PCR a été vérifiée par électrophorèse sur un gel d'agarose de 1% à 1,5% (en fonction de la taille du fragment d'ADN recherché) additionné de l'intercalant d'ADN GelRed.

Un marqueur de poids moléculaire de 100 pb a été utilisé pour déterminer la taille des amplifiats. La migration s'est effectuée sous l'effet d'un champ électrique à 100 volts et la révélation de l'ADN à l'aide d'un transilluminateur sous lampe UV.

- **Purification des produits de PCR**

Les produits de la PCR ont été purifiés avec le kit NucleoFast1 96 PCR (Macherey-Nagel, Allemagne). Les produits de PCR sont dilués par ajout de 100 µl d'eau, avant d'être répartis dans les puits de la plaque de 96 puits. Le fond de ces microplaques est constitué d'une membrane qui retient les fragments d'ADN et permet l'élimination des sels et des amorces non incorporés. Pour cela la plaque est mise sur un système d'aspiration jusqu'à ce que tout le liquide contenant les impuretés soit éliminé, l'ADN resté accroché à la membrane a été élué avec 30 µl de l'eau ultra-pure.

- **Réactions de séquençage**

Le séquençage des deux brins des produits de PCR a été réalisé à l'aide du kit Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v3,1 (Applied Biosystems, USA) et par l'instrument de séquençage 3313xL (Applied Biosystems, USA) selon le protocole fourni par le fabricant.

Les réactions de séquençage ont été effectuées avec l'amorce sens et l'amorce anti-sens dans un volume de 20 µl contenant, 1 µl (10 pmol/ml) de chaque amorce, 1 µl de pré-mix BigDye® Terminator v3,1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystem, USA) comprenant l'ADN Taq polymérase, les 4 ddNTPs fluorescents, les 4 dNTPs et du Mgcl2 ; 3 µl tampon BigDye 5X ; 1 µl d'ADN et 14 µl d'eau distillée stérile.

Les réactions de séquençage ont été effectuées dans les conditions suivantes : Dénaturation initiale 2 min à 96°C ; 25 cycles de : 10 sec à 98°C, 10 sec à 50°C et 4 min à 60°C.

- Purification des produits de séquençage

Les produits de séquençage ont été purifiés par filtration sur colonnes de résine Sephadex® G50 pour éliminer les nucléotides non incorporés, les amorces et les sels, en suivant les étapes suivantes :

- Charger la résine sèche Sephadex® G-50 Superfine dans les puits d'une plaque MultiScreen.
- Ajout de 300µl d'eau distillée dans chaque puit de la plaque et laisser incuber 3 heures à température ambiante.
- Centrifuger la plaque 5 min à 910 trs/min, rincer avec 150 µl, puis centrifuger une deuxième fois 5 min à 910 trs/min.
- Déposer les produits de séquençage dans les colonnes de la plaque Multiscreen et centrifuger 5 min à 910 trs/min.
- Ajout de 20 µl d'eau distillée dans les échantillons purifiés afin de limiter la dégradation des séquences par évaporation.

- Séquençage

Le séquençage par la méthode de Sanger a été réalisé avec le séquenceur 3313XI(Applied Biosystems, USA).

- Analyse des séquences

Les séquences obtenues ont été analysées en utilisant le logiciel d'alignement de séquences Bioedit (**Hall et al., 2011**). Pour détecter les mutations, les séquences ont été comparées par alignement multiple avec les séquences des gènes *rpoB*, *katG*, *inhA*, promoteur de *inhA*, *embB*, *pncA*, *rrs*, *rpsL*, *gid* et *gyrA* de la souche de référence *Mtb* H37Rv (Numéro d'accession dans GenBank : NC000962.3).

Toutes les mutations retrouvées sont comparées avec celles incluses dans la base de données des mutations TBDReaMDB (<https://tbdreamdb.ki.se/Info/>) (**Sandgren et al., 2009**).

2.7.3 Séquençage NGS ciblé basé sur des amplicons

Les mutations de résistances de deux isolats MDR n'ont pas été identifiées par la méthode Sanger. Par conséquent, pour déterminer les mécanismes de leurs multirésistances, nous avons effectué un séquençage par la stratégie NGS ciblée basée sur des amplicons en ciblant 15 gènes impliqués dans la résistance aux antituberculeux (*rpoB*, *katG*, *inhA*, *embB*, *pncA*, *rrs*, *rpsL*, *gidB*, *gyrA*, *gyrB*, *rplC*, *tlyA*, *ethA*, *ethR*).

L'approche de séquençage NGS ciblée basée sur des amplicons nécessite la préparation d'une bibliothèque d'amplicons qui implique plusieurs étapes : (i) préparation des amplicons par une première PCR; (ii) purification des amplicons; (iii) mesure de la concentration de l'ADN des amplicons; (iv) préparation d'une bibliothèque d'amplicons, par mélange des amplicons suivi par leur amplification clonale par une deuxième PCR en émulsion; (v) dénaturation de l'ADN de la bibliothèque d'amplicons et (vi) séquençage.

Préparation des amplicons

- Amplification des gènes cibles par PCR

Les séquences des 31 paires d'amorces (sens et anti-sens) utilisées dans la PCR sont données dans l'**annexe 1**. Ces amorces ont été désignées d'une manière que chaque amorce contient quatre parties fusionnées ensemble (**figure 25 et 26**): une séquence spécifique à l'ADN de *Mtb* cible, une séquence indexe (code barre) de 10 nucléotides appelées MID (*Multiplex Identifier*), une séquence de 4 nucléotides "TCAG", nécessaire pour l'initiation du séquençage, et des séquences adaptateurs 454 de 25 nucléotides (A ou B) nécessaires pour la PCR en émulsion et au séquençage bidirectionnel des amplicons (**figure 25 et 26**).

Les séquences MID servent comme code-barres permettant au logiciel du séquenceur d'identifier et de trier les séquences des amplicons mélangés selon les amplicons auxquelles elles appartiennent.



Figure 25 : Représentation schématique des amorces de la réaction PCR pour la préparation d'une bibliothèque d'amplicons « de base ».

Les amorces de la PCR contiennent une séquence spécifique au gène cible (vert), une séquence code-barre MID (jaune), une séquence "TCAG" (rouge) et une séquence d'adaptateur 454 (bleu) (Roche diagnostic).

Amorce anti-sens avec MID 1

5'-CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA-TCAG-ACGAGTGCCTGCGGCTGGACGACTCGGA-3'

Amorce anti-sens avec MID 1

5'-CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC-TCAG-ACGCTCGACA-CTTCTGCTCTTGCGCAGCCA-3'

Figure 26 : Exemple d'amorces utilisées dans la PCR.

Les amorces de la PCR contiennent une séquence spécifique au gène cible (vert), une séquence code-barre MID (orange), une séquence "TCAG" (rouge) et une séquence d'adaptateur 454 (bleu).

Le mélange réactionnel de la PCR a été préparé comme décrit dans le **tableau 7**.

Tableau 7 : Mélange réactionnel de la PCR

Réactif	Volume par réaction (µl)
Tampon Fast Start (10X)	2,5
Mgcl2So4 (50 mM)	1
dNTP mix (10mM)	0,5
Polymérase FastStart (5 U/µl)	0,25
Amorce sens (10µM)	1
Amorce antisens (10µM)	1
ADN génomique (5 ng/ml)	1
Eau	18,75
Volume total	26

- Programme de la PCR

Les conditions de la PCR étaient les suivantes : Dénaturation initiale à 94°C pendant 3 min, puis 35 cycles de : 15 sec à 94°C, 45 sec à 55°C et 1 min à 72°C, enfin une extension finale de 72°C pendant 8 min. La présence d'amplicons a été vérifiée par migration des aliquotes des produits de la PCR sur un gel d'agarose à 1.5%.

- **Purification des amplicons**

Les ADN produits par les réactions de PCR ont été purifiés à l'aide de billes magnétiques Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter) pour éliminer les sels, les amorces restants et les artefacts de la réaction de PCR, en suivant les instructions du fabricant, comme suit :

1. Transférer chaque produit de PCR dans un tube et en ajouter 22,5 μL d'eau.
2. Ajouter 72 μl de billes AMPure XP (billes magnétiques) dans chaque tube, mélanger au vortex pendant 5 sec et incubé pendant 10 min à température ambiante.
3. Placer les tubes sur une plaque de séparation magnétique pendant 10 min. Lors de cette incubation, retirer et jeter le surnageant sans perturber les billes.
4. Ajouter 200 μl d'éthanol à 70% dans chaque tube puis mélanger au vortex.
5. Placer les tubes sur la plaque de séparation magnétique, incubé pendant 1 min. Retirer et jeter le surnageant sans perturber les billes.
6. Répéter une deuxième fois les étapes 4 à 5.
7. Ouvrir les tubes et les placer dans un bloc chauffant à 37°C pendant 5 min pour permettre l'évaporation complète de l'éthanol.
8. Ajouter 20 μl de tampon Tris EDTA 1X dans chaque tube, puis mélanger par pipetage jusqu'à ce que toutes les billes soient remises en suspension.
9. Placer les tubes sur la plaque de séparation magnétique pendant 2 min.
10. Transférer 20 μL de surnageant dans un nouveau tube sans perturber les billes.

Les amplicons ainsi purifiés peuvent être utilisés immédiatement ou conservés à -20°C.

- **Mesure de la concentration des ADN des amplicons**

Une quantification précise des produits de la PCR est essentielle pour permettre d'avoir une représentation équimolaire et optimale de tous les amplicons lors du séquençage multiplex. La concentration de l'ADN purifié des amplicons de chaque réaction de PCR a été mesurée par fluorométrie à l'aide du kit Quant-iT PicoGreen dsDNA (Invitrogen). Le colorant fluorescent du kit PicoGreen se lie spécifiquement à l'ADN double brin.

L'efficacité de la purification, a été vérifiée par électrophorèse capillaire par puce d'ADN à l'aide du kit DNA 7500 Lab-Chip (Agilent Technologies, USA) sur un automate Agilent 2100 bioanalyzer, cette technique permet l'analyse qualitative et quantitative des fragments d'ADN de 100 à 7500 pb avec une grande sensibilité (gamme de quantification : 0,1-50 ng/ μL).

Préparation d'une courbe standard

- Préparer une solution mère d'ADN à 2 µg/mL en diluant 50 fois dans du TRIS-EDTA (TE) l'ADN lambda (100 µg/mL) fourni dans le kit Quant-iT™ PicoGreen®.
- Diluer la solution mère d'ADN à 2 µg/mL dans des cuvettes en quartz comme indiqué dans le **tableau 8**. Bien mélanger et incuber 2 à 5 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière.
- Après incubation, mesurer la fluorescence de l'échantillon à l'aide d'un spectrofluoromètre (excitation ~480 nm, émission ~520 nm).
- Soustraire la valeur de fluorescence du témoin de celle de chacun des échantillons.

Tableau 8 : Protocole de préparation d'une courbe étalon

Volume de TE (µL)	Volume de solution d'ADN mère à 2 µg/mL (µL)	Volume de réactif Quant-iT™ PicoGreen® Diluté (µL)	Concentration finale d'ADN dans le Quant-iT™ PicoGreen® test
0	1,000	1,000	1 µg/mL
900	100	1,000	100 ng/mL
990	10	1,000	10 ng/mL
999	1	1,000	1 ng/mL
1,000	0	1,000	Témoin

- Diluer les produits de la PCR avec du TE dans un volume final de 1 mL dans des cuvettes ou tubes à essai.
- Ajouter 1 ml de la solution du réactif Quant-iT™ PicoGreen® à chaque bibliothèque.
- Incuber 2 à 5 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière.
- Mesurer la fluorescence de chaque produit de PCR à l'aide d'un spectrofluoromètre.
- Soustraire la valeur de fluorescence du témoin de celle de chaque bibliothèque.
- Déterminer la concentration d'ADN des produits de PCR à partir de la courbe standard générée dans l'étape précédente.

Préparation de la bibliothèque d'amplicons et séquençage

Les produits de PCR1 purifiés contenant des codes-barres d'ADN de 10 nucléotides distincts (MID 1 et MID 2), incorporés dans les amplicons produits par la PCR1, ont été regroupés (poolés) dans un mélange de concentration équimolaire de chaque amplicon.

Cette bibliothèque d'amplicons a ensuite été purifiée à l'aide du kit de billes magnétiques Agencourt AMPure XP (Agencourt/Beckman Coulter Genomics) en suivant le protocole de préparation du fabricant Roche (décrit ci-dessus lors de la purification des produits de la PCR1).

La bibliothèque d'amplicons a été quantifiée avec le kit Quant-iT PicoGreen dsDNA (Invitrogen), en suivant le protocole du fabricant (décrit ci-dessus lors la quantification des produits de la PCR1).

Les ADN de la bibliothèque d'amplicons ont été dénaturés par traitement avec une solution d'hydroxyde de sodium, puis une dilution appropriée de la bibliothèque d'amplicons a ensuite été mélangée dans une émulsion eau-dans-huile avec des billes A et B. Les amplicons sont capturés par les billes par l'intermédiaire de séquences présentes sur la surface des billes qui sont complémentaires aux séquences A et B incorporées aux extrémités des amplicons (un seul amplicon est fixé sur une bille) (**Figure 27**).

Les amplicons fixés sur les billes ont été amplifiés par PCR en émulsion (emPCR) avec le kit GS Junior Lib-A puis séquencés en mode paire avec le kit GS Junior Titanium Sequencing sur l'instrument 454-GS Junior (Roche/454 Life Sciences) en suivant les protocoles du fabricant (**Figure 27**).

Les réactions de emPCR ont été effectuées selon les conditions suivantes : Dénaturation initiale à 94°C pendant 4 min, puis 50 cycles de 94°C pendant 30 sec, 58°C pendant 4,5 min et 68°C pendant 30 sec.

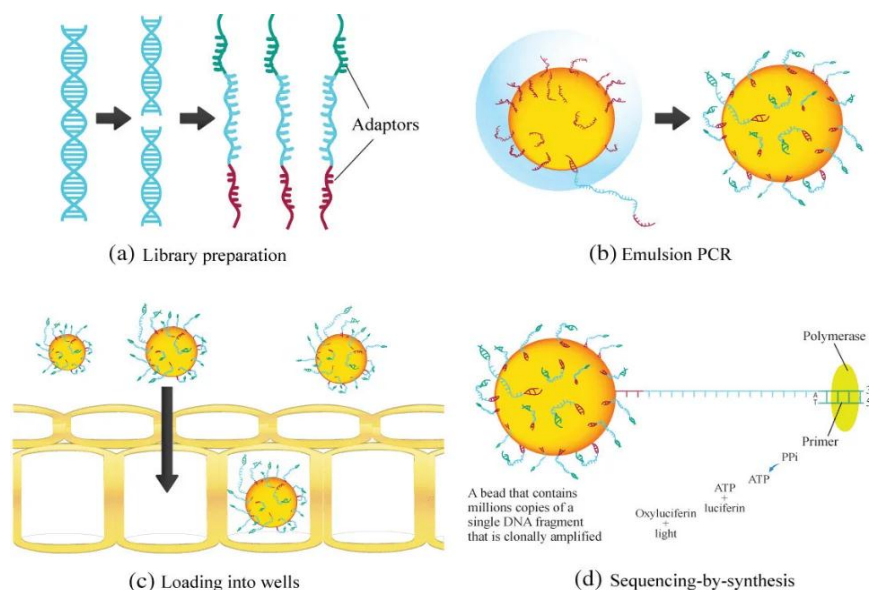


Figure 27 :Représentation schématique du processus de pyroséquence par la technologie Roche/454 (Low & Tammi, 2017).

(A) La bibliothèque d'ADN est préparée par PCR qui fixe un adaptateur aux extrémités des fragments d'ADN (amplicons). (B) Un seul fragment d'ADN (amplicon) se lie à chaque bille via son adaptateur. Les fragments d'ADN fixés sur les billes sont amplifiés par PCR en émulsion, qui génère des millions de copies d'un seul fragment d'ADN sur chaque bille. (C) Les billes sont placées dans la plaque PicoTiter pour le séquençage. (D) Durant le séquençage, les nucléotides sont ajoutés un par un. Lorsqu'un nucléotide est incorporé dans l'ADN en cours de synthèse, un pyrophosphate inorganique (PPi) est généré, qui est converti en ATP par la sulfurylase, l'ATP est utilisé par une luciférase pour produire la lumière .

Analyse des séquences

L'analyse de séquences a été réalisée par les logiciels GS Junior Sequencer v3.0, GS Run Browser v3.0 et GS Amplicon Variant Analyzer v3.0, qui permettent l'alignement et la comparaison des séquences obtenues aux séquences de référence.

2.7.4 Typage des isolats de *Mtb* par MIRU-VNTR

Les isolats ont été comparés par typage en utilisant la méthode de MIRU-VNTR à 24 locus, comme décrit précédemment (Supply *et al.*, 2006). Les 24 locus MIRU-VNTR ont été amplifiés par PCR multiplexe en utilisant des amorces spécifiques aux régions flanquantes les MIRU-VNTR. La liste des amorces utilisées est donnée dans l'Annexe 2.

Mélange réactionnel de la PCR MIRU-VNTR

Le mélange réactionnel de la PCR a été préparé comme suit (**tableau 9**).

Tableau 9 : Mélange réactionnel de la PCR

Réactif	Volume par réaction (µl)
ADN chromosomique (20 ng/µl)	1
Amorce sens (10µM)	5
Amorce antisens (10µM)	5
dNTPs (1.25 mM)	8
Tampon de PCR (10X)	5
MgCl ₂ (50 mM)	1.5
Taq DNA polymerase	0.25
Eau pure	24.25
Volume final	50

L'amplification de l'ADN de 24 locus a été réalisée avec le programme suivant : dénaturation initiale 15 min à 95°C; 40 cycles de : 1 min à 94°C, 30 sec à 59°C, 1 min 30 sec à 72 °C ; et une extension finale à 72°C pendant 10 min.

Les amplifiats ont été analysés par électrophorèse capillaire, pour cela 2 µl d'ADN ont été ajoutés à 9,5 µl de formamide Hi-Di (AB) et 0,5 µl de standard de taille interne GeneScan™ 1200 LIZ®.

Le mélange a été dénaturé par chauffage à 95 °C pendant 5 minutes puis le refroidissant rapidement sur un bloc réfrigéré. Les produits de PCR ont été ensuite séparés selon leur taille et la fluorescence a été détectée par électrophorèse capillaire sur un séquenceur automatique ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer. Les données brutes générées par le séquenceur automatique ont été analysées à l'aide du logiciel Gene Mapper.

Résultats

III. Résultats

3.1 Caractéristiques des patients et des prélèvements

Durant la période allant de Décembre 2014 à Décembre 2015 ; 2934 prélèvements (pulmonaires et extra-pulmonaires) provenant de patients de différentes Wilayas, qui ont été reçus à l'Institut Pasteur d'Alger, ont été analysés dans cette étude.

3.2 Isolement et identification de *Mtb*

La recherche des *Mtb* dans les 2934 échantillons a été réalisée par examen microscopique après coloration de Ziehl-Neelsen (**Figure 28**), culture sur milieu LJ (**Figure 29**) et par la méthode d'identification traditionnelle PNB/TCH. Sur les 2934 prélèvements, 750 étaient positives pour *Mtb* par culture sur milieu LJ et par le test PNB/TCH.

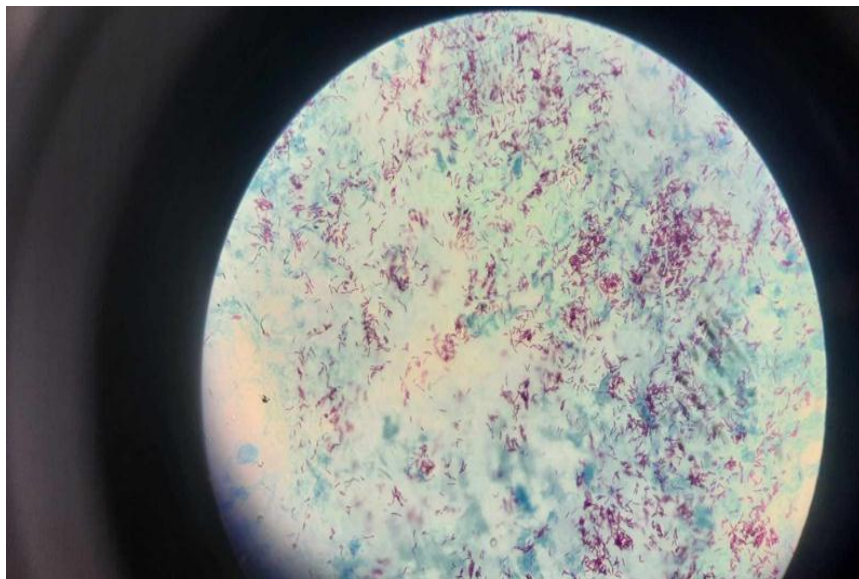


Figure 28 :Exemple d'un résultat positif d'un isolat de *Mtb* par examen microscopique après coloration de Ziehl-Neelsen



Figure 29 : Exemple d'une culture positive d'un isolat de *Mtb* sur milieu LJ.

3.3 Test phénotypique de sensibilité aux antibiotiques

Les 750 isolats de *Mtb* ont été soumis au test de sensibilité aux antibiotiques par la méthode de proportion indirecte (MPI) sur gélose contre un panel de 5 antibiotiques INH, RIF, STR, EMB et OFL. Les résultats ont été interprétés selon les recommandations définies par l'OMS ;il ressortait de ces résultats que parmi les 750 isolats, 11 (1,46%) étaient résistants à au moins un antituberculeux testé. Les profils de résistances des 11 isolats de *Mtb* sont présentés dans le **tableau 10**.La résistance était observée plus fréquemment avec l'INH (100%), suivie du RIF (90%), de la STR (72,7%), de l'EMB (18,2 %) et de l'OFL (9,1%) (**Figure 30**).

Tableau 10 : Phénotypes de résistances des isolats de *Mtb*

Isolat	RIF	INH	STR	EMB	OFL
Alg 1	R	R	R	S	S
Alg 2	R	R	R	S	S
Alg 3	R	R	R	R	R
Alg 4	R	R	R	S	S
Alg 5	R	R	S	R	S
Alg 6	S	R	R	S	S
Alg 7	R	R	R	S	S
Alg 8	R	R	S	S	S
Alg 9	R	R	S	S	S
Alg 10	R	R	R	S	S
Alg 11	R	R	R	S	S
Taux de résistance (%)	90,9	100	72,7	18,2	9,1

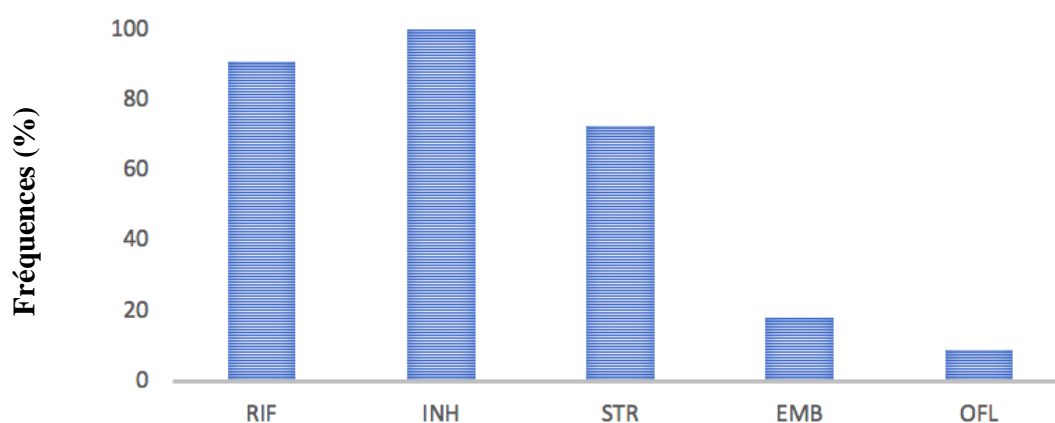


Figure 30. Fréquences de résistance aux antituberculeux.

Les résultats du test d'antibiorésistance (MPI) ont montré que 10 isolats étaient MDR-TB, en étant résistants à la fois au RIF et à l'INH ; et 1 isolat (Alg 6) était mono-résistant (MR-TB) à l'INH (mais sensible à la RIF). Les caractéristiques des 10 MDR-TB et 1 MR-TB isolats et les données démographiques et cliniques des patients sont présentées dans le **tableau 11**.

Tableau 11 : Phénotype de résistances des isolats de *Mtb* et caractéristiques des patients et prélèvements.

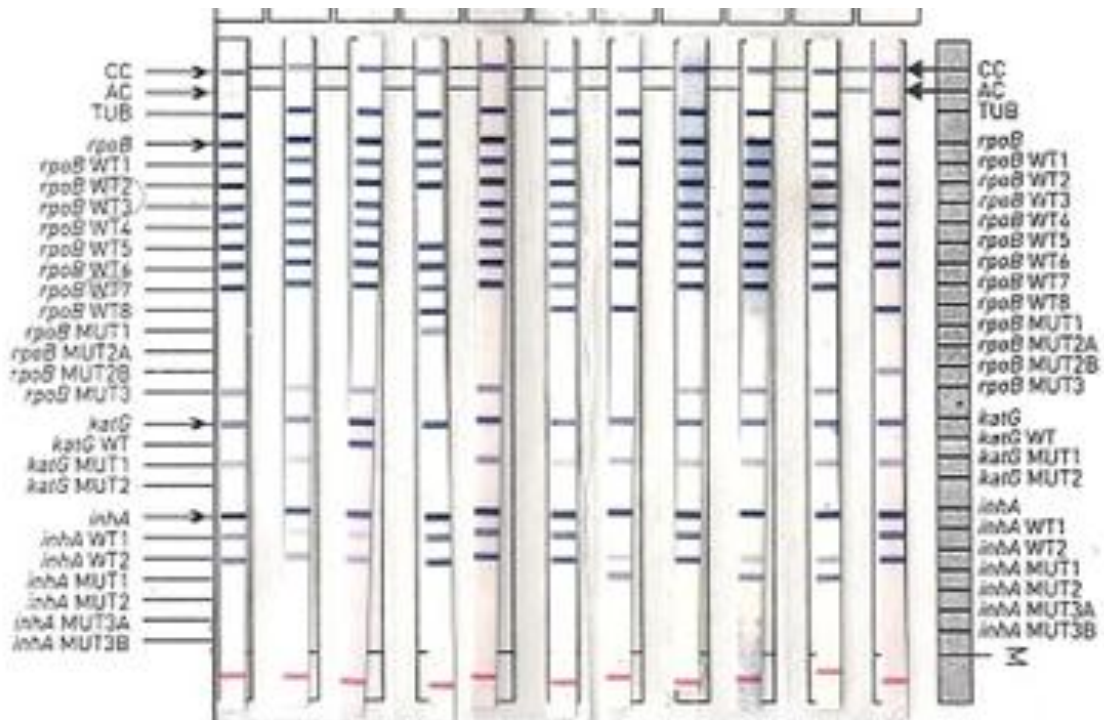
Caractéristiques des patients et prélèvements					
	Age (an)	Wilaya	Type de TB	Type de prélèvement	Date de collection
Alg 1	21	Alger	TB pulmonaire	Crachat	2015
Alg 2	46	Alger (CHU Parnet)	TB extra-pulmonaire	Pus d'une ponction à l'épaule	13/05/2015
Alg 3	22	Blida	TB pulmonaire	Crachat	2015
Alg 4	24	Sétif	TB pulmonaire	Crachat	19/04/2015
Alg 5		Batna	TB pulmonaire	Crachat	18/06/2015
Alg 6	24	Blida	TB pulmonaire	Tubage gastrique	2015
Alg 7	88	Khenchala	TB pulmonaire	Crachat	20/01/2015
Alg 8	59	Draa ben Khada – Tizi Ouzou	TB pulmonaire	Crachat	20/12/2015
Alg 9	24	Oran	TB pulmonaire	Crachat	19/04/2015
Alg 10	Non renseigné	Hadjout - Tipaza	TB pulmonaire	Crachat	27/12/2014
Alg 11	38	Ouled Yaich-Blida	TB pulmonaire	Crachat	25/02/2015

100 % des isolats provenaient de patients adultes, Neuf (90%) isolats MDR-TB provenaient de prélèvements de crachat et 1 (10%) de pus (collecté au niveau de l'épaule). Un seul isolat MR-TB a été obtenu par prélèvement d'un tubage gastrique.

Les 10 isolats de MDR-TB et 1 MR-TB (à l'INH) ont été retenus pour la caractérisation des mécanismes génotypiques de leurs résistances aux antituberculeux par *les tests* LPA GenoType® MTBDRplus v2 et GenoType® MTBDRsl v2, par séquençage avec la méthode Sanger ou par séquençage NGS.

3.4 Analyse génotypique de la résistance à la rifampicine et à l'isoniazide

Les mutations déterminants la résistance à l'INH (gène *katG* et promoteur du gène *inhA*) et au RIF (gène *rpoB*) ont été déterminées par le test GenoType® MTBDRplus v2 et le séquençage par la méthode Sanger. Les résultats de ces analyses sont montrés dans la **figure 31** et le **tableau 12**.



TUB	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>rpo B</i> WT	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>rpo B</i> MUT	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
<i>kat G</i> WT	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>kat G</i> MUT	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>inh A</i> WT	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
<i>inh A</i> MUT	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
RIF											
Sensible						+					
Résistant	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+
INH											
Sensible			+								
Résistant	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1

Figure 31 : Résultats du test GenoType® MTBDRplus v2.

CC : contrôle conjugué, AC : contrôle d'amplification, TUB : identification du complexe *M. tuberculosis* , pistes numérotées de 1 à 11 représente les souches *MTB* de ALG1 à ALG11.
(+ : présence de sonde WT/MUT, - : absence de sonde WT/MUT).

Tableau 12. Analyse génotypique de la résistance à la rifampicine et à l'isoniazide

Isolats	RIF			INH					
	Phéno type	Gène <i>rpoB</i>		Phéno type	Gène <i>katG</i>		Promoteur <i>inhA</i>		Gène <i>inhA</i>
		MTBDRplus	Séquençage de Sanger		MTBDR plus	Séquençage de Sanger	MTBD Rplus	Séquençage de Sanger	Séquençage de Sanger
Alg 1	R	MUT2B	H526D (CAC-GAC)	R	MUT1	S315T (AGC-ACC)	Non muté	Non muté	Non muté
Alg 2	R	MUT3	S531L (TCG-TTG)	R	MUT1	S315T (AGC-ACC)	MUT1	C-15T	Non muté
Alg 3	R	MUT3	S531L (TCG-TTG)	R	MUT1	S315T (AGC-ACC)	MUT1	C-15T	Non muté
Alg 4	R	MUT3	S531L (TCG-TTG)	R	MUT1	S315T (AGC-ACC)	Non muté	Non muté	Non muté
Alg 5	R	WT7-,WT2- /WT3-	H526Q (CAC-CAG)/ Del 512-513-514*	R	MUT1	S315T (AGC-ACC)	MUT1	C-15T	Non muté
Alg 6	S	Non muté	Non muté	R	MUT1	S315T (AGC-ACC)	Non muté	Non muté	Non muté
Alg 7	R	MUT3	S531L (TCG-TTG)	R	MUT1	S315T (AGC-ACC)	Non muté	Non muté	A190S (GCC-TCC)
Alg 8	R	MUT1	D516V (GAC-GTC)	R	MUT-	S315R (AGC-AGG)	Non muté	Non muté	Non muté
Alg 9	R	MUT3	S531L (TCG-TTG)	R	Non muté	M126I (ATG-ATA)/ R496L (CGC-CTC)	Non muté Non muté	Non muté Non muté	Non muté
Alg 10	R	MUT3	S531L (TCG-TTG)	R	MUT1	S315T (AGC-ACC)	Non muté	Non muté	A190S (GCC-TCC)
Alg 11	R	MUT3	S531L (TCG-TTG)	R	MUT1	S315T (AGC-ACC)	Non muté	Non muté	A190S (GCC-TCC)

Les mutations non décrites sont marquées d'un astérisque (*).

Le système de numération d' *E.coli* a été utilisé pour le gène *rpoB*.

R: résistant, S: sensible, RIF: rifampicine, INH: isoniazide.

Résistance à la rifampicine

- Gène *rpoB*

La résistance à la RIF est principalement due à des mutations ponctuelles dans la RDRR du gène *rpoB* codant pour la sous-unité β de l'ARN polymérase. Dans cette étude, tous les isolats (100%, n=10) MDR-TB étaient résistants à la RIF et à l'INH.

Chez ces isolats, la mutation dans le gène *rpoB* conférant la résistance à la RIF la plus courante (70%, n=7) était au niveau du nucléotide 531, résultant en la substitution S531L (selon le système de numération d'*Escherichia coli*, la position correspondante dans le système de numération de *Mtb* est 450).

La deuxième mutation la plus répandue (20%, n=2) dans le gène *rpoB* était au niveau du codon 526 (selon le système de numération d'*E. coli*, la position correspondante dans le système de numération de *Mtb* est 445), conduisant à deux différentes substitutions,

H526D et H526Q (une par isolat). A notre surprise, l'isolat qui possédait la mutation H526Q, possédait également une délétion de 9 pb, jamais décrite auparavant, au niveau de la position entre 1290 à 1298 correspondante aux trois codons 512, 513 et 514 (selon le système de numération d'*E. coli*, les positions correspondantes dans le système de numération de *Mtb* sont 431, 432 et 433).

L'isolat de MDR-TB restant a présenté une mutation au niveau du codon 516 conduisant à D516V (selon le système de numération d'*E. coli*, la position correspondante dans le système de numération de *Mtb* est 435).

Les résultats du test phénotypique de la résistance au RIF sont concordants avec les résultats génotypiques par le kit GenoType^R MTBDRplus et par le séquençage Sanger (**Tableau 12**).

Résistance à l'isoniazide

- Gène *KatG*

Parmi les 11 isolats résistants à l'INH, 9 (88,9%) portaient la mutation classique *KatG* S315T ; cependant, 1 isolat a montré une mutation rare au niveau du codon *KatG* S315R. L'isolat restant portait deux rares mutations *katG*, M126I et R496L.

Les résultats obtenus par le kit GenoType^R MTBDRplus sont concordants avec les résultats du séquençage de Sanger (**Tableau 12**). Les résultats du test phénotypique de la résistance à l'INH sont concordants avec les résultats génotypiques par le kit GenoType^R MTBDRplus et par le séquençage Sanger (**Tableau 12**).

- Promoteur et gène *inhA*

Parmi les 11 isolats résistants à l'INH, la mutation C15T au niveau du promoteur *inhA* a été retrouvée chez 3 isolats (27,3%). Cette mutation est associée à la mutation *katG* S315T. Une mutation au niveau du codon 190 A190S du gène *inhA* a été retrouvée chez 3 (27,3%) autres isolats (**Tableau 12**). L'isolat résistants à l'INH mais sensible au RIF portait la mutation classique *katG* S315T.

3.5 Analyse génotypique de la résistance aux autres agents antituberculeux de première ligne et seconde ligne

Les mutations déterminants la résistance aux agents antituberculeux de seconde ligne OFL et AMK/KAN ont été déterminées par le test GenoType® MTBDRsl v2 et par la méthode de séquençage. Alors que les mutations responsables à la résistance à la STR, EMB, PZA ont été étudiées par la méthode de séquençage (Figure 32 , Tableau 13).

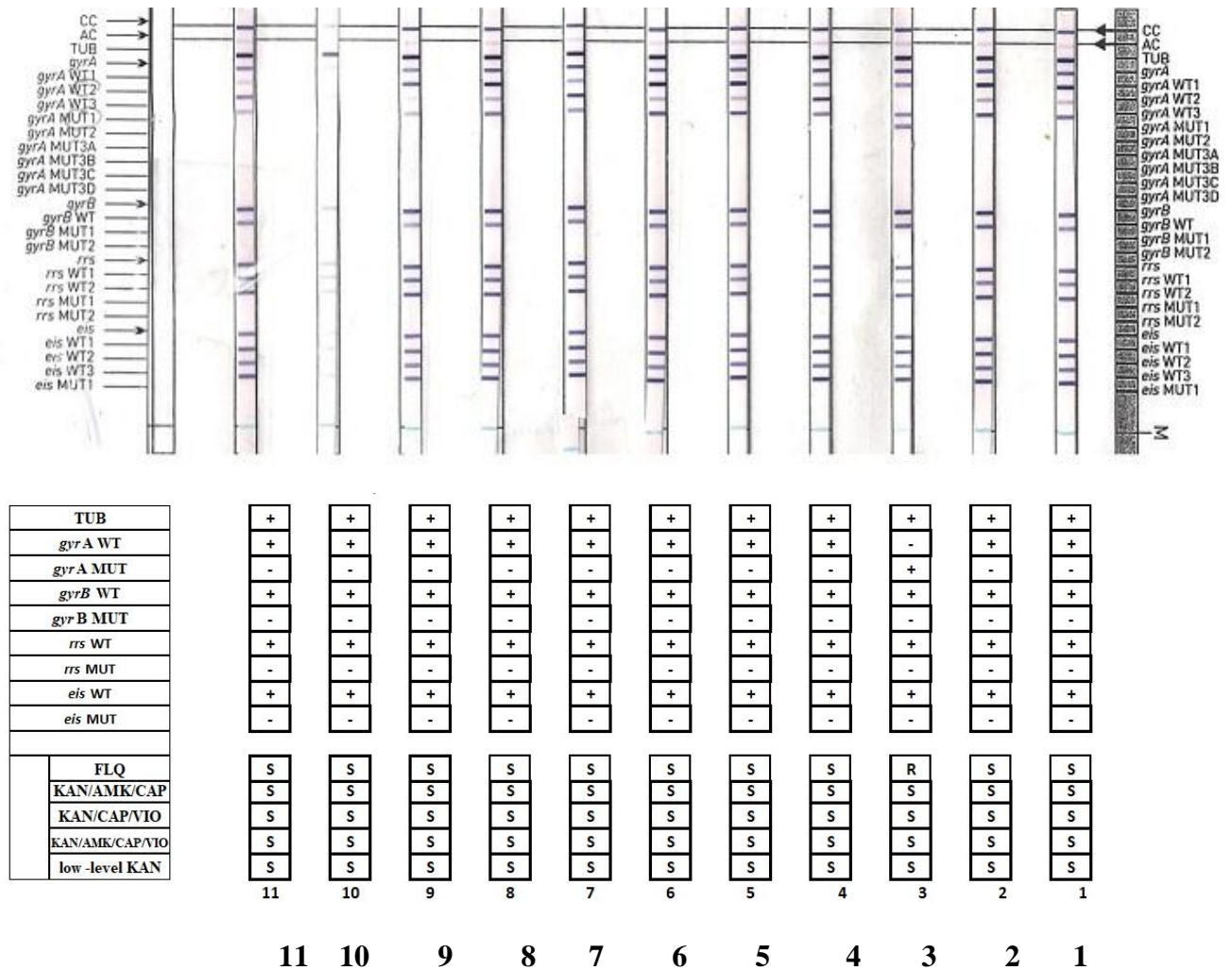


Figure 32. Résultats du test GenoType® MTBDRsl v2

CC : contrôle conjugué, AC :contrôle d'amplification, TUB : identification du complexe *M. tuberculosis* , pistes numérotées de 1 à 11 représentent les souches *MTB* de ALG1 à ALG11.
(+ : présence de sonde WT/MUT, - : absence de sonde WT/MUT, R : résistant , S : sensible).

Tableau 13 : Analyse génotypique de la résistance à la streptomycine, éthambutol, pyrazinamide, ofloxacine, amikacine et la kanamycine.

Isolats	STR				EMB		PZA	OFL			AMK/KAN	
	Séquençage de Sanger				Séquençage de Sanger		Séquençage de Sanger	phénotyp e	MTBDRsl	Séquençage de Sanger	MTBDRs l	Séquençage de Sanger
	phénotyp e	<i>gène rpsL</i>	<i>gène rrs</i>	<i>gène gidB</i>	phénotyp e	<i>gène embB</i>	<i>Gène pncA</i>		<i>gène gyrA</i>		<i>Gène rrs</i>	
Mtb 1	R	Non muté	Non muté	V124G (GTG-GGC)*	S	Non muté	Ins GG 391	S	Non muté	<u>E21Q</u> (GAG-CAG) <u>S95T</u> (AGC-ACC)	Non muté	Non muté
Mtb 2	R	Non muté	A514C	L16R (CTT-CGT)	S	Non muté	T142M (ACG-ATG)	S	Non muté	<u>E21Q</u> (GAG-CAG) <u>S95T</u> (AGC-ACC)	Non muté	Non muté
Mtb 3	R	Non muté	A514C	L16R (CTT-CGT)	R	M306V (ATG-GTG)	T142M (ACG-ATG)	R	MUT1	<u>E21Q</u> (GAG-CAG) A90V (GCG-GTG) <u>S95T</u> (AGC-ACC)	Non muté	Non muté
Mtb 4	R	K43R (AAG-AGG)	Non muté	WT	S	Y319S (TAT-TCT)	V139L (GTG-CTG)	S	Non muté	<u>E21Q</u> (GAG-CAG)	Non muté	Non muté
Mtb 5	S	Non muté	Non muté	E92A (GAA-GCA)*	R	M306I (ATG-ATA)	P62R (CCG-CGG)	S	Non muté	<u>E21Q</u> (GAG-CAG) <u>S95T</u> (AGC-ACC)	Non muté	Non muté
Mtb 6	R	Non muté	Non muté	Del Int115	S	Non muté	WT	S	Non muté	<u>E21Q</u> (GAG-CAG) <u>S95T</u> (AGC-ACC)	Non muté	Non muté
Mtb 7	R	K43R (AAG-AGG)	Non muté	V139A (GTG-GCG)*	S	D328Y (GAT-TAT)	V155A (GTG-GCG)	S	Non muté	<u>E21Q</u> (GAG-CAG)	Non muté	Non muté
Mtb 8	S	Non muté	Non muté	WT	S	Non muté	Non muté	S	Non muté	P8A* (CCT-GCT) <u>E21Q</u> (GAG-CAG) <u>S95T</u> (AGC-ACC)	Non muté	Non muté
Mtb 9	S	Non muté	Non muté	G37V (GGA-GTA)*	S	Non muté	Non muté	S	Non muté	P8A* (CCT-GCT) <u>E21Q</u> (GAG-CAG) <u>S95T</u> (AGC-ACC)	Non muté	Non muté
Mtb 10	R	K43R (AAG-AGG)	Non muté	V139A (GTG-GCG)*	S	D328Y (GAT-TAT)	V155A (GTG-GCG)	S	Non muté	<u>E21Q</u> (GAG-CAG)	Non muté	Non muté
Mtb 11	R	K43R (AAG-AGG)	Non muté	V139A (GTG-GCG)*	S	D328Y (GAT-TAT)	V155A (GTG-GCG)	S	Non muté	<u>E21Q</u> (GAG-CAG)	Non muté	Non muté

Les mutations non décrites sont marquées d'un astérisque (*). Les Mutation E21Q et S95T dans le gène *gyrA* sont des polymorphismes naturels.

R: Résistant, S: Sensible, STR: streptomycine, EMB: éthambutol, PZA: pyrazinamide, OFL: ofloxacine

Résistance à la streptomycine

La résistance à la STR a été constatée chez 70% (n=7) des isolats MDR-TB et chez l'unique isolat résistant à l'INH. La résistance à la STR chez *Mtb* est généralement due à des mutations dans les gènes codant pour la protéine ribosomale S12 (*rpsL*) et l'ARNr 16S (*rrs*).

- Gène *rpsL*

La mutation K43R du gène *rpsL* a été retrouvée chez 40% des isolats MDR-TB et chez 50% des 8 isolats MDR-TB résistants à la streptomycine.

- Gène *rrs*

La mutation A514C a été observée chez 20% des isolats MDR-TB et chez 25% des 8 isolats MDR-TB résistants à la streptomycine.

- Gène *gidB*

La mutation V139A dans le gène *gidB* a été retrouvée chez 30% des isolats MDR-TB et chez 37,5% des 8 isolats MDR-TB résistants à la streptomycine. Cette mutation a été trouvée toujours associée à la mutation K43R du gène *rpsL*.

La mutation L16R a été retrouvée chez 20% des isolats MDR-TB et chez 25% des 8 isolats MDR-TB résistants à la streptomycine. Cette mutation coexiste avec la mutation A514C du gène *rrs*.

Une délétion d'une paire de base en position 115 et une mutation inconnue V124G ont été également identifiées chez les souches résistantes à la streptomycine. Il est à noter également que 2 nouveaux polymorphismes G37V et E92A ont été observés chez les isolats MDR-TB sensibles à la streptomycine.

Résistance à l'éthambutol

- Gène *embB*

La résistance à l'EMB est principalement associée à une mutation au codon 306 dans le gène *embB*. Dans la présente étude, 2 isolats (20%) ont présenté une mutation au niveau du codon 306 du gène *embB*, aboutissant à deux substitutions différentes M306I ou M306V. A notre surprise, 4 MDR-TB isolats sensibles à l'EMB ont présenté des mutations au niveau du gène *embB*, D328Y (n=3) et Y319S (n=1) (**Tableau 13**).

Résistance à la pyrazinamide

- Gène *pncA*

La résistance au PZA est principalement associée à des mutations du gène *pncA*. Bien que la résistance phénotypique à la PZA n'ait pas été testée dans cette étude; différentes mutations au niveau du gène *pncA* ont été observées chez 80% des isolats MDR-TB avec des fréquences différentes, V155A (37,5%, n=3), T142M (25%, n=2), P62R (12,5%, n=1), V139L (12,5%, n=1) et une insertion de 2 nucléotides (GG) (12,5%, n=1) au niveau de la position 391 (**Tableau 13**).

Résistance à l'ofloxaxine

- Gène *gyrA*

Les mutations dans la QRDR du gène *gyrA* et, moins fréquemment, dans celle du gène *gyrB* sont responsables de la résistance aux FQ (**Ginsburg *et al.*, 2003; Mayer & Takiff, 2014**).

Parmi les 10 isolats MDR-TB, 1 seul isolat (10%), Alg 3, a montré une résistance à l'OFL. Cet isolat possédait la mutation A90V dans la QRDR du gène *gyrA* (**Tableau 13**). D'autre part, des polymorphismes dans le gène *gyrA*, non associés à la résistance à l'OFL, ont été observés, *gyrA* S95T (n=7), E21Q (n=11), P8A(n=2).

Résistance à l'amikacine et à la kanamycine

- Gène *rrs*

Aucune mutation dans le gène *rrs* conférant la résistance à AMK/KAN n'a été détectée. A savoir, que le test phénotypique de la résistance à l'AMK/KAN n'a pas été réalisé dans cette étude.

3.6 Analyse génotypique de la résistance aux agents antituberculeux par séquençage de nouvelle génération basé sur des amplicons

Puisque les mutations de résistances de deux isolats MDR-TB, Alg 3 et Alg 5, n'ont pas été identifiées par la méthode de séquençage Sanger, nous avons utilisé l'approche de séquençage NGS basée sur des amplicons pour déterminer les mécanismes de multirésistances de ces 2 isolats.

Pour cela, nous avons ciblé 15 locus impliqués dans la résistance aux antituberculeux, y inclut les 10 locus ciblés précédemment par la méthode de Sanger (*rpoB*, *katG*, *inhA*, le

promoteur de l'*inhA*, *embB*, *pncA*, *rrs*, *rpsL*, *gidB* et *gyrA*) et 5 gènes additionnels *gyrB*, *ethA*, *ethR*, *tlyA* et *rplC*. L'approche NGS a confirmé la présence de toutes les mutations identifiées par séquençage Sanger et a révélé également l'absence de mutations dans les gènes *gyrB*, *ethA*, *ethR*, *tlyA* et *rplC* (**Tableau 14**).

Tableau 14. Comparaison des résultats génotypiques obtenus par le séquençage Sanger et le séquençage nouvelle génération.

Gène	Isolat <i>Mtb</i> 3			Isolat <i>Mtb</i> 5		
	Sanger	NGS	Pourcentages de mutations NGS (%)	Sanger	NGS	Pourcentages de mutations NGS (%)
<i>rpoB</i>	S531L	S531L	98,73	H526Q/Del codon 512-513-514	H526Q/Del codon 512-513-514	100/100
<i>KatG</i>	S315T	S315T	100	S315T	S315T	100
Promoteur <i>inhA</i>	C-15T	C-15T	100	C-15T	C-15T	100
<i>inhA</i>	Non muté	Non muté		Non muté	Non muté	
<i>rpsL</i>	Non muté	Non muté		Non muté	Non muté	
<i>rrs</i>	A514C	A514C	100	Non muté	Non muté	
<i>gidB</i>	L16R	L16R	100	E92A	E92A	100
<i>embB</i>	M306V	Non détectée		M306I	M306I	100
<i>pncA</i>	T142M	T142M	100	P62R	P62R	97,07
<i>gyrA</i>	E21Q/A90V/S95T	E21Q/A90V/S95T	98.46/100/100	E21Q, S95T	E21Q, S95T	100,100
<i>gyrB</i>	Non testé	Non muté		Non testé	Non muté	
<i>ethA</i>	Non testé	Non muté		Non testé	Non muté	
<i>ethR</i>	Non testé	Non muté		Non testé	Non muté	
<i>tlyA</i>	Non testé	Non muté		Non testé	Non muté	
<i>rplC</i>	Non testé	Non muté		Non testé	Non muté	

3.7 Génotypage MIRU-VNTR

L'analyse MIRU-VNTR à 24-loci des isolats des 10 MDR-TB et 1 MR-TB a séparé les isolats en quatre lignées différentes: Cameroon (n=4), Haarlem (n=4), Amérique Latine Méditerranée (LAM, n=2), and S (n=1) (**Figure 33**).

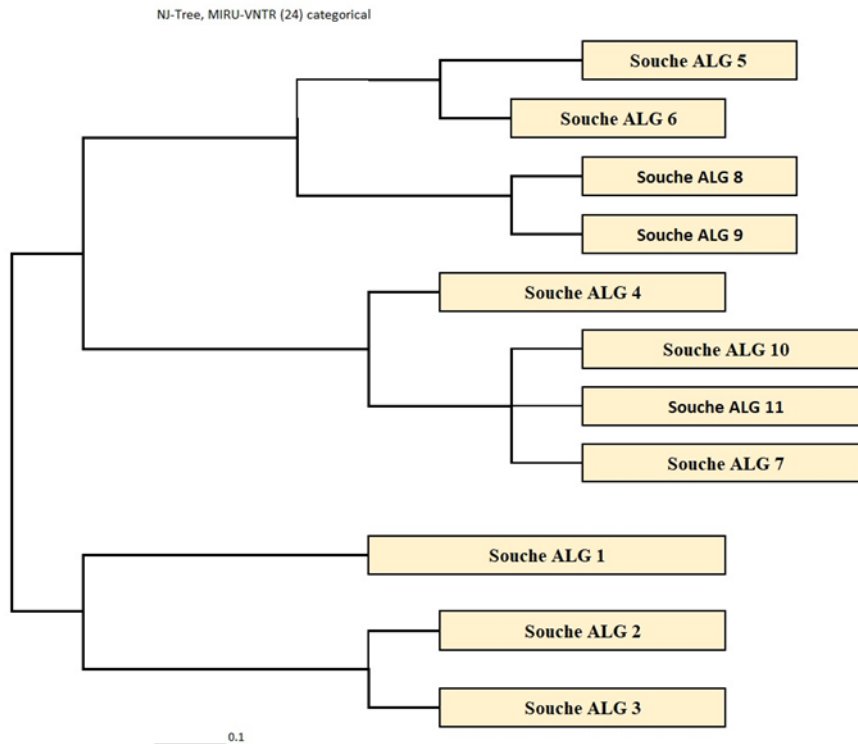


Figure 33. Dendrogramme obtenu après analyse MIRU-VNTR des 11 souches *Mtb*

La répartition géographique des lignées de *Mtb* identifiées dans cette étude par MIRU-VNTR est montrée dans la **figure 34**.

Trois des isolats de la lignée Cameroon (Alg 7, Alg 10 et Alg 11) partageaient le même code MIRU-VNTR et présentaient des profils de résistance génotypique identique, voire des mutations rares (A190S *inhA*, V139A *gidB* non décrite, D328Y *embB*, V155A *pncA*, E21Q *gyrA*).

Ceci suggère la transmission de la même souche entre ces trois patients. Cependant, comme ils ne vivaient pas dans la même zone (**Figure 34**) et n'étaient pas liés épidémiologiquement, cela peut suggérer une diffusion de ce clone dans une population plus large.

Les isolats Alg 2 et Alg 3 de la lignée LAM étaient également très similaires puisqu'ils avaient presque le même code MIRU-VNTR (seulement deux différences) et les génotypes de résistance étaient identiques pour *rpoB*, *katG*, *inhA*, *rrs*, *gid* et *pncA*.

Cependant, l'isolat Alg 3 a évolué vers une résistance aux agents antituberculeux car il hébergeait des mutations supplémentaires conférant une résistance à l'EMB (M306 V *embB*) et à l'OFL (A90V *gyrA*) et un statut de souche pré-XDR. Les quatre isolats de la lignée Haarlem (Alg 5, Alg 6, Alg 8 et Alg 9) présentaient différents codes MIRU-VNTR et différents génotypes de résistance, indiquant que ces souches n'étaient pas liées. Seul l'isolat Alg 1 était de la lignée S.

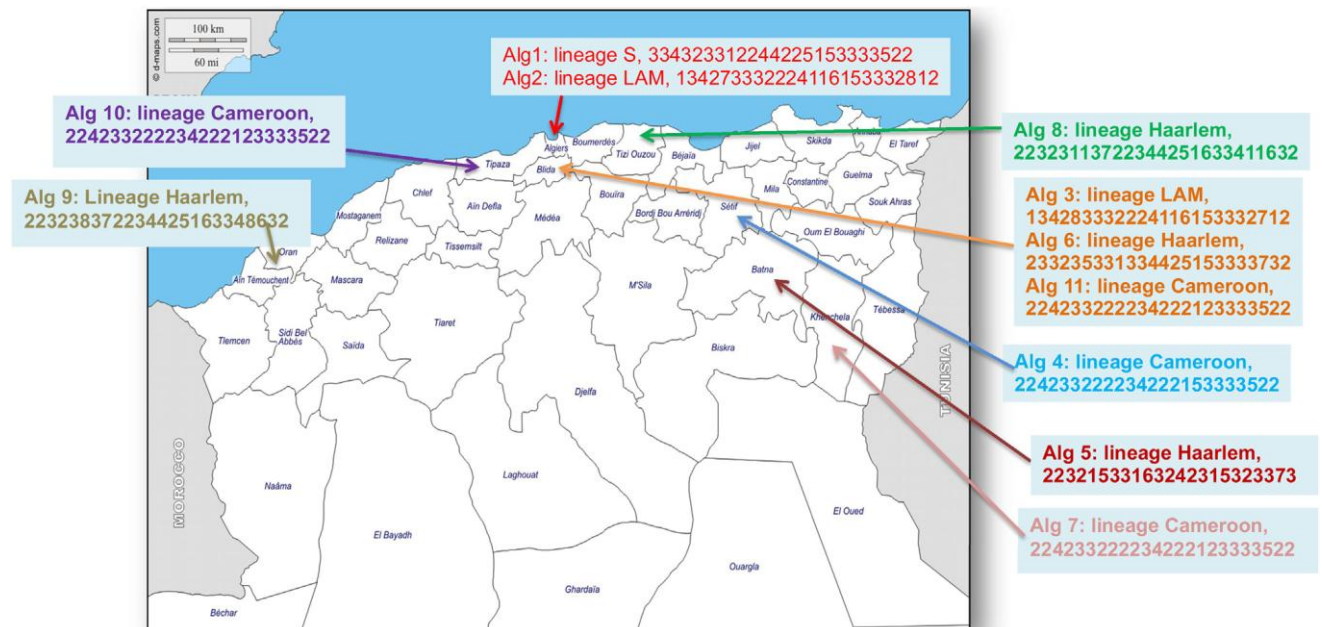


Figure 34. Répartition géographique des lignées de *Mtb* identifiées dans cette étude par MIRU-VNTR

Discussion

IV. Discussion

Dans ce travail, nous avons étudié 11 isolats de *Mtb*, isolés à partir de patients algériens présentant une tuberculose pulmonaire (TP) et extra-pulmonaire (TEP), qui ont montré des profils phénotypiques de résistances aux antibiotiques (10 MDR-TB et 1 MR-TB) par la méthode de proportion indirecte (MPI). Nous avons caractérisé les mutations associées à leur résistance aux agents antituberculeux par les tests de sondes linéaires (GenoType® MTBDRplus v2 et GenoType®MTBDRsl v2), par séquençage avec la méthode Sanger et par de séquençage de nouvelle génération (NGS), et enfin, nous avons déterminé la diversité génétique des isolats par MIRU-VNTR. Il s'agit de la première étude d'épidémiologie moléculaire sur *Mtb* réalisée en Algérie.

La RIF est l'un des agents antituberculeux les plus puissants inclus dans le schéma thérapeutique standard de première intention contre la tuberculose depuis les années 1980. Comme c'est le cas pour tous les antibiotiques, l'exposition continue à la RIF a abouti à la sélection et l'émergence de souches de *Mtb* résistantes à cet antibiotique. De plus, les isolats de *Mtb* résistant à la RIF ont plus de chance de développer une multirésistance. En 2022, l'OMS a estimé qu'environ 410 000 patients ont été atteints de *Mtb* mono-résistantes à la RIF (RR-TB) ou multirésistantes (MDR-TB) dans le monde (WHO, 2023).

En effet, la mono-résistance à la RIF est rarement observée; et pour cette raison la résistance à la RIF est largement considérée comme un marqueur fiable de la présence de multirésistance chez *Mtb* en raison de son association avec la résistance à l'INH dans plus de 90% des cas (Drobniewski & Wilson, 1998; Pablos-Méndez *et al.*, 1998; Pang *et al.*, 2013).

La majorité des mutations conférant une résistance à la RIF sont situées au niveau des codons 507 à 533 dans la région déterminante de la résistance à la rifampicine (RDRR) de 81 pb du gène *rpoB*, codant pour la sous-unité β de l'ARN polymérase. La grande majorité (90%) de ces mutations surviennent dans le codon 531, suivi par les codons 526 et 516 (Telenti *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2013; Zaw *et al.*, 2018). Les mutations dans le gène *rpoB* peuvent entraîner différents niveaux de résistance au RIF (faible, modéré ou élevé) en fonction de la position et du changement d'acide aminé (Li *et al.*, 2022)

Les mutations au niveau des codons 531 et 526 confèrent une résistance élevée à la RIF, tandis que les mutations au niveau du codon 516 entraînent généralement une résistance faible à modérée (**Li et al., 2022**).

Comme les autres études, nous avons également trouvé des mutations dans ces trois codons du gène *rpoB*, avec une prédominance de la mutation dans le codon 531, suivi des codons 526 et 516. La fréquence de la mutation S531L (70%, n=7) était comparable à celles signalées dans plusieurs pays du monde, entre 70 et 95% (**Telenti et al., 1993; Lee et al., 2005; Wang et al., 2013; Zaw et al., 2018**).

La deuxième mutation la plus fréquente, qui était au niveau du codon 526 du gène *rpoB*, a été identifiée chez 2 isolats (20%, n=2), chacun portait une substitution différente, H526D ou H526Q. Bien que la mutation *rpoB* H526D soit bien connue comme conférant un niveau élevé de résistance à la RIF, après S531L, la mutation H526Q est très rarement rencontrée (**Huang et al., 2014**). A signaler que cette mutation n'a été identifiée qu'après séquençage Sanger, car le kit GenoType MTBDR*plus* ne peut pas la détecter, du fait qu'il ne contient pas une sonde spécifique à cette mutation ; ce qui suggère que leur prévalence réelle pourrait être sous-estimée (**Huang et al., 2014**).

D'autre part, la mutation H526Q a été classée parmi les mutations de *rpoB* controversées (génotypiquement résistantes, phénotypiquement sensibles) qui pourraient être associées à une faible résistance à la RIF (**Van Deun et al., 2009 ; Ho et al., 2013; Rigouts et al., 2013; Jamieson et al., 2014; Berrada al., 2016; Lin et al., 2021**).

En outre, nous avons constaté aussi que l'isolat qui portait la mutation *rpoB* H526Q, avait en plus, une délétion de 9 pb de bases, entre les positions 1290 et 1298 (aboutissant à la délétion des codons 512, 513, 514) de la région RDRR, qui n'a jamais été décrite auparavant. Il reste à confirmer si la résistance de cet isolat à la RIF est due à la mutation H526Q seule, ou à l'association de cette mutation avec la délétion de 9 pb de bases dans la région RDRR.

Il est à noter qu'en plus des substitutions dans la RDRR qui confèrent la majorité des résistances à la RIF chez *Mtb*, des délétions au sein de cette région, ou dans d'autres positions, du gène *rpoB* ont été également signalées, bien qu'elles soient rares (**Eddabra & Neffa, 2020; CRyPTIC Consortium & Carter, 2021**).

La mutation la moins fréquente dans cette étude, D516V, a été observée dans le gène *rpoB* d'un seul isolat (10%, n=1). Cette mutation a été rapportée comme étant beaucoup plus associée à des niveaux de résistance à la RIF entre faibles et modérés (**Cambau et al., 2015**).

Dans notre étude 100% des isolats *Mtb* résistants à la RIF étaient également résistants à l'INH; et par conséquent étaient des MDR-TB, confirmant le constat que la mono-résistance à la RIF est rarement observée et que la résistance à la RIF est un important marqueur de MDR-TB (**Malenfant & Brewer, 2021**).

Les deux principaux mécanismes moléculaires conférant la résistance à l'INH chez *Mtb* sont des mutations dans le gène *inhA*, ou dans sa région promotrice, et dans le gène *katG* (**Swain et al., 2020**). Tous les isolats de *Mtb* testés dans cette étude étaient résistants à l'INH, dont la majorité (81,8%, 9/11) avaient la mutation *katG* S315T; ce qui est en cohérence avec les autres études qui ont signalé la présence de cette mutation chez 50 à 90 % des isolats cliniques de *Mtb* résistants à l'INH. Cette mutation a été également signalée comme fortement associée à une résistance élevée à l'INH (**van Soolingen et al., 2000 ; Ando et al., 2010 ; Cambau et al., 2015**).

La mutation *katG* S315T a été trouvée soit seule (33%, 3/9), ou en association avec la mutation A190S dans le gène *inhA* (33%, 3/9), ou avec la mutation C-15T dans le promoteur *inhA* (33%, 3/9). La présence de mutations combinées dans les gènes *katG* et *inhA* chez les isolats de *Mtb* résistants à l'INH a été signalée dans plusieurs études précédentes (**Torres et al., 2015**).

Des études ont montré que les isolats cliniques qui ont montré à la fois la mutation dans le promoteur *inhA* (15C-T) et la mutation *katG* ont des CMI plus élevées que les isolats qui possédaient une seule de ces deux mutations (**Ramaswamy et al., 2003**).

Un isolat (9%, 1/11) résistant à l'INH a montré la substitution *katG* S315R. Cette mutation a été également détectée dans d'autres études avec une faible fréquence (**Jin et al., 2012; Karunaratne et al., 2018**).

L'isolat résistant à l'INH restant avait une double mutation *katG* M126I et R496L. La mutation M126I seule a déjà été trouvée dans quelques études (**Mitarai et al., 2012; Islam et al., 2019**) ; tandis que la mutation R496L n'a été rapportée qu'une seule fois en Corée chez une souche clinique *Mtb* résistante à l'INH, mais elle a été trouvée en association avec la mutation *katG* S315T (**Jnawali et al., 2013**). Par contre, la double mutation *katG* M126I et R496L identifiée dans notre étude n'a jamais été décrite auparavant. A ce stade, il n'est pas clair si la mutation R496L seule est capable de conférer une résistance à l'INH, ou c'est le fait qu'elle soit retrouvée en association avec la mutation M126I.

La PZA est largement utilisée pour le traitement des cas de MDR-TB afin d'améliorer les taux de réussite et de raccourcir la durée du traitement (**Shi et al., 2011**). La résistance à la PZA est principalement associée à des mutations (substitutions, insertions ou délétions) du gène *pncA*, qui code pour une pyrazinamidase qui convertit la PZA (une prodrogue) en sa forme active, l'acide pyrazinoïque (POA) (**Shi et al., 2011 ; Miotto et al., 2014**). Contrairement aux mutations conférant la résistance aux autres agents antituberculeux, les mutations associées à la résistance au PZA ne sont pas confinées à une région spécifique au sein du gène cible, mais peuvent se produire au niveau de toutes les positions au sein du gène *pncA* ou son promoteur (**Yadon et al., 2017**).

Dans notre étude les mutations du gène *pncA* ont été retrouvées chez 80% des isolats MDR-TB. Au total, 5 différents types de mutations ont été observés ; dont le plus fréquent (37,5%, 3/8) était une substitution V155A. Cependant, cette substitution a été précédemment identifiée dans une étude en Chine à la fois chez les isolats résistants et sensibles au PZA, ce qui pourrait indiquer qu'elle n'était pas associée à une résistance au PZA (**Liu et al., 2018 ; Liu et al., 2024**).

Malheureusement, nous n'avons pas réalisé le test phénotypique de résistance au PZA pour pouvoir déterminer si la mutation V155A est associée à la résistance au PZA ou non. A signaler que le test phénotypique de résistance au PZA est connu comme très difficile à réaliser et peu fiable, en produisant souvent des résultats ambigus (**Njire et al. 2016**). C'est pour cela qu'il n'a pas été réalisé ni dans notre étude et n'est pas encore réalisable en Algérie.

La résistance à l'EMB est principalement associée à des mutations dans l'opéron *embCAB*, codant pour les enzymes impliquées dans la synthèse des composants de la paroi cellulaire mycobactérienne, avec la mutation dans le codon 306 du gène *embB* étant la plus fréquente (**Telenti et al., 1997**).

Des mutations dans *embB*, M306I ou M306V, ont été identifiées chez 20% (2/10) des MDR-TB isolats résistants à l'EMB. Bien que les mutations du codon 306 du gène *embB* soient proposés comme marqueur potentiel de la résistance à l'EMB (**Sreevatsan et al., 1997**); cependant, les avis concernant leur implication dans la résistance à l'EMB sont divergents. Certaines études ont trouvé les mutations *embB* 306 à la fois chez des isolats résistants et sensibles à l'EMB (**Bakula et al., 2013**) ; tandis que d'autres études les considéraient comme des polymorphismes assez commun, qui ne confèrent pas de résistance à l'EMB chez les souches de *Mtb*, mais les prédisposaient au développement de tout type de résistance aux antibiotiques (**Hazbón et al., 2005**).

En plus des mutations dans le codon 306, deux autres mutations dans le gène *embB*, D328Y et Y319S, ont été également observées, mais uniquement chez les isolats sensibles à l'EMB, suggérant que ces mutations ne sont pas impliquées dans la résistance à l'EMB et peuvent être des polymorphismes associés aux MDR-TB. En effet, ces deux mutations ont été trouvées dans plusieurs études précédentes, mais leur rôle dans la résistance à l'EMB n'a pas été caractérisé d'une manière non ambiguë (**Spinato et al., 2016 ; Zimenkov et al., 2016 ; Dixit et al., 2019 ; Jouet et al., 2021**).

La STR est actuellement recommandée pour une utilisation limitée comme antituberculeux de deuxième intention dans les schémas thérapeutiques personnalisés des patients atteints de MDR-TB (**Di Perri & Bonora, 2004**).

Dans cette étude, 70% des isolats MDR-TB ont présenté une résistance à la STR. Ce taux est relativement élevé, et est similaire à ceux signalés dans d'autres études, 64.90% en Chine (**Wu et al., 2019**), 65.9% en Zambie et 83.9% en Ouganda (**Lukoye et al., 2013**). Cette fréquence élevée de résistance à la STR souligne l'importance de tester la sensibilité à la STR avant son inclusion dans le schéma thérapeutique contre MDR-TB. Comme conséquence de ces taux élevés de résistance à la STR, depuis 2019, l'OMS recommandait un usage limité de la STR, au profit de nouveaux agents antituberculeux (WHO, 2019).

Les mutations associées à la résistance à la STR chez *Mtb* ont été décrites dans les gènes codant pour l'ARNr 16S (*rrs*), la protéine ribosomale S12 (*rpsL*) et la ARNr 16S méthyltransférase S-adénosylméthionine-dépendante (*gidB*). Les mutations les plus fréquentes se produisent dans les codons 43 et 88 du gène *rpsL* et au niveau de la boucle 530 et la région 912 du gène *rrs* (**Sreevatsan et al., 1996 ; Wong et al., 2011 ; Chauhan et al., 2021**).

Les mutations dans ces trois gènes sont associées à différents niveaux de résistances : élevé (*rpsL*), intermédiaire (*rrs*) et faible (*gidB*) (Meier *et al.*, 1996; Wong *et al.*, 2011; Nhu *et al.*, 2012).

Comme les autres études, nous avons également trouvé des mutations dans ces trois gènes chez les isolats de *Mtb* résistants à la STR. La mutation *rrs* A514C (au niveau de la boucle 530) a été détectée chez 25% (2/8) des isolats résistants à la STR. Par contre, la mutation *rrs* au niveau de la région 912 n'a pas été détectée dans cette étude, confirmant que les mutations dans cette région sont plutôt rares (Tudó *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2015).

D'autre part, nous avons trouvé la mutation *rpsL* K43R chez 50% (4/8) des isolats résistants à la STR. Cette mutation était la prédominante parmi les souches résistantes à la STR et était fortement associée à une résistance élevée à la STR (Jagielski *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2016; Oo *et al.*, 2018; Bwalya *et al.*, 2021).

Concernant les mutations du gène *gidB*, 6 différents polymorphismes ont été identifiés, G37V, V124G, V139A, L16R, E92A et une délétion d'un nucléotide en position 115. Les mutations *gidB* G37V, V124G et V139A ont été identifiées pour la première fois dans cette étude, et semblent être des nouvelles mutations.

Cependant, les mutations G37V, E92A ont été détectées chez 2 différents isolats *Mtb* sensibles à la STR, ce qui suggère que ces deux mutations ne sont pas associées à la résistance à la STR ; tandis que la mutation V139A coexiste avec la mutation *rpsL* K43R, et donc il n'est pas clair si elle est impliquée dans la résistance à la STR ou non. Alors que la mutation *gidB* L16R coexiste avec la mutation *rrs* A514C. La mutation *gidB* L16R a été fréquemment signalée et a été considérée comme un polymorphisme naturel non impliqué dans la résistance à la STR (Spies *et al.*, 2011; Jagielski *et al.*, 2014; Perdigão *et al.*, 2014; Smittipat *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2019; Bwalya *et al.*, 2021).

La seule mutation *gidB* qui pourrait être impliquée dans la résistance à la STR, était V124G, car elle était présente chez 1 isolat *Mtb* résistant à la STR qui n'a pas présenté de mutation dans *rpsL* ou *rrs*. A l'exception d'une étude précédente en Zambie (Bwalya *et al.*, 2021), la mutation *gidB* V124G n'a jamais été signalée.

Les FQs, notamment OFX, Mfx et Lfx, sont des antibiotiques bactéricides à large spectre, qui constituent des éléments importants dans les schémas thérapeutiques contre les MDR-TB (WHO, 2019). La résistance aux FQs est conférée par des mutations dans la RDRQ du gène *gyrA* et, dans une moindre mesure, du gène *gyrB* (Ginsburg *et al.*, 2003; Mayer & Takiff, 2014).

Dans cette étude 1 seul isolat MDR-TB (10%) a montré une résistance au FQ OFX. Ce taux était inférieur à l'estimation globale de 18% pour la résistance aux FQs parmi les MDR-TB (WHO, 2023).

Nous avons détecté quatre événements mutationnels indépendants dans le gène *gyrA*, A90V, E21Q, S95T et P8A. Cependant, la mutation *gyrA* A90V était la seule qui a été détectée chez l'isolat résistant à l'OFX ; par contre, les mutations *gyrA* E21Q, S95T et P8A ont été détectées à la fois chez l'isolat résistant à l'OFX et les autres isolats sensibles à l'OFX. Il est à signaler que la mutation *gyrA* P8A n'a jamais été décrite dans la littérature.

Dans l'ensemble, ces données confirment que *gyrA* A90V est la mutation la plus dominante dans la résistance aux FQs (Kumar *et al.*, 2021); et que les trois autres mutations (E21Q, S95T et P8A) sont probablement des polymorphismes naturels non impliqués dans la résistance aux FQs (Avalos *et al.*, 2015; Chien *et al.*, 2016; Morey-León *et al.*, 2023).

Nous n'avons pas trouvé de mutations dans le gène *gyrB* chez l'isolat résistant à l'OFX, ce qui n'est pas étonnant, puisque les mutations au niveau du gène *gyrB* sont moins fréquemment associées à la résistance aux FQ chez *Mtb* (Avalos *et al.*, 2015; Chien *et al.*, 2016; Morey-León *et al.*, 2023).

Les aminosides AMK et KAN sont des antituberculeux injectables de deuxième intention important pour le traitement de la tuberculose due au MDR-TB (Jnawali & Ryoo, 2013 ; Espinosa-Pereiro *et al.*, 2022).

La résistance à AMK et KAN et CAP est associée à des mutations dans le gène *rrs*, codant pour l'ARNr 16S, un composant de la sous-unité ribosomale 30S. Les mutations les plus fréquemment signalées comme cause de résistance comprennent les substitutions A1401G, C1402T et G1484T. La mutation au niveau de la position 1401 est la plus souvent observée en association avec une résistance élevée à l'AMK et KAN (Georghiou *et al.*, 2012; Miotto *et al.*, 2018).

Dans cette étude, aucune mutation conférant la résistance à l'AMK/KAN n'a été trouvée dans le gène *rrs*. Puisque nous n'avons pas effectué le test de résistance phénotypique à l'AMK/KAN nous ne pouvons pas confirmer si nos isolats étaient résistants ou sensibles à l'AMK/KAN.

Le typage MIRU-VNTR a classé les 11 isolats de *Mtb* en quatre lignées phylogénétiques différentes, Cameroon, Haarlem, LAM et S. Les lignées Cameroon et Haarlem étaient les plus fréquentes (36,36%, n=4 chacun), suivi de la lignée LAM (18%, n= 2) ; tandis que la lignée S était la moins répandue (9%, n= 1).

Ces résultats sont similaires à ceux d'autres études qui ont montré que les lignées Cameroon, Haarlem et LAM sont également les plus prédominantes en Afrique (**Niobe-Eyangoh et al., 2003; Sidze et al., 2013**). Cependant, des variations dans la répartition géographique et la fréquence des principales lignées entre différents pays, ou différentes régions au sein du même pays, ont été fréquemment signalées (**Chihota et al., 2018**).

Par exemple, la comparaison des lignées de *Mtb* circulantes dans les pays de l'Afrique du Nord a montré qu'au Maroc la lignée LAM, une lignée latino-américaine-méditerranéenne qui est répandue ; en Europe du Sud et en Afrique (**Mokrousov et al., 2016**), la lignée LAM est la prédominante ; suivi par Haarlem, une des lignées de *Mtb* les plus répandues à l'échelle mondiale (**Mokrousov, 2024**); puis par la lignée S, avec une faible prévalence (**Lahlou et al., 2012 ; Chaoui et al., 2014**); alors qu'en Tunisie la lignée Haarlem était la prédominante, suivi par LAM et T (**Mardassi et al., 2005; Namouchi et al., 2008**).

Il convient de mentionner que la lignée Cameroon qui dominait dans notre étude, et qui est largement répandue dans le continent Africain (**Niobe-Eyangoh et al., 2003; Sidze et al., 2013**), était absente parmi les isolats de *Mtb* analysés dans les deux études au Maroc et en Tunisie.

Par contre, la lignée Beijing, qui prédominait dans les pays d'Asie de l'Est, était présente au Maroc (**Lahlou et al., 2012 ; Chaoui et al., 2014**), mais était absente en Tunisie et dans notre étude.

La dominance de la lignée Africaine (Cameroon) et des lignées Européennes (Haarlem et LAM) en Algérie pourrait être expliqué par le fait que : (i) l'Algérie étant géographiquement située entre l'Europe et l'Afrique; (ii) l'Algérie compte une forte population d'émigrants en Europe, particulièrement en France; et (iii) l'Algérie est considérée à la fois comme un pays de transit et d'immigration pour les populations d'Afrique subsaharienne. Ainsi, le mouvement des populations entre les pays voisins de ces deux continents pourrait favoriser la circulation et le mélange des lignées de *Mtb* entre ces pays.

Nous reconnaissons que cette étude présente un certain nombre de limites. La principale limite est la petite taille de l'échantillon, l'étude a analysé uniquement 1 isolat MRR-TB et 10 isolats MDR-TB. Nous n'avons pas effectué le test phénotypique de sensibilité pour tous les antibiotiques pour pouvoir comparer les résultats phénotypiques et génotypiques.

Conclusion générale

Conclusion générale

Malgré l'existence d'une antibiothérapie et d'un vaccin efficaces, la tuberculose reste l'une des maladies transmissibles les plus mortelles au monde, coûtant la vie à environ 1,5 million de personnes par an. Par conséquent, la lutte contre l'épidémie de tuberculose figure parmi les principales priorités de l'OMS. Cependant, les efforts de lutte contre la tuberculose sont confrontés à un problème majeur, qui est l'émergence et la propagation de souches de *Mtb* résistantes aux antibiotiques.

Cette étude d'épidémiologie moléculaire avait comme objectifs : l'analyse phénotypique des résistances aux antibiotiques, la caractérisation des mécanismes génotypiques de résistances aux antibiotiques et la diversité génétique de 11 isolats cliniques de *Mtb* isolés à partir de patients atteints de tuberculose active en Algérie.

Cette étude a permis de mettre en évidence les principales mutations connues comme conférant la résistance aux antibiotiques, ainsi que des nouvelles mutations, non décrites auparavant ; indiquant que les souches de *Mtb* circulant en Algérie présentaient des caractéristiques génétiques distinctes, qui pourraient être dues à une pression de sélection inhérente au pays, qui pourrait être influencée par le niveau de consommation locale d'antibiotiques.

Il est important de signaler que même si la mise en évidence d'une mutation par un test génotypique peut prédire une résistance phénotypique à l'antibiotique, l'absence d'une mutation n'est pas un indicateur précis de susceptibilité.

D'autre part, nos résultats ont indiqué que la population de souches de *Mtb* circulant en Algérie est assez hétérogène, constituée de quatre lignées phylogénétiques distinctes, et dominée par des lignées d'origine Africaine et Européenne (Cameroon, Haarlem et LAM). De plus, nous avons également constaté des variations dans la distribution et la prévalence de ces différentes lignées phylogénétiques de *Mtb* entre les différentes régions du territoire national.

Il semble donc que la structure de la population de *Mtb* circulant en Algérie est influencée par la géographie, démographie et les migrations humaines. Il est important de souligner que cette étude était basée sur une petite taille d'échantillon qui pourrait ne pas être vraiment représentatif de la situation réelle qui prévaut en Algérie.

Néanmoins, le présent travail comble quelques lacunes dans l'épidémiologie de la tuberculose en Algérie, en fournissant un aperçu préliminaire sur les clones de *Mtb* circulants dans le pays ainsi que leurs profils phénotypiques et génotypiques de résistance aux antibiotiques.

Des études épidémiologiques plus larges, incluant un nombre d'isolats de *Mtb* plus représentatif, sont nécessaires pour mieux comprendre les facteurs de risque associés à la tuberculose, les mécanismes de résistances aux antibiotiques, l'émergence et les modes de transmission de lignées dominantes. Ces études supplémentaires pourraient contribuer à la mise en œuvre de mesures de contrôle plus efficaces par les autorités de santé publique algériennes, ce qui pourrait contribuer à prévenir la propagation de la tuberculose.

Dans l'ensemble, les résultats de ce travail soulignent l'importance de renforcer le dispositif de lutte contre la tuberculose par le diagnostic et le traitement précoce des cas de tuberculose. Les efforts de gestion de la tuberculose devraient être également consacrés à la surveillance des clones de *Mtb* en circulation, particulièrement les MDR-TB et XDR-TB, le traçage et à l'interruption de leurs voies de transmission.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abdelaziz, M. M., Bakr, W. M., Hussien, S. M., & Amine, A. E. (2016). Diagnosis of pulmonary tuberculosis using Ziehl–Neelsen stain or cold staining techniques?. *Journal of the Egyptian Public Health Association*, 91(1), 39-43.
- Acharya, B., Acharya, A., Gautam, S., Ghimire, S. P., Mishra, G., Parajuli, N., & Sapkota, B. (2020). Advances in diagnosis of Tuberculosis: an update into molecular diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular biology reports*, 47, 4065-4075.
- Ai, J. W., Ruan, Q. L., Liu, Q. H., & Zhang, W. H. (2016). Updates on the risk factors for latent tuberculosis reactivation and their managements. *Emerging microbes & infections*, 5(1), 1-8.
- Ai, J. W., Zhou, X., Xu, T., Yang, M., Chen, Y., He, G. Q., ... & Zhang, W. H. (2019). CRISPR-based rapid and ultra-sensitive diagnostic test for *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerging microbes & infections*, 8(1), 1361-1369.
- Aínsa, J. A., Pérez, E., Pelicic, V., Berthet, F. X., Gicquel, B., & Martín, C. (1997). Aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase genes are universally present in mycobacteria: characterization of the aac (2')-Ic gene from *Mycobacterium tuberculosis* and the aac (2')-Id gene from *Mycobacterium smegmatis*. *Molecular microbiology*, 24(2), 431-441.
- Ajbani, K., Shetty, A., Mehta, A., & Rodrigues, C. (2011). Rapid diagnosis of extensively drug-resistant tuberculosis by use of a reverse line blot hybridization assay. *Journal of clinical microbiology*, 49(7), 2546-2551.
- Alangaden, G. J., & Bone, S. A. (1997). The clinical use of fluoroquinolones for the treatment of mycobacterial diseases. *Clinical infectious diseases*, 25(5), 1213-1221.
- Alcaide, F., Pfyffer, G. E., & Teleni, A. (1997). Role of embB in natural and acquired resistance to ethambutol in mycobacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 41(10), 2270-2273.
- Alderwick, L. J., Harrison, J., Lloyd, G. S., & Birch, H. L. (2015). The mycobacterial cell wall—peptidoglycan and arabinogalactan. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 5(8), a021113.
- Al-Humadi, H. W., Al-Saigh, R. J., & Al-Humadi, A. W. (2017). Addressing the challenges of tuberculosis: a brief historical account. *Frontiers in pharmacology*, 8, 264120.
- Al-Zamel, F. A. (2009). Detection and diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis*. *Expert review of anti-infective therapy*, 7(9), 1099-1108.
- Andersen, P., & Doherty, T. M. (2005). The success and failure of BCG—implications for a novel tuberculosis vaccine. *Nature Reviews Microbiology*, 3(8), 656-662.

- Andini, N., & Nash, K. A. (2006). Intrinsic macrolide resistance of the *Mycobacterium tuberculosis* complex is inducible. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(7), 2560-2562.
- Ando, H., Kondo, Y., Suetake, T., Toyota, E., Kato, S., Mori, T., & Kirikae, T. (2010). Identification of katG mutations associated with high-level isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(5), 1793-1799.
- Andries, K., Villellas, C., Coeck, N., Thys, K., Gevers, T., Vranckx, L., ... & Koul, A. (2014). Acquired resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to bedaquiline. *PLOS one*, 9(7), e102135.
- Aubry, A., Pan, X. S., Fisher, L. M., Jarlier, V., & Cambau, E. (2004). *Mycobacterium tuberculosis* DNA gyrase: interaction with quinolones and correlation with antimycobacterial drug activity. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48(4), 1281-1288.
- Avalos, E., Catanzaro, D., Catanzaro, A., Ganiats, T., Brodine, S., Alcaraz, J., & Rodwell, T. (2015). Frequency and geographic distribution of gyrA and gyrB mutations associated with fluoroquinolone resistance in clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates: a systematic review. *PloS one*, 10(3), e0120470.
- Bakuła, Z., Napiórkowska, A., Bielecki, J., Augustynowicz-Kopeć, E., Zwolska, Z., & Jagielski, T. (2013). Mutations in the embB gene and their association with ethambutol resistance in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Poland. *BioMed research international*, 2013.
- Banerjee, A., Dubnau, E., Quemard, A., Balasubramanian, V., Um, K. S., Wilson, T., ... & Jacobs Jr, W. R. (1994). inhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, 263(5144), 227-230.
- Barberis, I., Bragazzi, N. L., Galluzzo, L., & Martini, M. (2017). The history of tuberculosis: from the first historical records to the isolation of Koch's bacillus. *Journal of preventive medicine and hygiene*, 58(1), E9.
- Barnard, M.; Parsons, L.; Miotto, P.; Cirillo, D.; Feldmann, K.; Gutierrez, C.; Somoskovi, A. (2012). Molecular Detection of Drug-Resistant Tuberculosis by Line Probe Assay. Laboratory Manual for Resource-Limited Settings. FIND, Geneva, Switzerland (2012) 274 pp.
- Baulard, A. R., Betts, J. C., Engohang-Ndong, J., Quan, S., McAdam, R. A., Brennan, P. J., ... & Besra, G. S. (2000). Activation of the pro-drug ethionamide is regulated in mycobacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 275(36), 28326-28331.
- Beckert, P., Hillemann, D., Kohl, T. A., Kalinowski, J., Richter, E., Niemann, S., & Feuerriegel, S. (2012). rplC T460C identified as a dominant mutation in linezolid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(5), 2743-2745.
- Bekmurzayeva, A., Sypabekova, M., & Kanayeva, D. (2013). Tuberculosis diagnosis using immunodominant, secreted antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, 93(4), 381-388.
- Berrada, Z. L., Lin, S. Y. G., Rodwell, T. C., Nguyen, D., Schechter, G. F., Pham, L., ... & Desmond, E. (2016). Rifabutin and rifampin resistance levels and associated rpoB mutations in

clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 85(2), 177-181.

Bespiatykh, D., Bespyatykh, J., Mokrousov, I., & Shitikov, E. (2021). A comprehensive map of *Mycobacterium tuberculosis* complex regions of difference. *Msphere*, 6(4), e00535-21.

Blair, J. M., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature reviews microbiology*, 13(1), 42-51.

Brennan, P. J., & Nikaido, H. (1995). The envelope of mycobacteria. *Annual review of biochemistry*, 64(1), 29-63.

Brett, K., Dulong, C., & Severn, M. (2020). Treatment of tuberculosis: a review of guidelines.

Brodie, D., & Schluger, N. W. (2005). The diagnosis of tuberculosis. *Clinics in chest medicine*, 26(2), 247-271.

Brosch, R., Gordon, S. V., Marmiesse, M., Brodin, P., Buchrieser, C., Eiglmeier, K., ... & Cole, S. T. (2002). A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proceedings of the national academy of Sciences*, 99(6), 3684-3689.

Brossier, F., Pham, A., Bernard, C., Aubry, A., Jarlier, V., Veziris, N., ... & CNR-MyRMA. (2017). Molecular Investigation of Resistance to Second-Line Injectable Drugs in Multidrug-Resistant Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(2), 10-1128.

Brossier, F., Sougakoff, W., Aubry, A., Bernard, C., Cambau, E., Jarlier, V., ... & Veziris, N. (2017). Molecular detection methods of resistance to antituberculosis drugs in *Mycobacterium tuberculosis*. *Medecine et maladies infectieuses*, 47(5), 340-348.

Brossier, F., Sougakoff, W., Bernard, C., Petrou, M., Adeyema, K., Pham, A., ... & Veziris, N. (2015). Molecular analysis of the embCAB locus and embR gene involved in ethambutol resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(8), 4800-4808.

Bull, T. J., Sidi-Boumedine, K., McMinn, E. J., Stevenson, K., Pickup, R., & Hermon-Taylor, J. (2003). Mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU) differentiate *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis from other species of the *Mycobacterium avium* complex. *Molecular and cellular probes*, 17(4), 157-164.

Bunsow, E., Ruiz-Serrano, M. J., Roa, P. L., Kestler, M., Viedma, D. G., & Bouza, E. (2014). Evaluation of GeneXpert MTB/RIF for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* and resistance to rifampin in clinical specimens. *Journal of Infection*, 68(4), 338-343.

Burdz, T. V., Wolfe, J., & Kabani, A. (2003). Evaluation of sputum decontamination methods for *Mycobacterium tuberculosis* using viable colony counts and flow cytometry. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 47(3), 503-509

Burrill, J., Williams, C. J., Bain, G., Conder, G., Hine, A. L., & Misra, R. R. (2007). Tuberculosis: a radiologic review. *Radiographics*, 27(5), 1255-1273.

- Bwalya, P., Yamaguchi, T., Solo, E. S., Chizimu, J. Y., Mbulo, G., Nakajima, C., & Suzuki, Y. (2021). Characterization of mutations associated with streptomycin resistance in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Zambia. *Antibiotics*, *10*(10), 1169.
- Cabibbe, A. M., Walker, T. M., Niemann, S., & Cirillo, D. M. (2018). Whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis*. *European Respiratory Journal*, *52*(5).
- Cambau, E., Viveiros, M., Machado, D., Raskine, L., Ritter, C., Tortoli, E., ... & Böttger, E. C. (2015). Revisiting susceptibility testing in MDR-TB by a standardized quantitative phenotypic assessment in a European multicentre study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *70*(3), 686-696.
- Canetti, G., Froman, S., Grosset, J. A., Hauduroy, P., Langerova, M., Mahler, H. T., ... & Šula, L. (1963). Mycobacteria: laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance. *Bulletin of the World Health Organization*, *29*(5), 565.
- Cantres-Fonseca, O. J., Rodriguez-Cintrón, W., Del Olmo-Arroyo, F., & Baez-Corujo, S. (2018). Extra pulmonary tuberculosis: an overview. *Role of microbes in human health and diseases*, 5560.
- Caulfield, A. J., & Wengenack, N. L. (2016). Diagnosis of active tuberculosis disease: From microscopy to molecular techniques. *Journal of Clinical Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases*, *4*, 33-43.
- Ceyssens, P. J., Soetaert, K., Timke, M., Van den Bossche, A., Sparbier, K., De Cremer, K., ... & Mathys, V. (2017). Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for combined species identification and drug sensitivity testing in mycobacteria. *Journal of clinical microbiology*, *55*(2), 624-634.
- Chaisson, R. E. (2003). Treatment of chronic infections with rifamycins: is resistance likely to follow?. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *47*(10), 3037-3039.
- Chan, E. D., Heifets, L., & Iseman, M. D. (2000). Immunologic diagnosis of tuberculosis: a review. *Tubercle and Lung Disease*, *80*(3), 131-140.
- Chaoui, I., Zozio, T., Lahlou, O., Sabouni, R., Abid, M., El Aouad, R., ... & El Mzibri, M. (2014). Contribution of spoligotyping and MIRU-VNTRs to characterize prevalent *Mycobacterium tuberculosis* genotypes infecting tuberculosis patients in Morocco. *Infection, Genetics and Evolution*, *21*, 463-471.
- Chattu, V. K., & Soosanna, K. (2016). The growing epidemic of MDR-TB and concerns for global health security. *Int J Contemp Med Res*, *3*, 329-31.
- Chauhan, A., Kumar, M., Kumar, A., & Kanchan, K. (2021). Comprehensive review on mechanism of action, resistance and evolution of antimycobacterial drugs. *Life sciences*, *274*, 119301.
- Chegou, N. N., Hoek, K. G., Kriel, M., Warren, R. M., Victor, T. C., & Walzl, G. (2011). Tuberculosis assays: past, present and future. *Expert review of anti-infective therapy*, *9*(4), 457-469.

- Chen, J., Chen, Z., Li, Y., Xia, W., Chen, X., Chen, T., ... & Xu, S. (2012). Characterization of gyrA and gyrB mutations and fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Hubei Province, China. *The Brazilian Journal of infectious diseases*, 16(2), 136-141.
- Chien, J. Y., Chiu, W. Y., Chien, S. T., Chiang, C. J., Yu, C. J., & Hsueh, P. R. (2016). Mutations in gyrA and gyrB among fluoroquinolone-and multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 60(4), 2090-2096.
- Chihota, V. N., Niehaus, A., Streicher, E. M., Wang, X., Sampson, S. L., Mason, P., ... & Warren, R. M. (2018). Geospatial distribution of *Mycobacterium tuberculosis* genotypes in Africa. *PLoS One*, 13(8), e0200632.
- Chisompola, N. K., Streicher, E. M., Muchemwa, C. M. K., Warren, R. M., & Sampson, S. L. (2020). Molecular epidemiology of drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Africa: a systematic review. *BMC Infectious Diseases*, 20, 1-16
- Churchyard, G., Kim, P., Shah, N. S., Rustomjee, R., Gandhi, N., Mathema, B., ... & Cardenas, V. (2017). What we know about tuberculosis transmission: an overview. *The Journal of infectious diseases*, 216(suppl_6), S629-S635.
- Cirillo, D. M., Cabibbe, A. M., De Filippo, M. R., Trovato, A., Simonetti, T., Rossolini, G. M., & Tortoli, E. (2016). Use of WGS in *Mycobacterium tuberculosis* routine diagnosis. *International journal of mycobacteriology*, 5, S252-S253.
- Cirillo, D. M., Piana, F., Frisicale, L., Quaranta, M., Riccabone, A., Penati, V., ... & Marchiaro, G. (2004). Direct rapid diagnosis of rifampicin-resistant M. tuberculosis infection in clinical samples by line probe assay (INNO LiPA Rif-TB). *The New Microbiologica*, 27(3), 221-227.
- Cohen, K. A., Manson, A. L., Desjardins, C. A., Abeel, T., & Earl, A. M. (2019). Deciphering drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* using whole-genome sequencing: progress, promise, and challenges. *Genome medicine*, 11, 1-18.
- Cole, S., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., ... & Barrell, B. G. (1998). Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, 396(6707), 190-190.
- Comas, I. (2017). Genomic epidemiology of tuberculosis. *Strain Variation in the Mycobacterium tuberculosis Complex: Its Role in Biology, Epidemiology and Control*, 79-93.
- Coscolla, M., & Gagneux, S. (2014). Consequences of genomic diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. In *Seminars in immunology* (Vol. 26, No. 6, pp. 431-444). Academic Press.
- CRyPTIC Consortium, & Carter, J. J. (2021). Quantitative measurement of antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis* reveals genetic determinants of resistance and susceptibility in a target gene approach. *bioRxiv*, 2021-09.
- Daniel, T. M., Bates, J. H., & Downes, K. A. (1994). History of tuberculosis. *Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control*, 13-24.
- Davies, P. D. O. (2005). Risk factors for tuberculosis. *Monaldi archives for chest disease*, 63(1).

- De Araujo, L., Cabibbe, A. M., Mhuulu, L., Ruswa, N., Dreyer, V., Utpatel, C., ... & Niemann, S. (2023). Implementation of targeted next-generation sequencing for the diagnosis of drug-resistant tuberculosis in low-resource settings: a programmatic model, challenges, and initial outcomes. *Frontiers in Public Health*, *11*, 1204064.
- Delogu, G., Sali, M., & Fadda, G. (2013). The biology of mycobacterium tuberculosis infection. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*, *5*(1).
- Dheda, K., Gumbo, T., Maartens, G., Dooley, K. E., McNerney, R., Murray, M., ... & Warren, R. M. (2017). The epidemiology, pathogenesis, transmission, diagnosis, and management of multidrug-resistant, extensively drug-resistant, and incurable tuberculosis. *The lancet Respiratory medicine*, *5*(4), 291-360.
- Di Perri, G., & Bonora, S. (2004). Which agents should we use for the treatment of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*?. *Journal of Antimicrobial chemotherapy*, *54*(3), 593-602.
- Dicks, K. V., & Stout, J. E. (2019). Molecular diagnostics for *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Annual review of medicine*, *70*, 77-90.
- Dixit, A., Freschi, L., Vargas, R., Calderon, R., Sacchetti, J., Drobniowski, F., ... & Farhat, M. R. (2019). Whole genome sequencing identifies bacterial factors affecting transmission of multidrug-resistant tuberculosis in a high-prevalence setting. *Scientific Reports*, *9*(1), 5602.
- Dong, B., He, Z., Li, Y., Xu, X., Wang, C., & Zeng, J. (2022). Improved conventional and new approaches in the diagnosis of tuberculosis. *Frontiers in Microbiology*, *13*, 924410.
- Dookie, N., Rambaran, S., Padayatchi, N., Mahomed, S., & Naidoo, K. (2018). Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a review on the molecular determinants of resistance and implications for personalized care. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *73*(5), 1138-1151.
- Dorman, S. E., Schumacher, S. G., Alland, D., Nabeta, P., Armstrong, D. T., King, B., ... & Xie, Y. (2018). Xpert MTB/RIF Ultra for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampicin resistance: a prospective multicentre diagnostic accuracy study. *The Lancet infectious diseases*, *18*(1), 76-84.
- Drobniowski, F. A., & Wilson, S. M. (1998). The rapid diagnosis of isoniazid and rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* a molecular story. *Journal of medical microbiology*, *47*(3), 189-196.
- E Barry, C. (2011). Lessons from seven decades of antituberculosis drug discovery. *Current topics in medicinal chemistry*, *11*(10), 1216-1225.
- Eddabra, R., & Ait Benhassou, H. (2018). Rapid molecular assays for detection of tuberculosis. *Pneumonia*, *10*(1), 1-12.
- Eddabra, R., & Neffa, M. (2020). Mutations associated with rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Moroccan patients: Systematic review. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*, 2020.

- Ei, P. W., Aung, W. W., Lee, J. S., Choi, G. E., & Chang, C. L. (2016). Molecular strain typing of *Mycobacterium tuberculosis*: a review of frequently used methods. *Journal of Korean medical science*, 31(11), 1673-1683.
- Escribano, I., Rodriguez, J. C., Llorca, B., Garcia-Pachon, E., Ruiz, M., & Royo, G. (2007). Importance of the efflux pump systems in the resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to fluoroquinolones and linezolid. *Chemotherapy*, 53(6), 397-401.
- Espinosa-Pereiro, J., Sánchez-Montalvá, A., Aznar, M. L., & Espiau, M. (2022). MDR tuberculosis treatment. *Medicina*, 58(2), 188.
- Falzon, D., Jaramillo, E., Schünemann, H. J., Arentz, M., Bauer, M., Bayona, J., ... & Zignol, M. (2011). WHO guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis: 2011 update.
- Fatima, S., Kumari, A., Das, G., & Dwivedi, V. P. (2020). Tuberculosis vaccine: A journey from BCG to present. *Life sciences*, 252, 117594.
- Feiler, C., Fisher, A. C., Boock, J. T., Marrichi, M. J., Wright, L., Schmidpeter, P. A., ... & DeLisa, M. P. (2013). Directed evolution of *Mycobacterium tuberculosis* β -lactamase reveals gatekeeper residue that regulates antibiotic resistance and catalytic efficiency. *PLoS One*, 8(9), e73123.
- Forrellad, M. A., Klepp, L. I., Gioffré, A., Sabio y Garcia, J., Morbidoni, H. R., Santangelo, M. D. L. P., ... & Bigi, F. (2013). Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence*, 4(1), 3-66.
- Fox, G. J., Dobler, C. C., Marais, B. J., & Denholm, J. T. (2017). Preventive therapy for latent tuberculosis infection the promise and the challenges. *International Journal of Infectious Diseases*, 56, 68-76.
- Franco-Paredes, C., Roupael, N., del Rio, C., & Santos-Preciado, J. I. (2006). Vaccination strategies to prevent tuberculosis in the new millennium: from BCG to new vaccine candidates. *International journal of infectious diseases*, 10(2), 93-102.
- Garg, N., Ahmad, F. J., & Kar, S. (2022). Recent advances in loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid and efficient detection of pathogens. *Current Research in Microbial Sciences*, 3, 100120.
- Georghiou, S. B., Magana, M., Garfein, R. S., Catanzaro, D. G., Catanzaro, A., & Rodwell, T. C. (2012). Evaluation of genetic mutations associated with *Mycobacterium tuberculosis* resistance to amikacin, kanamycin and capreomycin: a systematic review. *PloS one*, 7(3), e33275.
- Giampaglia C, Martins M, Inumaru V, Butuem I, Telles M (2005). Evaluation of a rapid differentiation test for the *Mycobacterium tuberculosis* complex by selective inhibition with rho-nitrobenzoic acid and thiophene-2-carboxylic acid hydrazide. *Int J Tuberc Lung Dis* 9(2):206–209

Ginsburg, A. S., Grosset, J. H., & Bishai, W. R. (2003). Fluoroquinolones, tuberculosis, and resistance. *The Lancet infectious diseases*, 3(7), 432-442.

Global tuberculosis report 2023. Geneva: World Health Organization; 2023

Gokulan, K., Khare, S., Cerniglia, C. E., Foley, S. L., & Varughese, K. I. (2018). Structure and inhibitor specificity of L, D-transpeptidase (LdtMt2) from *Mycobacterium tuberculosis* and antibiotic resistance: calcium binding promotes dimer formation. *The AAPS journal*, 20, 1-14.

Gong, Y., Wang, J., Li, F., & Zhu, B. (2023). Polysaccharides and glycolipids of *Mycobacterium tuberculosis* and their induced immune responses. *Scandinavian Journal of Immunology*, 97(5), e13261.

Gori, A., Bandera, A., Marchetti, G., Degli Esposti, A., Catozzi, L., Nardi, G. P., ... & Franzetti, F. (2005). Spoligotyping and *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerging infectious diseases*, 11(8), 1242.

Gradmann, C. (2001). Robert Koch and the pressures of scientific research: tuberculosis and tuberculin. *Medical history*, 45(1), 1-32.

Grange, J. M. (1982). Koch's tubercle bacillus a centenary reappraisal. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. I. Abt. Originale. A, Medizinische Mikrobiologie, Infektionskrankheiten und Parasitologie*, 251(3), 297-307.

Grosset, J. H., & Singer, T. (2013). Streptomycin. In *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition* (pp. 568-569). Elsevier Inc..

Guillet-Caruba, C., Martinez, V., & Doucet-Populaire, F. (2014). The new tools of microbiological diagnosis of tuberculosis. *La Revue de Medecine Interne*, 35(12), 794-800.

Gutierrez, M. C., Brisse, S., Brosch, R., Fabre, M., Omaïs, B., Marmiesse, M., ... & Vincent, V. (2005). Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS pathogens*, 1(1), e5.

Gygli, S. M., Borrell, S., Trauner, A., & Gagneux, S. (2017). Antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: mechanistic and evolutionary perspectives. *FEMS microbiology reviews*, 41(3), 354-373.

Hain-Lifesciences. GenoType MTBDRplus VER 2.0 (2012). Molecular Genetic Assay for Identification of the *M tuberculosis* Complex and its Resistance to Rifampicin and Isoniazid from Clinical Specimens and Cultivated Samples. Germany: Hain Lifescience GmbH. (<https://www.hainlifescience.de/en/products/microbiology/mycobacteria/tuberculosis/genotyp-e-mtbdplus.html>).

Hall, R. G., Leff, R. D., & Gumbo, T. (2009). Treatment of active pulmonary tuberculosis in adults: current standards and recent advances: insights from the Society of Infectious Diseases Pharmacists. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 29(12), 1468-1481.

Hall, T., Biosciences, I., & Carlsbad, C. J. G. B. B. (2011). BioEdit: an important software for molecular biology. *GERF Bull Biosci*, 2(1), 60-61.

- Halliday, A., Masonou, T., Tolosa-Wright, M., Mandagere, V., & Lalvani, A. (2019). Immunodiagnosis of active tuberculosis. *Expert Review of Respiratory Medicine*, 13(6), 521-532.
- Hasan, T., Au, E., Chen, S., Tong, A., & Wong, G. (2018). Screening and prevention for latent tuberculosis in immunosuppressed patients at risk for tuberculosis: a systematic review of clinical practice guidelines. *BMJ open*, 8(9), e022445.
- Hazbón, M. H., Bobadilla del Valle, M., Guerrero, M. I., Varma-Basil, M., Filliol, I., Cavatore, M., ... & Alland, D. (2005). Role of embB codon 306 mutations in *Mycobacterium tuberculosis* revisited: a novel association with broad drug resistance and IS 6110 clustering rather than ethambutol resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(9), 3794-3802.
- Hegde, S. S., Vetting, M. W., Roderick, S. L., Mitchenall, L. A., Maxwell, A., Takiff, H. E., & Blanchard, J. S. (2005). A fluoroquinolone resistance protein from *Mycobacterium tuberculosis* that mimics DNA. *Science*, 308(5727), 1480-1483.
- Hirani, N., Joshi, A., Anand, S., Chowdhary, A., Ganesan, K., Agarwal, M., & Phadke, N. (2020). Detection of a novel mutation in the rpoB gene in a multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolate using whole genome next generation sequencing. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 22, 270-274.
- Ho, J., Jelfs, P., & Sintchenko, V. (2013). Phenotypically occult multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: dilemmas in diagnosis and treatment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(12), 2915-2920.
- Huang, W. L., Hsu, Z. J., Chang, T. C., & Jou, R. (2014). Rapid and accurate detection of rifampin and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* using an oligonucleotide array. *Clinical microbiology and infection*, 20(9), O542-O549.
- Huang, Y., Ai, L., Wang, X., Sun, Z., & Wang, F. (2022). Review and Updates on the Diagnosis of Tuberculosis. *Journal of Clinical Medicine*, 11(19), 5826.
- Hugonnet, J. E., & Blanchard, J. S. (2007). Irreversible inhibition of the *Mycobacterium tuberculosis* β -lactamase by clavulanate. *Biochemistry*, 46(43), 11998-12004.
- Hugonnet, J. E., Tremblay, L. W., Boshoff, H. I., Barry 3rd, C. E., & Blanchard, J. S. (2009). Meropenem-clavulanate is effective against extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, 323(5918), 1215-1218.
- Huitric, E., Verhasselt, P., Koul, A., Andries, K., Hoffner, S., & Andersson, D. I. (2010). Rates and mechanisms of resistance development in *Mycobacterium tuberculosis* to a novel diarylquinoline ATP synthase inhibitor. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(3), 1022-1028.
- Ioannidis, P., Papaventsis, D., Karabela, S., Nikolaou, S., Panagi, M., Raftopoulou, E., ... & Kanavaki, S. (2011). Cepheid GeneXpert MTB/RIF assay for *Mycobacterium tuberculosis* detection and rifampin resistance identification in patients with substantial clinical indications

of tuberculosis and smear-negative microscopy results. *Journal of clinical microbiology*, 49(8), 3068-3070.

Irfan, M., & Bisht, D. (2022). Innovations in Molecular Identification of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Pure & Applied Microbiology*, 16(1).

Islam, M. M., Tan, Y., Hameed, H. M. A., Liu, Z., Chhotaray, C., Liu, Y., ... & Zhang, T. (2019). Detection of novel mutations associated with independent resistance and cross-resistance to isoniazid and prothionamide in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Clinical Microbiology and Infection*, 25(8), 1041-e1.

Jagielski, T., Grzeszczuk, M., Kamiński, M., Roeske, K., Napiórkowska, A., Stachowiak, R., ... & Bielecki, J. (2013). Identification and analysis of mutations in the katG gene in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Advances in Respiratory Medicine*, 81(4), 298-307.

Jagielski, T., Ignatowska, H., Bakula, Z., Dziewit, Ł., Napiórkowska, A., Augustynowicz-Kopeć, E., ... & Bielecki, J. (2014). Screening for streptomycin resistance-conferring mutations in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Poland. *PLoS One*, 9(6), e100078.

Jagielski, T., Van Ingen, J., Rastogi, N., Dziadek, J., Mazur, P. K., & Bielecki, J. (2014). Current methods in the molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacteria. *BioMed research international*, 2014.

Jamieson, F. B., Guthrie, J. L., Neemuchwala, A., Lastovetska, O., Melano, R. G., & Mehaffy, C. (2014). Profiling of rpoB mutations and MICs for rifampin and rifabutin in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of clinical microbiology*, 52(6), 2157-2162.

Jang, J. G., & Chung, J. H. (2020). Diagnosis and treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *Yeungnam University Journal of Medicine*, 37(4), 277-285.

Jia, H., Xu, Y., & Sun, Z. (2021). Analysis on Drug-Resistance-Associated Mutations among Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in China. *Antibiotics*, 10(11), 1367.

Jin, J., Zhang, Y., Fan, X., Diao, N., Shao, L., Wang, F., ... & Zhang, W. (2012). Evaluation of the GenoType® MTBDRplus assay and identification of a rare mutation for improving MDR-TB detection. *The International journal of tuberculosis and lung disease*, 16(4), 521-526.

Jnawali, H. N., & Ryoo, S. (2013). First-and second-line drugs and drug resistance. *Tuberculosis-current issues in diagnosis and management*, 20, 163-80.

Jnawali, H. N., Hwang, S. C., Park, Y. K., Kim, H., Lee, Y. S., Chung, G. T., ... & Ryoo, S. (2013). Characterization of mutations in multi-and extensive drug resistance among strains of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in Republic of Korea. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 76(2), 187-196.

Joloba, M. L., Johnson, J. L., Feng, P. J. I., Bozeman, L., Goldberg, S. V., Morgan, K., ... & Eisenach, K. D. (2014). What is the most reliable solid culture medium for tuberculosis treatment trials?. *Tuberculosis*, 94(3), 311-316.

- Jouet, A., Gaudin, C., Badalato, N., Allix-Béguet, C., Duthoy, S., Ferré, A., ... & Supply, P. (2021). Deep amplicon sequencing for culture-free prediction of susceptibility or resistance to 13 anti-tuberculous drugs. *European Respiratory Journal*, 57(3).
- Juréen, P., Werngren, J., Toro, J. C., & Hoffner, S. (2008). Pyrazinamide resistance and *pncA* gene mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(5), 1852-1854.
- Kandola, P., & Meena, L. S. (2014). Extra pulmonary tuberculosis: Overview, manifestations, diagnostic and treatment techniques. *Adv Mater Rev*, 1(1), 13-19.
- Kapur, V., Whittam, T. S., & Musser, J. M. (1994). Is *Mycobacterium tuberculosis* 15,000 years old?. *Journal of Infectious Diseases*, 170(5), 1348-1349.
- Karunaratne, G. H. R. E., Wijesundera, S. S., Vidanagama, D., Adikaram, C. P., & Perera, J. (2018). Significance of coexisting mutations on determination of the degree of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Microbial Drug Resistance*, 24(6), 844-851.
- Kassaza, K., Orikiriza, P., Llosa, A., Bazira, J., Nyehangane, D., Page, A. L., & Boum, Y. (2014). Lowenstein-Jensen selective medium for reducing contamination in *Mycobacterium tuberculosis* culture. *Journal of clinical microbiology*, 52(7), 2671-2673.
- Khan, M. T., Malik, S. I., Ali, S., Masood, N., Nadeem, T., Khan, A. S., & Afzal, M. T. (2019). Pyrazinamide resistance and mutations in *pncA* among isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. *BMC infectious diseases*, 19, 1-7.
- Khoshnood, S., Taki, E., Sadeghifard, N., Kaviar, V. H., Haddadi, M. H., Farshadzadeh, Z., ... & Heidary, M. (2021). Mechanism of action, resistance, synergism, and clinical implications of delamanid against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Frontiers in microbiology*, 12, 717045.
- Kiazyk, S., & Ball, T. B. (2017). Tuberculosis (TB): Latent tuberculosis infection: An overview. *Canada Communicable Disease Report*, 43(3-4), 62.
- Kim, C. H., Hyun, I. G., Hwang, Y. I., Kim, D. G., Lee, C. Y., Lee, M. G., ... & Park, M. J. (2015). Identification of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampin resistance in clinical specimens using the Xpert MTB/RIF assay. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 45(1), 32-38.
- Kim, H. W., & Kim, J. S. (2018). Treatment of latent tuberculosis infection and its clinical efficacy. *Tuberculosis and respiratory diseases*, 81(1), 6-12.
- Kone, B., Somboro, A. M., Holl, J. L., Baya, B., Togo, A. A., Sarro, Y. D. S., ... & Doumbia, S. (2020). Exploring the usefulness of molecular epidemiology of tuberculosis in Africa: a systematic review. *International journal of molecular epidemiology and genetics*, 11(1), 1 .
- Kumar, R. S., Devi, K. U., Dusthacker, A., & Nirmal, C. R. (2021). Ofloxacin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: An increasing concern. *Indian Journal of Health Sciences and Biomedical Research kleu*, 14(3), 302-309.

- Lahlou, O., Millet, J., Chaoui, I., Sabouni, R., Filali-Maltouf, A., Akrim, M., ... & El Aouad, R. (2012). The genotypic population structure of *Mycobacterium tuberculosis* complex from Moroccan patients reveals a predominance of Euro-American lineages.
- Lam, P. H., Catanzaro, A., & Perry, S. (2016). Diagnosis of pulmonary and extra-pulmonary tuberculosis. *Lung biology in health and disease*, 237, 81-112.
- Land, M., Hauser, L., Jun, S. R., Nookaew, I., Leuze, M. R., Ahn, T. H., ... & Ussery, D. W. (2015). Insights from 20 years of bacterial genome sequencing. *Functional & integrative genomics*, 15, 141-161.
- Lange C, Schubert S, Jung J, Kostrzewa M, Sparbier K. 2014. Quantitative matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for rapid resistance detection. *J Clin Microbiol* 52:4155– 4162.
- Lawn, S. D., & Nicol, M. P. (2011). Xpert® MTB/RIF assay: development, evaluation and implementation of a new rapid molecular diagnostic for tuberculosis and rifampicin resistance. *Future microbiology*, 6(9), 1067-1082.
- Lee MyungSun, L. M., Lee JongSeok, L. J., Carroll, M. W., Choi HongJo, C. H., Min SeonYeong, M. S., Song TaekSun, S. T., ... & Park SeungKyu, P. S. (2012). Linezolid for treatment of chronic extensively drug-resistant tuberculosis.
- Lee, A. S., Lim, I. H., Tang, L. L., & Wong, S. Y. (2005). High frequency of mutations in the *rpoB* gene in rifampin-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Singapore. *Journal of clinical microbiology*, 43(4), 2026.
- Lehmann, J. (1946). Para-aminosalicylic acid in the treatment of tuberculosis. *Lancet*, 15-16.
- Levin, M. E., & Hatfull, G. F. (1993). *Mycobacterium smegmatis* RNA polymerase: DNA supercoiling, action of rifampicin and mechanism of rifampicin resistance. *Molecular microbiology*, 8(2), 277-285.
- Li, M. C., Wang, X. Y., Xiao, T. Y., Lin, S. Q., Liu, H. C., Qian, C., ... & Wan, K. L. (2022). *rpoB* mutations are associated with variable levels of rifampin and rifabutin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Drug Resistance*, 6853-6861.
- Li, X. Z., Plésiat, P., & Nikaido, H. (2015). The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clinical microbiology reviews*, 28(2), 337-418.
- Lin, W. H., Lee, W. T., Tsai, H. Y., & Jou, R. (2021). Disputed *rpoB* mutations in *Mycobacterium tuberculosis* and tuberculosis treatment outcomes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 65(7), 10-1128.
- Ling, D. I., Zwerling, A. A., & Pai, M. (2008). Rapid diagnosis of drug-resistant TB using line probe assays: from evidence to policy. *Expert review of respiratory medicine*, 2(5), 583-588.
- Liu, B., Su, P., Hu, P., Yan, M., Li, W., Yi, S., ... & Tan, Y. (2024). Prevalence, Transmission and Genetic Diversity of Pyrazinamide Resistance Among Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in Hunan, China. *Infection and Drug Resistance*, 403-416.

- Liu, C. F., Song, Y. M., Ping, H. E., Liu, D. X., He, W. C., Li, Y. M., & Zhao, Y. L. (2021). Evaluation of multidrug resistant loop-mediated isothermal amplification assay for detecting the drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biomedical and Environmental Sciences*, 34(8), 616-622.
- Liu, W., Chen, J., Shen, Y., Jin, J., Wu, J., Sun, F., ... & Zhang, W. (2018). Phenotypic and genotypic characterization of pyrazinamide resistance among multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in Hangzhou, China. *Clinical Microbiology and Infection*, 24(9), 1016-e1.
- Long, R., & Schwartzman, K. (2014). Pathogenesis and transmission of tuberculosis. *Canadian tuberculosis standards*, 25.
- Lönnroth, K., Jaramillo, E., Williams, B. G., Dye, C., & Ravigliione, M. (2009). Drivers of tuberculosis epidemics: the role of risk factors and social determinants. *Social science & medicine*, 68(12), 2240-2246.
- Low, L., & Tammi, M. T. (2017). Introduction to next generation sequencing technologies. *Bioinformatics. World Scientific*, 1-21.
- Lukoye, D., Adatu, F., Musisi, K., Kasule, G. W., Were, W., Odeke, R., ... & Joloba, M. L. (2013). Anti-tuberculosis drug resistance among new and previously treated sputum smear-positive tuberculosis patients in Uganda: results of the first national survey. *PloS one*, 8(8), e70763.
- Luo, M., Li, K., Zhang, H., Yan, X., Gu, J., Zhang, Z., ... & Chen, Y. (2019). Molecular characterization of para-aminosalicylic acid resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in southwestern China. *Infection and drug resistance*, 2269-2275.
- Machado, D., Couto, I., & Viveiros, M. (2019). Advances in the molecular diagnosis of tuberculosis: from probes to genomes. *Infection, Genetics and Evolution*, 72, 93-112.
- MacLean, E., Kohli, M., Weber, S. F., Suresh, A., Schumacher, S. G., Denking, C. M., & Pai, M. (2020). Advances in molecular diagnosis of tuberculosis. *Journal of clinical microbiology*, 58(10), 10-1128.
- Madsen, C. T., Jakobsen, L., Buriánková, K., Doucet-Populaire, F., Pernodet, J. L., & Douthwaite, S. (2005). Methyltransferase Erm (37) slips on rRNA to confer atypical resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry*, 280(47), 38942-38947.
- Mainardi, J. L., Hugonnet, J. E., Gutmann, L., & Arthur, M. (2011). Fighting resistant tuberculosis with old compounds: the carbapenem paradigm. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(12), 1755-1756.
- Mäkinen, J., Marttila, H. J., Marjamäki, M., Viljanen, M. K., & Soini, H. (2006). Comparison of two commercially available DNA line probe assays for detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of clinical microbiology*, 44(2), 350-352.
- Malenfant, J. H., & Brewer, T. F. (2021). Rifampicin mono-resistant tuberculosis a review of an uncommon but growing challenge for global tuberculosis control. In *Open forum infectious diseases* (Vol. 8, No. 2, p. ofab018). US: Oxford University Press.

- Mardassi, H., Namouchi, A., Haltiti, R., Zarrouk, M., Mhenni, B., Karboul, A., ... & Dellagi, K. (2005). Tuberculosis due to resistant Haarlem strain, Tunisia. *Emerging Infectious Diseases*, *11*(6), 957.
- Marrakchi, H., Lanéelle, G., & Quémard, A. (2000). InhA, a target of the antituberculous drug isoniazid, is involved in a mycobacterial fatty acid elongation system, FAS-II. *Microbiology*, *146*(2), 289-296.
- Martin, A., Bombeeck, D., Fissette, K., de Rijk, P., Hernández-Neuta, I., Del Portillo, P., & Palomino, J. C. (2011). Evaluation of the BD MGIT TBc Identification Test (TBc ID), a rapid chromatographic immunoassay for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex from liquid culture. *Journal of microbiological methods*, *84*(2), 255-257.
- Mathys, V., Wintjens, R., Lefevre, P., Bertout, J., Singhal, A., Kiass, M., ... & Bifani, P. (2009). Molecular genetics of para-aminosalicylic acid resistance in clinical isolates and spontaneous mutants of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *53*(5), 2100-2109.
- Matteelli, A., Rendon, A., Tiberi, S., Al-Abri, S., Voniatis, C., Carvalho, A. C. C., ... & Migliori, G. B. (2018). Tuberculosis elimination: where are we now?. *European Respiratory Review*, *27*(148).
- Maus, C. E., Plikaytis, B. B., & Shinnick, T. M. (2005). Molecular analysis of cross-resistance to capreomycin, kanamycin, amikacin, and viomycin in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *49*(8), 3192-3197.
- Mayer, C., & Takiff, H. (2014). The molecular genetics of fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Genetics of Mycobacteria*, 455-478.
- Meehan, C. J., Goig, G. A., Kohl, T. A., Verboven, L., Dippenaar, A., Ezewudo, M., ... & Van Rie, A. (2019). Whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis*: current standards and open issues. *NATURE reviews microbiology*, *17*(9), 533-545.
- Meier, A., Sander, P., Schaper, K. J., Scholz, M., & Böttger, E. C. (1996). Correlation of molecular resistance mechanisms and phenotypic resistance levels in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *40*(11), 2452-2454.
- Mignani, S., Tripathi, R. P., Chen, L., Caminade, A. M., Shi, X., & Majoral, J. P. (2018). New ways to treat tuberculosis using dendrimers as nanocarriers. *Pharmaceutics*, *10*(3), 105.
- Millard, J., Ugarte-Gil, C., & Moore, D. A. (2015). Multidrug resistant tuberculosis. *Bmj*, *350*.
- Miotto, P., Cabibbe, A. M., Feuerriegel, S., Casali, N., Drobniewski, F., Rodionova, Y., ... & Cirillo, D. M. (2014). *Mycobacterium tuberculosis* pyrazinamide resistance determinants: a multicenter study. *MBio*, *5*(5), 10-1128.
- Miotto, P., Piana, F., Cirillo, D. M., & Migliori, G. B. (2008). Genotype MTBDR plus: a further step toward rapid identification of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of clinical microbiology*, *46*(1), 393-394.
- Miotto, P., Zhang, Y., Cirillo, D. M., & Yam, W. C. (2018). Drug resistance mechanisms and drug susceptibility testing for tuberculosis. *Respirology*, *23*(12), 1098-1113.

- Mitarai, S., Kato, S., Ogata, H., Aono, A., Chikamatsu, K., Mizuno, K., ... & Mori, T. (2012). Comprehensive multicenter evaluation of a new line probe assay kit for identification of *Mycobacterium* species and detection of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of clinical microbiology*, 50(3), 884-890.
- Mitchison, D. A. (1979). Basic mechanisms of chemotherapy. *Chest*, 76(6), 771-780.
- Mitchison, D. A. (1992). The Garrod Lecture. Understanding the chemotherapy of tuberculosis-current problems. *Journal of Antimicrobial chemotherapy*, 29(5), 477-493.
- Mokrousov, I. (2019). Current topics of molecular mycobacteriology. *Infection, Genetics and Evolution*, 73, 132-138.
- Mokrousov, I. (2024). Origin and dispersal of the *Mycobacterium tuberculosis* Haarlem genotype: Clues from its phylogeographic landscape and human migration. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 108045.
- Mokrousov, I., Vyazovaya, A., Iwamoto, T., Skiba, Y., Pole, I., Zhdanova, S., ... & Narvskaya, O. (2016). Latin-American-Mediterranean lineage of *Mycobacterium tuberculosis*: Human traces across pathogen's phylogeography. *Molecular phylogenetics and evolution*, 99, 133-143.
- Moraes, G. L., Gomes, G. C., De Sousa, P. R. M., Alves, C. N., Govender, T., Kruger, H. G., ... & Lameira, J. (2015). Structural and functional features of enzymes of *Mycobacterium tuberculosis* peptidoglycan biosynthesis as targets for drug development. *Tuberculosis*, 95(2), 95-111.
- Moreno-Molina, M., Comas, I., & Furió, V. (2019). The future of TB resistance diagnosis: the essentials on whole genome sequencing and rapid testing methods. *Archivos de bronconeumologia*, 55(8), 421-426.
- Morey-León, G., Mejía-Ponce, P. M., Granda Pardo, J. C., Muñoz-Mawyin, K., Fernández-Cadena, J. C., García-Moreira, E., ... & Berná, L. (2023). A precision overview of genomic resistance screening in Ecuadorian isolates of *Mycobacterium tuberculosis* using web-based bioinformatics tools. *PloS one*, 18(12), e0294670.
- Morlock, G. P., Metchock, B., Sikes, D., Crawford, J. T., & Cooksey, R. C. (2003). *ethA*, *inhA*, and *katG* loci of ethionamide-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(12), 3799-3805.
- Muzyukina, P., & Soutourina, O. (2023). CRISPR genotyping methods: Tracing the evolution from spoligotyping to machine learning. *Biochimie*.
- Nacef, L., Haddad, L., Graba, L., Mesbah, S., & Saighi, O. (2015). Profil épidémiologique de la tuberculose dans une wilaya du centre d'Algérie. *Revue des Maladies Respiratoires*, 32, A226.
- Nachiappan, A. C., Rahbar, K., Shi, X., Guy, E. S., Mortani Barbosa Jr, E. J., Shroff, G. S., ... & Hammer, M. M. (2017). Pulmonary tuberculosis: role of radiology in diagnosis and management. *Radiographics*, 37(1), 52-72.

- Nahid, P., Dorman, S. E., Alipanah, N., Barry, P. M., Brozek, J. L., Cattamanchi, A., ... & Vernon, A. (2016). Official American thoracic society/centers for disease control and prevention/infectious diseases society of America clinical practice guidelines: treatment of drug-susceptible tuberculosis. *Clinical infectious diseases*, 63(7), e147-e195.
- Naidoo, K., Perumal, R., Ngema, S. L., Shunmugam, L., & Somboro, A. M. (2023). Rapid Diagnosis of Drug-Resistant Tuberculosis—Opportunities and Challenges. *Pathogens*, 13(1), 27.
- Nakajima, H. (1993). Tuberculosis: a global emergency. *World Health*, 46(4), 3-3.
- Namouchi, A., Karboul, A., Mhenni, B., Khabouchi, N., Haltiti, R., Ben Hassine, R., ... & Mardassi, H. (2008). Genetic profiling of *Mycobacterium tuberculosis* in Tunisia: predominance and evidence for the establishment of a few genotypes. *Journal of Medical Microbiology*, 57(7), 864-872.
- Narasimhan, P., Wood, J., MacIntyre, C. R., & Mathai, D. (2013). Risk factors for tuberculosis. *Pulmonary medicine*, 2013.
- Nasiri, M. J., Haeili, M., Ghazi, M., Goudarzi, H., Pormohammad, A., Imani Fooladi, A. A., & Feizabadi, M. M. (2017). New insights in to the intrinsic and acquired drug resistance mechanisms in mycobacteria. *Frontiers in microbiology*, 8, 681.
- Neuschlova, M., Vladarova, M., Kompanikova, J., Sadlonova, V., & Novakova, E. (2017). Identification of Mycobacterium species by MALDI-TOF mass spectrometry. *Pulmonary Care and Clinical Medicine*, 37-42.
- Nguyen, L. (2016). Antibiotic resistance mechanisms in *M. tuberculosis*: an update. *Archives of toxicology*, 90, 1585-1604.
- Nhu, N. T. Q., Lan, N. T. N., Phuong, N. T. N., van V Chau, N., Farrar, J., & Caws, M. (2012). Association of streptomycin resistance mutations with level of drug resistance and *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *The international journal of tuberculosis and lung disease*, 16(4), 527-531.
- Niemann, S., & Diel, R. (2014). Advances in the molecular epidemiology of tuberculosis. *Der Pneumologe*, 11, 21-27.
- Nigam, A., Almabruk, K. H., Saxena, A., Yang, J., Mukherjee, U., Kaur, H., ... & Lal, R. (2014). Modification of rifamycin polyketide backbone leads to improved drug activity against rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry*, 289(30), 21142-21152.
- Nikolayevskyy, V., Kranzer, K., Niemann, S., & Drobniewski, F. (2016). Whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* for detection of recent transmission and tracing outbreaks: A systematic review. *Tuberculosis*, 98, 77-85.
- Niobe-Eyangoh, S. N., Kuaban, C., Sorlin, P., Cunin, P., Thonnon, J., Sola, C., ... & Gutierrez, M. C. (2003). Genetic biodiversity of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains from patients with pulmonary tuberculosis in Cameroon. *Journal of clinical microbiology*, 41(6), 2547-2553.

- Njire, M., Tan, Y., Mugweru, J., Wang, C., Guo, J., Yew, W., ... & Zhang, T. (2016). Pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Review and update. *Advances in medical sciences*, *61*(1), 63-71.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic acids research*, *28*(12), e63-e63.
- Oo, N. A. T., San, L. L., Thapa, J., Aye, K. S., Aung, W. W., Nakajima, C., & Suzuki, Y. (2018). Characterization of mutations conferring streptomycin resistance to multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Myanmar. *Tuberculosis*, *111*, 8-13.
- Pablos-Méndez, A., Raviglione, M. C., Laszlo, A., Binkin, N., Rieder, H. L., Bustreo, F., ... & Nunn, P. (1998). Global surveillance for antituberculosis-drug resistance, 1994–1997. *New England Journal of Medicine*, *338*(23), 1641-1649.
- Palomino, J. C., & Martin, A. (2014). Drug resistance mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antibiotics*, *3*(3), 317-340.
- Pang, Y., Lu, J., Wang, Y., Song, Y., Wang, S., & Zhao, Y. (2013). Study of the rifampin monoresistance mechanism in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *57*(2), 893-900.
- Pedersen, O. S., Holmgaard, F. B., Mikkelsen, M. K. D., Lange, C., Sotgiu, G., Lillebaek, T., ... & Dahl, V. N. (2023). Global treatment outcomes of extensively drug-resistant tuberculosis in adults: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Infection*.
- Perdigão, J., Macedo, R., Machado, D., Silva, C., Jordão, L., Couto, I., ... & Portugal, I. (2014). GidB mutation as a phylogenetic marker for Q1 cluster *Mycobacterium tuberculosis* isolates and intermediate-level streptomycin resistance determinant in Lisbon, Portugal. *Clinical microbiology and infection*, *20*(5), O278-O284.
- Peterson, E., & Kaur, P. (2018). Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens. *Frontiers in microbiology*, *9*, 2928.
- Pham, T. H., Peter, J., Mello, F. C., Parraga, T., Lan, N. T. N., Nabeta, P., ... & Perkins, M. D. (2018). Performance of the TB-LAMP diagnostic assay in reference laboratories: Results from a multicentre study. *International journal of infectious diseases*, *68*, 44-49.
- Piccazzo, R., Paparo, F., & Garlaschi, G. (2014). Diagnostic accuracy of chest radiography for the diagnosis of tuberculosis (TB) and its role in the detection of latent TB infection: a systematic review. *The Journal of Rheumatology Supplement*, *91*, 32-40.
- Pontali, E., D'Ambrosio, L., Centis, R., Sotgiu, G., & Migliori, G. B. (2017). Multidrug-resistant tuberculosis and beyond: an updated analysis of the current evidence on bedaquiline. *European Respiratory Journal*, *49*(3).
- Pontali, E., Sotgiu, G., D'Ambrosio, L., Centis, R., & Migliori, G. B. (2016). Bedaquiline and multidrug-resistant tuberculosis: a systematic and critical analysis of the evidence. *European Respiratory Journal*, *47*(2), 394-402.

- Pottumarthy, S., Wells, V. C., & Morris, A. J. (2000). A comparison of seven tests for serological diagnosis of tuberculosis. *Journal of clinical microbiology*, 38(6), 2227-2231.
- Poulton, N. C., & Rock, J. M. (2022). Unraveling the mechanisms of intrinsic drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 1573.
- Pourostadi, M., Rashedi, J., Poor, B. M., Kafil, H. S., Kazemi, A., Ahmadpour, E., & Asgharzadeh, M. (2018). Role of molecular epidemiology on tuberculosis control in the Middle East countries: a systematic review and meta-analysis. *Tanaffos*, 17(4), 223.
- Procop, G. W. (2017). Laboratory diagnosis and susceptibility testing for *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis and Nontuberculous Mycobacterial Infections*, 45-58.
- Pushkar, S., Varshney, V., Pushkar, P., & Sagar, H. K. (2023). Novel Approaches for the Treatment of Drug-Resistant Tuberculosis. *Pharmacognosy Research*, 15(2).
- Qi, Y., Li, K., Li, Y., Guo, D., Xu, J., Li, Y., & Gong, W. (2022). CRISPR-based diagnostics: a potential tool to address the diagnostic challenges of tuberculosis. *Pathogens*, 11(10), 1211.
- Rabahi, M. F., Silva, J. L. R. D., Ferreira, A. C. G., Tannus-Silva, D. G. S., & Conde, M. B. (2017). Tuberculosis treatment. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 43, 472-486.
- Rahlwes, K. C., Dias, B. R., Campos, P. C., Alvarez-Arguedas, S., & Shiloh, M. U. (2023). Pathogenicity and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Virulence*, 14(1), 2150449.
- Ramaswamy S, Musser JM. 1998. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tuber Lung Dis* 79: 3-29.
- Ramaswamy, S. V., Amin, A. G., Göksel, S., Stager, C. E., Dou, S. J., El Sahly, H., ... & Musser, J. M. (2000). Molecular genetic analysis of nucleotide polymorphisms associated with ethambutol resistance in human isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44(2), 326-336.
- Ramaswamy, S. V., Reich, R., Dou, S. J., Jasperse, L., Pan, X., Wanger, A., ... & Graviss, E. A. (2003). Single nucleotide polymorphisms in genes associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(4), 1241-1250.
- Ranjan, K. P., Ranjan, N., Kumar, N., & Kumar, N. (2023). Molecular Characterization of katG and inhA Mutations by Genotype MTBDRplus Line Probe Assay To Guide Isoniazid and Ethionamide Use for Drug-Resistant Tuberculosis. *Cureus*, 15(4).
- Rastogi, N., Legrand, E., & Sola, C. (2001). The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Revue Scientifique Et Technique-Office International Des Epizooties*, 20(1), 21-54.
- Raviglione, M. C., & Uplekar, M. W. (2006). WHO's new Stop TB Strategy. *The Lancet*, 367(9514), 952-955.
- Ray, S., Talukdar, A., Kundu, S., Khanra, D., & Sonthalia, N. (2013). Diagnosis and management of miliary tuberculosis: current state and future perspectives. *Therapeutics and clinical risk management*, 9-26.

- Reeves, A. Z., Campbell, P. J., Willby, M. J., & Posey, J. E. (2015). Disparities in capreomycin resistance levels associated with the rrs A1401G mutation in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(1), 444-449.
- Rengarajan J, Sasseti CM, Naroditskaya V, Sloutsky A, Bloom BR, Rubin EJ. 2004. The folate pathway is a target for resistance to the drug para-aminosalicylic acid (PAS) in mycobacteria. *Mol Microbiol* 53: 275-282.
- Richter, E., Rüsç-Gerdes, S., & Hillemann, D. (2007). First linezolid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(4), 1534-1536.
- Rigouts, L., Gumusboga, M., de Rijk, W. B., Nduwamahoro, E., Uwizeye, C., de Jong, B., & Van Deun, A. (2013). Rifampin resistance missed in automated liquid culture system for *Mycobacterium tuberculosis* isolates with specific rpoB mutations. *Journal of clinical microbiology*, 51(8), 2641-2645.
- Ryndak, M. B., & Laal, S. (2019). *Mycobacterium tuberculosis* primary infection and dissemination: a critical role for alveolar epithelial cells. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9, 299.
- Sablon, E., & Shapiro, F. (2005). Advances in molecular diagnosis of HBV infection and drug resistance. *International Journal of Medical Sciences*, 2(1), 8.
- Sakamoto, K. (2012). The pathology of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Veterinary pathology*, 49(3), 423-439.
- Sandgren, A., Strong, M., Muthukrishnan, P., Weiner, B. K., Church, G. M., & Murray, M. B. (2009). Tuberculosis drug resistance mutation database. *PLoS medicine*, 6(2), e1000002.
- Sarmiento, J. M. H., Restrepo, N. B., Mejía, G. I., Zapata, E., Restrepo, M. A., & Robledo, J. (2014). Rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis. *The Pan African Medical Journal*, 18.
- Scott, A. (2004). Sensitivity and specificity of spoligotyping and MIRU-VNTR typing in tuberculosis molecular epidemiology.
- Selmane, S., & L'Hadj, M. (2020). Epidemiology and clinical characteristics of tuberculosis in leon bernard tuberculosis unit in algeria. *The International Journal of Mycobacteriology*, 9(3), 254-260.
- Sengstake, S., Bergval, I. L., Schuitema, A. R., de Beer, J. L., Phelan, J., de Zwaan, R., ... & Anthony, R. M. (2017). Pyrazinamide resistance-conferring mutations in pncA and the transmission of multidrug resistant TB in Georgia. *BMC infectious diseases*, 17, 1-9.
- Seung, K. J., Keshavjee, S., & Rich, M. L. (2015). Multidrug-resistant tuberculosis and extensively drug-resistant tuberculosis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 5(9), a017863.
- Shah, M., & Dorman, S. E. (2021). Latent tuberculosis infection. *New England Journal of Medicine*, 385(24), 2271-2280.

- Sharma, S., Bajpai, J., Srivastava, K., Gaur, P., & Kant, S. (2018). Extra Pulmonary Tuberculosis: A Review on Current Scenario. *Journal of Medical Discovery*, 3(4), 1-8.
- Shenai, S. (2015). WHO recommended tools to improve diagnosis of active and drug resistant tuberculosis. *Acta Medica International*, 2(2), 118-129.
- Shi, W., Zhang, X., Jiang, X., Yuan, H., Lee, J. S., Barry 3rd, C. E., ... & Zhang, Y. (2011). Pyrazinamide inhibits trans-translation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, 333(6049), 1630-1632.
- Siddiqi, S., Takhar, P., Baldeviano, C., Glover, W., & Y. (2007). Isoniazid induces its own resistance in nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(6), 2100-2104.
- Sidze, L. K., Tekwu, E. M., Kuaban, C., Assam-Assam, J. P., Tedom, J. C., & Niemann, S. (2013). Estimates of genetic variability of *Mycobacterium tuberculosis* complex and its association with drug resistance in Cameroon. *Adv Infect Dis*, 3, 55-59.
- Silva, D. R., Mello, F. C. D. Q., & Migliori, G. B. (2020). Shortened tuberculosis treatment regimens: what is new?. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 46.
- Simons, S. O., van Ingen, J., van der Laan, T., Mulder, A., Dekhuijzen, P. R., Boeree, M. J., & van Soolingen, D. (2012). Validation of pncA gene sequencing in combination with the mycobacterial growth indicator tube method to test susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *Journal of clinical microbiology*, 50(2), 428-434.
- Singh, P., Kant, S., Gaur, P., Tripathi, A., & Pandey, S. (2018). Extra pulmonary tuberculosis: An overview and review of literature. *Int J Life Sci Scienti Res*, 4(1), 1539-41.
- Singh, R., Dwivedi, S. P., Gaharwar, U. S., Meena, R., Rajamani, P., & Prasad, T. (2020). Recent updates on drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of applied microbiology*, 128(6), 1547-1567.
- Singhal, R., & Myneedu, V. P. (2015). Microscopy as a diagnostic tool in pulmonary tuberculosis. *International journal of mycobacteriology*, 4(1), 1-6.
- Sinha P, Srivastava GN, Tripathi R, Mishra MN, Anupurba S. 2020. Detection of mutations in the rpoB gene of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains inhibiting wild type probe hybridization in the MTBDR plus assay by DNA sequencing directly from clinical specimens. *BMC Microbiol* 20: 284.
- Smith, I. (2003). *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clinical microbiology reviews*, 16(3), 463-496.
- Smith, T. W. (2013). KA and Nguyen. *L. Molecular Biology of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis*, *J. of Curr Top Microbiol Immunol*, 374, 53-80.
- Smittipat, N., Juthayothin, T., Billamas, P., Jaitrong, S., Rukseree, K., Dokladda, K., ... & Palittapongarnpim, P. (2016). Mutations in rrs, rpsL and gidB in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Thailand. *Journal of global antimicrobial resistance*, 4, 5-10.

Somoskovi, A. (2013). Molecular Detection of Drug-Resistant Tuberculosis By Line Probe Assay-Laboratory Manual for Resource-Limited Settings. *Diagnostic Utility of the Line Probe Assay for the Detection of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis*.

Soni, D. K., Dubey, S. K., & Bhatnagar, R. (2020). ATP-binding cassette (ABC) import systems of *Mycobacterium tuberculosis*: target for drug and vaccine development. *Emerging Microbes & Infections*, 9(1), 207-220.

Spies, F. S., Ribeiro, A. W., Ramos, D. F., Ribeiro, M. O., Martin, A., Palomino, J. C., ... & Zaha, A. (2011). Streptomycin resistance and lineage-specific polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* gidB gene. *Journal of clinical microbiology*, 49(7), 2625-2630.

Spinato, J., Boivin, É., Bélanger-Trudelle, É., Fauchon, H., Tremblay, C., & Soualhia, H. (2016). Genotypic characterization of drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Quebec, 2002-2012. *BMC microbiology*, 16, 1-9.

Sreevatsan, S., Pan, X., Stockbauer, K. E., Williams, D. L., Kreiswirth, B. N., & Musser, J. M. (1996). Characterization of rpsL and rrs mutations in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from diverse geographic localities. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 40(4), 1024-1026.

Sreevatsan, S., Stockbauer, K. E., Pan, X. I., Kreiswirth, B. N., Moghazeh, S. L., Jacobs Jr, W. R., ... & Musser, J. M. (1997). Ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: critical role of embB mutations. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 41(8), 1677-1681.

Stehr, M., Elamin, A. A., & Singh, M. (2015). Pyrazinamide: the importance of uncovering the mechanisms of action in mycobacteria. *Expert review of anti-infective therapy*, 13(5), 593-603.

Steingart, K. R., Flores, L. L., Dendukuri, N., Schiller, I., Laal, S., Ramsay, A., ... & Pai, M. (2011). Commercial serological tests for the diagnosis of active pulmonary and extrapulmonary tuberculosis: an updated systematic review and meta-analysis. *PLoS medicine*, 8(8), e1001062.

Sterling, T. R., Njie, G., Zenner, D., Cohn, D. L., Reves, R., Ahmed, A., ... & Belknap, R. (2020). Guidelines for the treatment of latent tuberculosis infection: recommendations from the National Tuberculosis Controllers Association and CDC, 2020. *American Journal of Transplantation*, 20(4), 1196-1206.

Stoffels, K., Mathys, V., Fauville-Dufaux, M., Wintjens, R., & Bifani, P. (2012). Systematic analysis of pyrazinamide-resistant spontaneous mutants and clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(10), 5186-5193.

Sun, H., Zhang, C., Xiang, L., Pi, R., Guo, Z., Zheng, C., ... & Sun, Q. (2016). Characterization of mutations in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Sichuan, China and the association between Beijing-lineage and dual-mutation in gidB. *Tuberculosis*, 96, 102-106.

Sun, J., Deng, Z., & Yan, A. (2014). Bacterial multidrug efflux pumps: mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochemical and biophysical research communications*, 453(2), 254-267.

- Sun, Z., Zhang, J., Zhang, X., Wang, S., Zhang, Y., & Li, C. (2008). Comparison of gyrA gene mutations between laboratory-selected ofloxacin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical isolates. *International journal of antimicrobial agents*, 31(2), 115-121.
- Supply, P., Allix, C., Lesjean, S., Cardoso-Oelemann, M., Rüsç-Gerdes, S., Willery, E., ... & van Soolingen, D. (2006). Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of clinical microbiology*, 44(12), 4498-4510.
- Swain, S. S., Sharma, D., Hussain, T., & Pati, S. (2020). Molecular mechanisms of underlying genetic factors and associated mutations for drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerging microbes & infections*, 9(1), 1651-1663.
- Takiff, H. E., Salazar, L., Guerrero, C., Philipp, W., Huang, W. M., Kreiswirth, B., ... & Telenti, A. (1994). Cloning and nucleotide sequence of *Mycobacterium tuberculosis* gyrA and gyrB genes and detection of quinolone resistance mutations. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 38(4), 773-780.
- Tao, J., Han, J., Wu, H., Hu, X., Deng, J., Fleming, J., ... & Mi, K. (2013). Mycobacterium fluoroquinolone resistance protein B, a novel small GTPase, is involved in the regulation of DNA gyrase and drug resistance. *Nucleic acids research*, 41(4), 2370-2381.
- Tawfick, M. M., Badawy, M. S. E., Taleb, M. H., & Menofy, N. G. E. (2023). Tuberculosis Diagnosis and Detection of Drug Resistance: A Comprehensive Updated Review. *Journal of Pure & Applied Microbiology*, 17(4).
- Teixeira, H. C., Abramo, C., & Munk, M. E. (2007). Immunological diagnosis of tuberculosis: problems and strategies for success. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 33, 323-334.
- Telenti, A., Imboden, P., Marchesi, F., Matter, L., Schopfer, K., Bodmer, T., ... & Cole, S. (1993). Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *The Lancet*, 341(8846), 647-651.
- Telenti, A., Philipp, W. J., Sreevatsan, S., Bernasconi, C., Stockbauer, K. E., Wieles, B., ... & Jacobs Jr, W. R. (1997). The emb operon, a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol. *Nature medicine*, 3(5), 567-570.
- Tolufashe, G. F., Sabe, V. T., Ibeji, C. U., Lawal, M. M., Govender, T., Maguire, G. E., ... & Honarparvar, B. (2019). Inhibition mechanism of L, D-transpeptidase 5 in presence of the β -lactams using ONIOM method. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 87, 204-210.
- Torres, J. N., Paul, L. V., Rodwell, T. C., Victor, T. C., Amallraja, A. M., Elghraoui, A., ... & Valafar, F. (2015). Novel katG mutations causing isoniazid resistance in clinical M. tuberculosis isolates. *Emerging microbes & infections*, 4(1), 1-9.
- Torres-Sangiao, E., Leal Rodriguez, C., & García-Riestra, C. (2021). Application and perspectives of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology laboratories. *Microorganisms*, 9(7), 1539.
- Tortoli, E. (2006). The new mycobacteria: an update. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 48(2), 159-178.

- Tortoli, E. (2019). The taxonomy of the genus *Mycobacterium*. In *Nontuberculous mycobacteria (NTM)* (pp. 1-10). Academic Press.
- Tortoli, E., & Marcelli, F. (2007). Use of the INNO LiPA Rif. TB for detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA directly in clinical specimens and for simultaneous determination of rifampin susceptibility. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, *26*, 51-55.
- Tortoli, E., Brown-Elliott, B. A., Chalmers, J. D., Cirillo, D. M., Daley, C. L., Emler, S., ... & van Ingen, J. (2019). Same meat, different gravy: ignore the new names of mycobacteria. *European Respiratory Journal*, *54*(1).
- Tremblay, L. W., Fan, F., & Blanchard, J. S. (2010). Biochemical and structural characterization of *Mycobacterium tuberculosis* β -lactamase with the carbapenems ertapenem and doripenem. *Biochemistry*, *49*(17), 3766-3773.
- Tudó, G., Rey, E., Borrell, S., Alcaide, F., Codina, G., Coll, P., ... & Gonzalez-Martin, J. (2010). Characterization of mutations in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in the area of Barcelona. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *65*(11), 2341-2346.
- UICTMR, 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 (UICTMR), Paris, France,.
- Van Deun, A., Barrera, L., Bastian, I., Fattorini, L., Hoffmann, H., Kam, K. M., ... & Wright, A. (2009). *Mycobacterium tuberculosis* strains with highly discordant rifampin susceptibility test results. *Journal of clinical microbiology*, *47*(11), 3501-3506.
- Van Embden, J. D., Cave, M. D., Crawford, J. T., Dale, J. W., Eisenach, K. D., Gicquel, B., ... & Shinnick, T. M. (1993). Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *Journal of clinical microbiology*, *31*(2), 406-409.
- Van Goethem, N., Descamps, T., Devleeschauwer, B., Roosens, N. H., Boon, N. A., Van Oyen, H., & Robert, A. (2019). Status and potential of bacterial genomics for public health practice: a scoping review. *Implementation Science*, *14*(1), 1-16.
- van Soolingen, D., de Haas, P. E., Van Doorn, H. R., Kuijper, E., Rinder, H., & Borgdorff, M. W. (2000). Mutations at amino acid position 315 of the katG gene are associated with high-level resistance to isoniazid, other drug resistance, and successful transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in the Netherlands. *The Journal of infectious diseases*, *182*(6), 1788-1790.
- Vannelli, T. A., Dykman, A., & de Montellano, P. R. O. (2002). The antituberculosis drug ethionamide is activated by a flavoprotein monooxygenase*. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(15), 12824-12829.
- Varma-Basil, M., & Nair, D. (2017). Molecular epidemiology of tuberculosis: Opportunities & challenges in disease control. *Indian Journal of Medical Research*, *146*(1), 11-14.

- Vetting, M. W., Hegde, S. S., Javid-Majd, F., Blanchard, J. S., & Roderick, S. L. (2002). Aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis* in complex with coenzyme A and aminoglycoside substrates. *Nature structural biology*, 9(9), 653-658.
- Veziris, N., & Robert, J. (2010). Anti-tuberculosis drug resistance and therapeutic dead end. *Medecine Sciences: M/S*, 26(11), 976-980.
- Veziris, N., Cambau, E., Sougakoff, W., Robert, J., & Jarlier, V. (2005). Résistance aux antituberculeux. *Archives de pédiatrie*, 12, S102-S109.
- Vilchèze, C., & Jacobs Jr, W. R. (2014). Resistance to isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*: genes, mutations, and causalities. *Molecular genetics of Mycobacteria*, 431-453.
- Viljoen, A., Dubois, V., Girard-Misguich, F., Blaise, M., Herrmann, J. L., & Kremer, L. (2017). The diverse family of MmpL transporters in mycobacteria: from regulation to antimicrobial developments. *Molecular microbiology*, 104(6), 889-904.
- Wang, F., Cassidy, C., & Sacchettini, J. C. (2006). Crystal structure and activity studies of the *Mycobacterium tuberculosis* β -lactamase reveal its critical role in resistance to β -lactam antibiotics. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(8), 2762-2771.
- Wang, F., Langley, R., Gulten, G., Dover, L. G., Besra, G. S., Jacobs Jr, W. R., & Sacchettini, J. C. (2007). Mechanism of thioamide drug action against tuberculosis and leprosy. *The Journal of experimental medicine*, 204(1), 73-78.
- Wang, S., Zhao, B., Song, Y., Zhou, Y., Pang, Y., Ou, X., ... & Zhao, Y. (2013). Molecular characterization of the rpoB gene mutations of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from China.
- Wang, Y., Li, Q., Gao, H., Zhang, Z., Liu, Y., Lu, J., & Dai, E. (2019). The roles of rpsL, rrs, and gidB mutations in predicting streptomycin-resistant drugs used on clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Hebei Province, China. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 12(7), 2713.
- Warren, R. M., van Helden, P. D., & van Pittius, N. C. G. (2009). Insertion Element IS 6110-Based Restriction Fragment Length Polymorphism Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mycobacteria Protocols: Second Edition*, 353-370.
- Wasserman, S., Louw, G., Ramangoela, L., Barber, G., Hayes, C., Omar, S. V., ... & Meintjes, G. (2019). Linezolid resistance in patients with drug-resistant TB and treatment failure in South Africa. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74(8), 2377-2384.
- Whitfield, M. G., Soeters, H. M., Warren, R. M., York, T., Sampson, S. L., Streicher, E. M., ... & Van Rie, A. (2015). A global perspective on pyrazinamide resistance: systematic review and meta-analysis. *PloS one*, 10(7), e0133869.
- Wiens, K. E., Woyczynski, L. P., Ledesma, J. R., Ross, J. M., Zenteno-Cuevas, R., Goodridge, A., ... & Hay, S. I. (2018). Global variation in bacterial strains that cause tuberculosis disease: a systematic review and meta-analysis. *BMC medicine*, 16, 1-13.

- Wivagg, C. N., Bhattacharyya, R. P., & Hung, D. T. (2014). Mechanisms of β -lactam killing and resistance in the context of *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of antibiotics*, 67(9), 645-654.
- Wong, S. Y., Lee, J. S., Kwak, H. K., Via, L. E., Boshoff, H. I., & Barry III, C. E. (2011). Mutations in *gidB* confer low-level streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(6), 2515-2522.
- Woodman, M., Haeusler, I. L., & Grandjean, L. (2019). Tuberculosis genetic epidemiology: a Latin American perspective. *Genes*, 10(1), 53.
- Woods, G. L., & Washington, J. A. (1987). Mycobacteria other than *Mycobacterium tuberculosis*: review of microbiologic and clinical aspects. *Reviews of infectious diseases*, 9(2), 275-294.
- World Health Organization, Automated Real-time Nucleic Acid Amplification Technology for Rapid and Simultaneous Detection of Tuberculosis and Rifampicin Resistance: Xpert MTB/RIF System (World Health Organization, 2011).
- World Health Organization, The Use of Loop-mediated Isothermal Amplification (TB-LAMP) for the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis: Policy Guidance (World Health Organization, 2016).
- World Health Organization. (2015). *Implementing the end TB strategy: the essentials* (No. WHO/HTM/TB/2015.31). World Health Organization.
- World Health Organization. (2016). Molecular line probe assays for rapid screening of patients at risk of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB): policy statement. Geneva: World Health Organization; 2008 (http://www.who.int/tb/features_archive/policy_statement.pdf)
- World Health Organization. (2018). Latent tuberculosis infection-Executive Summary. *World Health Organization: Geneva, Switzerland*.
- World Health Organization. (2019). WHO consolidated guidelines on drug-resistant tuberculosis treatment (No. WHO/CDS/TB/2019.7). World Health Organization.
- World Health Organization. *Forty Fourth World Health Assembly: Tuberculosis Control Programme (WHA44.8)*. 1991
- World Health Organization. *Global tuberculosis report 2020*.
- World Health Organization. *Global tuberculosis report 2023*.
- World Health Organization. *WHO Tuberculosis Programme: Framework for Effective Tuberculosis Control*. 1994
- Wright, A., & Zignol, M. (2008). Anti-tuberculosis drug resistance in the world: fourth global report: the world health organization/international union against tuberculosis and lung disease (who/union) global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance, 2002-2007. World Health Organization.

- Wu, X., Yang, J., Tan, G., Liu, H., Liu, Y., Guo, Y., ... & Yu, F. (2019). Drug resistance characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients with tuberculosis to 12 antituberculous drugs in China. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 9, 345.
- Yadon, A. N., Maharaj, K., Adamson, J. H., Lai, Y. P., Sacchettini, J. C., Ioerger, T. R., ... & Pym, A. S. (2017). A comprehensive characterization of PncA polymorphisms that confer resistance to pyrazinamide. *Nature communications*, 8(1), 588.
- Yuksel, P., Saribas, S., & Bagdatli, Y. (2011). Comparison of the VersaTrek and BACTEC MGIT 960 systems for the contamination rate, time of detection and recovery of mycobacteria from clinical specimens. *Afr J Microbiol Res*, 5(9), 985-9.
- Yusoof, K. A., García, J. I., Schami, A., Garcia-Vilanova, A., Kelley, H. V., Wang, S. H., ... & Torrelles, J. B. (2022). Tuberculosis Phenotypic and Genotypic Drug Susceptibility Testing and Immunodiagnosics: A Review. *Frontiers in immunology*, 13, 870768.
- Zaw, M. T., Emran, N. A., & Lin, Z. (2018). Mutations inside rifampicin-resistance determining region of rpoB gene associated with rifampicin-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of infection and public health*, 11(5), 605-610.
- Zhang, M. W., Zhou, L., Zhang, Y., Chen, B., Peng, Y., Wang, F., ... & Chen, S. H. (2021). Treatment outcomes of patients with multidrug and extensively drug-resistant tuberculosis in Zhejiang, China. *European journal of medical research*, 26, 1-10.
- Zhang, S., Chen, J., Cui, P., Shi, W., Zhang, W., & Zhang, Y. (2015). Identification of novel mutations associated with clofazimine resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(9), 2507-2510.
- Zhang, Y., & Yew, W. W. (2009). Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: update 2015. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 13(11):1320-30.
- Zhang, Y., & Yew, W. W. (2015). Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: update 2015. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 19(11), 1276-1289.
- Zhang, Z., Wang, Y., Pang, Y., & Kam, K. M. (2014). Ethambutol resistance as determined by broth dilution method correlates better than sequencing results with embB mutations in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(2), 638-641.
- Zhao LL, Sun Q, Liu HC, Wu XC, Xiao TY, Zhao XQ, Li GL, Jiang Y, Zeng CY, Wan KL. 2015. Analysis of embCAB mutations associated with ethambutol resistance in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China. *Antimicrob Agents Chemother* 59: 2045-2050.
- Zhao, F., Wang, X. D., Erber, L. N., Luo, M., Guo, A. Z., Yang, S. S., ... & Deng, J. Y. (2014). Binding pocket alterations in dihydrofolate synthase confer resistance to para-aminosalicylic acid in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(3), 1479-1487.

Zhao, L. L., Liu, H. C., Sun, Q., Xiao, T. Y., Zhao, X. Q., Li, G. L., ... & Wan, K. L. (2015). Identification of mutations conferring streptomycin resistance in multidrug-resistant tuberculosis of China. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 83(2), 150-153.

Zimenkov, D. V., Kulagina, E. V., Antonova, O. V., Zhuravlev, V. Y., & Gryadunov, D. A. (2016). Simultaneous drug resistance detection and genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* using a low-density hydrogel microarray. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 71(6), 1520-1531.

Zwerling, A., Behr, M. A., Verma, A., Brewer, T. F., Menzies, D., & Pai, M. (2011). The BCG World Atlas: a database of global BCG vaccination policies and practices. *PLoS medicine*, 8(3), e1001012.

ANNEXES

ANNEXES

Annexe 1. Amorces utilisées pour la préparation des bibliothèques d'amplillons pour l'analyse NGS.

gène	taille amplicon	amorces amplicons avec MD1 (5'-3')	amorces amplicons avec MD2 (5'-3')
rplC	495	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGAGTGCCTCTCGGGCTGGACGACTCGGA	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGCTCGACAAGGCTGGACGACTCGGA
		CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGACGAGTGCCTCTTCTGCTTTGCCAGCCA	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGACGCTCGACAAGGCTGGACGACTCGGA
atpE	510	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGAGTGCCTAGCGATGGAGCTCGAAGAGG	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGCTCGACAAGCGATGGAGCTCGAAGAGG
		CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGACGAGTGCCTCGTGGGAATGAGGAAGTTG	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGACGCTCGACAAGGCTGGGAATGAGGAAGTTG
gyrB	481	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGAGTGCCTGAGTTGGTGGCGGTAAGAG	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGCTCGACAAGATTGGTGGCGGTAAGAG
		CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGACGAGTGCCTACACATGCCCGTTCTC	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGACGCTCGACAAGACATGCCCGTTCTC
gyrA	484	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGAGTGCCTGATGTCTAACCAACCCCT	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGCTCGACAAGATTGTCTAACCAACCCCT
		CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGACGAGTGCCTCGTGGGTATTGCTCGGG	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGACGCTCGACAAGTGGGTATTGCTCGGG
tlyA	510	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGAGTGCCTGGAGAAGGTTGAGTGGGG	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGCTCGACAAGAGAAGGTTGAGTGGGG
		CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGACGAGTGCCTGTGAGGCCACGTGCGTTGG	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGACGCTCGACAAGTGAAGGCCACGTGCGTTGG
	510	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGAGTGCCTGCTGGCAAGATCCTCGGG	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGCTCGACAAGCTGGCAAGATCCTCGGG
		CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGACGAGTGCCTGGCCCTGCTAATGCAACGG	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGACGCTCGACAAGCCCTGCTAATGCAACGG
rrs	494	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGAGTGCCTGATGACGGCCTCGGGTGT	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGCTCGACAAGTACGGCCTCGGGTGT
		CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGACGAGTGCCTGAAACCCACACCTAGTACC	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGACGCTCGACAAGAAACCCACACCTAGTACC
	502	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGAGTGCCTATGACGTCAGTCAATCATGC	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGCTCGACAAGTACGTCAGTCAATCATGC
		CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGACGAGTGCCTGGCTCTGCCACTACAGAC	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGACGCTCGACAAGGCTCTGCCACTACAGAC
	501	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGAGTGCCTGAACAGGATTAGATACCCTG	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGCTCGACAAGAACAGGATTAGATACCCTG
		CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGACGAGTGCCTGGGCATGATGACTTGA	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGACGCTCGACAAGGCATGATGACTTGA
rpsL	495	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGAGTGCCTCAACATCCAGCAGCTGGTC	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGCTCGACAAGCAACATCCAGCAGCTGGTC
		CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGACGAGTGCCTGTAGACGGGTGCTTGACC	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGACGCTCGACAAGTAGACGGGTGCTTGACC
gidB	508	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGAGTGCCTGCCCTCCACTCGCCATC	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGCTCGACAAGTCCCTCCACTCGCCATC
		CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGACGAGTGCCTGCCATTGGCATAGCGGGC	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGACGCTCGACAAGCCATTGGCATAGCGGGC
	482	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGAGTGCCTCAGCGTGCCTGCCGCCAAT	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGCTCGACAAGCGTGCCTGCCGCCAAT
		CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGACGAGTGCCTGGGAGTGCCTAATGTCTC	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGACGCTCGACAAGCGAGTGCCTAATGTCTC

ethA	506	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGAGTGCGTGTGACGGCCTCGACATTAC	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGCTCGACA	GTTGACGGCCTCGACATTAC
		CTATGCGCCTTGCCAGCCGCTCAGACGAGTGCGTGAATTCGAGGTGAGGGCGC	CTATGCGCCTTGCCAGCCGCTCAGACGCTCGACA	GAATTCGAGGTGAGGGCGC
	504	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGAGTGCGTCTACGACGAGGCTACTCGC	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGCTCGACA	CTACGACGAGGCTACTCGC
		CTATGCGCCTTGCCAGCCGCTCAGACGAGTGCGTGTAGTAGCGGGCCGAAGTGC	CTATGCGCCTTGCCAGCCGCTCAGACGCTCGACA	GTAGTAGCGGGCCGAAGTGC
506	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGAGTGCGTCAGACGGGACGGCATCGCC	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGCTCGACA	CAGACGGGACGGCATCGCC	
	CTATGCGCCTTGCCAGCCGCTCAGACGAGTGCGTATAGTCGCGCTCGCCACC	CTATGCGCCTTGCCAGCCGCTCAGACGCTCGACA	AATAGTCGCGCTCGCCACC	
481	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGAGTGCGTAGGGCATGATGCTTC	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGCTCGACA	AAGGGCATGATGCTTC	
	CTATGCGCCTTGCCAGCCGCTCAGACGAGTGCGTTCATCGTCTGACTATGG	CTATGCGCCTTGCCAGCCGCTCAGACGCTCGACA	TCATCGTCTGACTATGG	
pncA	490	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGAGTGCGTGGCGTATGACCCATATC	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGCTCGACA	AGGCGTATGACCCATATC
		CTATGCGCCTTGCCAGCCGCTCAGACGAGTGCGTTGCCGTTCTGCTGACTCCT	CTATGCGCCTTGCCAGCCGCTCAGACGCTCGACA	TGCCGTTCTGCTGACTCCT
	506	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGAGTGCGTCTCCGGCACACGGACTAT	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGCTCGACA	TCTCCGGCACACGGACTAT
		CTATGCGCCTTGCCAGCCGCTCAGACGAGTGCGTCAACAGTTATCCCGTTC	CTATGCGCCTTGCCAGCCGCTCAGACGCTCGACA	CCAACAGTTATCCCGTTC
ethR	497	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGAGTGCGTCGCTGCCGATATCTCGGTC	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGCTCGACA	CGCTGCCGATATCTCGGTC
		CTATGCGCCTTGCCAGCCGCTCAGACGAGTGCGTAGCGTCCGCTCTCATCAG	CTATGCGCCTTGCCAGCCGCTCAGACGCTCGACA	AAGCGTCCGCTCTCATCAG
embB	485	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGAGTGCGTCGACGCCGTGATATTCC	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGCTCGACA	CGACGCCGTGATATTCC
		CTATGCGCCTTGCCAGCCGCTCAGACGAGTGCGTCACATAGGTACCACGGAGC	CTATGCGCCTTGCCAGCCGCTCAGACGCTCGACA	CACATAGGTACCACGGAGC
	465	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGAGTGCGTAGCAAACCCGCTACTGGGC	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGCTCGACA	AAGCAAACCCGCTACTGGGC
		CTATGCGCCTTGCCAGCCGCTCAGACGAGTGCGTTTGGCGGAACCCGTGGGC	CTATGCGCCTTGCCAGCCGCTCAGACGCTCGACA	TTGGCGGAACCCGTGGGC
485	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGAGTGCGTCTGGTCGGCAACCGGATGG	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGCTCGACA	CTGGTCGGCAACCGGATGG	
	CTATGCGCCTTGCCAGCCGCTCAGACGAGTGCGTATCAGGCTCGACGATAGCT	CTATGCGCCTTGCCAGCCGCTCAGACGCTCGACA	AATCAGGCTCGACGATAGCT	
katG	505	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGAGTGCGTAACACCAACTCTGGAAGGA	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGCTCGACA	AAACCAACTCTGGAAGGA
		CTATGCGCCTTGCCAGCCGCTCAGACGAGTGCGTTGGGCCAGCTGTTAAGCGG	CTATGCGCCTTGCCAGCCGCTCAGACGCTCGACA	ATGGGCCAGCTGTTAAGCGG
	485	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGAGTGCGTATCCGGATGCGTGGCACGC	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGCTCGACA	AATCCGGATGCGTGGCACGC
		CTATGCGCCTTGCCAGCCGCTCAGACGAGTGCGTGTCCGGTTGCCGTTCCGGC	CTATGCGCCTTGCCAGCCGCTCAGACGCTCGACA	AGTTCCGGTTGCCGTTCCGGC
	473	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGAGTGCGTAGATGGGCTGATCTACGTG	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGCTCGACA	AAGATGGGCTGATCTACGTG
		CTATGCGCCTTGCCAGCCGCTCAGACGAGTGCGTCCGTCCTTGGCGGTGTTATG	CTATGCGCCTTGCCAGCCGCTCAGACGCTCGACA	CCGTCCTTGGCGGTGTTATG
	466	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGAGTGCGTAGTTCGCCAAGGCTGGTA	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGCTCGACA	AGTTCGCCAAGGCTGGTA
		CTATGCGCCTTGCCAGCCGCTCAGACGAGTGCGTACTTTGATGTTCCCGGCG	CTATGCGCCTTGCCAGCCGCTCAGACGCTCGACA	ACTTTGATGTTCCCGGCG
485	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGAGTGCGTTGCGTCGAGGAACAAACCG	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGCTCGACA	ATGCGTCGAGGAACAAACCG	
	CTATGCGCCTTGCCAGCCGCTCAGACGAGTGCGTATAGACCTGACAAGCGCC	CTATGCGCCTTGCCAGCCGCTCAGACGCTCGACA	AATAGACCTGACAAGCGCC	
rpoB	483	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGAGTGCGTGAAGGTCAGACCAGATGAC	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGCTCGACA	GAGGGTCAGACCAGATGAC
		CTATGCGCCTTGCCAGCCGCTCAGACGAGTGCGTTGATCGGGCACAATCCGG	CTATGCGCCTTGCCAGCCGCTCAGACGCTCGACA	TCGATCGGGCACAATCCGG
p.inhA	485	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGAGTGCGTCGGCGGGAAGATCCGCTCG	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGCTCGACA	CGGCGGGAAGATCCGCTCG
		CTATGCGCCTTGCCAGCCGCTCAGACGAGTGCGTATGGGGTTTGGCCCTTCA	CTATGCGCCTTGCCAGCCGCTCAGACGCTCGACA	AATGGGGTTTGGCCCTTCA
inhA	480	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGAGTGCGTCACAAGGACGCACATGACA	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGCTCGACA	CACAAGGACGCACATGACA
		CTATGCGCCTTGCCAGCCGCTCAGACGAGTGCGTCCTTGGCCATCGAAGCATA	CTATGCGCCTTGCCAGCCGCTCAGACGCTCGACA	CCCTTGGCCATCGAAGCATA
	501	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGAGTGCGTGCATGGACTTCGACCCGAGC	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGCTCGACA	GCATGGACTTCGACCCGAGC
		CTATGCGCCTTGCCAGCCGCTCAGACGAGTGCGTCGGGCCCTTCGGTCCGGC	CTATGCGCCTTGCCAGCCGCTCAGACGCTCGACA	CGGGCCCTTCGGTCCGGC

Les différentes parties des amorces sont les séquences spécifiques à l'ADN de Mtb cible (noir) ; les séquences indexes (*Multiplex Identifier*) MID 1 (marron) et MID 2 (vert), les séquences adaptateurs 454 (rouge et bleu).

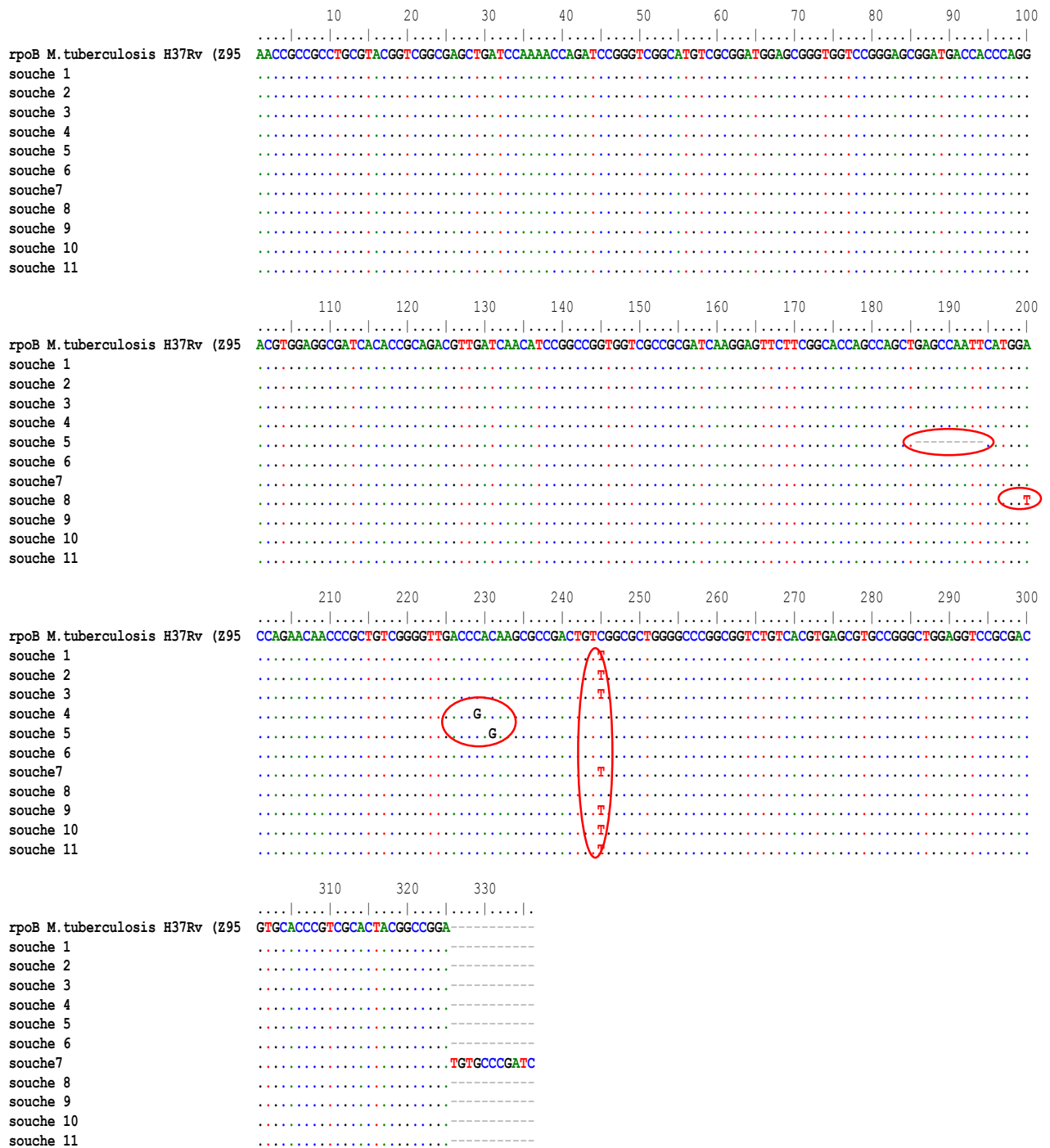
Annexe 2. Séquences d'amorces de la PCR utilisées dans le génotypage par la méthode de MIRU-VNTR à 24 locus (Supply *et al.*, 2006).

TABLE 2. Locus designations and PCR primer sequences used in this study for the 24 locus set.

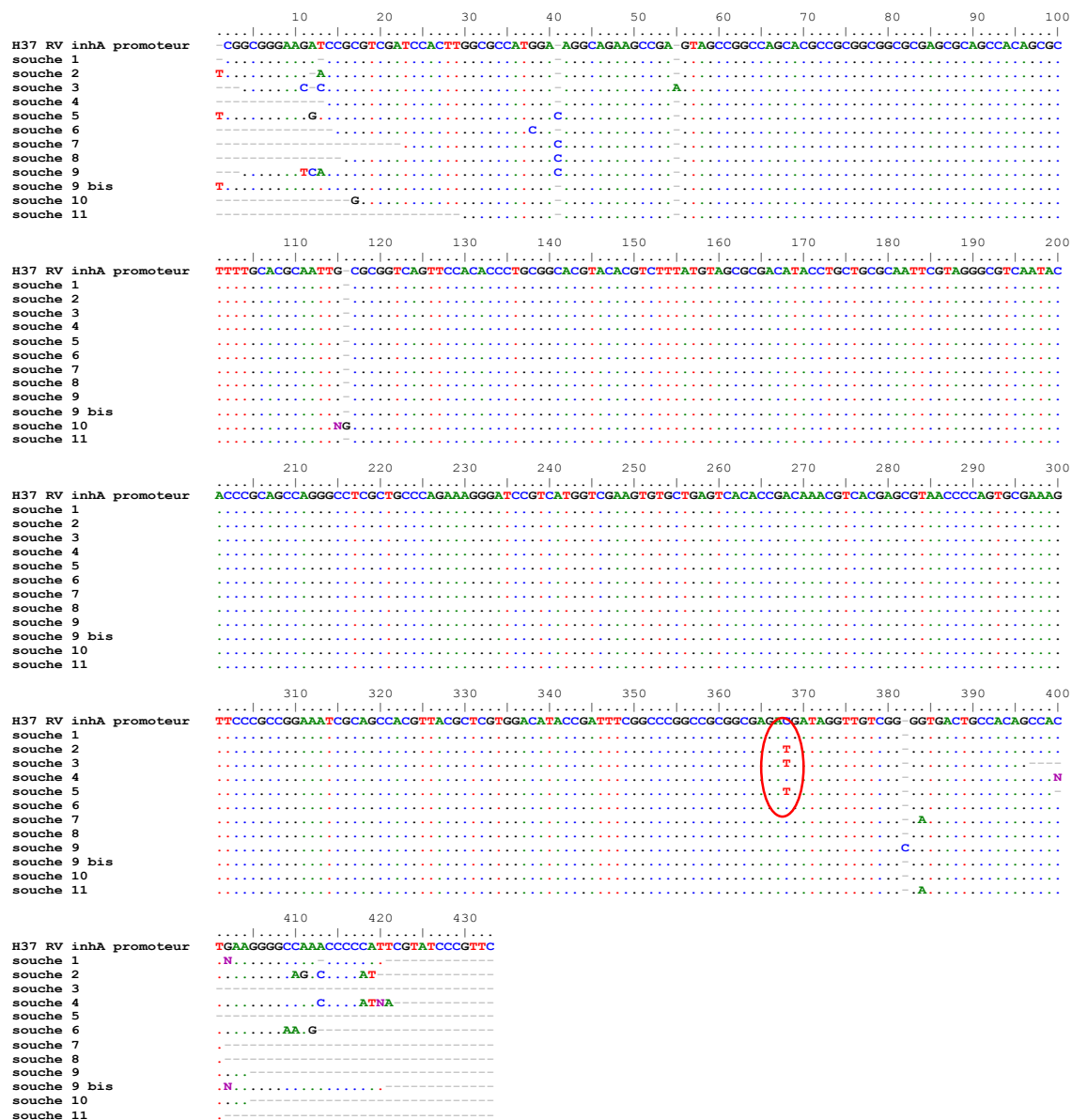
Set and multiplex ^a	Locus	Alias(es)	Repeat unit length (bp) ^b	PCR primer pairs (5' to 3', with labeling indicated) ^c	
Discriminatory Mix 1	580	MIRU 4; ETR D	77	GCGCGAGAGCCCGAACTGC (FAM) GCGCAGCAGAAAACGCCAGC	
	2996	MIRU 26	51	TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC CATAGGCGACCAGGCGAATAG (VIC)	
	802	MIRU 40	54	GGGTTGCTGGATGACAACGTGT (NED) GGGTGATCTCGGCGAAATCAGATA	
	Mix 2	960	MIRU 10	53	GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT (FAM)
		1644	MIRU 16	53	TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA CCCGTCGTGCAGCCCTGGTAC (VIC)
		3192	MIRU 31; ETR E	53	ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA GTGCCGACGTGGTCTTGAT (NED)
	Mix 3	424	Mtub04	51	CTTGGCCGGCATCAAGCGCATTATT GGCAGCAGAGCCCGGATTCCTC (FAM)
		577	ETR C	58	CGAGAGTGGCAGTGGCGTTATCT (VIC) AATGACTTGAACGCGCAAATTGTGA
		2165	ETR A	75	AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT (NED) CGAAGCCTGGGGTGCCCGGATTT
	Mix 4	2401	Mtub30	58	CTTGAAGCCCCGGTCTCATCTGT (FAM) ACTTGAACCCCCACGCCATTAGTA
		3690	Mtub39	58	CGGTGGAGGCGATGAACGTCTTC (VIC) TAGAGCGGCACGGGGGAAAGCTTAG
		4156	QUB-4156	59	TGACCACGGATTGCTCTAGT GCCGGCGTCCATGTT (NED)
Mix 5	2163b	QUB-11b	69	CGTAAGGGGGATGCGGGAAATAGG CGAAGTGAATGGTGGCAT (FAM)	
	1955	Mtub21	57	AGATCCCAGTTGTGCTGCTC (VIC) CAACATCGCCTGGTTCTGTA	
	4052	QUB-26	111	AACGCTCAGCTGTCCGAT (NED) CGGCCGTGCCGGCCAGGTCCTTCCCGAT	
Auxiliary Mix 6	154	MIRU 2	53	TGGACTTGCAGCAATGGACCAACT TACTCGGACGCCGGCTCAAAAT (FAM)	
	2531	MIRU 23	53	CTGTGATGGCCGCAACAAAACG (VIC) AGCTCAACGGGTTTCGCCCTTTTGTC	
	4348	MIRU 39	53	CGCATCGACAAACTGGAGCCAAAC CGGAAACGTCTACGCCACACAT (NED)	
Mix 7	2059	MIRU 20	77	TCGGAGAGATGCCCTTCGAGTTAG (FAM) GGAGACCGCACCAGTACTTGTA	
	2687	MIRU 24	54	CGACCAAGATGTGCAGGAATACAT GGGCGAGTTGAGCTCAGAA (VIC)	
	3007	MIRU 27; QUB-5	53	TCGAAAGCCTCTGCGTGCCAGTAA GCGATGTGAGCGTGCCACTCAA (NED)	
Mix 8	2347	Mtub29	57	GCCAGCCCGTGCATAAACCT (FAM) AGCCACCCGGTGTGCCTTGATGAC	
	2461	ETR B	57	ATGGCCACCCGATACCGCTTCAGT (VIC) CGACGGGCCATCTTGGATCAGCTAC	
	3171	Mtub34	54	GGTGCGCACCTGCTCCAGATAA (NED) GGCTCTCATTGCTGGAGGGTTGTAC	

e

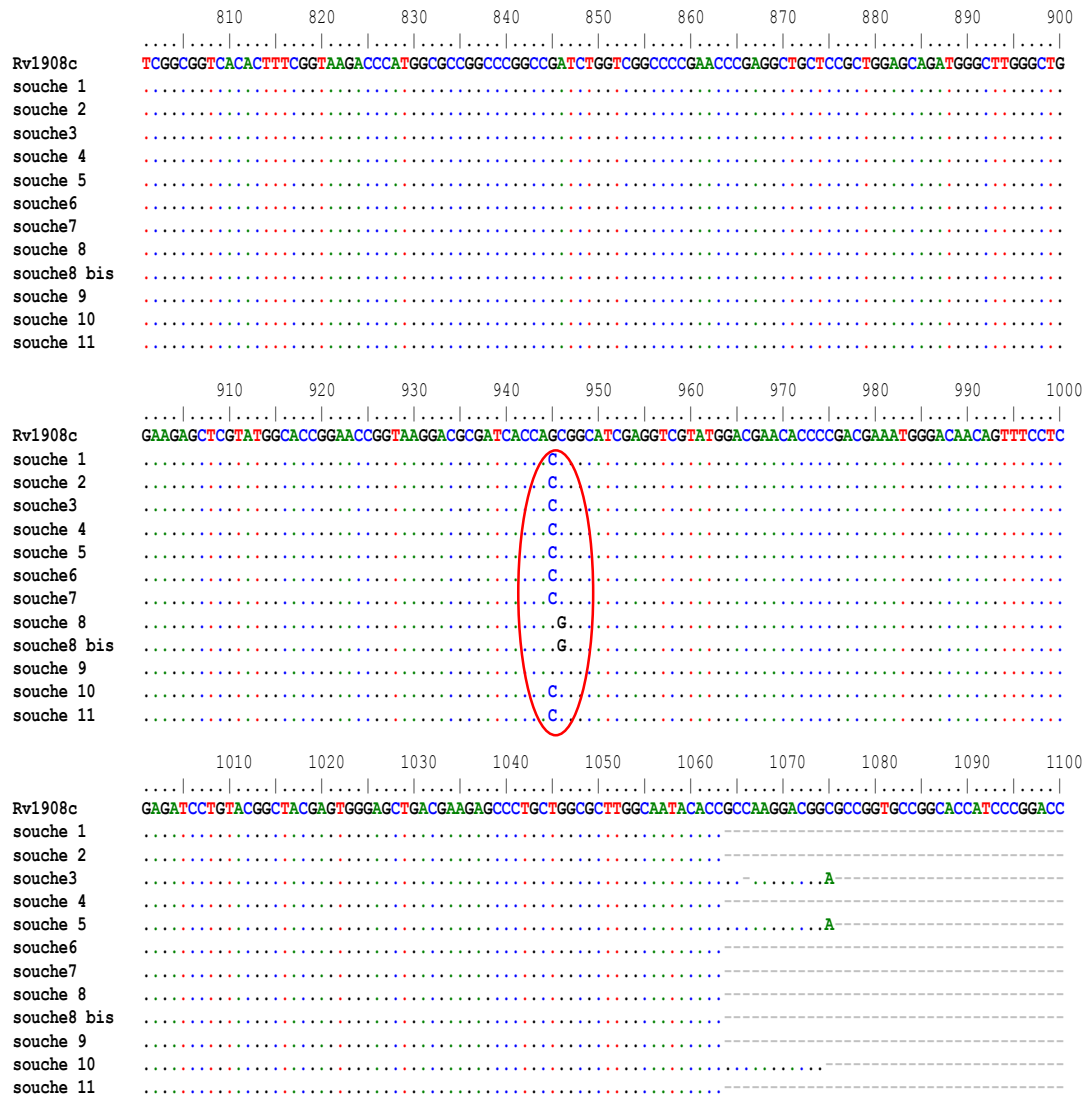
Annexe 3. Alignement des séquences du gène *rpoB* des 11 isolats *Mtb* avec la souche de référence H37RV.



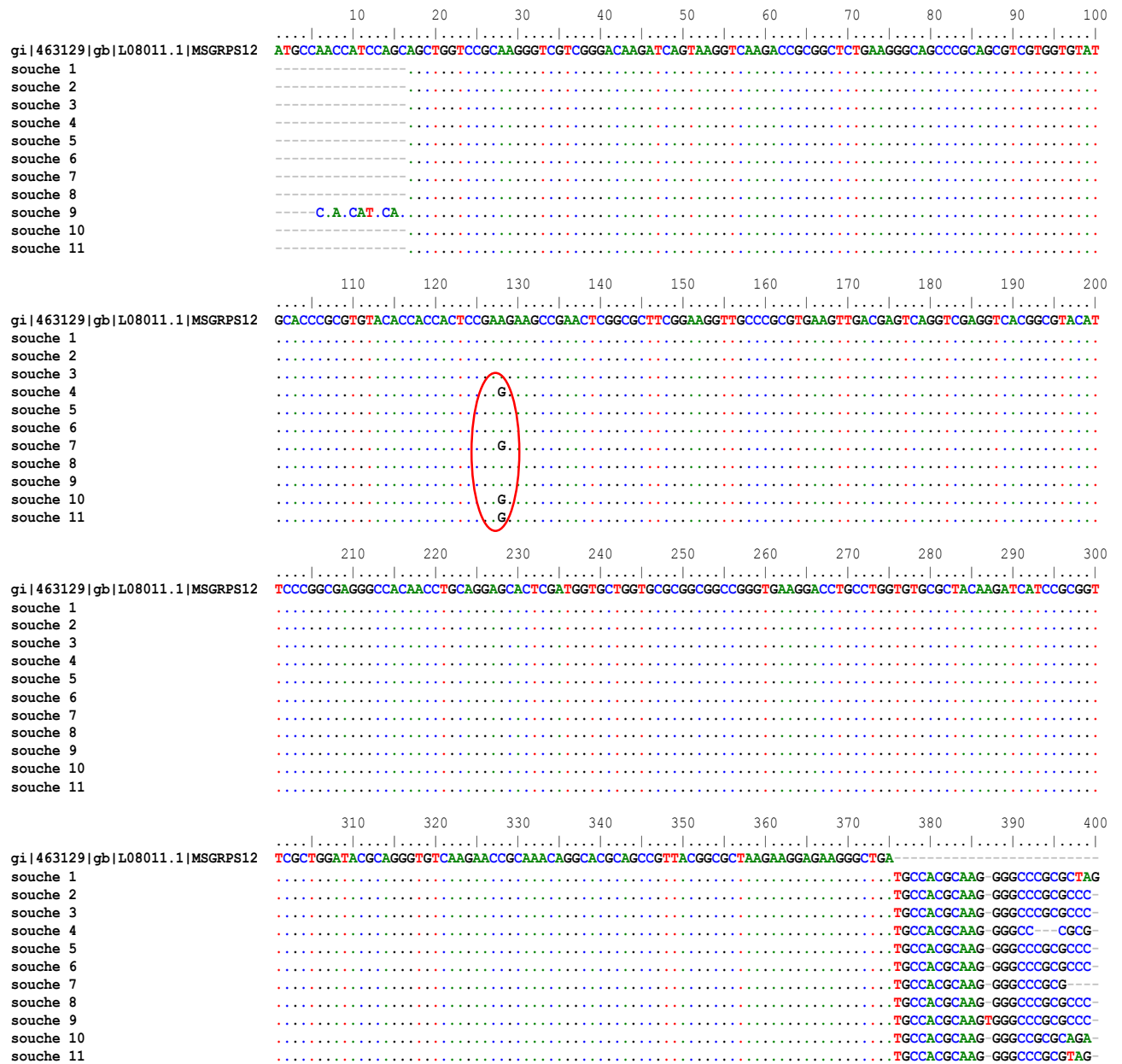
Annexe 4. Alignement des séquences du promoteur du gène *inhA* des 11 isolats *Mtb* avec la souche de référence H37RV.



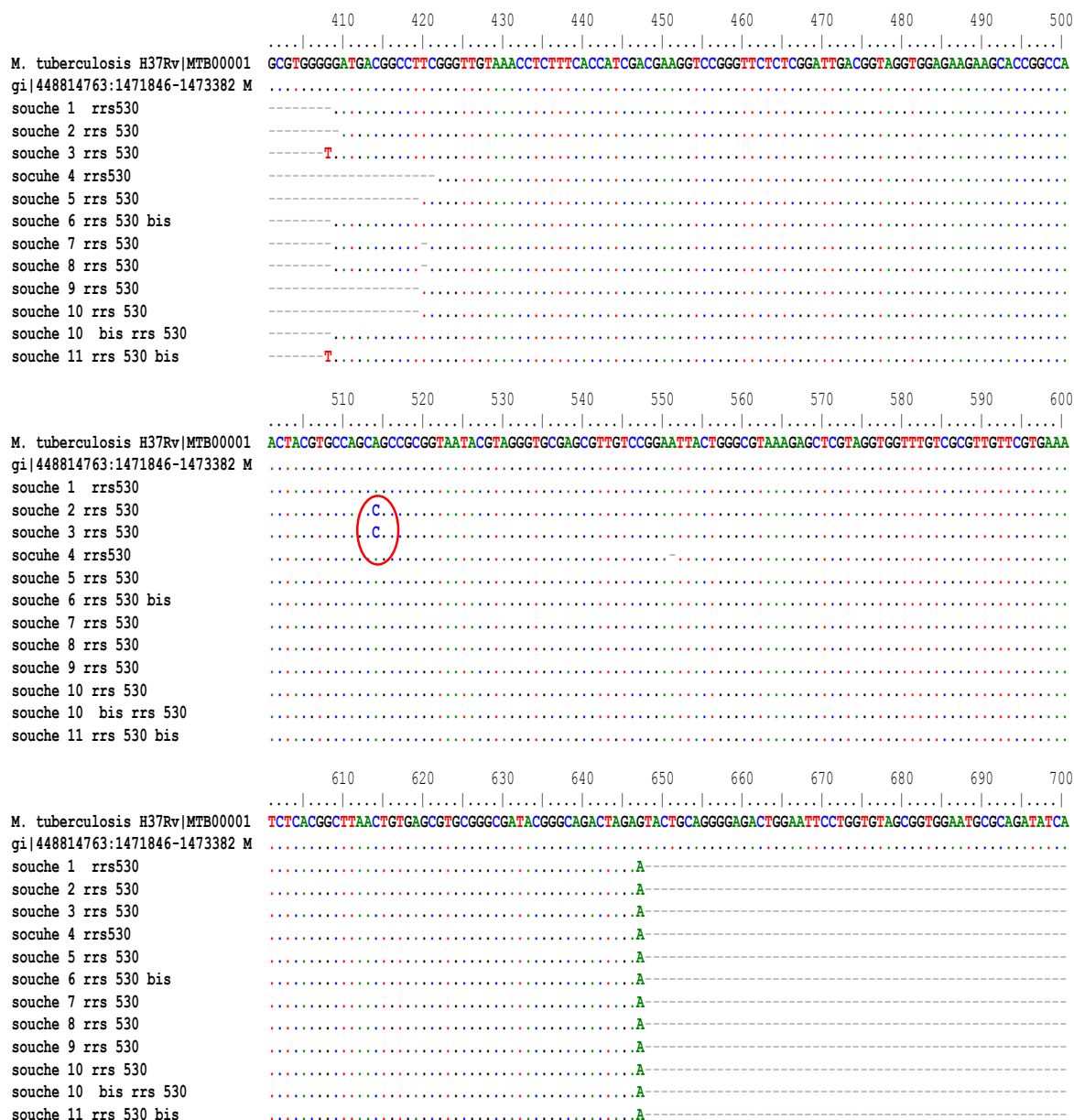
Annexe 5. Alignement des séquences du gène *katG* des 11 isolats *Mtb* avec la souche de référence H37RV.



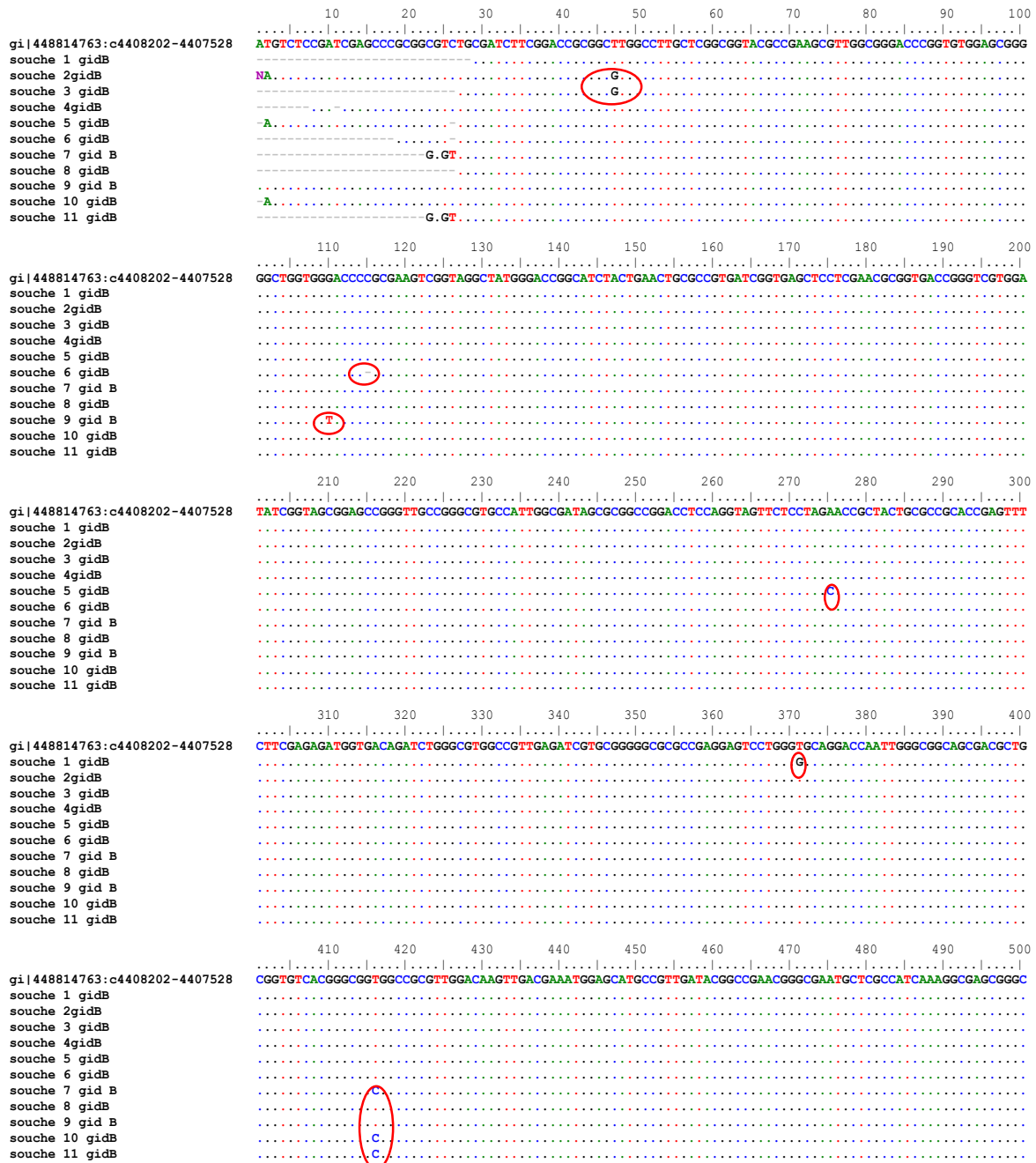
Annexe 6. Aligement des séquences du gène *rpsL* des 11 isolats *Mtb* avec la souche de référence H37RV.



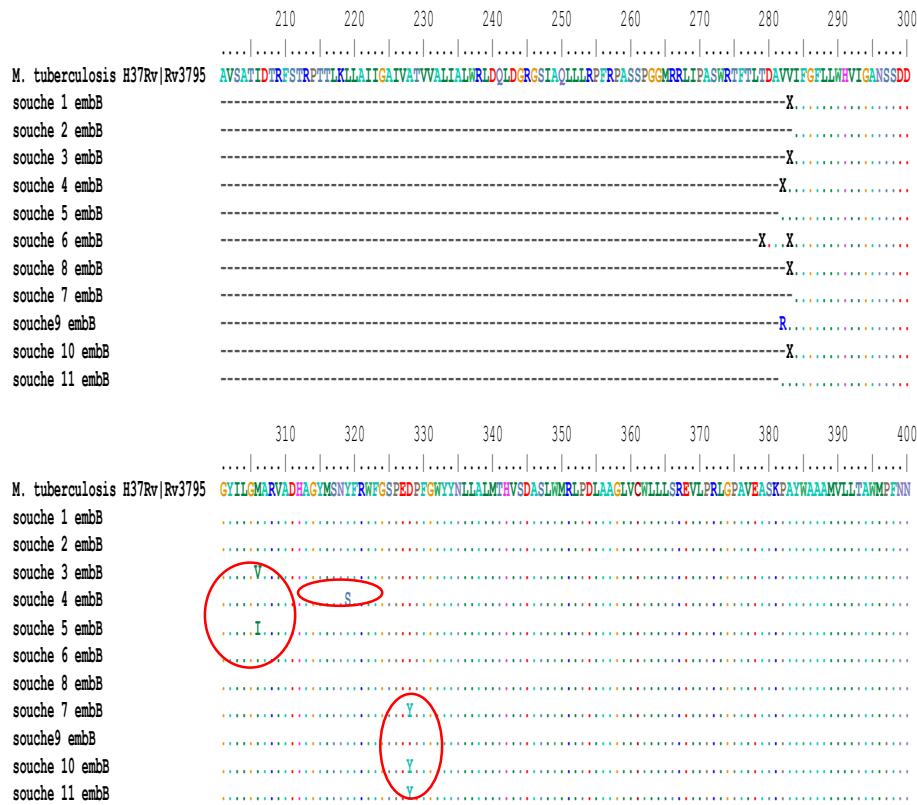
Annexe 7. Alignement des séquences du gène *rrs* au niveau de la boucle 530 des 11 isolats *Mtb* avec la souche de référence H37RV.



Annexe 8. Aligement des séquences du gène *gidB* des 11 isolats *Mtb* avec la souche de référence H37RV.



Annexe10. Aligement des séquences d'acide aminé du gène *embB* des 11 isolats *Mtb* avec la souche de référence H37RV



Annexe 11. Alignement des séquences d'acide aminé du gène *pncA* des 11 isolats *Mtb* avec la souche de référence H37RV

