

**TABLES DES MATIERES :**

<b>TABLES DES MATIÈRES :</b> .....	<b>4</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>7</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>9</b>
<b>PREMIERE PARTIE: GENERALITES</b> .....	<b>12</b>
<b>I. GÉNÉRALITÉS SUR LA TUBERCULOSE</b> .....	<b>13</b>
I.1. Historique de la tuberculose.....	13
I.2. Epidémiologie mondiale actuelle de la tuberculose.....	13
I.3 La tuberculose à Madagascar.....	15
<b>II. LE COMPLEXE <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> (MTBC)</b> .....	<b>16</b>
<b>II.1. Systématique des bactéries MTBC</b> .....	<b>16</b>
II.1.1. Le genre <i>Mycobacterium</i> .....	17
II.1.2. Le Complexe <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (MTBC) .....	18
<b>II.2. Caractéristiques du génome des bactéries MTBC</b> .....	<b>19</b>
II.2.1. Caractéristiques du génome de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv .....	19
II.2.2. Les séquences répétées du génome de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	20
<b>II.3. Epidémiologie Moléculaire et Evolution</b> .....	<b>28</b>
II.3.1. Utilisation des marqueurs génétiques dans le typage des MTBC .....	28
II.3.2. Evolution et phylogénie des souches MTBC :.....	36
II.3.3. Les familles de souches de <i>M. tuberculosis</i> :.....	39
<b>III. TRANSFERT HORIZONTAL DE MATÉRIEL GÉNÉTIQUE CHEZ LES BACTÉRIES</b> .....	<b>46</b>
<b>III.1. Les Transferts horizontaux</b> .....	<b>46</b>
<b>III.2. Les îlots génomiques (GEI ou « Genomic Islands »)</b> .....	<b>48</b>
III.2.1. Caractéristiques des îlots génomiques.....	48
III.2.2. Détections de régions potentiellement acquises par transferts horizontaux .....	49
<b>III.3. Les Transferts Horizontaux et les bactéries MTBC</b> :.....	<b>51</b>
<b>IV. LA TUBERCULOSE : DE L'INFECTION À LA MALADIE</b> .....	<b>52</b>
<b>IV.1. La primo-infection à la bactérie de la tuberculose</b> .....	<b>52</b>
IV.1.1. La Réponse immunitaire à médiation cellulaire contre la tuberculose.....	53
IV.1.2. Le granulome tuberculeux .....	57
IV.1.3. La réponse Th1 .....	59
IV.1.4. La réponse Th17 et Th2 dans l'immunité anti-tuberculeuse .....	61
<b>IV.2. Progression d'une infection tuberculeuse</b> .....	<b>62</b>
IV.2.1 Les facteurs génétiques liés à la susceptibilité de l'hôte à une tuberculose active .....	63
IV.2.2. Dynamique de la production de l'IFN $\gamma$ de l'infection à une tuberculose active .....	64

<b>IV.3. Diagnostic de la tuberculose .....</b>	<b>66</b>
IV.3.1. Le diagnostic de la tuberculose active .....	66
IV.3.2. Le diagnostic de la tuberculose latente .....	70
<b>IV.4. Le traitement de la tuberculose et la stratégie DOTS.....</b>	<b>71</b>
<b>IV.5. La Prévention de la tuberculose .....</b>	<b>73</b>
<b>V. LA DIVERSITÉ GENETIQUE DES BACTERIES ET LES PHÉNOTYPES .....</b>	<b>77</b>
V.1. Diversité génétique et virulence des souches <i>M. tuberculosis</i> .....	77
V.2. Diversité génétique des souches <i>M. tuberculosis</i> et variations de la réponse immunitaire chez l'hôte.	79
V.3. Diversité génétique des souches <i>M. tuberculosis</i> et variation des signes cliniques de la tuberculose ...	80
V.4. Corrélation entre génotype de la bactérie et celui de l'hôte .....	81
<b>VI. PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE .....</b>	<b>82</b>
<b>DEUXIEME PARTIE : RESULTATS EXPERIMENTAUX .....</b>	<b>85</b>
<b>I. VARIATIONS DE LA REPONSE IMMUNITAIRE EN FONCTION DU GÉNOTYPE DES SOUCHES <i>M. TUBERCULOSIS</i> CHEZ LES TUBERCULEUX ET LEURS CONTACTS (ARTICLE EN ANNEXE).....</b>	<b>86</b>
I.1. Présentation des travaux.....	86
I.2. Méthodologie.....	86
I.2.1. Site et sujets d'étude : .....	86
I.2.2. Procédures de mycobactériologie: .....	87
I.2.3. Spoligotypage: .....	87
I.2.4. Tests ELISPOTS:.....	88
I.2.5. Gestion des données et analyses statistiques:.....	88
I.3. Sujets retenus pour l'étude .....	88
I.4. Influence du spoligotype des souches sur la charge bacillaire .....	92
I.5. Influence du spoligotype des souches sur la réponse IFN $\gamma$ -ELISPOT des patients tuberculeux.....	93
I.6. Influence du spoligotype des souches sur la réponse IFN $\gamma$ -ELISPOT des contacts proches de patients tuberculeux .....	93
I.7. Issue clinique de la tuberculose chez les patients, suivi des sujets contacts et génotype des souches <i>M. tuberculosis</i> .....	95
I.8. Discussions et Perspectives I.....	99
<b>II. LE POLYMORPHISME DES ILOTS GÉNOMIQUES SPÉCIFIQUES DES MTBC EST ASSOCIÉ A LA DIVERSITE GENETIQUE DES SOUCHES CLINIQUES ISSUES DE PATIENTS TUBERCULEUX.....</b>	<b>104</b>
II.1. Méthodologie .....	105
II.1.1. Souches bactériennes.....	105

## Table des matières

II.1.2. Typages et analyses moléculaires.....	106
<b>II.2. Spoligotyping et classification des souches cliniques en famille.....</b>	<b>109</b>
<b>II.3. Criblage des îlots génomiques dans les isolats cliniques de <i>M. tuberculosis</i>.....</b>	<b>110</b>
II.3.1. Les îlots génomiques conservés dans les souches cliniques.....	111
II.3.2. Les îlots génomiques polymorphes dans les souches cliniques.....	114
<b>II.4. Caractérisation des îlots génomiques polymorphes par séquençage.....</b>	<b>118</b>
II.4.1. Les insertions dans les îlots génomiques.....	118
II.4.2. Les délétions dans les îlots génomiques.....	121
<b>II.5. Polymorphisme des GEI et association avec les familles de spoligotypes des souches cliniques.....</b>	<b>121</b>
II.5.1. Délétion d'îlots génomiques dans les familles spoligotypes de souches.....	121
II.5.2. Association de l'insertion d'IS6110 dans les GEI avec les familles de spoligotypes des souches cliniques.....	122
<b>II.6. Association du polymorphisme des GEI-spécifiques de MTBC avec le schéma évolutif des familles de souches.....</b>	<b>124</b>
<b>II.7. Association entre le polymorphisme des GEI et celui de chaque spacer dans le locus DR.....</b>	<b>128</b>
II.7.1. Etude de l'association entre la présence des gènes PhiRv1 et le polymorphisme des spacers dans les familles de spoligotypes.....	129
II.7.2. Etude de l'association entre la présence des IS dans les îlots génomiques et celui des spacers dans les familles de spoligotypes.....	131
<b>II.8. Fonctions des GEI délétés ou altérés par les IS.....</b>	<b>135</b>
<b>II.9. Association entre données cliniques des patients et génotype des souches.....</b>	<b>135</b>
<b>II.10. Discussions.....</b>	<b>140</b>
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>146</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>149</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>176</b>
1. Base des données cliniques des patients tuberculeux.....	176
2. Données cliniques des patients tuberculeux (résultats II). .....	177
3. Les différents profils spoligotypes des souches cliniques étudiées ainsi que leur familles.....	183
4. Résultats des antibiogrammes réalisés sur les souches cliniques. ....	184
5. Article sur les variations de l'IFN $\gamma$ en fonction de la diversité des souches à Antananarivo Madagascar..	184
<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>195</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>196</b>

## LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNr	Acide ribonucléique ribosomal
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
BAAR	Bacille Acido-Alcool Résistant
BCG	Bacille de Calmette et Guérin
BK	Bacille de Koch
BSA	Bovine Serum Albumine (Albumine du Sérum de Bovin)
<i>Bst</i>	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
CD	Complexe de différenciation
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CFP	Culture filtrate protein (protéine filtrée de culture)
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CR3	Complement receptor 3 (récepteur de complément 3)
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (Région de courtes séquences palindromiques régulièrement entrecoupées)
DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin (Molécule d'adhésion intracellulaire spécifique des cellules dendritiques, différent de l'intégrine)
dNTP	Déoxynucléoside triphosphate
DOTS	Directly Observed Therapy Short-course (Traitement de courte durée sous observation directe)
DR	Direct repeats (séquence répétée directement)
ELISA	Enzyme-linked immunoSorbent assay (dosage d'immunoabsorption par enzyme liée)
ELISPOT	Enzyme-linked immunosorbent spot assay (dosage de points à partir immunoabsorption par enzyme liée)
EMB	Ethambutol
ESAT-6	6 kDa early secretory antigenic target of Mycobacterium tuberculosis (cible sécrétée précoce de 6 Kda de Mycobacterium tuberculosis)
ETR-A	Exact Tandem Repeats (tandem répété avec exactitude)
G+C	Guanine + Cytosine
G-CSF	Granulocyte colony stimulating factor (facteur stimulant les colonies de granulocytes )
GEI	Genomic island (îlot génomique)
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony stimulating factor (facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages)
HGT	Horizontal gene transfer (transfert horizontal de gène)
IDR	Intradermoréaction
IFN $\gamma$	Interféron gamma
IFNGR	IFN $\gamma$ receptor (récepteur IFN $\gamma$ )
IL	interleukine
INH	Isoniazide
iNOS	Inductible nitric oxide synthase (Oxyde nitric synthase inductible)
IRGM	Immunity-Related GTPase M
IS	Insertion sequence (séquence d'insertion)
kb	Kilobases
kDa	Kilo dalton
KO	Knock out
Lam	Lipoarabinomannane
LJ	Lowenstein-Jensen
LSP	Large sequence polymorphism (polymorphisme de larges séquences)
$\mu$ g	Microgramme
$\mu$ m	micromètre

## Liste des abréviations

MDR-TB	Multidrug-Resistant Tuberculosis (Tuberculose multi-résistante aux antibiotiques)
MGIT	<i>Mycobacteria</i> growth indicator tube (tube indicateur de croissance mycobactérienne)
min	Minute
MIRU	Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit (unité répétitive dispersée dans le génome mycobactérien)
mL	Millilitre
MLVA	Multiple Loci VNTR Analysis
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MTBC	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complexe
n	Nombre
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide deshydrogénase
NK	Natural killer
NRAMP	Natural resistance-associated macrophage protein (protéine associée à la résistance naturelle des macrophages)
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PAI	Pathogenicity island (îlot de pathogénicité)
PAS	Acide p-aminosalicylique
Pb	Paire de bases
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell (cellules mononucléaires circulant dans le sang)
PBS	Phosphate Buffer Saline (Tampon Phosphate)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Réaction de Polymérisation en Chaîne)
PE	Proline-Glutamie
PGG	Principal genotypic group (principaux groupes génotypiques)
PGL	Phenolyc glycolipid (Glycolipide phénolique)
PGRS	Polymorphic GC-rich sequence (séquence polymorphe riche en GC)
PPD	Purified Protein Derivative
PPE	Proline-Proline-Glutamine
PZA	Pyrazinamide
RD	Région de différence
3R	Réplication recombinaison réparation
RFLP	Restriction fragment length polymorphism (Polymorphisme de la longueur de fragments de restriction)
RIF	Rifampicine
S	Svedberg
sec	Seconde
SIDA	Syndrome d'Immuno-Déficience Acquise
SITVIT	Spoligotype international typing-VNTR international typing
SM	Streptomycine
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Polymorphisme au niveau d'un seul nucléotide)
SpolDB4	Fourth international spoligotyping database (4 <sup>e</sup> base de données internationale de spoligotypes)
sSNPs	Synonymous single nucleotide polymorphism
ST	Share-type (type partagé)
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TB	Tuberculose
TCR	T-cell receptor (Récepteur des cellules T)
TGF	Tumor growth factor
Th	T helper (T auxiliaire)
THP-1	Human leukemic cell line (lignée cellulaire leucémique humaine)
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor necrosis factor
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VNTR	Variable Number of Tandem Repeat (Nombre variable de répétition en tandem)
WHO	World Health Organization (Organisation Mondiale de la Santé - OMS)
XDR-TB	Extensively Drug-Resistant Tuberculosis (Tuberculose à résistance étendue aux antibiotiques)

# Introduction

La tuberculose demeure un problème de santé publique mondial. Environ 2 millions de décès dus à la maladie sont recensés chaque année dans le monde. La plupart des cas de tuberculose est retrouvée dans les pays en voie de développement. Malgré l'existence d'un traitement efficace et d'un vaccin largement utilisé, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime que le tiers de la population mondiale est infecté par *M. tuberculosis* (*Mtb*), l'agent pathogène de la maladie. L'ampleur de la maladie est aujourd'hui aggravée par l'émergence de maladies touchant le système immunitaire de l'hôte comme le VIH-SIDA, ainsi que par l'apparition de souches bactériennes multi-résistantes aux antibiotiques utilisés pour contrôler la maladie. Les stratégies de lutte contre la tuberculose se sont de ce fait orientées vers l'amélioration des traitements, des moyens de diagnostic et la recherche de vaccins plus efficaces. Aujourd'hui, par exemple, de nouveaux candidats vaccins contre la tuberculose ont ainsi été développés et nombre d'entre eux sont en cours d'essais cliniques chez l'homme.

Chez l'homme, la réponse immunitaire contre la maladie peut être évaluée selon la production d'IFN $\gamma$  et/ou la prolifération des lymphocytes T chez les individus immunisés. Ces techniques sont notamment utilisées lors des essais cliniques vaccinaux. Il existe cependant une grande diversité génétique au sein des bactéries du complexe *M. tuberculosis*. Cette diversité génétique semble influencer sur les phénotypes bactériens et sur la présentation de la tuberculose. Par ailleurs, la réponse immune contre l'infection des bactéries du complexe *Mtb* (MTBC) semble varier selon le génotype de ces dernières.

Parmi les régions hypervariables du génome des MTBC, le locus DR permet la classification des souches en familles, en particulier par la technique de spoligotyping. Les lignées de souches générées par le spoligotyping semblent être associées aux localisations géographiques de ces bactéries. Ce locus *DR* appartient à la famille des séquences *CRISPR*. Les séquences *CRISPR* seraient étroitement associées aux transferts horizontaux de gènes. En effet, les séquences *CRISPR* auraient été façonnées par des épisodes de transferts horizontaux de matériel génétique. D'autres séquences d'ADN regroupées en îlots génomiques ont été récemment détectées chez quelques souches MTBC. Certains de ces îlots, dont le locus *DR*, sont spécifiques des bactéries MTBC et auraient été acquis par des transferts horizontaux à partir du matériel génétique d'autres organismes.

La compréhension des liens existants entre diversité bactérienne obtenue à partir de marqueur génétique, comme le locus *DR*, et les variations phénotypiques observées pourrait permettre d'affiner les stratégies de lutte contre la tuberculose, comme dans le choix de cibles potentiels pour les antituberculeux ou dans l'adaptation des stratégies

## Introduction

d'évaluation de l'efficacité des futurs vaccins selon la prévalence des souches dans les zones d'études.

Lors des travaux présentés dans cet ouvrage, la relation entre la diversité génétique des souches cliniques de *M. tuberculosis* et les caractères de virulence qui pourraient être associés à cette diversité est étudiée. Ainsi, les effets de la diversité de souches cliniques MTBC au niveau du locus DR sur la réponse immunitaire de l'hôte infecté, en particulier la réponse IFN $\gamma$ , seront d'abord traités dans ces travaux. Puis, les facteurs génétiques bactériens pouvant être liés à cette diversité génétique, en particulier les îlots génomiques spécifiques des MTBC seront étudiés en fonction de la lignée des souches générée par le spoligotyping.

La présentation de ces travaux sera précédée de généralités et d'une synthèse bibliographique sur les différentes composantes de la tuberculose. En particulier le complexe *M. tuberculosis*, la diversité génétique associée aux bactéries de ce complexe, les transferts horizontaux et l'immunité antituberculeuse seront successivement abordés avant de donner la problématique de l'étude.



# **Première partie: Généralités**

## **I. GENERALITES SUR LA TUBERCULOSE**

### **I.1. Historique de la tuberculose**

La tuberculose est une maladie infectieuse que l'être humain semble avoir côtoyé depuis des milliers d'années. En effet, les premières traces de la maladie chez l'homme ont été retrouvées chez des momies égyptiennes humaines, datant d'environ 5400 avant Jésus-Christ. Les ossements de ces momies présentent en effet des lésions et des déformations caractéristiques de la tuberculose osseuse plus connue comme étant la « maladie de Pott » (Crubezy et al. 1998). Avec le développement de la science, plusieurs milliers d'années plus tard, les études sur l'ADN isolé de ces momies égyptiennes confirmeront une infection bactérienne tuberculeuse (Zink et al. 2003).

Le caractère contagieux de la tuberculose n'a été décrit qu'en 1865 par Jean-Antoine Villemin. Et, ce n'est qu'en 1882 que l'agent pathogène responsable de la maladie, *Mycobacterium tuberculosis*, a été identifié et cultivé par Robert Koch qui a donné une origine bactériologique à la tuberculose. La bactérie porte aussi le nom de Bacille de Koch ou BK. Robert Koch a reçu le prix Nobel de Médecine et de Physiologie pour ses travaux (Sakula 1982).

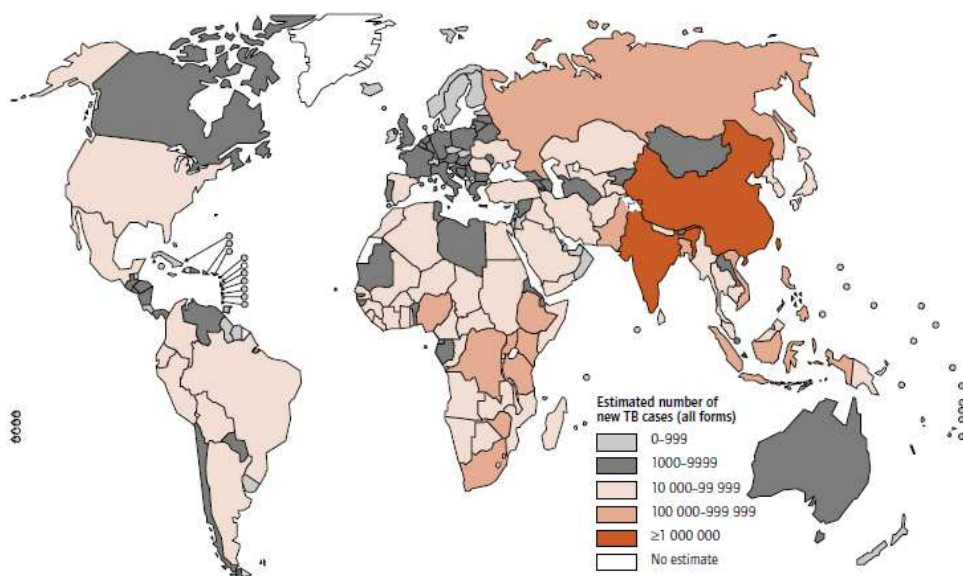
D'autres études montrent des traces d'ADN de bacilles tuberculeux sur des os d'une espèce éteinte de bisons vieille d'environ 17.000 ans de l'époque Pléistocène (Rothschild et al. 2001). Les bactéries de la tuberculose et d'autres mycobactéries affiliées seront regroupées dans le Complexe *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) qui peuvent être à l'origine de pathologies, touchant aussi bien les animaux que l'homme et qui auraient émergées il y a environ 3 millions d'années (Wirth et al. 2008).

### **I.2. Epidémiologie mondiale actuelle de la tuberculose**

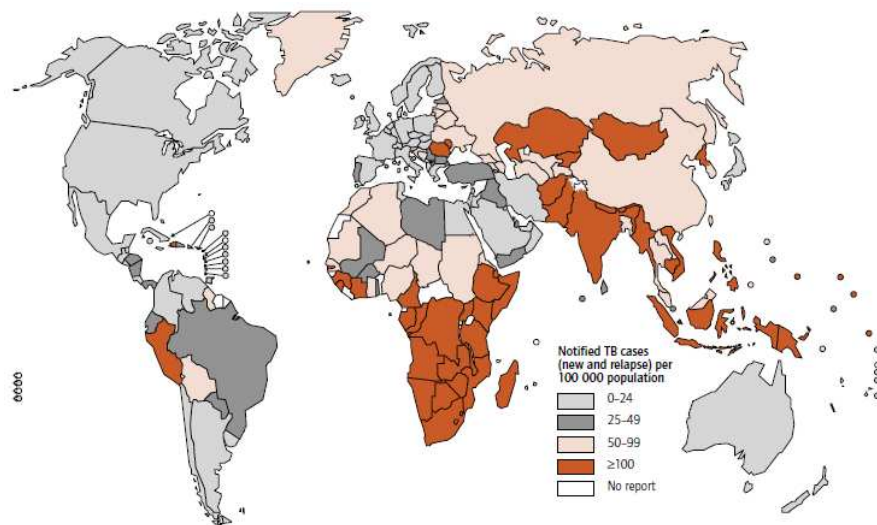
La tuberculose, dont l'agent pathogène est principalement *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), figure aujourd'hui aux premiers rangs mondiaux des infections d'origine bactérienne chez l'homme (Parry and Davies 1996). Environ le tiers de la population mondiale est infecté par la bactérie.

En 2007, d'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le nombre de nouveaux cas de tuberculose a été estimé à 9,27 millions d'individus dans le monde, soit 139 nouveaux cas pour 100.000 habitants. Le nombre de morts dus à la tuberculose dans le monde en 2007 est estimé à environ 1,8 millions d'individus. La tuberculose reste un problème de santé publique majeur dans les pays en développement où l'on recense chaque année plus de 90% des nouveaux cas dans le monde (WHO 2009). Toujours en 2007, 13 des pays avec le plus grand nombre de nouveaux cas de tuberculose sont des pays africains (Figure 1 et Figure 2). Plus de la moitié des cas recensés surviennent chez des sujets âgés de 15 à 49 ans, c'est-à-dire, les années les plus productives de la vie, causant de graves impacts socio-économiques pour les pays touchés. La tuberculose occupe, le 7<sup>ème</sup> rang mondial des causes de mortalité dans le monde avec environ 3 millions de décès par an et est responsable d'une morbidité importante (Raviglione 2003 , Dye 2006).

**Figure 1. Estimation du nombre de nouveaux cas de tuberculeux dans chaque pays dans le monde en 2007 (tiré du rapport de l'OMS 2009)**



**Figure 2. Taux estimé de l'incidence de la tuberculose par pays en 2007 (tiré du rapport de l'OMS 2009)**



### **I.3 La tuberculose à Madagascar**

A Madagascar, un Etat insulaire peuplé par environ 18 millions d'habitants, la tuberculose est une maladie endémique. On y compte 18.000 à 20.000 nouveaux cas de tuberculose recensés par an, avec un taux de mortalité des malades de la tuberculose estimé à 6% (Auregan et al. 1995). De l'autre côté, le taux de prévalence du VIH dans le pays est très faible, estimé à 0,14% en 2007.

Antananarivo, la capitale de Madagascar, est une mégapole de 1,1 millions d'habitants et une superficie de 90 km<sup>2</sup>. C'est la ville avec la plus grande densité de population dans toute l'île avec 8687 habitants/km<sup>2</sup>. L'incidence de la tuberculose pulmonaire dans la ville d'Antananarivo en 2004 serait la plus élevée de tout le pays avec 141 cas pour 100.000 personnes (données du Ministère de la Santé Malgache).

## II. LE COMPLEXE *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC)

### II.1. Systématique des bactéries MTBC

Les bactéries du complexe *M. tuberculosis* appartiennent à la classe des *Actinobactéries* (Tableau 1). Les Actinobactéries regroupent des bactéries Gram-positif possédant un taux en guanine plus cytosine (G+C %) élevé. Les MTBC ont la capacité de former des colonies en forme de champignons (mycoses) avec des filaments qui irradient par croissance centrifuge. Les bactéries ayant cette caractéristique sont regroupées dans l'ordre des Actinomycétales (signifiant « Champignons à rayons »). D'autre part, les MTBC sont classées parmi les bactéries du Sous-ordre des *Corynebacterineae*. Le sous-ordre des *Corynebacterineae* regroupe la plupart des bactéries acido-alcoolo résistantes (BAAR). La Famille des *Mycobacteriaceae*, possède un genre unique, le genre *Mycobacterium* regroupant les mycobactéries où l'on retrouve les bactéries MTBC (Ventura et al. 2007 pour revue).

**Tableau 1. Classification systématique des mycobactéries.**

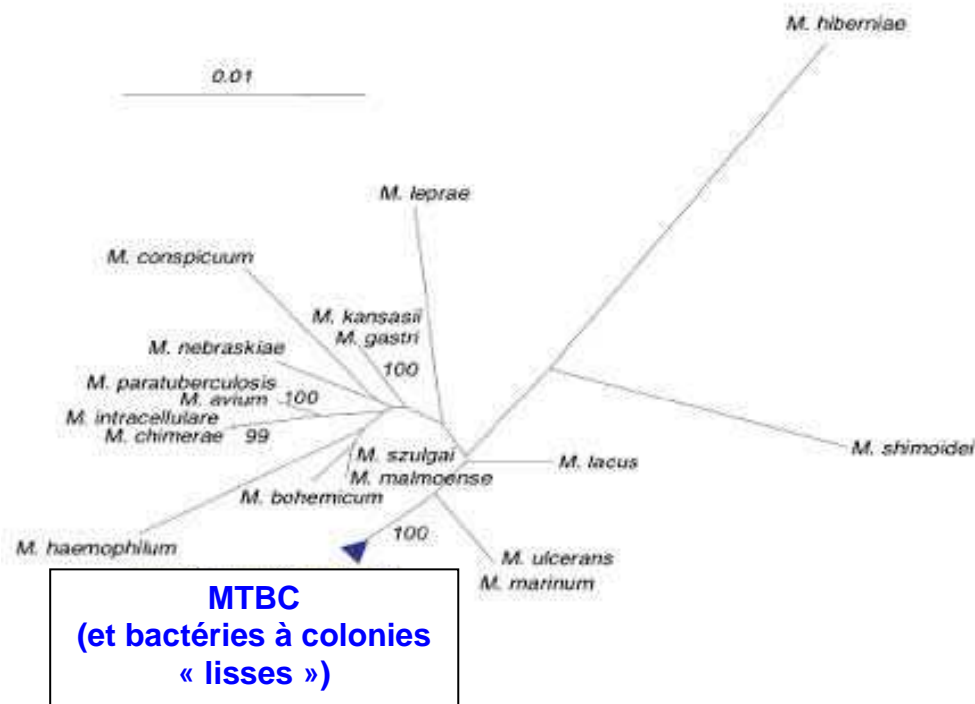
Règne	<i>Bacteria</i>
Embranchement	<i>Actinobacteria</i>
Ordre	<i>Actinomycétales</i>
Sous-Ordre	<i>Corynebacterineae</i>
Famille	<i>Mycobacteriaceae</i>
Genre	<i>Mycobacterium</i>
Complexe	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>

### **II.1.1. Le genre *Mycobacterium***

Les mycobactéries sont des bactéries aérobies et immobiles. Elles ont une longueur de 1 à 10µm et un diamètre 0,2 à 0,6 µm. Bien que la plupart des mycobactéries soient non sporulées, de récentes observations sur *Mycobacterium marinum* et *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) semblent indiquer un « état de sporulation » après une étape d'adaptation suite à un changement brutal des conditions du milieu environnant (Ghosh et al. 2009). Ces observations sont cependant remises en question par d'autres chercheurs qui n'ont pas observé d'endospores chez ces mycobactéries (Traag et al. 2010). Ce qui est admis, c'est que les mycobactéries sont caractérisées par i) une paroi bactérienne particulièrement épaisse. Cette paroi est hydrophobe et riche en acides gras  $\alpha$ -ramifiés et  $\beta$ -hydroxylés avec 60 à 90 atomes de carbones appelés acides mycoliques ou mycolates. Ces acides mycoliques sont à l'origine des formes mycéliennes observées chez les mycobactéries (Besra et al. 1994 , Leite et al. 2005). ii) la séquence des génomes avec un taux en G+C % élevé, allant de 61 à 71%.

Le genre *Mycobacterium* regroupe près d'une centaine d'espèces. Ces différentes espèces de mycobactéries sont classées en mycobactéries à croissance rapide ou à croissance lente selon les temps de génération sur milieu optimal (Tortoli 2003). Les colonies de mycobactéries à croissance rapide peuvent être visibles sur le milieu adéquat après quelques heures à 7 jours d'incubation. On y retrouve notamment des bactéries environnementales et des espèces saprophytes (Figure 3). Par contre, les mycobactéries à croissance lente poussent plus longtemps avant que les premières colonies ne soient nettement visibles. Ces mycobactéries à croissance lente sont souvent pathogènes, avec une étape intracellulaire obligatoire. Sur le plan phylogénétique, l'alignement de séquences de gènes codant pour l'ARNr 16S de mycobactéries (*rrnA* et *rrnB*) a permis de corréler l'apparition des mycobactéries à croissance lente à la délétion d'une portion du gène *rrnB* (Stahl and Urbance 1990 , Ji et al. 1994). En effet, il existe une corrélation entre le temps de croissance d'une bactérie et le nombre de ribosomes qu'elle produit. La production de ces ribosomes est elle même liée à la production d'ARNr dépendant du nombre d'opérons ARNr (*rrn*). Chez les bactéries à croissance rapide, deux opérons *rrn* (*rrnA* et *rrnB*) ont été observés alors qu'un seul opéron est observé chez les bactéries à croissance lente (Ji et al. 1994). Ces observations ont servi de bases génétiques à la phylogénie des mycobactéries (Devulder et al. 2005).

**Figure 3. Disposition phylogénétique des bacilles MTBC dans le genre *Mycobacterium* (adapté de Gutierrez et al. 2005).**



### II.1.2. Le Complexe *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC)

Les bactéries MTBC sont groupées dans les bactéries à croissance lente. On y retrouve notamment le genre *M. tuberculosis* qui a un temps de génération de 15 à 20 heures. Ce complexe regroupe 7 espèces : *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii* et *M. canettii*. Les espèces bactériennes retrouvées chez les MTBC sont toutes pathogènes ou potentiellement pathogènes pour l'homme et les animaux (Tortoli 2003). Certaines propriétés des bactéries du complexe sont dues à la concentration élevée en lipides dans leurs parois bactériennes. Ces propriétés concernent non seulement les caractéristiques tinctoriales qui leur sont associées (ce sont des bacilles acido-alcool résistants ou BAAR visibles par microscopie), mais permettent aussi la survie des bactéries dans leur environnement (résistance naturelle aux antibiotiques, résistance à la destruction par les macrophages,...) (Morris et al. 2005).

## **II.2. Caractéristiques du génome des bactéries MTBC**

### **II.2.1. Caractéristiques du génome de *M. tuberculosis* H37Rv**

L'une des avancées les plus notables en mycobactériologie fut le premier séquençage en 1998 par l'équipe menée par Stewart Cole du génome complet d'une souche virulente de laboratoire de *M. tuberculosis*, la souche H37Rv. La séquence de ce génome a ensuite été ré annotée en 2002 (Cole et al. 1998 , Camus et al. 2002). La disponibilité de cette séquence H37Rv, qui sert encore aujourd'hui de référence en mycobactériologie, permet de comprendre certains phénotypes de *M. tuberculosis*. La séquence de ce génome a aussi ouvert de nouveaux débats sur les différents caractères du pathogène, en particulier sur ses origines et son évolution. Les données relatives au génome de H37Rv sont disponibles sur la base de données en ligne de l'Institut Pasteur, <http://genolist.pasteur.fr/tuberculist>.

La souche H37Rv possède 4.411.532 nucléotides répartis en 3995 phases de lectures pouvant coder pour des protéines dont plus de 52% ont des fonctions potentiellement connues (Cole et al. 1998). Ce génome est aussi caractérisé par l'utilisation de Guanine-Thyrosine-Guanine (GTG) comme codon d'initiation dans plus de 35% des gènes. Par comparaison, ce taux d'utilisation de GTG comme codon d'initiation est de 9% chez *Escherichia Coli* et de 14% chez *Bacillus subtilis*. Le taux élevé en codon d'initiation GTG explique en partie le taux élevé du G+C chez les MTBC qui tourne autour de 65,5%. Bien que ce taux de G+C soit au premier abord uniforme sur tout le génome de la souche H37Rv, pour certaines régions particulières du génome, codant notamment pour des PE/PPE (voir page 21), ce taux de G+C peut passer à 80%. Ce taux G+C % est cependant inférieur à 50% pour d'autres régions codant pour des protéines transmembranaires ou des polykétides synthétases.

Unes des caractéristiques notables du génome de H37Rv est le nombre particulièrement élevé de gènes codant pour des protéines impliquées dans le métabolisme des acides gras. Le nombre élevé de ces gènes liés aux acides gras souligne l'importance des lipides dans le mode de vie pathogène des mycobactéries (Dubnau et al. 2005). Le génome de *M. tuberculosis* H37Rv est par ailleurs caractérisé par la présence de séquences nucléotidiques répétées comme les éléments d'insertion (IS ou « insertion séquences ») du type « IS6110» ainsi que les 32 séquences répétées de la famille des séquences nucléotidiques répétées REP13E12 décrites plus bas (Cole et al. 1998 , Gordon et al. 1999a).



### **II.2.2. Les séquences répétées du génome de *M. tuberculosis* H37Rv**

Les séquences nucléotidiques répétées du génome peuvent être à l'origine de la variabilité génétique et de l'identification des bactéries. Ces séquences nucléotidiques peuvent aussi affecter le phénotype, voire le mode de vie de ces organismes (Britten and Kohne 1968 , Eisenach et al. 1988). Certaines de ces séquences répétées sont retrouvées dans le génome de *M. tuberculosis* H37Rv aussi bien que dans les autres mycobactéries. Ces séquences nucléotidiques peuvent être répétées en tandem (exemple les PE\_PGRS et les MIRU), ou répétées en séquences entrecoupées (exemple des éléments mobiles comme les IS, les séquences REP13E12, les prophages ou les séquences CRISPR) (Cole et al. 1998 , Gordon et al. 1999a).

#### **a) Les IS6110**

Une des particularités du génome de H37Rv et celle de bon nombre de bactéries MTBC, est la présence d'IS. Les IS ou séquences d'insertion sont des séquences nucléotidiques, transposables, généralement inférieures à 2,5 kb, pouvant s'insérer dans de multiples sites du génome. Plusieurs familles d'IS sont retrouvées dans le génome de H37Rv et sont classées selon leurs caractéristiques.

Les IS6110 sont conservées et très répandues dans les bactéries MTBC. Le génome de H37Rv en possède un très grand nombre de copies (Cole et al. 1998). Les familles IS3, dont fait partie IS6110, sont des séquences nucléotidiques d'environ 1,5 kb à plus de 2 kb. Les IS6110 possèdent à leurs extrémités des séquences inversées associées à des répétitions de 3pb aidant probablement à leur transposition dans les différentes régions du génome (Figure 4) (McAdam et al. 1990 , Thierry et al. 1990a). Le génome de H37Rv possède 16 copies d'IS6110 réparties de manière inéquitable sur tout le génome. Des régions « hot-spot » d'intégration sont en effet observées. Ces régions « hot-spot d'intégration » sont retrouvées au niveau d'autres familles de séquences ou motifs répétés (les DR, cf pages 23, ou les PE/PPE en page 21 ) ou des gènes codant pour des antigènes potentiels (comme ceux de la phospholipase C). (Cole et al. 1998, Warren et al. 2000 ).

Le rôle biologique des IS6110, n'est pas clairement établi. Ces IS seraient à l'origine de recombinaisons génétiques et de délétions de certaines régions du génome (Figure 5). Les familles IS3 sont composées de deux à quatre phases de lecture. Certaines de ces phases de lecture codent pour des transposases qui sont probablement impliquées dans la génération et l'insertion de copies de l'IS dans le génome (McAdam et

al. 1990). La transposition des IS6110 ainsi que le nombre de copies dans le génome semble apporter un avantage sélectif aux mycobactéries. Des expérimentations sur *M. smegmatis*, un modèle mycobactérien, ont montré que la transposition d'IS6110 était stimulée par un environnement microaérobie (Ghanekar et al. 1999). Les transpositions d'IS6110 pourraient servir pour faire face aux conditions défavorables de l'environnement en participant à l'adaptation phénotypique des bactéries (McEvoy et al. 2007 pour revue).

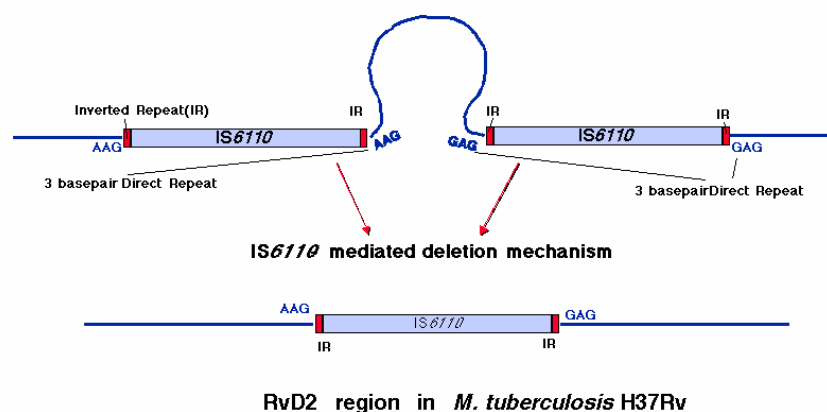
**Figure 4. Séquence complète d'une IS6110 avec les séquences inversées soulignées aux extrémités (Thierry et al. 1990a)**

```

DR INV.REP.
CGATGAACCG CCCCGGCATG TCCGGAGACT CCAGTTCCTG GAAAGGATGG GGTCATGTCA GGTGGTTCAT
CGAGGAGGTA CCCGCCGGAG CTGCGTGAGC GGGCGGTGCG GATGGTCGCA GAGATCCGCG GTCAGCACGA
TTCGGAGTGG GCAGCGATCA GTGAGGTCGC CCGTCTACTT GGTGTTGGCT GCGCGGAGAC GGTGCGTAAG
TGGGTGCGCC AGGCGCAGGT CGATGCCGGC GCACGGCCCG GGACCACGAC CGAAGAATCC GCTGAGCTGA
AGCGCTTAGC GGCGGGACAA CGCCGAATTG CGAAGGGCGA ACGCGATTTT AAAGACCGCG TCGGCTTTCT
TCGCGGCCGA GCTCGACCGG CCAGCACGCT AATTAACGGT TCATCGCCGA TCATCAGGCG CACCGCGAGG
GCCCCGATGG TTTGCGGTGG GGTGTCGAGT CGATCTGCAC ACAGCTGACC GAGCTGGGTG TGCCGATCGC
CCCATCGACC TACTACGACC ACATCAACCG GGAGCCCAGC CGCCGCGAGC TGCGCGATGG CGAACTCAAG
GAGCACATCA GCCGCGTCCA CGCCGCCAAC TACGGTGTTT ACGGTGCCCG CAAAGTGTGG CTAACCCCTGA
ACCGTCAGGG CATCGAGGTG GCCAGATGCA CCGTCGAACG GCTGATGACC AAACTCGGCC TGTCCGGGAC
CACCCGCGGC AAAGCCCGCA GGACCACGAT CGCTGATCCG GCCACAGCCC GTCCCGCCGA TCTCGTCCAG
CGCCGCTTCG GACCACCAGC ACCTAACCGG CTGTGGGTAG CAGACCTCAC CTATGTGTCTG ACCTGGGCAG
GGTTCGCCTA CGTGCCCTTT GTCACCGACG CCTACGCTCG CAGGATCCTG GGCTGGCGGG TCGCTTCCAC
GATGGCCACC TCCATGGTCC TCGACGCGAT CGAGCAAGCC ATCTGGACCC GCCAACAAGA AGGCGTACTC
GACCTGAAAG ACGTTATCCA CCATACGAT AGGGGATCTC AGTACACATC GATCCGGTTC AGCGAGCGGC
TCGCCGAGGC AGGCATCCAA CCGTCGGTCG GAGCGGTCGG AAGCTCCTAT GACAATGCAC TAGCCGAGAC
GATCAACGGC CTATACAAGA CCGAGCTGAT CAAACCCGGC AAGCCCTGGC GGTCCATCGA GGATGTCGAG
TTGGCCACCG CGCGCTGGGT CGACTGGTTC AACCATCGCC GCCTCTACCA GTACTGCGGC GACGTCCCGC
CGGTGCAACT CGAGGCTGCC TACTACGCTC AACGCCAGAG ACCAGCCGCC GGCTGAGGTC TCAGATCAGA
GAGTCTCCGG ACTCACCGGG GCGGTTCAAGA
INV.REP. DR

```

**Figure 5. Mécanisme de délétion médiée par IS6110 et montrant le rôle des régions inversées (IR). Exemple de la délétion de la région RvD2. (<http://www.pasteur.fr/recherche/unites/Pmi/IS-del2.gif>)**



### **b) Les motifs PE et PPE**

Les séquences nucléotidiques PE/PPE sont des régions du génome des mycobactéries qui codent pour des protéines acides particulièrement riches en Glycine et Alanine (Cole et al. 1998). Ces protéines sont caractérisées par la présence de motifs « Proline-Glutamine » (PE) ou « Proline-Proline-Glutamine » (PPE) au niveau de leur proximité N-terminale. Les régions PE/PPE représentent environ 10% des nucléotides du génome de H37Rv. Les gènes de ces séquences PE/PPE sont groupés en clusters et répartis en multiples copies polymorphes sur tout le génome. Dans le génome de H37Rv, une centaine de régions PE/PPE ont été identifiées. Celles-ci ont été classées en 3 sous-familles, selon la nature et la présence ou non de motifs répétés associés aux PE/PPE. La sous-famille la plus importante est celle des PGRS ou « polymorphic GC-rich sequences » particulièrement riche en G+C. Les régions PGRS sont organisées en microsatellites dont les motifs varient d'une souche de mycobactérie à une autre. La classe PE\_PGRS comporte 61 membres. Elle est caractérisée par des motifs Gly-Gly-Ala répétées en tandem, c'est-à-dire en unité monomérique associées aux PE ou aux PPE. Les PE\_PGRS sont retrouvées exclusivement dans les bactéries MTBC. Par ailleurs, les mycobactéries non pathogènes semblent en avoir moins comparées aux souches virulentes (Marri et al. 2006). Plusieurs protéines PE\_PGRS ont été retrouvées dans la paroi bactérienne. L'une d'entre elles, la PPE18, interagit avec le TLR2. Cette interaction PPE18/TLR2 induirait la synthèse d'IL10. Cette interleukine est connue pour inhiber la synthèse d'IFN $\gamma$  et d'IL12, qui jouent un rôle important dans l'établissement de la réponse protectrice Th1 contre la tuberculose (Cole 1999 , Brennan and Delogu 2002 , Nair et al. 2009). Même si la fonction de tous les gènes PE/PPE n'a pas été précisée à ce jour, il semble que ces derniers soient impliqués dans la persistance des mycobactéries et la pathogenèse de la tuberculose chez l'hôte (Camacho et al. 1999 , Talarico et al. 2005).

### **c) Les M.I.R.U.**

Les MIRU ou « mycobacterial interspersed repetitive units » sont des séquences nucléotidiques répétées en tandem caractérisant les bactéries MTBC et *M. leprae*. Les séquences des MIRU ont la structure des minisatellites et sont présentes sur différents loci dans le génome des mycobactéries. Les unités de séquences répétées font entre 46 pb et 101 pb et sont retrouvées principalement dans les régions intergéniques (Supply et al. 2000). Chez les mycobactéries, contrairement aux minisatellites des autres bactéries, les MIRU ne possèdent pas de séquences palindromiques. Dans le génome de H37Rv, on en retrouve 65 copies réparties dans 41 loci (Cole et al. 1998). Le rôle des MIRU est

encore inconnu. Cependant, il existe un polymorphisme dans la taille des séquences ou des motifs composants les MIRU. Ce polymorphisme est à la base du typage MIRU-VNTR (« Variable number of tandem repeats »). Le MIRU-VNTR est en plein essor dans le domaine du typage des bactéries MTBC.

### **d) La famille REP13E12**

Il s'agit de séquences répétées, de la famille des séquences entrecoupées ou «Interspersed sequences », de 1,3 kb à 1,5 kb. Leur dénomination vient des répétitions (REP) mises en évidence dans le cosmide MTCY13E12. On retrouve 7 types de répétitions REP13E12 dans le génome de la souche H37Rv. Les protéines REP13E12 n'ont aucune homologie de séquences avec des protéines connues. Ces REP13E12 semblent être uniquement observées dans les bactéries MTBC. Le rôle des REP13E12 semble encore assez flou. Leur expression serait induite en réponse à une altération de l'ADN. Dans le génome de H37Rv, 4 régions REP13E12 possèdent des sites d'insertion potentiels pour des groupes de gènes ressemblant à un prophage, le *PhiRv1* (Cole et al. 1998 , Gordon et al. 1999a, Bibb et al. 2005 ).

### **e) Les prophages *PhiRv1* et *PhiRv2***

Deux régions du génome de H37Rv correspondent à des prophages *PhiRv1* et *PhiRv2*. Ces prophages possèdent des organisations similaires avec des gènes phagiques adjacents situés dans le même loci (Cole et al. 1998). La présence ou la localisation des gènes de *PhiRv1* semble être assez variable d'une souche à une autre. Une étude comparative des régions de différences entre quelques mycobactéries a en effet montré que le prophage *PhiRv1* est absent dans 16% des souches cliniques étudiées. De même, la souche vaccinale *M. bovis* BCG en est exempt (Mahairas et al. 1996). Les gènes du prophage *PhiRv2*, eux semblent toujours être présents et sont assez stables.

Dans le génome de H37Rv, le prophage *PhiRv1* interrompt l'opéron biotine. Par ailleurs, on y retrouve aussi une recombinaise (*Rv1586c*) et une intégrase. La présence de gènes codant pour ces enzymes suggère la possibilité de recombinaison site spécifique de la part du prophage *PhiRv1*. Le prophage *PhiRv1* possède 7 sites d'attachements potentiels (*att*) dans le génome de H37Rv (Hendrix et al. 1999 , Bibb and Hatfull 2002, Bibb et al. 2005 ).

Le prophage *PhiRv1* est par ailleurs flanqué de séquences REP13E12. Il a été suggéré que l'opéron biotine de la souche H37Rv a d'abord été interrompu par des

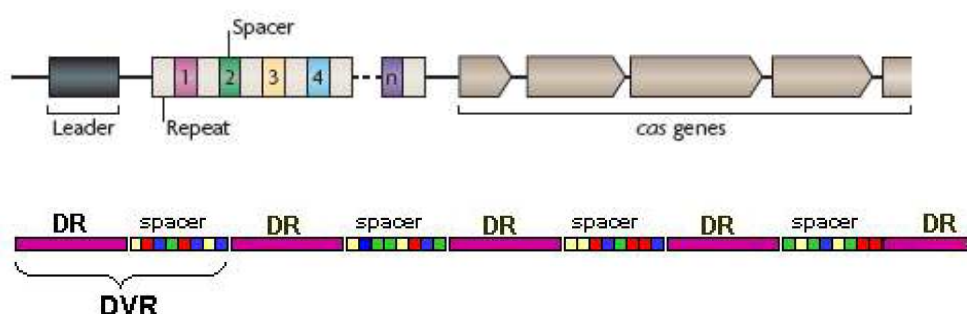
séquences REP13E12 suite à un stress. Cette séquence REP13E12 aurait ensuite servi de site d'insertion du prophage PhiRv1 dans le génome de H37Rv (Gordon et al. 1999a).

Le rôle biologique de ces prophages dans les bactéries MTBC n'est pas encore clairement établi. Leur présence semble cependant indiquer la contribution des transferts horizontaux dans la dynamique et la structure du génome des bactéries MTBC.

#### f) La famille CRISPR et le locus DR

Les séquences CRISPR ou « **C**lustered **R**egularly **I**nterspaced **S**hort **P**alindromic **R**epeats » ont été décrites et séquencées pour la première fois chez *Escherichia coli* par Ishino en 1987. La disponibilité de plus en plus de séquence de génome a ensuite permis à Mojica et ses collaborateurs de caractériser les CRISPR. Ce sont des séquences nucléotidiques caractérisées par une série de répétitions directes de séquences identiques de 24 à 48 pb. Ces séquences identiques répétées sont entrecoupées de courtes séquences uniques, variables, de 20 à 40 pb appelées « spacers » (Figure 6). Ces régions présentent souvent une certaine symétrie mais ne sont pas exactement palindromiques. Les CRISPR sont retrouvées aussi bien dans le génome des bactéries que chez les archéobactéries. Ces séquences sont par contre absentes chez les eucaryotes et les virus. Les séquences CRISPR ont été retrouvées dans environ 40% des génomes séquencés jusqu'en 2000 (Mojica et al. 2000). Les séquences répétées des CRISPR sont conservées au sein d'une même espèce (conservation intra-espèce) (Jansen et al. 2002). Cependant, ces séquences varient d'une espèce à l'autre (variation inter-espèces).

**Figure 6. Structures des séquences CRISPR (Marraffini et al. 2010)**



L'unique région CRISPR retrouvée chez *M. tuberculosis*, le locus DR, est très polymorphe d'une souche à une autre. Elle est utilisée pour typer les souches MTBC.

## Introduction

Celles-ci peuvent en effet être différenciées à partir de la présence ou l'absence de certains spacers par la technique du « spoligotyping » ou « spacer oligotyping » (Tableau 2) (Groenen et al. 1993 , Kamerbeek et al. 1997). La diversité retrouvée au sein des loci CRISPR dans différents génomes peut être utilisée pour l'identification des bactéries pathogènes (Grissa et al. 2007).

Des études *in silico* sur cette famille de séquence ont montré la présence de gènes appelés *cas* pour « C RISPR-associated » adjacents aux séquences CRISPR. On peut retrouver jusqu'à 20 copies de gènes *cas* selon les génomes (Jansen et al. 2002, Haft et al. 2005). Il semblerait que seuls 2 gènes *cas* soient associés aux séquences CRISPR de *M. tuberculosis* (H37Rv et CDC1551) (Godde and Bickerton 2006). Ces gènes *cas* ont des homologies avec des protéines impliquées dans la recombinaison et la réparation d'ADN.

Les CRISPR seraient impliqués dans le maintien de l'intégrité du génome bactérien. Ils auraient un rôle de protection des bactéries contre les infections d'ADN d'origine exogène en empêchant ces derniers de s'introduire dans le génome bactérien. De récentes découvertes ont en effet montré que les séquences des spacers composant les CRISPR correspondent à des portions d'éléments mobiles, comme des ADN de bactériophages ou de plasmides. Une fois incorporées dans le système CRISPR, ces séquences spacers vont aider à prévenir spécifiquement d'autres invasions par ces éléments exogènes (Figure 7) (Barrangou et al. 2007, Comas et al. 2009, van der Oost et al. 2009).

**Tableau 2. Les séquences connues de spacers dans les bactéries MTBC.** Les spacers utilisés pour le spoligotyping sont numérotés de 1 à 43 dans la seconde colonne (van Embden et al. 2000).

Spacer no.	Previous designation (ref.18)	Spacer sequence <sup>a</sup>	Spacer no.	Previous designation (ref.18)	Spacer sequence <sup>a</sup>
1		TTAAACCGTGTTCACCTCCAAACCGGAATCTTCGAC	48		GCGAGGAACCGTCCCACTTGGGCTGCTCCGCCAGCGG
2 <sup>b</sup>	1	CATAGAGGGTGGCGGCTCTGGATTCACGCTCCCTAGTCTGT	49		TCAAATAACACTTTTCTTGGAGCTGGCGGGTTGAGAGT
3 <sup>c</sup>	2	TTTTTGGCTCAATGCTTTGGCGACAGCTTTTGAACAA	50		ACGGAAACCGACCAACGCTTGACAACTCTATTCTCGC
4	3	TCCAAAGCGCGCTTCCAGTGTATGCGCTTCTA	51	37	ATTTTGACCGGAACCTCGTCCCACTGCCCTCTCAG
5		TCCGGCGCGCGATGGCAGCTCAGCGCTGGCTAAGG	52	38	CGCCGCTGGATGGCGGATGCGTTGTGCGGCAAGT
6		ATGGCGCGCTCGCGCTTAAATGCCCGACGGCGGT	53	39	CGACGATGGCGAGTAAATCGCGCTGGGTAAACGATCGG
7		ATTTGACGACAAATTCCTTGAACAGGAATTTTCAG	54		CCTCGCAGAAAAGGCCATGGATCATGAGAGTTGCGTTGAT
8		ACATCCCAACCGCTTACCGCTGGCGCGCATCATATCGA	55		AATGCTGGCGACGATTTTCGCTGTGTGGTCTCTATT
9		CCATATCGGGGACCGCGACCTGGAGAGGACACGGCGA	56 <sup>d</sup>		GCACACGACGACCTCCCTTGGACATCGGGACATCAGAC
10		TACACCAACGCGCTGGCGCATCAGTCAGGCTCTCTCTC	57		TGGCGGCTCTGCGCTAAGGTTGCTGACTTCGCGCTGA
11		TTGAACCGGAGCGGCGACATGCCGCTCGAGGGT	58		CGACGACGAGACGCGCATGACGAGCGCACGGATACGGCAG
12	4	AACACCTCAGTAGCCGTCATACCGCGACCAATCAGCAG	59		TTCCATGCCACTCGCGCGACACCGCGGACTTCGCGGA
13	5	TTTTCTGACCACTTTGTGCGGAGTACCGGGCTTAG	60		TGGTAAATGCGCTCAGCGCGCGCTGCGCGCGCGGAT
14	6	ACCAATGCGCTCGCATTTTCGCGCTTCAATTTTCGCGCT	61		ACCATCCGACGACGCTACCGGAATCGATGACAAAGCC
15	7	CTGAGGAGAGCGATCTACGCGCGCTGCGCTGCGCGCTG	62	40	TAGTAGCGCATCTGTGCTCTATACAGGTCGCTGCGCT
16		ACACGCTTAGGGATCGACATATCGCGCTGCGCTTTTGA	63	41	CTGACGCGACGAGAGCTTTCCGCGCTCTATATGAGTA
17		TGCTCTTGAACACGCGCATATCGCGCGCGCGAGCTCGCG	64	42	CCTCATGCTGGGACATGAGCGAGCGCGGACATATCGCG
18	8	CGCTGAACCGCGCGCGCGCGCTGCGCGCGCGCGCTAG	65	43	TGGACGCGAATCGACCGCGGCTGCGCGGATTCAGCA
19	9	ACTCGGAATCGCATGTCTGACAGCGGATTCGAT	66		GCATATCGCGCGCGCACACACACCGCTACTGCTCGCT
20	10	CGCGCAGCGTTCGACACCGCGCTATGTTGACTTCGCG	67		ACACCGCGGATGACAGCTATGCTCGGATGACATCGCGCA
21	11	CAGGTGAGCAACCGCGCGCGCAACCTGCGCGCGCGCTCG	68		TTGACCGCGCTTCCGCGCTGCTTTCGCGCGCTGCGGA
22	12	ATGGATATCTCTGCGCGCGCGCGCGGAGCTGTGCGAG	69		TTGAGGCTGTGTTGCACTTCGCTGAGCTGCTGCTATT
23	13	TTGCTGACCATCATTCGCGCATTCGCGCTGCGCTACGT	70		ATGCGCGCTGTGACGCGCGCGCGCGCGCGCGCGGAAA
24	14	TTGCGCGCAACCTTTGCGCTGATGCGGATGCTGCGCTCGG	71		TTGCTGATCTTCGATGACTTGAACCGCGCTTGAACGCGAT
25	15	CCTGAAATACCGCGCATGATTTTCGCGGA	72		GCGGTGCTCGATGCGCGCACTAGCGCGCGCGCACTCGG
26	16	ATTGCGACGAGTTCGCGCTCAGCGCTGTAATGCGCA	73		TGCGTCTGAGCGCGCATGAGTGAAGCGTAGAGCTCTGT
27	17	CGCGCAACAATTCGCGCGCGCGCGCGCGGATGACTCGG	74		CAACAGGCTTACGCGCTGAGGTCACGCGCTCAGAA
28	18	CGCATGAGCGCGCGCGGAGCTGCGGAG	75		ATGTGCGGATTCAGCGCTGATCAGCGGAAAGCGG
29	19	TGGATTCGCTAACTGCGCTTGGCGCTGATCTCGGT	76		TTGAGTAATTTGACGCGACCGCGGATTCAGCAACT
30	20	TGCATCGATTTCTTGCCTGCGCGCGGAGAGAGATCTC	77		CTTCAACGACGCTGATTTGGCGCATGTGGCTGGCTTTTCA
31	21	TGCTGACGATCGCGCGATGTGATGTGCGCAATCGTGA	78		AGCAGCATGAGCGGCTTGGCGCTGATTCGCGGTAAGAAA
32	22	TTGAGCTGTCTACCGCAGACCGCGGATTCAGCAAA	79		TGGATGCGCGCGCGCTTGGCGGATGCGGCGGCTGAGC
33	23	CGTCAGCTCAGCATCGCTGATGCGGCTGCGAGCTGCTCGT	80		TTGCGCTACATAGCGAGCTGCGCGCGGATGAGTGGG
34	24	CGAAGCTCAGCGCTGCTGCGGTGAGAGCTGCTGCTCGGA	81		CTTCGATGTGCGCGCGCGGCTTTCGCTAC
35	25	TGCGGAGCGGATCAGCGGACCGCGCGCGCTGCTCA	82		TGCGCGCGCTGCGCGGCTGCTTTCGCTGCGCTAAT
36	26	CCTCAGCACCACATCATCCGCGCGCTCAGCTCAGCAT	83		CCTTCCAGGAGGCTGCTGCGGCTTCTTATGCGCTACAG
37	27	CGTTCGACGCGGATTCGCTGATCTCTTCCGCGGAGG	84		TAGTTGAGCGCAAACTTTGGGACTGTGATGCAATTCAA
38	28	TGCGCGCGCGCTTGAAGATGACAAAGCAACGAAAG	85		GCTTGACAAATCGCGCTTTCGCGCGCGCTTTTCAGCGGAG
39	29	CAGCGAAATACAGCGCTCCACGACACGCGCAACGC	86		GTGTGTTTCAACGCGCTTTCAGTTTTCTTTCGCGCGG
40	30	CTTGAAGATGCGTTGCGCGCGCGCTTTTCAGGCT	87		ACTGCTTGTTCGCGCGCGCGCGCGCGCTTTCAGGCT
41	31	AGGTTGCGCTCAGACAGGCTTGGGCTGATCAAGTCTG	88		CATCCAGAGGTCGAAAGTGTGCTGCGGCTTTCGCTGAC
42	32	TTTATCACTCCGAGCAAAATAGGTAATCGCGCTGTTCAA	89		TTCTCGCGCGGATCTCGCTCATGACGAGCGCGCGG
43	33	TGACACCGACATGACCGCGCGGCGCGCTTTCAGCA	90		ATCAGCACAGCGCGGATCGGCTGCGTGGCGCGGATCTCAGA
44	34	CTTTCGAAAGTCACTTCGCGCGCACCGCTGAGAGCGCT	91		CAGAAAGGTAAGCTCGCGCGGATGCTGCGCGGCT
45		GCGGATGCTGGCGAAATTCGCGCTGCGGCTGAGTCAA	92		CATCGAACAGCGCGGCTGCGCGGAGCGCGCTGCTGCA
46	35	CTGATTCGCGAAAGTTCGCTGCGGCTGCGGCTTTCAGCT	93		TCTCGCTGATAGGTCAGGACCGCGGATTCAGCTCA
47	36	TGAAATCCAGCACCATGCGCGAGCTCGCGCATGCTCGCGAA	94		TCTGATGCTGGGCTTCTCGCGCTGCGCGGCTTTCGCTCT

<sup>a</sup> Bold sequences used for oligonucleotide probes in spoligotyping.

<sup>b</sup> The previously published sequence (18) contained a C at residue 17 erroneously.

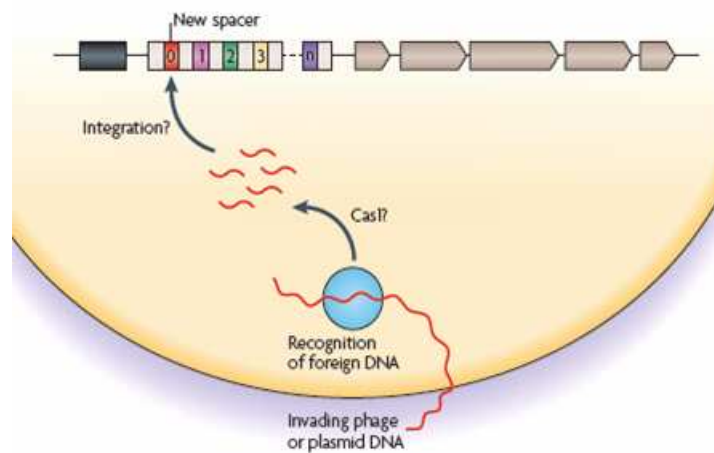
<sup>c</sup> The previously published sequence (18) contained two errors at residues 13 and 14 (both were A).

<sup>d</sup> This spacer is polymorphic: at position 21. Strain 1 is as shown, and strain 2 has a C at this position.

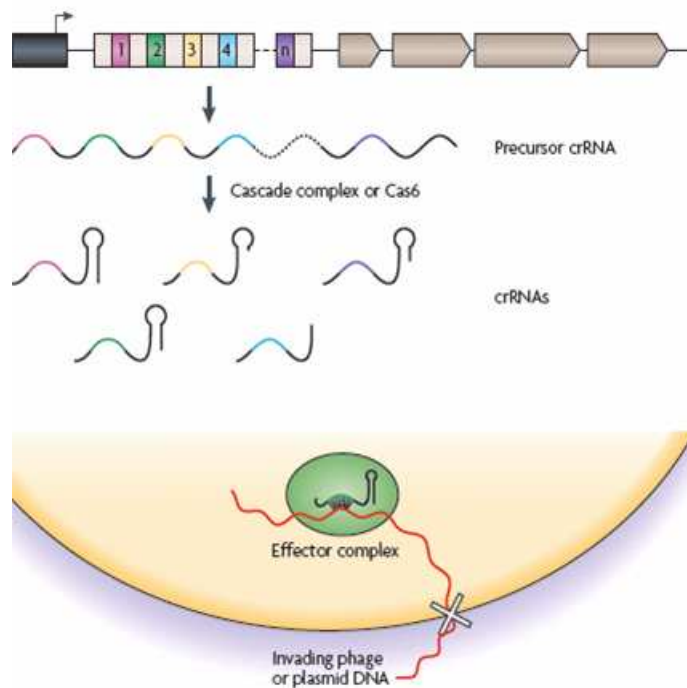


**Figure 7. Acquisition de spacers et fonctionnement du mécanisme d'interférence des CRISPR (Horvath et Barrangou 2010).**

A)



B)



**A.** Acquisition d'une nouvelle unité de spacer à partir d'ADN invasif. L'ADN d'origine exogène (plasmide ou phage) serait « découpé » et une partie des séquences est incorporée dans le CRISPR comme nouveau spacer. **B.** Mécanisme d'interférence par CRISPR à partir de spacers transcrits. En cas de ré-invasion par l'ADN exogène, les séquences de spacers correspondantes vont être transcrites en précurseurs crRNA, devenir matures (crRNA) et servir dans la reconnaissance spécifique de l'élément exogène et son élimination.



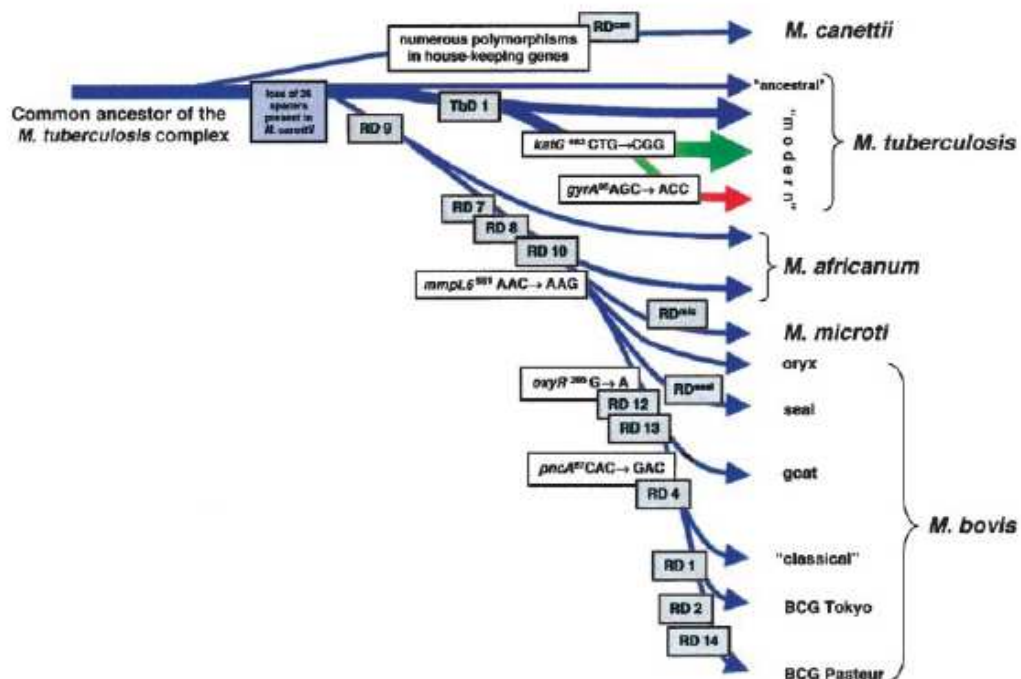
### **II.3. Epidémiologie Moléculaire et Evolution**

Les caractères génétiques des mycobactéries ont permis le développement de nombreux outils moléculaires qui servent à étudier aussi bien la phylogénie que l'épidémie des populations de mycobactéries.

#### **II.3.1. Utilisation des marqueurs génétiques dans le typage des MTBC**

Les marqueurs génétiques utilisés pour étudier les souches de *M. tuberculosis* proviennent pour la plupart des variations génétiques observées dans les différents génomes des souches bactériennes. Ces marqueurs génétiques peuvent être issus des réarrangement intra-génomiques ou de délétions de certaines régions du génome. Tels est le cas des séquences répétées, *IS6110*, *DR*, MIRU-VNTR, etc... Des changements mineurs ou des mutations localisés au niveau de certaines séquences du génome peuvent aussi être utilisés comme marqueurs génétiques (cas des SNPs) (Arber 2003). Enfin, des régions de différences (RD) correspondant à des séquences nucléotidiques de grande taille peuvent aussi être utilisées pour différencier les espèces et les souches, voire de retracer leur phylogénie (Figure 8) (Gordon et al. 1999b , Brosch et al. 2002).

**Figure 8. Représentation proposée du schéma évolutif des bacilles de la tuberculose, illustrant les pertes successives d'ADN dans certaines lignées de bactéries MTBC (Brosch et al. 2002).**



#### a) La IS6110-RFLP

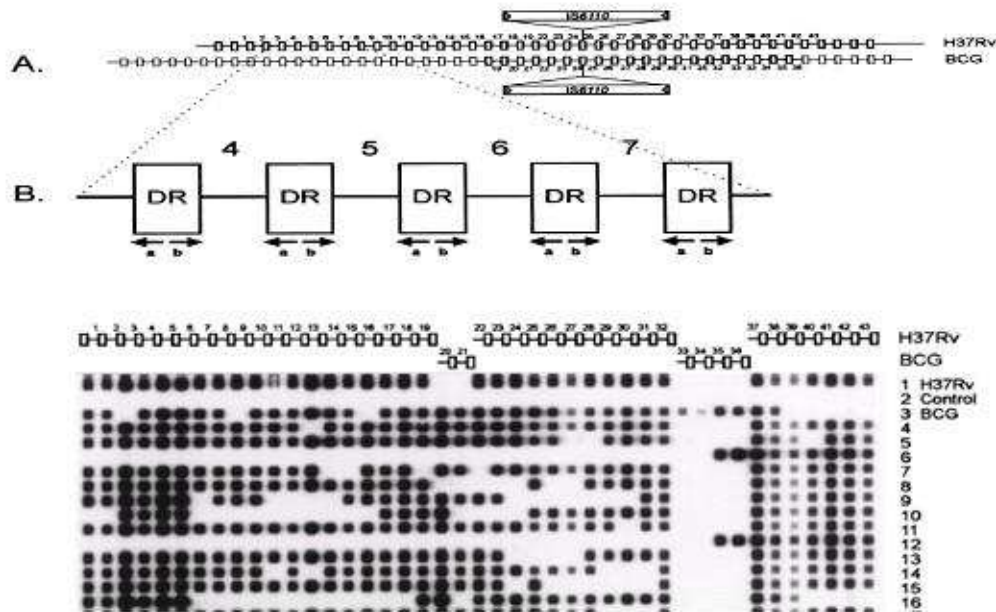
La RFLP (« restriction fragment length polymorphism ») est une méthode permettant de comparer les produits de digestion d'ADN par des enzymes de restriction. Le typage IS6110-RFLP permet de déterminer le nombre d'IS6110 présent au sein de chaque souche étudiée. La méthode est basée sur la digestion du génome par des enzymes de restriction. Puis, les produits de digestion sont hybridés avec des sondes IS6110 marquées. Le nombre de copies d'IS6110 varie d'une souche à une autre. Ce nombre peut aller jusqu'à 25 copies selon les génomes (Hermans et al. 1990, Thierry et al. 1990b, van Soolingen et al. 1993). La IS6110-RFLP est assez discriminante pour les études épidémiologiques. Elle est souvent utilisée comme technique de référence dans certaines études épidémiologiques sur le typage des souches MTBC (Otal et al. 1991, Kremer et al. 1999). Les premières utilisations de la technique IS6110-RFLP ont permis d'étudier la transmission des souches issues de patients atteints de tuberculose dans des agglomérations des Etats-Unis comme New York (Alland et al. 1994) ou San Francisco (Small et al. 1994).

Les profils *IS6110*, c'est-à-dire le nombre et la position de copies d' *IS6110*, d'une même souche peuvent cependant varier chez un même patient au cours du temps (de Boer et al. 2000). Ces variations temporelles dans une même souche font de l'*IS6110* un marqueur génétique avec un faible pouvoir discriminant pour l'étude de l'évolution moléculaire des souches. De plus, la *IS6110*-RFLP est une technique très laborieuse. Elle nécessite en effet une quantité élevée d'ADN, plusieurs jours de manipulation à la paillasse et des logiciels sophistiqués qui rendent les échanges de données entre laboratoires indépendants difficiles (Warren et al. 2001). Certaines souches avec un petit nombre de copies *IS6110* (<6 copies) sont assez difficiles à discerner les une des autres. D'autres techniques basées sur le polymorphisme d'autres séquences répétées comme les PGRS ou les DR doivent être utilisées pour discriminer ces souches (van Soolingen et al. 1993 , Chaves et al. 1996 , Yang et al. 2000 , Dale et al. 2003). Les *IS6110* semblent être uniquement retrouvées dans les bactéries MTBC. Cependant, des homologues de *IS6110* ont été retrouvés chez d'autres espèces de mycobactéries (Kent et al. 1995) et de récentes études semblent indiquer la présence d'IS (annoté ISMs6110) ayant de très grandes similarités avec *IS6110* chez une mycobactérie à croissance rapide, *Mycobacterium smegmatis*. Cet *IS6110* semble y avoir été acquis par transfert horizontal (Coros et al. 2008).

### **b) Le Spoligotyping ou spoligotyping**

Le « spoligotyping » (pour « spacers oligotyping ») permet de typer des souches MTBC en détectant la présence ou l'absence de 43 spacers localisés sur le locus DR (Figure 9). La méthode consiste à amplifier les spacers par PCR à partir des séquences DR flanquantes. L'amplification est faite avec des amorces (dont une généralement marquée à la biotine) spécifiques des DR flanquant les spacers. Les amplicons marqués sont ensuite hybridés à des oligonucléotides complémentaires des spacers immobilisés sur une membrane. La présence des amplicons de spacers est alors révélée par chimioluminescence. Le profil obtenu à partir des 43 spacers utilisés est appelé spoligotype (Groenen et al. 1993 , Kamerbeek et al. 1997 , van Embden et al. 2000).

**Figure 9. Obtention de spoligotypes à partir du locus DR.** A. Représentation schématique du locus DR avec les séquences entrecoupées de DR et la présence d'une *IS6110*. B. Sites d'amplification des régions DR avec les amorces Dra et DRb et profils spoligotypes obtenus à partir de l'hybridation de produits PCR marqués de différentes souches



La diversité des spoligotypes des différentes souches provenant de plusieurs pays a pu être collectée dans des bases de données (Sola et al. 1999). Ces bases de données peuvent être utilisées pour la phylogénie et surtout l'épidémiologie de souches MTBC. La présence ou l'absence de chacun des 43 spacers a été standardisée. Le spoligotype peut être exprimée de façon binaire ou octale selon la présence ou l'absence de chacun des 43 spacers utilisés. Cette standardisation facilite les comparaisons des profils spoligotypes et permet la construction des bases de données. Dans les bases de données de spoligotypes, les souches sont classées selon le profil spoligotype en « Shared Types » (ST). Les ST sont ensuite eux même regroupés en « familles » selon des paramètres géographiques et épidémiologiques (Dale et al. 2001, Sola et al. 2001). Les bases de données de spoligotypes ont permis de retracer la phylogéographie des souches MTBC dans plusieurs pays (Filliol et al. 2002, Filliol et al. 2003). Aujourd'hui, la quatrième base de données internationale de spoligotyping SpolDB4 (« Fourth International Spoligotyping Database ») regroupe des spoligotypes de 39.609 souches de *M. tuberculosis* provenant de 122 pays. Grâce à leurs spoligotypes, ces souches ont été classées en 62 familles et 1939 ST (Brudey et al. 2006). Cette base de données est accessible sur le site Internet de SITVIT ou « Spoligotype International Typing - VNTR International Typing » (<http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVITDemo/>).

Bien qu'étant moins discriminant que la méthode IS6110-RFLP, le spoligotyping est moins coûteux, plus simple à réaliser, avec des bases de données plus accessibles. Les bases de données spoligotypes permettent par ailleurs les échanges entre laboratoires indépendants (Mostowy et al. 2002 , Kwara et al. 2003 , Kremer et al. 2005 , Brudey et al. 2006). Cependant, la neutralité des CRISPRs comme marqueurs génétiques de l'évolution est aujourd'hui sujet à controverse. Les CRISPR auraient en effet un rôle dans la protection de l'intégrité du génome bactérien. La pression de sélection de l'hôte qui en résulterait pourrait alors être un biais dans les études phylogénétiques utilisant le spoligotyping (Hale et al. 2009).

### **c) Les typages MIRU-VNTR :**

Le typage VNTR ("Variable Number of Tandem Repeats typing ") est une méthode de génotypage reposant sur le polymorphisme du nombre de séquences répétées en tandem dans le génome (Frothingham and Meeker-O'Connell 1998). Le but du typage MIRU-VNTR est de connaître la taille de chaque locus MIRU. Pour cela, différents loci MIRU-VNTR du génome sont amplifiés par PCR à partir de leurs régions flanquantes non polymorphes. La taille des amplicons est relative au nombre de copies MIRU-VNTR. Ce nombre peut alors être déterminé par ce système (Supply et al. 2001, Kwara et al. 2003, Allix et al. 2004). La détermination de la taille des amplicons peut être faite par électrophorèse sur gel (Mazars et al. 2001), ou par chromatographie en phase liquide de haute performance non dénaturante (Evans et al. 2004). L'analyse du polymorphisme des VNTR peut se faire sur plusieurs loci. Cette technique est aussi appelée MLVA ou « Multiple Loci VNTR Analysis ».

Le polymorphisme de 12 de ces loci MIRU semble être suffisamment discriminant et assez stable d'une souche à une autre pour des études épidémiologiques et phylogénétiques (Mazars et al. 2001, Supply et al. 2001 , Savine et al. 2002, Hawkey et al. 2003 , Kwara et al. 2003 ). Ces 12 loci sont notamment utilisés pour le système de contrôle de la tuberculose aux Etats-Unis. Ces techniques doivent cependant être associées à d'autres typages (IS6110, spoligotyping) dans des cas où les études épidémiologiques ne permettent pas de classer ou de distinguer les souches (Cowan et al. 2005). D'autres loci MIRU peuvent être ajoutés aux 12 décrits pour affiner le pouvoir discriminant du typage. Plusieurs nombres différents de loci VNTR ont été suggérés pour améliorer le pouvoir discriminant de la méthode. Ce nombre varie de 8 à 48 loci selon les auteurs : 18 loci VNTR (Kremer et al. 2005 , Kam et al. 2006), 21 loci (Le Fleche et al. 2002), 48 loci (Smittipat et al. 2005) ainsi que d'autres loci testés séparément (Roring et al. 2002 , Surikova et al. 2005).

En 2006, dans un souci de standardisation de la méthode, 24 loci VNTR les plus optimisés ont été utilisés pour typer plus de 800 souches de bactéries MTBC. Supply et ses collaborateurs ont en déduit que l'utilisation de 15 loci les plus discriminants suffisent dans les études épidémiologiques utilisant les MIRU-VNTR (Supply et al. 2006). Le typage MIRU-VNTR est en train aujourd'hui de devenir la méthode de référence en épidémiologie moléculaire de la tuberculose. Cette technique remplace petit à petit le typage IS6110. Elle souffre cependant des mêmes inconvénients que le spoligotypage. Des événements de recombinaison peuvent avoir lieu au niveau des répétitions générant des profils similaires chez des souches très différentes.

### **d) Génomique Comparative: Les LSPs et SNPs**

#### *i. Les Régions de différences:*

Il s'agit de différences de séquences nucléotidiques de grande taille entre les différentes souches. La comparaison de génomes de mycobactéries a permis d'avancer dans la compréhension de l'évolution des mycobactéries. Elle a aussi permis de mieux comprendre les origines et la pathogénicité des espèces de mycobactéries.

Les premières comparaisons de génomes entiers ont été réalisées par l'analyse de profils de restrictions par électrophorèse sur gel à champs pulsé (PFGE pour « Pulsed Field Gel Electrophoresis »). Cette méthode a permis de dresser les premières cartes physiques et intégrées de *M. tuberculosis* (Philipp et al. 1996). Cette méthode a aussi permis la comparaison des cosmides de chromosomes artificiels bactériens ou BAC (« bacteria artificial chromosome hybridization »). Plus tard, ces cosmides ont servi pour le séquençage des génomes. La séparation des fragments de restriction sur champ pulsé a été utilisée pour différencier différentes souches vaccinales *M. bovis* BCG ainsi que des souches cliniques de *M. tuberculosis* (Zhang et al. 1995).

D'autres techniques, comme la soustraction génomique ont permis de comparer le génome de la souche vaccinale atténuée *M. bovis* BCG Pasteur à celui de la souche virulente *M. bovis* (Mahairas et al. 1996). Grâce à cette technique, l'absence de 3 régions de différences (RD1 à RD3) de *M. bovis* BCG a été observée. La région RD3 absente de la souche vaccinale correspond au prophage PhiRv1 qui est aussi absente dans 84% des souches MTBC étudiées. La région RD2 correspond à des séquences répétées dont la délétion ne semble cependant être observée que chez les souches vaccinales repiquées après l'année 1925 (Mahairas et al. 1996). La région RD1 est la seule région délétée des souches *M. bovis* BCG qui soit présente dans toutes les souches virulentes. Cette région RD1 est aussi présente dans d'autres bactéries MTBC (Brosch et al. 1999 , Warren et al.

2006). La région RD1 contient notamment les gènes codant pour l'ESAT-6 (« Early Secreted Antigenic Target 6 »). Cet antigène majeur de *M. tuberculosis* semble jouer un rôle important dans la pathogénicité de ces bactéries (Gordon et al. 1999b, Brodin et al. 2002, Brosch et al. 2002). En effet, grâce à des mutants par transposition sur la région RD1, il a été observé que l'ESAT-6 et le CFP-10 (dont le gène est aussi retrouvé dans la région RD1) permettaient la translocation des mycobactéries virulentes du phagolysosome vers le cytosol des cellules dendritiques infectées échappant ainsi au phagosome (van der Wel et al. 2007). L'hybridation des BACs issus de *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG sur le génome de H37Rv a par ailleurs permis de mettre en évidence d'autres régions de différences (Gordon et al. 1999b).

L'utilisation de puces à ADN (DNA microarrays) associée aux BACs a permis d'affiner la comparaison des génomes. Avec les puces à ADN, la comparaison de génome a pu s'étendre aux autres bactéries MTBC. Grâce à cette technologie, 16 régions de différence absentes de *M. bovis* BCG ont été observées chez *M. tuberculosis* H37Rv en plus de celles qui ont été trouvées par Mahairas et ses collaborateurs, en 1996. Neuf de ces 16 RD absentes de *M. bovis* BCG sont délétées dans d'autres souches pathogènes de *M. bovis*. Ces RD contribuent au polymorphisme des souches *M. bovis*. Par ailleurs, deux régions (RvD1 et RvD2) sont absentes du génome de H37Rv. Ces 2 régions sont cependant retrouvées dans les génomes des souches *M. bovis* BCG et *M. bovis* (Behr et al. 1999, Gordon et al. 1999b).

La comparaison de génome par hybridation d'ADN entre H37Rv et une souche avirulente *M. tuberculosis* H37Ra montre aussi des régions délétées dans la souche virulente (RvD3 à 5). Ces régions sont intactes dans la souche non virulente. Les délétions retrouvées dans le génome de la souche H37Rv se feraient à partir des séquences IS6110 qui se trouvent à proximité. La complémentation des souches H37Ra avec ces régions délétées ne rendent cependant pas les souches complémentées aussi virulentes que la souche H37Rv (Brosch et al. 1999).

### ii. La génomique Comparative *in silico* :

D'autres génomes de mycobactéries ont été entièrement séquencés ou le sont partiellement. Ces séquences (ou projet de séquençage) sont accessibles sur Internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/lproks.cgi?view=1>, ou <http://genome.tdb.org/annotation/genome/tbdb/GenomesIndex.html>).

Grâce au séquençage complet de ces génomes, des comparaisons *in silico* entre différents génomes de mycobactéries ont pu être réalisées. Parmi les génomes

séquencés figurent d'autres souches de *M. tuberculosis*, comme la souche clinique CDC1551, séquencée en 2002 (Fleischmann et al. 2002).

La comparaison *in silico* des séquences complètes des 2 génomes de *M. tuberculosis* (H37Rv et CDC1551) a mis en évidence plusieurs différences notables. Ainsi, de larges séquences nucléotidiques polymorphes, nommés les LSPs, correspondant à la fois aux RD et à des régions insérées, ont été observées entre les deux souches. Les autres variations concernent un ou plusieurs nucléotides dans un gène ou une région donnée du génome, les SNPs (« Single Nucleotide Polymorphisme »). Par comparaison avec le génome de H37Rv, 49 insertions de plus sont observées dans le génome de CDC1551. 35 de ces insertions sont retrouvées dans des gènes et affectent la phase de lecture de ces derniers. D'un autre côté, 37 insertions différentes sont observées dans le génome de H37Rv. Ces inserts sont absents du génome de CDC1551. De plus, la souche CDC1551 ne possède que quatre IS6110 dans son génome alors que dans celui de H37Rv, on en retrouve seize. Dans les 2 génomes, 45% des inserts sont retrouvés dans des séquences nucléotidiques correspondant à la famille PE/PPE. Par ailleurs, une autre différence est à noter entre les 2 souches pour le prophage PhiRv1. Ce prophage PhiRv1 est en effet retrouvé sur des brins d'ADN différents et dans des positions différentes (position 1779312 pour H37Rv et position sur le brin complémentaire 3870803 pour CDC1551). Dans les deux cas cependant, le prophage PhiRv1 est toujours associé à une séquence REP13E12. En plus de ces variations génomiques, les deux génomes présentent une différence de 1075 SNPs avec une répartition moyenne d'environ 1 SNP tous les 4 kb (Fleischmann et al. 2002, Hughes et al. 2002).

La comparaison entre le génome de la souche avirulente H37Ra ATCC25177 séquencée en 2008 et les deux souches virulentes *M. tuberculosis* (CDC1551 et H37Rv) révèle 74 insertions et délétions différentes entre le génome des souches. De plus, 76 SNPs ont été observés sur 32 gènes. Les SNPs non synonymes peuvent affecter entre autre les facteurs de transcription, la régulation des voies métaboliques ainsi que l'enveloppe cellulaire (Zheng et al. 2008). Le génome complet de *M. tuberculosis* H37Rv aligné avec celui de *M. bovis* AF2122/97 montre 99,5 % de similarité. *M. tuberculosis* possède 60 kb de nucléotides de plus dans son génome par rapport à *M. bovis*. Les différences entre les deux génomes consistent principalement en des délétions génomiques de RD ainsi que des SNPs. On y observe cependant une région spécifique de 2 kb environ, absente de *M. tuberculosis* mais présente chez *M. bovis* appelée région TbD1. Cette région TbD1 contient notamment deux gènes codant pour des protéines membranaires dont l'un, mmpL6, est tronqué tandis que l'autre, mmpS6 est totalement absent chez *M. bovis* (Brosch et al. 2002 , Garnier et al. 2003).



L'essor des techniques de séquençage en haut débit de gènes, des ARN ou des génomes contribuent aujourd'hui de manière non négligeable au développement de la génomique comparative et à la compréhension des processus biologiques, notamment chez les pathogènes (Gingeras et al. 1998 , Ansorge 2009 pour revue, Gilad et al. 2009 ). Jusqu'en Aout 2010, 144 projets de séquençage de génomes et de plasmides de mycobactéries ont été réalisés ou sont en cours de réalisation, dont 52 sont disponibles. Les séquences disponibles concernent les séquences de 20 génomes de souches *M. tuberculosis*, d'autres espèces MTBC, comme *M. bovis* AF2122/97 et les deux souches vaccinales *M. bovis* BCG Pasteur 1113P2 (Brosch et al. 2007) et *M. bovis* BCG Tokyo 172 (Seki et al. 2009). Deux séquences de génomes de souches de *M. leprae* sont aussi disponibles (Cole et al. 2001 , Monot et al. 2009). Des génomes d'autres mycobactéries comme *M. avium paratuberculosis* (Li et al. 2005), *M. intracellulare* ATCC 13950, *M. smegmatis* MC2 155, *M. marinum* (Stinear et al. 2008), *M. ulcerans* Agy99 (Stinear et al. 2007), *M. kansasii* ATCC 12478, *M. abscessus* (Ripoll et al. 2009) sont disponibles sur le site internet de genomes en ligne (<http://www.genomesonline.org/>).

Les études phylogénétiques basées sur les SNPs sont exposées à certains biais. Tel est le cas quand ces SNPs sont associés à des gènes de résistance aux antibiotiques ou sont soumis à une pression de sélection de l'hôte. Parfois, les SNPs sont sélectionnés à partir de génomes non représentatifs des *M. tuberculosis*. Par contre, l'évolution des LSPs n'est pas assez rapide pour retracer l'évolution des souches actuelles (Baker et al. 2004 , Filliol et al. 2006, Gutacker et al. 2006 ).

### **II.3.2. Evolution et phylogénie des souches MTBC :**

L'observation des différents génomes de bactéries MTBC a mis en évidence l'existence de variations génétiques entre les souches. Ces variations sont apparentées à des SNPs, des LSPs et des régions de différences. Ces marqueurs génétiques sont utilisés pour étudier l'épidémiologie des souches de la tuberculose. Ils servent surtout à typer les bactéries. Ces typages de souches permettent de retracer et de comprendre l'expansion, la pathogénicité et l'évolution des souches de *M. tuberculosis* (Fleischmann et al. 2002 , Gutacker et al. 2002 , Tsolaki et al. 2004 , Filliol et al. 2006). La majorité des espèces constituant le genre des mycobactéries sont des bactéries saprophytes non pathogènes. L'évolution de la plupart des bactéries MTBC vers un mode de vie pathogène contre les mammifères et les disparités au sein des bactéries du complexe suscitent encore de grandes interrogations.

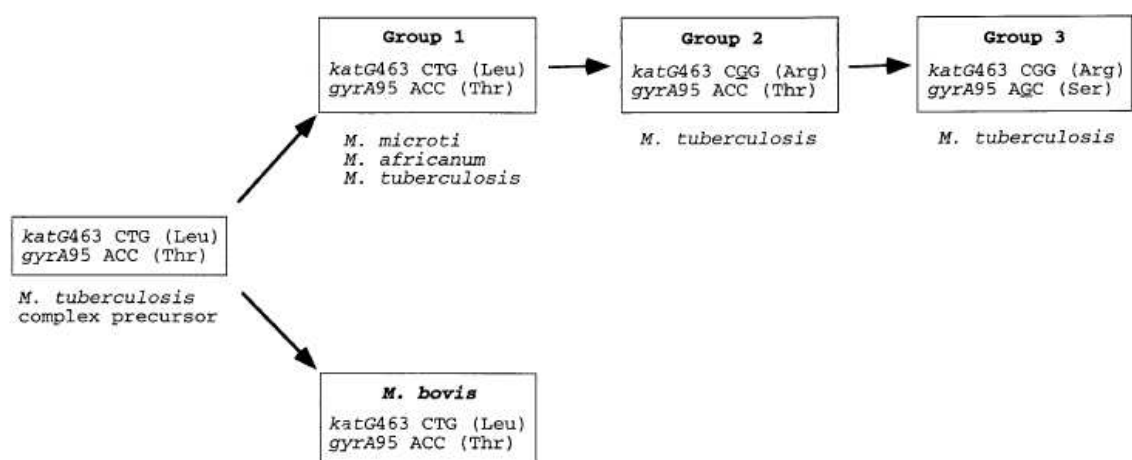
Les régions de différence (RD) ainsi que des SNPs sont utilisés comme marqueurs génétiques. Ils permettent de comprendre en partie l'évolution de ces bactéries MTBC. Grâce à l'étude de la distribution de 20 régions variables correspondant à des délétions et des insertions observées sur 100 bactéries appartenant à 6 sous-espèces différentes MTBC, Brosch et ses collaborateurs ont révélé un nouveau scénario de l'évolution des bactéries MTBC. Les différences observées entre souches de *M. tuberculosis* et *M. bovis* montrent que cette dernière serait apparue plus récemment dans le processus de l'évolution et dériverait de *M. tuberculosis* ou d'un ancêtre commun. Selon cette étude, la tuberculose humaine aurait donc précédé celle des bovins (Figure 8) (Brosch et al. 2002 , Garnier et al. 2003). Les polymorphismes observés au niveau des régions variables semblent irréversibles et permettent de retracer l'historique de l'évolution des souches. La présence ou l'absence de la région TbD1 permet de diviser les souches de *M. tuberculosis* en souches « anciennes » (celles où TbD1 est présente) et en souches « récentes » où la région TbD1 a été délétée. Par ailleurs, la délétion de la région RD9, antérieure à TbD1, marque la divergence entre *M. tuberculosis* et les espèces *M. africanum*, *M. microti* et *M. bovis* (Brosch et al. 2002). L'analyse de LSPs associée au séquençage de ces régions dans d'autres souches MTBC par d'autres laboratoires semble confirmer ce schéma évolutif (Mostowy et al. 2002).

L'étude de SNPs dans le codon 463 du gène de la catalase-péroxydase G (*katG*) et du codon 95 du gène *gyrA* (sous-unité A de l'ADN Gyrase) permet de dresser une relation phylogénétique entre plus de 840 bactéries MTBC provenant de plusieurs pays. Grâce à ces, SNPs les souches ont été classées en trois groupes principaux (Figure 10). La classification des souches à partir des variations des RD observées par Brosch et ses collaborateurs, en 2002 semblent corrélérer avec celle observée avec ces SNPs (Sreevatsan et al. 1997 , Brosch et al. 2002). L'augmentation du nombre de SNPs étudié par Gutacker et ses collaborateurs sur plus de 5000 souches de *M. tuberculosis* de 4 sites géographiques différents (principalement des Etats-Unis) a par la suite permis le classement des souches en 9 branches phylogénétiques majeures. Ces branches phylogénétiques semblent être associées aux spoligotypes, aux profils IS6110 et MIRU des souches. Une répartition clonale des souches a par ailleurs été observée (Gutacker et al. 2002).

Les branches phylogénétiques obtenues de l'analyse des SNPs ne sont cependant pas toujours les mêmes. Elles peuvent conduire à une estimation de la diversité génétique discordante des souches (Gingeras et al. 1998). Des études associant d'autres SNPs avec les marqueurs phylogénétiques (spoligotype et MIRU) font état de 7 groupes phylogénétiques distincts, incluant les souches *M. bovis* (Filliol et al. 2006). Un nombre

important de SNPs a par ailleurs été observé au niveau de gènes de réparation, de recombinaison et de réplication de l'ADN (gènes « 3R ») qui sont liés à l'évolution et la diversité des bactéries MTBC et qui permettent notamment de distinguer les souches monoclonales bactériennes (Dos Vultos et al. 2008). Les différents auteurs s'accordent cependant sur une certaine corrélation entre génotype des souches *M. tuberculosis* et l'origine géographique des populations humaines hôtes.

**Figure 10. Classification des souches MTBC selon les polymorphismes retrouvés sur les gènes *katG* et *gyrA95* (Sreevatsan et al. 1997)**

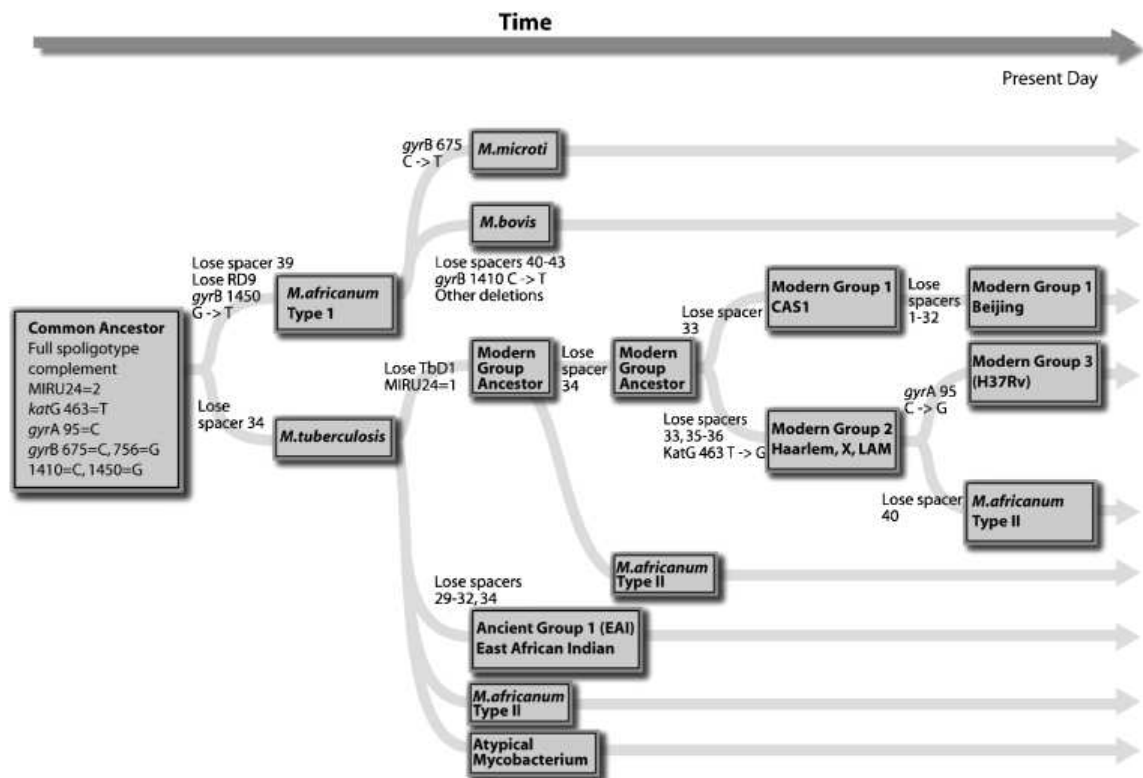


D'autres études confirment la corrélation entre le génotype des souches et les branches phylogénétiques observées. La phylogéographie des souches obtenue grâce à l'étude de LSPs indique que les grandes lignées clonales de *M. tuberculosis* sont spécifiquement associées aux sites géographiques des souches ou à l'origine des patients tuberculeux. En utilisant ces LSPs, Gagneux et ses collaborateurs ont classé les souches en lignée de l'Océan Indien, lignée Est-Asiatique, lignée Est-Africaine Indienne, lignée Euro-Américaine et lignée Ouest Africaine. Cette classification des souches semble concorder de manière plus précise avec les origines géographiques des patients tuberculeux (Gagneux et al. 2006).

### II.3.3. Les familles de souches de *M. tuberculosis* :

Aujourd'hui, l'épidémie globale de la tuberculose semble être structurée de manière phylogéographique. Après des milliers d'années d'évolution, certains clones de MTBC semblent en extinction alors que d'autres réemergent (Tanaka and Francis 2006). Grâce à l'association de plusieurs marqueurs génétiques, différentes familles ou lignées principales de souches *M. tuberculosis* ont émergé (Figure 11) et sont décrites succinctement ici.

**Figure 11. Représentation schématique des événements génétiques dans les MTBC à l'échelle du temps. Cette représentation a été obtenue à partir de la combinaison de spoligotype, MIRU-VNTR et SNPs au niveau de KatG et GyrA. (Arnold 2007).**



#### e) La Lignée EAI ou « East African- Indian »

Cette lignée de souches *M. tuberculosis* est caractérisée par un nombre très peu élevé d'IS6110. Elles ont 4 copies ou plus de VNTR- allèle ETR-A et un profil spoligotype caractéristique (Figure 12). Le profil spoligotype des souches EAI se présente avec

l'absence des spacers 29 à 32, la présence du spacer 33 et l'absence du spacer 34 (Filliol et al. 2003). L'étude des SNPs observés sur *katG* et *gyrA* placent les souches EAI dans le groupe génétique I de Sreevatsan (Sreevatsan et al. 1997). La présence de la région *TbD1* dans les souches EAI les placent dans la lignée des souches « anciennes » (Brosch et al. 2002, Arnold 2007). Les souches de la lignée EAI ont récemment été dénommées lignée de l'Océan Indien (« Indian Oceanic lineage ») par Gagneux et ses collaborateurs (Gagneux et al. 2006). L'étude de différents SNPs dans ces souches place respectivement la lignée EAI dans le SNPs Cluster Group 1 de Gutacker et dans le groupe I d'après la phylogénie issue des SNPs de Filliol (Filliol et al. 2006, Gutacker et al. 2006).

Bien que décrite pour la première fois au Burkina-Faso (Afrique de l'Ouest), les souches *M. tuberculosis* avec un profil de la lignée EAI sont principalement retrouvées dans tout le pourtour de l'Océan Indien. Elles sont plus fréquentes en Afrique de l'Est, en Inde du Sud et en Asie de Sud-Est. Cette distribution géographique des souches EAI laisse suggérer une transmission possible de la tuberculose par les migrations de populations de cette région (Kremer et al. 1999, Gagneux et al. 2006). Plusieurs variantes ou *share-type* (ST) du profil EAI existent. Ces variantes sont plus ou moins prévalentes selon les régions géographiques. Le profil ST19 assimilé aux EAI-2 semble très fréquent à Manille. Les souches EAI ST19 ont les spacers 3, 20 et 21 absents en plus du profil-spoligotype EAI (Douglas et al. 2003). A Madagascar, le profil EAI8 ST109 caractérisé par l'absence des spacers 2,3 et 18 en plus du profil type EAI semble très fréquent (Ferdinand et al. 2005) (<http://www.biomedcentral.com/1471-2180/6/23/figure/F1?highres=y>).

### **f) La Lignée Beijing**

La lignée Beijing a été caractérisée en 1995 à partir de souches de *M. tuberculosis* provenant de Chine, plus précisément de provinces aux alentours de la capitale Beijing, ainsi que de Mongolie. Le profil spoligotype des souches Beijing est très caractéristique avec la présence de seulement 9 des 43 spacers du côté 3' dans les profils spoligotype (Figure 12) (van Soolingen et al. 1995). A partir de l'étude des SNPs d'Ingrid Filliol ainsi que de Gutacker et leurs collaborateurs, les souches de la lignée Beijing sont respectivement classées dans le groupe des clusters SNP 2 et dans le groupe SNP-II. Sebastien Gagneux et ses collaborateurs placent ces souches Beijing dans la lignée dite « Est-Asiatique ». Les souches de la lignée Beijing sont par ailleurs caractérisées par une mutation G81A au niveau du gène *Rv3815c* qui code pour une acyltransférase (Filliol et al. 2006, Gagneux et al. 2006, Gutacker et al. 2006). Une large délétion de la région

RD105 est observée dans toutes les souches Beijing de la sous-famille W (Beijing/W family). L'utilisation d'autres LSPs complémentaires (RD142, RD150, et RD181) permet par la suite de subdiviser cette famille en 4 sous-groupes. Certains auteurs soupçonnent des différences phénotypiques entre ces différents sous-groupes de souches Beijing (Tsolaki et al. 2005).

De plus, une autre source de polymorphisme est unique à la lignée des souches Beijing : des mutations non synonymes au niveau de gènes codant pour des enzymes impliquées dans la réparation de l'ADN, comme les gènes *mutT* et les gènes *ogt*. Ces mutations semblent contribuer au polymorphisme des souches Beijing (Ebrahimi-Rad et al. 2003). Les RD et les mutations sur des gènes de réparation de l'ADN (ou gènes 3R) ont servi à retracer l'évolution des souches Beijing (Dos Vultos et al. 2008, Rindi et al. 2009 ).

Certaines souches de la famille Beijing ont la particularité d'induire une réponse cellulaire du type Th2, antagoniste de la réponse protectrice Th1 par comparaison à d'autres lignées de souches (Manca et al. 2004) et peuvent être associées à une virulence plus importante (Lopez et al. 2003). Les souches de la lignée Beijing peuvent parfois être associées à des échecs de traitement contre la tuberculose (van Crevel et al. 2001, Lopez et al. 2003 ). Des études rapportent des résistances aux traitements associées au génotype Beijing un peu partout dans le monde (Almeida et al. 2005 , Drobniewski et al. 2005, Glynn 2006 pour revue, Iwamoto et al. 2008 ). Les souches Beijing seraient originaires de l'Asie du Sud Est où la vaccination BCG de masse aurait été un facteur sélectif. Cette vaccination de masse au BCG aurait favorisé les caractères phénotypiques et génotypiques acquis par la famille Beijing (Glynn et al. 2002, Abebe and Bjune 2006 ). Les études épidémiologiques et moléculaires des souches Beijing montrent que, bien qu'elles soient plus prévalentes en Asie, ces souches sont répandues un peu partout dans le monde et ont la capacité de disséminer très rapidement (Glynn et al. 2002).

### **g) La Lignée Centre Asiatique ou CAS :**

Cette lignée de souches *M. tuberculosis*, quelquefois appelée lignée « Delhi », a été caractérisée par comparaison des profils de restriction RFLP-IS6110 et des spoligotypes de souches en Inde, du côté de Delhi, où sa prévalence semble particulièrement élevée (Bhanu et al. 2002 , Filliol et al. 2003). Les souches de la lignée CAS sont caractérisées par un profil spoligotype où les spacers 4 à 7 et 23 à 34 sont absents (Figure 12). Les profils spoligotypes et MIRU des souches CAS semblent être très proches de ceux des

souches Beijing (Sola et al. 2003). D'ailleurs, la lignée Beijing pourrait être issue de souches CAS (Arnold 2007). D'autres variantes de ce spoligotype peuvent être retrouvées. Le profil CAS1-Kili (Kili pour Kilimanjaro), avec 4 autres spacers en moins, a été caractérisé en Tanzanie où la lignée CAS semble être plus prévalente que les autres familles de *M. tuberculosis* (McHugh et al. 2005 , Eldholm et al. 2006). Les souches de cette lignée correspondent à la lignée Est-Africaine Indienne de Gagneux et ses collaborateurs et au principal groupe génétique 1 de Sreevatsan et ses collaborateurs (Sreevatsan et al. 1997, Gagneux and Small 2007 ).

Par ailleurs, les souches CAS sont caractérisées par un large polymorphisme au niveau de la RD750. Une mutation silencieuse a été retrouvée au niveau du gène *rpoB* (T2646G) des souches CAS. Le gène *rpoB* code pour une sous unité de l'ARN polymérase impliquée dans la résistance à la rifampicine (Baker et al. 2004, Gagneux et al. 2006 ). Les souches de la lignée CAS sont particulièrement plus prévalentes aussi bien en Inde (Bhanu et al. 2002) qu'au Pakistan (Hasan et al. 2006) ainsi qu'en Afrique de l'Est (Eldholm et al. 2006). Cette lignée semble être associée à des formes extrapulmonaires plus élevées de tuberculose (Lari et al. 2009). Des formes de résistance aux traitements antituberculeux plus importants sont observées au niveau de la lignée CAS, probablement à cause de l'existence de mutations spécifiques au sein des gènes impliqués dans ces résistances (Suresh et al. 2006 , Stavrum et al. 2009).

### ***h) Les Lignées Haarlem, LAM, T et X :***

Ces 4 lignées de souches *M. tuberculosis* sont classées parmi les souches de la lignée Euro-Américaine à partir de leurs LSPs (Gagneux et al. 2006). Elles ont en commun l'existence de 2 mutations caractéristiques : une mutation T/G au niveau du codon 388 du gène codant pour la catalase-péroxydase G (*katG*), et une autre mutation C/T au niveau du codon 3243 du gène *rpoB* (Sreevatsan et al. 1997 , Baker et al. 2004). En général, le spoligotype de ces familles est caractérisé par l'absence des spacers 33 à 36 (Soini et al. 2000).

Ces souches sont toutes caractérisées par l'existence d'une délétion de 7 paires de bases causant un déplacement de la phase de lecture du gène *Pks15/1* et son inactivation. Ce gène code pour une polykétide synthétase. Ces enzymes sont impliquées dans le métabolisme des glycolipides phénoliques (PGL) qui entrent dans la structure de la paroi bactérienne. Les variations au niveau du gène *Pks15/1* auraient des impacts sur le phénotype et la virulence des mycobactéries (Constant et al. 2002 , Reed et al. 2004 , Huet et al. 2009).

### ***i. La Lignée Haarlem :***

Les souches de la famille Haarlem ont été identifiées à partir d'une souche *M. tuberculosis* de patient provenant de Haarlem, en Hollande, en 1999 (Kremer et al. 1999). Le spoligotype de ces souches est caractérisé par l'absence du spacers 31 dont la détection est gênée par la présence d'une IS6110 (Groenen et al. 1993 , Legrand et al. 2001), en plus des spacers 33 à 36 (Figure 12) (Brudey et al. 2006). Par ailleurs, une mutation non synonyme au niveau du codon 182 (H182R) du gène *mgtC* est associée aux souches de la famille Haarlem. Ce gène code pour une protéine impliquée dans la virulence de plusieurs pathogènes intracellulaires (Alix et al. 2006). D'autres variantes de la famille Haarlem sont observées à partir du spoligotype. Ces variantes sont annotées Haarlem 1 à 4. Le variant Haarlem 2 (ou H2) est caractérisé par l'absence de tous les spacers 1 à 24 en plus de la signature spoligotype habituelle des souches de la famille Haarlem (Filliol et al. 2003).

De récentes observations sur des souches de la famille Haarlem montrent des associations du génotype Haarlem avec des SNP synonymes au niveau de gènes de réparation de l'ADN, dont *ogt44* et *ung501* (Olano et al. 2007). D'autres études montrent l'association de la famille Haarlem avec des multi-résistances aux traitements chez des enfants tuberculeux (Marais et al. 2006). Les souches de la famille Haarlem semblent être répandues un peu partout dans le monde, en particulier en Asie et sur le continent Européen (Kremer et al. 1999).

### ***ii. La lignée LAM ou Latino-Américaine Méditerranéenne :***

Les souches de la famille LAM ont un spoligotype caractérisé par l'absence des spacers 21 à 24 (Sola et al. 2001 , Brudey et al. 2006). Plusieurs variantes de la famille LAM existent. Désignées LAM01 à LAM12, les profils spoligotypes de ces variantes sont parfois très ambigus (Figure 12). Chez les souches LAM3/S, tous les spacers de 1 à 24 ont disparu. Cette disparition ferait probablement suite à une convergence du spoligotype de ces souches (Warren et al. 2002). D'autres variantes sont spécifiques de certains sites géographiques localisés. La signature spoligotype au niveau des spacers 21 à 24 n'est pas toujours respectée. Tel est le cas des souches LAM07-TUR de Turquie ou les LAM10-CAM. Chez les variants LAM11-SWE de Suède et LAM12-Madrid1 d'Espagne, on observe



des spacers en moins (Brudey et al. 2006). D'autres marqueurs génétiques sont souvent utilisés en plus des spoligotypes pour typer les souches de la famille LAM. Ainsi pour différencier les souches LAM, les typages de IS6110, les SNPs ou le typage VNTR sont utilisés. Le typage MIRU-VNTR des souches LAM montre un déséquilibre de liaison d'un allèle ETR-A égal à 2 pour les LAM en général (Sola et al. 2001). Dans les souches LAM-RUS de Russie centrale, une insertion spécifique d'IS6110 est observée dans le gène *plcA*, un des gènes codant pour la phospholipase-C qui est impliquée dans la virulence de *M. tuberculosis* (Raynaud et al. 2002, Dubiley et al. 2007, Raynaud, 2002 #317).

Récemment, une autre souche de la famille LAM appelée RD<sup>Rio</sup> a été décrite chez des souches du Brésil. Cette sous-famille RD<sup>Rio</sup> est caractérisée par l'existence d'une région de différence spécifique de 26 kb contenant des régions PPE. Les souches LAM RD<sup>Rio</sup> ont aussi une RD174 caractéristique associée à des sSNP au niveau du gène *Ag85C<sup>103</sup>*. Ce gène code pour un antigène immuno-dominant de la tuberculose. Cette mutation semble être spécifique des souches LAM (Lazzarini et al. 2007, Gibson et al. 2008, Von Groll et al. 2009). Au regard des gènes *katG* et *gyrA*, les souches de la famille LAM appartiennent au PGG 2 et au cluster phylogénétique VI de Gutacker *et al.*, (Sreevatsan et al. 1997, Gutacker et al. 2006).

Les souches de la famille LAM semblent avoir une prévalence élevée dans le pourtour méditerranéen et en Amérique Latine. Cependant, elles sont retrouvées un peu partout dans le monde. On estime aujourd'hui que les souches *M. tuberculosis* de la famille LAM sont à l'origine des 15% des cas de tuberculose dans le monde. Une étude menée en Russie en 2006 rapporte un nombre élevé de résistance au traitement anti-tuberculeux associé aux souches LAM (Ignatova et al. 2006).

### **iii. La Lignée X**

Les souches de *M. tuberculosis* de la famille X ont un spoligotype caractérisé par l'absence des spacers 33 à 36 associées à l'absence du spacer 18. Des variants de la famille X sont numérotées de X1 à X3 selon les spacers absents en plus de la signature type de la famille (Torrea et al. 1995, Sola et al. 1999, Brudey et al. 2006). Les études associant le typage des IS6110 et des DR montrent que les souches de la famille X sont aussi caractérisées par un nombre de copies très faible d'IS6110 (Soini et al. 2000, Sebban et al. 2002, Dale et al. 2003). La souche CDC1551 séquencée en 2002 possède les caractéristiques de la famille X (Fleischmann et al. 2002).

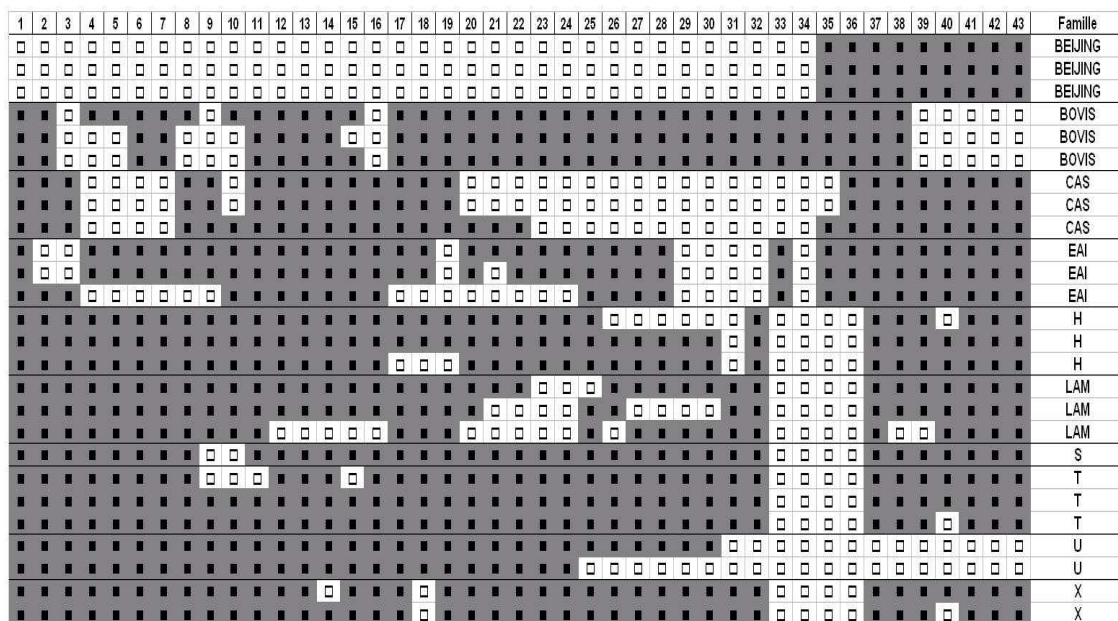
Les souches de la lignée X ont une prévalence assez élevée en Europe, principalement dans certains pays anglo-saxons (Sebban et al. 2002 , Dale et al. 2003). Une étude récente sur des souches *M. tuberculosis* des Caraïbes semble indiquer que la souche responsable de plus de la moitié des cas de tuberculose dans les îles de Trinidad et Tobago possède les caractéristiques d'une souche récente de la famille X1. Cette souche y aurait sévi avec les immigrants d'origine anglo-saxonne dans ces îles (Millet et al. 2009). Une autre étude menée en Afrique du Sud semble aussi indiquer que le taux de souches résistantes au traitement anti-tuberculeux des souches de la famille X avoisine celle des souches Beijing (Streicher et al. 2004).

### **iv. La Lignée T**

Cette branche de souches *M. tuberculosis* regroupe des familles ou des profils génotypiques encore mal définis. Le spoligotype de ces souches est juste caractérisé par l'absence des spacers 33 à 36. De plus, sont inclus dans cette lignée les souches avec au moins un des spacers de 1 à 30 présent, ainsi que la présence des spacers 9, 10 et 31 (Figure 12).

Plus de 600 profils spoligotypes non définis sont classés dans cette lignée (Sebban et al. 2002 , Brudey et al. 2006). On y retrouve différents variants (T1 à T5) dont les spoligotypes sont parfois très différents. La souche H37Rv est classée dans la lignée T. D'autres variants ont donné une sous-famille distincte, la lignée S, décrite sur des souches provenant de Sicile et de Sardaigne et qui sont parfois englobées dans la lignée des souches T (Brudey et al. 2006). Cette ambiguïté et le grand nombre de sous-familles retrouvés chez la lignée T sont probablement la raison pour laquelle les souches classées dans la lignée T sont prédominantes dans plusieurs pays. Elle est particulièrement présente en Europe comme en Suède (Brudey et al. 2004), ou en Toscane en Italie (Lari et al. 2007). Cependant des profils spoligotypes sont retrouvés plus souvent que d'autres dans des régions spécifiques dans le monde. Les souches T1 ont des prévalences élevées en Turquie et au Norvège (Kinander et al. 2009, Otlu et al. 2009 ). Une étude récente montre par ailleurs que la majorité des souches INH résistantes en Pologne ont le profil des lignées T et Haarlem (Augustynowicz-Kopec et al. 2008).

**Figure 12. Les grandes familles de profils spoligotypes avec certaines de leurs variantes.** Les numéros des spacers sont donnés. Les cases blanches représentent les spacers absents, les noires les spacers présents



### III. TRANSFERT HORIZONTAL DE MATERIEL GENETIQUE CHEZ LES BACTERIES

### III.1. Les Transferts horizontaux

Afin de s'adapter à un environnement donné ou d'explorer d'autres niches écologiques, beaucoup d'organismes vivants, sont capables d'adapter leur mode de vie à celui de leur environnement. Cette adaptation passe généralement par une modification de leur expression génétique, voire de leur génome. L'accumulation des seules mutations ponctuelles n'est en effet pas suffisante pour permettre à une bactérie d'exploiter de nouveaux environnements. Les microorganismes ont développé des mécanismes leur permettant d'acquérir directement et de manière plus rapide des gènes ou de nouveaux caractères à partir d'autres organismes. L'ensemble de ces phénomènes d'acquisition d'ADN d'un génome à un autre est appelé transfert horizontal ou HGT (« Horizontal Gene Transfer ») (Ochman et al. 2000 , Dobrindt et al. 2003). Ces transferts passent soit par

des transferts directs d'ADN par « contact » ou conjugaison à partir de plasmides, soit par capture de l'ADN du milieu environnant ou transformation, soit par l'intermédiaire des bactériophages infectant les microorganismes par transduction (Frost et al. 2005). Ces transferts horizontaux de matériels génétiques sont impliqués dans l'évolution des bactéries. Ils peuvent conduire au basculement vers un mode de vie pathogène. Les HGT permettent aux bactéries d'acquérir des gènes qui ont bénéficiés aux organismes préexistants dans le milieu les possédant déjà (Ochman et al. 2000).

La disponibilité de plus de séquences de génomes de microorganismes pathogènes ou non pathogènes a permis de suivre l'évolution de ces microorganismes. L'acquisition de nouvelles fonctions, dont ceux pouvant induire la pathogénicité, par les transferts horizontaux de gènes a pu être mieux étudiée. Dans l'ensemble, les gènes acquis par HGT concernent 3 principaux caractères qui sont :

*La résistance aux antibiotiques.* Chez les bactéries, l'acquisition de gènes de résistance aux antibiotiques est souvent associée aux éléments mobiles ou aux éléments transférables comme les plasmides, les transposons ou les intégrons (Hacker et al. 2003 , Hawkey and Jones 2009). Un groupe de gènes de résistance aux antibiotiques, la *ICEHin1056* a été séquencée chez *Haemophilus influenzae*. Ces groupes de gènes semblent avoir été transférés d'une bactérie à une autre par HGT et sont retrouvés chez un grand nombre de protobactéries (Mohd-Zain et al. 2004). Les gènes de résistance aux antibiotiques  $\beta$ -lactames ou  $\beta$ -lactamines sont souvent acquis par conjugaison à partir de plasmides portant des gènes de la  $\beta$ -lactamase, une enzyme capable de métaboliser l'antibiotique (Hawkey and Jones 2009). Par ailleurs, des transposons responsables de la résistance à la vancomycine sont retrouvées identiques chez des entérocoques résistantes à l'antibiotique (Paulsen et al. 2003). D'autres gènes de résistance peuvent se transmettre par des super-intégrons. Ces super-intégrons sont capables de s'exprimer de façon autonome. Ils ont permis aux entérobactéries Gram-négatifs de capturer et d'intégrer les gènes de résistances aux antibiotiques (Rowe-Magnus et al. 2003).

*La pathogénicité.* Les premières observations de l'acquisition de caractères virulents par HGT concernent le transfert de caractères pathogènes par les plasmides et les bactériophages. Ces transferts ont permis aux bactéries réceptrices de pouvoir coloniser de nouvelles niches écologiques et de causer des dommages à l'hôte infecté (Smith and Linggood 1971 , Brussow et al. 2004). Chez les microorganismes pathogènes, le groupe de gènes de virulence est souvent retrouvé associé à des éléments mobiles ou qui ont été mobiles. Ce groupe de gènes est appelé îlots de pathogénicité ou PAI (« Pathogenicity Islands »). Les PAI sont des blocks de gènes de 10 à 200 kb présents

chez les souches pathogènes et absents des souches affiliées non pathogènes (Hacker and Kaper 2000, Schmidt and Hensel 2004). L'usage des codons de ces îlots ainsi que leur taux en G+C sont souvent atypiques par rapport au reste du génome les hébergeant. Ces caractéristiques atypiques suggèrent qu'ils proviennent d'un autre organisme et permettent de déduire une acquisition par un transfert horizontal. Souvent, un ou plusieurs PAI peuvent être retrouvés en même temps dans le génome d'une bactérie pathogène. Ce phénomène suggère que le transfert des îlots de pathogénicité se sont fait en block, avec une possible synergie entre les différents gènes acquis (Groisman and Ochman 1996 , Ochman et al. 2000 , Ho et al. 2002).

*Les propriétés métaboliques permettant de s'adapter à un environnement particulier (« fitness traits »).* Les transferts horizontaux peuvent aussi conférer des propriétés physiologiques nouvelles aux organismes récepteurs. Il peut s'agir des voies métaboliques permettant aux bactéries réceptrices de s'adapter à un environnement particulier ou d'assurer leur survie face à un environnement hostile. Ces caractères sont retrouvés aussi bien chez les bactéries commensales que chez les pathogènes (Ochman et al. 2000). Ainsi, les « îlots de haute pathogénicité » retrouvés chez des souches virulentes de *Yersinia* sont aussi observés dans des souches non pathogènes d'entérobactéries. D'autres îlots sont à la fois retrouvés sur les souches pathogènes et commensales d'*Escherichia coli* (Dobrindt et al. 2003, Oelschlaeger et al. 2003 ). Ces îlots de gènes y jouent plus un rôle dans l'adaptation et la conquête du milieu où évoluent les bactéries, que dans la virulence. Les autres caractères apportés peuvent permettre la symbiose, la synthèse de sidérophore ou de composés aromatiques là où ils sont nécessaires (Larbig et al. 2002, Sullivan et al. 2002 , Gaillard et al. 2006 ). La pérennité des gènes acquis sera sous le contrôle de la sélection naturelle. S'il s'avère que ces gènes sont inutiles ou insignifiants pour la bactérie réceptrice, ces caractères seront « abandonnés » et, souvent, les gènes sont délétés (Ochman et al. 2000).

### **III.2. Les îlots génomiques (GEI ou « Genomic Islands »)**

#### **III.2.1. Caractéristiques des îlots génomiques**

Les îlots génomiques définissent les blocks de gènes acquis par HGT et comprennent aussi bien les PAI, les îlots de résistance aux antibiotiques que les îlots d'« adaptation ». La présence ou l'absence de ces GEI diffèrent entre des souches

bactériennes proches. Des traces de mobilité ou des éléments mobiles sont souvent observables dans ces îlots génomiques (Dobrindt et al. 2004 , Juhas et al. 2009).

Les caractéristiques atypiques communes à la plupart des îlots génomiques peuvent permettre de les identifier. La taille des GEI varie beaucoup, allant de 10 à 200 kb. Cependant, des îlots inférieurs à 10 kb, pouvant aller jusqu'à quelques centaines de bases ont été détectés grâce à la génomique comparative de génomes (Hacker and Kaper 2000 , Becq et al. 2007). Par ailleurs, comme la plupart des GEI ont été acquis par HGT à partir d'autres organismes, leurs séquences nucléotidiques ont souvent des traits atypiques par rapport au reste du génome. Les analyses statistiques des nucléotides appuyées par des outils bioinformatiques permettent de retrouver ces traits atypiques. Ces méthodes utilisent le taux en G+C, la fréquence de tétranucléotides ou l'usage des codons. Ces caractères diffèrent généralement du reste du génome. Les caractéristiques atypiques des GEI permettent parfois de retracer leurs origines par comparaison avec les caractères des génomes connus (Dufraigne et al. 2005 , Rosas-Magallanes et al. 2006 , Becq et al. 2007). Les GEI sont souvent insérés à côté de gènes codant pour les ARNt ou flanqués par des DR de 16 à 20 pb qui pourraient servir de site de reconnaissance pour certains enzymes et pourraient être impliquées dans l'insertion des GEI (Schmidt et Hensel 2004). La plupart des GEI porte des éléments mobiles ou des gènes codant pour des intégrases, des phages ou d'autres gènes impliqués dans l'acquisition de gènes par HGT. Certains gènes des GEI peuvent être apportés ou délétés par des éléments mobiles, comme les éléments d'insertion (IS), ou les transposases qui sont aussi retrouvés dans les GEI (Buchrieser et al. 1998 , Gal-Mor and Finlay 2006).

### **III.2.2. Détections de régions potentiellement acquises par transferts horizontaux**

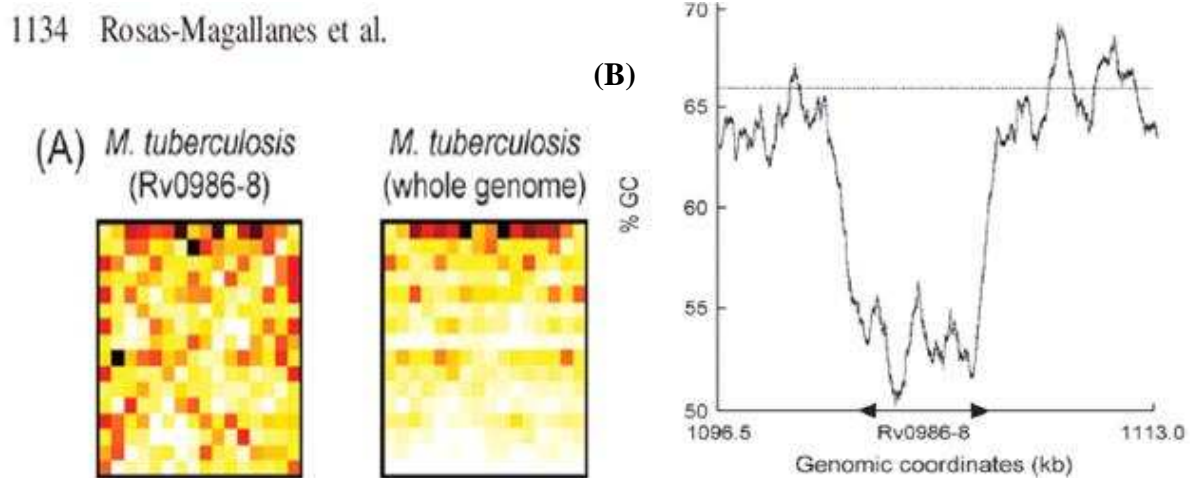
A partir de leurs différentes caractéristiques, plusieurs techniques permettent de détecter les îlots génomiques. La comparaison de génomes par soustraction génomique ou l'hybridation ADN-ADN permet de détecter les délétions ou les insertions différentes entre les souches pour en déduire les nouveaux nucléotides. Ces techniques sont souvent associées au criblage des ARNt flanquant les régions différentes entre les souches.

Des analyses *in silico* permettent par ailleurs de retrouver les traits caractéristiques des GEI à partir de génomes ou de régions génomiques (Dobrindt et al. 2004). Ainsi, la méthode d'analyse *in silico* dite « méthode phylogénétique » se base sur la détection des disparités des gènes potentiellement acquis par HGT dans les souches comparées. Elle se

base sur l'analyse de la phylogénie de régions génomiques (Veyrier et al. 2009). La méthode « paramétrique » se base sur la détection des traits atypiques des régions des génomes à étudier (Lecointre et al. 1998 , Maynard Smith and Smith 1998 , Nakamura et al. 2004). Ces méthodes paramétriques comprennent notamment les techniques suivantes (Dufraigne et al. 2005, Rosas-Magallanes et al. 2006 , Becq et al. 2007, Jang et al. 2008) (Figure 13):

- a) *Le calcul G+C%*: le contenu en G+C des gènes ou des régions d'intérêt est calculé à partir du premier et du troisième codon. Les régions dont les valeurs en G+C sont supérieures ou inférieures à un seuil ou une référence donnée sont considérées comme atypiques (Figure 13B).
- b) *L'usage du codon* : certains acides aminés peuvent être codés par plus d'un triplet de nucléotides ou codon : ce sont les « codons synonymes ». La fréquence d'utilisation de ces codons synonymes varie d'un génome à un autre. La détermination de la fréquence d'utilisation de ces codons dans une région ou un gène donné permet de détecter les régions potentiellement acquises par transferts horizontaux (Ermolaeva 2001) pour revue).
- c) *La signature tétranucléotidique* : le génome est scanné en déterminant la fréquence (signature) de tétranucléotides sur une fenêtre de 5 kb. Les fenêtres présentant une distance Euclidienne par comparaison à la signature-seuil d'une référence ou de tout le génome est considéré comme atypique (Dufraigne et al. 2005).

**Figure 13. Caractères atypiques de la région Rv0986-8 dans le génome de *M. tuberculosis*. A) Signature tétranucléotidique. B) Taux en G+C %**



### III.3. Les Transferts Horizontaux et les bactéries MTBC :

Le taux uniforme en G+C de 65,5% chez *M. tuberculosis* H37Rv supposait qu'il n'y avait pas de transfert de gène dans les souches *M. tuberculosis* (Sreevatsan et al. 1997). D'autre part, l'analyse et la comparaison des premiers génomes de *M. tuberculosis* et *M. bovis* n'avaient montré aucune différence. Les variations entre les souches semblaient minimales (Cole et al. 1998, Brosch et al. 2002, Garnier et al. 2003). Cependant, un nombre limité de gènes et d'éléments mobiles ont été observés comme ayant été acquis par HGT chez les mycobactéries. La plupart de ces éléments mobiles semblent avoir été acquis avant l'émergence de ces dernières (Saves et al. 2001, Blanc-Potard and Lafay 2003, Kinsella et al. 2003). Une étude menée sur plusieurs espèces de mycobactéries a montré que plusieurs épisodes d'HGT ont contribué à l'assemblage du génome de la souche ancestrale *M. prototuberculosis*. Le génome de ces mycobactéries aurait été façonné avant leur expansion clonale et serait à l'origine de l'émergence des bactéries MTBC (Figure 3, (Gutierrez et al. 2005).

Une étude utilisant des analyses paramétriques et des techniques d'hybridation d'ADN de Rosa-Magallanes et de ses collaborateurs a permis d'identifier l'opéron Rv0986-8 comme ayant des traits atypiques. Ces gènes auraient été acquis par HGT à partir de  $\gamma$ -protéobactéries. Cet opéron est notamment impliqué dans la fixation de *M. tuberculosis* aux cellules eucaryotes et au trafficking intracellulaire (Rosas-Magallanes et al. 2006, Rosas-Magallanes et al. 2007). Plus tard, en appliquant des analyses paramétriques *in*



*silico* sur l'ensemble du génome de 3 souches de *M. tuberculosis*, *M. bovis* et 3 autres mycobactéries, d'autres régions atypiques potentiellement acquises par HGT ont été identifiées. Quarante-huit de ces îlots sont spécifiques des bactéries MTBC. Ces îlots spécifiques comprennent des gènes de virulence et d'autres fonctions, pour la plupart non encore connues (Becq et al. 2007). Très récemment, l'analyse phylogénétique d'une vingtaine de gènes sur des souches de mycobactéries a permis d'identifier 137 gènes acquis par plusieurs séries d'HGT dans les différentes strates phylogénétiques des mycobactéries. La plupart de ces régions détectées correspondent à ceux identifiés par la méthode paramétrique. Ces gènes semblent avoir façonné les génomes des bactéries MTBC (Veyrier et al. 2009).

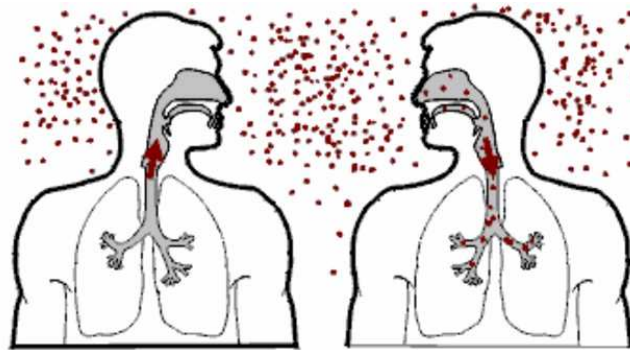
## **IV. LA TUBERCULOSE : DE L'INFECTION A LA MALADIE**

### **IV.1. La primo-infection à la bactérie de la tuberculose**

L'homme est le seul réservoir connu de *M. tuberculosis*. La transmission de la tuberculose a lieu par voie aérienne, par l'inhalation de gouttelettes contenant les bactéries émises par un individu bacillifère, en toussant, en éternuant ou simplement en parlant (Figure 14). La tuberculose est une maladie typique des poumons (forme pulmonaire) qui constituent à la fois la porte d'entrée de la bactérie et le lieu de dissémination de la maladie (Raja 2004). *M. tuberculosis* est en effet une bactérie aérobique obligatoire qui est principalement retrouvée dans les voies respiratoires supérieures (dans 75% des cas) où elles vont proliférer.

Le premier contact d'un sujet avec *M. tuberculosis* est appelé « primo-infection tuberculeuse ».

**Figure 14: Transmission de la tuberculose par voie aérienne et passage vers les organes pulmonaires**



[http://pathport.vbi.vt.edu/pathinfo/pathogens/Tuberculosis\\_2.html#CDC\\_CoreCurriculum](http://pathport.vbi.vt.edu/pathinfo/pathogens/Tuberculosis_2.html#CDC_CoreCurriculum)

#### **IV.1.1. La Réponse immunitaire à médiation cellulaire contre la tuberculose**

*M. tuberculosis* est un parasite intracellulaire facultatif. Cette bactérie infecte surtout les macrophages. Comme pour la plupart des infections par des microorganismes intracellulaires, l'hôte infecté par *M. tuberculosis* est protégé principalement par une immunité à médiation cellulaire qui peut stopper la multiplication bactérienne. Le système immunitaire de l'hôte semble efficace pour contenir le pathogène mais il n'élimine souvent pas complètement les bactéries (Kaufmann 2002, Cooper and Khader 2008).

##### **a) Les premiers contacts des bactéries avec les cellules immunitaires de l'hôte**

Après l'inhalation de gouttelettes infestées par des BK, le premier contact de la bactérie avec le système immunitaire se fait au niveau des macrophages alvéolaires. Les bactéries *M. tuberculosis* sont alors internalisées par les macrophages. Ces derniers peuvent servir de refuge pour les bactéries où elles vont se multiplier. Des études immunologiques sur l'infection *in vitro* de monocytes humains ont montré que la plupart des bactéries *M. tuberculosis* internalisées vont échapper à la lyse phagocytaire en inhibant la maturation du phagosome (Sturgill-Koszycki et al. 1994, Clemens and Horwitz 1995). Dans les macrophages non activés, les bactéries inhibent la fusion des lysosomes avec les phagosomes, empêchant la maturation de ces derniers en phagolysosomes (Armstrong and Hart 1971). La multiplication du bacille dans le phagosome peut conduire à la destruction de la cellule infectée. Les nombreuses bactéries libérées seront à leur tour

phagocytées par d'autres monocytes et macrophages pour reprendre leur cycle de multiplication (Dannenberg 1994). Par contre, les macrophages activés par l'interféron gamma (IFN $\gamma$ ) résistent mieux à l'infection par la bactérie en favorisant la maturation des phagosomes contenant les bactéries (MacMicking et al. 2003).

Les mycobactéries interagissent avec les cellules immunitaires grâce aux récepteurs de reconnaissance cellulaires. Ainsi, les récepteurs de mannose retrouvés sur les macrophages sont impliqués dans l'adhérence des souches virulentes de *M. tuberculosis* puis de leur internalisation dans la cellule (Schlesinger 1993). Par ailleurs, l'interaction des lipoprotéines bactériennes avec des récepteurs « Toll-like », en particulier TLR-2, des macrophages stimule la réponse immunitaire et la sécrétion de molécule effectrices. L'interaction de la lipoprotéine bactérienne de 19 kDa de *M. tuberculosis* avec le TLR-2 de macrophages active ces derniers. Une fois activés, ces macrophages sécrètent des interleukines protectrices comme l'IL-12 ou des agents microbicides comme l'oxyde nitrique produit par une synthétase inductible ou iNOS (Brightbill et al. 1999, Means et al. 1999, Underhill et al. 1999). Selon diverses études, les macrophages alvéolaires interagissent avec les molécules de la paroi bactérienne de *M. tuberculosis* au niveau de ces récepteurs cellulaires. Cette interaction déterminerait souvent l'issue de la réponse immunitaire du macrophage (Brightbill et al. 1999, Nau, 2002 #199, Thoma-Uszynski et al. 2001, Nau et al. 2002, Loeuillet et al. 2006, Torrelles et al. 2008a, Torrelles et al. 2008b). D'autres récepteurs cellulaires comme le récepteur 3 du complément (CR3) sont impliqués dans l'internalisation de *M. tuberculosis* dans les macrophages (Schlesinger 1993). Par contre, ces CR3 ne semblent pas influencer l'induction de molécules effectrices permettant d'éliminer les bactéries infectantes (Le Cabec et al. 2000, Rooyakkers and Stokes 2005).

En plus des macrophages, les neutrophiles sont des cellules phagocytaires intervenant dans l'immunité innée de l'hôte. Ces neutrophiles sont parmi les premiers leucocytes à être recrutés au niveau du site d'infection. Avec les macrophages alvéolaires, les neutrophiles interviennent dans la réponse précoce à une infection par *M. tuberculosis*. Ils permettent de contrôler l'infection et la multiplication des bactéries par la production de chémokines aidant dans la formation des granulomes (Seiler et al. 2003). L'étude de l'infection par certaines mycobactéries a indiqué que les défensines produites par neutrophiles humains sont par ailleurs capables d'éliminer les bactéries (Ogata et al. 1992). Les neutrophiles seraient cependant aussi impliqués dans la transmission de la tuberculose. Très récemment, les analyses bactériologiques et cellulaires de différents prélèvements biologiques provenant de patients tuberculeux ont montré que les bactéries *M. tuberculosis* intracellulaires étaient principalement

retrouvées dans les neutrophiles où ces bactéries se répliquent très rapidement. Ces neutrophiles sont par ailleurs les populations cellulaires prédominantes au niveau des sites infections de ces patients tuberculeux (Eum et al. 2010).

### **b) Activation de la réponse cellulaire adaptative spécifique**

Ce sont des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) qui sont impliquées dans le déclenchement de la réponse adaptative de l'hôte au niveau des organes lymphatiques secondaires. Parmi ces CPA, les cellules dendritiques sont assez résistantes à une infection par la bactérie et sont caractérisées par des prolongements cytoplasmiques appelés « dendrites » (Wolf et al. 2007). Les cellules dendritiques sont retrouvées en très grand nombre dans les lésions tuberculeuses. *M. tuberculosis* est internalisée dans ces cellules dendritiques après fixation de leur lipoarabinomannane (LAM) au récepteur DC-SIGN (Dendritic Cell-specific Intracellular-adhesion-molecule-grabbing non-integrin), un récepteur lectine de type-C (Tailleux et al. 2003, Torrelles, 2006 #225, Torrelles et al. 2006). En étudiant l'internalisation cellulaire de bactéries *M. tuberculosis* exprimant un marqueur fluorescent chez la souris, il a été montré que les cellules dendritiques sont impliquées dans le transport des bactéries internalisées des muqueuses pulmonaires aux nodules lymphatiques. Une fois arrivées aux ganglions lymphatiques, les cellules dendritiques vont présenter les antigènes aux cellules T naïves qui vont être activées et proliférer en CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> spécifiques grâce aux complexes majeurs d'histocompatibilités CMHII ou CMHI au niveau des ganglions lymphatiques (Wolf et al. 2008). En plus des ces cellules, les cellules T $\gamma/\delta$  (gamma/delta) caractérisées par des récepteur antigéniques T (TCR) composés de chaînes  $\gamma$  et  $\delta$  et des cellules T CD1-restreintes vont aussi être activées.

En présence de *M. tuberculosis*, les macrophages alvéolaires issus de liquide broncho-alvéolaire de patients tuberculeux expriment aussi le récepteur DC-SIGN. L'interaction des bactéries avec ces DC-SIGN macrophagiques semble inhiber les sécrétions d'IL10 par ces macrophages (Tailleux et al. 2005). Les cellules T induites par les cellules dendritiques répondent notamment par la sécrétion de cytokines au profil du type Th1, dont l'IL-12 ou l'IFN $\gamma$  qui activent par la suite les macrophages et permettent de contrôler la multiplication des bactéries.

Le système immunitaire spécifique est alors activé engendrant par la suite les cellules mémoires qui seront présentes jusqu'à la mort du sujet infecté. Les différentes cellules activées vont alors migrer vers le site infectieux.

### **c) Les réponses cellulaires immunes au niveau du site infectieux**

Les cellules T CD4 auxiliaires activées spécifiques vont jouer un rôle important dans la production d'IFN $\gamma$  et l'induction des mécanismes apoptotiques des cellules infectées grâce au profil de sécrétion de cytokines du type Th1 (T helper 1).

Les cellules activées T CD8+, T $\gamma/\delta$ , T CD1-restreintes sont capables de lyser des cellules étrangères ou des cellules infectées. Le rôle de ces cellules dans l'immunité anti-tuberculeuse est de réduire la prolifération des mycobactéries intracellulaires en éliminant leur habitat, c'est-à-dire la cellule infectée. Ces cellules stimulent aussi la sécrétion de cytokines du type Th1, induisant la formation de granulomes dans les premières heures de l'infection (Thoma-Uszynski et al. 2000). Les cellules T CD8 humaines activées par *M. tuberculosis* expriment des molécules cytolytiques comme les perforines, les granzymes, la granulysine ou le ligand Fas (Fas-L). Ces différentes molécules vont participer à lyser les macrophages infectés par les bactéries (Canaday et al. 2001). Les T CD8 secrètent aussi l'IFN $\gamma$ . La majorité de ces cellules T CD8 sensibilisées reconnaissent les antigènes grâce au CMH de classe I. Des antigènes spécifiques de mycobactéries comme l'ESAT-6, l'antigène 85 ou le CFP-10 sont ainsi reconnus. Ces propriétés des cellules T CD8 sont mises à profit dans diverses techniques de diagnostic de la tuberculose (Lalvani et al. 1997, Boom et al. 2003 pour revue). Les cellules T $\gamma/\delta$  (gamma/delta) sont caractérisées par des récepteur antigéniques T (TCR) composés de chaînes  $\gamma$  et  $\delta$ . Des études menées sur les cellules T humaines semblent indiquer que, comme les cellules T CD8, les T CD4 et T $\gamma/\delta$  ont une activité cytotoxique et sont capables de sécréter de l'IFN $\gamma$  avec cependant des proportions différentes (Tsukaguchi et al. 1995).

A cause de la structure riche en dérivés lipidiques des mycobactéries, les cellules T CD1-restreintes ont un rôle important dans l'immunité anti-tuberculeuse. Les molécules CD1 sont en effet impliquées dans la présentation des antigènes d'origine lipidique pour activer l'activité cytolytique des cellules T CD1-restreintes contre les macrophages infectés. Le rôle de ces cellules T CD1-restreintes dans les sujets humains exposés à *M. tuberculosis* a été confirmé grâce à des études *ex vivo* faites à partir de lymphocytes du sang périphérique humain (Kaufmann 2002 pour revue, Ulrichs et al. 2003).

En plus de la réponse cellulaire adaptative, les cellules T-NK (T-Natural-Killer) peuvent lyser des cellules de manière indépendante à l'antigène contrairement aux autres cellules T effectrices. De plus, à partir d'expérimentations sur la souris, il a été

démontré que les cellules NK figurent parmi les premières cellules à produire de l'IFN $\gamma$  lors de l'infection par *M. tuberculosis* (Junqueira-Kipnis et al. 2003) accentuant les effets bactéricides des cellules infectées grâce à l'interféron sécrété (Vankayalapati et al. 2004). De récentes observations mentionnent l'interaction entre cellules NK et cellules dendritiques associant ainsi la réponse immune innée, non spécifique des cellules NK, avec la réponse immune adaptative antigènes-spécifique des cellules dendritiques. Ces interactions permettraient l'activation des cellules NK ainsi que la maturation des cellules dendritiques (Cooper et al. 2004).

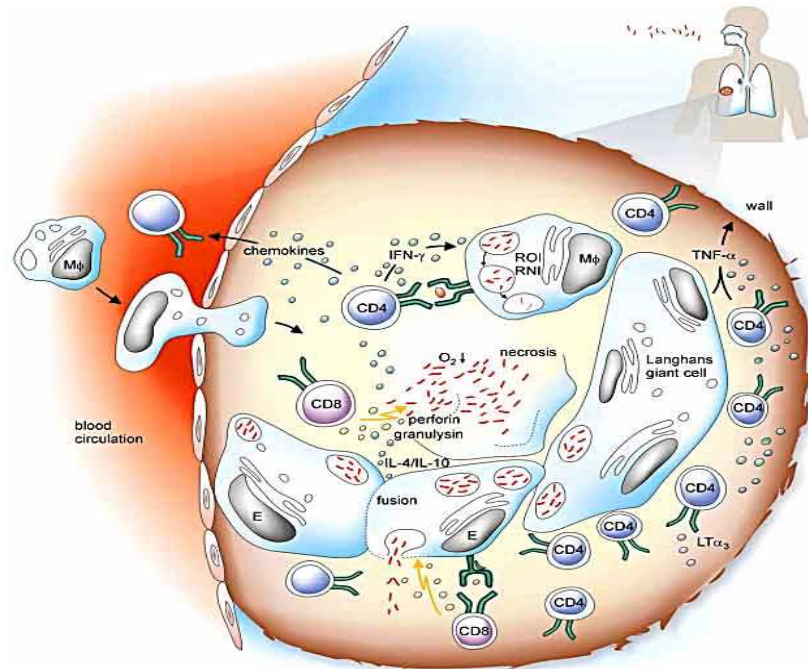
### **IV.1.2. Le granulome tuberculeux**

Une fois activées, les cellules T vont proliférer, puis sont recrutées au niveau du site infectieux, notamment par l'IL-12 et l'IL23 (Cruz et al. 2006). Arrivées au niveau du site infectieux, les différentes cellules recrutées vont s'agréger en formant les granulomes tuberculeux. Des études immuno-histochimiques, histologiques et de cytométrie de flux sur les granulomes humains et murins ont montré une organisation structurale du recrutement cellulaire et de la disposition de ces dernières dans les granulomes (Tsai et al. 2006). L'ensemble des populations lymphocytaires sensibilisées reconnaissant les antigènes de *M. tuberculosis* sont recrutées au niveau du ganglion périphérique vers le site d'infection et s'y agrègent dans les granulomes, avec les lymphocytes entourant les macrophages infectés (Figure 15). Le granulome permet de retenir les mycobactéries dans un environnement qui leur est hostile à cause du pH acide et de l'anoxie qui y subsiste. Le granulome tuberculeux offre aussi un environnement confiné où les cellules effectrices et les molécules bactéricides se côtoient et peuvent interagir rapidement pour éliminer les bactéries au niveau du site infectieux (Russell 2007). De récentes observations à partir de l'infection de larves de poissons zèbres (« zebra fish ») suggèrent que le recrutement des macrophages pour former les granulomes est induit indirectement par les antigènes bactériens sécrétés dont l'ESAT-6 (Early Secreted Antigenic Target 6) (Volkman et al. 2009).

Au niveau du granulome, ces cellules vont contrôler la multiplication des bactéries en activant les phagocytes infectés grâce à l'induction par l'IFN $\gamma$  et la réponse Th1 (Cooper and Khader 2008). Ces cytokines de la famille de la réponse Th1 agissent comme agents bactéricides, en parallèle avec les composés comme l'iNOS ou le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Chan et al. 1992, Flynn and Chan 2003, MacMicking et al. 2003, Axelrod et al. 2008). Ces derniers enclenchent alors leur activité bactéricide et facilite la phagocytose des pathogènes internalisés (Flynn et al. 1993, Ehrt and Schnappinger 2009).

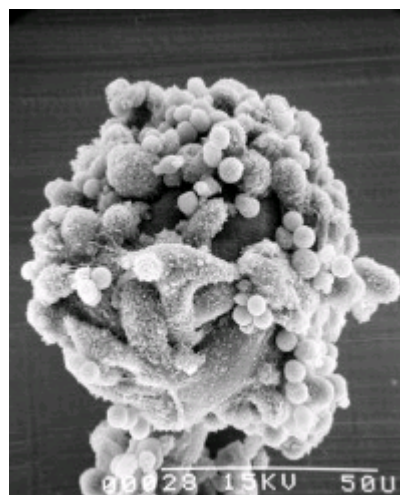
**Figure 15. Réponse de l'hôte infecté par *M. tuberculosis* dans le granulome.**

**A**



**B**

[www.bioscience.org/2002/v7/d/ulrichs/fig3.jpg](http://www.bioscience.org/2002/v7/d/ulrichs/fig3.jpg)



<http://www.ipbs.fr/equipes/altare/granulome.jpg>

(A) les effecteurs de l'immunité au sein de granulome. Les macrophages alvéolaires (MΦ), les cellules épithéliales (E) ou les cellules géantes de Langhans qui ont internalisés les bactéries sont au centre du granulome. Ces cellules vont présenter les antigènes bactériens aux lymphocytes T qui vont

produire des cytokines pour éliminer les cellules infectées et les mycobactéries intracellulaire, ainsi que des chémokines qui vont recruter d'autres cellules effectrices à partir du sang périphérique. Les intermédiaires réactifs d'oxygène (« reactive oxygen intermediates ou ROI ») et d'azote (« reactive nitrogen intermediates » ou RNI) contribue aussi à éliminer les bactéries intracellulaires. (B) Un granulome observé par microscope électronique.

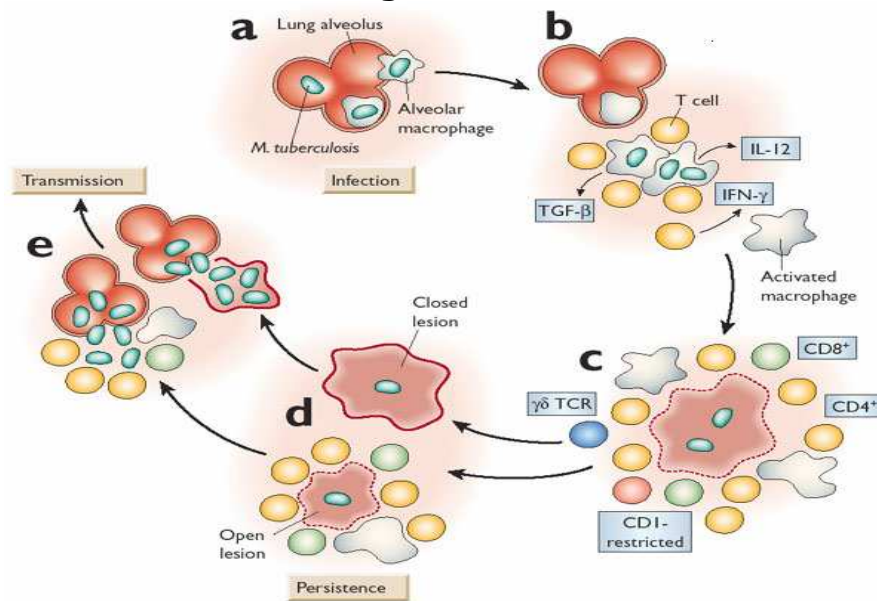
### IV.1.3. La réponse Th1

L'interaction entre les antigènes présentés par les cellules présentatrices d'antigènes et les récepteurs des cellules T sert de signal d'activation de ces dernières. Les lymphocytes sensibilisés prolifèrent et migrent vers le site d'infection pour y sécréter des lymphokines médiatrices. Ces lymphokines vont activer les macrophages qui vont à leur tour produire l'IL-12. L'interleukine 12 va orienter les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> vers une différenciation en lymphocytes T auxiliaires ou T « helper » (Th) de type Th1 (T « helper type 1 »). Le profil de sécrétion cytokine Th1 est connu pour activer les cellules inflammatoires ainsi que la phagocytose. Cette réponse est impliquée dans l'inhibition de la croissance des bactéries pathogènes (Schluger and Rom 1998). Cette réponse Th1, notamment caractérisée par la sécrétion d'IFN $\gamma$  et TNF $\alpha$  (Herrera et al. 2009), est résumée sur la Figure 16.

L'inhibition de la maturation des phagosomes par *M. tuberculosis* chez le macrophage peut être levée par les cytokines, comme l'IFN $\gamma$ . Des études *in vitro* de systèmes cellulaires sur l'action antibactérienne des macrophages humains montrent que l'IFN $\gamma$  et les lymphocytes sont essentiels contre une infection par *M. tuberculosis* (Bonecini-Almeida et al. 1998). L'IFN $\gamma$  est aussi une lymphokine activant les macrophages. D'autres cytokines comme le « Tumor Necrosis Factor alpha » (TNF $\alpha$ ) semblent aussi être impliqués dans la réponse immune protectrice contre la bactérie (Flynn et al. 1995). La plupart de ces cytokines possédant une activité protectrice contre la tuberculose font partie de la famille de la réponse Th1.



**Figure 16. Les effecteurs de l'immunité anti-tuberculeuse et la formation de granulome.**



- (a) *M. tuberculosis* phagocytés dans les alvéoles pulmonaires au niveau du site infectieux. (b) Activation des cellules T par les CPA et libération des lymphokines au niveau des ganglions lymphatiques. (c) Formation de lésions granulomateuses au niveau du site infectieux permettant de contenir l'infection. (d) Prolifération et transmission des bactéries en cas de défaillance du système immunitaire (adapté du site <http://www.nature.com>).

*Rôle de l'interféron gamma dans la réponse Th1*: L'IFN $\gamma$  va faciliter la prolifération des cellules T CD4 $^{+}$  et des cellules T cytolytiques. Ces dernières ont une activité lytique directe sur les cellules infectées (Flynn et al. 1993). L'IFN $\gamma$  tient donc une place prépondérante dans l'immunité anti-tuberculeuse et peut servir pour le diagnostic de l'infection à *M. tuberculosis*. Des études sur des modèles murins ont montré que l'arrêt de la croissance des bactéries *M. tuberculosis* chez l'hôte infecté correspond souvent à la prolifération de cellules T productrices d'IFN $\gamma$  ainsi qu'à une augmentation d'ARNm d'IFN $\gamma$  (Schwander et al. 2000, Khader et al. 2007). Chez la souris aussi bien que chez l'homme, des perturbations de la réponse immune du type Th1 associées à des déficiences génétiques en IFN $\gamma$  (Filipe-Santos et al. 2006) ou aux voies métaboliques liées à d'autres molécules du système immunitaire rendent extrêmement susceptibles aux infections à *M. tuberculosis* (Dorman and Holland 2000, Ellner et al. 2000).

*Rôle du TNF $\alpha$  dans la réponse Th1* : le TNF $\alpha$ , quant à lui, a la capacité d'induire la production de chémokines chez les monocytes/macrophages. De plus, il est impliqué dans l'expression de gènes d'oxydants cellulaires qui vont induire la mort ou la nécrose d'une

cellule infectée. L'élimination des cellules infectées va contribuer à la diminution et à la limitation du parasitisme intracellulaire de *M. tuberculosis* (Zganiacz et al. 2004). Le  $\text{TNF}\alpha$  est également à l'origine du maintien de l'intégrité du granulome tuberculeux où s'effectue l'isolement et l'élimination des bactéries par les effecteurs cellulaires de l'immunité (Clay et al. 2008).

Ainsi, plusieurs études montrent que l'arrêt de la multiplication des mycobactéries par le système immunitaire ne se produit pas en l'absence d'  $\text{IFN}\gamma$ , de  $\text{TNF}\alpha$  ni d'IL-12 (Cooper and Khader 2008).

### **IV.1.4. La réponse Th17 et Th2 dans l'immunité anti-tuberculeuse**

A côté de la réponse Th1, la réponse Th17, dépendante de l'IL23, semble aussi être protectrice contre les infections mycobactériennes (Cooper and Khader 2008). Cette réponse Th17 est notamment caractérisée par la sécrétion d'IL17A, IL17F, IL21 et IL22 par les cellules T sensibilisées. L'IL17 produite par les cellules T CD4 est impliquée dans le recrutement rapide de cellules Th1 capables de produire l' $\text{IFN}\gamma$  après une stimulation ou une vaccination de modèles murins avec des antigènes spécifiques de *M. tuberculosis* (Khader et al. 2007). L'étude de la réponse Th17 chez des souris  $\text{IFN}\gamma$ -KO semble indiquer que l' $\text{IFN}\gamma$  peut agir comme un régulateur de la prolifération des cellules T productrices d'IL17 suite à une infection par des mycobactéries (Cruz et al. 2010). Les cellules Th17 induisent par ailleurs la production de cytokines comme le GM-CSF ou le G-CSF chez une grande majorité de cellules. Ces deux cytokines favorisent la formation du granulome lors des infections mycobactériennes. La réponse Th17 serait aussi impliquée dans l'immunité contre les microorganismes extracellulaires et les champignons (Curtis and Way 2009).

Les réponses Th1 et Th17 semblent agir à des niveaux différents lors des infections mycobactériennes. Alors que la réponse Th1 est requise au niveau du site infectieux avec une durée d'action limitée dans le temps, les cellules Th17 spécifiques des mycobactéries contribuent au maintien de la réponse inflammatoire en amplifiant la réponse cellulaire, notamment lors des réponses secondaires aux infections mycobactériennes (Cooper and Khader 2008). Une étude récente montre d'ailleurs que des stimulations répétées du système immunitaire par des antigènes mycobactériens dans les modèles murins conduisaient à une réponse pathologique. Une augmentation de IL17 serait impliquée dans cette pathologie (Cruz et al. 2010).

La réponse Th1 et Th17 sont associées à une immunité protectrice contre les infections mycobactériennes. Les cellules Th2 et les cytokines qui leur sont associées,

comme l'IL4, l'IL5 ou l'IL10 sont par contre corrélées à une sensibilité plus accrue à la tuberculose (Rook and Zumla 2001). En effet, l'IL10, une cytokine de type Th2, est associée à une désactivation des macrophages et à une réduction de la sécrétion de cytokines Th1. D'autre part, une diminution de la réponse Th1 (IFN $\gamma$  et IL12 en particulier) et une augmentation de la réponse IL-10 sont observées chez les patients tuberculeux (Manca et al. 2001). Des études menées en Ethiopie sur des sujets sains infectés par *M. tuberculosis* montrent que ces derniers produisent l'antagoniste de l'IL4, l'IL4 $\delta$ 2, de manière plus importante que les patients tuberculeux ou les sujets non infectés, soulignant l'importance de la régulation de la réponse Th2 dans l'immunité protectrice contre la tuberculose (Demissie et al. 2006).

### **IV.2. Progression d'une infection tuberculeuse**

Le système immunitaire répond généralement efficacement contre les infections de mycobactéries. Selon la capacité du système immunitaire à contrôler la croissance des bacilles, la lésion tuberculeuse peut régresser ou au contraire s'étendre. Dans environ 10% des cas (10% des personnes immunocompétentes et 8% des personnes immunodéprimées), l'infection par *M. tuberculosis* échappe au contrôle immunitaire et le sujet infecté développera la tuberculose maladie. Dans 90% des cas, la « tuberculose infection » est asymptomatique. L'organisme infecté contrôle la prolifération des bactéries et la lésion tuberculeuse va se calcifier. Cependant, certains bacilles ayant un métabolisme extrêmement ralenti pourront survivre. Ces bacilles, dits quiescents ou persistants, pourront se développer à nouveau sous l'influence de différents facteurs entraînant une baisse de l'immunité de l'hôte. Le sujet concerné présentera alors une tuberculose active (Mohan et al. 2001, Kaufmann 2002, Houben et al. 2006 pour revues). En effet, a tuberculose fait souvent suite à une diminution du système immunitaire des individus infectés (Dolin et al. 1994, Hernandez-Pando et al. 2009). Le développement de la tuberculose est souvent lié à des facteurs de risque comme la malnutrition (Zachariah et al. 2002, Cegielski and McMurray 2004, Kim et al. 2008), l'alcoolisme, la précarité du logement ou la présence d'autres maladies respiratoires (Lin et al. 2007, Hernandez-Pando et al. 2009 ).

La carence en vitamine D est aussi associée à la tuberculose (Wilkinson et al. 2000). La vitamine D est issue de l'exposition de la peau aux rayons solaires et est aussi retrouvée dans l'alimentation. Elle a été exploitée dans les sanatoriums pour traiter la tuberculose par la cure d'air, de lumière et de soleil. En effet, les macrophages et les monocytes exposés à *M. tuberculosis* produisent plus de récepteurs de la vitamine D et les

réactions en chaîne issues de l'interaction de la vitamine D avec ces récepteurs favorisent la destruction des bactéries (Wilkinson et al. 2000, Holick 2007).

### **IV.2.1 Les facteurs génétiques liés à la susceptibilité de l'hôte à une tuberculose active**

Le fait que seuls 8 à 10% des sujets infectés par *M. tuberculosis* développent une tuberculose et l'observation de tuberculose chez certains jumeaux ont orienté des chercheurs à penser à une susceptibilité génétique de l'hôte à la maladie (Newport and Levin 1999 pour revue).

Des polymorphismes peuvent être retrouvés au niveau de gènes codant pour les interleukines ou les récepteurs cellulaires impliqués dans la protection de l'hôte contre les pathogènes intracellulaires. Ces polymorphismes génétiques peuvent affecter la réponse immunitaire et rendre les sujets portant ces défaillances génétiques plus susceptibles aux infections (Casanova and Abel 2007). Plusieurs expérimentations sur des modèles murins ont montré que les blocages de l'activité des cytokines, soit par l'utilisation d'antagonistes, soit par génération de souris KO par altération des gènes, peuvent affecter la susceptibilité aux infections bactériennes (van de Vosse and van Agtmael 2007 pour revue). Des mutations génétiques au niveau des gènes codant pour des molécules intervenant dans l'immunité médiée par l'IFN $\gamma$  et l'axe IL12/IL23 rendent les sujets particulièrement susceptibles aux infections aux mycobactéries qui sont normalement peu pathogènes. Tel est le cas pour *M. bovis* BCG et certaines mycobactéries environnementales non-tuberculeuses. Des mutations génétiques au niveau du gène de l'IL12p40, ou du gène codant pour le récepteur IL12R peuvent aussi entraîner une nette diminution du taux de production d'IFN $\gamma$ , réduisant de ce fait la réponse bactéricide de ce dernier (de Jong et al. 1998). Des altérations génétiques au niveau du gène de l'IL23 peuvent par ailleurs affecter non seulement la production de l'IFN $\gamma$  par les cellules T, mais surtout la prolifération des cellules T mémoires, dépendante de l'IL23. D'autres défaillances génétiques au niveau des gènes impliqués dans la structure de récepteurs de l'IFN $\gamma$ , ou IFNGR ont aussi été étudiées. Ces altérations génétiques rendent particulièrement sensibles aux mycobactérioses (Newport and Levin 1999). Cependant, aucune altération génétique touchant directement l'IFN $\gamma$  ou le TNF $\alpha$  n'a été décrite jusqu'à présent. Les susceptibilités génétiques touchant l'axe IFN $\gamma$ /IL12/IL23 concernent principalement les infections aux mycobactéries normalement peu pathogènes alors que les susceptibilités à *M. tuberculosis* sont assez rares chez les individus portant ces défaillances génétiques (Casanova and Abel 2007, Cooper and Khader 2008).

Des études de génétique conventionnelle semblent lier le polymorphisme de certains gènes de l'hôte à la tuberculose. Se référant à des observations faites sur des modèles murins, une étude sur l'association de la tuberculose et les variations des gènes codant pour NRAMP1 (« natural resistance-associated macrophage protein »), une protéine impliquée dans la phagocytose chez les macrophages, a été menée sur des patients tuberculeux d'Afrique de l'Ouest. Cette étude a montré que certains polymorphismes au niveau des gènes *nramp1* étaient statistiquement associés à la maladie (Bellamy et al. 1998). Des observations similaires ont été trouvées avec le polymorphisme sur le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (Bothamley et al. 1989), le récepteur toll-like (TLR-2) (Ben-Ali et al. 2004) ou le récepteur de la vitamine D (Bellamy et al. 1999, Wilkinson et al. 2000). Des études récentes sur des populations de patients tuberculeux indiquent aussi l'existence d'un gène majeur associé à la maladie sur la région chromosomique 8q12-13 indiquant la présence d'un gène potentiellement associé à la tuberculose dans le locus (Baghdadi et al. 2006). En 2006, en étudiant une cohorte de sujets provenant d'une zone à forte incidence en tuberculose d'Afrique du Sud, Barreiro et ses collaborateurs ont observé que le risque de développer la maladie diminue suivant les variations observées sur les régions -871G et -336A du CD209, gène codant pour la molécule de reconnaissance DC-SIGN des cellules dendritiques. Le polymorphisme du DC-SIGN pourrait donc être étudié pour déterminer des marqueurs génétiques de protection contre la tuberculose (Pitarque et al. 2005, Barreiro et al. 2006).

### **IV.2.2. Dynamique de la production de l'IFN $\gamma$ de l'infection à une tuberculose active**

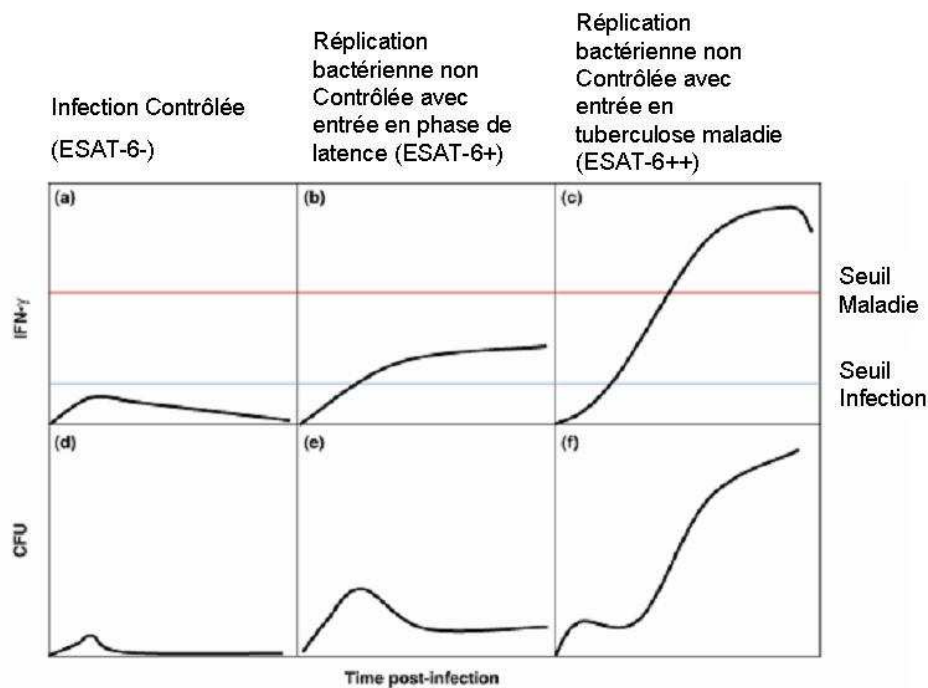
La réponse immunitaire à médiation cellulaire suite à une infection par *M. tuberculosis*, peut être appréciée en suivant la dynamique de la production des cytokines de type Th1, en particulier la production d'IFN $\gamma$  grâce aux tests IGRA (« Interferon gamma release assays »), par les cellules de l'hôte.

Différents tests basés sur la production d'IFN $\gamma$  après stimulation *in vitro* par des antigènes spécifiques de *M. tuberculosis* ont montré que les premiers contacts de la bactérie avec le système immunitaire de l'hôte se traduisent par une réponse immunitaire à médiation cellulaire (Andersen et al. 2007). En effet, par cette technique, la réponse immune cellulaire peut-être détectée dès deux semaines après une infection par la bactérie. De plus, cette production d'IFN $\gamma$ , augmenterait avec la charge bacillaire.

## Introduction

Ce phénomène s'explique par le fait que les antigènes utilisés dans ces tests correspondent à ceux secrétés massivement lors de la réplication des bactéries pendant l'infection par *M. tuberculosis* et sont parmi les premiers antigènes reconnus par le système immunitaire lors de la phase précoce de l'infection (Sorensen et al. 1995). Cette réponse serait maintenue tout le long du processus infectieux (Figure 17) (Andersen et al. 2007).

**Figure 17. Représentation de la relation existant entre la charge bacillaire et la réponse IFN- $\gamma$ -ESAT-6 selon Andersen et al. 2007. CFU= colony forming unit**



La réponse immunitaire à médiation cellulaire (appréciée par la production d'IFN $\gamma$ ) permettrait à l'hôte de contenir l'infection bactérienne. Suite à cette réponse immune, les bactéries peuvent être éliminées ou peuvent entrer dans un métabolisme ralenti et entrer dans un état dormant ou latent donnant une tuberculose latente, asymptomatique. La réponse immunitaire utilisée en permanence pour contenir les bactérie expliquerait le maintien d'une production importante d'IFN $\gamma$  lors de l'infection (Ferrara et al. 2009).

Il arrive cependant que le système immunitaire n'arrive pas à contenir l'infection et les bactéries peuvent se multiplier et donner une tuberculose maladie. Lors de la tuberculose maladie, la réplication active des mycobactéries se reflète par une production plus accrue d'IFN $\gamma$  chez les malades (Andersen et al. 2007, Lienhardt et al. 2010). Alors que le taux d'IFN $\gamma$  retrouvé chez les patients TB serait significativement supérieur à celui retrouvé chez les individus avec une TB latente, le large spectre de réponse IFN $\gamma$  des deux groupes de sujets ne permet pas de distinguer les sujets avec une tuberculose

active, de ceux avec une tuberculose latente (Chee et al. 2009). Cependant, dans les deux cas, la réponse IFN $\gamma$  est significativement différente de celle des sujets non infectés et ces tests permettent donc d'identifier une infection par *M. tuberculosis* (Figure 17) (Ferrara et al. 2009).

Plusieurs études longitudinales ont par ailleurs montré que la production d'IFN $\gamma$  en réponse à la stimulation par ESAT-6 peu après l'exposition par *M. tuberculosis* permettrait de prédire un risque de voir une infection latente progresser en tuberculose active (Andersen et al. 2007, del Corral et al. 2009). En effet, chez les individus infectés qui vont tomber malades de la tuberculose dans les 2 ans après l'exposition à la bactérie, la production d'IFN $\gamma$  mesurée après une infection récente est 2 à 10 fois plus importante que pour celle des individus infectés restés asymptomatiques.

Il y a aussi une dynamique de la production d'IFN $\gamma$  lors du traitement antituberculeux. Dans certains cas, notamment chez les enfants, le traitement antituberculeux provoque une augmentation significative de la réponse IFN $\gamma$  suite à la restauration de la réponse T peu de temps après le traitement (Herrmann et al. 2009). Plusieurs études ont en effet montré qu'au de-là d'un seuil de répllication des bactéries, la réponse cellulaire peut être dépassée ou pourrait être séquestrée dans le site infectieux. L'effet du traitement antituberculeux se traduirait par une libération de cette réponse cellulaire. La production IFN $\gamma$  diminue ensuite avec l'élimination des bactéries (et des antigènes bactériens) sous les effets du traitement (Pathan et al. 2001).

### **IV.3. Diagnostic de la tuberculose**

#### **IV.3.1. Le diagnostic de la tuberculose active**

*Les signes cliniques de la tuberculose.* Les symptômes associés à la tuberculose pulmonaire sont la présence de toux productives et persistantes souvent sanguinolentes. Ces toux sont souvent accompagnées de douleurs au niveau des poumons. Les bactéries peuvent aussi se répandre dans l'organisme de l'hôte infecté et atteindre d'autres organes, donnant alors lieu à une forme extrapulmonaire de la tuberculose. Des bactéries peuvent être ainsi retrouvées dans la moelle osseuse, le foie, la rate, les os, les reins, l'appareil génito-urinaire voire le cerveau pour la méningite tuberculeuse (<http://textbookofbacteriology.net/tuberculosis>).

En général, les formes aussi bien pulmonaires qu'extrapulmonaires de la tuberculose se présentent avec une fièvre généralement associée à des sueurs

nocturnes, une perte d'appétit et de poids. Les formes disséminées de la maladie sont souvent associées à une anémie et le diagnostic d'une tuberculose extrapulmonaire est souvent associé à des constatations histologiques ou des signes cliniques manifestes évocateurs.

Chez le tuberculeux pulmonaire actif, des consolidations pulmonaires ou des cavités tuberculeuses peuvent être observées dans la partie supérieure des poumons par radiographie aux rayons-X. Chez l'homme, les signes cliniques et radiologiques ne sont souvent pas spécifiques de la tuberculose et n'ont qu'une valeur d'orientation diagnostique (Wu et al. 2009) (<http://www.istcweb.org/documents/istcenglish.pdf>). Les méthodes de référence pour diagnostiquer une tuberculose de manière plus précise sont celles qui permettent de mettre en évidence la présence des bactéries dans les prélèvements biologiques. Jusqu'à présent, les méthodes de diagnostic les plus fréquemment utilisées pour cela sont la microscopie pour la recherche de bactéries acido-alcool résistantes ou BAAR et la culture des bactéries sur le milieu adéquat.

*La microscopie.* La microscopie permet d'observer les bacilles à partir de d'expectorations ou d'autres prélèvements biologiques. Elle permet un diagnostic rapide des infections à mycobactéries BAAR. La coloration des bactéries utilise la technique de coloration de Ziehl-Neelsen ou la technique de coloration à l'auramine ou à la rhodamine. Le principe de la coloration des bactéries BAAR repose sur la richesse en lipides de la paroi des bactéries. Cette paroi bactérienne les rend résistantes à la décoloration à l'alcool et à l'acide après une première coloration. Une microscopie BAAR positive se présente avec des bactéries roses pour la technique de Ziehl-Neelsen et sous forme verte fluorescente pour la technique à l'auramine. La sensibilité de la microscopie BAAR varie selon le type de prélèvement, les espèces de mycobactéries et d'autres facteurs (Somoskovi et al. 2001 , Van Deun et al. 2005).

*La culture des mycobactéries.* L'étalement des prélèvements biologiques contenant des mycobactéries sur les milieux de culture adéquats pour y laisser pousser les BK permettent de détecter les mycobactéries de manière plus sensible que la microscopie. Pour la culture bactérienne, la sensibilité varie de 80 % à 85% avec une spécificité de 98%, alors que la sensibilité varie de 50% à 80% pour la microscopie BAAR (Ichiyama et al. 1993). La culture des bactéries permet de mieux identifier les espèces bactériennes et d'en détecter les susceptibilités aux anti-tuberculeux.

Les milieux de culture à base d'œufs comme le milieu solide Löwenstein-Jensen (LJ) ou le milieu Coletsos sont les plus couramment utilisés pour cultiver les mycobactéries. Pour le milieu LJ, du vert malachite est ajouté pour diminuer la croissance des bactéries



contaminantes. En milieu LJ, les cultures ne croissent qu'en 4 à 8 semaines. D'autres milieux de culture permettant une croissance plus rapide des mycobactéries ont été formulés à base de gélose d'acide oléique-albumine, solide ou liquide : les milieux Middelbrook. Ces derniers semblent moins favoriser les bactéries contaminantes comparés aux milieux à base d'œufs. Cependant, malgré une incubation plus longue, le milieu Löwenstein-Jensen semble être le plus adéquat pour la croissance des bactéries. Les souches atypiques de mycobactéries ne poussent généralement que sur milieux à base d'œufs à cause de l'albumine apportée par ces derniers qui est un meilleur nutriment pour les bactéries. Sur les milieux solides, les souches de *M. tuberculosis* se présentent sous forme de colonies rugueuses en « feuille de chou » incolores (Figure 18).

Aujourd'hui, des systèmes commerciaux de culture automatisés en milieux liquides comme le « BACTEC 460 TB » ou le système MGIT (Mycobacterial Growth Indicator Tube) permettent d'augmenter la sensibilité et de diminuer le temps d'incubation des cultures. Ces systèmes sont cependant plus onéreux.

**Figure 18. Mycobactéries poussant sur milieu Löwenstein-Jensen (<http://tuberculosis textbook.com/tb/clinbact.htm>).**



Figure 3-3: Mycobacteria growing on Löwenstein-Jensen slants. a. *Mycobacterium gordonae*; b. *Mycobacterium fortuitum*; c. *Mycobacterium avium*; d. *Mycobacterium tuberculosis*.

*Identification biochimique des bactéries de MTBC.* Certains phénotypes biochimiques des bactéries MTBC sont mis à profit dans différents tests permettant de les identifier. Ces tests biochimiques permettent de discerner les espèces du complexe. En effet, la détection de certains intermédiaires métaboliques ou certaines enzymes participant à la pathogénicité des bactéries permettent d'identifier ces dernières. Par exemple, la détection de l'accumulation de la niacine (ou acide nicotinique) permet de caractériser les souches *M. tuberculosis*, *M. canettii*, et *M. africanum*. La niacine est impliquée dans des réactions d'oxydoréductions sur le NADH de voies métaboliques

énergétiques bactériennes ainsi que dans la réparation d'ADN chez ces mycobactéries (Kasarov and Moat 1972). Ces bactéries possèdent par ailleurs une activité catalasique due à des enzymes du type catalase-péroxydase. Ces enzymes permettent aux bactéries de détoxifier certains composants oxygénés létaux produits notamment par les phagocytes comme le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Ces mycobactéries possèdent aussi une activité nitrate réductase. La réduction du nitrate en nitrite par cette enzyme confère aux bactéries une source supplémentaire d'azote en absence d'oxygène leur permettant une respiration en milieu anaérobie (Weber et al. 2000, Sohaskey 2005). Enfin, *M. tuberculosis* est capable de produire de l'ammoniac à partir d'urée grâce à des uréases, offrant à la bactérie une source d'azote supplémentaire. L'expression de l'enzyme augmente en effet en absence d'azote (Clemens et al. 1995, Reyrat et al. 1995).

*Identification moléculaire des bactéries MTBC.* Les techniques d'identification moléculaire utilisées en mycobactériologie sont pour la plupart basées sur l'amplification d'acides nucléiques en utilisant la PCR. Cette technique permet d'amplifier de manière spécifique des séquences d'ADN ou d'ARN. Ces techniques permettent une identification plus spécifique et plus rapide des bactéries (Palomino 2009). L'addition de tests d'hybridation des amplicons avec des sondes marquées permet par la suite de détecter et d'identifier les souches bactériennes.

Le test *Amplicor* est basé sur l'amplification d'une région de 584 pb de l'ARN 16S, spécifique des mycobactéries, suivi d'une détection colorimétrique après hybridation avec des sondes marquées. Cette technique permet la détection de *M. tuberculosis* en 24h (D'Amato et al. 1995). Utilisant le même principe, la MTD (*M. tuberculosis* Direct Test) utilise des sondes marquées par des esters d'acridium pour détecter les ARNr 16S (Abe et al. 1993).

La technique LAMP (« Loop-mediated isothermal AMplification ») permet l'identification de mycobactéries en 1h. Cette technique est basée sur la synthèse d'ADN par la *Bst* DNA polymérase à une température spécifique de 63°C, suivie de la détection des brins d'ADN néoformés. L'ADN néoformé forme des boucles qui produisent du magnésium pyrophosphate détectable en temps réel par la turbidité du milieu ou par l'utilisation de sonde d'insertion comme le Sybr green (Mori et al. 2001).

Le test GenoType MTBC est basé sur l'amplification de l'ARN 23S spécifique de *M. tuberculosis* combiné au polymorphisme du gène *gyrB* (codant pour une gyrase) ou aux gènes associés à la résistance au traitement ainsi qu'à la région RD1 pour l'identification de *M. bovis* BCG. Les amplicons du test GenoType MTBC sont ensuite hybridés sur une membrane où sont fixés les oligonucléotides spécifiques (Richter et al. 2003). Ce test permet une identification des MTBC en 2-3 heures et de prédire une éventuelle résistance au traitement.

#### **IV.3.2. Le diagnostic de la tuberculose latente**

L'infection d'un sujet par *M. tuberculosis* peut être détectée à partir de la réponse immunitaire spécifique de l'hôte infecté au contact avec des antigènes mycobactériens.

*Diagnostic d'une infection à M. tuberculosis à partir de réaction d'hypersensibilité retardée :*

La plupart des individus exposés à *M. tuberculosis* génèrent et maintiennent souvent une réaction d'hypersensibilité retardée suite au contact du système immunitaire de l'hôte avec des antigènes du pathogène. Ce phénomène est à l'origine du test cutané à la tuberculine. Ce test est aussi appelé réaction d'intradermoréaction ou IDR à cause de l'injection intradermique des antigènes mycobactériens utilisés pour la réaction. L'IDR permet d'identifier une infection à *M. tuberculosis*, en particulier, chez des individus jamais entrés en contact avec la tuberculose (Wallis et al. 2009). Ce test est basé sur la réaction d'hypersensibilité retardée de l'organisme au contact d'un filtrat de cultures de mycobactéries appelé « tuberculine ». Pour le test cutané à la tuberculine, un extrait bactérien appelé PPD (« tuberculine Protein Purified Derivative ») est injectée de manière sous-cutanée au niveau du bras du sujet. Les cellules T déjà sensibilisées par un contact antérieur avec les antigènes sont alors recrutées au niveau du site d'injection de la tuberculine. Les cellules déjà pré-sensibilisées vont alors sécréter des lymphokines pro-inflammatoires. Ces lymphokines vont en 48h à 72h provoquer une induration au niveau du site d'injection de la PPD. La taille de l'induration va alors déterminer la positivité du test (Jasmer et al. 2002 , Ayub et al. 2004). Certains antigènes de la PPD sont cependant retrouvés dans les mycobactéries environnementales et peuvent engendrer des réactions croisées dans la réponse IDR. De même que la vaccination contre la tuberculose, qui peut fausser le test (Dye and Raviglione 2005).

*Diagnostic d'une infection à M. tuberculosis basée sur l'IFN $\gamma$  :*

Les tests reposant sur la détection de la sécrétion d'IFN $\gamma$  (IGRA) sont souvent utilisés pour le diagnostic de maladies infectieuses dont la tuberculose. Dans le cas de la tuberculose, ils utilisent souvent la capacité des antigènes spécifiques de *M. tuberculosis*, comme l'ESAT-6 (Early Secreted Antigenic Target 6) ou le CFP-10 (Culture Filtred Protein-10) à stimuler la production d'IFN $\gamma$  chez l'hôte. Comme ces antigènes sont spécifiques de *M. tuberculosis* et ne se retrouvent ni dans la souche vaccinale BCG ni dans la plupart des mycobactéries environnementales, ces tests permettent de distinguer de manière plus spécifique une infection latente à la tuberculose (Harboe et al. 1996).

Deux techniques basées sur la production d'IFN $\gamma$  sont utilisées. La première permet de détecter une réponse immune à des antigènes de *M. tuberculosis* dans le sang par le test ELISA (Enzyme-linked ImmunoSorbent assay). Elle permet de quantifier le taux d'IFN $\gamma$  sécrété sur du sang total. La seconde technique, le test ELISPOT (ou Enzyme-linked Immunospot assay), permet de détecter les cellules activées sécrétant l'IFN $\gamma$  grâce aux empreintes révélées par des réactions colorimétriques de chacune de ces cellules après une stimulation spécifique (Lalvani et al. 1997).

Selon le choix du seuil de détection recommandé dans les tests commercialisés, des études de comparaison des deux techniques semblent montrer que le test ELISA est plus pratique avec une spécificité plus importante pour détecter une tuberculose latente. Le test ELISPOT semble par contre être plus sensible avec moins de résultats indéterminés. Il est cependant admis que les 2 tests sont plus spécifiques dans la détection d'une infection par *M. tuberculosis* que le test IDR (Lee et al. 2006). Le test ELISPOT permet d'apprécier l'intensité de la sécrétion de molécules effectrices par les lymphocytes en réponse à une stimulation *ex vivo* par des antigènes aussi bien que le nombre de ces cellules sécrétrices (Lalvani et al. 2001b). Contrairement aux tests commerciaux utilisant les test ELISA qui ne peuvent être utilisés qu'avec des prélèvements sanguins, les tests ELISPOT peuvent aussi être utilisés sur des cellules d'autres types de prélèvement comme les liquides broncho-alvéolaires (BAL) (Ferrara et al. 2009). Les premières utilisations du test ELISPOT avec des antigènes spécifiques de *M. tuberculosis* ont permis d'estimer la prévalence de tuberculose latente à Bombay en Inde, sans réaction croisée avec une vaccination préalable avec le BCG (Lalvani et al. 2001a).

#### **IV.4. Le traitement de la tuberculose et la stratégie DOTS**

Le premier antibiotique efficace contre la tuberculose, la streptomycine, a été découvert en 1944 dans le laboratoire de Selman Waksman, qui a reçu le prix Nobel de Médecine en 1952. Il s'est cependant avéré que cet antibiotique présente une certaine ototoxicité pouvant conduire à une surdité parfois totale (Curry et al. 1956). D'autre part, l'apparition de plus en plus de souches résistantes à l'antibiotique chez les patients tuberculeux à l'époque a orienté vers la recherche et l'utilisation d'autres antituberculeux.

Aujourd'hui, le traitement de la tuberculose consiste en un régime composé de plusieurs antibiotiques : l'isoniazide, l'éthambutol, le pyrazinamide et la rifampicine. Ces différents antibiotiques ont des mécanismes d'action différents. L'isoniazide (abrégé INH

ou H) est un agent bactéricide contre les bactéries en réplication alors que l'éthambutol (EMB ou E) est un agent bactériostatique à faible dose et bactéricide à forte dose. La rifampicine (RMP ou R) a un effet bactéricide. Par contre le pyrazinamide (PZA ou Z) est faiblement bactéricide mais est cependant particulièrement actif contre les bactéries vivant dans l'environnement acide des granulomes. Le pyrazinamide est actif contre les bactéries vivant dans les phagocytes ou les zones d'inflammation en général (WHO 2003, Paramasivan et al. 2005 ).

Lors de son traitement, un patient tuberculeux reçoit un régime combinant une phase initiale de INH, RMP, PZA et EMB, tous les jours pendant 2 mois. Puis, s'ensuit une phase d'entretien de INH et RIF, trois fois par semaine pendant 4 mois. La combinaison des 2 phases est connue sous la formule 2HREZ/4HR<sub>3</sub>.

Un traitement long de 6 (parfois 8 mois) a été préconisé par l'OMS afin d'éliminer les bactéries persistantes. Ces bactéries persistantes sont en phase stationnaire de croissance et ont un métabolisme très ralenti. Elles ne sont pas tuées par les antibiotiques lors des premières semaines de traitement. L'utilisation d'une combinaison de plusieurs antibiotiques permet de prévenir la sélection de mutants résistants qui résultent de l'apparition de mutations spontanées dans les gènes associés aux activités des antibiotiques utilisés. Ces mutations sont observées à des fréquences de l'ordre de 1 pour 10<sup>7</sup> bactéries pour EMB, 1 pour 10<sup>8</sup> bactéries pour INH et 1 pour 10<sup>10</sup> bactéries pour RMP (David 1970). La variabilité du mode d'action des antibiotiques utilisés permet une action combinée plus efficace.

Le patient est considéré comme guéri si après son traitement et au moins à une occasion précédente, il ne présente plus les symptômes de la tuberculose et ses expectorations ou les prélèvements biologiques sont exempts de bactéries (WHO 2003).

Généralement, les symptômes de la tuberculose disparaissent quelques semaines après le début du traitement ce qui incite souvent les patients à abandonner leur prise de médicaments. L'abandon du traitement antituberculeux avant terme augmente le risque de rechutes ou d'apparition de résistances aux antibiotiques. Afin de lutter plus efficacement contre la maladie, la stratégie DOTS ou « Directly Observed Therapy, Short-course » a été adoptée par l'OMS (<http://www.who.int/tb/dots/whatisdots/en/index.html>). Il s'agit d'observer et de suivre directement par une tierce personne chaque prise d'antibiotique de chaque patient traité pendant au moins les deux premiers mois du traitement. La stratégie DOTS implique par conséquent que la détection et l'enregistrement des tuberculeux se fassent de manière rigoureuse, avec un traitement standardisé et un approvisionnement en médicaments suffisant, tout cela sous une évaluation et un suivi stricts (Elzinga et al. 2004).

L'usage abusif des antibiotiques ou le non suivi du traitement de manière rigoureuse peuvent engendrer des tuberculoses multi-résistantes ou MDR-TB (Multi-Drug Resistance). Une souche résistante à au moins l'isoniazide et la rifampicine est qualifiée de souche MDR. Plus tard, d'autres formes de résistance aux antibiotiques appelées XDR-TB pour « EXtensively Drug-Resistant tuberculosis » ont été identifiées. Les souches XDR concernent des souches MDR résistantes aux fluoroquinolones et à un antibiotique de seconde ligne injectable, l'aminoglycoside ou la capréomycine. Ces antibiotiques de seconde ligne sont aussi utilisés pour le traitement des tuberculoses MDR (WHO 2003). D'après le rapport 2009 de l'OMS, on a estimé à environ 5% le taux de résistance multiples aux antituberculeux chez les nouveaux cas en 2007. Le traitement des patients avec des souches MDR prend plus de temps. Le traitement des souches MDR peut en effet aller jusqu'à une durée d'environ 2 ans et coûte plus cher (Jasmer et al. 2002, WHO 2009).

### **IV.5. La Prévention de la tuberculose**

Le seul vaccin antituberculeux disponible à l'heure actuelle est le vaccin mis au point en 1921 par Albert Calmette et Camille Guérin, le BCG (Bacille Calmette-Guérin). Il s'agit d'un variant d'une souche *M. bovis*. Pour obtenir le vaccin, une souche *M. bovis* a été atténuée par des séries de repiquages *in vitro* pendant 13 ans (Behr 2002). Ce vaccin est administré à environ 100 millions d'individus par an (WHO 1999). Bien que le BCG puisse prévenir contre les complications graves de la tuberculose chez l'enfant, son efficacité dans la prévention de la tuberculose pulmonaire est très controversée. Selon les populations étudiées, l'efficacité du vaccin BCG peut aller de 40% à 70% chez les enfants de 0 à 14 ans, et de 0 à 85% chez l'adulte (Bannon 1999). Par ailleurs, la vaccination par le BCG n'empêche pas la transmission de la maladie. Ce vaccin peut aussi être à l'origine d'effets secondaires graves chez les sujets immunodéprimés, en particulier les personnes infectées par le VIH et les nouveau-nés de mères séropositives (Colditz et al. 1995).

Diverses stratégies ont été déployées pour la recherche de vaccins plus efficaces aussi bien chez l'enfant que chez l'adulte. Ces recherches se sont aussi tournées vers des vaccins dont l'utilisation serait sans danger pour les sujets immunodéprimés et séropositifs au VIH (Ginsberg 2002, Okkels et al. 2003, Nor and Musa 2004). Plus d'une centaine de candidats vaccins ont été développés jusqu'à présents. En 2009, nombre d'entre eux sont en cours d'essais cliniques (Tableau 3). Parmi eux, des candidats vaccins,

développés à partir de souches vivantes ou de sous-unités vaccinales, ont été testés ou vont l'être chez l'homme. Trois sont actuellement en Phase II pour les tests d'efficacité, l'évaluation de la posologie optimale et des effets secondaires. Ces candidats vaccins devront au moins permettre d'amplifier ou d'égaliser la protection apportée par la vaccination au BCG (Hoft et al. 2008). En général, les candidats vaccins peuvent être développés de plusieurs manières. Ces candidats vaccins peuvent être produits, soit à partir de souches vivantes recombinantes de la souche BCG, modifiées pour être plus immunogènes (Grode et al. 2005 , Hoft et al. 2008), soit à partir des antigènes de *M. tuberculosis* exprimés dans un vecteur viral, comme l'antigène Ag85A porté par le virus *Vaccinia*. Ces vaccins permettraient d'amplifier la protection initialement apportée par le BCG (Warren et al. 2000, Brookes et al. 2008 , Hawkridge et al. 2008). D'autres vaccins sont développés à partir de protéines recombinantes associant des antigènes immunogènes et des adjuvants (Dietrich et al. 2006 , Magalhaes et al. 2008 , Skeiky et al. 2009, Von Eschen et al. 2009 ). Enfin, des candidats vaccins sont issus de l'inactivation de parois de mycobactéries comme *M. vaccae*. Ce genre de candidat vaccin a été testés sur des sujets séropositifs au VIH et semble ne pas générer d'effets secondaires mais au contraire stimuler la réponse immunitaire chez ces individus (Waddell et al. 2000, Vuola et al. 2003 ).

Les expérimentations sur modèles souris des candidats vaccins exploitant les propriétés de Ag85 et ESAT-6 semblent montrer une bonne protection contre la tuberculose (Dietrich et al. 2005). Cependant, étant donné que l'ESAT-6 est aussi utilisé efficacement dans le diagnostic d'une infection aux MTBC, d'autres antigènes comme le CFP-7 ou TB10.4, avec un pouvoir immunogène tout aussi important ont été utilisés dans les candidats vaccins (Magalhaes et al. 2008 , Skeiky et al. 2009, Billeskov et al. 2010 ). Le CFP-7 fait partie de la famille ESAT-6, dont les gènes sont retrouvés dans les bactéries MTBC, incluant le BCG mais qui semble ne pas être retrouvé chez les autres mycobactéries (Skjot et al. 2002).

Après l'évaluation de la protection apportée par ces vaccins chez différents modèles animaux, les tests d'immunogénicité chez l'homme se réalisent en étudiant la capacité des individus immunisés à stimuler une réponse immunitaire cellulaire et une réponse humorale avec un profil de sécrétion de cytokine du type Th1. La sécrétion d'IFN $\gamma$  détectée par les IGRA et la prolifération des cellules immunitaires effectrices, en particulier les cellules T, impliquées dans la réponse immune contre la tuberculose par la cytométrie de flux sont généralement utilisées pour évaluer les candidats vaccins dans les essais cliniques chez l'homme. Une étude récente a comparé l'efficacité de différents tests de détection de l'IFN $\gamma$  utilisés pour évaluer la réponse immunitaire pour un candidat vaccin (le

MVA85A ou *M. vaccae* Antigen 85A). Cette étude a montré que bien que le seuil de détection d'IFN $\gamma$  soit le plus élevé pour les tests ELISA sur sang total, le test *ex vivo* ELISPOT était le plus sensible à long terme pour la détection d'une réponse immunitaire post-vaccinale (Beveridge et al. 2008).



**Tableau 3. Liste des candidats vaccins en cours d'essais cliniques en 2009 (Source Stob TB Partnership Working Group New TB Vaccines)**

Type de vaccin	Produit	Description du produit	Sponsor	Indications	Status en 2009
Recombinant vivant	VPM 1002	Souche rBCG de Prague exprimant la listeriolysine et portant une mutation par délétion d'une uréase	Max Plank, Vakzine Projekt Management GmbH, TBVI	Primovaccination	Phase I
	rBCG30	Souche rBCG de Tice exprimant de l'antigène 85B de 30 kDa de Mtb, Phase I complétée aux USA	UCLA, NIH, NIAID, Areas	Primovaccination	Phase I [non concluante]
Vecteur Viral	Oxford MVA85A / AERAS-485	Vecteur Vaccinia Ankara modifiée exprimant l'antigène 85A de Mtb	OETC, Aeras	Booster, Post-infection, Immunothérapie	Phase II b
	Crucell Ad35 / AERAS-402	Vecteur adenovirus 35 ayant une déficience de réplication et exprimant les antigènes 85A, 85B et TB10.4	Crucell, Aeras	Booster	Phase II
	AdAg85A	Vecteur adenovirus 5 exprimant l'antigène 85A	McMaster University	Primovaccination, Booster	Phase I
Protéines Recombinantes	Hybrid-I+IC-31	Protéine recombinante adjuvantée composée des antigènes de Mtb 85B et ESAT-6	SSI, TBVI, Intercell	Primovaccination, Booster, post-infection	Phase II a
	Hybrid-I+CAF01	Protéine recombinante adjuvantée composée des antigènes de Mtb 85B et ESAT-6	SSI	Primovaccination, Booster, post-infection	Phase I
	M72	Protéine recombinante composée de la fusion d'antigènes Mtb Rv1196 et Rv0125 avec adjuvant	GSK, Aeras	Booster, post-infection	Phase II
	HyVac4 / AERAS-404	Protéine recombinante adjuvantée composée des antigènes de Mtb 85B et TB10.4 fusionnés	SSI, Sanofi-Pasteur, Aeras, Intercell	Booster	Phase I
Autres	RUTI	Fragments cellulaires de Mtb	Archivel Farma, SI; Badalogue, Espagne	Booster, Post-infection, Immunothérapie	Phase I Phase III complétée chez des sujets VIH vaccinés par le BCG;
	<i>M. vaccae</i>	Cellules de mycobactéries non-TB inactivées	NIH, Aeras, Immodulon	Booster, Post-infection, Immunothérapie	reformulation en attente
	<i>M. smegmatis</i>	Extrats cellulaires; Phase I complétée en Chine	Wuhan Inst. Of Biol. Products	Booster, Post-infection, Immunothérapie	Phase I [non concluante]

## **V. LA DIVERSITE GENETIQUE DES BACTERIES ET LES PHENOTYPES**

Alors que les observations faites suite à la comparaison de souches MTBC avaient conduit à penser que ces variations étaient minimales, l'essor des outils génétiques et de la génomique mycobactérienne suggère aujourd'hui l'existence d'une diversité génétique plus importante au sein des bactéries MTBC. La structure phylogéographique des populations de *M. tuberculosis* avec des groupes ethniques humains montre une certaine corrélation entre les familles de souches de pathogènes et leur hôte humain (Gagneux and Small 2007). Cette corrélation peut être due, d'une part, au fait qu'il n'y a pas ou peu de compétition de la part des autres souches, ou d'autre part, à cause d'une transmission non contrôlée ou défaillance des outils de détection des souches. Aujourd'hui, de plus en plus d'études suggèrent le facteur d'origine bactérienne comme l'un des plus importants dans le processus de développement et de dissémination de la tuberculose (Hirsh et al. 2004 , Wirth et al. 2008).

### **V.1. Diversité génétique et virulence des souches *M. tuberculosis***

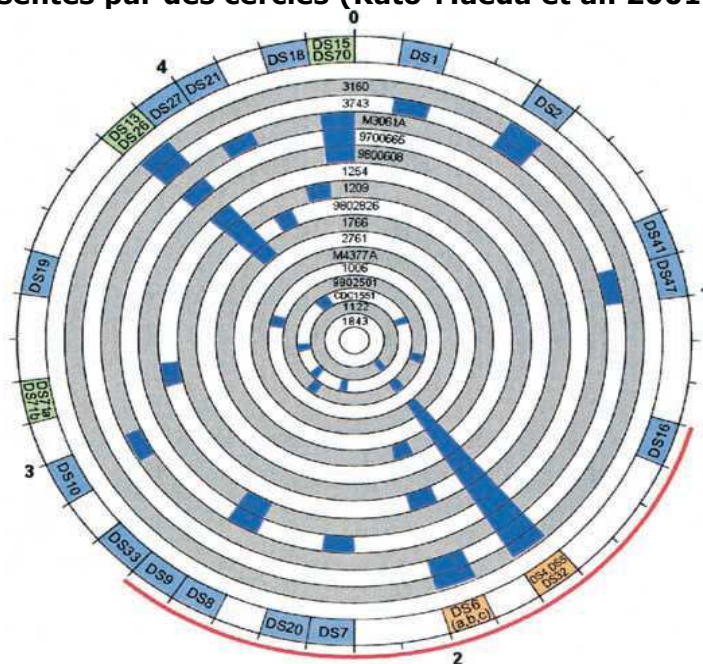
Les études menées chez le cobaye furent parmi les premières à suggérer l'existence d'une variation de la virulence selon les souches *M. tuberculosis*. L'infection de cobayes par différentes souches suggère que les isolats cliniques de patients tuberculeux d'origine indienne semblent moins virulents que ceux isolés de patients provenant de Grande-Bretagne (Mitchison et al. 1961 , Collins and Smith 1969). D'autres expérimentations animales montrèrent plus tard l'existence d'une variation du phénotype entre différentes souches de *M. tuberculosis*. L'infection de lapins par la souche CDC1551 produit des tubercules de plus petite taille avec moins de bacilles par comparaison avec la souche de laboratoire H37Rv (Bishai et al. 1999). Une croissance plus rapide de la souche H37Rv dans les modèles animaux suggère par ailleurs que celle-ci est plus virulente que la souche CDC1551 (North et al. 1999). L'expression différentielle d'un certain nombre de gènes entre souches virulentes et non virulentes contribuerait aux phénotypes observés (Gao et al. 2005).

En étudiant le polymorphisme de 19 souches différentes de *M. tuberculosis*, Kato-Maeda et ses collègues ont observé une augmentation du nombre de délétions génomiques selon les différentes souches étudiées (Figure 19). La diminution de la taille du génome de ces souches a été associée à une diminution de la cavité tuberculeuse

## Introduction

chez l'hôte infecté. Les souches ayant le plus de délétions dans leur génome semblent moins transmissibles et moins virulentes (Kato-Maeda et al. 2001). D'après d'autres études, la délétion au niveau du gène *Pks15/1* a été étudiée. Il semble que le gène *Pks15/1* soit impliqué dans l'évasion du système immunitaire de l'hôte par les bactéries du complexe où il est intact (Reed et al. 2004). Chez les souches Euro-Américaines (Haarlem, LAM, X et T) l'existence de la délétion de 7 paires de bases inactivant le gène *Pks15/1* est associée à une diminution de la mortalité des patients atteints de tuberculose pulmonaire, ainsi qu'à un faible taux de tuberculose de type extrapulmonaire (Caws et al. 2008).

**Figure 19. Comparaison des délétions génomiques de plusieurs génomes de *M. tuberculosis*, représentés par des cercles (Kato-Maeda et al. 2001)**



Les délétions génomiques peuvent être avantageuses pour la bactérie. Les délétions de certaines régions permettent d'échapper au système immunitaire de l'hôte. Dans le cas de certaines souches retrouvés des délétions sur des gènes de régulation ou d'autres gènes peuvent rendre le système immunitaire de l'hôte moins efficace. Ces délétions rendent alors des souches hypervirulentes (Tsolaki et al. 2004 , ten Bokum et al. 2008).

## **V.2. Diversité génétique des souches *M. tuberculosis* et variations de la réponse immunitaire chez l'hôte**

Plusieurs études suggèrent que la réponse immunitaire de l'hôte varie avec la nature des souches bactériennes infectantes. L'expression des cytokines par le système immunitaire peut varier selon la nature de la souche infectante. Par exemple, la souche CDC1551 semble induire une forte réponse pro-inflammatoire avec une production plus élevée de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12 et IFN $\gamma$  chez les macrophages. Par contre, la souche *HN878* (de la famille Beijing) induit l'expression de cytokines modulatrices de la production de macrophages (Manca et al. 1999). La différence entre ces deux souches semble être liée à la délétion de 7bp au niveau du gène *Pks15/1*. Cette délétion entraînerait une différence de la composition lipidique de leur paroi bactérienne et influencerait l'immunogénicité des souches (Reed et al. 2004 , Tsenova et al. 2005 , Sinsimer et al. 2008).

L'infection *in vitro* de macrophages issus de moelle osseuse de souris par 3 souches de génotypes différents de mycobactéries indique que la souche Beijing stimule une sécrétion de iNOS plus importante par rapport aux souches *M. canetti* et H37Rv. Les souches Beijing induiraient une réponse de type Th1 plus importante au dépend de l'IL-10, contrairement aux réponses des autres souches. Cependant, *in vivo*, cette réponse protectrice de l'hôte diminue pendant une infection chronique à des souches Beijing (Chacon-Salinas et al. 2005). En effet, d'autres études ont montré que les souches W/Beijing induisent la production d'un profil d'expression de cytokines de type Th2 chez des monocytes du sang périphérique humain, modérant la réponse immunitaire de type Th1 de l'hôte (Manca et al. 2004). Par ailleurs, à partir d'expérimentations sur des macrophages issus du sang humain activés par l'IFN $\gamma$ , il a été observé qu'après l'infection par des isolats cliniques hypervirulents de *M. tuberculosis*, les profils d'expression de cytokines des cellules variaient selon les profils IS6110 des souches. Les souches avec un profil Beijing induiraient ainsi une réponse TNF $\alpha$  significativement plus faible comparée aux autres familles de souches *M. tuberculosis* testées (Wong et al. 2007).

D'autres observations semblent indiquer une variation de la production d'IFN $\gamma$  selon la nature des souches ou des antigènes utilisés pour stimuler cette production. En effet, une étude sur la protection contre la tuberculose chez les bovins apportée par deux souches vaccinales *M. bovis* Pasteur et *M. bovis* du Danemark a montré que la production d'IFN $\gamma$  variait selon la nature des souches vaccinales utilisées chez l'hôte (Wedlock et al. 2007). Cette étude a cependant montré que malgré cette différence, les deux vaccins étaient apparemment protecteurs. Par ailleurs, dans une autre étude, la sécrétion d'IFN $\gamma$

après la stimulation de cellules T par la PPD issue de mycobactéries environnementales est plus élevée que la production d'IFN $\gamma$  après stimulation par la PPD provenant de *M. tuberculosis* (Black et al. 2002, Black et al. 2003). Une étude récente montre que les souches Beijing induisent une même réponse de type Th1 que les souches non-Beijing. Cependant, la tuberculose observée chez les patients infectés par des souches Beijing est moins symptomatique. Elle est caractérisée par une réponse immune avec un profil de cytokine de type Th2 plus important que la tuberculose causée par des souches non-Beijing (Sun et al. 2006).

### **V.3. Diversité génétique des souches *M. tuberculosis* et variation des signes cliniques de la tuberculose**

Des facteurs génétiques de la bactérie sont associés aux formes cliniques de tuberculose. La présence d'insertions d'IS6110 ou de délétions au niveau des gènes codant pour la phospholipase C, comme le gène *p/c D*, impliquée dans la structure de la paroi bactérienne, semble favoriser l'apparition de la forme extrapulmonaire de la tuberculose. Ces observations varient cependant selon les patients (Kong et al. 2005). Par ailleurs, les insertions/délétions de grande taille ou les mutations pouvant changer la phase de lecture au niveau du gène de PE\_PGRS33 sont associées à l'absence de cavités dans les poumons par comparaison au gène non muté (Talarico et al. 2005). La tuberculose causée par des souches Beijing est moins symptomatique, avec moins de fièvre, moins de cavitations tuberculeuses. Les sujets infectés par des souches Beijing semble produire moins de sueurs nocturnes que la tuberculose causée par des souches non-Beijing (Sun et al. 2006).

Des études plus récentes sur les signes cliniques de la tuberculose pulmonaire et de la méningite tuberculeuse montrent que la radiographie pulmonaire de patients infectés par des souches d'origine Euro-américaines présente des consolidations pulmonaires plus nettes par comparaison aux radiographies obtenues de patients infectées par d'autres lignées de *M. tuberculosis*. Les consolidations pulmonaires sont causées par les espaces d'air remplis par des cellules inflammatoires. Les variations de ces consolidations peuvent être dues à une réponse inflammatoire différentielle selon les lignées bactériennes. Par ailleurs, la durée de la méningite tuberculeuse semble être altérée par les souches d'origine Est-asiatiques et les souches Beijing. Les méningites causées par ces souches ont en effet une durée plus courte. Ces méningites sont précédées de fièvre

avec moins de fluide cérébrospinal par comparaison à la méningite causée par des souches appartenant à d'autres lignées (Thwaites et al. 2008).

Des études réalisées sur différents modèles d'infection montrent que la réponse immune et le développement du processus infectieux varient selon le génotype de la souche *M. tuberculosis* infectante. Chez la souris, certaines souches de *M. tuberculosis* ont une virulence plus élevée que d'autres. La souche HN878 de la famille Beijing conduit à un taux de mortalité plus élevé dans le modèle murin (Manca et al. 2001). La souche Beijing semble induire une réponse immunitaire non protectrice après injection intra-trachéale chez la souris BALB/c, accentuant sa virulence par comparaison avec 4 autres lignées différentes de *M. tuberculosis* (Lopez et al. 2003). Chez l'homme, la transmission des bactéries semble être influencée par la vitesse de croissance intracellulaire chez l'hôte ainsi que le profil d'expression des cytokines. Ces deux facteurs sont tous deux associés au génotype des souches de *M. tuberculosis*. En effet, les isolats bactériens de la famille Beijing semblent se multiplier plus rapidement dans les cellules THP-1 que les souches isolées appartenant à d'autres familles. Une souche de la famille Beijing (la souche 210) a causé plus de 25% des cas de tuberculose au centre de Los Angeles en 1996-1999 et elle est largement répandue dans le monde (Zhang et al. 1999 , Theus et al. 2005).

### **V.4. Corrélation entre génotype de la bactérie et celui de l'hôte**

Des observations assez récentes suggèrent qu'il existe une certaine corrélation entre la variabilité génétique des pathogènes et la structure génétique des populations humaines hôte (Cavalli-Sforza and Feldman 2003). L'étude de microsatellites chez l'homme permet de classer les variations génétiques humaines en 6 grands groupes génétiques. Ces groupes génétiques humains semblent correspondre eux aussi avec les grandes régions géographiques retrouvées chez les mycobactéries (Rosenberg et al. 2002 , Gagneux et al. 2006). Dans une étude récente, Intemann et ses collaborateurs ont montré une association entre la délétion des 7 paires de bases inactivant le gène *Pks15/1* retrouvée chez les souches *M. tuberculosis* de la lignée Euro-Américaine avec la protection de l'hôte apportée par un variant -261TT du gène IRGM (Immunity-Related GTPase M). Ce gène est impliqué dans l'autophagie des bactéries chez l'homme (Intemann et al. 2009). De même, une autre étude sur des patients d'origine Vietnamiennne montre que les individus portant l'allèle C du gène du récepteur TLR-2

(T59C) sont plus associées à une infection causée par les souches de types Est-Asiatiques et Beijing que les autres individus (Caws et al. 2008).

Les différents phénotypes issus de la diversité génétique des souches de *M. tuberculosis* doivent être pris en considération pour le développement de nouveaux outils afin de lutter contre la tuberculose (Gagneux and Small 2007 , Palanisamy et al. 2009).

## **VI. PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE**

La tuberculose est responsable d'une morbidité importante dans le monde. Cette maladie tue environ 2 millions de personnes chaque année. Les pays en voie de développement où sévit chaque année plus des 90% des nouveaux cas de tuberculose sont les plus touchés par le fléau (Parry and Davies 1996). L'ampleur de la maladie est par ailleurs aggravée par l'émergence de maladies touchant le système immunitaire comme le VIH-SIDA, ainsi que par l'apparition de souches multi-résistantes aux antibiotiques qui rendent les traitements insuffisants pour contrôler la maladie. La lutte contre la tuberculose nécessite de ce fait le développement de nouveaux traitements, de moyens de diagnostic rapide et de nouveaux vaccins (Raviglione 2003).

De nouveaux candidats vaccins contre la tuberculose sont aujourd'hui en cours de développement afin d'améliorer l'efficacité ou de supplanter le seul vaccin utilisé massivement en ce moment, le BCG. Certains d'entre eux sont en cours d'essais cliniques chez l'homme et devraient être évalués dans les pays les plus touchés par la maladie (Baldwin et al. 1998, Ginsberg 2002 ). L'évaluation de l'efficacité d'un nouveau vaccin est en principe réalisée en comparant le risque de développer la maladie chez un groupe de sujets ayant reçu ce candidat vaccin avec un groupe de sujets non vaccinés ou vaccinés par le vaccin préexistant. Or, le délai entre le moment de l'infection et le début de la maladie peut prendre plusieurs années dans le cas de la tuberculose. Par conséquent, l'évaluation de l'efficacité d'un nouveau vaccin chez l'homme demandera de longues années de suivi. Cela entraînerait aussi un coût élevé (WHO 1999). L'alternative à ces problèmes est d'utiliser des marqueurs de susceptibilité ou des marqueurs de protection pour évaluer les vaccins potentiels contre la tuberculose chez l'homme.

Lors des essais cliniques vaccinaux chez l'homme, la réponse immunitaire vaccinale est généralement évaluée par la production d'IFN $\gamma$  et la prolifération des lymphocytes T chez les individus immunisés par les antigènes du candidat vaccin. La réponse immunitaire de l'hôte contre la tuberculose est liée à une immunité à médiation cellulaire

associée à un profil de sécrétion de cytokine du type Th1. L'interféron gamma tient une place importante dans cette immunité anti-tuberculeuse. L'IFN $\gamma$  entre dans l'activation de la phagocytose des cellules infectées et l'arrêt de la multiplication et de la prolifération des bactéries MTBC en général (Dorman and Holland 2000 , Ellner et al. 2000).

La réponse immune contre l'infection des bactéries MTBC varie cependant selon le génotype des souches BK. Plusieurs études *in vitro* et *ex vivo* ont montré la variation de la sécrétion de cytokines par les cellules ou les individus infectés selon la nature des souches BK utilisées (Dietrich et al. 2006 , Magalhaes et al. 2008 , Skeiky et al. 2009 , Von Eschen et al. 2009 , Wallis et al. 2009).

En effet, il existe une grande diversité génétique au sein des bactéries du complexe *M. tuberculosis*. Ces variations génétiques ont des répercussions sur le phénotype des souches. Elles influent aussi bien sur la virulence des souches, la présentation des signes cliniques de la tuberculose que sur la réponse immunitaire de l'hôte infecté. Parmi ces variations génétiques, il y a le locus DR, une région hypervariable du génome bactérien. Le polymorphisme du locus DR semble être associé à l'origine géographique des patients tuberculeux.

Ce locus DR appartient à une famille de séquences répétées entrecoupées, partiellement palindromiques, la famille des séquences *CRISPR* (Gordon et al. 1999a). Grâce au polymorphisme des spacers au niveau de ce locus, il est utilisé pour typer des souches MTBC par le spoligotypage (Groenen et al. 1993 , Kamerbeek et al. 1997). Plusieurs observations mentionnent l'existence de souches mycobactériennes plus virulentes selon les modèles expérimentaux utilisés ou des souches avec des profils spoligotypes plus prévalentes selon les régions d'étude. Des souches ayant des profils spoligotypes différents semblent aussi présenter des réponses immunitaires différentes.

L'influence du polymorphisme génétique des souches *M. tuberculosis* au niveau du locus DR sur la réponse immunitaire, traduite par la production d'IFN $\gamma$  devrait être connue. Elle permettrait d'adapter les essais cliniques aux régions géographiques où ils sont menés. Cela permettrait d'évaluer plus efficacement la protection apportée par les candidats vaccins et affiner ainsi les stratégies menées dans la lutte contre la tuberculose.

De récentes observations sur les *CRISPR* et les gènes qui leurs sont associés montrent qu'ils sont impliqués dans le maintien de l'intégrité génomique des bactéries qui les possède. Ainsi, le polymorphisme observé au sein des spacers des *CRISPR* semble être lié à une « immunité » bactérienne contre les invasions des bactériophages. Ces *CRISPR* semblent associés aux échanges de matériels génétiques par les transferts



horizontaux de gènes (Horvath and Barrangou 2010). Ces transferts horizontaux auraient ainsi façonné les CRISPR et seraient à l'origine des spacers retrouvés dans ces régions (Marraffini and Sontheimer 2009).

D'autres épisodes de transferts horizontaux de gènes auraient aussi façonné le génome de mycobactéries. Des séquences d'ADN regroupées en modules, ayant des caractéristiques des îlots génomiques ont été récemment détectées chez quelques souches appartenant au MTBC. Les transferts horizontaux de matériels génétiques ont aussi participé à façonner les génomes de ces bactéries. Alors que ces transferts horizontaux semblent avoir contribué à l'évolution des bactéries du genre *Mycobacterium*, jusqu'à l'apparition des bactéries MTBC, l'importance de ces transferts horizontaux dans la diversité et la virulence des souches MTBC demeure aujourd'hui presque inexplorée.

### **- Objectifs de l'étude :**

L'objectif de ces travaux est de mieux comprendre la relation entre la diversité génétique des souches cliniques de *M. tuberculosis* et les caractères de virulence.

Le présent travail a consisté à étudier la diversité génétique des souches *M. tuberculosis*, d'abord en évaluant les effets de la diversité des souches sur la réponse immunitaire de l'hôte infecté puis, en étudiant les facteurs génétiques bactériens pouvant être à l'origine de cette diversité, en particulier les transferts horizontaux.

Il s'agit ici:

1. De déterminer les impacts du polymorphisme génétique au niveau du locus DR sur la réponse immunitaire associée à la tuberculose, en évaluant la production d'IFN $\gamma$ , chez différents sujets comprenant des patients tuberculeux et leurs contacts proches.
2. D'étudier le polymorphisme génétique d'îlots génomiques spécifiques MTBC à partir de souches cliniques isolées des patients pour déterminer l'existence éventuelle d'une corrélation entre le génotype des souches et leur phylogénie.
3. D'étudier les corrélations entre le polymorphisme de différentes régions acquises par transferts horizontaux dans le génome des MTBC: les îlots génomiques et le locus CRISPR.

# **Deuxième partie : RESULTATS EXPERIMENTAUX**

## **I. VARIATIONS DE LA REPONSE IMMUNITAIRE EN FONCTION DU GENOTYPE DES SOUCHES *M. tuberculosis* CHEZ LES TUBERCULEUX ET LEURS CONTACTS (ARTICLE EN ANNEXE).**

### **I.1. Présentation des travaux**

La majorité des sujets exposés à *M. tuberculosis* ne développent pas la tuberculose car beaucoup de ces sujets infectés restent asymptomatiques, avec une tuberculose latente. Une évaluation plus précise de la réponse immunitaire chez l'homme face aux infections à *M. tuberculosis* permettrait de distinguer les sujets risquant de développer une tuberculose active. La production d'IFN $\gamma$  est largement utilisée comme biomarqueur pour étudier l'infection et examiner la réponse immune spécifique aux antigènes de *M. tuberculosis* chez l'homme. La diversité génétique des souches entraîne cependant des variations dans les réponses immunitaires. Les influences de cette diversité génétique sur la réponse immunitaire et l'issue clinique d'une infection demeurent encore peu explorées.

Lors de ces travaux, nous avons évalué la production d'IFN $\gamma$  de cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) suite à la stimulation d'antigènes de *M. tuberculosis* chez 2 cohortes d'individus recrutés à Antananarivo, Madagascar. Les cohortes recrutées sont composées de patients tuberculeux pulmonaires à microscopie positive (cas index) et leurs contacts proches du même foyer que les cas index. Les isolats cliniques des patients ont été typés par typage du locus DR par la technique du spoligotyping.

Les analyses des réponses IFN $\gamma$  en fonction du spoligotype des isolats cliniques des patients montrent que les souches « modernes », dont celles de la famille Beijing et CAS, ont tendance à stimuler moins d'IFN $\gamma$  que les souches anciennes, notamment celles de la famille EAI chez les patients et leurs contacts.

### **I.2. Méthodologie**

#### **I.2.1. Site et sujets d'étude :**

Les nouveaux patients tuberculeux avec crachats à microscopie positive (appelé cas index –CI) âgés de plus de 15 ans ont été recrutés dans le principal centre anti-tuberculeux d'Antananarivo. Les sujets contacts proches, de même foyer que les cas index ont été

visités à domicile par les cliniciens pour être invités à rejoindre l'étude. Ceux âgés de plus de 1 an et ayant vécu dans le même foyer que le cas index au moins pendant 6 mois ont été inclus dans l'étude. Seuls les individus ayant consentis à effectuer un test VIH et à donner leur consentement éclairé pour toute l'étude ont été inclus. Des prélèvements sanguins veineux ont été réalisés pour chaque sujet. Le sang a été collecté dans un tube hépariné pour le test ELISPOT et dans un tube sec pour le test VIH. Les sujets séro-positifs au VIH ont été exclus de l'étude.

Les sujets contacts ont été soumis à des tests IDR. Une radiographie des poumons et des examens cliniques plus poussés ont été réalisés sur les sujets positifs au test IDR au moment de l'inclusion dans l'étude ou après une conversion lors du suivi. Les individus diagnostiqués avec une TB maladie ont alors été acheminés vers les centres de traitements anti-tuberculeux. Pour tous les sujets, les données épidémiologiques, cliniques et bactériologiques ont été archivées.

L'étude a été approuvée par le Comité national d'éthique ainsi que par le Ministère de la Santé de Madagascar.

### **I.2.2. Procédures de mycobactériologie:**

Les procédures ont été décrites par Rakotosamimanana *et al.*, (Rakotosamimanana et al. 2010 article en annexe). Brièvement, les crachats collectés des patients tuberculeux ont d'abord été décontaminés puis une partie examinée sous microscope pour la détection des bactéries BAAR. Les crachats décontaminés ont été inoculés dans des tubes contenant du milieu LJ puis incubés à 37°C pendant plus de 3 semaines. Les mycobactéries ont alors été identifiées selon leur croissance sur milieu LJ, leur morphologie et selon les tests biochimiques (production de niacine, catalase, uréase et nitrate réductase).

Des antibiogrammes ont ensuite été réalisés sur les souches *M. tuberculosis* isolées avec les anti-tuberculeux de première ligne, selon la méthode des proportions sur milieu LJ.

### **I.2.3. Spoligotypage:**

L'ADN génomique a été extrait des cultures de *M. tuberculosis*. Le spoligotypage des *M. tuberculosis* isolées a été réalisé selon la méthode décrite par Kamerbeek et ses collaborateurs (Kamerbeek et al. 1997). Les groupes de souches *M. tuberculosis* ont été définis quand un ou plusieurs isolats ont des profils spoligotypes identiques. Les

spoligotypes ainsi que les familles spoligotypes ont été assignés par comparaison des profils spoligotypes avec ceux des bases de données spoligotypes (SITVIT et SPoIDb4).

### **I.2.4. Tests ELISPOTS:**

Les procédures sont celles décrites dans Rakotosamimanana et al., (article en annexe). Brièvement, dans les 4h après la collecte des prélèvements, les PBMC ont été séparées du sang hépariné par centrifugation sur gradient de Ficoll-Hypaque. Les PBMC isolées ont ensuite été lavées puis diluées de façon à avoir  $2 \times 10^6$  cellules viables/ mL par échantillons pour les tests ELISPOT. Les tests *ex vivo* ELISPOT ont été réalisés avec l'anticorps de capture anti-IFN $\gamma$  humain de souris. Pour cette étude, le PPD ainsi que les antigènes recombinants ESAT-6 et CFP-7 ont été utilisés comme stimulateurs de la production d'IFN $\gamma$  par les PBMC. La phytohémagglutinine a été utilisée comme contrôle positif et le RPMI comme contrôle négatif. Les spots de chaque puits ont été comptés par deux lecteurs indépendants. Le point de décision pour la positivité du test ELISPOT est égal au nombre moyen de cellules formant des spots retrouvé chez les puits non stimulés + 1,64 écarts-types.

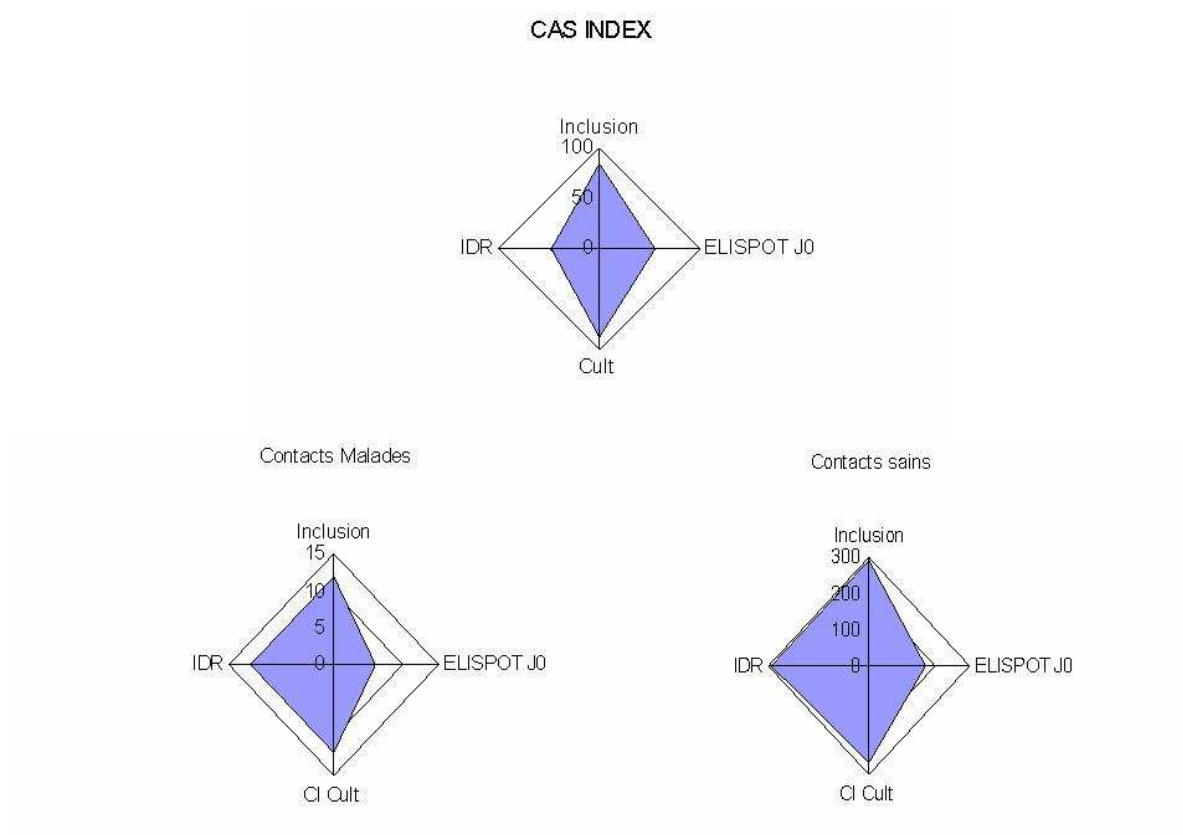
### **I.2.5. Gestion des données et analyses statistiques:**

Les données ont été enregistrées dans des bases de données Access et Excel où les erreurs ont été vérifiées. Les analyses statistiques ont été faites sur les programmes Statistica et EpiInfo (version 6). Les différentes comparaisons ont été testées par Kruskal-Wallis, le test exact de Fischer ou par le test U de Mann-Whitney. Une valeur de  $p < 0,05$  est considérée comme statistiquement significative.

## **I.3. Sujets retenus pour l'étude**

Quatre-vingt cinq patients tuberculeux (appelés cas index) et 293 de leurs contacts proches, de même foyer que les cas index, ont été recrutés pour l'étude et ont été suivis pendant une période de 1 à 2 ans. Suite à des résultats non interprétables pendant la mise en place de l'étude lors de l'inclusion des sujets, certains résultats ELISPOT n'ont pas été considérés (Figure 20). Tous les sujets sont d'origine Malgache et sont séronégatifs au VIH (Tableau 4).

**Figure 20. Répartition des sujets de l'étude selon les groupes de sujets et les tests effectués à l'inclusion.**



La proportion des sujets testés par ELISPOT et IDR est donnée. Cult : Proportion de cas index avec une culture TB ; CI Cult : Proportion de contacts avec un cas index ayant réalisé une culture TB.

**Tableau 4. Caractéristiques des individus pour lesquels les données ELISPOT ont été obtenues à la période d'inclusion.**

Cohort	Cas Index	Contacts TB <sup>1</sup>	Contacts sains <sup>2</sup>	
<b>No. individus</b>	55	6	169	
<b>Moyenne d'âge</b> [répartition]	35,38 [17-70]	21 [2-47]	20,95 [1-79]	
<b>Sexe M</b>	31	3	79	
<b>F</b>	24	3	90	
<b>TST à D zéro</b>				
<b>Négatif</b>	4	0	38 (22,5%)	
<b>5-14 mm</b>	10	0	46 (27,2)	
<b>≥15mm</b>	12	6 (100%)	84 (49,7%)	
<b>NF</b>	29	0	1	
<b>Vaccination BCG</b>				
<b>Oui</b>	40	6	150	
<b>Non</b>	6	0	9	
<b>IND</b>	9	0	10	
<b>IFN<math>\gamma</math> ELISPOT positif<sup>3</sup></b> avec les antigènes				
<b>CFP7</b>	65,45%	66,6%	51,48%	<i>P=0,16</i>
<b>ESAT6</b>	61,8%	50%	43,78%	<i>P=0,066</i>
<b>PPD</b>	94,54%	100%	74,55%	<i>P=0,0026</i>

<sup>1</sup> Contacts sains à l'inclusion et tombés malades durant le suivi lors de l'étude

<sup>2</sup> Contacts restés sains jusqu'à la fin de l'étude

<sup>3</sup>Le seuil de positivité est déterminé à partir du nombre de spots obtenu des puits avec les PBMC non stimulées + 1,64 écart-types.

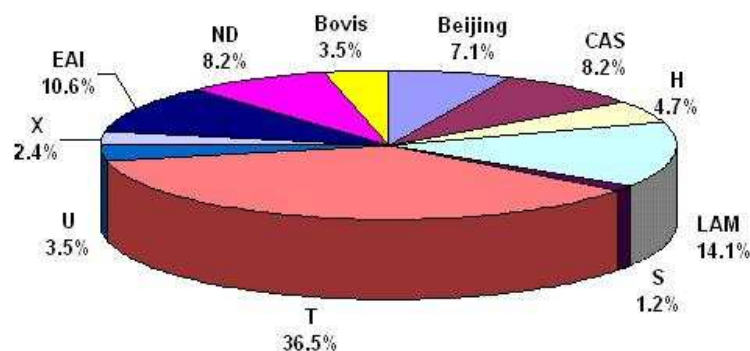
M : masculin, F : féminin ; NF : non fait ; IND ; indéterminé.

Les isolats cliniques de 81 cas index ont été typés par spoligotypage. A partir de la comparaison des profils spoligotypes avec ceux de la base de données SpolDb4, les

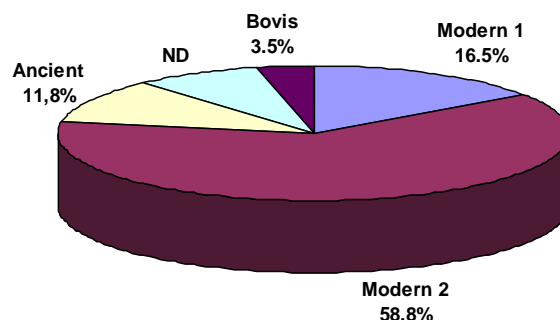
différentes souches ont été classées en 10 familles différentes (Figure 21). La distribution des familles des souches typées est ainsi similaire à celle de familles de souches d'études ultérieures. Pour les différentes analyses, les familles de souches obtenues à partir des profils spoligotypes ont été classées selon le schéma évolutif préétabli des souches MTBC, généré à partir de la combinaison de plusieurs marqueurs génétiques fréquemment utilisés en mycobactériologie, spoligotyping, MIRU-VNTR, et SNP sur *katG* et *gyrA* (Figure 8 et Figure 11). Les souches typées ont ainsi été groupées en souches « anciennes », regroupant principalement les souches Est-africaines et Indiennes (EAI), ainsi qu'en groupe de souches « modernes », avec le sous-groupe « moderne 1 », incluant les familles Beijing et CAS et le sous-groupe « moderne-2 » contenant les souches T, Haarlem, LAM, X et S (Figure 21b).

**Figure 21. Répartition des familles de spoligotype retrouvées parmi les souches cliniques isolées des cas index.** (A) Familles de profils spoligotypes selon les données de la base SpolDB4 (Brudey et al, 2006). (B) Répartition des groupes de familles de souches isolées des souches cliniques de patients tuberculeux; CAS: Central Asian; EAI: East African Indian; LAM: Latino-Américaine méditerranéenne.

A)



B)





#### I.4. Influence du spoligotype des souches sur la charge bacillaire

La charge bacillaire dans les prélèvements obtenus des 81 patients tuberculeux pulmonaire à microscopie positive a d'abord été étudiée par énumération des bactéries après microscopie BAAR à partir d'expectorations des patients (Tableau 5). D'autre part, le nombre de colonies observées sur milieu LJ après culture des isolats cliniques a aussi été considéré. Bien que non significatif statistiquement, les souches ayant des spoligotypes avec un profil CAS et Beijing donnent une charge bacillaire plus faible que les autres profils. Toutes les souches sont susceptibles aux anti-tuberculeux excepté une souche ayant un profil LAM, résistante à l'isoniazide, et une autre souche avec un spoligotype de type HAARLEM, multi-résistante à la fois à la streptomycine, l'isoniazide, la rifampicine et l'éthambutol.

**Tableau 5. Charge bacillaire obtenue chez les patients tuberculeux à microscopie positive selon le spoligotype des souches infectantes.**

Spoligotypes	<i>M. bovis</i>	CAS / Beijing	groupe Modern 2	EAI	<i>p</i>
<b>No. BAAR</b>					
≥ 100 BAAR / champs	nd	4 (28,6%)	23 (45,1%)	4 (40%)	NS
< 100 BAAR / champs	nd	10 (71,4%)	28 (54,9%)	6 (60%)	NS
<b>No. d'UFC sur milieu LJ</b>					
≥ 300 UFC / tube	1	8 (57,1%)	35 (68,6%)	5 (50%)	NS
< 300 UFC / tube	2	6 (42,9%)	16 (31,4%)	5 (50%)	NS

nd: non déterminé

NS : non significatif

UFC: unité formant les colonies

### **I.5. Influence du spoligotype des souches sur la réponse IFN $\gamma$ -ELISPOT des patients tuberculeux**

Les tests IFN $\gamma$ -ELISPOT ont été réalisés à partir de prélèvements de sang périphérique de 230 personnes recrutées, comprenant 55 cas index et 175 de leurs contacts proches, remplissant les critères d'inclusion de l'étude. La stimulation des PBMC avec tous les antigènes étudiés (la PPD, le CFP-7 et l'ESAT-6) montre que la proportion de cellules produisant l'IFN $\gamma$  est plus importante chez les cas index par comparaison avec leurs contacts proches sains, avec cependant des différences non significatives pour CFP-7 et ESAT-6 (Tableau 4).

Par ailleurs, après stimulation par l'ESAT-6, les PBMC prélevées de patients infectés par des bactéries ayant un profil spoligotype correspondant aux familles Beijing et CAS produisent significativement moins d'IFN $\gamma$  que les cellules prélevées sur des patients infectés par des bactéries appartenant aux autres familles de spoligotype (Figure 22a,  $p=0,037$ ). A la fin du traitement anti-tuberculeux, les PBMC de patients guéris qui ont été infectés par des bactéries avec des profils spoligotypes différents, ne montrent aucune différence significative dans la production d'IFN $\gamma$ . La stimulation des PBMC par le PPD et le CFP-7 ne montre aucune différence statistiquement significative entre les familles de spoligotype (Figure 22b).

### **I.6. Influence du spoligotype des souches sur la réponse IFN $\gamma$ -ELISPOT des contacts proches de patients tuberculeux**

Les tests IFN $\gamma$ -ELISPOT ont été réalisés sur les contacts proches des patients tuberculeux (les cas index). Les analyses ont été faites en fonction du spoligotype de la souche isolée de chacun de ces cas index (Figure 23). Ainsi, la stimulation par les antigènes ESAT-6 et PPD de PBMC prélevés de contacts proches dont les patients tuberculeux ont été infectés par des souches bactériennes correspondant aux souches EAI produisent significativement plus d'IFN $\gamma$  que les PBMC de contacts de tuberculeux infectés par les souches modernes 1 ou modernes 2 ( $p=0,010$  et  $p=0,003$  respectivement). D'un autre côté, la stimulation par l'antigène CFP-7 des PBMC de contacts de patients infectés par les souches ayant un spoligotype EAI, induit une production significativement plus élevée d'IFN $\gamma$  par comparaison aux individus en contact de patients infectés par des souches avec un spoligotype de type « moderne 1 ». Aucune différence significative n'est cependant

observée chez les PBMC de contacts de patients infectés par les autres spoligotypes de bactéries (Figure 23a). Par ailleurs, au moment de l'inclusion des sujets d'étude, la production d'IFN $\gamma$  par les PBMC stimulées par ESAT-6 et CFP-7 de contacts dont les patients ont été infectés par des bactéries avec un spoligotype avec des profils CAS et Beijing, est significativement moins élevée que celle des PBMC issus de contacts dont les cas index tuberculeux ont été infectés par des bactéries avec d'autres spoligotypes ( $p=0,047$  et  $p=0,016$  respectivement).

La réponse IFN $\gamma$  obtenue par ELISPOT semble être proportionnelle à la réponse au test d'intradermoréaction (IDR) à la tuberculine observée chez les sujets contacts (Tableau 6). Cependant, aucune corrélation statistiquement significative n'a été observée entre test IDR des sujets contacts et génotype des souches isolées des patients correspondant (Figure 24).

Enfin, après stimulation des PBMC avec les différents antigènes utilisés pour l'étude, aucune différence significative n'a été observée entre la réponse IFN $\gamma$  induite par les souches *M. bovis* et les souches *M. tuberculosis*, ni chez les patients, ni chez leurs contacts ( $p>0,05$ ).

**Tableau 6. Corrélation entre réponse IFN-gamma induite par ESAT-6, PPD et CFP7 et le test d'intradermoréaction obtenu chez les contacts de patients tuberculeux.**

Résultats IDR	Nb. Médian de spots par $2.10^5$ cells			Valeur de P
	< 5mm	5-14mm	>14mm	
No. sujets	34	40	75	
<b>Antigènes</b>				
ESAT-6	3,5	7,5	23	0,000006
PPD	18,5	26	35	0,0034
CFP7	4,5	9	27	0,00012

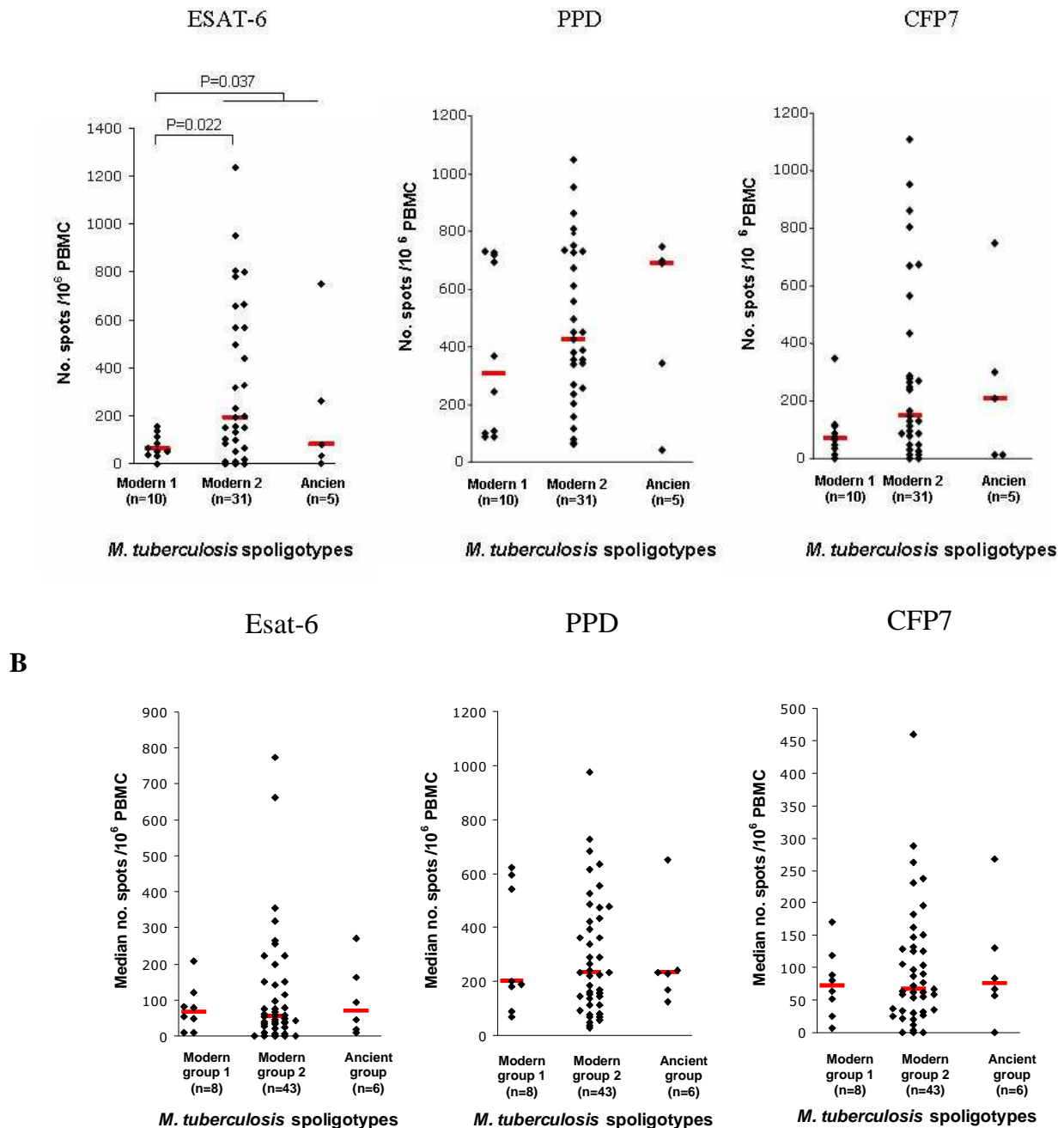
### **I.7. Issue clinique de la tuberculose chez les patients, suivi des sujets contacts et génotype des souches *M. tuberculosis***

*Suivi des contacts.* Trois mois après l'inclusion des individus, les PBMC issus de contacts dont les patients ont été infectés par des souches EAI produisent toujours significativement plus d'IFN $\gamma$  que les souches modernes 1 après stimulation par la PPD. De plus, après stimulations par l'ESAT-6, les PBMC obtenus de contacts dont les patients ont été infectés par des souches modernes 1 produisent significativement moins d'IFN $\gamma$  que les autres familles selon les spoligotypes (Figure 23b).

*Issue clinique de la tuberculose active.* Un cas index infecté par une souche de type LAM a décédé. Deux patients infectés par des souches de type T différents ont présenté une rechute de tuberculose et sont aussi décédés. Un autre cas de rechute chez un patient infecté par une souche de type CAS a aussi été observé mais guéri après retraitement et deux autres patients, infectés par des souches T différentes n'ont pas répondu au traitement (Figure 22b).

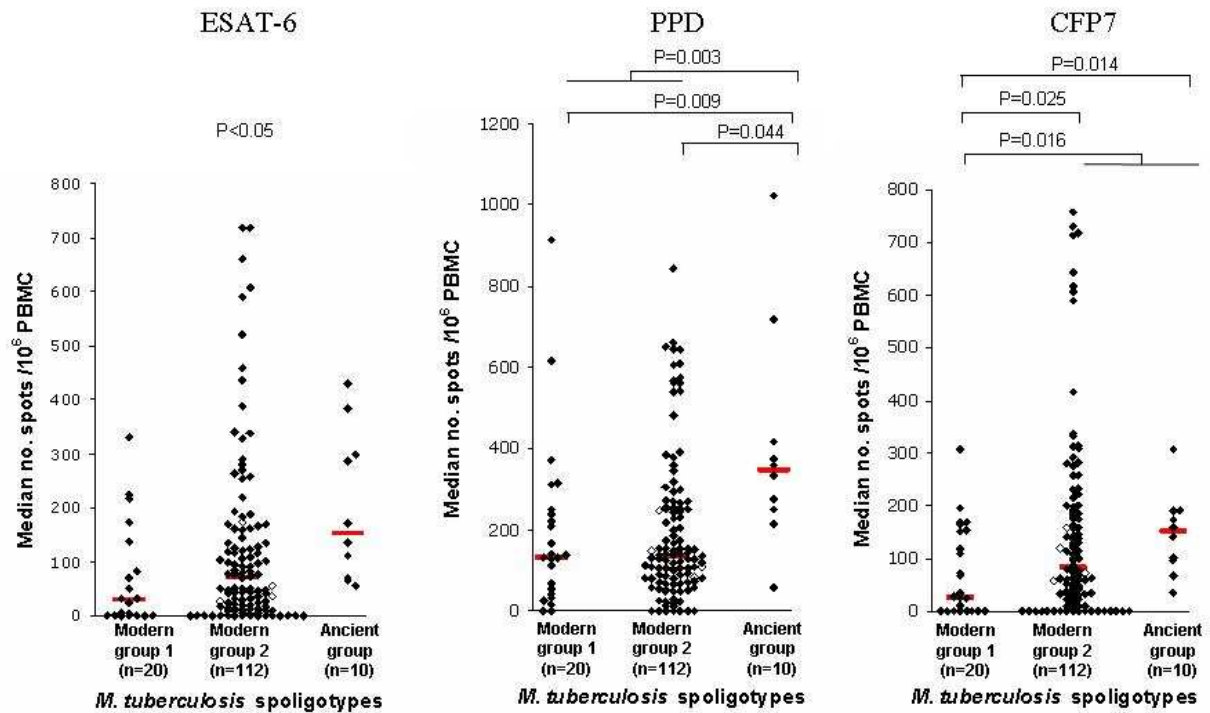
Après suivi des contacts des patients tuberculeux, 12 d'entre eux ont présenté une tuberculose active, dont 10 sont des contacts de patients infectés par des souches de type T, un de type LAM et le dernier est un contact de patient infecté par une souche de type *M. bovis*.

**Figure 22. Réponse-IFN gamma *ex vivo* de PBMC isolées des cas index après restimulation avec les antigènes de *M. tuberculosis* ESAT-6, PPD et CFP7 (A) à la période d'inclusion, (B) après leur traitement, selon la famille des souches infectantes de *M. tuberculosis*.**

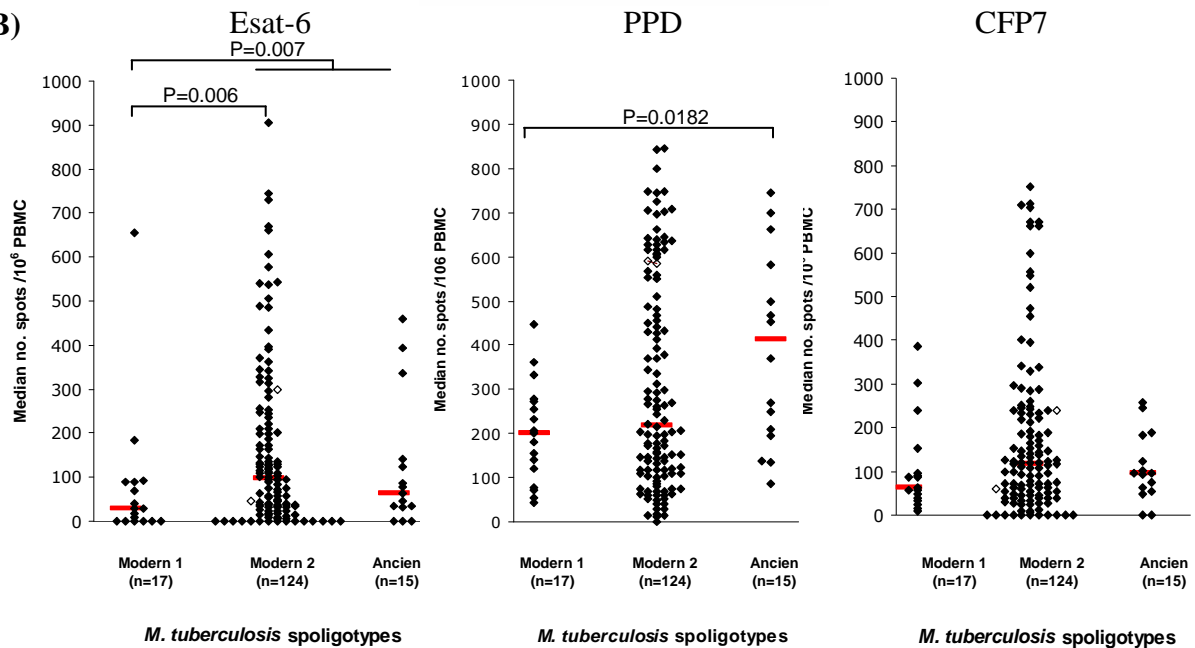


**Figure 23. Réponse-IFN $\gamma$  ex vivo de PBMC isolées des sujets contacts après restimulation avec les antigènes de *M. tuberculosis* ESAT-6, PPD et CFP7. (A) à la période d'inclusion, (B) après 3 mois de suivi après la période d'inclusion, selon la famille des souches infectantes de *M. tuberculosis*. Les différences significatives (test de Mann-Whitney) de production d'IFN $\gamma$  entre les différents groupes sont indiquées. Les barres horizontales rouges indiquent le nombre médian de spots pour  $10^6$  PBMC. ♦: Contacts sains ; ◇: Contacts TB.**

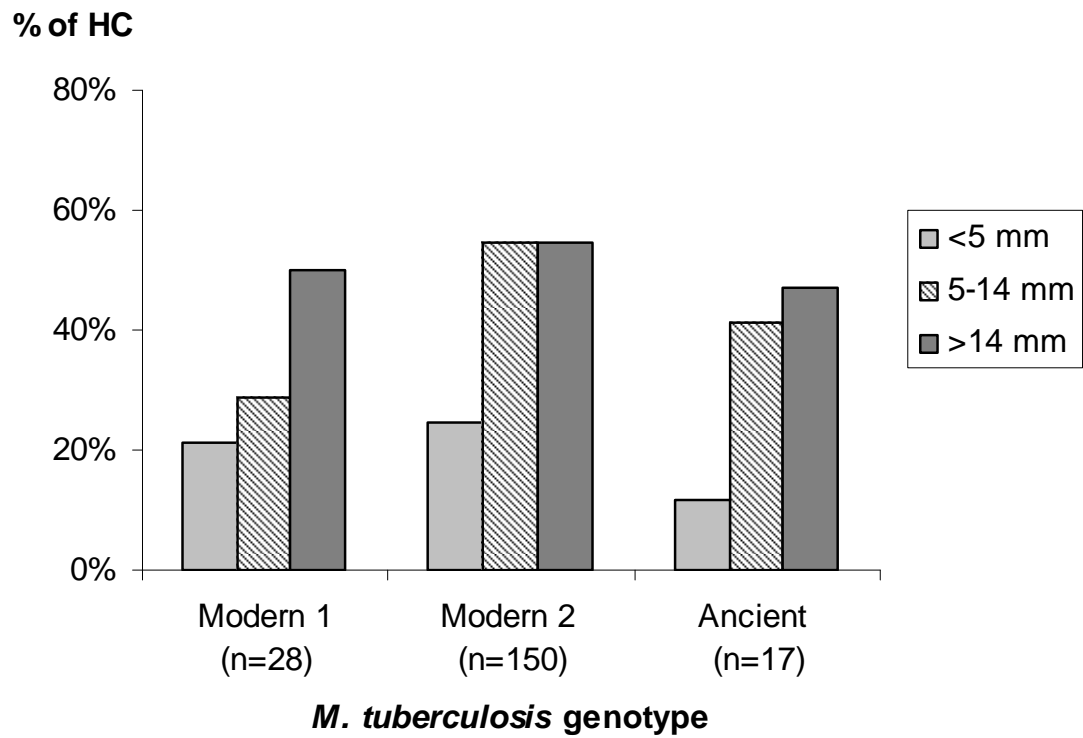
A)



B)



**Figure 24. Résultats de l'intradermoréaction chez les sujets contacts (HC) selon le génotype des souches isolées des cas index leur correspondant.**



**Tableau 7. Caractéristiques des patients tuberculeux d'où ont été isolées les souches cliniques.**

Caractéristiques	Valeurs
Ages	
Moyennes	31
Mediane (spectre)	30 (1-77)
Sexe Ratio	
Masculins	1,09 (M/F)
Féminins	51% (93)
	49% (85)
Données Cliniques	
Forme de tuberculose	
Extrapulmonaire	34,6% (63)
Pulmonaire	65,4% (119)
Microscopie	
0	30,3% (54)
1+	9% (16)
2+	18% (32)
3+	24,7% (44)
4+	18% (32)

## I.8. Discussions et Perspectives I

Un nombre important d'études utilise la réponse IFN $\gamma$  de lymphocytes en réponse à des stimulations d'antigènes spécifiques de *M. tuberculosis* aussi bien dans le diagnostic d'une infection latente à ces bactéries (Arend et al. 2000 , Munk et al. 2001 , Hill et al. 2005, Demissie et al. 2006), que dans l'évaluation d'une réponse immune apportée notamment par les candidats vaccins, aussi bien chez l'homme que dans les modèles animaux (Brookes et al. 2008 , Hawkrigde et al. 2008 , Hoft et al. 2008 , Whelan et al. 2008). Cette étude menée à Madagascar se propose d'analyser la réponse IFN $\gamma$  chez les patients tuberculeux et leurs contacts proches en y associant les influences du génotype des souches infectant le patient dans l'étude. Plusieurs études suggèrent en effet des variations



de la réponse immune en fonction du génotype de la souche infectant le sujet. A Madagascar, la tuberculose est encore un sérieux problème de santé publique et comme dans beaucoup de pays où la tuberculose est endémique, un Programme National pour le Contrôle de la Tuberculose s'occupe notamment du diagnostic et du traitement des tuberculeux pour stopper la transmission de la maladie. Cependant, les stratégies de diagnostic actuelles ne tiennent en compte ni de la détection des infections de *M. tuberculosis* au sein des familles et de contacts des cas contagieux, ni de l'existence de diversité génétique au sein de *M. tuberculosis*. La couverture vaccinale au BCG à Madagascar ainsi que l'exposition aux mycobactéries atypiques rendent une grande majorité de la population sensible aux tests cutanés à la tuberculine chez les personnes saines (Champetier de Ribes et al. 1997). L'un des antigènes utilisé pour stimuler la production d'IFN $\gamma$  par les PBMC est l'ESAT-6. L'ESAT-6 est codé par des gènes du locus *esat-6* retrouvé sur la région RD1 (Sorensen et al. 1995, Berthet et al. 1998, Brosch et al. 1999). Cette région RD1 est présente chez la souche *M. tuberculosis* et les souches *M. bovis* pathogènes, mais elle est par contre délétée chez les souches vaccinale BCG (Harboe et al. 1996, Gey Van Pittius et al. 2001). Les protéines de la famille ESAT-6 sont des facteurs de virulence hautement conservés dans les souches cliniques de BK et sont parmi les premiers antigènes reconnus par le système immunitaire des sujets infectés. Ces antigènes ne sont cependant pas reconnus par les individus sains, mêmes vaccinés (Behr et al. 1999, Skjot et al. 2000). Nous avons donc utilisé le PPD, l'ESAT-6 et le CFP-7 pour stimuler les PBMC prélevées des différentes cohortes. La CFP-7 aussi appelée TB10.4 est aussi membre de la famille ESAT-6 mais est présente chez la souche BCG. Le niveau de production d'IFN $\gamma$  est ensuite associé au génotype des souches des patients pour en voir les influences sur la réponse immunitaire.

Les virulences particulières associées à des souches bactériennes spécifiques ont été observées sur des modèles animaux et cellulaires. Une étude d'épidémiologie moléculaire dans différents modèles expérimentaux montre que la vitesse de croissance de souches bactériennes regroupées dans des « clusters » est plus élevée dans des cellules THP-1 que les souches isolées (Theus et al. 2005). De plus, les souches bactériennes isolées à l'extérieur des poumons infectent plus efficacement les macrophages dérivés de monocytes humains que les souches isolées au sein du poumon (Garcia de Viedma et al. 2005). De même, une étude menée en Ouganda a permis de classer des isolats cliniques de *M. tuberculosis* selon la fréquence de la transmission de ces dernières chez les contacts de même foyer que les patients. Ainsi, il semble que les souches ayant une forte transmission croissent plus rapidement dans les cellules THP-1 que les isolats moins transmissibles (Theus et al. 2005). Cependant, jusque là, peu de données sur les effets de la diversité des souches sur la présentation clinique ou l'issue de la maladie n'ont été évoquées. Lors d'une

étude précédente, nous n'avons globalement observé aucune corrélation entre les profils IS6110-RFLP et la présentation clinique de la tuberculose (Rasolofo Razanamparany et al. 2002). Cependant, certains profils RFLP-IS6110 spécifiques semblent être respectivement associés à des tuberculoses pulmonaires ou extrapulmonaires ou à une tuberculose pleurale chez les patients, suggérant que certaines souches ont une plus grande capacité à disséminer que d'autres. De même, des études menées au Vietnam montre que les souches appartenant aux lignées Euro-Américaines (correspondant à la lignée moderne 2 d'Arnold C., 2007), est associée à une radiographie plus nette montrant des cavités tuberculeuse au niveau de la partie supérieure des poumons (Thwaites et al. 2008).

Bien que nos résultats ne confirment aucune influence statistique du spoligotype des souches sur la charge bacillaire dans les expectorations des patients tuberculeux, on observe cependant une différence de la réponse immunitaire entre les patients infectés par les souches CAS et Beijing où le nombre de cellules produisant l'IFN $\gamma$  est moins élevé que les patients infectés par les autres géotypes de souches après une stimulation par l'ESAT-6. Ces observations sont compatibles avec celles de Lopez et ses collaborateurs qui, en étudiant l'infection de souris, ont constaté une expression diminuée de l'IFN $\gamma$  chez les souris infectées avec des souches Beijing par rapport à 4 autres lignées de *M. tuberculosis*. Les auteurs suggèrent que l'inefficacité de l'activation de la réponse Th1 conduirait à faire progresser l'infection vers la maladie (Lopez et al. 2003). Les résultats de la présente étude sont aussi compatibles avec ceux observés à partir des expérimentations sur des lignées cellulaires de monocytes THP-1 et des modèles *ex vivo* de cellules sanguines de volontaires sains vaccinés au BCG, où les souches Beijing et CAS induisent une réduction de la production de TNF $\alpha$  et d'IFN $\gamma$  (Tanveer et al. 2009). D'autres modèles expérimentaux suggèrent que l'induction de la diminution de la production de cytokine pro-inflammatoires semble associée à la présence de PGL sur la paroi bactérienne des mycobactéries pathogènes (Reed et al. 2004, Tsenova et al. 2005, Ordway et al. 2007, Sinsimer et al. 2008, Huet et al. 2009 ).

La fréquence élevée des souches de la famille EAI (23,5% d'après de récentes études) observé à Madagascar par comparaison aux autres souches (Ferdinand et al. 2005, Brudey et al. 2006) suggère que cette souche est hautement transmissible au sein de la population malgache. D'après les résultats de cette étude, en réponse à la stimulation par ESAT-6, le nombre de PBMC produisant l'IFN $\gamma$  est nettement plus important chez les contacts dont les patients ont été infectés par ces souches de type EAI. Ces observations semblent confirmer que les souches modernes du groupe 1 induisent une réponse de type Th1 moins importante que les souches EAI ou les souches modernes 2. La faible production d'IFN $\gamma$  suite à la stimulation par ESAT-6 des cellules prélevées de sujets contacts dont les patients

ont été infectés par des souches modernes 1 pourrait être la conséquence d'une faible transmissibilité de ces souches suite à une compétition avec les souches EAI qui sont présentes et peut-être mieux adaptées à la population malgache. Cependant, cette hypothèse n'est pas confirmée par l'expansion des souches modernes 1 et 2 dans la région. Une autre explication serait que le taux de transmission est le même pour toutes les souches. Cependant, les souches EAI induiraient une réponse immunitaire plus importante chez les sujets infectés que les souches modernes. Ces souches EAI seraient donc relativement moins virulentes comparées aux souches de lignée modernes expliquant la faible prévalence de ces souches modernes à Madagascar (Brudey et al. 2006).

Cette étude est la première, à notre connaissance, qui traite de la réponse IFN $\gamma$  de l'hôte en tenant compte du génotype des souches chez les patients tuberculeux et leurs contacts. Cependant elle est limitée par plusieurs points. D'abord, afin de standardiser les tests ELISPOT, seuls les résultats provenant de PBMC fraîchement prélevées ont été utilisés (Doherty et al. 2005), limitant le nombre de données. Par ailleurs, à cause de l'effectif de certaines souches bactériennes, bien que statistiquement robustes, les résultats doivent être pris comme préliminaires. Enfin, nos résultats se basent sur les PBMC et peuvent ne pas refléter la réponse immune au sein du site d'infection. Pour analyser nos données, nous nous sommes concentrés sur la production d'IFN $\gamma$  par stimulation avec ESAT-6 qui semble être le mieux associé à la charge bacillaire (Millington et al. 2007) et par conséquent aux risques conduisant vers la tuberculose active (Doherty et al. 2002, Andersen et al. 2007). Il serait intéressant de déterminer le rôle d'autres cytokines, comme l'IL-4 qui a été associée à la survenue d'une tuberculose et semble être préférentiellement induite par les PGL de souches Beijing (Demissie et al. 2004, Fletcher et al. 2004, Ordway et al. 2004).

Par ailleurs, il serait aussi intéressant d'approfondir l'étude des facteurs génétiques de la bactérie pouvant être à l'origine de ces variations de la réponse immune. Le génotypage des souches cliniques de *M. tuberculosis* et les réponses immunitaires induites par ces souches peuvent permettre l'identification de facteurs de virulence impliqués dans le processus de développement de la tuberculose active et les facteurs de protection de l'hôte qui y sont associés.

L'association existant entre réponse immunitaire de l'hôte infecté et le spoligotype des souches demeure intrigant. Le locus DR, typé par spoligotype, est une région CRISPR, c'est-à-dire, constituée de séquences nucléotidiques répétées, palindromiques localisées. Par ailleurs, les séquences nucléotidiques du locus DR ne semblent pas coder pour des gènes pouvant intervenir dans une quelconque modulation de la réponse immunitaire de

l'hôte, voire ne semblent pas coder pour des gènes. Par contre, de récentes observations suggèrent le rôle primordial des transferts horizontaux dans l'acquisition des spacers dans les régions *CRISPR*. Alors que les rôles des délétions des spacers ainsi que les insertions d'*IS6110* dans la génération de polymorphisme au sein du locus DR ont été établis, d'autres études ont montré que des îlots génomiques acquis par transferts horizontaux à partir de divers microorganismes ont contribué à l'évolution des MTBC. Certains de ces îlots sont uniquement retrouvés sur les génomes des souches MTBC qui sont pour la plupart pathogènes ou potentiellement pathogènes et mériterait de ce fait une attention particulière.

## **II. LE POLYMORPHISME DES ÎLOTS GENOMIQUES SPECIFIQUES DES MTBC EST ASSOCIE A LA DIVERSITE GENETIQUE DES SOUCHES CLINIQUES ISSUES DE PATIENTS TUBERCULEUX**

Grâce à différents types de marqueurs génétiques et d'outils moléculaires, les bactéries MTBC ont pu être classées en familles ou en lignées définies. La diversité génétique observée au niveau de ces familles de souches semble influencer sur la présentation de la tuberculose chez l'hôte. Par ailleurs, la prévalence des familles de souches MTBC semble varier selon les populations humaines et les régions géographiques d'où elles ont été isolées.

Les processus biologiques ayant généré cette diversité aussi bien que les conséquences cliniques et les manifestations phénotypiques qui en découlent demeurent cependant obscures. Dans le but de comprendre la relation entre la diversité génétique des souches cliniques de *M. tuberculosis* et leurs caractères de virulence, les facteurs génétiques bactériens pouvant être à l'origine de cette diversité, en particulier les transferts horizontaux, ont été étudiés dans cette seconde partie des travaux.

La technique de spoligotyping du locus DR, une région hypervariable du génome des bactéries MTBC a permis la classification des souches en familles. Ces familles de spoligotypes sont associées à la localisation géographique des souches. Le locus DR appartient à la famille des séquences *CRISPR*. Ces régions *CRISPR* auraient été façonnées par plusieurs épisodes de transferts horizontaux de gènes dans la bactérie réceptrice. Le transfert horizontal de matériel génétique est l'un des mécanismes les plus importants impliqué dans l'évolution des organismes microbiens. Des séquences d'ADN regroupées en îlots génomiques (GEI ou « genomic islands ») ont été récemment détectées chez quelques souches MTBC. Certains de ces îlots (dont le locus DR) sont spécifiques des bactéries MTBC et ne sont pas retrouvés chez les autres mycobactéries. Ces îlots auraient été acquis par des transferts horizontaux à partir d'autres bactéries. Les îlots génomiques acquis par transferts horizontaux auraient contribué à l'évolution des MTBC.

Alors que le polymorphisme des spacers au niveau du locus DR a largement été utilisé dans les études épidémiologiques ou phylogénétiques des MTBC, les polymorphismes éventuels pouvant exister sur les autres régions acquises par transferts horizontaux, localisés ailleurs dans le génome et leurs répercussions sur l'évolution des MTBC, demeurent inexplorés. De plus, le rôle des îlots génomiques spécifiques des MTBC dans l'évolution du

pathogène est très peu connu. Les corrélations éventuelles entre les différents épisodes de transferts de gènes dans les *CRISPR* et les GEI ont été très peu étudiées jusqu'à maintenant.

Dans le chapitre qui suit seront traités les travaux qui ont consisté à étudier la contribution du polymorphisme des régions acquises par transferts horizontaux dans le processus évolutif des bactéries MTBC.

Pour cela:

- L'existence de polymorphisme génétique d'îlots génomiques spécifiques MTBC dans des souches cliniques isolées de patients tuberculeux a été étudiée.
- Puis, les corrélations entre le polymorphisme de différentes régions acquises par transferts horizontaux dans le génome des MTBC, en particulier, les îlots génomiques et le locus *CRISPR*, ont été recherchées pour déterminer l'existence éventuelle d'une corrélation entre le génotype des souches et leur phylogénie.

### **II.1. Méthodologie**

#### **II.1.1. Souches bactériennes**

Les souches bactériennes cliniques étudiées (n=182) ont été isolées à partir de patients tuberculeux pulmonaires (n=119) et extrapulmonaires (n=83) provenant du laboratoire national de référence de l'Unité des Mycobactéries de l'Institut Pasteur de Madagascar.

Les patients tuberculeux pulmonaires sont des sujets malgaches, séro-négatifs au VIH, recrutés entre 2004 et 2005, inclus dans le projet VACSIS. Les souches bactériennes provenant de patients tuberculeux extrapulmonaires ont été, quant à elles, sélectionnées de manière à avoir des prélèvements de différents sites infectieux.

Les isolats ont été cultivés sur milieu de Löwenstein-Jensen (LJ) et identifiés comme appartenant au MTBC par des techniques biochimiques. Une partie des souches cliniques (n=102) a été traitée par antibiogramme sur LJ avec des antituberculeux de première ligne

(Annexe 4). Les ADN génomiques ont ensuite été extraits des cultures bactériennes pour les études ultérieures.

### **II.1.2. Typages et analyses moléculaires**

A partir des ADN génomiques, les isolats cliniques ont d'abord été typés par spoligotypage avec la méthode décrite par Kamerbeek et ses collaborateurs (Kamerbeek et al. 1997). Les souches ont ensuite été classées en familles de spoligotypes attribuées par la comparaison des profils spoligotypes avec ceux des bases de données SITVIT et SpolDB4 (Brudey et al. 2006).

Les îlots génomiques identifiés comme étant spécifiques des MTBC (Becq et al. 2007) ont, quant à eux, été criblés par PCR à partir de leurs régions flanquantes. Des PCR ont ainsi été réalisées sur les ADN génomiques des 182 isolats cliniques (Tableau 7). Les tailles des produits PCR obtenus ont ensuite été comparées à celles d'îlots génomiques correspondants à l'ADN génomique de la souche de laboratoire de référence H37Rv. Sur les 48 GEI criblés qui sont spécifiques des MTBC, la région *Rv2801c-Rv2824c* possède le locus DR (donc est polymorphe), 3 îlots n'ont pas pu être amplifiés avec les conditions PCR mis au point (Tableau 8). Afin de caractériser les îlots génomiques polymorphes observés, les amplicons obtenus à l'aide des îlots génomiques avec des tailles différentes par rapport à ceux de H37Rv ont été séquencés à partir des mêmes amorces de leurs régions flanquantes.

Les réactions d'amplification ont été réalisées dans des plaques PCR 96 puits avec un volume final de 25 µl. Chaque Master Mix est composé de :

- 20 ng d'ADN génomique,
- 0,8 µM de chaque couple d'amorces,
- 400 µM de dNTPs,
- 1X de tampon GC TaKaRa II
- 1,25 U de LA Taq TaKaRa (TaKaRa)

Les conditions PCR utilisées varient selon la taille attendue des amplicons.

Pour les amplicons dont les tailles sont supérieures à 1 kb :

- dénaturation HOTSTART : 94°C pendant 1 min;
- 14 cycles : 98°C pendant 10s + 68°C pendant 15 min,

## Résultats expérimentaux

- 16 cycles : 98°C pendant 10s + 68°C pendant 15 min avec 15 sec de plus par cycle
- 1 cycle de 72°C pendant 10 min

Pour les amplicons dont les tailles sont inférieures à 1 kb :

- dénaturation HOTSTART : 94°C pendant 1 min
- 30 cycles de 94°C pendant 30 sec + étape d'annealing de ( $T_m$  des amorces-5 °C) pendant 30 sec + une étape d'extension de 72°C pendant 1 min 15 sec,
- 1 cycle de 72°C pendant 10.

Les produits PCR sont ensuite migrés par électrophorèse sur gel d'agarose 0,5-1,2% et observés sur un GelScann. Les îlots génomiques polymorphes observés avec les PCR multiplexes sont ré-amplifiés en simplex pour vérification.

Pour étudier le lien entre les transferts horizontaux et la diversité génétique des souches MTBC, la répartition ainsi que la fréquence des îlots génomiques polymorphes (par comparaison avec H37Rv) ont été étudiées en fonction des familles spoligotypes des souches cliniques.



**Tableau 8. Liste des amorces PCR utilisées dans cette étude.**

Ilot Génomique	FW(5'-3')	RV (5'-3')	Taille Attendue (bp)
Rv0078A	CCCAGTAGGCTTTGAGTGTGGCAGT	GGCTCATCGACGGGATGCTTAAC	917
Rv0112-Rv0115	CAATTCAACGGAGCAGAAGTCGATA	ACACGTTGTGGAACAACAAAAGTCA	3585
RV0298-Rv0303	TCCGGATTACCGAGTCTGTAGATA	GGCGGGTTTCTTTAGGGGATAAC	3061
RV0323c-Rv0331	TTCCCTACCTTGAACATATGCGGTTT	AGCGGTTATCCACAGTCTGGTGT	7077
Rv0347-Rv0349	AATCGGAAACAATCGATCGGTCAAC	GAGCTGAGCCTGATGCACTCAACTT	2668
Rv0595c-Rv0614	CTACAACCATTTACGACGTGCAGAC	CCTACAGGCCCTCTTCGTTTATCTA	10151
Rv0628c	GTGTGGAGATCATTCCGGTCTGACT	CGGACTTTGACATCGCATACACGAA	1299
RV0656c-Rv0666	GTCGAGTGGATCACACATTTTCGAG	CAACAGATTGACCCGTTTAGCGTCT	6587
RV0739-Rv0750	GCCGTGATGTCCGATTACAGTCTC	ACCGCGTTGATGAACAAGGAC	11712
Rv0836c-Rv0837c	CATTTTCAGACCGACTTTCGTGAAC	ACCACATCGAACATCCTGACCTGAA	4009
Rv0893c-Rv0895	GCAATACCTGGATTTCCGAACCTTCT	TGCCCCACTAAGTGCTTATAGCTGA	4481
Rv0986-Rv0989c	TGAGAGGTTATCCACAAGGGGATTT	GCCGAAATATCCAACAAAGGACCTA	6393
Rv1041c-Rv1055	ACCTCGGGCATCAATGCTT	CTAGTGGTCACTGCTGGGGTGTG	6199
Rv1089A-Rv1090	ATGTGGGTAAAGGATTGCGGATGTC	CAAGGACGCCGATCATTCCATTAAC	4804
Rv1184c	GGTCTGATATTTGCCGCTTCGATGT	CCGGGACGTGGCTGACTAAGATATG	1464
Rv1344	CGTAGACGCAGAACCAAGCAAACAA	CGGGTCGGTCATGGTCTAGCA	695
Rv1351	CCGTTTCAGCGATGACAGAAGCTATG	CGGGCCATATTCTCCTCCCTATCAT	717
Rv1356c	ATAATAGGCCCATCGCTTCGCTTCT	CGGTATCACCGTCACTGCAAAGCTA	1597
Rv1397c-Rv1398c	TGGATTCTTCATCGAGCGGATATT	ACAACCTGCCCGTGGTTGTCTACTA	4100
Rv1424c	GAAAGACGCTGTAGCCGGACGTATT	GGGAACGGTCCAGTTTGTAGGACAT	1235
Rv1439c	CCAATTCCATGACGGGTAGCGTACT	ACAACCTCGAGTACCGTCTGGAACA	1093
Rv1499	CCCCTCACATTCTTTTACCCGCTCT	AACTCCAGCACGTAAGGCTCTGACA	554
Rv1572c-Rv1588c	GCGTGCCGAGTACCTGCT	TATCAGCACTCGCACTCGAC	11101
Rv1805c	CAACGGAATGCTGAGTAGCGTTGAC	AGCGCATCTGGACAGACAAGAACAA	790
Rv1988-Rv1991c	ACTACGTTCTCAGCCCAGCGAATTG	CCAAGACACCTGATCGGACTATCCC	3708
Rv2084-Rv2088	ACAAGGACTTCGGACGCATA	GTGCTGTGTCTGTCAACAACCTG	4490
Rv2159c-Rv2161c	AATGACGCCTTGGCCTCGAAGTAGT	CAACGACAACAGCTCCACCCTTG	3933
Rv2267c-Rv2269c	GCAGTTCAATTCACGGAATCAAGACG	GTCCGCCGACTTGAAGGTTAATCCAG	3563
Rv2290	CGTTTCAATCGCTGTCCGAGCTA	GTGTGTAACCTTTGCCCTGCCTGGT	413
Rv2302-Rv2312	TCCGTGGTCATATCAAGACAAGAAG	ACGCTGTGGTTCTGTATACGTTGACT	11253
Rv2336-Rv2339	TTTGAAAGCTCTTGCTGTCAAATC	TTATGCGGTACCCGATGTCTATTT	9465
Rv2491-Rv2494	TAGATTGCTCCGAATTCTGTGCAAC	GACGATGACGTTGACTTGTGTGTTT	2326
Rv2730	CCGTGCAATTGACCGTTGCTTAC	GAAGCAAGTATTGAGGCCGCTTGAC	205
Rv2734-Rv2735c	GAGTCGTGGACGTTTATCTGACAGC	ACTTCGCCGAACAATGGGTTTCACT	2488
Rv2742c	TGTGGCGGGACTACTTCGATGTCTA	AATACACGAACGGGATGAGAATCGG	2681
Rv2871-Rv2872	GATCCGTATCGATGACGAGCTGTACC	CTAACTGCCGAAAGGCCATCCAGT	519
Rv2929	GATGTAGCTGGCCGAAGATCCAAC	CGTCCCGTTGTGACGAGATTAACAA	229
Rv2954c-Rv2961	ATTAGTTATGCCATGGGCACATTAG	GAAAAAGTGACGGCGACTAAGTGAG	7200
Rv3098c	CTGTAGACCGCTCCCCGAATCAC	CACCGATCCGTGTGGTGCAG	401
Rv3108-Rv3126c	GACTGTAGCGCTTGCGTCTCCT	GAGCAGCTCTACCTCGCTAACATCC	16352
Rv3173c-Rv3191c	CAGGAAGTCTGGGTCGTAGTAGTGCT	GGTGTGCAACACATCTCTAGGTTT	17329
Rv3376-Rv3378c	CATTTTCAGCAAGTCACCGGGTATCA	ACCATCCTGATTCCGGCGATAGTTA	3284
Rv3466	GGTCTCTGGAACGTCTGGAATGCTT	GTCGTCGTCTTGGTTGTGGAGGAAT	1266
Rv3528c	ATCGGTTACGACAGGGTGGCTATTG	GTCATGATCCGGGTGCTTTTATCG	536
Rv3749c-Rv3751	CACCACATCGAGTTTCGAGCTACC	TCCCTTTGACTGTTAGTGCAGTTCA	1689

## Résultats expérimentaux

Amorces supplémentaires permettant d'amplifier les régions internes respectives de Rv1572c-Rv1588c, Rv3108-Rv3126c, Rv0595c-Rv0614 et Rv1041c-Rv1055

intPhi Fw : 5'ACATCGAACCGATCCTGTATCACAT  
intPhi Rv : 5'CACGGGTTTCAGGTAAAGAGAGGTT

Rv3114lft : 5'CATCAATCGAGACCCTTATCCAGTG  
Moeb2rgt : 5'GCTGCTGATTCTACTTTCGGCCTAC

Rv0595c-Rv0614 interne  
Fw 5'GAACGATGGCAGCGTCTACAAAAT  
Rv 5'GTGACCACCAGATCTCCCATCAG

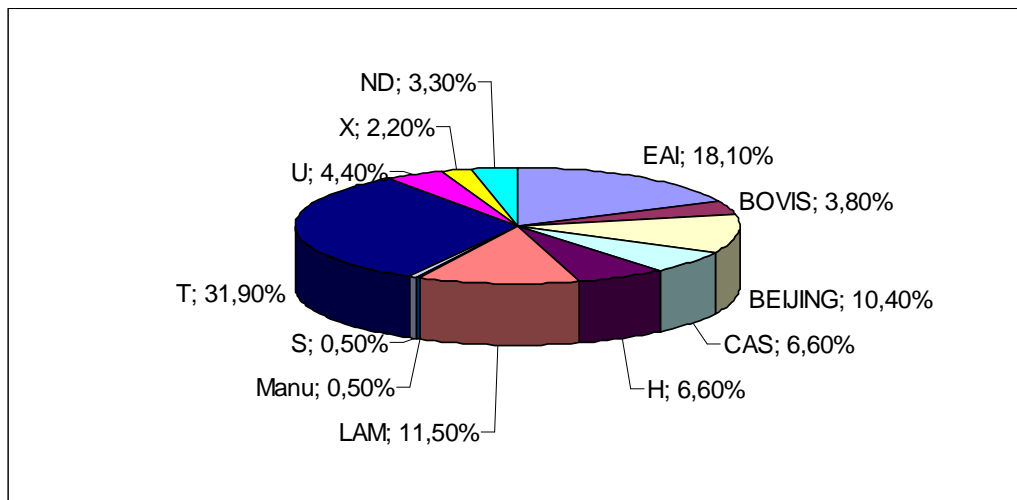
Rv1047int : 5'GAACGCCTCAACCGAGAGGTACGAC

Fw : Amorce « forward » en 5' ; Rv : amorce « reverse » en 3'.

## II.2. Spoligotyping et classification des souches cliniques en famille

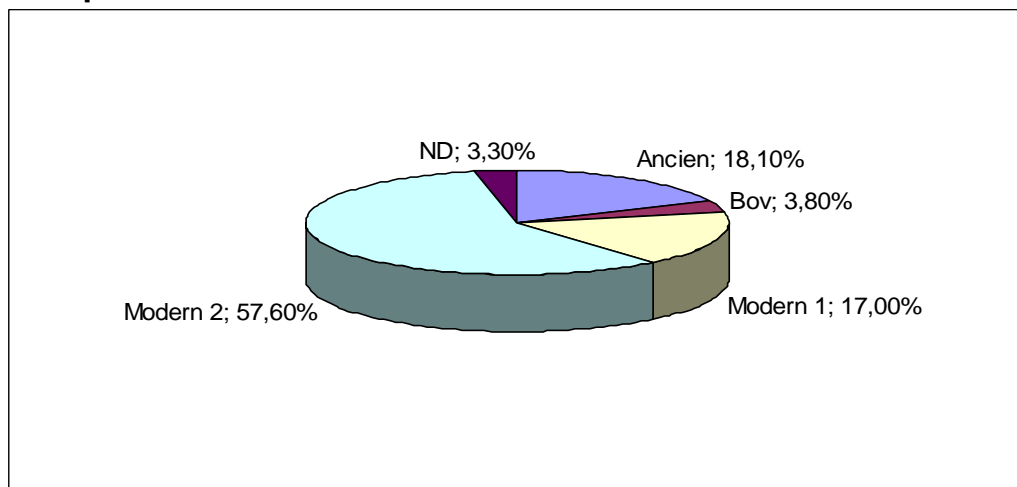
A partir de la comparaison des profils spoligotypes avec ceux de la base de données SpolDb4, les différentes souches ont été classées en 11 familles différentes regroupant 49 share-types (Figure 25). De même, les différentes familles de souches obtenues ont été classées selon le schéma évolutif préétabli des souches MTBC (Figure 11). Les souches typées ont ainsi été groupées en souches « anciennes », regroupant principalement les souches Est-africaines et Indiennes (EAI), ainsi qu'en groupe de souches « modernes », avec le sous-groupe « moderne 1 », incluant les familles Beijing et CAS et le sous-groupe « moderne-2 » contenant les souches Haarlem, LAM, X, MANU et S, ainsi que la famille des souches T qui regroupent des profils spoligotypes mal définis (Figure 26).

**Figure 25. Répartition des familles de spoligotypes isolées des souches cliniques de patients tuberculeux**



Familles de profils spoligotypes selon les données de la base SpolDB4 (Brudey et al, 2006; CAS: Central Asian; EAI: East African Indian; LAM: Latino American Mediterranean; H: Haarlem; T: famille non définie, ND non décrit dans SpolDB4).

**Figure 26. Répartition des groupes de familles de souches isolées des souches cliniques de patients tuberculeux**



(Regroupement des familles spoligotypes retrouvées selon le schéma évolutif décrit par Arnold 2007)

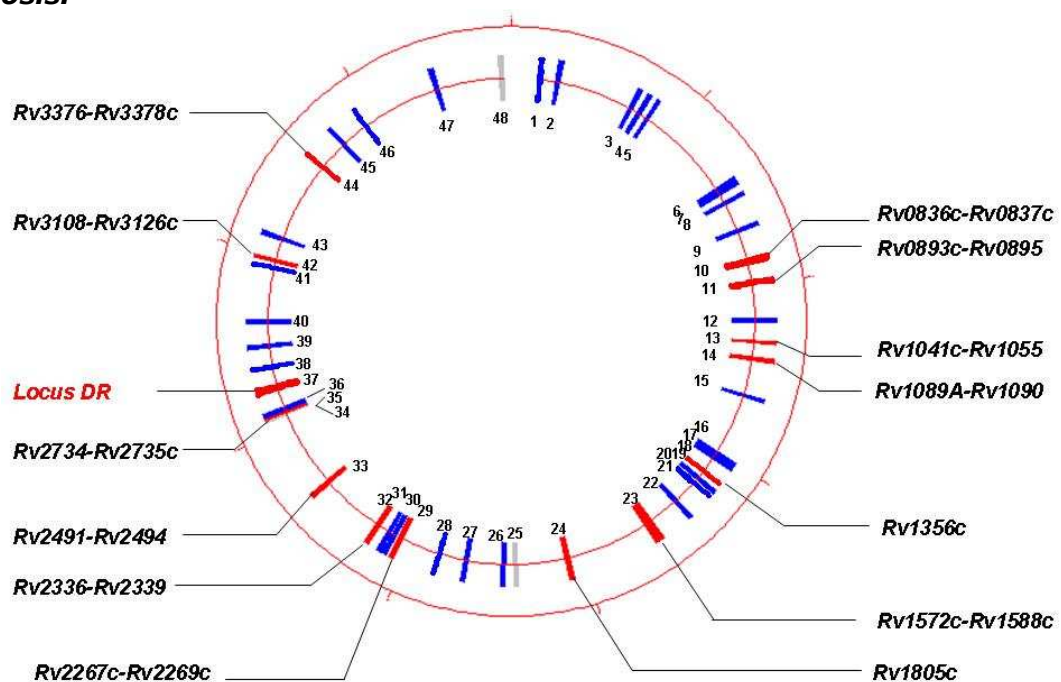
### **II.3. Criblage des îlots génomiques dans les isolats cliniques de *M. tuberculosis***

Alors que la plupart des îlots génomiques spécifiques des MTBC semblent intacts dans les souches cliniques, le criblage des îlots génomiques de ces souches cliniques par PCR montre l'existence de polymorphisme sur certains îlots par comparaison avec la souche H37Rv.

### II.3.1. Les îlots génomiques conservés dans les souches cliniques

Par comparaison avec les îlots génomiques de H37Rv, sur les 45 GEI criblés, 32 GEI sont retrouvés à la même taille dans les différents isolats cliniques de l'étude (Tableau 9, Figure 27). Alors que la fonction d'environ la moitié des gènes constituant ces îlots génomiques conservés n'est pas encore définie, les gènes connus semblent être impliqués dans la mobilité génétique, les séquences répétées, le métabolisme intermédiaire ou des protéines de structure. De plus 8 gènes retrouvés dans ces îlots conservés ont été décrits dans la littérature comme étant liés à la virulence de souches MTBC (<http://genolist.pasteur.fr/tuberculist> ; (Becq et al. 2007)).

**Figure 27. Position des îlots génomiques polymorphes sur le génome de *M. tuberculosis*.**



**Tableau 9. Liste des îlots génomiques intacts dans les génomes bactériens criblés ainsi que leurs fréquence (par comparaison à H37Rv)**

GEI	Polymorph	Freq,	%
RV0078A	N	162	89,0%
	nd	20	11,0%
Rv0112-Rv0115	N	170	93,4%
	nd	12	6,6%
RV0298-Rv0303	N	162	89,0%
	nd	20	11,0%
RV0323c-Rv0331	N	140	76,9%
	nd	42	23,1%
Rv0347-Rv0349	N	152	83,5%
	nd	30	16,5%
Rv0595c-Rv0614	N	168	92,3%
	nd	14	7,7%
RV0628c	N	163	89,6%
	nd	19	10,4%
RV0656c-Rv0666	N	135	74,2%
	nd	47	25,8%
RV0739-Rv0750	N	135	74,2%
	nd	47	25,8%
Rv0986-Rv0989c	N	170	93,4%
	nd	12	6,6%
RV1184c	N	152	83,5%
	nd	30	16,5%
RV1344	N	152	83,5%
	nd	30	16,5%
RV1351	N	140	76,9%
	nd	42	23,1%
Rv1397c-Rv1398c	N	124	68,1%
	nd	58	31,9 %

## Résultats expérimentaux

RV1424c	N	150	82,4%
	nd	32	17,6%
Rv1439c	N	149	81,8%
	nd	33	18,2%
RV1499	N	150	82,4%
	nd	32	17,6%
Rv2084-Rv2088	N	139	76,4%
	nd	43	23,6%
Rv2159c-Rv2161c	N	148	81,3%
	nd	34	18,7%
RV2290	N	163	89,6%
	nd	19	10,4%
Rv2302-Rv2312	N	167	91,8%
	nd	15	8,2%
RV2730	N	144	79,1%
	nd	38	20,9%
RV2742c	N	166	91,2%
	nd	16	8,8%
Rv2871-Rv2872	N	160	87,9%
	nd	22	12,1%
RV2929	N	160	87,9%
	nd	22	12,1%
Rv2954c-Rv2961	N	158	86,8%
	nd	24	13,2%
RV3098c	N	162	89,0%
	nd	20	11,0%
Rv3173c-Rv3191c	N	135	74,2%
	nd	47	25,8%
RV3466	N	163	89,6%
	nd	19	10,4%
RV3528c	N	161	88,5%

	nd	21	11,5%
Rv3749c-Rv3751	N	164	90,1%
	nd	18	9,9%

N= GEI non polymorphes

nd= non déterminé (Pas de bande PCR observé après utilisation de plusieurs conditions PCR)

Freq= fréquence

### II.3.2. Les îlots génomiques polymorphes dans les souches cliniques

Après comparaison avec les îlots génomiques de H37Rv, 13 des îlots criblés dans les souches cliniques sont retrouvés avec des amplicons de tailles différentes. Ces amplicons de différentes tailles correspondent à des délétions ou des insertions de nucléotides dans les îlots génomiques (Figure 28).

Sur les 13 îlots polymorphes, une insertion d'environ 1,5 kb de nucléotides a été observée sur 10 îlots. Des délétions sont observées pour 5 des 13 îlots polymorphes. Parmi les cinq îlots délétés, certains semblent avoir été complètement délétés car on ne retrouve plus que la taille des régions flanquantes à ces îlots. Tel est le cas de l'îlot *Rv0836c-Rv0837c* ou de l'îlot *Rv1572c-Rv1588c* contenant les gènes codant pour le prophage *PhiRv1*. Pour la région *Rv3108c-Rv3126c*, une délétion partielle est par contre observée. Dans cet îlot, la taille des amplicons passe en effet de 15,1 kb à 6,5 kb chez certaines souches. Enfin, pour les îlots *Rv0836c-Rv0837c* et *Rv0893c-Rv0895*, selon les souches, des insertions et des délétions de nucléotides peuvent être observées (Tableau 10).

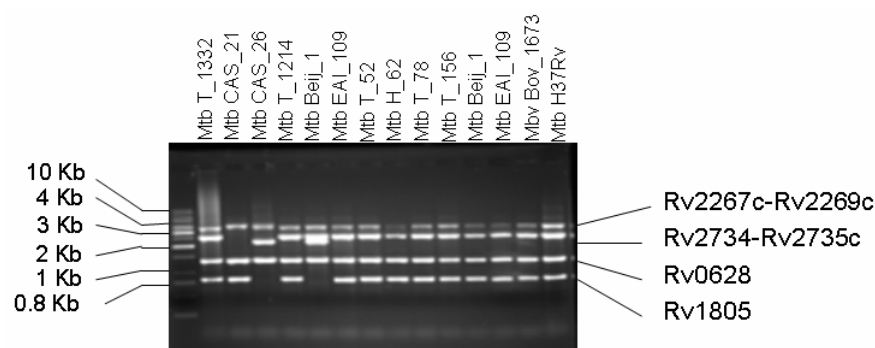
La fréquence d'apparition du polymorphisme dans chacun de ces 13 îlots est variable. Pour certains de ces îlots, le polymorphisme n'est retrouvé que très rarement. En effet, dans 5 de ces îlots, chacun des polymorphismes n'est retrouvé que dans des souches uniques. Tel est le cas de la délétion retrouvée sur l'îlot *Rv0836c-Rv0837c*, de l'insertion observée sur l'îlot *Rv0893c-Rv0895*, ainsi que du polymorphisme observé sur les îlots *Rv1041c-Rv1055*, *Rv1089A-Rv1090* et *Rv2267c-Rv2269c*. Le polymorphisme le plus fréquemment observé est la diminution de la taille des amplicons observée au niveau de la région *Rv1572c-Rv1588c* où sont retrouvés les gènes codant pour le prophage *PhiRv1*. Ce polymorphisme est observé chez la moitié des souches criblées dans cette étude.

Afin de vérifier l'éventuelle présence des gènes codant pour le prophage *PhiRv1* ailleurs dans le génome, une région interne de *PhiRv1* a été amplifiée à partir d'amorces

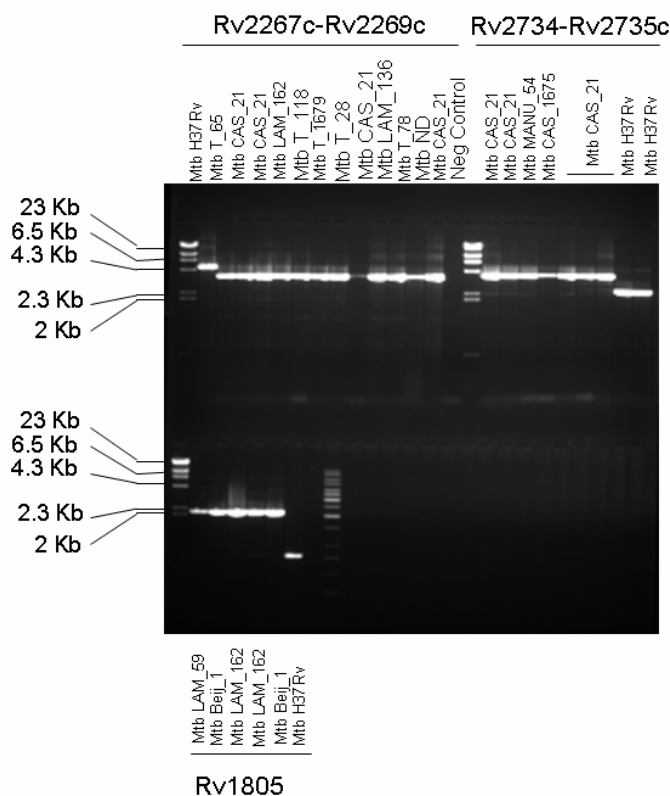
spécifiques du prophage. Ainsi, il a été confirmé que la plupart des souches cliniques étudiées ont perdu les gènes codant pour le prophage PhiRv1. Cependant, la présence d'amplicons à partir d'amorces internes au prophage PhiRv1 indique que chez 7,1% de ces souches polymorphes au niveau de la région *Rv1572c-Rv1588c*, les gènes codant pour le prophage PhiRv1 sont placés ailleurs dans le génome par comparaison à H37Rv.

**Figure 28. Gels d'agarose montrant des amplicons d'îlots génomiques obtenus à partir d'ADN génomiques de souches cliniques de MTBC.** (A) Amplicons de GEI obtenus par PCR multiplex. (B) Vérification des polymorphismes par PCR simplex. (C) Gels montrant les différents types de polymorphisme de l'îlot *Rv0836c-Rv0837c*. Les isolats cliniques sont nommés à partir du type de souche et de leur numéro ST.

A)

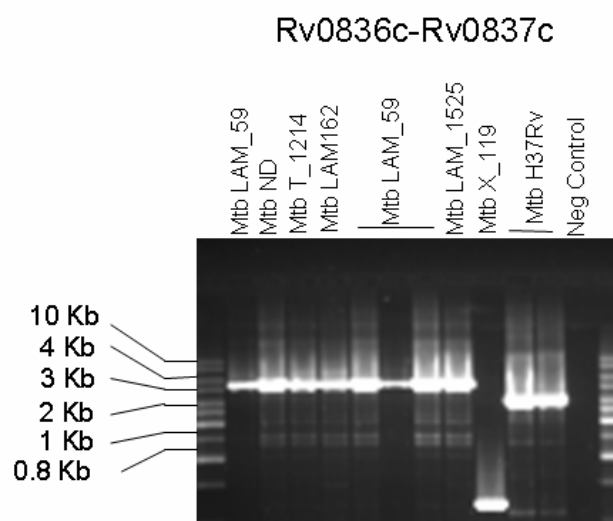


B)





C)



**Tableau 10. Description des îlots génomiques polymorphes et des familles de souches dans lesquelles elles sont observées (par comparaison à H37Rv)**

GEI	Taille H37Rv	Amplicon observé	n. souche	Freq %	FAMILLE SPOLIGOTYPE
Rv0836c-Rv0837c	4009 bp	D_1,2 kb	1	0,5%	X-119 LAM(162; 59; 1525)
		I_5,2 kb	7	3,8%	
		N	130	71,4%	
		nd	44	24,2%	
Rv0893c-Rv0895	4481 bp	D_2 kb	2	1,1%	EAI-7, H-273 H-1678
		I_6 kb	1	0,5%	
		N	167	91,8%	
		Nd	12	6,6%	
Rv1041c-Rv1055	6199 bp	I_8,75 kb	1	0,5%	H-50
		N	169	92,9%	
		Nd	12	6,6%	
Rv1089A-Rv1090	4804 bp	D_3,8 kb	1	0,5%	ND
		N	151	83,0%	
		nd	30	16,5%	
RV1356c	1597 bp	I_2,5 kb	20	11,0%	H(50 ;273 ;47 ;62 ;1678), U-46,EAI-1062, T-28
		N	119	65,4%	
		nd	43	23,60%	
Rv1572c-Rv1588c	11101 bp	D	78	42,9%	BEIJ1, BoviBCG-482, CAS(24;16), EAI(109;10;11), H(50 ;62 ;1678), LAM(162 ;9 ;74 ;136 ;1525), S-34

## Résultats expérimentaux

		T	13	7,1%	T(53 ;52 ;65 ;174 ;118 ;1214 ;136 ;156 ;17 ;13 ;15 ;1672), U (46 ;1904), X-302 X(336;119), H(50;62), U-46, T(73;86;156,1679)
		N	76	41,8%	
		nd	15	8,2%	
RV1805c	790 bp	I_2,1 kb	5	2,7%	Beij-1, LAM-162, CAS-26
		N	136	74,7%	
		nd	41	22,5%	
Rv2734- Rv2735c	2488 bp	I_3,8 kb	10	5,5%	MANU-54, CAS(16;21;26;1675)
		N	131	72,0%	
		nd	41	22,5%	
Rv2267c- Rv2269c	3563 bp	I_5 kb	1	0,5%	T-65
		N	140	76,9%	
		nd	41	22,5%	
		I_10,5 kb	25	13,7%	EAI(6;18;109;1062) H(47;50;62;1678) T(28;53;78;118;242;1332) U-46
Rv2336- Rv2339	9465				
		N	68	37,4%	
		nd	89	48,9%	
Rv2491- Rv2494	2326 bp	I_4,1 kb	2	1,1%	LAM-162
		N	149	81,9%	
		nd	31	17,0%	
Rv3108- Rv3126c	16352 bp	D_6,5 kb	2	1,1%	LAM-162
		N	133	73,1%	
		nd	47	25,8%	
Rv3376- Rv3378c	3284 bp	I_4,3 kb	4	2,2%	LAM-61
		N	137	75,3%	
		nd	41	22,5%	

N= GEI non polymorphes , nd= non déterminé (Pas de bande PCR observé après utilisation de plusieurs conditions PCR), Freq= fréquence, D= deleté, I= Présence d'insertion  
T= localisé ailleurs dans le génome

## **II.4. Caractérisation des îlots génomiques polymorphes par séquençage**

### **II.4.1. Les insertions dans les îlots génomiques**

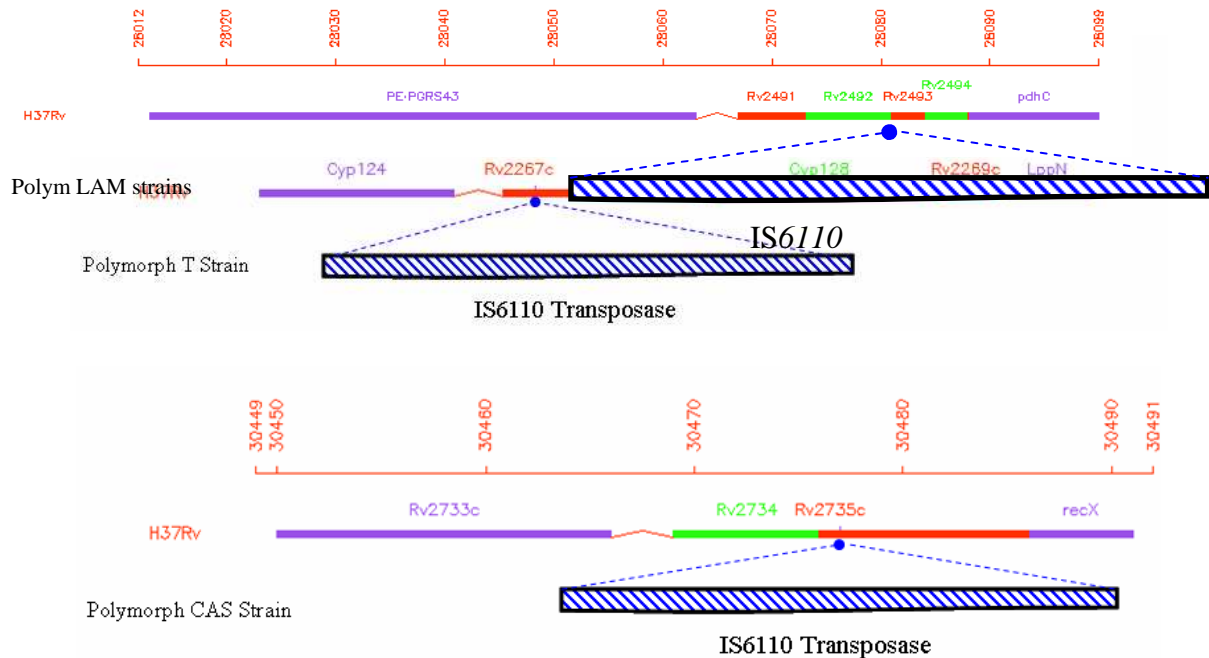
Le séquençage des îlots génomiques présentant une augmentation de la taille des amplicons a montré l'insertion d'*IS6110* dans ces îlots (Tableau 11, Figure 29). Les *IS* observées peuvent être insérées soit de manière intra-génique, altérant directement les gènes touchés (comme dans le cas des gènes *Rv2267c*, *Rv2735c* ou *Rv2336*) ou de manière inter-génique, s'insérant entre 2 gènes, comme dans le cas de *Rv2491-Rv2494* ou *Rv1804c-Rv1805c* (Figure 29). Le séquençage des régions où sont insérées les *IS* dans l'îlot *Rv1804c-Rv1805c* montre différents sites d'insertions selon les souches. En effet, l'*IS* a été localisée à la fois à 1339 pb en amont du gène *Rv1805c* et à 168 pb en amont de *Rv1805c* selon les souches (Figure 29). Dans les 2 cas, l'*IS* est insérée entre les gènes *Rv1804c* et *Rv1805c*.

Dans tous les cas observés ici, la présence d'*IS* semble affecter la phase de lecture des gènes voisins, étant donné que ces derniers semblent pour la plupart être exprimés en opérons (prédit par <http://www.microbesonline.org/operons/gnc83332.named> et <http://operondb.cdcb.umd.edu>) (Figure 29B).

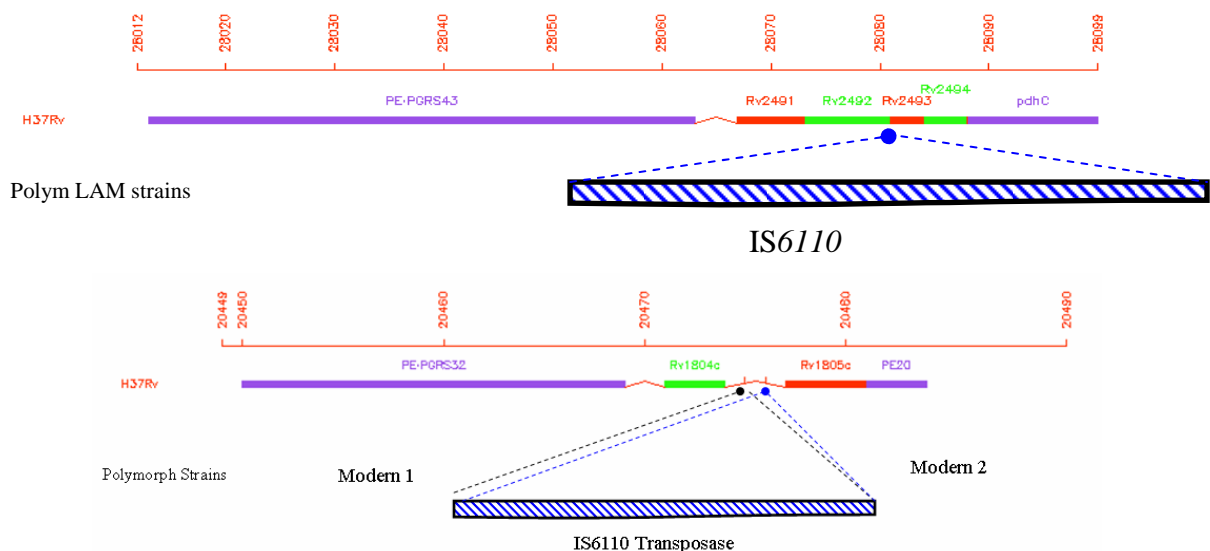
Les fonctions potentielles des gènes composant les îlots affectés par les *IS* ont été recherchées sur Tuberculist Pasteur (<http://genolist.pasteur.fr/tuberculist>). Ainsi, l'expression de la plupart des gènes retrouvés dans ces îlots varieraient selon les conditions du milieu de culture in vitro (cas de *Rv0836c-Rv0837c*, *Rv1804c-Rv1805c*, *Rv2336-Rv2339* et *Rv2267c-Rv2269*) ou dans un milieu intracellulaire, comme le cas de l'îlot *Rv3376c-Rv3378c* (Tableau 12).

**Figure 29. Représentation schématique des séquences d'îlots génomiques polymorphes.** (A) Insertion intragénique d'*IS6110* dans deux GEI différents. (B) Insertion intergénique d'*IS6110*. Les points d'insertion de l'IS dans l'îlot Rv1805c varient selon la souche séquencée. (C) Déletion d'îlot génomique. Les schémas ont été dessinés sur LinDNA Pasteur. La règle donne la localisation selon le génome de H37Rv.

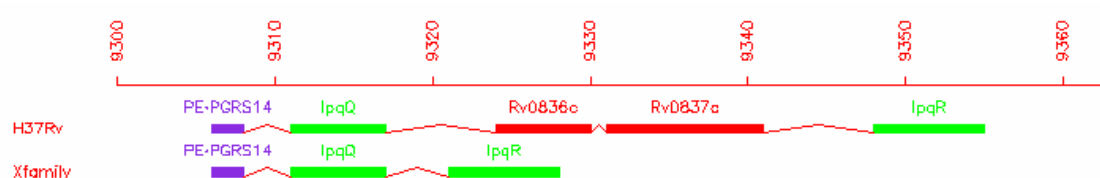
A)



B)



C)



**Tableau 11. Description des différents polymorphismes observés au niveau des îlots génomiques. D= deletion, I= insertion, Dep= localisation ailleurs dans le génome par comparaison à H37Rv**

<b>GEI</b>	<b>Taille des GEI dans H37Rv</b>	<b>Tailles approximatives observées</b>	<b>Observations</b>
Rv0836c-Rv0837c	1,8 kb	D_1,2 kb I_5,2 kb	Délétion de la position 931208 à 933819
Rv0893c-Rv0895	4 kb	D_2 kb I_6kb	
Rv1041c-Rv1055	12,8 kb	I_8,75 kb	
Rv1089A-Rv1090	4,8 kb	D_3,8 kb	
RV1356c	0,6 kb	I_2,5 kb	
Rv1572c-Rv1588c	10,6 kb	D totale Dep	Délétion de la position 1779276 à 1788526 Déplacement vers la position 3870803 - 3879990
RV1805c	0,3 kb	I_2,1 kb	IS6110 en amont du gène Rv1805c aux positions 2047368 et 2047519
Rv2734-Rv2735c	1,7 kb	I_3,8 kb	IS6110 dans le gène Rv2735c à la position 3048409
Rv2267c-Rv2269c	3 kb	I_5 kb	IS6110 dans le gène Rv2267c à la position 2541734
Rv2336-Rv2339	6,7 kb	I_10,5 kb	IS6110 dans le gène Rv2336 à la position 2610865
Rv2491-Rv2494	2,1 kb	I_4,1 kb	Vérifié par PCR
Rv3108-Rv3126c	15,1 kb	D_6,5 kb	Délétion partielle de nucléotides décrite par Becq <i>et al.</i> , 2007
Rv3376-Rv3378c	3,1 kb	I_4,3 kb	

#### **II.4.2. Les délétions dans les îlots génomiques**

Des délétions d'îlots observées par PCR ont aussi été confirmées par le séquençage. Outre les îlots qui ont des gènes dont les expressions varient selon les conditions du milieu (*Rv0836c-Rv0893c*, *Rv1572c-Rv1588c*), les autres îlots, où des délétions ont été retrouvées, possèdent des gènes intervenant dans des voies métaboliques comme *Rv0893c-Rv0895*, *Rv1089A-Rv1090* ou *Rv3108c-Rv3126c* (Tableau 12).

#### **II.5. Polymorphisme des GEI et association avec les familles de spoligotypes des souches cliniques**

Pour étudier le lien entre les transferts horizontaux et la diversité génétique des souches MTBC, la répartition des îlots génomiques polymorphes dans les différentes familles spoligotypes des souches cliniques a été étudiée.

##### **II.5.1. Délétion d'îlots génomiques dans les familles spoligotypes de souches**

Les îlots génomiques portant des délétions ont été analysés selon les familles de spoligotypes.

*Délétions d'îlots chez des souches cliniques isolées.* Par comparaison avec les îlots génomiques de H37Rv, la plupart des îlots génomiques avec des délétions de nucléotides se retrouve dans des souches isolées. Chez une souche clinique unique ayant un profil spoligotype inconnu dans la base de données SITVIT, l'îlot *Rv1089A-Rv1090* (codant pour des enzymes entrant dans la composition de cellulases/endoglucanases) est retrouvé délété. La région *Rv0893c-Rv0895* est aussi délétée chez 2 souches cliniques distinctes qui appartiennent respectivement aux familles spoligotypes EAI ST17 et Haarlem ST273.

*Polymorphisme au niveau de l'îlot *Rv1572c-RV1588c* (Tableau 13).* Le type de polymorphisme le plus fréquemment observé au niveau des GEI spécifiques des MTBC est la délétion des gènes du prophage PhiRv1 dans l'îlot *Rv1572c-RV1588c*. La présence de polymorphisme observé sur les gènes PhiRv1 du locus *Rv1572c-Rv1588c* semble être

globalement associée à la famille des souches. Cependant, pour certains profils spoligotypes, différentes formes de l'îlot *Rv1572c-Rv1588c* peuvent être retrouvées chez un même ST. Les gènes *PhiRv1* peuvent y être soit intacts, soit complètement délétés indépendamment du profil spoligotype.

Par comparaison avec la souche H37Rv, les souches « modernes » avec un îlot *Rv1572c-Rv1588c* polymorphe sont significativement plus nombreuses par comparaison aux souches avec un spoligotype « ancestral » ( $p = 0,034$ ). Par contre, la proportion d'îlot *Rv1572c-Rv1588c* polymorphe est significativement plus importante chez les souches « modernes 1 » par comparaison avec les souches « modernes 2 » ( $p = 0,009$ ).

### **II.5.2. Association de l'insertion d'IS6110 dans les GEI avec les familles de spoligotypes des souches cliniques**

La présence d'îlots génomiques portant des insertions de nucléotides a été étudiée en fonction du spoligotype des souches cliniques. La présence d'IS dans les îlots génomiques étudiés peut être soit observée dans des souches isolées, soit associée à des familles de souches (Tableau 14).

#### ***a) Les îlots avec IS insérée retrouvées dans des souches isolées***

Pour certains îlots génomiques, la présence d'IS n'est retrouvée que chez des souches isolées. Tel est le cas chez une unique souche avec un profil Haarlem ST678 où une IS est observée au niveau l'îlot génomique *Rv0893c-Rv0895*. De même pour l'IS dans l'îlot *Rv1041c* qui n'a été observée que dans une souche Haarlem ST50 ou l'IS dans l'îlot *Rv2267c-Rv2269c*, observée dans une souche T ST65.

#### ***b) Les îlots avec IS insérée retrouvées dans des familles particulières de souches***

- *IS dans l'îlot Rv0836c-Rv0837c de souches LAM* : la présence d'IS dans l'îlot *Rv0836c-Rv0837c* est associée aux souches avec un profil LAM ( $p < 0,001$ ). En effet, une IS est présente dans l'îlot pour les isolats cliniques LAM ST162 ( $n=2$ ), ST59 ( $n=4$ ) et LAM ST1525 ( $n=1$ ). Cependant, dans les souches LAM ST61 ( $n=3$ ), ST74 ( $n=6$ ), ST12 ( $n=1$ ) et ST136 ( $n=1$ ), l'îlot *Rv0836c-Rv0837c* semble intact.

- *IS dans l'îlot Rv1356c de souches U et Haarlem* : toutes les souches U (n=7) et Haarlem (n=11) de l'étude ont une IS dans l'îlot Rv1356c qui leur est associée ( $p < 0,001$ ).

- *IS dans l'îlot Rv1805c de certaines souches « modernes »* : bien que ce type d'îlot ne soit pas statistiquement associé aux souches modernes ( $p > 0,05$ ), il a été observé dans une souche CAS ST26, deux souches LAM ST162 et dans 2 souches Beijing ST1. Le séquençage des régions où sont insérées les IS dans l'îlot montre que chez les deux souches du type LAM, l'IS est localisée à 1339 pb en amont du gène Rv1805c alors que chez les deux souches du type Beijing, cette IS est localisée à 168 pb en amont de Rv1805c (Figure 29).

- *IS dans l'îlot Rv2336-Rv2339* : Ce type de polymorphisme est associé aux souches EAI (n=10 souches,  $p < 0,001$ ), ainsi qu'aux souches Haarlem (n=6 souches,  $p = 0,0013$ ). Cependant, quelques souches T (n=8) et une souche U possèdent aussi une IS dans l'îlot ( $p$  non significatif). Par ailleurs, malgré le fait que les souches « modern 2 » ont un nombre plus élevé de souches possédant une IS dans l'îlot, ce type de polymorphisme est statistiquement associé aux souches anciennes ( $p < 0,05$ ). L'îlot Rv2336-Rv2339 des souches Beijing, *M. bovis*, CAS, LAM, U ou X semble conservé par comparaison à H37Rv.

- *IS dans l'îlot Rv2491-Rv2494 dans les souches LAM9 ST162* : la présence d'IS dans l'îlot Rv2491-Rv2494 a été uniquement observée dans 2 souches LAM9 ST162.

- *IS dans l'îlot Rv2734-Rv2735c des souches CAS* : la présence d'IS dans l'îlot Rv2734-Rv2735c est observée dans les souches avec un profil CAS (n=9,  $p < 0,05$ ) regroupant 4 ST différents. Bien que ce type de polymorphisme de l'îlot Rv2734-Rv2735c soit statistiquement associé aux souches « modern 1 » ( $p < 0,001$ ), il a aussi été observé dans une souche du type MANU ST 54.

- *IS dans l'îlot Rv3376-Rv3378 de souches LAM* : la présence d'IS dans l'îlot Rv3376-Rv3378 est observée dans les souches LAM ( $p < 0,001$ ), en particulier celles avec un profil ST61 (n=4).

Tandis que la plupart des délétions au niveau des GEI sont relativement peu fréquentes dans les familles d'isolats cliniques étudiées, la présence d'IS dans les îlots semble par contre plus fréquente et plus spécifiquement associée aux familles de spoligotype des souches cliniques. Ainsi, il semble que la présence d'IS dans certains îlots génomiques soit plus fréquemment observée chez des familles spécifiques de profils spoligotypes dont la plupart sont associées à des groupes de souches modernes suggérant



un rôle du polymorphisme des régions acquises par transferts horizontaux dans l'évolution des souches MTBC.

## **II.6. Association du polymorphisme des GEI-spécifiques de MTBC avec le schéma évolutif des familles de souches**

Afin d'étudier la corrélation entre le polymorphisme des régions potentiellement acquises par les transferts horizontaux et la diversité génétique ainsi que le processus évolutif des familles de souches MTBC, le polymorphisme global des îlot génomiques dans chaque famille de souche a été recherché. Ainsi, le polymorphisme des GEI-spécifiques des MTBC est significativement plus élevé dans les souches Haarlem, LAM et Beijing ( $p < 0,05$ , Tableau 15). Par contre, les îlots génomiques sont statistiquement plus conservés pour les souches T et *M. bovis* ( $p < 0,05$ ).

Pour pouvoir comparer le niveau de polymorphisme des îlots génomiques entre les différentes familles de souches, le taux global de polymorphisme des GEI spécifiques des MTBC a été déterminé dans chaque famille spoligotype. Ainsi, dans chaque famille de souches, le rapport suivant a été calculé:

$$\frac{\text{Nombre de GEI-MTBC polymorphes}}{\text{Nombre de GEI-MTBC criblés}}$$

Ce taux a ensuite été comparé entre les différentes familles de souches.

Le calcul du taux de GEI polymorphes dans chaque famille de souches indique une variation du taux de polymorphisme des GEI en fonction des familles de souches (Tableau 16). En effet, la majorité des souches Haarlem, LAM, CAS, X, U et Beijing possèdent un taux élevé de GEI-spécifiques des MTBC polymorphes. Les souches T, EAI et *M. bovis* ont leurs GEI-spécifiques des MTBC plus conservés par comparaison à H37Rv. Les souches cliniques avec le nombre d'îlots génomiques polymorphes le plus élevé sont celles avec le profil LAM9 ST162 ( $n=2$ ). Dans ces souches ST162, 5 îlots génomiques sont différents de ceux de H37Rv (IS dans les îlots *Rv0836c-Rv0837c*, *Rv1805c* et *Rv2491-Rv2494*, délétion complète des gènes du prophage *PhiRv1*, délétion partielle de l'îlot *Rv3108c-Rv3126c*).

Pour affiner le lien trouvé entre le polymorphisme des îlots génomiques spécifiques des MTBC et la diversité du locus DR des souches cliniques, les familles de profils spoligotypes ont été groupées selon des schémas évolutifs préétablis des familles de souches MTBC (Gagneux et al. 2006, Arnold 2007 ). En classant les taux de polymorphisme des îlots génomiques de chaque famille dans un ordre croissant, on constate une concordance avec ces schémas évolutifs préétablis des souches MTBC (Figure 30).

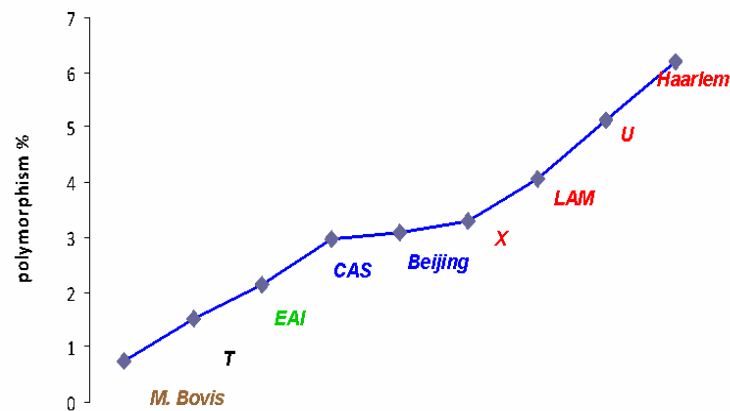
En assignant une valeur croissante aux familles de souches selon leur ordre d'apparition théorique, nos observations montrent une corrélation entre le taux d'îlots génomiques polymorphes et le schéma évolutif des familles MTBC. Ce taux d'îlots génomiques polymorphes est statistiquement différent d'une famille de souches à une autre ( $p < 0,0001$  selon le test de Kruskal-Wallis). En effet, d'abord, le taux de GEI polymorphes le plus faible est observé dans les souches *M. bovis* (0,75% de GEI polymorphes), puis ce taux de polymorphisme augmente dans les groupes de familles de souches. Cette augmentation du taux de polymorphisme est observée respectivement dans les souches « non définies » T, puis dans les souches ancestrales EAI, les souches « modernes 1 » (CAS et Beijing) et les souches « modernes 2 » (les souches X, LAM, U et Haarlem). Pour ces derniers groupes de familles de souches, le taux de GEI polymorphes retrouvé est d'environ 6,2 % (Figure 30 et Figure 31).

L'ordre d'agencement des spacers polymorphes du locus DR a aussi contribué à générer les schémas évolutifs des MBTC. Afin de voir si les liens observés entre l'augmentation du taux de polymorphisme des îlots génomiques spécifiques des MTBC et les groupes évolutifs de familles de souches sont aussi retrouvés au niveau du locus DR, le taux global de polymorphisme des spacers observé par spoligotyping a été déterminé puis comparé entre chaque famille de souches. Ainsi, contrairement à l'ordre d'agencement des spacers, le taux global de polymorphisme des spacers du locus DR (calculé à partir de l'absence de spacers) entre les différentes familles de souches ne concorde pas avec le schéma évolutif des MTBC (Figure 32).

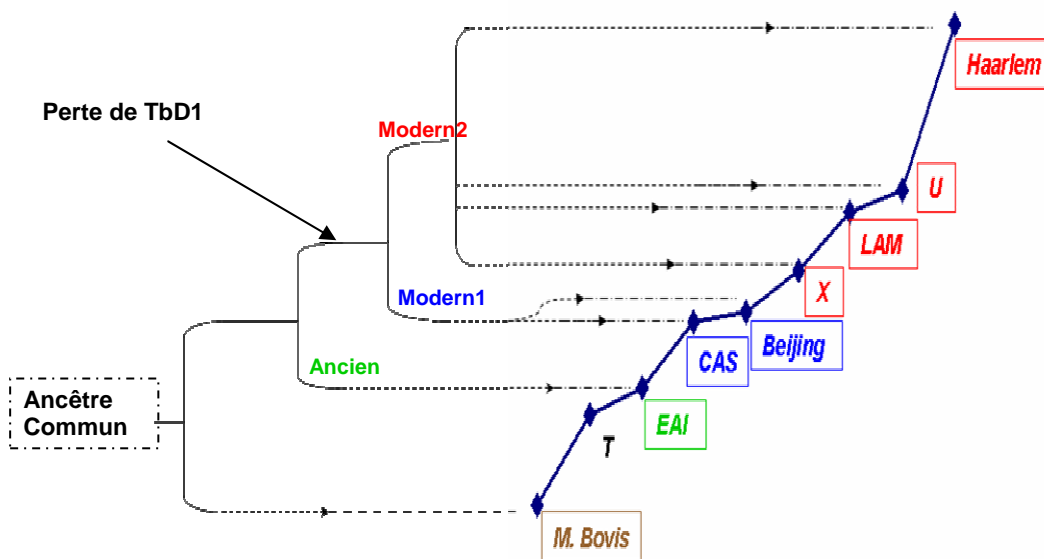
L'évolution des souches MTBC semble être associée à une augmentation du taux du polymorphisme global des îlots génomiques spécifiques. Les familles de souches avec des profils spoligotypes « modernes » semblent avoir plus d'îlot génomiques polymorphes. Cependant, au niveau du locus DR, le taux de polymorphisme global des spacers ne reflète pas le schéma évolutif proposé pour les MTBC.

**Figure 30. Courbes représentant le taux de polymorphisme des îlots génomiques criblés en fonction de la famille de spoligotype des souches cliniques MTBC.**

A)

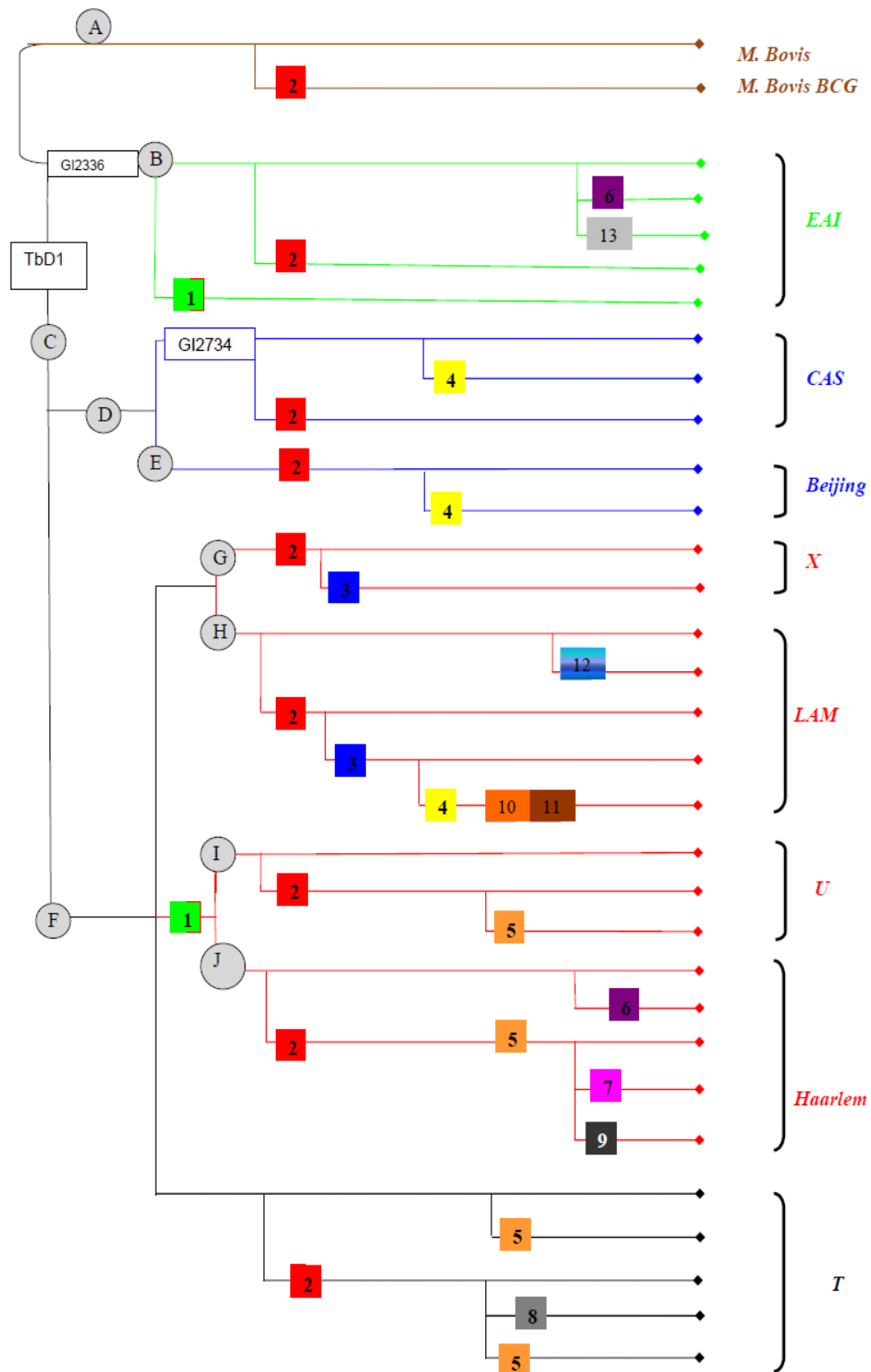


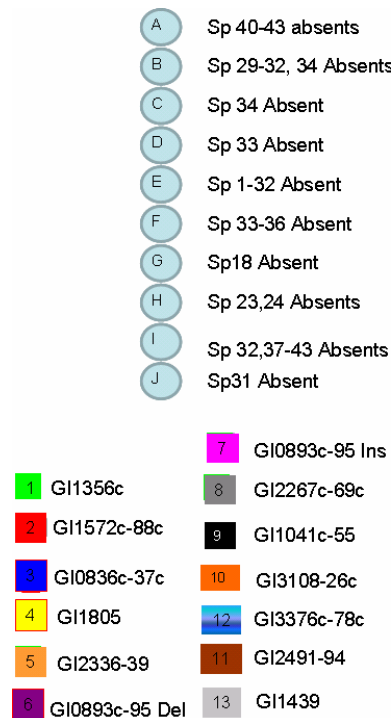
B)



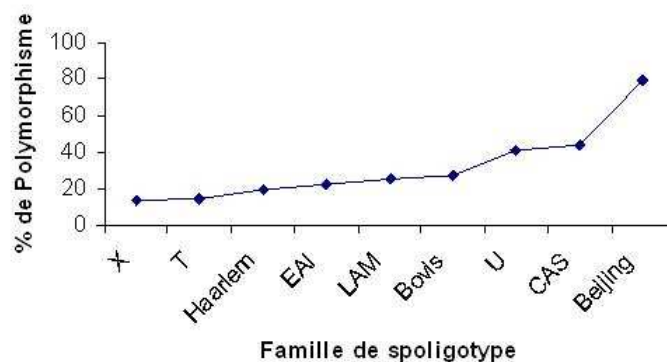
(A) Taux de polymorphisme des 14 îlots polymorphes selon le spoligotype des souches cliniques. Le pourcentage de polymorphisme représente le nombre d'îlots polymorphes par rapport au nombre total d'îlots criblés dans chaque famille de souches. (B) Représentation de la corrélation existant entre taux de polymorphisme des souches et schéma évolutif proposé pour les MTBC (Arnold 2007)

**Figure 31. Représentation de l'arbre phylogénétique proposé pour les MTBC et des îlots génétiques polymorphes.** L'arbre montre le polymorphisme du locus DR et de celui des GEI et repose sur le schéma évolutif proposé par Arnold *et al.*, 2007 et Brosch *et al.*, 2002.





**Figure 32. Courbe représentant le taux de polymorphisme des spacers du locus DR typés par spoligotypage en fonction de la famille des souches cliniques MTBC.**



## II.7. Association entre le polymorphisme des GEI et celui de chaque spacer dans le locus DR

L'augmentation du taux d'îlots génomiques polymorphes avec l'évolution des familles spoligotypes des souches n'est pas observée sur les spoligotypes du locus DR. Afin d'étudier la corrélation entre le polymorphisme des îlots génomiques et celui des spacers du locus DR,

les spacers associés aux GEI les plus polymorphes ont été recherchés. Ainsi, la fréquence du polymorphisme de chacun des 43 spacers utilisés dans le spoligotypage a été comparée selon le polymorphisme des îlots génomiques par des tests statistiques.

### **II.7.1. Etude de l'association entre la présence des gènes PhiRv1 et le polymorphisme des spacers dans les familles de spoligotypes**

Les séquences CRISPR, dont le locus DR fait partie, ont pour particularité d'être constituées de nucléotides provenant pour la plupart de bactériophages. La corrélation entre le polymorphisme des spacers du locus DR et celui observé sur les gènes du prophage PhiRv1 de l'îlot *Rv1572c-RV1588c* a donc d'abord été étudiée ici.

La comparaison du polymorphisme des spacers entre souches cliniques avec et sans gènes PhiRv1 a été réalisée à l'intérieur de chaque famille de spoligotype.

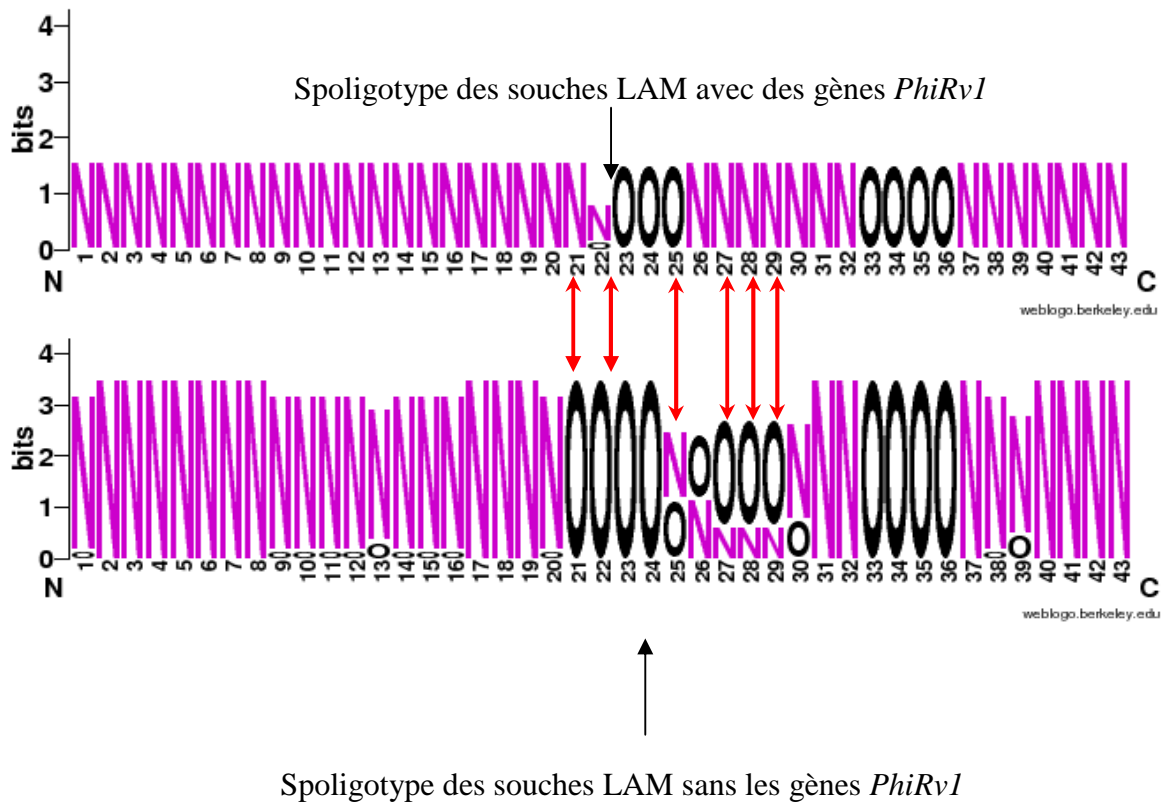
Ainsi, l'absence de gènes du prophage PhiRv1 chez certaines familles de souches est accompagnée par la délétion de spacers au niveau du locus DR. En effet, pour les souches LAM, la fréquence de la présence de chacun des 43 spacers entre souches possédant les gènes PhiRv1 (n=5) et celles qui n'en ont pas (n=15) montre une différence significative pour les fréquences du spacer 21 ( $p<0,001$ ), du spacer 22 ( $p<0,001$ ), du spacer 25 ( $p=0,023$ ), 27 ( $p=0,0054$ ), 28 ( $p=0,0054$ ) et du spacer 29 ( $p=0,0054$ ) (Figure 33A). Ces spacers sont moins fréquemment présents dans le génome des souches LAM où les gènes PhiRv1 ont été délétés.

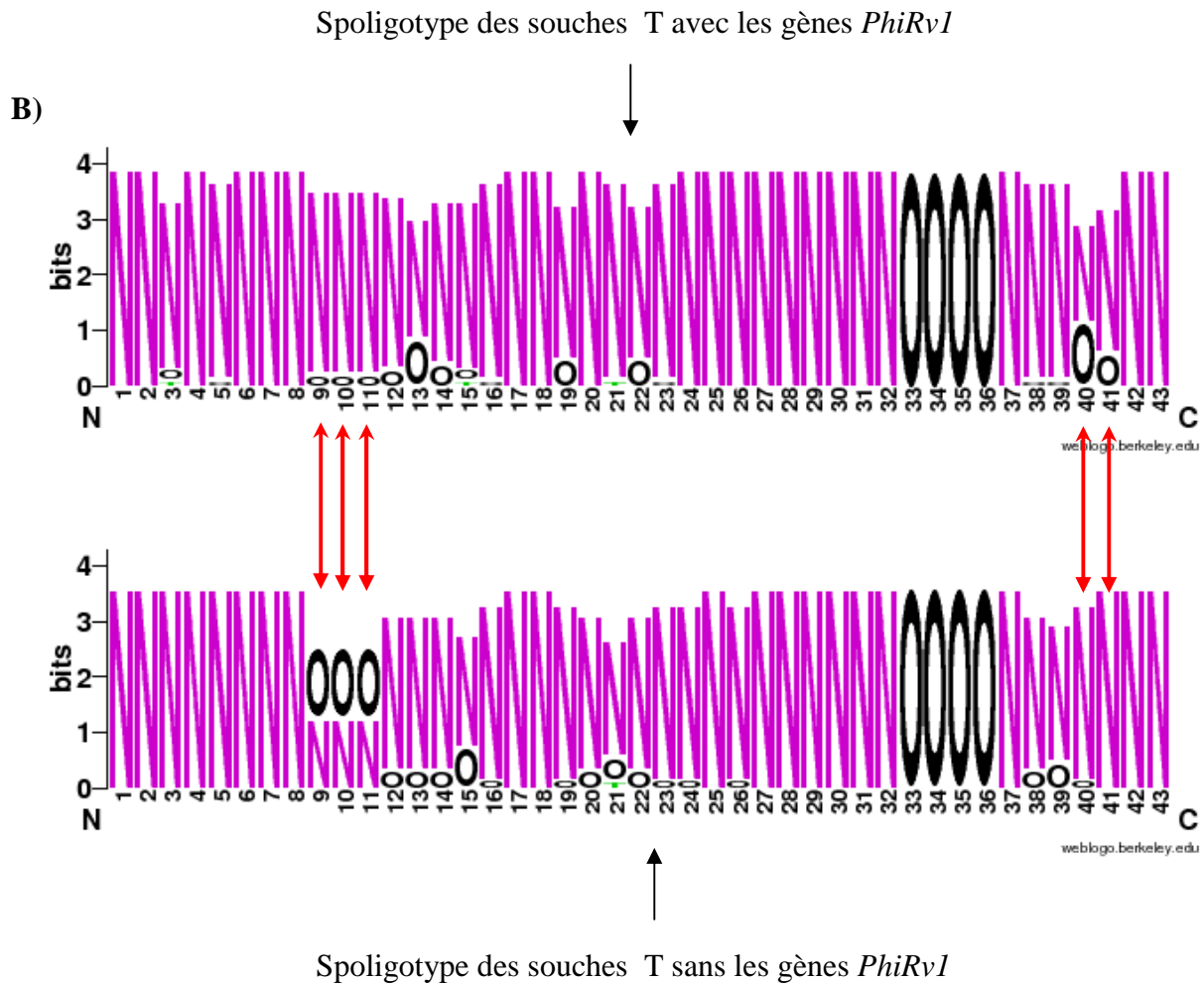
Pour la famille T criblée (n=56), les spacers 9 ( $p<0,001$ ), 10 ( $p<0,001$ ) et 11 ( $p<0,001$ ) sont moins présents dans les souches où les gènes des prophages PhiRv1 ont été délétés (n=19). Cependant, chez les souches T les spacers 40 ( $p=0,01$ ) et 41 ( $p=0,045$ ) sont plus fréquents dans les spoligotypes des souches T sans gènes PhiRv1 (Figure 33B).

Nos observations montrent donc que le polymorphisme retrouvé sur l'îlot *Rv1572c-Rv1588c* est associé à celui de certains spacers du locus DR.

**Figure 33. Représentation de la variation de la fréquence des spacers du locus DR en fonction du polymorphisme des gènes *PhiRv1* de l'îlot *Rv1572c-Rv1588c*. (A) Comparaison des spoligotypes des souches LAM selon la présence ou non des gènes du phage *PhiRv1*. (B) Comparaison des spoligotypes des souches T selon la présence ou non des gènes du phage *PhiRv1*. Les doubles flèches rouges indiquent les différences statistiquement significatives ( $p < 0,05$ ). Les représentations ont été générées à partir des spoligotypes sur [weblogo.berkeley.edu](http://weblogo.berkeley.edu). N= Présence du spacer ; O = absence du spacer.**

A)





## II.7.2. Etude de l'association entre la présence des IS dans les îlots génomiques et celui des spacers dans les familles de spoligotypes

En plus des délétions de spacers, des insertions d'IS dans les spacers sont impliquées dans la diversité du locus DR. Les éventuelles corrélations entre spoligotype et la présence d'IS dans les GEI ont été étudiées dans chaque famille de souches.

Ainsi, au sein des souches LAM, les spoligotypes ont été comparés entre souches possédant une IS dans l'îlot *Rv0836c-Rv0837c* (n=7) et celles qui en sont dépourvues (n=11). Ainsi, les fréquences de trois spacers sont significativement différentes entre les deux groupes. Les spacers 25 et 26 sont significativement plus fréquents chez les souches LAM où une IS est présente dans l'îlot *Rv0836c-Rv0837c* (n=7 sur 7 souches avec IS ;  $p < 0,001$  et  $0,0087$  respectivement), alors que le spacer 30 est plus fréquent chez les souches LAM avec une *Rv0836c-Rv0837c* conservée (n=11 souches LAM criblées sans IS,  $p = 0,0057$ ) (Figure 34A).



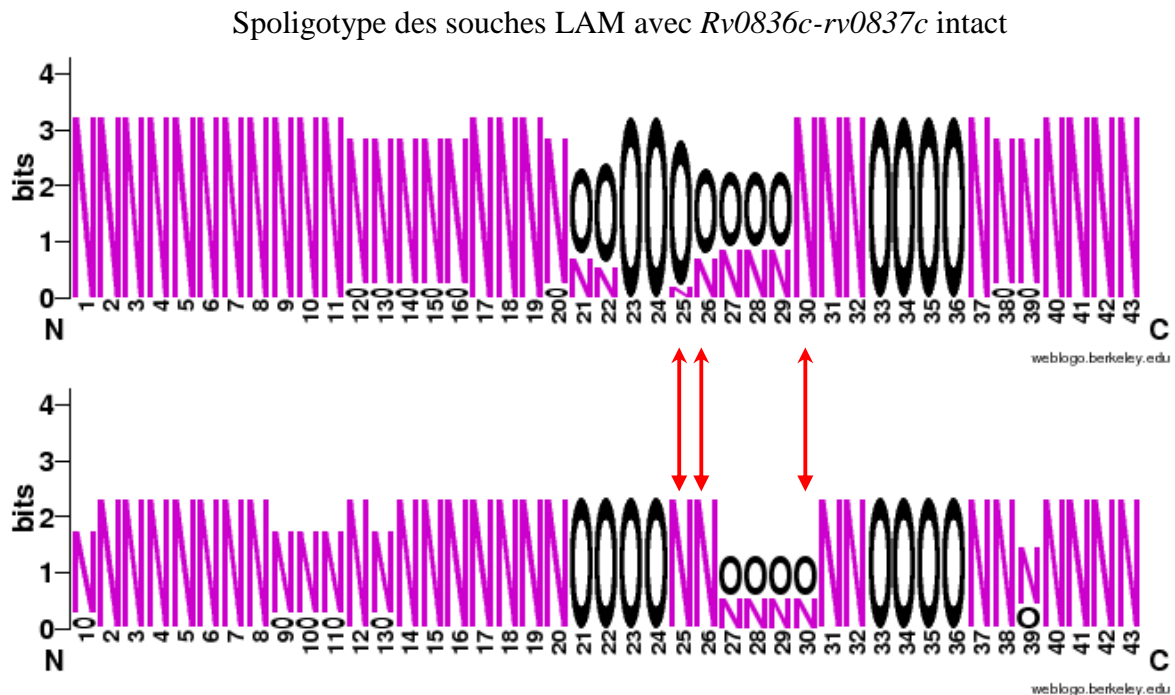
Concernant l'îlot *Rv1356c*, la présence d'IS dans l'îlot est principalement observée dans les souches U et Haarlem. Les souches de la famille Haarlem sont caractérisées par l'absence des spacers 31, 33 et 36, alors que les souches U n'ont pas les spacers 31 à 43. En tenant compte de cette différence dans l'alignement des spoligotypes des souches des 2 familles, il semble que le spacer 15 soit significativement plus fréquent chez les souches U et Haarlem ayant une IS dans l'îlot *Rv1356c* ( $n=21/21$  souches avec IS ;  $p=0,027$  (Figure 34 B)).

Par ailleurs, la comparaison des souches T avec une IS dans la région *Rv2336-Rv2339* et celles dont l'îlot n'en possède pas, montre que les spacers 3 ( $n=5$  souches sur 8 avec IS ;  $p=0,009298$ ) , 38 ( $n=6$  souches sur 8 avec IS ;  $p=0,008361$ ) et 39 ( $n=6$  souches sur 8 avec IS ;  $p=0,008361$ ) sont plus fréquemment présents dans les souches T avec une IS dans la région *Rv2336-Rv2339* (Figure 34C).

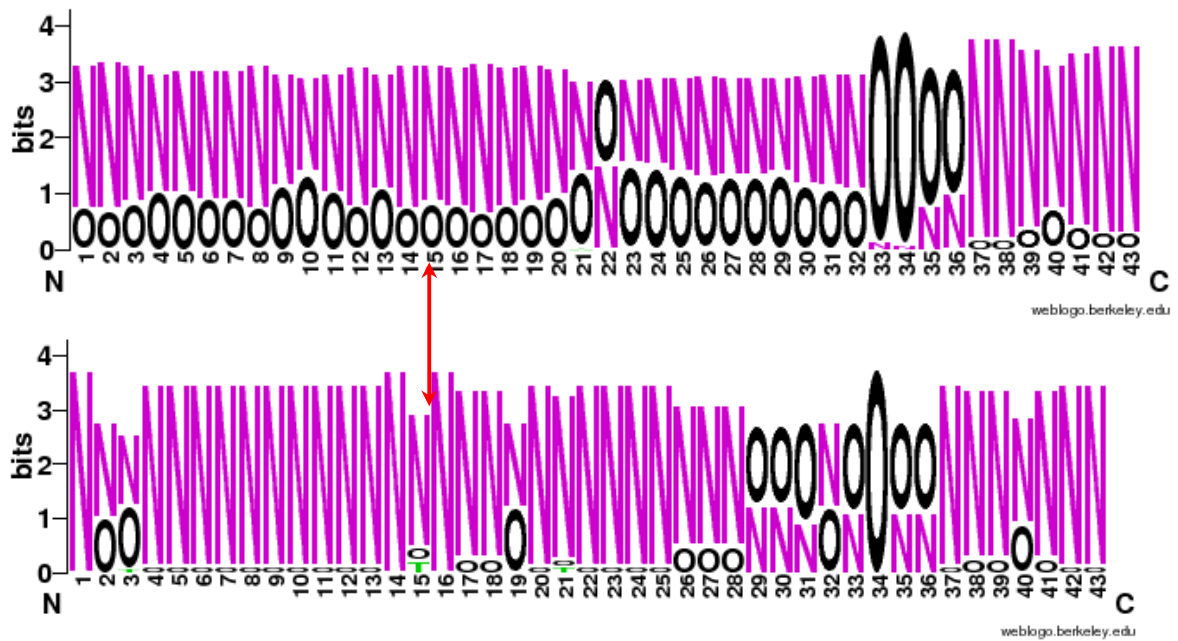
Le locus DR et les îlots génomiques auraient été tous deux acquis par des transferts horizontaux. Le polymorphisme observé sur certains spacers caractérisant des familles de spoligotypes est aussi associé aux délétions et insertions d'IS observées au niveau de certains îlots génomiques. Nos résultats montrent que les polymorphismes observés sur les îlots génomiques spécifiques des MTBC sont associés à ceux retrouvés sur certains spacers du locus DR.

**Figure 34. Représentation de la variation de la fréquence des spacers du locus DR obtenu par spoligotyping en fonction de la présence d'IS dans les îlots génomiques.** (A) Comparaison des spoligotypes des souches LAM selon la présence ou non d'IS dans l'îlot *Rv0836c-rv0837c*. (B) Comparaison des spoligotypes des souches selon la présence ou non d'IS dans l'îlot *Rv1356c*. (C) Comparaison des spoligotypes des souches T selon la présence ou non d'IS dans l'îlot *Rv2336-Rv2339*. Les doubles flèches rouges indiquent les différences statistiquement significatives ( $p < 0,05$ ). Les représentations ont été générées à partir des spoligotypes sur [weblogo.berkeley.edu](http://weblogo.berkeley.edu). N= Présence du spacer ; O = absence du spacer ; T= non déterminé.

A)

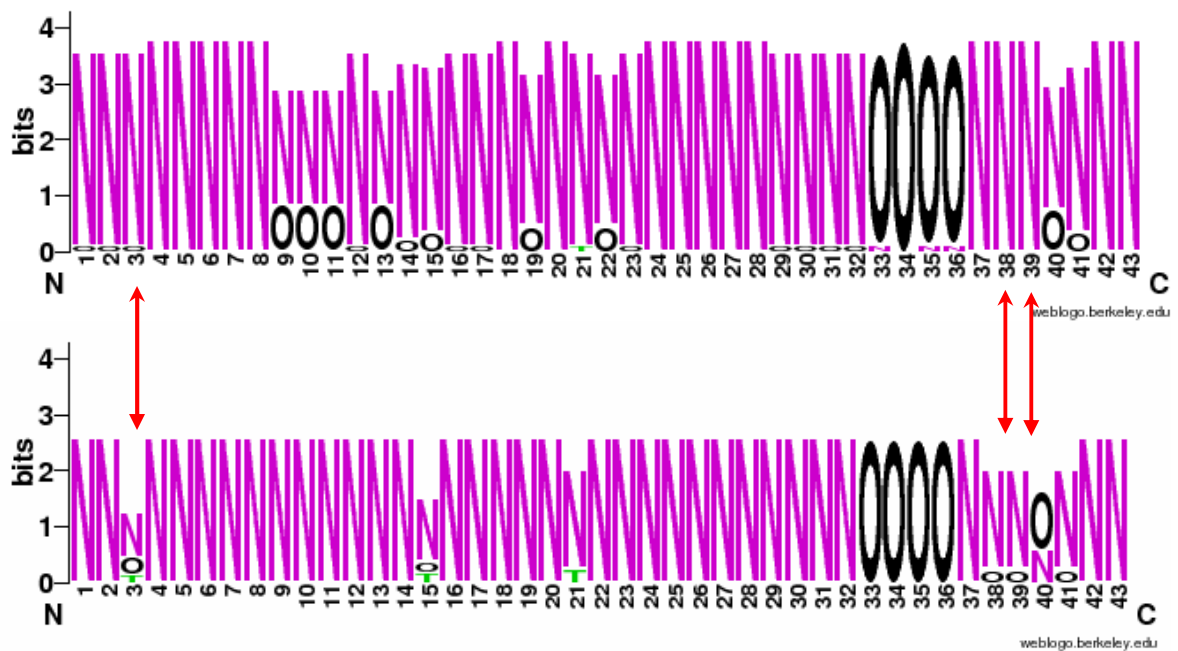


B) Spoligotype des souches avec la région *Rv1356c* intacte



Spoligotype des souches avec une IS dans la région *Rv1356c*

C) Spoligotype des souches T avec la région *Rv2336-Rv2339* intacte



Spoligotype des souches T avec une IS la région *Rv2336-Rv2339*

## **II.8. Fonctions des GEI délétés ou altérés par les IS**

Les fonctions potentielles des GEI altérés ont été recherchées à partir de Tuberculist (<http://genolist.pasteur.fr/tuberculist>). La plupart des gènes affectés par les polymorphismes ne sont pas essentiels pour la croissance des bactéries. Les GEI polymorphes sont pour la plupart impliqués dans l'adaptation de la bactérie aux conditions de l'environnement (Tableau 12). Certains de ces GEI ont les caractéristiques des îlots de pathogénicité avec des gènes de virulence comme l'îlot *Rv2336-Rv2339*. L'expression du gène *Rv2336* est en effet diminuée chez une souche avirulente de *M. tuberculosis*, H37Ra (Rindi et al. 2009). D'autres îlots seraient impliqués dans la survie des bactéries dans la cellule-hôte alors que d'autres sont impliqués dans des voies métaboliques, tels que la biosynthèse de cofacteur molybdiques.

## **II.9. Association entre données cliniques des patients et génotype des souches**

Nos précédents résultats (résultats I et Rakotosamimanana et al. 2010 en annexe) ont montré l'existence d'une corrélation entre réponse IFN $\gamma$  de l'hôte et le spoligotype des souches cliniques infectantes. Les corrélations éventuelles entre données cliniques collectées des patients (âge, sexe, forme de tuberculose, issue des traitements anti-tuberculeux, etc...cf tableau 2 en ANNEXE) et génotype des souches ont aussi été analysées ici.

Le génotype des souches (aussi bien au niveau du polymorphisme des îlots génomiques que du spoligotype) ne semble présenter aucune corrélation ni avec l'âge des patients, ni la forme clinique de la tuberculose (pulmonaire ou extrapulmonaire). Par contre, le nombre de patients masculins infectés par des souches de la famille CAS (n=11) est plus importante que celui des sujets féminins (n=2 ; p=0,016). Etant donné que les souches de la famille CAS ont une IS dans l'îlot *Rv2734-Rv2735*, les mêmes proportions sont observées en analysant le polymorphisme de l'îlot selon le sexe des patients (p= 0,026).

**Tableau 12. Liste des fonctions possibles des îlots polymorphes selon les gènes qui les composent.**

Ilôt génomique polymorphe	Observations		Essentiel ou non pour la croissance de MTBC (E/NE)	Prediction OPERON
Rv0836c-Rv0837c		surexprimé en milieu appauvri	0 / 2	Rv0836c-Rv0837c
Rv0893c-Rv0895	Possible Famille de gènes LuxR		1 / 2	
Rv1041c-Rv1055	IS LIKE-2 TRANSPOSASE	surexprimé en milieu appauvri	0 / 13 (5ND)	Rv1041c-Rv1042c
		Rv1045: Nécessaire pour la survie dans les macrophages de souris		Rv1044-Rv1045
		identifié dans les filtrats de culture de <i>M. tuberculosis H37Rv</i>		Rv1054-Rv1055
	PROBABLE INTEGRASE	surexprimé suite à l'exposition à de hautes températures		
Rv1089A-Rv1090	endoglucanase		0 / 1 (1ND)	Rv1090-Rv1091
	endoglucanase			
Rv1356c		surexprimé en milieu appauvri	0 / 1	Rv1356c-1357c
Rv1439c			0 / 1	Rv1439c-Rv1441c
Rv1572c-Rv1588c	Genes Prophage PhiRv1	Rv1585c: transcription réprimée dans de faibles pH du milieu	NE (Tsolaki et al.)	Rv1579c-Rv1580c
	REP13E12	Rv1587c: expression plus faible chez H37Rv dans un milieu dépourvu de Mg <sup>2+</sup>		Rv1582c-Rv1583c
				Rv1583c-Rv1584c
				Rv1585c-Rv1586c
				Rv1587c-Rv1588c
RV1805c		expression plus élevée dans milieu dépourvu de Mg <sup>2+</sup>	0 / 1	Rv1804c-1805c
Rv2336-Rv2339	virulence	Rv2336: Diminution de l'expression dans H37Ra	1 / 3	Rv2335-Rv2336
				Rv2337c-Rv2338c
	Biosynthèse du cofacteur MOLYBDOPTEINUM			
Rv2734-Rv2735c	Transport d'acides gras		0 / 2	Rv2733c-2735c
				Rv2735c-RecA RecX
Rv2267c-Rv2269c	CYTOCHROMES P450	surexprimé en milieu appauvri surexprimé en milieu appauvri surexprimé en milieu appauvri	1 / 2	Rv2267c-2268c Rv2267c-2269c
Rv2491-Rv2494			0 / 2 (2 ND)	Rv2491-Rv2492
	Antitoxine			Rv2493-Rv2494
	Domaine Pili-N-terminale			
Rv3108c-Rv3126c	Biosynthèse du cofacteur MOLYBDOPTEINUM		4 / 5 (2ND)	Rv3109-Rv3110
	POSSIBLE PHOSPHATASE			Rv3110-Rv3111
	PROBABLE TRANSPOSASE	Diminution de l'expression en milieu appauvri		Rv3111-Rv3112
				Rv3117-Rv3118
				Rv3119-Rv3120
	SULFOTRANSFERASE			
		Rv3118: Nécessaire pour la survie dans les macrophages de souris		
		Rv3115: Diminution de l'expression en milieu appauvri		
		Rv3126: gene induit par l'hypoxie		
	PROBABLE CYTOCHROME P450			
Rv3376-Rv3378c	Protéine de régulation de la transcription		0 / 2 (1 ND)	
	Protéine PPE			
		gene induit par l'hypoxie		
	POSSIBLE CYCLASE	Nécessaire pour la survie dans les macrophages		Rv3377c-Rv3378c

**Tableau 13. Polymorphisme de l'îlot Rv1572c-Rv1588c selon les familles de souches.**

Groupe	Famille	Absence de PhiRv1		Présence de PhiRv1		Déplacement PhiRv1	
Moderne1	Beijing	ST1					
	CAS	ST16 ST24		ST21 ST26			
Moderne2	Haarlem	ST50 ST62 ST1678		ST50 ST273		ST50	
	U	ST46 ST1904		ST237		ST46	
	X	ST302				ST119 ST336	
	LAM	ST59 ST74 ST136 ST162 ST1525		ST61			
Moderne2 Mal- défini	T	ST52 ST53 ST65 ST118 ST136 ST156 ST174 ST1214		ST37 ST40 ST53 ST73 ST78 ST86 ST102 ST154 ST171 ST242 ST1214 ST1332 ST1679		ST73 ST78 ST86 ST1679	
Ancient	EAI	ST8 ST10 ST109		ST109 ST1062 ST1676			
M. bovis	M. bovis	ST482					
	BCG			ST1673			

**Tableau 14. Présence d'IS dans les îlots génomiques en fonction des familles de souches.**

Groupe	Famille	<i>Rv0836c- Rv0837c</i>	<i>Rv0893c- Rv0895</i>	<i>Rv1356c</i>	<i>Rv1805c</i>	<i>Rv2336- Rv2339</i>	<i>Rv2734- Rv2735c</i>	<i>Rv3376- Rv3378</i>
Moderne1	Beijing				ST1			
	CAS				ST26		ST16 ST21 ST26 ST1675	
Moderne2	Haarlem		ST678	ST47 ST50 ST62 ST273 ST1678		ST47 ST50 ST62 ST1678		
	U			ST46 ST237		ST46		
	X							
	LAM	ST162 ST59 ST1525			ST162			ST61
Moderne2 Mal- défini	T			ST28		ST28 ST53 ST118 ST242 ST1332		
Ancient	EAI			ST1062		ST6 ST18 ST109 ST1062		
	MANU						ST54	
M. bovis	M. bovis							
	BCG							

**Tableau 15. Association du polymorphisme des îlots génomiques avec les familles spoligotypes des souches cliniques. Les différences significatives ( $p < 0,05$  par Chi2) sont affichées en rouge.**

Famille Spoligotype		Résultat criblage GEI		Total	%		Valeur p
		Conservé	Polymorphe		Conservé	Polymorphe	
H	H	0	12	12	0	100	0,035868
	non H	36	89	125	29	71	
U	U	1	7	8	13	88	0,437698
	non U	53	115	168	32	68	
LAM	LAM	2	19	21	10	90	0,04678
	non LAM	52	103	155	34	66	
X	X	0	4	4	0	100	0,313886
	non X	54	118	172	31	69	
Beijing	Beijing	1	18	19	5	95	0,022584
	non Beijing	53	104	157	34	66	
CAS	CAS	2	11	13	15	85	0,349078
	non Cas	52	111	163	32	68	
EAI	EAI	12	21	33	36	64	0,564751
	non EAI	42	101	143	29	71	
T	T	30	28	58	52	48	0,000047
	non T	24	94	118	20	80	
Bovis	bovis	6	1	7	86	14	0,00505
	non bovis	48	121	169	28	72	

**Tableau 16. Description du taux de polymorphisme des îlots génomiques selon les familles de spoligotypes des souches. OR= Odds ratio ; IC= Intervalle de confiance.**

Famille Spoligotype	GEI polymorphes	GEI criblés	n (souches)	% polymorphisme	OR	IC95%		p
Bovis	1	134	7	0,746268657	1			<0,0001
T	33	2161	58	1,527070801	5,4	0,6	48,6	
EAI	23	1073	33	2,143522833	11	1,2	104,0	
CAS	12	403	13	2,977667494	30	2,2	413,7	
Beijing	21	682	19	3,079178886	108	5,7	2049,3	
X	5	152	4	3,289473684	24	1,1	516,5	
LAM	32	785	21	4,076433121	60	4,5	797,2	
U	13	254	8	5,118110236	48	2,4	953,2	
H	29	468	12	6,196581197	72	3,7	1391,4	



## **II.10. Discussions**

Le spoligotyping, ainsi que d'autres outils moléculaires sont largement utilisés pour étudier l'évolution et l'épidémiologie des souches du complexe *M. tuberculosis*. La plupart de ces outils moléculaires permettent en effet de classer les différentes espèces MTBC en lignées ou familles (Brudey et al. 2006, Gagneux et al. 2006 ). Ces familles de souches semblent elles-mêmes associées à certains phénotypes spécifiques, aux origines et à l'évolution de la population humaine ainsi qu'aux flux migratoires de ces populations (Hirsh et al. 2004 , Reed et al. 2004 , Wirth et al. 2008). Alors que le rôle du polymorphisme des spacers dans la diversité des souches MTBC a été établi, l'association entre ces variations spécifiques, la localisation géographique des populations hôtes et les différents phénotypes bactériens associés à cette diversité reste méconnue. En 2007, à partir d'études bioinformatiques paramétriques combinées sur des séquences nucléotidiques atypiques de génomes disponibles d'espèces MTBC, Becq et ses collaborateurs ont suggéré une contribution des îlots génomiques acquis par transferts horizontaux à l'évolution des bacilles tuberculeux (Becq et al. 2007). Il a été ainsi observé 48 îlots génomiques uniquement présents dans le génome de bactéries MTBC.

Dans la présente étude, la présence des GEI-spécifiques des MTBC a été recherchée dans un nombre plus important d'isolats cliniques issus de patients tuberculeux par PCR. La taille des amplicons et les séquences nucléotidiques obtenues ont été ensuite comparées à celles de H37Rv. Ainsi, la plupart de ces GEI semble être conservée dans le génome des souches cliniques soulignant leur importance dans les bactéries MTBC. Cependant, quelques polymorphismes de grande échelle ont été observés. En effet, des GEI sont partiellement ou totalement absents de certaines souches et, dans d'autres, une augmentation de la taille des amplicons correspondant à une transposition d'*IS6110* est observée. Des études ultérieures ont suggéré qu'une partie des génomes des souches actuelles de MTBC dériveraient de l'assemblage de séquences nucléotidiques provenant de plusieurs épisodes de transferts horizontaux à partir du pool des souches progénitrices de MTBC (Gutierrez et al. 2005). Alors que ces observations suggèrent que depuis la spéciation des MTBC, les espèces actuelles de bacilles tuberculeux semblent présenter une structure génomique clonale et hautement conservée, la présence de larges polymorphismes au sein des GEI observée lors de notre étude semble par contre suggérer un « mouvement » de matériel génétique à partir de génomes de MTBC.

L'une des hypothèses pour expliquer l'absence de certains GEI serait une acquisition séquentielle des îlots suite à l'apparition des MTBC et que certaines souches n'ont pas acquis ces GEI. Les études sur les barrières contre les transferts horizontaux chez

*Escherichia coli* suggèrent que la toxicité des gènes exogènes serait la principale cause de leur non acquisition dans le génome récepteur (Sorek et al. 2007). Dans notre étude, la plupart des îlots génomiques sont présents dans la majorité des souches suggérant que ces GEI ne sont pas toxiques. L'autre explication sur l'apparition de polymorphismes au sein des GEI serait la perte progressive de certains îlots acquis dans le génome des MTBC. La délétion de certains de ces GEI ainsi que l'altération de certains îlots suite à une insertion d'IS sont en effet observées. La présence de délétions irréversibles dans le génome des MTBC a déjà été observée et serait impliquée dans les variations phénotypiques ainsi que dans l'évolution des espèces MTBC (Hirsh et al. 2004, Tsolaki et al. 2004 ). De plus, les rares recombinaisons génétiques au sein des MTBC suggèrent un faible taux de transferts horizontaux dans les MTBC (Gutierrez et al. 2005). L'extrême rareté des transferts horizontaux dans les espèces MTBC s'expliquerait par le mode de vie intracellulaire de ces pathogènes qui ne favorise pas beaucoup d'échanges à cause d'une niche écologique close où les autres microorganismes, comme les virus ou les autres bactéries, sont quasi inexistants. De plus, *in vitro*, les mycobactéries sont en général réfractaires aux phénomènes de transduction et de transformation (Parsons et al. 1998).

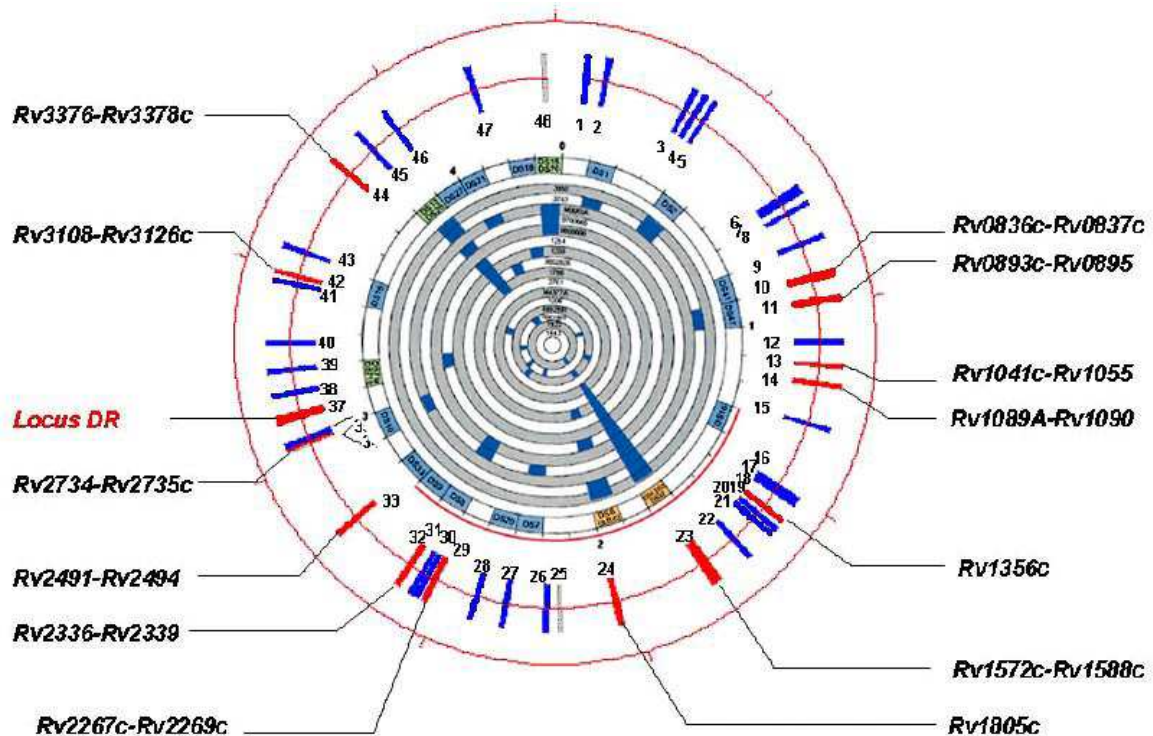
En même temps, l'observation des gènes et des régions délétés par LSP de la littérature suggère que la plupart de ces séquences délétées sont soit englobées dans des îlots génomiques (spécifiques ou non des MTBC), soit localisées immédiatement à côté d'îlots génomiques (Tsolaki et al. 2004 , Becq et al. 2007 , Veyrier et al. 2009). Dans notre étude, en plus de la présence de délétions au niveau des îlots génomiques, la présence d'IS modifiant la phase de lecture des gènes adjacents a été observée. Il a déjà été démontré que les transpositions d'IS altèraient en effet l'expression des gènes où ils sont insérés (Safi et al. 2004). Nos observations suggèrent que les îlots génomiques constituent l'une des cibles de ces IS.

Le nombre des GEI altérés (soit par délétion, soit par insertion d'IS) varie avec les familles de MTBC cliniques générées à partir du spoligotype de ces souches. Une augmentation du nombre de GEI polymorphes est observée en fonction de la classification des familles des souches étudiées dans le schéma évolutif des MTBC. En effet, lorsque les différentes familles de souches sont groupées selon les schémas évolutifs préétablis des MTBC, il semble que la fonction de certains GEI tend à se perdre avec l'évolution des espèces MTBC. Il a été suggéré que l'augmentation du nombre d'IS6110 dans le génome des mycobactéries leur apportait un avantage sélectif et serait contrôlé par des facteurs environnementaux, comme la présence de promoteurs adjacents ou par une pression microaérobie (Ghanekar et al. 1999). Alors que la fonction exacte des IS est peu connue, la présente étude révèle un rôle important des IS dans l'organisation du génome des MTBC. La présence des IS peut être liée à l'évolution de ces souches. Les éléments IS, en particulier

IS6110, peuvent aussi être à l'origine de recombinaisons homologues ou peuvent être des navettes pour l'acquisition de nouveaux acides nucléiques (Fang et al. 1998). L'une des limites de notre étude est le fait que le criblage des GEI avec des localisations spécifiques préétablies dans le génome de H37Rv ne permet pas de savoir si la perte des gènes observée est contrebalancée ailleurs dans le génome suite, par exemple, à l'acquisition de gènes ayant les mêmes fonctions ou si d'autres gènes ont des fonctions redondantes aux gènes altérés. Cependant, les réductions génomiques ont été largement observées dans de nombreuses espèces de bactéries intracellulaires dont *M. tuberculosis* (Kato-Maeda et al. 2001). L'adaptation d'un organisme à un mode de vie intracellulaire passe par une "élimination" de gènes rendus superflus dont les fonctions peuvent être remplacées par celles fournies par l'hôte parasité. Les bactéries pathogènes obligatoires ont en effet tendance à appliquer un processus de réduction génomique évolutif par la désactivation de certains gènes (Dagan et al. 2006). D'après Dagan et ses collaborateurs, la réduction génomique commencerait par une inactivation des gènes superflus en pseudogènes. Les gènes non fonctionnels sont ensuite délétés par des processus neutres comme les réarrangements génomiques. Alors que les pseudogènes sont souvent issus de mutations inactivant la fonction de gènes, notre étude montre que pour les gènes des GEI, les IS semblent jouer un rôle non négligeable dans l'inactivation des fonctions apportées par ces GEI.

Ces variations dans le génome seraient impliquées dans le mode de vie de ces bactéries pathogènes dans leur hôte (Hacker et al. 2003). Dans leur étude, suite à la comparaison du génome de 3 espèces bactériennes intracellulaires, Dagan et ses collaborateurs n'ont trouvé aucune règle particulière régissant les fonctions à désactiver par l'extinction en masse de gènes durant l'évolution réductive, bien que les voies métaboliques soient un peu plus fréquemment inactivées que les autres fonctions (Dagan et al. 2006). Notre étude pourrait suggérer que pour les bactéries MTBC, ces réductions génomiques semblent affecter plus particulièrement les régions acquises par transferts horizontaux (Figure 35).

**Figure 35. Localisation des îlots génomiques polymorphes (cercle extérieur) et comparaison avec les délétions génomiques observées dans différentes souches *M. tuberculosis* par Kato-Maeda et ses collaborateurs en 2001.**



Dans cette étude, les réductions génomiques observées dans les MTBC pourraient d'abord permettre aux génomes plus petits d'être plus rapidement répliqués et la non utilisation de certains gènes pourrait économiser de l'énergie en plus pour les bactéries. Ensuite, l'inactivation de certains gènes peut aussi servir aux bactéries pour échapper au système immunitaire de l'hôte. Tel pourrait être le cas de la délétion de l'îlot *Rv0836c-Rv0837c* observé chez une souche unique de la famille X. En effet, cet îlot est flanqué par les gènes *lpqQ* et *lpqR* qui composent certaines protéines de surface bactériennes. Cependant, alors que de récentes observations suggèrent que les épitopes des cellules T de *M. tuberculosis* seraient hyperconservés, la pression de sélection du système immunitaire de l'hôte pourrait quand même favoriser l'élimination de certains gènes associés aux antigènes de la membrane cellulaire bactérienne (Malen et al. 2007 , Comas et al. 2010).

Parmi les îlots génomiques les plus polymorphes, on retrouve l'îlot *Rv1572c-Rv1588c* qui contient les gènes du prophage *PhiRv1* dont le rôle n'est pas connu. Dans H37Rv, les gènes du phage coupent l'opéron biotine. La biotine est un cofacteur essentiel dans les activités enzymatiques, en particulier, de la pyruvate deshydrogénase et de la carboxylase.

Cette dernière enzyme permet d'ajouter une unité acétyl-CoA à une chaîne native d'acide gras (Purushothaman et al. 2008). La délétion ou la délocalisation des gènes *PhiRv1* de l'opéron biotine pourrait apporter un avantage aux bactéries en améliorant le métabolisme des acides gras. Par ailleurs, il apparaît que dans cette étude, l'analyse du polymorphisme de la région *Rv1572c-Rv1588c* (délétion ou non des gènes *PhiRv1*) et la résistance aux antituberculeux utilisés indique que la proportion des souches résistantes à la streptomycine et à la rifampicine est plus importante chez les souches avec des gènes *PhiRv1* intacts dans le génome. Cependant, malgré la disponibilité des résultats des antibiogrammes réalisés sur une centaine de souches cliniques de l'étude (annexe 4), les résultats ne sont pas utilisables statistiquement. En effet, l'échantillonnage réalisé lors de cette étude ne nous a pas permis d'étudier l'association entre le polymorphisme des îlots génomiques avec la résistance aux antituberculeux à cause de l'existence de biais dans la sélection des souches multi résistantes.

Nos résultats semblent aussi confirmer la présence de polymorphisme au niveau de gènes non essentiels à la croissance bactérienne. Dans l'étude précédente (résultats I), nous avons observé une certaine corrélation entre la réponse immunitaire de l'hôte et la diversité génétique observée au niveau du locus DR des souches isolées de patients tuberculeux et de leurs contacts. Nos résultats ont par ailleurs suggéré une diminution de la réponse IFN $\gamma$  produite par les PBMC issus de patients et de leur contacts infectés par des souches « modernes » par rapport à la réponse produite par les patients infectés par des souches « anciennes » (Rakotosamimanana et al. 2010). Dans la présente étude, la présence d'IS au niveau de la région *Rv2336-Rv2339*, un îlot de pathogénicité, est observé principalement dans les souches anciennes (EAI) et pourrait être lié à la réponse immunitaire plus importante observée dans les PBMC. De plus, alors que les transferts horizontaux sont impliqués dans la résistance aux antibiotiques de certaines bactéries, l'existence d'une certaine corrélation entre résistance aux antituberculeux et polymorphisme au sein de matériel génétique potentiellement acquis par transferts horizontaux dans les MTBC observée ici reste à valider sur une population plus importante de souches.

La corrélation entre le polymorphisme du locus DR et les phénotypes associés à cette diversité pourrait être associée à l'altération des gènes au niveau des GEI en général. Récemment, le rôle des CRISPR dans l'« immunité » bactérienne contre l'invasion par d'autres microorganismes, comme les bactériophages, a été démontrée. L'implication des CRISPR dans la prévention des transferts horizontaux néfastes à la bactérie a été suggérée, en particulier, dans le cas de conjugaison observée chez les staphylocoques (Marraffini and Sontheimer 2009). Des séquences d'acides nucléiques pénétrant la bactérie seraient incorporées dans les loci CRISPR pour former de nouveaux spacers. Ces nouveaux spacers

seront par la suite impliqués dans la phase de défense des CRISPR. Après la transcription et la maturation des CRISPR en ARNcr (ARN-CRISPR), ces derniers vont aider les mécanismes effecteurs de la reconnaissance de l'ADN étranger et le blocage de l'infection (Brouns et al. 2008 , Marraffini and Sontheimer 2009).

Le locus DR constitue l'unique région CRISPR des MTBC (Jansen et al. 2002). Aucun des 94 spacers connus des espèces MTBC n'a cependant de similarité avec les 48 GEI spécifiques des MTBC et aucune homologie de séquence n'est observée ni avec les génomes bactériens connus, ni dans les régions en dehors du locus DR (van Embden et al. 2000). Afin de comprendre les rôles éventuels de l'unique région CRISPR dans la diversité des MTBC et la corrélation avec les îlots génomiques, nous avons analysé le polymorphisme de chacun des 43 spacers utilisés pour le spoligotyping et les GEI polymorphes. Nos résultats suggèrent une certaine corrélation entre le taux de GEI polymorphes et l'évolution des différentes familles de souches obtenues à partir de la diversité génétique au niveau du locus DR. La comparaison des fréquences de la présence des différents spacers entre souches GEI-polymorphes et GEI-non polymorphes semble montrer que la disparition de certains spacers est associée au polymorphisme observé au niveau des îlots génomiques dans les familles de spoligotypes.

Il semble que les polymorphismes observés sur certaines régions acquises par transferts horizontaux du génome des MTBC, en particulier les îlots génomiques et les spacers du locus DR, soient corrélés. Une des explications à ces observations est que les bactéries MTBC auraient pour ancêtres des bactéries environnementales. La présence de séquences CRISPR dans les souches cliniques MTBC actuelles pourrait être le vestige d'une protection contre les attaques provenant de différentes niches écologiques rencontrés par les ancêtres des MTBC, avant l'apparition de souches pathogènes MTBC. Le locus DR, comme nombre de loci CRISPR, semble aussi avoir été acquis par transfert horizontal dans le génome des MTBC (Godde and Bickerton 2006 , Becq et al. 2007). La non utilisation de l'activité CRISPR due à l'extrême rareté des échanges de matériels génétiques dans le milieu intracellulaire où vivent et se reproduisent les bactéries MTBC pourrait expliquer la perte progressive des spacers dans les souches « modernes » de *M. tuberculosis* (comme dans la lignée Beijing ou la lignée Haarlem) ainsi que la convergence apparente des profils spoligotypes du locus DR, sous l'effet d'une pression de sélection négative. Ce polymorphisme du locus DR semble refléter celui retrouvé au niveau des îlots génomiques. Comme ces îlots sont associés à des fonctions particulières, les polymorphismes au niveau des GEI pourraient être associés aux phénotypes retrouvés chez telle ou telle famille spoligotypes de souches.

# **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

Dans le but d'expliquer l'origine des variations phénotypiques associés à la diversité génétique des souches bactériennes MTBC, le locus DR issus d'isolats cliniques de ces souches a été typé par spoligotyping et la diversité génétique générée a été corrélée avec la réponse IFN $\gamma$  de PBMC isolées de patients tuberculeux et de leur contact. La classification des familles de profils spoligotypes de ces isolats cliniques a permis de montrer que les souches « modernes » semblent induire une réponse IFN $\gamma$  moins importante chez les PBMC isolés de patients tuberculeux et de leurs contacts que les souches avec un profil spoligotype plus « ancestrale ». L'existence d'une grande diversité génétique au sein des bactéries MTBC devrait être pris en compte dans les stratégies de lutte contre la tuberculose.

Comme la plupart des CRISPR, le locus DR aurait été généré par l'acquisition de spacers probablement prélevé à partir d'ADN exogènes issus de plusieurs séries de transferts horizontaux. Le polymorphisme du locus DR dans les souches MTBC a quant à lui été généré par des délétions et des insertions d'*IS6110* au niveau de ces spacers après la spéciation des MTBC.

D'autres régions du génome des MTBC, regroupées en îlots génomiques auraient aussi été acquises par des transferts horizontaux. Ces îlots génomiques ont un rôle dans l'adaptation des bactéries à leur environnement et la pathogénicité des bactéries. Nos travaux ont montré que les délétions et insertions d'*IS6110* observées au niveau des spacers du locus DR sont aussi retrouvées sur d'autres régions acquises par transferts horizontaux dans le reste du génome. Ceci établit un lien entre le phénotype observé et la diversité des familles de souches. L'étude des îlots génomiques spécifiques des MTBC dans les différentes familles spoligotypes des souches cliniques montre par ailleurs que l'évolution des souches MTBC est associée à une augmentation du taux de polymorphisme observé au niveau de ces îlots génomiques.

Ainsi, cette étude semble apporter une nouvelle vision sur la dynamique du génome et son évolution dans les espèces MTBC. Comme les séquences CRISPR possèdent des caractéristiques des GEI et que les spacers ont aussi été acquis par des épisodes successives de transferts horizontaux, les délétions successives observées dans le locus DR semblent refléter la perte progressive de certains îlots génomiques dans l'ensemble du génome des MTBC. Par contre, l'étude de ce polymorphisme devrait être élargie aux GEI non-spécifiques des MTBC afin d'affiner la corrélation entre les différents épisodes de transferts horizontaux. Ce processus pourrait ainsi expliquer les relations existant entre, par exemple, les délétions génomiques observées par LSP (Hirsh et al. 2004, Tsolaki et



al. 2004 , Gagneux et al. 2006 ), les génotypes *IS6110* et le spoligotype des espèces MTBC (Fang et al. 1998). Certaines fonctions apportées par les GEI pourraient être moins indispensables pour certaines bactéries et sont soumises à une pression de sélection de l'hôte. Ceci impliquerait que l'acquisition des îlots génomiques s'est réalisée récemment car les processus de sélection et d'intégration de ces îlots dans le génome MTBC sont encore en cours. Par ailleurs étant donné que ces îlots génomiques ont des fonctions spécialisées dans l'adaptation des bactéries aux variations des conditions de l'environnement, la perte progressive de certains de ces îlots peut être directement liée aux phénotypes de ces bactéries.

Dans le monde, la prévalence des différentes familles de souches MTBC semble varier d'une zone géographique à une autre. Ces différentes familles de souches induisent des réponses immunitaires différentes chez l'hôte. Pour être plus efficaces, les stratégies de lutte contre la tuberculose devraient tenir compte de cette diversité génétique des souches MTBC. L'évaluation des futurs vaccins contre la tuberculose devrait être adaptée aux zones géographiques où les essais cliniques sont menées et tenir compte des familles de souches qui y sont les plus prévalentes.

Par ailleurs, étant donné le rôle des transferts horizontaux dans la résistance à certains antibiotiques, une étude centrée sur l'association entre le polymorphisme des îlots génomiques et la résistance aux antituberculeux pourrait être utile dans le développement ou l'amélioration des traitements antituberculeux.

Enfin, les traits fonctionnels des GEI qui semblent être conservés dans les différentes souches cliniques ne doivent pas être négligées étant donné que seules les bactéries pathogènes les ont conservés. Etudier leurs rôles dans la pathogénicité des bactéries MTBC pourrait emmener à la mise au point de nouvelles cibles thérapeutiques et au développement de nouveaux traitements contre la tuberculose.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abe, C., K. Hirano, M. Wada, Y. Kazumi, M. Takahashi, Y. Fukasawa, T. Yoshimura, C. Miyagi, and S. Goto. 1993.** Detection of Mycobacterium tuberculosis in clinical specimens by polymerase chain reaction and Gen-Probe Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test. *J Clin Microbiol* 31: 3270-4.
- Abebe, F., and G. Bjune. 2006.** The emergence of Beijing family genotypes of Mycobacterium tuberculosis and low-level protection by bacille Calmette-Guerin (BCG) vaccines: is there a link? *Clin Exp Immunol* 145: 389-97.
- Alix, E., S. Godreuil, and A. B. Blanc-Potard. 2006.** Identification of a Haarlem genotype-specific single nucleotide polymorphism in the *mgtC* virulence gene of Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Microbiol* 44: 2093-8.
- Alland, D., G. E. Kalkut, A. R. Moss, R. A. McAdam, J. A. Hahn, W. Bosworth, E. Drucker, and B. R. Bloom. 1994.** Transmission of tuberculosis in New York City. An analysis by DNA fingerprinting and conventional epidemiologic methods. *N Engl J Med* 330: 1710-6.
- Allix, C., P. Supply, and M. Fauville-Dufaux. 2004.** Utility of fast mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number tandem repeat genotyping in clinical mycobacteriological analysis. *Clin Infect Dis* 39: 783-9.
- Almeida, D., C. Rodrigues, T. F. Ashavaid, A. Lalvani, Z. F. Udhwadia, and A. Mehta. 2005.** High incidence of the Beijing genotype among multidrug-resistant isolates of Mycobacterium tuberculosis in a tertiary care center in Mumbai, India. *Clin Infect Dis* 40: 881-6.
- Andersen, P., T. M. Doherty, M. Pai, and K. Weldingh. 2007.** The prognosis of latent tuberculosis: can disease be predicted? *Trends Mol Med* 13: 175-82.
- Ansorge, W. J. 2009.** Next-generation DNA sequencing techniques. *N Biotechnol* 25: 195-203.
- Arber, W. 2003.** Elements for a theory of molecular evolution. *Gene* 317: 3-11.
- Arend, S. M., P. Andersen, K. E. van Meijgaarden, R. L. Skjot, Y. W. Subronto, J. T. van Dissel, and T. H. Ottenhoff. 2000.** Detection of active tuberculosis infection by T cell responses to early-secreted antigenic target 6-kDa protein and culture filtrate protein 10. *J Infect Dis* 181: 1850-4.
- Armstrong, J. A., and P. D. Hart. 1971.** Response of cultured macrophages to Mycobacterium tuberculosis, with observations on fusion of lysosomes with phagosomes. *J Exp Med* 134: 713-40.
- Arnold, C. 2007.** Molecular evolution of Mycobacterium tuberculosis. *Clin Microbiol Infect* 13: 120-8.
- Augustynowicz-Kopec, E., T. Jagielski, and Z. Zwolska. 2008.** Genetic diversity of isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates collected in Poland and assessed by spoligotyping. *J Clin Microbiol* 46: 4041-4.
- Auregan, G., D. Rakotondramarina, J. Razafinimanana, H. Ramarokoto, O. Ratsirahonana, and M. Ralamboson. 1995.** [The National Tuberculosis Control Program in Madagascar]. *Arch Inst Pasteur Madagascar* 62: 4-12.
- Axelrod, S., H. Oschkinat, J. Enders, B. Schlegel, V. Brinkmann, S. H. Kaufmann, A. Haas, and U. E. Schaible. 2008.** Delay of phagosome maturation by a mycobacterial lipid is reversed by nitric oxide. *Cell Microbiol* 10: 1530-45.
- Ayub, A., S. H. Yale, K. D. Reed, R. M. Nasser, and S. R. Gilbert. 2004.** Testing for latent tuberculosis. *Clin Med Res* 2: 191-4.
- Baghdadi, J. E., M. Orlova, A. Alter, B. Ranque, M. Chentoufi, F. Lazrak, M. I. Archane, J. L. Casanova, A. Benslimane, E. Schurr, and L. Abel. 2006.** An autosomal dominant major gene confers predisposition to pulmonary tuberculosis in adults. *J Exp Med* 203: 1679-84.

- Baker, L., T. Brown, M. C. Maiden, and F. Drobniewski. 2004.** Silent nucleotide polymorphisms and a phylogeny for *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerg Infect Dis* 10: 1568-77.
- Baldwin, S. L., C. D'Souza, A. D. Roberts, B. P. Kelly, A. A. Frank, M. A. Lui, J. B. Ulmer, K. Huygen, D. M. McMurray, and I. M. Orme. 1998.** Evaluation of new vaccines in the mouse and guinea pig model of tuberculosis. *Infect Immun* 66: 2951-9.
- Bannon, M. J. 1999.** BCG and tuberculosis. *Arch Dis Child* 80: 80-3.
- Barrangou, R., C. Fremaux, H. Deveau, M. Richards, P. Boyaval, S. Moineau, D. A. Romero, and P. Horvath. 2007.** CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315: 1709-12.
- Barreiro, L. B., O. Neyrolles, C. L. Babb, L. Tailleux, H. Quach, K. McElreavey, P. D. Helden, E. G. Hoal, B. Gicquel, and L. Quintana-Murci. 2006.** Promoter variation in the DC-SIGN-encoding gene CD209 is associated with tuberculosis. *PLoS Med* 3: e20.
- Becq, J., M. C. Gutierrez, V. Rosas-Magallanes, J. Rauzier, B. Gicquel, O. Neyrolles, and P. Deschavanne. 2007.** Contribution of horizontally acquired genomic islands to the evolution of the tubercle bacilli. *Mol Biol Evol* 24: 1861-71.
- Behr, M. A. 2002.** BCG--different strains, different vaccines? *Lancet Infect Dis* 2: 86-92.
- Behr, M. A., M. A. Wilson, W. P. Gill, H. Salamon, G. K. Schoolnik, S. Rane, and P. M. Small. 1999.** Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science* 284: 1520-3.
- Bellamy, R., C. Ruwende, T. Corrah, K. P. McAdam, H. C. Whittle, and A. V. Hill. 1998.** Variations in the NRAMP1 gene and susceptibility to tuberculosis in West Africans. *N Engl J Med* 338: 640-4.
- Bellamy, R., C. Ruwende, T. Corrah, K. P. McAdam, M. Thursz, H. C. Whittle, and A. V. Hill. 1999.** Tuberculosis and chronic hepatitis B virus infection in Africans and variation in the vitamin D receptor gene. *J Infect Dis* 179: 721-4.
- Ben-Ali, M., M. R. Barbouche, S. Bousnina, A. Chabbou, and K. Dellagi. 2004.** Toll-like receptor 2 Arg677Trp polymorphism is associated with susceptibility to tuberculosis in Tunisian patients. *Clin Diagn Lab Immunol* 11: 625-6.
- Berthet, F. X., P. B. Rasmussen, I. Rosenkrands, P. Andersen, and B. Gicquel. 1998.** A *Mycobacterium tuberculosis* operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10). *Microbiology* 144 ( Pt 11): 3195-203.
- Besra, G. S., T. Sievert, R. E. Lee, R. A. Slayden, P. J. Brennan, and K. Takayama. 1994.** Identification of the apparent carrier in mycolic acid synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 12735-9.
- Beveridge, N. E., H. A. Fletcher, J. Hughes, A. A. Pathan, T. J. Scriba, A. Minassian, C. R. Sander, K. T. Whelan, H. M. Dockrell, A. V. Hill, W. A. Hanekom, and H. McShane. 2008.** A comparison of IFN $\gamma$  detection methods used in tuberculosis vaccine trials. *Tuberculosis (Edinb)* 88: 631-40.
- Bhanu, N. V., D. van Soolingen, J. D. van Embden, L. Dar, R. M. Pandey, and P. Seth. 2002.** Predominance of a novel *Mycobacterium tuberculosis* genotype in the Delhi region of India. *Tuberculosis (Edinb)* 82: 105-12.
- Bibb, L. A., and G. F. Hatfull. 2002.** Integration and excision of the *Mycobacterium tuberculosis* prophage-like element,  $\phi$ Rv1. *Mol Microbiol* 45: 1515-26.
- Bibb, L. A., M. I. Hancox, and G. F. Hatfull. 2005.** Integration and excision by the large serine recombinase  $\phi$ Rv1 integrase. *Mol Microbiol* 55: 1896-910.
- Billeskov, R., M. V. Grandal, C. Poulsen, J. P. Christensen, N. Winther, C. Vingsbo-Lundberg, T. T. Hoang, B. van Deurs, Y. H. Song, C. Aagaard, P. Andersen, and J. Dietrich. 2010.** Difference in TB10.4 T-cell epitope recognition following immunization with recombinant TB10.4, BCG or infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Immunol* 40: 1342-54.
- Bishai, W. R., A. M. Dannenberg, Jr., N. Parrish, R. Ruiz, P. Chen, B. C. Zook, W. Johnson, J. W. Boles, and M. L. Pitt. 1999.** Virulence of *Mycobacterium*

- tuberculosis CDC1551 and H37Rv in rabbits evaluated by Lurie's pulmonary tubercle count method. *Infect Immun* 67: 4931-4.
- Black, G. F., R. E. Weir, S. Floyd, L. Bliss, D. K. Warndorff, A. C. Crampin, B. Ngwira, L. Sichali, B. Nazareth, J. M. Blackwell, K. Branson, S. D. Chaguluka, L. Donovan, E. Jarman, E. King, P. E. Fine, and H. M. Dockrell. 2002.** BCG-induced increase in interferon-gamma response to mycobacterial antigens and efficacy of BCG vaccination in Malawi and the UK: two randomised controlled studies. *Lancet* 359: 1393-401.
- Black, G. F., R. E. Weir, S. D. Chaguluka, D. Warndorff, A. C. Crampin, L. Mwaungulu, L. Sichali, S. Floyd, L. Bliss, E. Jarman, L. Donovan, P. Andersen, W. Britton, G. Hewinson, K. Huygen, J. Paulsen, M. Singh, R. Prestidge, P. E. Fine, and H. M. Dockrell. 2003.** Gamma interferon responses induced by a panel of recombinant and purified mycobacterial antigens in healthy, non-mycobacterium bovis BCG-vaccinated Malawian young adults. *Clin Diagn Lab Immunol* 10: 602-11.
- Blanc-Potard, A. B., and B. Lafay. 2003.** MgtC as a horizontally-acquired virulence factor of intracellular bacterial pathogens: evidence from molecular phylogeny and comparative genomics. *J Mol Evol* 57: 479-86.
- Bonecini-Almeida, M. G., S. Chitale, I. Boutsikakis, J. Geng, H. Doo, S. He, and J. L. Ho. 1998.** Induction of in vitro human macrophage anti-Mycobacterium tuberculosis activity: requirement for IFN-gamma and primed lymphocytes. *J Immunol* 160: 4490-9.
- Boom, W. H., D. H. Canaday, S. A. Fulton, A. J. Gehring, R. E. Rojas, and M. Torres. 2003.** Human immunity to M. tuberculosis: T cell subsets and antigen processing. *Tuberculosis (Edinb)* 83: 98-106.
- Bothamley, G. H., J. S. Beck, G. M. Schreuder, J. D'Amato, R. R. de Vries, T. Kardjito, and J. Ivanyi. 1989.** Association of tuberculosis and M. tuberculosis-specific antibody levels with HLA. *J Infect Dis* 159: 549-55.
- Brennan, M. J., and G. Delogu. 2002.** The PE multigene family: a 'molecular mantra' for mycobacteria. *Trends Microbiol* 10: 246-9.
- Brightbill, H. D., D. H. Libraty, S. R. Krutzik, R. B. Yang, J. T. Belisle, J. R. Bleharski, M. Maitland, M. V. Norgard, S. E. Plevy, S. T. Smale, P. J. Brennan, B. R. Bloom, P. J. Godowski, and R. L. Modlin. 1999.** Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* 285: 732-6.
- Britten, R. J., and D. E. Kohne. 1968.** Repeated sequences in DNA. Hundreds of thousands of copies of DNA sequences have been incorporated into the genomes of higher organisms. *Science* 161: 529-40.
- Brodin, P., K. Eiglmeier, M. Marmiesse, A. Billault, T. Garnier, S. Niemann, S. T. Cole, and R. Brosch. 2002.** Bacterial artificial chromosome-based comparative genomic analysis identifies Mycobacterium microti as a natural ESAT-6 deletion mutant. *Infect Immun* 70: 5568-78.
- Brookes, R. H., P. C. Hill, P. K. Owiafe, H. B. Ibanga, D. J. Jeffries, S. A. Donkor, H. A. Fletcher, A. S. Hammond, C. Lienhardt, R. A. Adegbola, H. McShane, and A. V. Hill. 2008.** Safety and immunogenicity of the candidate tuberculosis vaccine MVA85A in West Africa. *PLoS One* 3: e2921.
- Brosch, R., W. J. Philipp, E. Stavropoulos, M. J. Colston, S. T. Cole, and S. V. Gordon. 1999.** Genomic analysis reveals variation between Mycobacterium tuberculosis H37Rv and the attenuated M. tuberculosis H37Ra strain. *Infect Immun* 67: 5768-74.
- Brosch, R., S. V. Gordon, M. Marmiesse, P. Brodin, C. Buchrieser, K. Eiglmeier, T. Garnier, C. Gutierrez, G. Hewinson, K. Kremer, L. M. Parsons, A. S. Pym, S. Samper, D. van Soolingen, and S. T. Cole. 2002.** A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 3684-9.
- Brosch, R., S. V. Gordon, T. Garnier, K. Eiglmeier, W. Frigui, P. Valenti, S. Dos Santos, S. Duthoy, C. Lacroix, C. Garcia-Pelayo, J. K. Inwald, P. Golby, J. N. Garcia, R. G. Hewinson, M. A. Behr, M. A. Quail, C. Churcher, B. G.**

- Barrell, J. Parkhill, and S. T. Cole. 2007.** Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 5596-601.
- Brouns, S. J., M. M. Jore, M. Lundgren, E. R. Westra, R. J. Slijkhuis, A. P. Snijders, M. J. Dickman, K. S. Makarova, E. V. Koonin, and J. van der Oost. 2008.** Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science* 321: 960-4.
- Brudey, K., M. Gordon, P. Mostrom, L. Svensson, B. Jonsson, C. Sola, M. Ridell, and N. Rastogi. 2004.** Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in western Sweden. *J Clin Microbiol* 42: 3046-51.
- Brudey, K., J. R. Driscoll, L. Rigouts, W. M. Proding, A. Gori, S. A. Al-Hajj, C. Allix, L. Aristimuno, J. Arora, V. Baumanis, L. Binder, P. Cafrune, A. Cataldi, S. Cheong, R. Diel, C. Ellermeier, J. T. Evans, M. Fauville-Dufaux, S. Ferdinand, D. Garcia de Viedma, C. Garzelli, L. Gazzola, H. M. Gomes, M. C. Gutierrez, P. M. Hawkey, P. D. van Helden, G. V. Kadival, B. N. Kreiswirth, K. Kremer, M. Kubin, S. P. Kulkarni, B. Liens, T. Lillebaek, M. L. Ho, C. Martin, C. Martin, I. Mokrousov, O. Narvskaja, Y. F. Ngeow, L. Naumann, S. Niemann, I. Parwati, Z. Rahim, V. Rasolofo-Razanamparany, T. Rasolonavalona, M. L. Rossetti, S. Rusch-Gerdes, A. Sajduda, S. Samper, I. G. Shemyakin, U. B. Singh, A. Somoskovi, R. A. Skuce, D. van Soolingen, E. M. Streicher, P. N. Suffys, E. Tortoli, T. Tracevska, V. Vincent, T. C. Victor, R. M. Warren, S. F. Yap, K. Zaman, F. Portaels, N. Rastogi, and C. Sola. 2006.** *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol* 6: 23.
- Brussow, H., C. Canchaya, and W. D. Hardt. 2004.** Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiol Mol Biol Rev* 68: 560-602.
- Buchrieser, C., R. Brosch, S. Bach, A. Guisou, and E. Carniel. 1998.** The high-pathogenicity island of *Yersinia pseudotuberculosis* can be inserted into any of the three chromosomal *asn* tRNA genes. *Mol Microbiol* 30: 965-78.
- Camacho, L. R., D. Ensergueix, E. Perez, B. Gicquel, and C. Guilhot. 1999.** Identification of a virulence gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* by signature-tagged transposon mutagenesis. *Mol Microbiol* 34: 257-67.
- Camus, J. C., M. J. Pryor, C. Medigue, and S. T. Cole. 2002.** Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology* 148: 2967-73.
- Canaday, D. H., R. J. Wilkinson, Q. Li, C. V. Harding, R. F. Silver, and W. H. Boom. 2001.** CD4(+) and CD8(+) T cells kill intracellular *Mycobacterium tuberculosis* by a perforin and Fas/Fas ligand-independent mechanism. *J Immunol* 167: 2734-42.
- Casanova, J. L., and L. Abel. 2007.** Human genetics of infectious diseases: a unified theory. *Embo J* 26: 915-22.
- Cavalli-Sforza, L. L., and M. W. Feldman. 2003.** The application of molecular genetic approaches to the study of human evolution. *Nat Genet* 33 Suppl: 266-75.
- Caws, M., G. Thwaites, S. Dunstan, T. R. Hawn, N. T. Lan, N. T. Thuong, K. Stepniewska, M. N. Huyen, N. D. Bang, T. H. Loc, S. Gagneux, D. van Soolingen, K. Kremer, M. van der Sande, P. Small, P. T. Anh, N. T. Chinh, H. T. Quy, N. T. Duyen, D. Q. Tho, N. T. Hieu, E. Torok, T. T. Hien, N. H. Dung, N. T. Nhu, P. M. Duy, N. van Vinh Chau, and J. Farrar. 2008.** The influence of host and bacterial genotype on the development of disseminated disease with *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* 4: e1000034.
- Cegielski, J. P., and D. N. McMurray. 2004.** The relationship between malnutrition and tuberculosis: evidence from studies in humans and experimental animals. *Int J Tuberc Lung Dis* 8: 286-98.
- Chacon-Salinas, R., J. Serafin-Lopez, R. Ramos-Payan, P. Mendez-Aragon, R. Hernandez-Pando, D. Van Soolingen, L. Flores-Romo, S. Estrada-Parra, and I. Estrada-Garcia. 2005.** Differential pattern of cytokine expression by

- macrophages infected in vitro with different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clin Exp Immunol* 140: 443-9.
- Champetier de Ribes, G., G. Ranaivosoa, E. Rakotoherisoa, B. Andriamahefazafy, and S. Blanchy. 1997.** [Annual risk of tuberculosis infection in Madagascar: study from 1991 to 1994]. *Bull Soc Pathol Exot* 90: 349-52.
- Chan, J., Y. Xing, R. S. Magliozzo, and B. R. Bloom. 1992.** Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J Exp Med* 175: 1111-22.
- Chaves, F., Z. Yang, H. el Hajj, M. Alonso, W. J. Burman, K. D. Eisenach, F. Dronda, J. H. Bates, and M. D. Cave. 1996.** Usefulness of the secondary probe pTBN12 in DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 34: 1118-23.
- Chee, C. B., T. M. Barkham, K. W. Khinmar, S. H. Gan, and Y. T. Wang. 2009.** Quantitative T-cell interferon-gamma responses to *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigens in active and latent tuberculosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 28: 667-70.
- Clay, H., H. E. Volkman, and L. Ramakrishnan. 2008.** Tumor necrosis factor signaling mediates resistance to mycobacteria by inhibiting bacterial growth and macrophage death. *Immunity* 29: 283-94.
- Clemens, D. L., and M. A. Horwitz. 1995.** Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. *J Exp Med* 181: 257-70.
- Clemens, D. L., B. Y. Lee, and M. A. Horwitz. 1995.** Purification, characterization, and genetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* urease, a potentially critical determinant of host-pathogen interaction. *J Bacteriol* 177: 5644-52.
- Colditz, G. A., C. S. Berkey, F. Mosteller, T. F. Brewer, M. E. Wilson, E. Burdick, and H. V. Fineberg. 1995.** The efficacy of bacillus Calmette-Guerin vaccination of newborns and infants in the prevention of tuberculosis: meta-analyses of the published literature. *Pediatrics* 96: 29-35.
- Cole, S. T. 1999.** Learning from the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *FEBS Lett* 452: 7-10.
- Cole, S. T., R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S. V. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, C. E. Barry, 3rd, F. Tekaia, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, S. Gentles, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, A. Krogh, J. McLean, S. Moule, L. Murphy, K. Oliver, J. Osborne, M. A. Quail, M. A. Rajandream, J. Rogers, S. Rutter, K. Seeger, J. Skelton, R. Squares, S. Squares, J. E. Sulston, K. Taylor, S. Whitehead, and B. G. Barrell. 1998.** Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393: 537-44.
- Cole, S. T., K. Eiglmeier, J. Parkhill, K. D. James, N. R. Thomson, P. R. Wheeler, N. Honore, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, K. Mungall, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. M. Davies, K. Devlin, S. Duthoy, T. Feltwell, A. Fraser, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, C. Lacroix, J. Maclean, S. Moule, L. Murphy, K. Oliver, M. A. Quail, M. A. Rajandream, K. M. Rutherford, S. Rutter, K. Seeger, S. Simon, M. Simmonds, J. Skelton, R. Squares, S. Squares, K. Stevens, K. Taylor, S. Whitehead, J. R. Woodward, and B. G. Barrell. 2001.** Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature* 409: 1007-11.
- Collins, F. M., and M. M. Smith. 1969.** A comparative study of the virulence of mycobacterium tuberculosis measured in mice and guinea pigs. *Am Rev Respir Dis* 100: 631-9.
- Comas, I., S. Homolka, S. Niemann, and S. Gagneux. 2009.** Genotyping of genetically monomorphic bacteria: DNA sequencing in mycobacterium tuberculosis highlights the limitations of current methodologies. *PLoS One* 4: e7815.

- Comas, I., J. Chakravartti, P. M. Small, J. Galagan, S. Niemann, K. Kremer, J. D. Ernst, and S. Gagneux. 2010.** Human T cell epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* are evolutionarily hyperconserved. *Nat Genet* 42: 498-503.
- Constant, P., E. Perez, W. Malaga, M. A. Laneelle, O. Saurel, M. Daffe, and C. Guilhot. 2002.** Role of the *pkc15/1* gene in the biosynthesis of phenolglycolipids in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Evidence that all strains synthesize glycosylated *p*-hydroxybenzoic methyl esters and that strains devoid of phenolglycolipids harbor a frameshift mutation in the *pkc15/1* gene. *J Biol Chem* 277: 38148-58.
- Cooper, A. M., and S. A. Khader. 2008.** The role of cytokines in the initiation, expansion, and control of cellular immunity to tuberculosis. *Immunol Rev* 226: 191-204.
- Cooper, M. A., T. A. Fehniger, A. Fuchs, M. Colonna, and M. A. Caligiuri. 2004.** NK cell and DC interactions. *Trends Immunol* 25: 47-52.
- Coros, A., E. DeConno, and K. M. Derbyshire. 2008.** *IS6110*, a *Mycobacterium tuberculosis* complex-specific insertion sequence, is also present in the genome of *Mycobacterium smegmatis*, suggestive of lateral gene transfer among mycobacterial species. *J Bacteriol* 190: 3408-10.
- Cowan, L. S., L. Diem, T. Monson, P. Wand, D. Temporado, T. V. Oemig, and J. T. Crawford. 2005.** Evaluation of a two-step approach for large-scale, prospective genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the United States. *J Clin Microbiol* 43: 688-95.
- Crubezy, E., B. Ludes, J. D. Poveda, J. Clayton, B. Crouau-Roy, and D. Montagnon. 1998.** Identification of *Mycobacterium* DNA in an Egyptian Pott's disease of 5,400 years old. *C R Acad Sci III* 321: 941-51.
- Cruz, A., S. A. Khader, E. Torrado, A. Fraga, J. E. Pearl, J. Pedrosa, A. M. Cooper, and A. G. Castro. 2006.** Cutting edge: IFN- $\gamma$  regulates the induction and expansion of IL-17-producing CD4 T cells during mycobacterial infection. *J Immunol* 177: 1416-20.
- Cruz, A., A. G. Fraga, J. J. Fountain, J. Rangel-Moreno, E. Torrado, M. Saraiva, D. R. Pereira, T. D. Randall, J. Pedrosa, A. M. Cooper, and A. G. Castro. 2010.** Pathological role of interleukin 17 in mice subjected to repeated BCG vaccination after infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med* 207: 1609-16.
- Curry, F. J., J. M. Schless, P. B. Storey, and J. A. Wier. 1956.** Ototoxicity from intermittent streptomycin therapy of pulmonary tuberculosis; a study of one hundred five patients treated eight to ten months. *Dis Chest* 30: 628-32.
- Curtis, M. M., and S. S. Way. 2009.** Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. *Immunology* 126: 177-85.
- D'Amato, R. F., A. A. Wallman, L. H. Hochstein, P. M. Colaninno, M. Scardamaglia, E. Ardila, M. Ghouri, K. Kim, R. C. Patel, and A. Miller. 1995.** Rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis by using Roche AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* PCR test. *J Clin Microbiol* 33: 1832-4.
- Dagan, T., R. Blekhan, and D. Graur. 2006.** The "domino theory" of gene death: gradual and mass gene extinction events in three lineages of obligate symbiotic bacterial pathogens. *Mol Biol Evol* 23: 310-6.
- Dale, J. W., D. Brittain, A. A. Cataldi, D. Cousins, J. T. Crawford, J. Driscoll, H. Heersma, T. Lillebaek, T. Quitugua, N. Rastogi, R. A. Skuce, C. Sola, D. Van Soolingen, and V. Vincent. 2001.** Spacer oligonucleotide typing of bacteria of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: recommendations for standardised nomenclature. *Int J Tuberc Lung Dis* 5: 216-9.
- Dale, J. W., H. Al-Ghusein, S. Al-Hashmi, P. Butcher, A. L. Dickens, F. Drobniowski, K. J. Forbes, S. H. Gillespie, D. Lamprecht, T. D. McHugh, R. Pitman, N. Rastogi, A. T. Smith, C. Sola, and H. Yesilkaya. 2003.** Evolutionary relationships among strains of *Mycobacterium tuberculosis* with few copies of *IS6110*. *J Bacteriol* 185: 2555-62.

- Dannenbergh, A. M., Jr. 1994.** Roles of cytotoxic delayed-type hypersensitivity and macrophage-activating cell-mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunobiology* 191: 461-73.
- David, H. L. 1970.** Probability distribution of drug-resistant mutants in unselected populations of *Mycobacterium tuberculosis*. *Appl Microbiol* 20: 810-4.
- de Boer, A. S., K. Kremer, M. W. Borgdorff, P. E. de Haas, H. F. Heersma, and D. van Soolingen. 2000.** Genetic heterogeneity in *Mycobacterium tuberculosis* isolates reflected in IS6110 restriction fragment length polymorphism patterns as low-intensity bands. *J Clin Microbiol* 38: 4478-84.
- de Jong, R., F. Altare, I. A. Haagen, D. G. Elferink, T. Boer, P. J. van Breda Vriesman, P. J. Kabel, J. M. Draaisma, J. T. van Dissel, F. P. Kroon, J. L. Casanova, and T. H. Ottenhoff. 1998.** Severe mycobacterial and *Salmonella* infections in interleukin-12 receptor-deficient patients. *Science* 280: 1435-8.
- del Corral, H., S. C. Paris, N. D. Marin, D. M. Marin, L. Lopez, H. M. Henao, T. Martinez, L. Villa, L. F. Barrera, B. L. Ortiz, M. E. Ramirez, C. J. Montes, M. C. Oquendo, L. M. Arango, F. Riano, C. Aguirre, A. Bustamante, J. T. Belisle, K. Dobos, G. I. Mejia, M. R. Giraldo, P. J. Brennan, J. Robledo, M. P. Arbelaez, C. A. Rojas, and L. F. Garcia. 2009.** IFN $\gamma$  response to *Mycobacterium tuberculosis*, risk of infection and disease in household contacts of tuberculosis patients in Colombia. *PLoS One* 4: e8257.
- Demissie, A., L. Wassie, M. Abebe, A. Aseffa, G. Rook, A. Zumla, P. Andersen, and T. M. Doherty. 2006.** The 6-kilodalton early secreted antigenic target-responsive, asymptomatic contacts of tuberculosis patients express elevated levels of interleukin-4 and reduced levels of gamma interferon. *Infect Immun* 74: 2817-22.
- Demissie, A., M. Abebe, A. Aseffa, G. Rook, H. Fletcher, A. Zumla, K. Weldingh, I. Brock, P. Andersen, and T. M. Doherty. 2004.** Healthy individuals that control a latent infection with *Mycobacterium tuberculosis* express high levels of Th1 cytokines and the IL-4 antagonist IL-4 $\Delta$ 2. *J Immunol* 172: 6938-43.
- Devulder, G., M. Perouse de Montclos, and J. P. Flandrois. 2005.** A multigene approach to phylogenetic analysis using the genus *Mycobacterium* as a model. *Int J Syst Evol Microbiol* 55: 293-302.
- Dietrich, J., C. Andersen, R. Rappuoli, T. M. Doherty, C. G. Jensen, and P. Andersen. 2006.** Mucosal administration of Ag85B-ESAT-6 protects against infection with *Mycobacterium tuberculosis* and boosts prior bacillus Calmette-Guerin immunity. *J Immunol* 177: 6353-60.
- Dietrich, J., C. Aagaard, R. Leah, A. W. Olsen, A. Stryhn, T. M. Doherty, and P. Andersen. 2005.** Exchanging ESAT6 with TB10.4 in an Ag85B fusion molecule-based tuberculosis subunit vaccine: efficient protection and ESAT6-based sensitive monitoring of vaccine efficacy. *J Immunol* 174: 6332-9.
- Dobrindt, U., B. Hochhut, U. Hentschel, and J. Hacker. 2004.** Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat Rev Microbiol* 2: 414-24.
- Dobrindt, U., F. Agerer, K. Michaelis, A. Janka, C. Buchrieser, M. Samuelson, C. Svanborg, G. Gottschalk, H. Karch, and J. Hacker. 2003.** Analysis of genome plasticity in pathogenic and commensal *Escherichia coli* isolates by use of DNA arrays. *J Bacteriol* 185: 1831-40.
- Doherty, T. M., A. Demissie, D. Menzies, P. Andersen, G. Rook, and A. Zumla. 2005.** Effect of sample handling on analysis of cytokine responses to *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples using ELISA, ELISPOT and quantitative PCR. *J Immunol Methods* 298: 129-41.
- Doherty, T. M., A. Demissie, J. Olobo, D. Wolday, S. Britton, T. Eguale, P. Ravn, and P. Andersen. 2002.** Immune responses to the *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigen ESAT-6 signal subclinical infection among contacts of tuberculosis patients. *J Clin Microbiol* 40: 704-6.
- Dolin, P. J., M. C. Ravigliione, and A. Kochi. 1994.** Global tuberculosis incidence and mortality during 1990-2000. *Bull World Health Organ* 72: 213-20.



- Dorman, S. E., and S. M. Holland. 2000.** Interferon-gamma and interleukin-12 pathway defects and human disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 11: 321-33.
- Dos Vultos, T., O. Mestre, J. Rauzier, M. Golec, N. Rastogi, V. Rasolofo, T. Tonjum, C. Sola, I. Matic, and B. Gicquel. 2008.** Evolution and diversity of clonal bacteria: the paradigm of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One* 3: e1538.
- Douglas, J. T., L. Qian, J. C. Montoya, J. M. Musser, J. D. Van Embden, D. Van Soolingen, and K. Kremer. 2003.** Characterization of the Manila family of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 41: 2723-6.
- Drobniewski, F., Y. Balabanova, V. Nikolayevsky, M. Ruddy, S. Kuznetsov, S. Zakharova, A. Melentyev, and I. Fedorin. 2005.** Drug-resistant tuberculosis, clinical virulence, and the dominance of the Beijing strain family in Russia. *Jama* 293: 2726-31.
- Dubiley, S., E. Kirillov, A. Ignatova, V. Stepanshina, and I. Shemyakin. 2007.** Molecular characteristics of the *Mycobacterium tuberculosis* LAM-RUS family prevalent in Central Russia. *J Clin Microbiol* 45: 4036-8.
- Dubnau, E., J. Chan, V. P. Mohan, and I. Smith. 2005.** responses of mycobacterium tuberculosis to growth in the mouse lung. *Infect Immun* 73: 3754-7.
- Dufraigne, C., B. Fertil, S. Lespinats, A. Giron, and P. Deschavanne. 2005.** Detection and characterization of horizontal transfers in prokaryotes using genomic signature. *Nucleic Acids Res* 33: e6.
- Dye, C. 2006.** Global epidemiology of tuberculosis. *Lancet* 367: 938-40.
- Dye, C., and M. Raviglione. 2005.** Monitoring global health: WHO has mandate and expertise. *Bmj* 330: 195.
- Ebrahimi-Rad, M., P. Bifani, C. Martin, K. Kremer, S. Samper, J. Rauzier, B. Kreiswirth, J. Blazquez, M. Jouan, D. van Soolingen, and B. Gicquel. 2003.** Mutations in putative mutator genes of *Mycobacterium tuberculosis* strains of the W-Beijing family. *Emerg Infect Dis* 9: 838-45.
- Ehrt, S., and D. Schnappinger. 2009.** Mycobacterial survival strategies in the phagosome: defence against host stresses. *Cell Microbiol* 11: 1170-8.
- Eisenach, K. D., J. T. Crawford, and J. H. Bates. 1988.** Repetitive DNA sequences as probes for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 26: 2240-5.
- Eldholm, V., M. Matee, S. G. Mfinanga, M. Heun, and U. R. Dahle. 2006.** A first insight into the genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Dar es Salaam, Tanzania, assessed by spoligotyping. *BMC Microbiol* 6: 76.
- Ellner, J. J., C. S. Hirsch, and C. C. Whalen. 2000.** Correlates of protective immunity to *Mycobacterium tuberculosis* in humans. *Clin Infect Dis* 30 Suppl 3: S279-82.
- Elzinga, G., M. C. Raviglione, and D. Maher. 2004.** Scale up: meeting targets in global tuberculosis control. *Lancet* 363: 814-9.
- Ermolaeva, M. D. 2001.** Synonymous codon usage in bacteria. *Curr Issues Mol Biol* 3: 91-7.
- Eum, S. Y., J. H. Kong, M. S. Hong, Y. J. Lee, J. H. Kim, S. H. Hwang, S. N. Cho, L. E. Via, and C. E. Barry, 3rd. 2010.** Neutrophils are the predominant infected phagocytic cells in the airways of patients with active pulmonary TB. *Chest* 137: 122-8.
- Evans, J. T., P. M. Hawkey, E. G. Smith, K. A. Boese, R. E. Warren, and G. Hong. 2004.** Automated high-throughput mycobacterial interspersed repetitive unit typing of *Mycobacterium tuberculosis* strains by a combination of PCR and nondenaturing high-performance liquid chromatography. *J Clin Microbiol* 42: 4175-80.
- Fang, Z., N. Morrison, B. Watt, C. Doig, and K. J. Forbes. 1998.** IS6110 transposition and evolutionary scenario of the direct repeat locus in a group of closely related *Mycobacterium tuberculosis* strains. *J Bacteriol* 180: 2102-9.
- Ferdinand, S., C. Sola, S. Chanteau, H. Ramarokoto, T. Rasolonalana, V. Rasolofo-Razanamparany, and N. Rastogi. 2005.** A study of spoligotyping-defined *Mycobacterium tuberculosis* clades in relation to the origin of peopling and the demographic history in Madagascar. *Infect Genet Evol* 5: 340-8.

- Ferrara, G., M. Losi, L. M. Fabbri, G. B. Migliori, L. Richeldi, and L. Casali. 2009.** Exploring the immune response against *Mycobacterium tuberculosis* for a better diagnosis of the infection. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 57: 425-33.
- Filipe-Santos, O., J. Bustamante, A. Chaggier, G. Vogt, L. de Beauclourey, J. Feinberg, E. Jouanguy, S. Boisson-Dupuis, C. Fieschi, C. Picard, and J. L. Casanova. 2006.** Inborn errors of IL-12/23- and IFN-gamma-mediated immunity: molecular, cellular, and clinical features. *Semin Immunol* 18: 347-61.
- Filliol, I., A. S. Motiwala, M. Cavatore, W. Qi, M. H. Hazbon, M. Bobadilla del Valle, J. Fyfe, L. Garcia-Garcia, N. Rastogi, C. Sola, T. Zozio, M. I. Guerrero, C. I. Leon, J. Crabtree, S. Angiuoli, K. D. Eisenach, R. Durmaz, M. L. Joloba, A. Rendon, J. Sifuentes-Osornio, A. Ponce de Leon, M. D. Cave, R. Fleischmann, T. S. Whittam, and D. Alland. 2006.** Global phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* based on single nucleotide polymorphism (SNP) analysis: insights into tuberculosis evolution, phylogenetic accuracy of other DNA fingerprinting systems, and recommendations for a minimal standard SNP set. *J Bacteriol* 188: 759-72.
- Filliol, I., J. R. Driscoll, D. van Soolingen, B. N. Kreiswirth, K. Kremer, G. Valetudie, D. A. Dang, R. Barlow, D. Banerjee, P. J. Bifani, K. Brudey, A. Cataldi, R. C. Cooksey, D. V. Cousins, J. W. Dale, O. A. Dellagostin, F. Drobniewski, G. Engelmann, S. Ferdinand, D. Gascoyne-Binzi, M. Gordon, M. C. Gutierrez, W. H. Haas, H. Heersma, E. Kassa-Kelembho, M. L. Ho, A. Makristathis, C. Mammina, G. Martin, P. Mostrom, I. Mokrousov, V. Narbonne, O. Narvskaya, A. Nastasi, S. N. Niobe-Eyangoh, J. W. Pape, V. Rasolofo-Razanamparany, M. Ridell, M. L. Rossetti, F. Stauffer, P. N. Suffys, H. Takiff, J. Texier-Maugein, V. Vincent, J. H. de Waard, C. Sola, and N. Rastogi. 2003.** Snapshot of moving and expanding clones of *Mycobacterium tuberculosis* and their global distribution assessed by spoligotyping in an international study. *J Clin Microbiol* 41: 1963-70.
- Filliol, I., J. R. Driscoll, D. Van Soolingen, B. N. Kreiswirth, K. Kremer, G. Valetudie, D. D. Anh, R. Barlow, D. Banerjee, P. J. Bifani, K. Brudey, A. Cataldi, R. C. Cooksey, D. V. Cousins, J. W. Dale, O. A. Dellagostin, F. Drobniewski, G. Engelmann, S. Ferdinand, D. Gascoyne-Binzi, M. Gordon, M. C. Gutierrez, W. H. Haas, H. Heersma, G. Kallenius, E. Kassa-Kelembho, T. Koivula, H. M. Ly, A. Makristathis, C. Mammina, G. Martin, P. Mostrom, I. Mokrousov, V. Narbonne, O. Narvskaya, A. Nastasi, S. N. Niobe-Eyangoh, J. W. Pape, V. Rasolofo-Razanamparany, M. Ridell, M. L. Rossetti, F. Stauffer, P. N. Suffys, H. Takiff, J. Texier-Maugein, V. Vincent, J. H. De Waard, C. Sola, and N. Rastogi. 2002.** Global distribution of *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes. *Emerg Infect Dis* 8: 1347-9.
- Fleischmann, R. D., D. Alland, J. A. Eisen, L. Carpenter, O. White, J. Peterson, R. DeBoy, R. Dodson, M. Gwinn, D. Haft, E. Hickey, J. F. Kolonay, W. C. Nelson, L. A. Umayam, M. Ermolaeva, S. L. Salzberg, A. Delcher, T. Utterback, J. Weidman, H. Khouri, J. Gill, A. Mikula, W. Bishai, W. R. Jacobs Jr, Jr., J. C. Venter, and C. M. Fraser. 2002.** Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. *J Bacteriol* 184: 5479-90.
- Fletcher, H. A., P. Owiafe, D. Jeffries, P. Hill, G. A. Rook, A. Zumla, T. M. Doherty, and R. H. Brookes. 2004.** Increased expression of mRNA encoding interleukin (IL)-4 and its splice variant IL-4delta2 in cells from contacts of *Mycobacterium tuberculosis*, in the absence of in vitro stimulation. *Immunology* 112: 669-73.
- Flynn, J. L., and J. Chan. 2003.** Immune evasion by *Mycobacterium tuberculosis*: living with the enemy. *Curr Opin Immunol* 15: 450-5.
- Flynn, J. L., J. Chan, K. J. Triebold, D. K. Dalton, T. A. Stewart, and B. R. Bloom. 1993.** An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Med* 178: 2249-54.
- Flynn, J. L., M. M. Goldstein, J. Chan, K. J. Triebold, K. Pfeffer, C. J. Lowenstein, R. Schreiber, T. W. Mak, and B. R. Bloom. 1995.** Tumor necrosis factor-alpha

is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity* 2: 561-72.

- Frost, L. S., R. Leplae, A. O. Summers, and A. Toussaint. 2005.** Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol* 3: 722-32.
- Frothingham, R., and W. A. Meeker-O'Connell. 1998.** Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology* 144 ( Pt 5): 1189-96.
- Gagneux, S., and P. M. Small. 2007.** Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development. *Lancet Infect Dis* 7: 328-37.
- Gagneux, S., K. DeRiemer, T. Van, M. Kato-Maeda, B. C. de Jong, S. Narayanan, M. Nicol, S. Niemann, K. Kremer, M. C. Gutierrez, M. Hilty, P. C. Hopewell, and P. M. Small. 2006.** Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 2869-73.
- Gaillard, M., T. Vallaes, F. J. Vorholter, M. Minoia, C. Werlen, V. Sentchilo, A. Puhler, and J. R. van der Meer. 2006.** The *clc* element of *Pseudomonas* sp. strain B13, a genomic island with various catabolic properties. *J Bacteriol* 188: 1999-2013.
- Gal-Mor, O., and B. B. Finlay. 2006.** Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence. *Cell Microbiol* 8: 1707-19.
- Gao, Q., K. E. Kripke, A. J. Saldanha, W. Yan, S. Holmes, and P. M. Small. 2005.** Gene expression diversity among *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Microbiology* 151: 5-14.
- Garcia de Viedma, D., G. Lorenzo, P. J. Cardona, N. A. Rodriguez, S. Gordillo, M. J. Serrano, and E. Bouza. 2005.** Association between the infectivity of *Mycobacterium tuberculosis* strains and their efficiency for extrapulmonary infection. *J Infect Dis* 192: 2059-65.
- Garnier, T., K. Eiglmeier, J. C. Camus, N. Medina, H. Mansoor, M. Pryor, S. Duthoy, S. Grondin, C. Lacroix, C. Monsempe, S. Simon, B. Harris, R. Atkin, J. Doggett, R. Mayes, L. Keating, P. R. Wheeler, J. Parkhill, B. G. Barrell, S. T. Cole, S. V. Gordon, and R. G. Hewinson. 2003.** The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 7877-82.
- Gey Van Pittius, N. C., J. Gamielien, W. Hide, G. D. Brown, R. J. Siezen, and A. D. Beyers. 2001.** The ESAT-6 gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* and other high G+C Gram-positive bacteria. *Genome Biol* 2: RESEARCH0044.
- Ghanekar, K., A. McBride, O. Dellagostin, S. Thorne, R. Mooney, and J. McFadden. 1999.** Stimulation of transposition of the *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence IS6110 by exposure to a microaerobic environment. *Mol Microbiol* 33: 982-93.
- Ghosh, J., P. Larsson, B. Singh, B. M. Pettersson, N. M. Islam, S. N. Sarkar, S. Dasgupta, and L. A. Kirsebom. 2009.** Sporulation in mycobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 10781-6.
- Gibson, A. L., R. C. Huard, N. C. Gey van Pittius, L. C. Lazzarini, J. Driscoll, N. Kurepina, T. Zozio, C. Sola, S. M. Spindola, A. L. Kritski, D. Fitzgerald, K. Kremer, H. Mardassi, P. Chitale, J. Brinkworth, D. Garcia de Viedma, B. Gicquel, J. W. Pape, D. van Soolingen, B. N. Kreiswirth, R. M. Warren, P. D. van Helden, N. Rastogi, P. N. Suffys, J. Lapa e Silva, and J. L. Ho. 2008.** Application of sensitive and specific molecular methods to uncover global dissemination of the major RDRio Sublineage of the Latin American-Mediterranean *Mycobacterium tuberculosis* spoligotype family. *J Clin Microbiol* 46: 1259-67.
- Gilad, Y., J. K. Pritchard, and K. Thornton. 2009.** Characterizing natural variation using next-generation sequencing technologies. *Trends Genet* 25: 463-71.
- Gingeras, T. R., G. Ghandour, E. Wang, A. Berno, P. M. Small, F. Drobniowski, D. Alland, E. Desmond, M. Holodniy, and J. Drenkow. 1998.** Simultaneous genotyping and species identification using hybridization pattern recognition analysis of generic *Mycobacterium* DNA arrays. *Genome Res* 8: 435-48.

- Ginsberg, A. M. 2002.** What's new in tuberculosis vaccines? *Bull World Health Organ* 80: 483-8.
- Glynn, J. R. 2006.** Beijing/W genotype *Mycobacterium tuberculosis* and drug resistance. *Emerg Infect Dis* 12: 736-43.
- Glynn, J. R., J. Whiteley, P. J. Bifani, K. Kremer, and D. van Soolingen. 2002.** Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. *Emerg Infect Dis* 8: 843-9.
- Godde, J. S., and A. Bickerton. 2006.** The repetitive DNA elements called CRISPRs and their associated genes: evidence of horizontal transfer among prokaryotes. *J Mol Evol* 62: 718-29.
- Gordon, S. V., B. Heym, J. Parkhill, B. Barrell, and S. T. Cole. 1999a.** New insertion sequences and a novel repeated sequence in the genome of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology* 145 ( Pt 4): 881-92.
- Gordon, S. V., R. Brosch, A. Billault, T. Garnier, K. Eiglmeier, and S. T. Cole. 1999b.** Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. *Mol Microbiol* 32: 643-55.
- Grissa, I., G. Vergnaud, and C. Pourcel. 2007.** The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC Bioinformatics* 8: 172.
- Grode, L., P. Seiler, S. Baumann, J. Hess, V. Brinkmann, A. Nasser Eddine, P. Mann, C. Goosmann, S. Bander mann, D. Smith, G. J. Bancroft, J. M. Rey rat, D. van Soolingen, B. Raupach, and S. H. Kaufmann. 2005.** Increased vaccine efficacy against tuberculosis of recombinant *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin mutants that secrete listeriolysin. *J Clin Invest* 115: 2472-9.
- Groenen, P. M., A. E. Bunschoten, D. van Soolingen, and J. D. van Embden. 1993.** Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method. *Mol Microbiol* 10: 1057-65.
- Groisman, E. A., and H. Ochman. 1996.** Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. *Cell* 87: 791-4.
- Gutacker, M. M., B. Mathema, H. Soini, E. Shashkina, B. N. Kreiswirth, E. A. Graviss, and J. M. Musser. 2006.** Single-nucleotide polymorphism-based population genetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains from 4 geographic sites. *J Infect Dis* 193: 121-8.
- Gutacker, M. M., J. C. Smoot, C. A. Migliaccio, S. M. Ricklefs, S. Hua, D. V. Cousins, E. A. Graviss, E. Shashkina, B. N. Kreiswirth, and J. M. Musser. 2002.** Genome-wide analysis of synonymous single nucleotide polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: resolution of genetic relationships among closely related microbial strains. *Genetics* 162: 1533-43.
- Gutierrez, M. C., S. Brisse, R. Brosch, M. Fabre, B. Omais, M. Marmiesse, P. Supply, and V. Vincent. 2005.** Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* 1: e5.
- Hacker, J., and J. B. Kaper. 2000.** Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol* 54: 641-79.
- Hacker, J., U. Hentschel, and U. Dobrindt. 2003.** Prokaryotic chromosomes and disease. *Science* 301: 790-3.
- Haft, D. H., J. Selengut, E. F. Mongodin, and K. E. Nelson. 2005.** A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Comput Biol* 1: e60.
- Hale, C. R., P. Zhao, S. Olson, M. O. Duff, B. R. Graveley, L. Wells, R. M. Terns, and M. P. Terns. 2009.** RNA-guided RNA cleavage by a CRISPR RNA-Cas protein complex. *Cell* 139: 945-56.
- Harboe, M., T. Oettinger, H. G. Wiker, I. Rosenkrands, and P. Andersen. 1996.** Evidence for occurrence of the ESAT-6 protein in *Mycobacterium tuberculosis* and virulent *Mycobacterium bovis* and for its absence in *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun* 64: 16-22.

- Hasan, Z., M. Tanveer, A. Kanji, Q. Hasan, S. Ghebremichael, and R. Hasan. 2006.** Spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Pakistan reveals predominance of Central Asian Strain 1 and Beijing isolates. *J Clin Microbiol* 44: 1763-8.
- Hawkey, P. M., and A. M. Jones. 2009.** The changing epidemiology of resistance. *J Antimicrob Chemother* 64 Suppl 1: i3-10.
- Hawkey, P. M., E. G. Smith, J. T. Evans, P. Monk, G. Bryan, H. H. Mohamed, M. Bardhan, and R. N. Pugh. 2003.** Mycobacterial interspersed repetitive unit typing of *Mycobacterium tuberculosis* compared to IS6110-based restriction fragment length polymorphism analysis for investigation of apparently clustered cases of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 41: 3514-20.
- Hawkrige, T., T. J. Scriba, S. Gelderbloem, E. Smit, M. Tameris, S. Moyo, T. Lang, A. Veldsman, M. Hatherill, L. Merwe, H. A. Fletcher, H. Mahomed, A. V. Hill, W. A. Hanekom, G. D. Hussey, and H. McShane. 2008.** Safety and immunogenicity of a new tuberculosis vaccine, MVA85A, in healthy adults in South Africa. *J Infect Dis* 198: 544-52.
- Hendrix, R. W., M. C. Smith, R. N. Burns, M. E. Ford, and G. F. Hatfull. 1999.** Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: all the world's a phage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 2192-7.
- Hermans, P. W., D. van Soolingen, J. W. Dale, A. R. Schuitema, R. A. McAdam, D. Catty, and J. D. van Embden. 1990.** Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 28: 2051-8.
- Hernandez-Pando, R., H. Orozco, and D. Aguilar. 2009.** Factors that deregulate the protective immune response in tuberculosis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 57: 355-67.
- Herrera, M. T., M. Torres, D. Nevels, C. N. Perez-Redondo, J. J. Ellner, E. Sada, and S. K. Schwander. 2009.** Compartmentalized bronchoalveolar IFN-gamma and IL-12 response in human pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* 89: 38-47.
- Herrmann, J. L., M. Belloy, R. Porcher, N. Simonney, R. Aboutaam, M. Lebourgeois, J. Gaudelus, L. De Losangeles, K. Chadelat, P. Scheinmann, N. Beydon, B. Fauroux, M. Bingen, M. Terki, D. Barraud, P. Cruaud, C. Offredo, A. Ferroni, P. Berche, D. Moissenet, H. Vuthien, C. Doit, E. Bingen, and P. H. Lagrange. 2009.** Temporal dynamics of interferon gamma responses in children evaluated for tuberculosis. *PLoS One* 4: e4130.
- Hill, P. C., D. Jackson-Sillah, A. Fox, K. L. Franken, M. D. Lugos, D. J. Jeffries, S. A. Donkor, A. S. Hammond, R. A. Adegbola, T. H. Ottenhoff, M. R. Klein, and R. H. Brookes. 2005.** ESAT-6/CFP-10 fusion protein and peptides for optimal diagnosis of mycobacterium tuberculosis infection by ex vivo enzyme-linked immunospot assay in the Gambia. *J Clin Microbiol* 43: 2070-4.
- Hirsh, A. E., A. G. Tsolaki, K. DeRiemer, M. W. Feldman, and P. M. Small. 2004.** Stable association between strains of *Mycobacterium tuberculosis* and their human host populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 4871-6.
- Ho, T. D., N. Figueroa-Bossi, M. Wang, S. Uzzau, L. Bossi, and J. M. Slauch. 2002.** Identification of GtgE, a novel virulence factor encoded on the Gifsy-2 bacteriophage of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* 184: 5234-9.
- Hoft, D. F., A. Blazevic, G. Abate, W. A. Hanekom, G. Kaplan, J. H. Soler, F. Weichold, L. Geiter, J. C. Sadoff, and M. A. Horwitz. 2008.** A new recombinant bacille Calmette-Guerin vaccine safely induces significantly enhanced tuberculosis-specific immunity in human volunteers. *J Infect Dis* 198: 1491-501.
- Holick, M. F. 2007.** Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 357: 266-81.
- Horvath, P., and R. Barrangou. 2010.** CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science* 327: 167-70.
- Houben, E. N., L. Nguyen, and J. Pieters. 2006.** Interaction of pathogenic mycobacteria with the host immune system. *Curr Opin Microbiol* 9: 76-85.

- Huet, G., P. Constant, W. Malaga, M. A. Laneelle, K. Kremer, D. van Soolingen, M. Daffe, and C. Guilhot. 2009.** A lipid profile typifies the Beijing strains of *Mycobacterium tuberculosis*: identification of a mutation responsible for a modification of the structures of phthiocerol dimycocerosates and phenolic glycolipids. *J Biol Chem* 284: 27101-13.
- Hughes, A. L., R. Friedman, and M. Murray. 2002.** Genomewide pattern of synonymous nucleotide substitution in two complete genomes of *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerg Infect Dis* 8: 1342-6.
- Ichiyama, S., K. Shimokata, and J. Takeuchi. 1993.** Comparative study of a biphasic culture system (Roche MB Check system) with a conventional egg medium for recovery of mycobacteria. Aichi Mycobacteriosis Research Group. *Tuber Lung Dis* 74: 338-41.
- Ignatova, A., S. Dubiley, V. Stepanshina, and I. Shemyakin. 2006.** Predominance of multi-drug-resistant LAM and Beijing family strains among *Mycobacterium tuberculosis* isolates recovered from prison inmates in Tula Region, Russia. *J Med Microbiol* 55: 1413-8.
- Intemann, C. D., T. Thye, S. Niemann, E. N. Browne, M. Amanua Chinbuah, A. Enimil, J. Gyapong, I. Osei, E. Owusu-Dabo, S. Helm, S. Rusch-Gerdes, R. D. Horstmann, and C. G. Meyer. 2009.** Autophagy gene variant IRGM -261T contributes to protection from tuberculosis caused by *Mycobacterium tuberculosis* but not by *M. africanum* strains. *PLoS Pathog* 5: e1000577.
- Iwamoto, T., S. Yoshida, K. Suzuki, and T. Wada. 2008.** Population structure analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family indicates an association between certain sublineages and multidrug resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 3805-9.
- Jang, J., J. Becq, B. Gicquel, P. Deschavanne, and O. Neyrolles. 2008.** Horizontally acquired genomic islands in the tubercle bacilli. *Trends Microbiol* 16: 303-8.
- Jansen, R., J. D. van Embden, W. Gastra, and L. M. Schouls. 2002.** Identification of a novel family of sequence repeats among prokaryotes. *Omics* 6: 23-33.
- Jasmer, R. M., P. Nahid, and P. C. Hopewell. 2002.** Clinical practice. Latent tuberculosis infection. *N Engl J Med* 347: 1860-6.
- Ji, Y. E., M. J. Colston, and R. A. Cox. 1994.** The ribosomal RNA (rrn) operons of fast-growing mycobacteria: primary and secondary structures and their relation to rrn operons of pathogenic slow-growers. *Microbiology* 140 ( Pt 10): 2829-40.
- Juhas, M., J. R. van der Meer, M. Gaillard, R. M. Harding, D. W. Hood, and D. W. Crook. 2009.** Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS Microbiol Rev* 33: 376-93.
- Junqueira-Kipnis, A. P., A. Kipnis, A. Jamieson, M. G. Juarrero, A. Diefenbach, D. H. Raulet, J. Turner, and I. M. Orme. 2003.** NK cells respond to pulmonary infection with *Mycobacterium tuberculosis*, but play a minimal role in protection. *J Immunol* 171: 6039-45.
- Kam, K. M., C. W. Yip, L. W. Tse, K. L. Leung, K. L. Wong, W. M. Ko, and W. S. Wong. 2006.** Optimization of variable number tandem repeat typing set for differentiating *Mycobacterium tuberculosis* strains in the Beijing family. *FEMS Microbiol Lett* 256: 258-65.
- Kamerbeek, J., L. Schouls, A. Kolk, M. van Agterveld, D. van Soolingen, S. Kuijper, A. Bunschoten, H. Molhuizen, R. Shaw, M. Goyal, and J. van Embden. 1997.** Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 35: 907-14.
- Kasarov, L. B., and A. G. Moat. 1972.** Metabolism of nicotinamide adenine dinucleotide in human and bovine strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* 110: 600-3.
- Kato-Maeda, M., P. J. Bifani, B. N. Kreiswirth, and P. M. Small. 2001.** The nature and consequence of genetic variability within *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Invest* 107: 533-7.

- Kaufmann, S. H. 2002.** Protection against tuberculosis: cytokines, T cells, and macrophages. *Ann Rheum Dis* 61 Suppl 2: ii54-8.
- Kent, L., T. D. McHugh, O. Billington, J. W. Dale, and S. H. Gillespie. 1995.** Demonstration of homology between IS6110 of *Mycobacterium tuberculosis* and DNAs of other *Mycobacterium* spp.? *J Clin Microbiol* 33: 2290-3.
- Khader, S. A., G. K. Bell, J. E. Pearl, J. J. Fountain, J. Rangel-Moreno, G. E. Cilley, F. Shen, S. M. Eaton, S. L. Gaffen, S. L. Swain, R. M. Locksley, L. Haynes, T. D. Randall, and A. M. Cooper. 2007.** IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. *Nat Immunol* 8: 369-77.
- Kim, D. K., H. J. Kim, S. Y. Kwon, H. I. Yoon, C. T. Lee, Y. W. Kim, H. S. Chung, S. K. Han, Y. S. Shim, and J. H. Lee. 2008.** Nutritional deficit as a negative prognostic factor in patients with miliary tuberculosis. *Eur Respir J* 32: 1031-6.
- Kinander, W., T. Bruvik, and U. R. Dahle. 2009.** Dominant *Mycobacterium tuberculosis* lineages in elderly patients born in Norway. *PLoS One* 4: e8373.
- Kinsella, R. J., D. A. Fitzpatrick, C. J. Creevey, and J. O. McInerney. 2003.** Fatty acid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*: lateral gene transfer, adaptive evolution, and gene duplication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 10320-5.
- Kong, Y., M. D. Cave, D. Yang, L. Zhang, C. F. Marrs, B. Foxman, J. H. Bates, F. Wilson, L. N. Mukasa, and Z. H. Yang. 2005.** Distribution of insertion- and deletion-associated genetic polymorphisms among four *Mycobacterium tuberculosis* phospholipase C genes and associations with extrathoracic tuberculosis: a population-based study. *J Clin Microbiol* 43: 6048-53.
- Kremer, K., C. Arnold, A. Cataldi, M. C. Gutierrez, W. H. Haas, S. Panaiotov, R. A. Skuce, P. Supply, A. G. van der Zanden, and D. van Soolingen. 2005.** Discriminatory power and reproducibility of novel DNA typing methods for *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *J Clin Microbiol* 43: 5628-38.
- Kremer, K., D. van Soolingen, R. Frothingham, W. H. Haas, P. W. Hermans, C. Martin, P. Palittapongarnpim, B. B. Plikaytis, L. W. Riley, M. A. Yakrus, J. M. Musser, and J. D. van Embden. 1999.** Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J Clin Microbiol* 37: 2607-18.
- Kwara, A., R. Schiro, L. S. Cowan, N. E. Hyslop, M. F. Wiser, S. Roahen Harrison, P. Kissinger, L. Diem, and J. T. Crawford. 2003.** Evaluation of the epidemiologic utility of secondary typing methods for differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Clin Microbiol* 41: 2683-5.
- Lalvani, A., R. Brookes, S. Hambleton, W. J. Britton, A. V. Hill, and A. J. McMichael. 1997.** Rapid effector function in CD8+ memory T cells. *J Exp Med* 186: 859-65.
- Lalvani, A., P. Nagvenkar, Z. Udwadia, A. A. Pathan, K. A. Wilkinson, J. S. Shastri, K. Ewer, A. V. Hill, A. Mehta, and C. Rodrigues. 2001a.** Enumeration of T cells specific for RD1-encoded antigens suggests a high prevalence of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection in healthy urban Indians. *J Infect Dis* 183: 469-77.
- Lalvani, A., A. A. Pathan, H. Durkan, K. A. Wilkinson, A. Whelan, J. J. Deeks, W. H. Reece, M. Latif, G. Pasvol, and A. V. Hill. 2001b.** Enhanced contact tracing and spatial tracking of *Mycobacterium tuberculosis* infection by enumeration of antigen-specific T cells. *Lancet* 357: 2017-21.
- Larbig, K. D., A. Christmann, A. Johann, J. Klockgether, T. Hartsch, R. Merkl, L. Wiehlmann, H. J. Fritz, and B. Tummeler. 2002.** Gene islands integrated into tRNA(Gly) genes confer genome diversity on a *Pseudomonas aeruginosa* clone. *J Bacteriol* 184: 6665-80.
- Lari, N., L. Rindi, R. Cristofani, N. Rastogi, E. Tortoli, and C. Garzelli. 2009.** Association of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates of BOVIS and Central Asian (CAS) genotypic lineages with extrapulmonary disease. *Clin Microbiol Infect* 15: 538-43.

- Lari, N., L. Rindi, D. Bonanni, N. Rastogi, C. Sola, E. Tortoli, and C. Garzelli. 2007.** Three-year longitudinal study of genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Tuscany, Italy. *J Clin Microbiol* 45: 1851-7.
- Lazzarini, L. C., R. C. Huard, N. L. Boechat, H. M. Gomes, M. C. Oelemann, N. Kurepina, E. Shashkina, F. C. Mello, A. L. Gibson, M. J. Virginio, A. G. Marsico, W. R. Butler, B. N. Kreiswirth, P. N. Suffys, E. S. J. R. Lapa, and J. L. Ho. 2007.** Discovery of a novel *Mycobacterium tuberculosis* lineage that is a major cause of tuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol* 45: 3891-902.
- Le Cabec, V., C. Cols, and I. Maridonneau-Parini. 2000.** Nonopsonic phagocytosis of zymosan and *Mycobacterium kansasii* by CR3 (CD11b/CD18) involves distinct molecular determinants and is or is not coupled with NADPH oxidase activation. *Infect Immun* 68: 4736-45.
- Le Fleche, P., M. Fabre, F. Denoeud, J. L. Koeck, and G. Vergnaud. 2002.** High resolution, on-line identification of strains from the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on tandem repeat typing. *BMC Microbiol* 2: 37.
- Lecointre, G., L. Rachdi, P. Darlu, and E. Denamur. 1998.** *Escherichia coli* molecular phylogeny using the incongruence length difference test. *Mol Biol Evol* 15: 1685-95.
- Lee, J. Y., H. J. Choi, I. N. Park, S. B. Hong, Y. M. Oh, C. M. Lim, S. D. Lee, Y. Koh, W. S. Kim, D. S. Kim, W. D. Kim, and T. S. Shim. 2006.** Comparison of two commercial interferon-gamma assays for diagnosing *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Eur Respir J* 28: 24-30.
- Legrand, E., I. Filliol, C. Sola, and N. Rastogi. 2001.** Use of spoligotyping to study the evolution of the direct repeat locus by IS6110 transposition in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 39: 1595-9.
- Leite, C. Q., A. da Silva Rocha, S. R. de Andrade Leite, R. M. Ferreira, P. N. Suffys, L. de Souza Fonseca, and M. H. Saad. 2005.** A comparison of mycolic acid analysis for nontuberculous mycobacteria identification by thin-layer chromatography and molecular methods. *Microbiol Immunol* 49: 571-8.
- Li, L., J. P. Bannantine, Q. Zhang, A. Amonsin, B. J. May, D. Alt, N. Banerji, S. Kanjilal, and V. Kapur. 2005.** The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 12344-9.
- Lienhardt, C., K. Fielding, A. A. Hane, A. Niang, C. T. Ndao, F. Karam, H. Fletcher, F. Mbow, J. F. Gomis, R. Diadiou, M. Toupene, T. Dieye, and S. Mboup. 2010.** Evaluation of the prognostic value of IFN-gamma release assay and tuberculin skin test in household contacts of infectious tuberculosis cases in Senegal. *PLoS One* 5: e10508.
- Lin, H. H., M. Ezzati, and M. Murray. 2007.** Tobacco smoke, indoor air pollution and tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Med* 4: e20.
- Loeuillet, C., F. Martinon, C. Perez, M. Munoz, M. Thome, and P. R. Meylan. 2006.** *Mycobacterium tuberculosis* subverts innate immunity to evade specific effectors. *J Immunol* 177: 6245-55.
- Lopez, B., D. Aguilar, H. Orozco, M. Burger, C. Espitia, V. Ritacco, L. Barrera, K. Kremer, R. Hernandez-Pando, K. Huygen, and D. van Soolingen. 2003.** A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clin Exp Immunol* 133: 30-7.
- MacMicking, J. D., G. A. Taylor, and J. D. McKinney. 2003.** Immune control of tuberculosis by IFN-gamma-inducible LRG-47. *Science* 302: 654-9.
- Magalhaes, I., D. R. Sizemore, R. K. Ahmed, S. Mueller, L. Wehlin, C. Scanga, F. Weichold, G. Schirru, M. G. Pau, J. Goudsmit, S. Kuhlmann-Berenzon, M. Spangberg, J. Andersson, H. Gaines, R. Thorstensson, Y. A. Skeiky, J. Sadoff, and M. Maeurer. 2008.** rBCG induces strong antigen-specific T cell responses in rhesus macaques in a prime-boost setting with an adenovirus 35 tuberculosis vaccine vector. *PLoS One* 3: e3790.



- Mahairas, G. G., P. J. Sabo, M. J. Hickey, D. C. Singh, and C. K. Stover. 1996.** Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J Bacteriol* 178: 1274-82.
- Malen, H., F. S. Berven, K. E. Fladmark, and H. G. Wiker. 2007.** Comprehensive analysis of exported proteins from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Proteomics* 7: 1702-18.
- Manca, C., M. B. Reed, S. Freeman, B. Mathema, B. Kreiswirth, C. E. Barry, 3rd, and G. Kaplan. 2004.** Differential monocyte activation underlies strain-specific *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. *Infect Immun* 72: 5511-4.
- Manca, C., L. Tsenova, C. E. Barry, 3rd, A. Bergtold, S. Freeman, P. A. Haslett, J. M. Musser, V. H. Freedman, and G. Kaplan. 1999.** *Mycobacterium tuberculosis* CDC1551 induces a more vigorous host response in vivo and in vitro, but is not more virulent than other clinical isolates. *J Immunol* 162: 6740-6.
- Manca, C., L. Tsenova, A. Bergtold, S. Freeman, M. Tovey, J. M. Musser, C. E. Barry, 3rd, V. H. Freedman, and G. Kaplan. 2001.** Virulence of a *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolate in mice is determined by failure to induce Th1 type immunity and is associated with induction of IFN- $\alpha$  / $\beta$ . *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 5752-7.
- Marais, B. J., T. C. Victor, A. C. Hesselning, M. Barnard, A. Jordaan, W. Brittle, H. Reuter, N. Beyers, P. D. van Helden, R. M. Warren, and H. S. Schaaf. 2006.** Beijing and Haarlem genotypes are overrepresented among children with drug-resistant tuberculosis in the Western Cape Province of South Africa. *J Clin Microbiol* 44: 3539-43.
- Marraffini, L. A., and E. J. Sontheimer. 2009.** Invasive DNA, chopped and in the CRISPR. *Structure* 17: 786-8.
- Marri, P. R., J. P. Bannantine, and G. B. Golding. 2006.** Comparative genomics of metabolic pathways in *Mycobacterium* species: gene duplication, gene decay and lateral gene transfer. *FEMS Microbiol Rev* 30: 906-25.
- Maynard Smith, J., and N. H. Smith. 1998.** Detecting recombination from gene trees. *Mol Biol Evol* 15: 590-9.
- Mazars, E., S. Lesjean, A. L. Banuls, M. Gilbert, V. Vincent, B. Gicquel, M. Tibayrenc, C. Locht, and P. Supply. 2001.** High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 1901-6.
- McAdam, R. A., P. W. Hermans, D. van Soolingen, Z. F. Zainuddin, D. Catty, J. D. van Embden, and J. W. Dale. 1990.** Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence belonging to the IS3 family. *Mol Microbiol* 4: 1607-13.
- McEvoy, C. R., A. A. Falmer, N. C. Gey van Pittius, T. C. Victor, P. D. van Helden, and R. M. Warren. 2007.** The role of IS6110 in the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)* 87: 393-404.
- McHugh, T. D., S. L. Batt, R. J. Shorten, R. D. Gosling, L. Uiso, and S. H. Gillespie. 2005.** *Mycobacterium tuberculosis* lineage: a naming of the parts. *Tuberculosis (Edinb)* 85: 127-36.
- Means, T. K., S. Wang, E. Lien, A. Yoshimura, D. T. Golenbock, and M. J. Fenton. 1999.** Human toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 163: 3920-7.
- Millet, J., S. Baboolal, P. E. Akpaka, D. Ramoutar, and N. Rastogi. 2009.** Phylogeographical and molecular characterization of an emerging *Mycobacterium tuberculosis* clone in Trinidad and Tobago. *Infect Genet Evol* 9: 1336-44.
- Millington, K. A., J. A. Innes, S. Hackforth, T. S. Hinks, J. J. Deeks, D. P. Dosanjh, V. Guyot-Revol, R. Gunatheesan, P. Klenerman, and A. Lalvani. 2007.** Dynamic relationship between IFN- $\gamma$  and IL-2 profile of *Mycobacterium tuberculosis*-specific T cells and antigen load. *J Immunol* 178: 5217-26.
- Mitchison, D. A., A. L. Bhatia, S. Radhakrishna, J. B. Selkon, T. V. Subbaiah, and J. G. Wallace. 1961.** The virulence in the guinea-pig of tubercle bacilli isolated before treatment from South Indian patients with pulmonary tuberculosis. I.

- Homogeneity of the investigation and a critique of the virulence test. *Bull World Health Organ* 25: 285-312.
- Mohan, V. P., C. A. Scanga, K. Yu, H. M. Scott, K. E. Tanaka, E. Tsang, M. M. Tsai, J. L. Flynn, and J. Chan. 2001.** Effects of tumor necrosis factor alpha on host immune response in chronic persistent tuberculosis: possible role for limiting pathology. *Infect Immun* 69: 1847-55.
- Mohd-Zain, Z., S. L. Turner, A. M. Cerdeno-Tarraga, A. K. Lilley, T. J. Inzana, A. J. Duncan, R. M. Harding, D. W. Hood, T. E. Peto, and D. W. Crook. 2004.** Transferable antibiotic resistance elements in *Haemophilus influenzae* share a common evolutionary origin with a diverse family of syntenic genomic islands. *J Bacteriol* 186: 8114-22.
- Mojica, F. J., C. Diez-Villasenor, E. Soria, and G. Juez. 2000.** Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Mol Microbiol* 36: 244-6.
- Monot, M., N. Honore, T. Garnier, N. Zidane, D. Sherafi, A. Paniz-Mondolfi, M. Matsuoka, G. M. Taylor, H. D. Donoghue, A. Bouwman, S. Mays, C. Watson, D. Lockwood, A. Khamesipour, Y. Dowlati, S. Jianping, T. H. Rea, L. Vera-Cabrera, M. M. Stefani, S. Banu, M. Macdonald, B. R. Sapkota, J. S. Spencer, J. Thomas, K. Harshman, P. Singh, P. Busso, A. Gattiker, J. Rougemont, P. J. Brennan, and S. T. Cole. 2009.** Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. *Nat Genet* 41: 1282-9.
- Mori, Y., K. Nagamine, N. Tomita, and T. Notomi. 2001.** Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem Biophys Res Commun* 289: 150-4.
- Morris, R. P., L. Nguyen, J. Gatfield, K. Visconti, K. Nguyen, D. Schnappinger, S. Ehrh, Y. Liu, L. Heifets, J. Pieters, G. Schoolnik, and C. J. Thompson. 2005.** Ancestral antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 12200-5.
- Mostowy, S., D. Cousins, J. Brinkman, A. Aranaz, and M. A. Behr. 2002.** Genomic deletions suggest a phylogeny for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Infect Dis* 186: 74-80.
- Munk, M. E., S. M. Arend, I. Brock, T. H. Ottenhoff, and P. Andersen. 2001.** Use of ESAT-6 and CFP-10 antigens for diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. *J Infect Dis* 183: 175-6.
- Nair, S., P. A. Ramaswamy, S. Ghosh, D. C. Joshi, N. Pathak, I. Siddiqui, P. Sharma, S. E. Hasnain, S. C. Mande, and S. Mukhopadhyay. 2009.** The PPE18 of *Mycobacterium tuberculosis* interacts with TLR2 and activates IL-10 induction in macrophage. *J Immunol* 183: 6269-81.
- Nakamura, Y., T. Itoh, H. Matsuda, and T. Gojobori. 2004.** Biased biological functions of horizontally transferred genes in prokaryotic genomes. *Nat Genet* 36: 760-6.
- Nau, G. J., J. F. Richmond, A. Schlesinger, E. G. Jennings, E. S. Lander, and R. A. Young. 2002.** Human macrophage activation programs induced by bacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 1503-8.
- Newport, M., and M. Levin. 1999.** Genetic susceptibility to tuberculosis. *J Infect* 39: 117-21.
- Nor, N. M., and M. Musa. 2004.** Approaches towards the development of a vaccine against tuberculosis: recombinant BCG and DNA vaccine. *Tuberculosis (Edinb)* 84: 102-9.
- North, R. J., L. Ryan, R. LaCourse, T. Mogue, and M. E. Goodrich. 1999.** Growth rate of mycobacteria in mice as an unreliable indicator of mycobacterial virulence. *Infect Immun* 67: 5483-5.
- Ochman, H., J. G. Lawrence, and E. A. Groisman. 2000.** Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* 405: 299-304.
- Oelschlaeger, T. A., D. Zhang, S. Schubert, E. Carniel, W. Rabsch, H. Karch, and J. Hacker. 2003.** The high-pathogenicity island is absent in human pathogens of

- Salmonella enterica* subspecies I but present in isolates of subspecies III and VI. J Bacteriol 185: 1107-11.
- Ogata, K., B. A. Linzer, R. I. Zuberi, T. Ganz, R. I. Lehrer, and A. Catanzaro. 1992.** Activity of defensins from human neutrophilic granulocytes against *Mycobacterium avium*-*Mycobacterium intracellulare*. Infect Immun 60: 4720-5.
- Okkels, L. M., T. M. Doherty, and P. Andersen. 2003.** Selecting the components for a safe and efficient tuberculosis subunit vaccine--recent progress and post-genomic insights. Curr Pharm Biotechnol 4: 69-83.
- Olano, J., B. Lopez, A. Reyes, M. P. Lemos, N. Correa, P. Del Portillo, L. Barrera, J. Robledo, V. Ritacco, and M. M. Zambrano. 2007.** Mutations in DNA repair genes are associated with the Haarlem lineage of *Mycobacterium tuberculosis* independently of their antibiotic resistance. Tuberculosis (Edinb) 87: 502-8.
- Ordway, D., M. Henao-Tamayo, M. Harton, G. Palanisamy, J. Troudt, C. Shanley, R. J. Basaraba, and I. M. Orme. 2007.** The hypervirulent *Mycobacterium tuberculosis* strain HN878 induces a potent TH1 response followed by rapid down-regulation. J Immunol 179: 522-31.
- Ordway, D. J., L. Costa, M. Martins, H. Silveira, L. Amaral, M. J. Arroz, F. A. Ventura, and H. M. Dockrell. 2004.** Increased Interleukin-4 production by CD8 and gammadelta T cells in health-care workers is associated with the subsequent development of active tuberculosis. J Infect Dis 190: 756-66.
- Otal, I., C. Martin, V. Vincent-Levy-Frebault, D. Thierry, and B. Gicquel. 1991.** Restriction fragment length polymorphism analysis using IS6110 as an epidemiological marker in tuberculosis. J Clin Microbiol 29: 1252-4.
- Otlu, B., R. Durmaz, S. Gunal, C. Sola, T. Zozio, and N. Rastogi. 2009.** Beijing/W and major spoligotype families of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from tuberculosis patients in Eastern Turkey. New Microbiol 32: 255-63.
- Palanisamy, G. S., N. DuTeau, K. D. Eisenach, D. M. Cave, S. A. Theus, B. N. Kreiswirth, R. J. Basaraba, and I. M. Orme. 2009.** Clinical strains of *Mycobacterium tuberculosis* display a wide range of virulence in guinea pigs. Tuberculosis (Edinb) 89: 203-9.
- Palomino, J. C. 2009.** Molecular detection, identification and drug resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis*. FEMS Immunol Med Microbiol 56: 103-11.
- Paramasivan, C. N., S. Sulochana, G. Kubendiran, P. Venkatesan, and D. A. Mitchison. 2005.** Bactericidal action of gatifloxacin, rifampin, and isoniazid on logarithmic- and stationary-phase cultures of *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother 49: 627-31.
- Parry, C., and P. D. Davies. 1996.** The resurgence of tuberculosis. Soc Appl Bacteriol Symp Ser 25: 23S-26S.
- Parsons, L. M., C. S. Jankowski, and K. M. Derbyshire. 1998.** Conjugal transfer of chromosomal DNA in *Mycobacterium smegmatis*. Mol Microbiol 28: 571-82.
- Pathan, A. A., K. A. Wilkinson, P. Klennerman, H. McShane, R. N. Davidson, G. Pasvol, A. V. Hill, and A. Lalvani. 2001.** Direct ex vivo analysis of antigen-specific IFN-gamma-secreting CD4 T cells in *Mycobacterium tuberculosis*-infected individuals: associations with clinical disease state and effect of treatment. J Immunol 167: 5217-25.
- Paulsen, I. T., L. Banerjee, G. S. Myers, K. E. Nelson, R. Seshadri, T. D. Read, D. E. Fouts, J. A. Eisen, S. R. Gill, J. F. Heidelberg, H. Tettelin, R. J. Dodson, L. Umayam, L. Brinkac, M. Beanan, S. Daugherty, R. T. DeBoy, S. Durkin, J. Kolonay, R. Madupu, W. Nelson, J. Vamathevan, B. Tran, J. Upton, T. Hansen, J. Shetty, H. Khouri, T. Utterback, D. Radune, K. A. Ketchum, B. A. Dougherty, and C. M. Fraser. 2003.** Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. Science 299: 2071-4.
- Philipp, W. J., S. Poulet, K. Eiglmeier, L. Pascopella, V. Balasubramanian, B. Heym, S. Bergh, B. R. Bloom, W. R. Jacobs, Jr., and S. T. Cole. 1996.** An integrated map of the genome of the tubercle bacillus, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, and comparison with *Mycobacterium leprae*. Proc Natl Acad Sci U S A 93: 3132-7.

- Pitarque, S., J. L. Herrmann, J. L. Duteyrat, M. Jackson, G. R. Stewart, F. Lecointe, B. Payre, O. Schwartz, D. B. Young, G. Marchal, P. H. Lagrange, G. Puzo, B. Gicquel, J. Nigou, and O. Neyrolles. 2005.** Deciphering the molecular bases of *Mycobacterium tuberculosis* binding to the lectin DC-SIGN reveals an underestimated complexity. *Biochem J* 392: 615-24.
- Purushothaman, S., G. Gupta, R. Srivastava, V. G. Ramu, and A. Surolia. 2008.** Ligand specificity of group I biotin protein ligase of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One* 3: e2320.
- Raja, A. 2004.** Immunology of tuberculosis. *Indian J Med Res* 120: 213-32.
- Rakotosamimanana, N., V. Raharimanga, S. F. Andriamandimby, J. L. Soares, T. M. Doherty, M. Ratsitorahina, H. Ramarokoto, A. Zumla, J. Huggett, G. Rook, V. Richard, B. Gicquel, and V. Rasolofo-Razanamparany. 2010.** Variation in gamma interferon responses to different infecting strains of *Mycobacterium tuberculosis* in acid-fast bacillus smear-positive patients and household contacts in Antananarivo, Madagascar. *Clin Vaccine Immunol* 17: 1094-103.
- Rasolofo Razanamparany, V., D. Menard, G. Auregan, B. Gicquel, and S. Chanteau. 2002.** Extrapulmonary and pulmonary tuberculosis in antananarivo (madagascar): high clustering rate in female patients. *J Clin Microbiol* 40: 3964-9.
- Raviglione, M. C. 2003.** The TB epidemic from 1992 to 2002. *Tuberculosis (Edinb)* 83: 4-14.
- Raynaud, C., C. Guilhot, J. Rauzier, Y. Bordat, V. Pelicic, R. Manganelli, I. Smith, B. Gicquel, and M. Jackson. 2002.** Phospholipases C are involved in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 45: 203-17.
- Reed, M. B., P. Domenech, C. Manca, H. Su, A. K. Barczak, B. N. Kreiswirth, G. Kaplan, and C. E. Barry, 3rd. 2004.** A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response. *Nature* 431: 84-7.
- Reyrat, J. M., F. X. Berthet, and B. Gicquel. 1995.** The urease locus of *Mycobacterium tuberculosis* and its utilization for the demonstration of allelic exchange in *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 8768-72.
- Richter, E., M. Weizenegger, S. Rusch-Gerdes, and S. Niemann. 2003.** Evaluation of genotype MTBC assay for differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J Clin Microbiol* 41: 2672-5.
- Rindi, L., N. Lari, B. Cuccu, and C. Garzelli. 2009.** Evolutionary pathway of the Beijing lineage of *Mycobacterium tuberculosis* based on genomic deletions and *mutT* genes polymorphisms. *Infect Genet Evol* 9: 48-53.
- Ripoll, F., S. Pasek, C. Schenowitz, C. Dossat, V. Barbe, M. Rottman, E. Macheras, B. Heym, J. L. Herrmann, M. Daffe, R. Brosch, J. L. Risler, and J. L. Gaillard. 2009.** Non mycobacterial virulence genes in the genome of the emerging pathogen *Mycobacterium abscessus*. *PLoS One* 4: e5660.
- Rook, G. A., and A. Zumla. 2001.** Advances in the immunopathogenesis of pulmonary tuberculosis. *Curr Opin Pulm Med* 7: 116-23.
- Rooyakkers, A. W., and R. W. Stokes. 2005.** Absence of complement receptor 3 results in reduced binding and ingestion of *Mycobacterium tuberculosis* but has no significant effect on the induction of reactive oxygen and nitrogen intermediates or on the survival of the bacteria in resident and interferon-gamma activated macrophages. *Microb Pathog* 39: 57-67.
- Roring, S., A. Scott, D. Brittain, I. Walker, G. Hewinson, S. Neill, and R. Skuce. 2002.** Development of variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium bovis*: comparison of results with those obtained by using existing exact tandem repeats and spoligotyping. *J Clin Microbiol* 40: 2126-33.
- Rosas-Magallanes, V., P. Deschavanne, L. Quintana-Murci, R. Brosch, B. Gicquel, and O. Neyrolles. 2006.** Horizontal transfer of a virulence operon to the ancestor of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Biol Evol* 23: 1129-35.
- Rosas-Magallanes, V., G. Stadthagen-Gomez, J. Rauzier, L. B. Barreiro, L. Tailleux, F. Boudou, R. Griffin, J. Nigou, M. Jackson, B. Gicquel, and O.**

- Neyrolles. 2007.** Signature-tagged transposon mutagenesis identifies novel *Mycobacterium tuberculosis* genes involved in the parasitism of human macrophages. *Infect Immun* 75: 504-7.
- Rosenberg, N. A., J. K. Pritchard, J. L. Weber, H. M. Cann, K. K. Kidd, L. A. Zhivotovsky, and M. W. Feldman. 2002.** Genetic structure of human populations. *Science* 298: 2381-5.
- Rothschild, B. M., L. D. Martin, G. Lev, H. Bercovier, G. K. Bar-Gal, C. Greenblatt, H. Donoghue, M. Spigelman, and D. Brittain. 2001.** *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA from an extinct bison dated 17,000 years before the present. *Clin Infect Dis* 33: 305-11.
- Rowe-Magnus, D. A., A. M. Guerout, L. Biskri, P. Bouige, and D. Mazel. 2003.** Comparative analysis of superintegrations: engineering extensive genetic diversity in the *Vibrionaceae*. *Genome Res* 13: 428-42.
- Russell, D. G. 2007.** Who puts the tubercle in tuberculosis? *Nat Rev Microbiol* 5: 39-47.
- Safi, H., P. F. Barnes, D. L. Lakey, H. Shams, B. Samten, R. Vankayalapati, and S. T. Howard. 2004.** IS6110 functions as a mobile, monocyte-activated promoter in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 52: 999-1012.
- Sakula, A. 1982.** Robert Koch: centenary of the discovery of the tubercle bacillus, 1882. *Thorax* 37: 246-51.
- Saves, I., F. Westrelin, M. Daffe, and J. M. Masson. 2001.** Identification of the first eubacterial endonuclease coded by an intein allele in the *pps1* gene of mycobacteria. *Nucleic Acids Res* 29: 4310-8.
- Savine, E., R. M. Warren, G. D. van der Spuy, N. Beyers, P. D. van Helden, C. Loch, and P. Supply. 2002.** Stability of variable-number tandem repeats of mycobacterial interspersed repetitive units from 12 loci in serial isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 40: 4561-6.
- Schlesinger, L. S. 1993.** Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. *J Immunol* 150: 2920-30.
- Schluger, N. W., and W. N. Rom. 1998.** The host immune response to tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 157: 679-91.
- Schmidt, H., and M. Hensel. 2004.** Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 17: 14-56.
- Schwander, S. K., M. Torres, C. C. Carranza, D. Escobedo, M. Tary-Lehmann, P. Anderson, Z. Toossi, J. J. Ellner, E. A. Rich, and E. Sada. 2000.** Pulmonary mononuclear cell responses to antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in healthy household contacts of patients with active tuberculosis and healthy controls from the community. *J Immunol* 165: 1479-85.
- Sebban, M., I. Mokrousov, N. Rastogi, and C. Sola. 2002.** A data-mining approach to spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Bioinformatics* 18: 235-43.
- Seiler, P., P. Aichele, S. Bandermann, A. E. Hauser, B. Lu, N. P. Gerard, C. Gerard, S. Ehlers, H. J. Mollenkopf, and S. H. Kaufmann. 2003.** Early granuloma formation after aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection is regulated by neutrophils via CXCR3-signaling chemokines. *Eur J Immunol* 33: 2676-86.
- Seki, M., I. Honda, I. Fujita, I. Yano, S. Yamamoto, and A. Koyama. 2009.** Whole genome sequence analysis of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG) Tokyo 172: a comparative study of BCG vaccine substrains. *Vaccine* 27: 1710-6.
- Sinsimer, D., G. Huet, C. Manca, L. Tsenova, M. S. Koo, N. Kurepina, B. Kana, B. Mathema, S. A. Marras, B. N. Kreiswirth, C. Guilhot, and G. Kaplan. 2008.** The phenolic glycolipid of *Mycobacterium tuberculosis* differentially modulates the early host cytokine response but does not in itself confer hypervirulence. *Infect Immun* 76: 3027-36.
- Skeiky, Y. A., J. Dietrich, T. M. Lasco, K. Stagliano, V. Dheenadhayalan, M. A. Goetz, L. Cantarero, R. J. Basaraba, P. Bang, I. Kromann, J. B. McClain, J.**

- C. Sadoff, and P. Andersen. 2009.** Non-clinical efficacy and safety of HyVac4:IC31 vaccine administered in a BCG prime-boost regimen. *Vaccine*.
- Skjot, R. L., T. Oettinger, I. Rosenkrands, P. Ravn, I. Brock, S. Jacobsen, and P. Andersen. 2000.** Comparative evaluation of low-molecular-mass proteins from *Mycobacterium tuberculosis* identifies members of the ESAT-6 family as immunodominant T-cell antigens. *Infect Immun* 68: 214-20.
- Skjot, R. L., I. Brock, S. M. Arend, M. E. Munk, M. Theisen, T. H. Ottenhoff, and P. Andersen. 2002.** Epitope mapping of the immunodominant antigen TB10.4 and the two homologous proteins TB10.3 and TB12.9, which constitute a subfamily of the *esat-6* gene family. *Infect Immun* 70: 5446-53.
- Small, P. M., P. C. Hopewell, S. P. Singh, A. Paz, J. Parsonnet, D. C. Ruston, G. F. Schecter, C. L. Daley, and G. K. Schoolnik. 1994.** The epidemiology of tuberculosis in San Francisco. A population-based study using conventional and molecular methods. *N Engl J Med* 330: 1703-9.
- Smith, H. W., and M. A. Linggood. 1971.** The transmissible nature of enterotoxin production in a human enteropathogenic strain of *Escherichia coli*. *J Med Microbiol* 4: 301-5.
- Smittipat, N., P. Billamas, M. Palittapongarnpim, A. Thong-On, M. M. Temu, P. Thanakijcharoen, O. Karnkawinpong, and P. Palittapongarnpim. 2005.** Polymorphism of variable-number tandem repeats at multiple loci in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 43: 5034-43.
- Sohaskey, C. D. 2005.** Regulation of nitrate reductase activity in *Mycobacterium tuberculosis* by oxygen and nitric oxide. *Microbiology* 151: 3803-10.
- Soini, H., X. Pan, A. Amin, E. A. Graviss, A. Siddiqui, and J. M. Musser. 2000.** Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients in Houston, Texas, by spoligotyping. *J Clin Microbiol* 38: 669-76.
- Sola, C., I. Filliol, M. C. Gutierrez, I. Mokrousov, V. Vincent, and N. Rastogi. 2001.** Spoligotype database of *Mycobacterium tuberculosis*: biogeographic distribution of shared types and epidemiologic and phylogenetic perspectives. *Emerg Infect Dis* 7: 390-6.
- Sola, C., A. Devallois, L. Horgen, J. Maisetti, I. Filliol, E. Legrand, and N. Rastogi. 1999.** Tuberculosis in the Caribbean: using spacer oligonucleotide typing to understand strain origin and transmission. *Emerg Infect Dis* 5: 404-14.
- Sola, C., I. Filliol, E. Legrand, S. Lesjean, C. Locht, P. Supply, and N. Rastogi. 2003.** Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics. *Infect Genet Evol* 3: 125-33.
- Somoskovi, A., J. E. Hotaling, M. Fitzgerald, D. O'Donnell, L. M. Parsons, and M. Salfinger. 2001.** Lessons from a proficiency testing event for acid-fast microscopy. *Chest* 120: 250-7.
- Sorek, R., Y. Zhu, C. J. Creevey, M. P. Francino, P. Bork, and E. M. Rubin. 2007.** Genome-wide experimental determination of barriers to horizontal gene transfer. *Science* 318: 1449-52.
- Sorensen, A. L., S. Nagai, G. Houen, P. Andersen, and A. B. Andersen. 1995.** Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 63: 1710-7.
- Sreevatsan, S., X. Pan, K. E. Stockbauer, N. D. Connell, B. N. Kreiswirth, T. S. Whittam, and J. M. Musser. 1997.** Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 9869-74.
- Stahl, D. A., and J. W. Urbance. 1990.** The division between fast- and slow-growing species corresponds to natural relationships among the mycobacteria. *J Bacteriol* 172: 116-24.
- Stavrum, R., V. P. Myneedu, V. K. Arora, N. Ahmed, and H. M. Grewal. 2009.** In-depth molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* from New Delhi--predominance of drug resistant isolates of the 'modern' (TbD1) type. *PLoS One* 4: e4540.

- Stinear, T. P., T. Seemann, S. Pidot, W. Frigui, G. Reyssset, T. Garnier, G. Meurice, D. Simon, C. Bouchier, L. Ma, M. Tichit, J. L. Porter, J. Ryan, P. D. Johnson, J. K. Davies, G. A. Jenkin, P. L. Small, L. M. Jones, F. Tekaia, F. Laval, M. Daffe, J. Parkhill, and S. T. Cole. 2007.** Reductive evolution and niche adaptation inferred from the genome of *Mycobacterium ulcerans*, the causative agent of Buruli ulcer. *Genome Res* 17: 192-200.
- Stinear, T. P., T. Seemann, P. F. Harrison, G. A. Jenkin, J. K. Davies, P. D. Johnson, Z. Abdellah, C. Arrowsmith, T. Chillingworth, C. Churcher, K. Clarke, A. Cronin, P. Davis, I. Goodhead, N. Holroyd, K. Jagels, A. Lord, S. Moule, K. Mungall, H. Norbertczak, M. A. Quail, E. Rabinowitsch, D. Walker, B. White, S. Whitehead, P. L. Small, R. Brosch, L. Ramakrishnan, M. A. Fischbach, J. Parkhill, and S. T. Cole. 2008.** Insights from the complete genome sequence of *Mycobacterium marinum* on the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Genome Res* 18: 729-41.
- Streicher, E. M., R. M. Warren, C. Kewley, J. Simpson, N. Rastogi, C. Sola, G. D. van der Spuy, P. D. van Helden, and T. C. Victor. 2004.** Genotypic and phenotypic characterization of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from rural districts of the Western Cape Province of South Africa. *J Clin Microbiol* 42: 891-4.
- Sturgill-Koszycki, S., P. H. Schlesinger, P. Chakraborty, P. L. Haddix, H. L. Collins, A. K. Fok, R. D. Allen, S. L. Gluck, J. Heuser, and D. G. Russell. 1994.** Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* 263: 678-81.
- Sullivan, J. T., J. R. Trzebiatowski, R. W. Cruickshank, J. Gouzy, S. D. Brown, R. M. Elliot, D. J. Fleetwood, N. G. McCallum, U. Rossbach, G. S. Stuart, J. E. Weaver, R. J. Webby, F. J. De Bruijn, and C. W. Ronson. 2002.** Comparative sequence analysis of the symbiosis island of *Mesorhizobium loti* strain R7A. *J Bacteriol* 184: 3086-95.
- Sun, Y. J., T. K. Lim, A. K. Ong, B. C. Ho, G. T. Seah, and N. I. Paton. 2006.** Tuberculosis associated with *Mycobacterium tuberculosis* Beijing and non-Beijing genotypes: a clinical and immunological comparison. *BMC Infect Dis* 6: 105.
- Supply, P., E. Mazars, S. Lesjean, V. Vincent, B. Gicquel, and C. Locht. 2000.** Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol Microbiol* 36: 762-71.
- Supply, P., S. Lesjean, E. Savine, K. Kremer, D. van Soolingen, and C. Locht. 2001.** Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol* 39: 3563-71.
- Supply, P., C. Allix, S. Lesjean, M. Cardoso-Oelemann, S. Rusch-Gerdes, E. Willery, E. Savine, P. de Haas, H. van Deutekom, S. Roring, P. Bifani, N. Kurepina, B. Kreiswirth, C. Sola, N. Rastogi, V. Vatin, M. C. Gutierrez, M. Fauville, S. Niemann, R. Skuce, K. Kremer, C. Locht, and D. van Soolingen. 2006.** Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 44: 4498-510.
- Suresh, N., U. B. Singh, J. Arora, H. Pant, P. Seth, C. Sola, N. Rastogi, J. C. Samantaray, and J. N. Pande. 2006.** *rpoB* gene sequencing and spoligotyping of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from India. *Infect Genet Evol* 6: 474-83.
- Surikova, O. V., D. S. Voitech, G. Kuzmicheva, S. I. Tatkov, I. V. Mokrousov, O. V. Narvskaya, M. A. Rot, D. van Soolingen, and M. L. Filipenko. 2005.** Efficient differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* strains of the W-Beijing family from Russia using highly polymorphic VNTR loci. *Eur J Epidemiol* 20: 963-74.
- Tailleux, L., N. Pham-Thi, A. Bergeron-Lafaurie, J. L. Herrmann, P. Charles, O. Schwartz, P. Scheinmann, P. H. Lagrange, J. de Blic, A. Tazi, B. Gicquel, and O. Neyrolles. 2005.** DC-SIGN induction in alveolar macrophages defines

- privileged target host cells for mycobacteria in patients with tuberculosis. *PLoS Med* 2: e381.
- Tailleux, L., O. Schwartz, J. L. Herrmann, E. Pivert, M. Jackson, A. Amara, L. Legres, D. Dreher, L. P. Nicod, J. C. Gluckman, P. H. Lagrange, B. Gicquel, and O. Neyrolles. 2003.** DC-SIGN is the major *Mycobacterium tuberculosis* receptor on human dendritic cells. *J Exp Med* 197: 121-7.
- Talarico, S., M. D. Cave, C. F. Marrs, B. Foxman, L. Zhang, and Z. Yang. 2005.** Variation of the *Mycobacterium tuberculosis* PE\_PGRS 33 gene among clinical isolates. *J Clin Microbiol* 43: 4954-60.
- Tanaka, M. M., and A. R. Francis. 2006.** Detecting emerging strains of tuberculosis by using spoligotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 15266-71.
- Tanveer, M., Z. Hasan, A. Kanji, R. Hussain, and R. Hasan. 2009.** Reduced TNF-alpha and IFN-gamma responses to Central Asian strain 1 and Beijing isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in comparison with H37Rv strain. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 103: 581-7.
- ten Bokum, A. M., F. Movahedzadeh, R. Frita, G. J. Bancroft, and N. G. Stoker. 2008.** The case for hypervirulence through gene deletion in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol* 16: 436-41.
- Theus, S. A., M. D. Cave, and K. D. Eisenach. 2005.** Intracellular macrophage growth rates and cytokine profiles of *Mycobacterium tuberculosis* strains with different transmission dynamics. *J Infect Dis* 191: 453-60.
- Thierry, D., A. Brisson-Noel, V. Vincent-Levy-Frebault, S. Nguyen, J. L. Guesdon, and B. Gicquel. 1990a.** Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, *IS6110*, and its application in diagnosis. *J Clin Microbiol* 28: 2668-73.
- Thierry, D., M. D. Cave, K. D. Eisenach, J. T. Crawford, J. H. Bates, B. Gicquel, and J. L. Guesdon. 1990b.** *IS6110*, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Nucleic Acids Res* 18: 188.
- Thoma-Uszynski, S., S. Stenger, and R. L. Modlin. 2000.** CTL-mediated killing of intracellular *Mycobacterium tuberculosis* is independent of target cell nuclear apoptosis. *J Immunol* 165: 5773-9.
- Thoma-Uszynski, S., S. Stenger, O. Takeuchi, M. T. Ochoa, M. Engele, P. A. Sieling, P. F. Barnes, M. Rollinghoff, P. L. Bolcskei, M. Wagner, S. Akira, M. V. Norgard, J. T. Belisle, P. J. Godowski, B. R. Bloom, and R. L. Modlin. 2001.** Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors. *Science* 291: 1544-7.
- Thwaites, G., M. Caws, T. T. Chau, A. D'Sa, N. T. Lan, M. N. Huyen, S. Gagneux, P. T. Anh, D. Q. Tho, E. Torok, N. T. Nhu, N. T. Duyen, P. M. Duy, J. Richenberg, C. Simmons, T. T. Hien, and J. Farrar. 2008.** Relationship between *Mycobacterium tuberculosis* genotype and the clinical phenotype of pulmonary and meningeal tuberculosis. *J Clin Microbiol* 46: 1363-8.
- Torrea, G., G. Levee, P. Grimont, C. Martin, S. Chanteau, and B. Gicquel. 1995.** Chromosomal DNA fingerprinting analysis using the insertion sequence *IS6110* and the repetitive element DR as strain-specific markers for epidemiological study of tuberculosis in French Polynesia. *J Clin Microbiol* 33: 1899-904.
- Torrelles, J. B., A. K. Azad, and L. S. Schlesinger. 2006.** Fine discrimination in the recognition of individual species of phosphatidyl-myo-inositol mannosides from *Mycobacterium tuberculosis* by C-type lectin pattern recognition receptors. *J Immunol* 177: 1805-16.
- Torrelles, J. B., A. K. Azad, L. N. Henning, T. K. Carlson, and L. S. Schlesinger. 2008a.** Role of C-type lectins in mycobacterial infections. *Curr Drug Targets* 9: 102-12.
- Torrelles, J. B., R. Knaup, A. Kolareth, T. Slepishkina, T. M. Kaufman, P. Kang, P. J. Hill, P. J. Brennan, D. Chatterjee, J. T. Belisle, J. M. Musser, and L. S. Schlesinger. 2008b.** Identification of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates with altered phagocytosis by human macrophages due to a truncated lipoarabinomannan. *J Biol Chem* 283: 31417-28.



- Tortoli, E. 2003.** Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. *Clin Microbiol Rev* 16: 319-54.
- Traag, B. A., A. Driks, P. Stragier, W. Bitter, G. Broussard, G. Hatfull, F. Chu, K. N. Adams, L. Ramakrishnan, and R. Losick. 2010.** Do mycobacteria produce endospores? *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 878-81.
- Tsai, M. C., S. Chakravarty, G. Zhu, J. Xu, K. Tanaka, C. Koch, J. Tufariello, J. Flynn, and J. Chan. 2006.** Characterization of the tuberculous granuloma in murine and human lungs: cellular composition and relative tissue oxygen tension. *Cell Microbiol* 8: 218-32.
- Tsenova, L., E. Ellison, R. Harbacheuski, A. L. Moreira, N. Kurepina, M. B. Reed, B. Mathema, C. E. Barry, 3rd, and G. Kaplan. 2005.** Virulence of selected *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in the rabbit model of meningitis is dependent on phenolic glycolipid produced by the bacilli. *J Infect Dis* 192: 98-106.
- Tsolaki, A. G., S. Gagneux, A. S. Pym, Y. O. Goguet de la Salmoniere, B. N. Kreiswirth, D. Van Soolingen, and P. M. Small. 2005.** Genomic deletions classify the Beijing/W strains as a distinct genetic lineage of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 43: 3185-91.
- Tsolaki, A. G., A. E. Hirsh, K. DeRiemer, J. A. Enciso, M. Z. Wong, M. Hannan, Y. O. Goguet de la Salmoniere, K. Aman, M. Kato-Maeda, and P. M. Small. 2004.** Functional and evolutionary genomics of *Mycobacterium tuberculosis*: insights from genomic deletions in 100 strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 4865-70.
- Tsukaguchi, K., K. N. Balaji, and W. H. Boom. 1995.** CD4<sup>+</sup> alpha beta T cell and gamma delta T cell responses to *Mycobacterium tuberculosis*. Similarities and differences in Ag recognition, cytotoxic effector function, and cytokine production. *J Immunol* 154: 1786-96.
- Ulrichs, T., D. B. Moody, E. Grant, S. H. Kaufmann, and S. A. Porcelli. 2003.** T-cell responses to CD1-presented lipid antigens in humans with *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infect Immun* 71: 3076-87.
- Underhill, D. M., A. Ozinsky, K. D. Smith, and A. Aderem. 1999.** Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 14459-63.
- van Crevel, R., R. H. Nelwan, W. de Lenne, Y. Veeraragu, A. G. van der Zanden, Z. Amin, J. W. van der Meer, and D. van Soolingen. 2001.** *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains associated with febrile response to treatment. *Emerg Infect Dis* 7: 880-3.
- van de Vosse, E., and M. A. van Agtmael. 2007.** Targets of anticytokine therapy and the risk of infections in humans and mice. *Curr Opin Rheumatol* 19: 626-35.
- van der Oost, J., M. M. Jore, E. R. Westra, M. Lundgren, and S. J. Brouns. 2009.** CRISPR-based adaptive and heritable immunity in prokaryotes. *Trends Biochem Sci* 34: 401-7.
- van der Wel, N., D. Hava, D. Houben, D. Fluitsma, M. van Zon, J. Pierson, M. Brenner, and P. J. Peters. 2007.** *M. tuberculosis* and *M. leprae* translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. *Cell* 129: 1287-98.
- Van Deun, A., A. Hamid Salim, K. J. Aung, M. A. Hossain, N. Chambugonj, M. A. Hye, A. Kawria, and E. Declercq. 2005.** Performance of variations of carbolfuchsin staining of sputum smears for AFB under field conditions. *Int J Tuberc Lung Dis* 9: 1127-33.
- van Embden, J. D., T. van Gorkom, K. Kremer, R. Jansen, B. A. van Der Zeijst, and L. M. Schouls. 2000.** Genetic variation and evolutionary origin of the direct repeat locus of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *J Bacteriol* 182: 2393-401.
- van Soolingen, D., P. E. de Haas, P. W. Hermans, P. M. Groenen, and J. D. van Embden. 1993.** Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 31: 1987-95.

- van Soolingen, D., L. Qian, P. E. de Haas, J. T. Douglas, H. Traore, F. Portaels, H. Z. Qing, D. Enkhsaikan, P. Nymadawa, and J. D. van Embden. 1995.** Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of east Asia. *J Clin Microbiol* 33: 3234-8.
- Vankayalapati, R., P. Klucar, B. Wizel, S. E. Weis, B. Samten, H. Safi, H. Shams, and P. F. Barnes. 2004.** NK cells regulate CD8+ T cell effector function in response to an intracellular pathogen. *J Immunol* 172: 130-7.
- Ventura, M., C. Canchaya, A. Tauch, G. Chandra, G. F. Fitzgerald, K. F. Chater, and D. van Sinderen. 2007.** Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol Mol Biol Rev* 71: 495-548.
- Veyrier, F., D. Pletzer, C. Turenne, and M. A. Behr. 2009.** Phylogenetic detection of horizontal gene transfer during the step-wise genesis of *Mycobacterium tuberculosis*. *BMC Evol Biol* 9: 196.
- Volkman, H. E., T. C. Pozos, J. Zheng, J. M. Davis, J. F. Rawls, and L. Ramakrishnan. 2009.** Tuberculous Granuloma Induction via Interaction of a Bacterial Secreted Protein with Host Epithelium. *Science*.
- Von Eschen, K., R. Morrison, M. Braun, O. Ofori-Anyinam, E. De Kock, P. Pavithran, M. Koutsoukos, P. Moris, D. Cain, M. C. Dubois, J. Cohen, and W. R. Ballou. 2009.** The candidate tuberculosis vaccine Mtb72F/AS02A: Tolerability and immunogenicity in humans. *Hum Vaccin* 5: 475-82.
- Von Groll, A., A. Martin, C. Felix, P. F. Sanmartin Prata, G. Honscha, F. Portaels, P. Vandame, P. E. Almeida da Silva, and J. C. Palomino. 2009.** Fitness study of the RD(Rio) lineage and Latin American-Mediterranean family of *Mycobacterium tuberculosis* in the city of Rio Grande, Brazil. *FEMS Immunol Med Microbiol*.
- Vuola, J. M., M. A. Ristola, B. Cole, A. Jarviluoma, S. Tvaroha, T. Ronkko, O. Rautio, R. D. Arbeit, and C. F. von Reyn. 2003.** Immunogenicity of an inactivated mycobacterial vaccine for the prevention of HIV-associated tuberculosis: a randomized, controlled trial. *Aids* 17: 2351-5.
- Waddell, R. D., C. Chintu, A. D. Lein, A. Zumla, M. R. Karagas, K. S. Baboo, J. D. Habbema, A. N. Tosteson, P. Morin, S. Tvaroha, R. D. Arbeit, A. Mwinga, and C. F. von Reyn. 2000.** Safety and immunogenicity of a five-dose series of inactivated *Mycobacterium vaccae* vaccination for the prevention of HIV-associated tuberculosis. *Clin Infect Dis* 30 Suppl 3: S309-15.
- Wallis, R. S., T. M. Doherty, P. Onyebujoh, M. Vahedi, H. Laang, O. Olesen, S. Parida, and A. Zumla. 2009.** Biomarkers for tuberculosis disease activity, cure, and relapse. *Lancet Infect Dis* 9: 162-72.
- Warren, R. M., S. L. Sampson, M. Richardson, G. D. Van Der Spuy, C. J. Lombard, T. C. Victor, and P. D. van Helden. 2000.** Mapping of IS6110 flanking regions in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* demonstrates genome plasticity. *Mol Microbiol* 37: 1405-16.
- Warren, R. M., E. M. Streicher, S. L. Sampson, G. D. van der Spuy, M. Richardson, D. Nguyen, M. A. Behr, T. C. Victor, and P. D. van Helden. 2002.** Microevolution of the direct repeat region of *Mycobacterium tuberculosis*: implications for interpretation of spoligotyping data. *J Clin Microbiol* 40: 4457-65.
- Warren, R. M., M. Richardson, S. L. Sampson, G. D. van der Spuy, W. Bourn, J. H. Hauman, H. Heersma, W. Hide, N. Beyers, and P. D. van Helden. 2001.** Molecular evolution of *Mycobacterium tuberculosis*: phylogenetic reconstruction of clonal expansion. *Tuberculosis (Edinb)* 81: 291-302.
- Warren, R. M., N. C. Gey van Pittius, M. Barnard, A. Hesselning, E. Engelke, M. de Kock, M. C. Gutierrez, G. K. Chege, T. C. Victor, E. G. Hoal, and P. D. van Helden. 2006.** Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex by PCR amplification of genomic regions of difference. *Int J Tuberc Lung Dis* 10: 818-22.
- Weber, I., C. Fritz, S. Ruttkowski, A. Kreft, and F. C. Bange. 2000.** Anaerobic nitrate reductase (narGHJI) activity of *Mycobacterium bovis* BCG in vitro and its contribution to virulence in immunodeficient mice. *Mol Microbiol* 35: 1017-25.
- Wedlock, D. N., M. Denis, H. M. Vordermeier, R. G. Hewinson, and B. M. Buddle. 2007.** Vaccination of cattle with Danish and Pasteur strains of *Mycobacterium*

- bovis BCG induce different levels of IFN $\gamma$  post-vaccination, but induce similar levels of protection against bovine tuberculosis. *Vet Immunol Immunopathol* 118: 50-8.
- Whelan, A. O., D. C. Wright, M. A. Chambers, M. Singh, R. G. Hewinson, and H. M. Vordermeier. 2008.** Evidence for enhanced central memory priming by live *Mycobacterium bovis* BCG vaccine in comparison with killed BCG formulations. *Vaccine* 26: 166-73.
- WHO. 1999.** Report of the meeting of the working group on clinical trials of new TB vaccines, W.H.O. Report 1999. WHO/V&B/00.26.
- WHO. 2003.** Treatment of tuberculosis: Guidelines for National Programmes., WHO/CDS/TB/2003.313.
- WHO. 2009.** Global tuberculosis control 2009: epidemiology, strategy, financing., WHO/HTM/TB/2009.411.
- Wilkinson, R. J., M. Llewelyn, Z. Toossi, P. Patel, G. Pasvol, A. Lalvani, D. Wright, M. Latif, and R. N. Davidson. 2000.** Influence of vitamin D deficiency and vitamin D receptor polymorphisms on tuberculosis among Gujarati Asians in west London: a case-control study. *Lancet* 355: 618-21.
- Wirth, T., F. Hildebrand, C. Allix-Beguec, F. Wolbeling, T. Kubica, K. Kremer, D. van Soolingen, S. Rusch-Gerdes, C. Locht, S. Brisse, A. Meyer, P. Supply, and S. Niemann. 2008.** Origin, spread and demography of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *PLoS Pathog* 4: e1000160.
- Wolf, A. J., B. Linas, G. J. Trevejo-Nunez, E. Kincaid, T. Tamura, K. Takatsu, and J. D. Ernst. 2007.** *Mycobacterium tuberculosis* infects dendritic cells with high frequency and impairs their function in vivo. *J Immunol* 179: 2509-19.
- Wolf, A. J., L. Desvignes, B. Linas, N. Banaiee, T. Tamura, K. Takatsu, and J. D. Ernst. 2008.** Initiation of the adaptive immune response to *Mycobacterium tuberculosis* depends on antigen production in the local lymph node, not the lungs. *J Exp Med* 205: 105-15.
- Wong, K. C., W. M. Leong, H. K. Law, K. F. Ip, J. T. Lam, K. Y. Yuen, P. L. Ho, W. S. Tse, X. H. Weng, W. H. Zhang, S. Chen, and W. C. Yam. 2007.** Molecular characterization of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and their association with phenotypic virulence in human macrophages. *Clin Vaccine Immunol* 14: 1279-84.
- Wu, J. Y., S. C. Ku, C. C. Shu, J. Y. Fan, H. Y. Chen, Y. C. Chen, and C. J. Yu. 2009.** The role of chest radiography in the suspicion for and diagnosis of pulmonary tuberculosis in intensive care units. *Int J Tuberc Lung Dis* 13: 1380-6.
- Yang, Z. H., K. Ijaz, J. H. Bates, K. D. Eisenach, and M. D. Cave. 2000.** Spoligotyping and polymorphic GC-rich repetitive sequence fingerprinting of *mycobacterium tuberculosis* strains having few copies of IS6110. *J Clin Microbiol* 38: 3572-6.
- Zachariah, R., M. P. Spielmann, A. D. Harries, and F. M. Salaniponi. 2002.** Moderate to severe malnutrition in patients with tuberculosis is a risk factor associated with early death. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 96: 291-4.
- Zganiacz, A., M. Santosuosso, J. Wang, T. Yang, L. Chen, M. Anzulovic, S. Alexander, B. Gicquel, Y. Wan, J. Bramson, M. Inman, and Z. Xing. 2004.** TNF- $\alpha$  is a critical negative regulator of type 1 immune activation during intracellular bacterial infection. *J Clin Invest* 113: 401-13.
- Zhang, M., J. Gong, Z. Yang, B. Samten, M. D. Cave, and P. F. Barnes. 1999.** Enhanced capacity of a widespread strain of *Mycobacterium tuberculosis* to grow in human macrophages. *J Infect Dis* 179: 1213-7.
- Zhang, Y., R. J. Wallace, Jr., and G. H. Mazurek. 1995.** Genetic differences between BCG substrains. *Tuber Lung Dis* 76: 43-50.
- Zheng, H., L. Lu, B. Wang, S. Pu, X. Zhang, G. Zhu, W. Shi, L. Zhang, H. Wang, S. Wang, G. Zhao, and Y. Zhang. 2008.** Genetic basis of virulence attenuation revealed by comparative genomic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Ra versus H37Rv. *PLoS One* 3: e2375.

**Zink, A. R., C. Sola, U. Reischl, W. Grabner, N. Rastogi, H. Wolf, and A. G. Nerlich. 2003.** Characterization of Mycobacterium tuberculosis complex DNAs from Egyptian mummies by spoligotyping. J Clin Microbiol 41: 359-67.

## ANNEXES

### 1. Base des données cliniques des patients tuberculeux.

Ident	Foyer	Statut Clinique	AGE	Tranche Age	Sexe	Statut Marital	Scolarisé	Niv. Étude	Vaccination BCG	Marque BCG	Taille Marque BCG	Grossesse	Alcoolisme	Lien tabac	Diabétique	NUMPV TJ0
005/C/01	5	CI		30	3	2 Marié	NON	Primaire	OUI sans preuve	OUI		5 NON	NON	N'a jamais fumé	NON	02 5519
006/C/01	6	CI		36	4	2 Marié	NON	Secondai	OUI sans preuve	NON		NON	NON	N'a jamais fumé	NON	02 5522
007/C/01	7	CI		23	3	2 Divorcé	NON	Primaire	OUI sans preuve	NON		NON	NON	N'a jamais fumé	NON	02 5526
016/C/01	16	CI		39	4	1 Marié	NON	Secondai	OUI sans preuve	OUI		2 Sans obj	NON	N'a jamais fumé	NON	02 5570
017/C/01	17	CI		24	3	2 Célibata	NON	Supérieur	OUI sans preuve	OUI		11 NON	NON	N'a jamais fumé	NON	02 5584
020/C/01	20	CI		34	4	1 Marié	NON	Secondai	Ne sait	OUI		10 Sans obj	OUI	Ancien fumeur	NON	02 5275
021/C/01	21	CI		34	4	1 Marié	NON	Secondai	OUI sans preuve	OUI		15 Sans obj	NON	Ancien fumeur	NON	02 5279
024/C/01	24	CI		37	4	1 Célibata	NON	Secondai	OUI sans preuve	OUI		7 Sans obj	NON	N'a jamais fumé	NON	02 5298
025/C/01	25	CI		51	6	2 Divorcé	NON	Supérieur	OUI sans preuve	OUI		4 NON	NON	N'a jamais fumé	NON	02 5300
026/C/01	26	CI		65	7	1 Marié	NON	Supérieur	OUI sans preuve	NON		Sans obj	OUI	Ancien fumeur	NON	02 5304
027/C/01	27	CI		20	2	2 Célibata	OUI	Secondai	OUI sans preuve	NON		NON	NON	N'a jamais fumé	NON	02 5310
042/C/01	42	CI		24	3	1 Célibata	NON	Jamais s	NON	NON		Sans obj	OUI	Ancien fumeur	NON	04 4261
043/C/01	43	CI		35	4	2 Marié	NON	Secondai	OUI sans preuve	OUI		15 NON	NON	N'a jamais fumé	NON	02 5999
044/C/01	44	CI		31	4	1 Célibata	NON	Secondai	OUI sans preuve	OUI		3 Sans obj	OUI	Ancien fumeur	NON	02 5991
045/C/01	45	CI		28	3	1 Marié	NON	Primaire	OUI sans preuve	NON		Sans obj	NON	Ancien fumeur	NON	02 5977
046/C/01	46	CI		26	3	1 Marié	NON	Primaire	NON	NON		Sans obj	OUI	Ancien fumeur	NON	02 5966
047/C/01	47	CI		38	4	1 Marié	NON	Jamais s	Ne sait	NON		Sans obj	OUI	N'a jamais fumé	NON	02 5956
048/C/01	48	CI		39	4	2 Marié	NON	Primaire	OUI sans preuve	OUI		4 NON	OUI	Ancien fumeur	NON	02 5955
049/C/01	49	CI		38	4	1 Marié	NON	Secondai	Ne sait	NON		Sans obj	OUI	Fumeur a	NON	02 5938
050/C/01	50	CI		52	6	1 Divorcé	NON	Secondai	OUI sans preuve	OUI		8 Sans obj	OUI	Ancien fumeur	NON	02 5927
051/C/01	51	CI		31	4	1 Marié	NON	Secondai	OUI sans preuve	OUI		5 Sans obj	NON	N'a jamais fumé	NON	02 5924
052/C/01	52	CI		34	4	2 Marié	NON	Primaire	NON	NON		NON	NON	N'a jamais fumé	NON	02 5920
053/C/01	53	CI		54	6	1 Marié	NON	Jamais s	Ne sait	NON		Sans obj	NON	N'a jamais fumé	NON	02 5915
054/C/01	54	CI		47	5	2 Marié	NON	Secondai	OUI sans preuve	OUI		12 NON	NON	N'a jamais fumé	NON	02 5896
055/C/01	55	CI		22	3	1 Célibata	NON	Supérieur	OUI sans preuve	NON		Sans obj	OUI	N'a jamais fumé	NON	02 5891
056/C/01	56	CI		28	3	1 Marié	NON	Secondai	OUI sans preuve	OUI		5 Sans obj	NON	N'a jamais fumé	OUI	02 5886
057/C/01	57	CI		23	3	2 Célibata	NON	Secondai	OUI sans preuve	OUI		5 NON	OUI	N'a jamais fumé	NON	02 5881
058/C/01	58	CI		31	4	1 Marié	NON	Secondai	OUI sans preuve	NON		Sans obj	NON	N'a jamais fumé	NON	02 5874
059/C/01	59	CI		45	5	1 Marié	NON	Secondai	Ne sait	NON		Sans obj	OUI	Fumeur a	NON	02 5864
061/C/01	61	CI		38	4	1 Marié	NON	Secondai	Ne sait	NON		Sans obj	OUI	Fumeur a	NON	02 5787
062/C/01	62	CI		19	2	2 Célibata	NON	Secondai	OUI sans preuve	NON		NON	NON	N'a jamais fumé	NON	02 5778
063/C/01	63	CI		38	4	1 Marié	NON	Secondai	OUI sans preuve	NON		Sans obj	NON	N'a jamais fumé	NON	02 5772
064/C/01	64	CI		47	5	2 Divorcé	NON	Supérieur	OUI sans preuve	OUI		8 NON	NON	N'a jamais fumé	NON	02 5753
066/C/01	66	CI		31	4	1 Marié	NON	Primaire	OUI sans preuve	OUI		5 Sans obj	OUI	N'a jamais fumé	NON	02 5738
067/C/01	67	CI		28	3	2 Divorcé	NON	Secondai	NON	NON		NON	NON	N'a jamais fumé	NON	02 5734
072/C/01	72	CI		38	4	2 Marié	NON	Secondai	OUI sans preuve	OUI		15 NON	OUI	Ancien fumeur	NON	02 5427
073/C/01	73	CI		23	3	1 Célibata	NON	Secondai	Ne sait	NON		Sans obj	NON	Ancien fumeur	NON	02 5429
075/C/01	75	CI		49	5	1 Marié	NON	Secondai	OUI sans preuve	OUI		10 Sans obj	OUI	N'a jamais fumé	NON	02 5412
077/C/01	77	CI		28	3	1 Célibata	NON	Primaire	OUI sans preuve	OUI		5 Sans obj	NON	N'a jamais fumé	NON	02 5386
078/C/01	78	CI		23	3	2 Célibata	NON	Secondai	OUI sans preuve	OUI		5 NON	OUI	N'a jamais fumé	NON	02 5382
079/C/01	79	CI		30	3	1 Marié	NON	Primaire	NON	NON		Sans obj	OUI	Fumeur a	NON	02 5241
080/C/01	80	CI		33	4	1 Marié	NON	Secondai	OUI sans preuve	OUI		12 Sans obj	OUI	N'a jamais fumé	NON	02 5239
081/C/01	81	CI		20	2	2 Marié	NON	Secondai	OUI sans preuve	NON		NON	OUI	N'a jamais fumé	NON	02 5235
082/C/01	82	CI		70	7	1 Marié	NON	Secondai	OUI sans preuve	OUI		10 Sans obj	NON	N'a jamais fumé	NON	02 5234
083/C/01	83	CI		22	3	2 Célibata	OUI	Supérieur	OUI sans preuve	OUI		3 NON	NON	N'a jamais fumé	NON	02 5237
084/C/01	84	CI		54	6	2 Marié	NON	Secondai	Ne sait	NON		NON	OUI	N'a jamais fumé	NON	02 5216
085/C/01	85	CI		35	4	1 Marié	NON	Jamais s	NON	NON		Sans obj	OUI	N'a jamais fumé	NON	02 5206
086/C/01	86	CI		17	2	2 Célibata	OUI	Secondai	OUI sans preuve	NON		NON	NON	N'a jamais fumé	NON	02 5202
087/C/01	87	CI		35	4	2 Marié	NON	Primaire	OUI sans preuve	OUI		3 NON	OUI	N'a jamais fumé	NON	02 5094
088/C/01	88	CI		47	5	1 Marié	NON	Secondai	Ne sait	NON		Sans obj	OUI	Ancien fumeur	NON	02 5085
091/C/01	91	CI		48	5	2 Marié	NON	Secondai	OUI sans preuve	NON		NON	NON	N'a jamais fumé	NON	02 5070
093/C/01	93	CI		34	4	1 Marié	NON	Secondai	OUI sans preuve	OUI		10 Sans obj	NON	N'a jamais fumé	NON	02 5065
094/C/01	94	CI		25	3	2 Marié	NON	Secondai	OUI sans preuve	OUI		4 NON	NON	N'a jamais fumé	NON	02 5064
095/C/01	95	CI		40	4	2 Marié	NON	Supérieur	OUI sans preuve	OUI		12 NON	NON	N'a jamais fumé	OUI	02 5060
096/C/01	96	CI		55	6	1 Marié	NON	Secondai	OUI sans preuve	OUI		10 Sans obj	NON	Ancien fumeur	NON	02 5254

## 2. Données cliniques des patients tuberculeux (résultats II).

Souches	AGE	SEXE	CAS	FORME	NATURE	SITE CLINIQUE	ED	CULT	IDENT	SM	INH	RIF	EMB
04.254	4	F	INC	EP	LIQUIDE PLEURAL	TB PLEURALE	0	1	TB				
97.3339	7	F	ENFANT	P	TUBAGE GASTRIQUE	POUMON	0	1	TB	S	S	S	S
05.685	17	M	NV	EP	PUS	DIVERS	0	15	TB	S	S	S	S
04.195	18	M	INC	EP	PUS	DIVERS	2+	100	TB				
04.398	21	F	INC	EP	PUS	DIVERS	1+	16	TB				
04.1386	23	M	NV	P	CRACHAT	POUMON	3+	300	TB				
05.8	24	F	NV	P	CRACHAT	POUMON	2+	200	TB	S	S	S	S
05.1029	27	F	NV	P	CRACHAT	POUMON	0	100	TB	S	S	S	S
05.398	27	M	INC	EP	PUS	DIVERS	2+	200	TB				
00.2910	31	F	INC	EP	URINES	URINES	1+	100	TB				
05.24	34	M	NV	P	CRACHAT	POUMON	3+	300	TB				
05.384	34	F	NV	P	CRACHAT	POUMON	2+	100	TB	S	S	S	S
99.331	39	F	C2	P	CRACHAT	POUMON	2+	1	TB	S	S	S	S
96.4052	47	F	INC	P	SOUCHES	POUMON							
01.1833	51	M	EC	P	CRACHAT	POUMON	2+	100	TB				
05.1061	65	M	NV	P	CRACHAT	POUMON	2+	200	TB	S	S	S	S
03.446	67	F	INC	EP	URINES	URINES	0	5	TB				
00.2737	74	M	RC	P	CRACHAT	POUMON	3+	300	TB				
96.227			INC	P	SOUCHES	POUMON							
04.2278	18	M	INC	EP	PUS	DIVERS	3+	18					
05.641	20	F	NV	P	CRACHAT	POUMON	3+	200	TB	S	S	S	S
04.1498	43	F	NV	P	CRACHAT	POUMON	3+	300	BO				
04.2090	57	F	NV	P	CRACHAT	POUMON	2+	200	TB				
03.703		M	EC	P	CRACHAT	POUMON	2+	200	BO	R	R	R	R
94.392			NV	P	CRACHAT	POUMON	2+	999	BO	S	S	S	S
94.97		F	INC	P	CRACHAT	POUMON	2+	2+	BO	S	S	S	S
04.1572	0	F	INC	EP	LIQUIDE PLEURAL	TB PLEURALE	0	100	TB				

98.2957	9	M	INC	EP	BIOPSIE PLEURALE	TB PLEURALE	0	100	TB	S	S	S	S
03.317	12	M	INC	EP	PUS	DIVERS	0	300	TB				
02.1567	20	M	RC	P	CRACHAT	POUMON	3+	300	TB	R	R	R	S
03.2060	21	M	EC	P	CRACHAT	POUMON	3+	200	TB	R	R	R	R
05.1725	28	M	NV	P	CRACHAT	POUMON	2+	300	TB	S	S	S	S
99.589	28	M	INC	EP	PUS	DIVERS	1+	200	TB				
05.1659	37	M	NV	P	CRACHAT	POUMON	1+	10	TB				
05.1408	38	M	NV	P	CRACHAT	POUMON	1+	50	TB	S	S	S	S
05.1069	46	F	NV	P	CRACHAT	POUMON	1+	200	TB				
05.1496	51	M	NV	P	CRACHAT	POUMON	4+	300	TB				
04.2240		M	NV	P	CRACHAT	POUMON	4+	300	TB	S	S	S	S
98.3537	0,5	M	ENFANT	P	TUBAGE GASTRIQUE	POUMON	0	1	TB	S	S	S	S
05.1474	1	M	NV	EP	PUS	DIVERS	0	1	TB	S	S	S	S
00.411	4	M	INC	EP	LIQUIDE PLEURAL	TB PLEURALE	0	1	TB	S	S	S	S
99.2102	5	F	INC	P	TUBAGE GASTRIQUE	POUMON	0	1	TB	S	S	S	S
04.289	12	F	INC	EP	PUS	DIVERS	0	20	TB				
03.495	14	M	INC	EP	LIQUIDE PLEURAL	TB PLEURALE	0	100	AT				
01.293	19	F	RP	P	CRACHAT	POUMON	2+	200	TB				
05.452	19	F	NV	P	CRACHAT	POUMON	3+	200	TB	S	S	S	S
04.1817/04.1818	20	F	NV	P	CRACHAT	POUMON	3+	300	TB	S	S	S	S
05.1414	22	M	NV	P	CRACHAT	POUMON	3+	300	TB	S	S	S	S
05.821	22	M	NV	P	CRACHAT	POUMON	4+	300	TB	S	S	S	S
99.17	22	F	C2	P	CRACHAT	POUMON	2+	50	TB				
99.1859	23	F	INC	EP	PUS	DIVERS	0	100	TB				
04.1074	25	M	INC	EP	LIQUIDE PLEURAL	TB PLEURALE	0	11	TB				
04.1425	27	F	NV	P	CRACHAT	POUMON	2+	300	TB	S	S	S	S
99.2606	27	F	INC	EP	LIQUIDE PLEURAL	TB PLEURALE	0	1	TB				
04.1570	29	F	NV	P	CRACHAT	POUMON	3+	200	TB	S	S	S	S
04.1789	31	M	NV	P	CRACHAT	POUMON	4+	200	TB				
05.645	21	F	NV	P	CRACHAT	POUMON	3+	200	TB	S	S	S	S
01.823	32	F	INC	EP	URINES	URINES	0	45	TB				

02.2474	32	M	INC	P	CRACHAT	POUMON	4+	100	TB	R	R	R	R
05.783	34	F	NV	P	CRACHAT	POUMON	3+	300	TB				
00.4047	35	F	RC	P	CRACHAT	POUMON	4+	300	TB	S	S	S	S
01.1966	36	M	INC	EP	URINES	URINES	2+	100	TB				
99.4244	41	M	INC	P	CRACHAT	POUMON	1+	100	BO	S	S	S	S
00.2104	48	F	RP	P	CRACHAT	POUMON	2+	1	TB	R	R	R	R
04.1618	53	F	INC	P	CRACHAT	POUMON	0						
05.495	54	F	NV	P	CRACHAT	POUMON	1+	10	TB	S	S	S	S
02.2093	55	M	RC	P	CRACHAT	POUMON	4+	300	TB	S	R	R	S
05.229	64	M	NV	P	CRACHAT	POUMON	4+	300	TB				
00.3594	66	F	EC	P	CRACHAT	POUMON	3+	1	TB	R	R	R	R
01.1747	77	M	INC	EP	LCR	MENINGITE	0	1	TB				
01.639			INC	EP	LIQUIDE PLEURAL	TB PLEURALE	0	1	TB				
96.416		M	EC	P	CRACHAT	POUMON		300	TB	S	R	R	S
05.765	3	F	INC	EP	GANGLION	GANGLION	0	3	TB				
99.4605	9	F	INC	P	TUBAGE GASTRIQUE	POUMON	0	24	TB	S	S	S	S
00.5307	13	M	INC	EP	ABCES POTTIQUE	POTT	1+	200	TB	S	S	S	S
01.1174	20	M	RC	P	CRACHAT	POUMON	3+	200	TB	S	S	S	S
04.1311	6	M	INC	EP	PUS	DIVERS	0	4	TB				
99.568	31	M	INC	EP	BIOPSIE PLEURALE	TB PLEURALE	0	100	TB				
05.624	32	M	NV	P	CRACHAT	POUMON	4+	300	TB	R	R	R	R
05.1484	34	F	NV	P	CRACHAT	POUMON	2+	300	TB	S	S	S	S
05.69	48	F	NV	P	CRACHAT	POUMON	3+	300	TB	S	S	S	S
05.740	48	M	NV	P	CRACHAT	POUMON	4+	400	TB	S	S	S	S
05.1489	54	M	INC	P	CRACHAT	POUMON	0						
04.2575	65	M	INC	EP	ASCITE	PERITONEALE	0	1	TB				
99.4376	8	F	INC	EP	PUS	DIVERS	0	1	TB	S	S	S	S
04.1518	18	F	NV	P	CRACHAT	POUMON	4+	200	TB				
04.2682	21	M	NV	P	CRACHAT	POUMON	4+	300	TB	S	S	S	S
05.44	25	F	NV	P	CRACHAT	POUMON	3+	200	TB				
05.1721	26	M	NV	P	CRACHAT	POUMON	4+	300	TB	S	S	S	S



05.1017	29	F	NV	P	CRACHAT	POUMON	4+	200	TB	S	S	S	S
99.495	29	F	C2	P	CRACHAT	POUMON	2+	4	TB	S	S	S	S
04.171	32	F	INC	EP	LIQUIDE PLEURAL	TB PLEURALE	0	100	TB				
04.1687	36	F	NV	P	CRACHAT	POUMON	3+	300	TB	S	S	S	S
04.1581	37	F	NV	P	CRACHAT	POUMON	3+	300	TB	S	S	S	S
05.152	37	M	NV	P	CRACHAT	POUMON	2+	100	TB	S	S	S	S
05.813	37	F	NV	P	CRACHAT	POUMON	3+	300	TB	S	S	S	S
05.1657	38	F	NV	P	CRACHAT	POUMON	1+	100	TB				
05.1760	38	M	NV	P	CRACHAT	POUMON	3+	300	TB	S	S	S	S
05.463	38	M	INC	EP	PUS	DIVERS	0	50	TB				
04.2049	41	M	NV	P	CRACHAT	POUMON	2+	100	TB	S	S	S	S
05.1270	44	M	NV	P	CRACHAT	POUMON	4+	200	TB	S	R	S	S
05.1470	53	M	NV	P	CRACHAT	POUMON	3+	200	TB				
02.2408	54	F	INC	EP	URINES	URINES	0	24	TB				
01.3128	59	F	INC	EP	PUS	DIVERS	2+	100	TB				
99.4390	59	F	INC	EP	URINES	URINES	3+	300	TB				
05.1181	37	M	NV	P	CRACHAT	POUMON	3+	300	TB				
05.146	24	F	NV	P	CRACHAT	POUMON	2+	300	TB	S	S	S	S
00.4838	47	F	INC	EP	PUS	DIVERS	2+	100	TB				
05.164	47	M	NV	P	CRACHAT	POUMON	3+	200	TB	S	S	S	S
02.2138	57	M	INC	EP	PUS	DIVERS	1+	100	TB				
05.1159	37	M	NV	P	CRACHAT	POUMON	4+	200	TB	S	S	S	S
05.1462	4	M	INC	EP	LIQ EPANCHEMT GENOU	GENOU	0	8	TB	S	S	S	S
02.1858	48	F	INC	EP	PUS CUTANE	CUTANE	0	15	TB				
99.143	5	F	INC	EP	PUS	DIVERS	0	15	TB	S	S	S	S
02.2002		F	INC	EP	LCR	MENINGITE	0	5	TB				
00.4938	7	M	INC	EP	LCR	MENINGITE	0	6	TB	S	S	S	S
03.1429	10	M	NV	EP	GANGLION	GANGLION	0	9	TB	S	S	S	S
00.795	11	M	INC	P	CRACHAT	POUMON	2+	300	TB	S	S	S	S
02.2167		F	INC	EP	LCR	MENINGITE	0	6	TB				
04.1946	15	F	INC	EP	LCR	MENINGITE	0	100	TB				

04.1967	16	F	NV	P	CRACHAT	POUMON	4+	300	TB	S	S	S	S
05.111	16	M	NV	P	CRACHAT	POUMON	2+	40	TB	S	S	S	S
99.233	16	M	INC	EP	BIOPSIE OSSEUSE	TB OSSEUSE	0	100	TB				
05.445	17	F	NV	P	CRACHAT	POUMON	2+	50	TB	S	S	S	S
04.1340	18	F	NV	P	CRACHAT	POUMON	4+	300	TB				
05.1164	18	F	NV	P	CRACHAT	POUMON	3+	200	TB	S	S	S	S
01.1905	21	F	RP	P	CRACHAT	POUMON	3+	300	TB	S	S	S	S
03.1731	11	M	NV	EP	PUS	DIVERS	0	50	TB	S	S	S	S
05.1390	22	F	NV	P	CRACHAT	POUMON	2+	200	TB	S	S	S	S
03.43	23	F	RC	P	CRACHAT	POUMON	4+	100	TB	S	S	S	S
04.1694	23	F	NV	P	CRACHAT	POUMON	3+	200	TB	S	S	S	S
04.2435	23	F	NV	P	CRACHAT	POUMON	3+	300	TB				
05.676	23	F	NV	P	CRACHAT	POUMON	2+	200	TB	S	S	S	S
01.1864	24	M	RC	P	CRACHAT	POUMON	3+	300	TB	S	S	S	S
04.130	25	F	INC	EP	URINES	URINES	0	3	TB				
04.2043	25	F	NV	P	CRACHAT	POUMON	3+	200	TB	S	S	S	S
05.679	27	M	NV	P	CRACHAT	POUMON	4+	300	TB	S	S	S	S
00.901	30	M	INC	EP	LCR	MENINGITE	0	3	TB				
04.2554	30	M	NV	P	CRACHAT	POUMON	4+	300	TB	S	S	S	S
05.1025	30	M	NV	P	CRACHAT	POUMON	3+	300	TB	S	S	S	S
05.1354	30	M	NV	P	CRACHAT	POUMON	2+	200	TB	S	S	S	S
05.1494	30	M	NV	P	CRACHAT	POUMON	3+	28	TB				
05.634	30	M	NV	P	CRACHAT	POUMON	3+	200	TB	S	S	S	S
04.1580	31	M	NV	P	CRACHAT	POUMON	4+	200	TB				
99.3559	31	M	INC	EP	PUS	DIVERS	0	100	TB				
05.707	32	M	NV	P	CRACHAT	POUMON	2+	200	TB	S	S	S	S
05.21	33	M	NV	P	CRACHAT	POUMON	4+	300	TB	S	S	S	S
02.2582	34	M	INC	EP	LIQUIDE PLEURAL	TB PLEURALE	0	4	TB				
05.473	35	M	NV	P	CRACHAT	POUMON	3+	200	TB	S	S	S	S
05.1172	36	F	NV	P	CRACHAT	POUMON	3+	300	TB	S	S	S	S
04.1790	37	M	NV	P	CRACHAT	POUMON	4+	200	TB				

04.1357	38	F	NV	P	CRACHAT	POUMON	3+	300	TB	S	S	S	S
05.699	40	F	INC	EP	BIOPSIE OSSEUSE	TB OSSEUSE	0	23	TB	S	S	S	S
01.2245	43	M	INC	EP	PUS	DIVERS	3+	400	TB	R	R	R	R
05.915	43	M	NV	P	CRACHAT	POUMON	4+	300	TB	S	S	S	S
04.1856	45	F	NV	P	CRACHAT	POUMON	4+	400	TB	S	S	S	S
05.1516	46	F	RC	P	CRACHAT	POUMON	2+	300	TB	S	S	S	S
01.607	47	F	RC	P	CRACHAT	POUMON	4+	300	TB	S	S	S	S
05.1416	47	F	NV	P	CRACHAT	POUMON	4+	300	TB	S	S	S	S
96.4133	31	M	EC	P	CRACHAT	POUMON	1	100	TB	R	R	R	S
05.141	48	M	NV	P	CRACHAT	POUMON	4+	300	TB				
05.183	50	F	NV	P	CRACHAT	POUMON	4+	300	TB				
04.2637	55	M	NV	P	CRACHAT	POUMON	4+	300	TB				
02.2261	59	F	INC	EP	LIQUIDE PLEURAL	TB PLEURALE	0	35	TB				
00.3759	65	F	C2	P	CRACHAT	POUMON	1+	5	TB	S	S	S	S
05.618	67	M	NV	P	CRACHAT	POUMON	4+	300	TB				
99.1667	4	M	INC	EP	PUS	ADP CERVICAL	1+	35	TB	S	S	S	S
99.1897	2	M	ENFANT	EP	LCR	MENINGITE	0	1	TB	S	S	S	S
94.59			INC	EP									
00.4405	26	M	INC	EP	PUS GANGLIONNAIRE	GANGLION	1+	200	TB				
99.4914	5	F	INC	EP	PUS	DIVERS	0	1	TB	S	S	S	S
03.1460	8	M	INC	EP	PONCTION	DIVERS	0	50	TB				
03.1672	24	F	INC	EP	URINES	URINES	0	200	TB				
00.4655	32	M	INC	EP	URINES	URINES	0	200	TB				
00.3242	37	M	RP	P	CRACHAT	POUMON	1+	300	TB	S	S	S	S
05.914	42	M	NV	P	CRACHAT	POUMON	3+	300	TB	S	S	S	S
05.63	43	M	NV	P	CRACHAT	POUMON	3+	200	TB	S	S	S	S
03.1615	52	M	INC	EP	LIQUIDE PLEURAL	TB PLEURALE	0	6	TB				
99.819	21	F	C2	P	CRACHAT	POUMON	3+	4	TB	S	S	S	S
99.625	27	F	INC	EP	BIOPSIE PLEURALE	TB PLEURALE	0	1	TB				
05.11	34	M	NV	P	CRACHAT	POUMON	3+	200	TB				
04.2647	40	F	NV	P	CRACHAT	POUMON	3+	300	TB	S	S	S	S

183

#### **4. Résultats des antibiogrammes réalisés sur les souches cliniques.**

Antibiotiques utilisés	Resistants	Sensibles
Strept	8,8% (9)	91,2% (93)
INH	11,8% (12)	88,2% (90)
RIF	10,8% (11)	89,2% (91)
EMB	6,9% (7)	93,1% (95)
MDR (INH/RIF)	10,8% (11)	88,2% (90)

Strept= Streptomycine, INH = isoniazide, RIF= rifampicine, EMB= Ethambutol, MDR= souches multi-résistantes

#### **5. Article sur les variations de l'IFN $\gamma$ en fonction de la diversité des souches à Antananarivo Madagascar**

# Variation in Gamma Interferon Responses to Different Infecting Strains of *Mycobacterium tuberculosis* in Acid-Fast Bacillus Smear-Positive Patients and Household Contacts in Antananarivo, Madagascar<sup>¶</sup>

Niaina Rakotosamimanana,<sup>1</sup> Vaomalala Rahanimanga,<sup>2</sup> Soa Py Andriamandimby,<sup>2</sup> Jean-Louis Soares,<sup>2</sup> T. Mark Doherty,<sup>3</sup> Maberisoa Ratsitorahina,<sup>2</sup> Herimanana Ramarokoto,<sup>4,5</sup> Alimuddin Zomla,<sup>5</sup> Jim Hoggart,<sup>5</sup> Graham Rook,<sup>5</sup> Vincent Richard,<sup>2</sup> Brigitte Gicquel,<sup>6</sup> Voahangy Rasolofo-Razanamparany,<sup>1\*</sup> and the VACSEL/VACSIS Study Group

<sup>1</sup>Unité des Mycobactéries, Institut Pasteur de Madagascar, BP 1274, Antananarivo, Madagascar<sup>¶</sup>; <sup>2</sup>Unité d'Épidémiologie, Institut Pasteur de Madagascar, Antananarivo, Madagascar<sup>¶</sup>; <sup>3</sup>Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark<sup>¶</sup>; <sup>4</sup>Laboratoire National des Mycobactéries, Ministry of Health, Antananarivo, Madagascar<sup>¶</sup>; <sup>5</sup>University College London, United Kingdom<sup>¶</sup>; and <sup>6</sup>Unité de Génétique Mycobactérienne, Institut Pasteur, Paris, France<sup>¶</sup>

Received 30 January 2010/Returned for modification 5 March 2010/Accepted 4 May 2010

The majority of healthy individuals exposed to *Mycobacterium tuberculosis* will not develop tuberculosis (TB), though many may become latently infected. More precise measurement of the human immune response to *M. tuberculosis* infection may help us understand this difference and potentially identify those subjects most at risk of developing active disease. Gamma interferon (IFN- $\gamma$ ) production has been widely used as a proxy marker to study infection and to examine the human immune response to specific *M. tuberculosis* antigens. It has been suggested that genetically distinct *M. tuberculosis* strains may invoke different immune responses, although how these differences influence the immune responses and clinical outcome in human tuberculosis is still poorly understood. We therefore evaluated the antigen-specific IFN- $\gamma$  production responses in peripheral blood mononuclear cells from two cohorts of subjects recruited in Antananarivo, Madagascar, from 2004 to 2006 and examined the influence of the infecting *M. tuberculosis* strains on this response. The cohorts were sputum-positive index cases and their household contacts. Clinical strains isolated from the TB patients were typed by spoligotyping. Comparison of the IFN- $\gamma$  responses with the spoligotype of the infecting clinical strains showed that "modern" *M. tuberculosis* strains, like Beijing and Central Asian (CAS) strains, tended to induce lower IFN- $\gamma$  responses than "ancient" strains, like East African-Indian (EAI) strains, in index cases and their household contacts. These results suggest that new strains may have evolved to induce a host response different from that of ancient strains. These findings could have important implications in the development of therapeutic and diagnostic strategies.

Tuberculosis (TB), caused by *Mycobacterium tuberculosis*, is a major cause of global morbidity and mortality throughout the world. It is estimated that there are in excess of new 8 million cases of TB each year, and this represents just the tip of the iceberg. Infection with *M. tuberculosis* leads to clinically active TB in about 5 to 10% of exposed individuals. A much higher proportion of exposed individuals apparently become latently infected, and these individuals may remain noninfectious and symptom free for years. Approximately one-third of the world population is thought to be latently infected with *M. tuberculosis*. However, under some circumstances (in about 5% of the latently infected people), the host immune response is perturbed and latent *M. tuberculosis* infection may develop into clinically active TB (52). This process is most prominent in individuals coinfecting with human immunodeficiency virus

(HIV), but it can also occur with impairment of the immune system associated with old age, malnutrition, anti-inflammatory drug treatment, etc. Reactivation of latent disease is thought to contribute roughly half of all TB cases, and thus, understanding the factors controlling the development of acute primary TB or latent infection is crucial to TB control (64).

Gamma interferon (IFN- $\gamma$ ) production has been widely used to study infection and to examine the human immune response to specific *M. tuberculosis* antigens. The 6-kDa early secreted antigenic target (ESAT-6) antigen, encoded by genes located within region of difference 1 (RD1) of the *M. tuberculosis* genome, is much more specific for *M. tuberculosis* than purified protein derivative (PPD), as these genes were deleted from *M. bovis* in the development of BCG substrains or are not found in most environmental mycobacteria (29, 53). Some studies showed that the level of IFN- $\gamma$  release in response to ESAT-6 could identify TB contacts at risk of developing active disease after recent infection (3, 18, 50). CFP7 or TB10.4 is an immunodominant antigen recognized by TB patients and *M. bovis* BCG-vaccinated subjects, while ESAT-6 is specific to TB pa-

\* Corresponding author. Mailing address: Unité des Mycobactéries, Institut Pasteur de Madagascar, Antananarivo, BP 1274, Antananarivo 101, Madagascar. Phone: 261 20 22 401 64; Fax: 261 20 22 415 34; E-mail: vranak@pasteur.mg.

<sup>¶</sup> Published ahead of print on 12 May 2010.

tients and induces a strong IFN- $\gamma$  response (51). Moreover, since CFP7 induces strong protection against infection by *M. tuberculosis*, it was proposed to be a TB vaccine candidate (1, 19).

There is a growing number of observations indicating that TB cases resulting from infection with epidemic strains, such as the W-Beijing strains (22, 35, 39, 44), may display a more severe pathology or more severe symptoms. Beijing strains were also found to induce higher levels in pulmonary TB patients than other strains (62). In addition, the Beijing genotype, which is responsible for more than 80% of TB cases in China, was associated with virulence and high transmissibility (7, 28). The same has been found more recently with the RDV10 strains belonging to the Latin America-Mediterranean (LAM) family (38). Despite the fact that other epidemiological and clinical studies have failed to confirm any association between the mycobacterial genotype and the clinical presentation (8, 41, 43), the immunological aspects of infection with these strains is still of interest and poorly described.

Epidemiological studies carried out in Madagascar showed no association between *IS6110* patterns and clinical tuberculosis presentation (47), but they did reveal a heterogeneous population of *M. tuberculosis* strains, including the existence of a high frequency of unusual genotypes, such as the shared type 109 from the EAI8-MDG family (SpolDB4) (10) or strains with a single copy of *IS6110* (24, 46). Since there are limited data on the correlation of the strain genotype with clinical features or the host immune response in patients and their contacts (57, 59), we investigated the IFN- $\gamma$  response to the ESAT-6, CFP7, and PPD antigens in pulmonary TB patients and their household contacts (as this is commonly used as a biomarker to identify *M. tuberculosis* infection) and examined the influence of the *M. tuberculosis* genotype on this response.

#### MATERIALS AND METHODS

**Study site and subjects.** Newly recruited sputum-positive TB patients (infect cases [IC]) over 15 years of age were recruited between June 2004 and December 2005 at the principal antituberculosis center of Antananarivo, the capital of Madagascar, where the annual incidence of newly diagnosed sputum smear-positive patients is about 80 cases per 100,000 inhabitants. Positivity was defined as two sputum samples positive by microscopy and confirmed by culture on Löwenstein-Jensen (LJ) medium. The patients were treated according to the National TB Control Programme (NCTCP) strategy and were followed up by the clinical physician; sputum samples were collected 2, 5, and 7 months after the start of treatment.

The household contacts (HC) of the included infect cases were visited at home by the study physician and were invited to join the study. They were included if they were  $\geq 1$  year old and had been living in the same house as the case patient for at least 6 months.

The subjects were invited by the study physician to give informed consent, interviewed, and examined. Only subjects who accepted an HIV test, after counseling, and who had given informed consent were included in the study. A venous blood sample was drawn into a Vacutainer tube containing heparin for cryopreserved interferon- $\gamma$  (ELISPOT) assay and into a dry Vacutainer tube for anti-HIV test. HIV-positive subjects were excluded from the study.

Household contacts and community controls underwent a PPD skin test (10 units; tuberculin purified protein derivative; Aventis Pasteur). Infection was recorded after 72 h. Subjects with a positive PPD test result of  $>14$  mm of induration at the time of inclusion in the study or for which conversion of the PPD test occurred during follow-up were offered chest radiography, and those with symptoms underwent a clinical examination. Individuals with a diagnosis of TB disease were referred to the antituberculosis center for treatment.

For all subjects, epidemiological, clinical, and bacteriological data were recorded prospectively on individual record forms.

The study was approved by the National Ethics Committee of the Ministry of Health in Madagascar.

**Mycobacteriology procedures.** Sputum was decontaminated using the sodium laurylsulfate method (55). One drop of the decontaminated sputum was fixed on a slide, stained with auramine-phenol, and examined under a fluorescence microscope (objective,  $\times 40$ ) for acid-fast bacilli (AFB). The remaining decontaminated specimen was inoculated into two tubes of standard LJ medium (Diagnostic Pasteur, Paris, France) and on two tubes of LJ medium without glycerol but supplemented with 0.5% pyrazinamide. The numbers of CFU growing in each LJ tube were counted. Mycobacterial isolates were identified according to growth on LJ medium, colony morphology, and biochemical tests for the following: nitrate production, catalase, urease, and nitrite reductase (23). The *M. tuberculosis* isolates were tested for their susceptibility to streptomycin (4  $\mu$ g/ml; catalog no. D-5355; Sigma), isoniazid (0.2  $\mu$ g/ml; catalog no. 11777; Sigma), rifampin (40  $\mu$ g/ml; catalog no. R-8520; Sigma), and ethambutol (2  $\mu$ g/ml; catalog no. E-803; Sigma) using the proportion method on Löwenstein-Jensen medium, as recommended by the Global Tuberculosis Programme of the World Health Organization and the International Union against Tuberculosis and Lung Disease (11). The critical proportion value was 1/5 for all drugs.

**Spolotyping.** Genomic DNA was extracted from the *M. tuberculosis* cultures as described by van Soolingen et al. (65). Spolotyping of the *M. tuberculosis* isolates was performed as described by Kamerling et al. (34). A cluster of *M. tuberculosis* strains was defined as two or more isolates with identical spoligotypes. A cluster of patients was defined as two or more patients with identical strains. The spoligotype and spoligotype family designation were attributed by comparing the patterns with those from the SITVIT database (<http://www.genome.gov/ncbi/ncbi/SITVIT.html>) and from the SpolDB4 international spoligotype database (10).

**ELISPOT assay.** Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were separated from heparinized whole blood as described previously (20) within the 4 h following blood collection. Briefly, PBMCs were enriched by centrifugation over Ficoll-Hypaque (catalog no. 148696; Sigma). The PBMCs were then washed with complete RPMI 1640 medium (catalog no. 11630025; Gibco) containing 1%  $\alpha$ -glutamine and 1% penicillin-streptomycin. Viable cells were counted after staining of the PBMCs with trypan blue and diluted to  $2 \times 10^6$  viable cells/ml in RPMI medium (complete RPMI 1640 medium supplemented with 5% heat-inactivated fetal bovine serum [catalog no. 16050-044; Invitrogen, Gibco]), and  $100 \mu$ l ( $2 \times 10^6$  cells) per well was used for the ELISPOT assay.

The *ex vivo* ELISPOT assay was performed with fresh samples, as described elsewhere (36), using mouse anti-human IFN- $\gamma$  (ID1K; catalog no. 3420-3-200; Mabtech). For this study, PPD (Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark) was used at 5  $\mu$ g/ml. We tested each of the recombinant antigens ESAT-6 and CFP7 (Statens Serum Institute) at a concentration of 10  $\mu$ g/ml, on the basis of the optimal responsiveness observed in prior stimulation studies. Phycoerythrin-labeled anti-mouse IgG (1:250; catalog no. 1-2704; Sigma) was used as a positive control, and RPMI 1640 medium was used as a negative control. Briefly, 96-well plates (catalog no. MAIP 54510; Millipore) were coated with 0.5  $\mu$ g/well of the anti-human IFN- $\gamma$  (anti-IFN- $\gamma$ ) ID1K antibody in carbonate buffer (pH 9.6) overnight at 4 to 8°C. The plates were washed the next morning in phosphate-buffered saline (PBS) and blocked with RPMI medium. The antigens at various concentrations were placed in the coated wells, together with  $2 \times 10^6$  PBMCs per well. After approximately 16 h of incubation at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>, the wells were washed in PBS-0.05% Tween 20, and 50  $\mu$ g biotinylated anti-IFN- $\gamma$  monoclonal antibody (7-B6-1; catalog no. 3420-4-20; Mabtech) in PBS-1% BSA was added to each well. The plates were incubated for 4 h at room temperature, washed, and incubated with streptavidin-alkaline phosphatase conjugate (catalog no. 17065-02; Bio-Rad) diluted 1:1,000 in PBS-0.05% Tween 20 for 1 h at 37°C. Between steps, the plates were washed five times in PBS-0.05% Tween 20. The spots were developed by addition of alkaline phosphatase substrate (catalog no. 170-6402; Bio-Rad), and the reactions were stopped by extensively washing the plates with tap water. The spots in each well were counted by two independent readers using a dissecting microscope. The mean number of spot-forming cells (SFCs) per well for each antigen was calculated. The difference between duplicate wells was consistently less than 20% of the mean. The mean number of SFCs of the negative control was subtracted and transformed to the number of SFCs per  $2 \times 10^6$  cells. The cutoff point for positivity was taken as the mean response of unstimulated wells for the whole cohort plus 1.64 standard deviations.

Data management and statistical analysis. Data were entered into Access or Excel databases and checked for error. Analyses were performed using Statistica software or the EpiInfo (version 6) program. Comparisons were assessed by the Kruskal-Wallis test or the Mann-Whitney U test. A *P* value of  $<0.05$  was considered statistically significant.



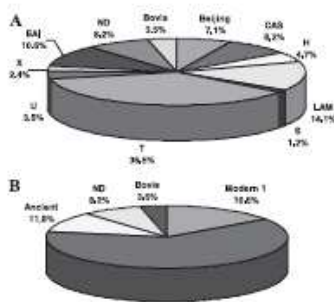


FIG. 1. Distribution of the spoligotype families found among the *M. tuberculosis* strains isolated from the index cases. (A) Spoligotype family according to data in the SpolDB4 database (CAS, Central Asian; EAI, East African-Indian; LAM, Latin American-Mediterranean; H, Haarlem; T, undefined family) (10); ND, not described in SpolDB4 database. (B) Groups according to Arnold (5).

## RESULTS

**Study participants.** From 15 June 2004 to December 2005, 85 ICs and 293 HC were recruited and were followed up until December 2006. All subjects were Malagasy and HIV negative.

*M. tuberculosis* isolates from 81 ICs were typed by spoligotyping. On the basis of the SITVIT guidelines (<http://www.pasteur-guadeloupe.8081/SITVITdemo>) and the data in the SpolDB4 database (10), the spoligotypes could be classified into 10 families (Fig. 1A). The strain distribution was similar to that described in a previous study (24). Then, for the analysis, we considered the phylogeny described elsewhere (5, 9), where the *M. tuberculosis* strains were divided into an "ancient" strain group (spoligotypes of the East African-Indian [EAI] family) and a "modern" strain group, with modern group 1 including the Beijing and Central Asian (CAS) families and modern group 2 containing the T (undefined family), Haarlem, LAM, U, X, and S families (Fig. 1B).

**Follow-up.** Of the ICs, three patients died: one during the course of treatment and two after relapse. Six patients interrupted TB treatment, one patient relapsed, and one patient failed after 5 months of therapy; all of them returned to the health center and completed the standardized retreatment therapy regimen.

The ICs who died during the course of treatment were infected by an *M. tuberculosis* strain of the LAM spoligotype; both of the other two patients who relapsed and died later were infected by a strain with the T spoligotype. One patient, who relapsed but who was cured after retreatment therapy, was infected by a strain with the CAS genotype. The patient who failed TB treatment was infected by a T-family strain.

Two HC died during the study, one of a cerebral vascular

accident and one of pleurisy, which was not proved to be linked to *M. tuberculosis* infection. Twelve HC (4.1%) developed TB disease during the follow-up: one developed pleural TB, six had pulmonary AFB-negative TB with radiological symptoms, three patients from the same household developed clinical TB with erythema nodosum, and two contacts developed AFB-positive pulmonary TB.

Of the 12 HC who developed clinical TB disease, 10 were contacts of IC patients infected with T-family strains, 1 was the contact subject of a LAM-family-strain-infected IC, and 1 was the contact of a *M. bovis*-family-strain-infected IC. However, the number of HC who developed TB was so small that it was not possible to find any correlation between the genotype and the development of TB among the contacts.

**Influence of spoligotype on bacillary load.** We examined whether there was any correlation between the spoligotype of the infecting strains and the *M. tuberculosis* sputum load in TB patients. The sputum bacterial load was measured as the number of AFB observed by microscopy and by the number of CFU obtained by culture (Table 1). Though the CAS and Beijing spoligotypes were more likely to give a lower bacillus load than the other spoligotypes, this difference was not statistically significant.

All except two strains were drug susceptible. The exceptions were one strain with a LAM spoligotype which was resistant to isoniazid and one strain with a Haarlem spoligotype which was multidrug-resistant to streptomycin, isoniazid, rifampin, and ethambutol. On analysis, we did not find any correlation between the drug resistance of the strains and the spoligotype of the strains (data not shown).

**Influence of spoligotype on IFN- $\gamma$  ELISPOT assay response.** Of the recruited individuals, 230 (55 ICs, 175 HC) had adequate blood specimens available and ELISPOT assay results that met the inclusion criteria (Table 2). With all the antigens (PPD, CFP7, and ESAT-6), the proportion of cells positive by the IFN- $\gamma$  ELISPOT assay was higher for the TB patient group than for the healthy household contact (HHC) group during the inclusion period. There was no significant difference in the ESAT-6-induced IFN- $\gamma$  ELISPOT assay response according to the bacterial load ( $P > 0.05$ ).

We then compared the genotype of the infecting strains in those subjects for which both ELISPOT assay results and spoligotypes were available. The median PPD- and CFP7-induced

TABLE 1. *M. tuberculosis* bacillus load in smear-positive patients, according to the infecting strain spoligotype

Bacterial sputum load	No. (%) of patients infected by <i>M. tuberculosis</i> spoligotype <sup>a</sup>			
	Bova	CAS/Beijing	Modern group 2	EAI
No. of AFB				
≥ 200 AFB per field	ND	4 (26.5)	22 (45.1)	4 (40)
< 200 AFB per field	ND	10 (71.4)	28 (54.9)	6 (60)
No. of CFU on LJ medium				
≥ 300 CFU/tube	1	8 (57.1)	25 (48.6)	5 (50)
< 300 CFU/tube	2	6 (42.9)	16 (31.4)	5 (50)

<sup>a</sup> None of the differences between groups was statistically significant by the  $\chi^2$  test. ND, not determined.



TABLE 2. Characteristics of the individuals for whom IFN- $\gamma$  ELISPOT assay results were obtained at the inclusion period

Characteristic <sup>a</sup>	Index cases	TBHC	MHCs	P value <sup>b</sup>
No. of individuals	55	6	169	
Mean (range) age (yr)	35.38 (17–70)	21 (2–47)	20.95 (1–79)	
Sex (no. of individuals)				
Male	31	3	79	
Female	24	3	90	
TST result at day 0 (no. [%] of individuals) <sup>c</sup>				
Negative	4 (15.3)	0	38 (22.5)	
5–14 mm	10 (38.5)	0	46 (27.2)	
$\geq 15$ mm	12 (46.2)	6 (100)	84 (49.7)	
ND	29	0	1	
BCG vaccination (no. [%] of individuals)				
Yes	40 (72.7)	6 (100)	150 (89.7)	
No	6	0	9	
IND	9	0	10	
IFN- $\gamma$ ELISPOT assay response to antigens <sup>d</sup>				
CFP7	233 (65.5)	276 (66.6)	144 (51.5)	0.16
ESAT-6	225 (61.8)	158 (50)	105 (43.8)	0.066
PPD	772 (94.5)	396 (100)	304 (74.6)	0.0026

<sup>a</sup> ND, not determined; IND, indeterminate.<sup>b</sup>  $\chi^2$  test.<sup>c</sup> Percentages are the percent positive among those tested.<sup>d</sup> The responses are given as the median number of SFCs per  $10^6$  PBMCs (percent). The cutoff point for positivity was taken as the mean response of the unstimulated wells for the whole cohort plus 1.64 standard deviations.

IFN- $\gamma$  responses were higher in IC patients from whom we isolated ancient group *M. tuberculosis* strains than in IC patients from whom we isolated modern group 1 or modern group 2 strains; however, this difference was not statistically significant (Fig. 2A). The ESAT-6-induced IFN- $\gamma$  responses of IC patients from whom we isolated modern group 1 strains (Beijing, CAS), however, was significantly lower than the responses of IC patients from whom we isolated strains belonging to modern group 2 strains or to the ancient strain group ( $P = 0.037$ ). The ELISPOT assay results for cured ICs, i.e., after the end of the TB treatment, showed no differences according to the spoligotype of the infecting strains (Fig. 2B).

We assumed that HCs, all of whom had significant exposure times, would most likely be exposed to and thus react to the same strains as their respective ICs, even if this might involve superinfection on top of a previous, unidentified exposure, in some cases. Therefore, to determine whether some strains induced different IFN- $\gamma$  responses among the contacts of TB patients, the IFN- $\gamma$  response in the HC cohort was assessed according to the genotype of the strains isolated from their respective ICs (Fig. 3A). Both the ESAT-6- and the PPD-induced IFN- $\gamma$  responses were statistically higher in the HCs of patients infected by EAI strains than in the HCs of patients infected by modern group 1 or group 2 strains ( $P = 0.010$  and  $P = 0.005$ , respectively). The CFP7-induced IFN- $\gamma$  responses were significantly higher in the HCs of TB patients infected with EAI strains than in the HCs of patients infected with modern group 1 strains ( $P = 0.014$ ). Even though the CFP7-induced IFN- $\gamma$  responses were also higher in the HCs of EAI strain-infected patients than in the HCs of modern group 2 strain-infected patients, this difference was not statistically significant. Likewise, the ESAT-6-induced and CFP7-induced

IFN- $\gamma$  responses at the inclusion were significantly lower in the HCs of patients from whom CAS or Beijing strains were isolated than the responses in the contacts of modern group 2 or ancient strain-infected patients ( $P = 0.016$ ).

With all the antigens tested here, there was no statistically significant difference between the IFN- $\gamma$  responses induced by *M. bovis* strains and *M. tuberculosis* strains in patients and in contacts ( $P > 0.05$ ) (data not shown).

The IFN- $\gamma$  responses were proportional to the tuberculin skin test (TST) response (Table 3). However, there was no significant correlation between the TST results for the HCs and the genotype of the strain isolated from their respective ICs (Fig. 4).

Three months following recruitment (and the initiation of treatment of the ICs) the PPD-induced IFN- $\gamma$  responses remained higher in the contacts of patients infected with EAI strains than in the contacts of patients infected with modern group 1 strains (Fig. 3B), but no difference was observed between the contacts of patients infected with modern group 1 and modern group 2 strains. The ESAT-6-induced IFN- $\gamma$  responses were lower in the contacts of patients infected with modern group 1 strains than in the contacts of patients infected with modern group 2 or ancient strains ( $P = 0.0076$ ). With the CFP7 antigen, no difference was observed between the different groups of household contacts.

#### DISCUSSION

A number of studies have used the magnitude of the IFN- $\gamma$  response to ESAT-6 for the diagnosis of *M. tuberculosis* infection in different populations (4, 16, 32), but this is the first study addressing the issue of strain-specific differences in

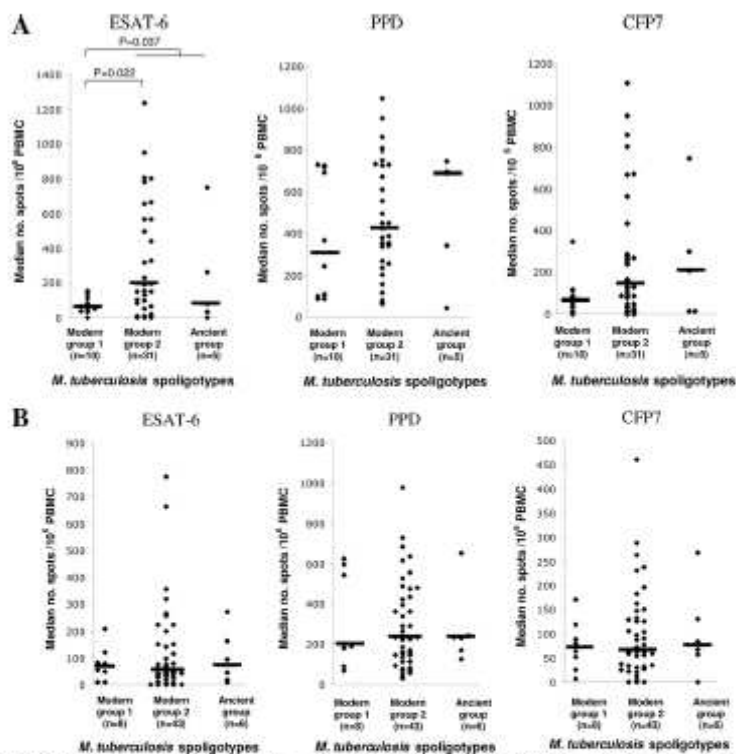


FIG. 2. *In vitro* IFN- $\gamma$  responses of PBMCs from ICs to restimulation with *M. tuberculosis* ESAT-6, PPD, and CFP7 antigens at the inclusion period (A) and after treatment (B), according to the spoligotypes of the infecting *M. tuberculosis* strains. The levels of IFN- $\gamma$  which were significantly different between groups (Mann-Whitney test) are indicated. The horizontal bars indicate the median number of spots per  $10^5$  PBMCs.

IFN- $\gamma$  responses in humans, although strain-specific variability has been observed in animal models (44).

In Madagascar, TB is still a serious public health problem, and in common with the practice in many countries where TB is endemic, the NTCP focuses on the diagnosis and treatment of smear-positive patients to stop the transmission of bacilli. However, currently, there is no actual policy regarding the detection of *M. tuberculosis* infection among the family and the contacts of contagious cases. It should be noted that BCG vaccination is common, and whether it is due to this or to exposure to atypical mycobacteria, the tuberculin test is positive for a high proportion of the healthy population (13).

ESAT-6 is encoded by the RD1 genomic region, which is present in *M. tuberculosis* and pathogenic *M. bovis* but which is lacking in all BCG vaccine strains. However, it is an important virulence factor and is highly conserved in clinical TB strains, and therefore, this antigen is expected to be recognized by *M. tuberculosis*-infected subjects but not by healthy vaccinated subjects (6), and the magnitude of the response to ESAT-6 has been used as a proxy marker for both the bacterial load and exposure to *M. tuberculosis* (3, 32). We thus used PPD, ESAT-6, and the ESAT-6-related antigen CFP7 (also called TB10.4; this antigen is an ESAT-6 family member, but unlike ESAT-6, it is also present in BCG) to stimulate PBMCs from

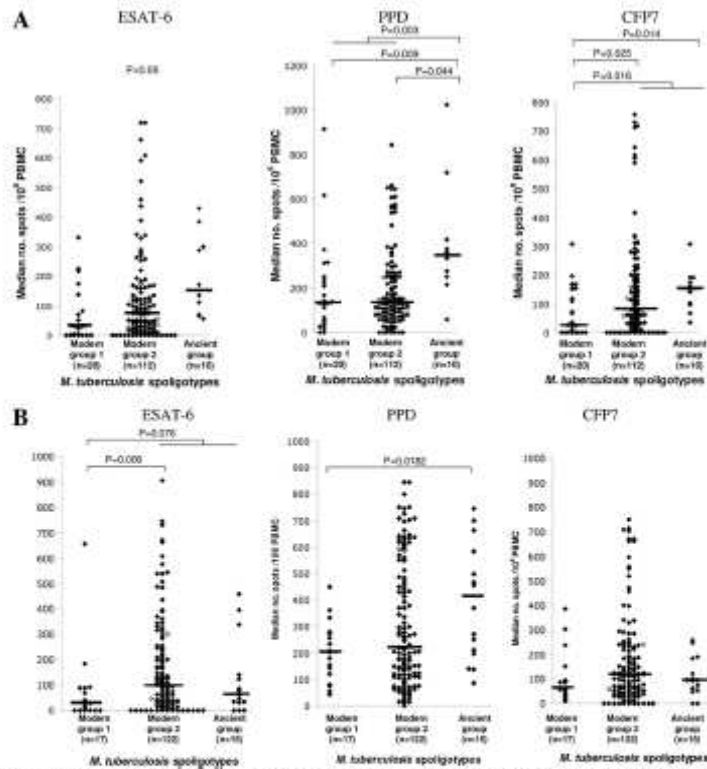


FIG. 3. *In vitro* IFN- $\gamma$  responses of PBMCs from household contacts to re-stimulation with the ESAT-6, PPD, and CFP7 antigens at the induction period (A) and 3 months after the induction period (B), according to the spoligotypes of the infecting *M. tuberculosis* strains isolated from their respective IC patients. The levels of IFN- $\gamma$  which were significantly different between groups (Mann-Whitney test) are indicated. The horizontal bars indicate the median number of spots per 10<sup>6</sup> PBMCs. ♦, HHC; ○, TBHCs.

TABLE 3. Correlation between ESAT-6-, PPD-, and CFP7-induced IFN- $\gamma$  responses and TST results in household contacts

Antigen	Median no. of spots/10 <sup>6</sup> cells for individuals with the following TST result:			P value <sup>a</sup>
	<5 mm (n = 24)	5–14 mm (n = 40)	>14 mm (n = 73)	
ESAT-6	17.5	37.5	115	0.000006
PPD	92.5	130	175	0.0004
CFP7	22.5	45	135	0.00012

<sup>a</sup> n, number of subjects.

<sup>b</sup> Kruskal-Wallis test.

the recruited cohorts to determine whether the genotype of the infecting strain might have an influence on the IFN- $\gamma$  response induced by these antigens.

While there is some evidence of strain-specific virulence, for example, from animal models, an association between molecular epidemiology and experimental model systems showed the improved growth of clustered strains in THP-1 cells compared with that of unique strains and the more efficient infection of human monocyte-derived macrophages with extrapulmonary strains than pulmonary strains (26, 35). Furthermore, a cell

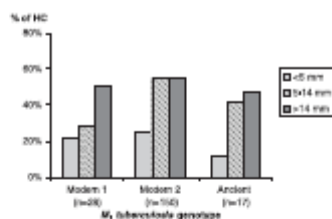


FIG. 4. TST results for household contacts, according to the genotype of the *M. tuberculosis* isolates from the index case patients.

culture study in Uganda separated isolates on the basis of their frequency of transmission to household contacts, and those which transmitted efficiently showed more rapid growth in THP-1 cells than nontransmitted isolates (57). However, so far there are few data on the effects of *M. tuberculosis* isolates with different genotypes on clinical presentation or outcome in human TB. In a previous study, we did not find any obvious association between the IS6110-based restriction fragment length polymorphism (IS6110-RFLP) patterns and the clinical presentation of tuberculosis (47). However, there was some association of specific IS6110-RFLP patterns with disease presentation, suggesting that some strains may have the ability to disseminate more easily than others. Similarly, studies performed in Vietnam reported that the Euro-American lineage (corresponding to the modern group 2 strains [5]) associated with radiographically detected lung consolidation in pulmonary TB patients was more likely to result in pulmonary TB than meningeal TB (59) and less likely to cause extrapulmonary disease (12). In The Gambia, contacts exposed to Beijing strains were most likely to develop TB disease (14). Another study conducted in China associated the Beijing strains with less fever and night sweats as well as less cavitory disease in patients (54), consistent with the hypothesis that these strains induce the production of fewer proinflammatory mediators. Ulrich et al. (61) reported that the number of IFN- $\gamma$ -producing cells was higher in TB patients after treatment than in untreated TB patients. Controversially, however, others found lower numbers of IFN- $\gamma$ -producing cells after treatment and that patients with cavitory disease had higher counts of ESAT-6-secreting cells than those without cavitory disease, suggesting that there may be a relationship between IFN- $\gamma$  release and bacterial load (40). Since Beijing strains were found to be associated with less cavitory disease in Chinese patients (54), we expected that the IFN- $\gamma$  response to ESAT-6 induced by Beijing strains will be lower than that induced by non-Beijing strains. Our results are concordant with this hypothesis. However, we did not find any significant difference in the ESAT-6-induced IFN- $\gamma$  response in index cases according to the bacterial load. Furthermore, even though modern group 1 strains tend to give a lower bacterial load than the other strains, there was no statistically significant influence of the infecting strains' spoligotype on the bacterial load in the sputum of TB patients. It is probable that other factors, such as individual variability

(49), may influence disease importance. However, in the present study, we found a weaker ESAT-6-induced-IFN- $\gamma$  response in patients infected with modern group 1 strains (CAS and Beijing) than in patients infected with strains of other genotypes, consistent with the hypothesis that these strains induce lower inflammatory responses.

These results are compatible with the finding that Beijing strains induced the poorer expression of IFN- $\gamma$  in the mouse *M. tuberculosis* infection model (39). The authors suggested that, consequently, the Th1 cells were inefficiently activated, leading to the progression of TB disease. Our results are also compatible with those of an assay with a THP-1 monocytic cell line model, where the Beijing and CAS strains induced low levels of tumor necrosis factor alpha secretion and IFN- $\gamma$  production in the whole-blood assays among healthy BCG-vaccinated volunteers (56). IFN- $\gamma$  is one of the major components of the Th1 immune response against *M. tuberculosis*. However, the Th1 response also leads to the inflammation and pathology associated with TB (granulomatous inflammation and necrosis). Therefore, a low IFN- $\gamma$  rate could explain the low histopathological score, the disseminated infection, and the higher virulence observed with Beijing strains in some studies (22, 28, 35, 39, 62). Some experimental models suggest that Beijing strains induced the downregulation of proinflammatory cytokines (44, 48, 50) associated with the production of the phenolic glycolipid (PGL) (33), a cell wall component important in the pathogenic process and in strain dissemination and survival (60).

Since, in contrast to TST, the ESAT-6 ELISPOT assay results had a strong positive relation with increasing exposure and were not correlated with BCG vaccination status, this test could allow the more accurate identification of symptom-free infected individuals recently exposed to *M. tuberculosis* (37). In countries with a low TB incidence, the ESAT-6-induced IFN- $\gamma$  response was found to be sensitive and specific in diagnosing latent TB infection (18, 31), and exposed contacts with high levels of IFN- $\gamma$  production have a greater possibility of developing active TB than those with lower IFN- $\gamma$  levels (30). However, in high-TB-incidence countries, different data were obtained. For example, a study in Ethiopia reported that the high IFN- $\gamma$  response to ESAT-6 by healthy household contacts of TB patients correlates with the subsequent development of active TB during a 2-year follow-up period (21). However, other data suggested that the level of IFN- $\gamma$  response to ESAT-6 alone is not indicative of disease progression and that the response to another specific antigen, Rv2031, may be important (16). Prospective studies are still required to determine if the IFN- $\gamma$  response is predictive of a high risk of active TB progression in high-burden settings (17). In the present study, the positive reactivity of household contacts to ESAT-6 antigen at the inclusion period did not correlate with disease progression during follow-up, since there was no significant difference in the ELISPOT assay response between HHCs and household contacts who developed TB disease (TBHCs) (Table 2). Even if most of the index cases of contacts who developed TB disease during follow-up were infected by modern group 2 strains, no significant association was found, since the TBHC sample size was too small. It was then interesting to determine whether the ESAT-6-induced IFN- $\gamma$  response, i.e., latent infection

among contacts, was associated with the genotype of the strains isolated from index cases.

The EAI family spoligotype was previously found to be relatively frequent (23.5%) in Madagascar (10, 23), suggesting that this spoligotype is widely transmitted in the Malagasy population. We did not see an IFN- $\gamma$  response in EAI-infected index cases significantly different from that in index cases infected with any of the other strains of *M. tuberculosis*. However, in response to stimulation with ESAT-6, the ELISPOT assay count was significantly higher in the household contacts of EAI-infected patients than in the household contacts of CAS/Beijing-infected patients. These results therefore seemed to confirm the observation of others regarding the fact that modern group 1 strains seem to induce a weaker immune response than either the ancient EAI lineage or the strains of the modern group 2 lineage.

These results can be interpreted in several different ways. It is possible that the lower ESAT-6-specific IFN- $\gamma$  responses observed among the HCs of modern group 1-infected patients may reflect a lower capacity of these strains to be transmitted, perhaps because the longer history of EAI strains in the region may have allowed them to better infect Malagasy individuals. However, this interpretation is hard to reconcile with the rapid spread of modern group 1 lineages in the region. Another explanation could be that the transmission rate is similar for all strains but that the IFN- $\gamma$  response resulting from the infection is higher in the contacts of EAI-infected patients than in those of modern group 1 strain-infected patients. If (as we believe) this is true, it may affect the relative virulence of EAI and modern-lineage strains, explaining their relative prevalence in Madagascar (10).

Regarding the results obtained with PPD and CFP7, the responses to PPD were higher than the responses to CFP7, since PPD contains several antigens, including CFP7. However, similar responses to both antigens were observed in TB patients and in contacts independently of the infecting strains. The identical results obtained with the PPD and CFP7 antigens could be explained by the use of the BCG vaccine in the country, since both antigens are also present in BCG vaccine strains.

This is the first study analyzing the ESAT-6- and PPD-induced IFN- $\gamma$  responses and genotypes of infecting *M. tuberculosis* strains in humans. While the study provides some key findings, it should be noted that there are certain limits to the results obtained. First, in order to standardize the tests, only fresh PBMCs were used in the IFN- $\gamma$  ELISPOT assay (20), limiting the number of available ELISPOT assay results. Second, the sample size of some clusters of strains was small, so these results, while they are statistically robust, must still be considered preliminary. Finally, this study relied on analysis of the IFN- $\gamma$  response observed with circulating cells (PBMCs). Therefore, we must be prudent when interpreting these results, since they do not necessarily reflect what happens at the site of the infection.

For this analysis, we have focused on ESAT-6-induced IFN- $\gamma$ , since this has been suggested to be a proxy for the bacterial load (42) and, possibly, for the risk of subsequent progression to disease (3, 21). It would, of course, be interesting to determine if these effects could be explained by the induction of other cytokines, for example, interleukin-4, which

has been associated with a poor prognosis in TB patients (15, 25, 45) and which is thought to be preferentially induced by PGL from at least some strains of the Beijing lineage (40). Since the current data were gathered as part of a longitudinal cohort study, we are addressing these questions.

Some studies have described the global genetic population structure of *M. tuberculosis* and the geographical distribution of *M. tuberculosis* genotypes (10, 26), and the findings of those studies support the hypothesis of a human host-specific adaptation of the pathogen. It is known that strain genetic variation is important for vaccine development. For instance, geographic variation in the protective efficacy of BCG has been observed (2) that can be due to environmental factors, but it can also be due to differences in the vaccine strain. These observations may have implications for TB control and the development of new vaccines. Thus, our observations on the variations in the IFN- $\gamma$  responses of the human host according to the genotype of the mycobacteria could be useful in performing more accurate IFN- $\gamma$  response-based TB diagnostic tests or using other tools to monitor for a protective host immune response in clinical trials for new vaccines or therapies.

Ultimately, our findings suggest that genotyping of *M. tuberculosis* strains and immune responses to these strains may help identify markers of virulence that could be involved in the development of TB disease or, conversely, in the correlates of protection of the human host.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Élie Jeanne Vololonirina, Astra Andrianandranaharatra, and Rina Ralainirijona for technical assistance; the Centre de Biologie Clinique of the Institut Pasteur de Madagascar; the clinical physicians of the Dispensaire Anti-Tuberculeux d'Antananarivo; the Radiology Department of the Institut d'Hygiène Sociale à Antananarivo; the staff of the National Mycobacterium Laboratory of the Ministry of Health; and the National TB Control Programme of the Ministry of Health for their contribution to the study. We thank Christophe Sola for quality control of spoligotyping and for helping with determining the ST and family of spoligotypes.

This work was supported by the European Commission through EU contract ICA4-CT-2002-10052.

The VACSEL/VACSIS study group also includes Helen Fletcher (until 2005) and Louise Kim, University College London; Chikanda Chimwa, Gina Malunga, and Peter Mwaba, University of Zambia School of Medicine, Lusaka, Zambia; K. P. W. J. McAdam (until 2003), Patrick Owaisi, David Warndorf (until 2001), Christian Lienhardt (until 2001), R. Brookes, and Philip Hill (from 2001), MRC, The Gambia; and Howard Engen, Abraham Assefa, Abebech Demissie, Markus Abebe, and Liya Wanji, AHRU.

#### REFERENCES

1. Aggarwal, C., T. T. Hoang, A. Izza, E. Bishnikov, J. Trough, E. Arnett, A. Kojouhar, T. Brown, P. Andersen, and J. Dietrich. 2009. Protection and polyfunctional T cells induced by Ag85B-TB10.4/IC21 against *Mycobacterium tuberculosis*: is highly dependent on the antigen dose. *PLoS One* 4:e4930.
2. Andersen, P., and T. M. Doherty. 2005. The success and failure of BCG: implications for novel tuberculosis vaccines. *Nat. Rev. Microbiol.* 3:956–962.
3. Andersen, P., T. M. Doherty, M. Pal, and E. Wedderburn. 2007. The progress of latent tuberculosis: can disease be predicted? *Trends Med. Biol.* 15:175–182.
4. Arnold, S. M., P. Andersen, E. E. van Marrewijk, R. L. Sijpe, Y. W. Siderovski, J. T. van Dissel, and T. H. Ottenhoff. 2003. Detection of active tuberculosis infection by T cell response to early-injected antigen: target 6A10 protein and culture filter protein 10. *J. Infect. Dis.* 187:1450–1454.
5. Arnold, C. 2007. Molecular evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Microbiol. Infect.* 15:120–128.
6. Bole, M. A., M. A. Wilson, W. P. Gill, B. Selvaraj, G. E. Schenck, S. Ezen, and P. M. Smith. 1999. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science* 284:1520–1523.

- [illegible]

- Holbein, R. M. Warren, and J. F. Schwan. 2007. Absence of an association between *Mycobacterium tuberculosis* genotype and clinical outcome in children with tuberculous meningitis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 36:13–18.
42. Millington, E. A., J. A. Isaacs, S. Buckle, T. S. Hinks, J. J. Doherty, D. P. Dwyer, Y. Gupta-Ravel, R. Gonsky, F. Kew, and A. L. Hargrett. 2007. Dynamic relationship between IFN- $\gamma$  and IL-2 profile of *Mycobacterium tuberculosis*-specific T cells and antigen load. *J. Immunol.* 178:5217–5226.
43. Nicol, M. P., C. Sola, B. February, N. Rostogi, L. Roys, and E. J. Williamson. 2005. Identification of minor families of *Mycobacterium tuberculosis* causing pulmonary and extrapulmonary disease in hospitalized children in Cape Town, South Africa. *J. Clin. Microbiol.* 43:5759–5761.
44. Ordway, D., M. Hens-Tamayo, M. Harrison, G. Polunsky, J. Trosdt, C. Stanley, R. J. Doumle, and I. M. Orma. 2007. The hypervirulent *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv induces a potent TH1 response followed by rapid down-regulation. *J. Immunol.* 179:252–261.
45. Ordway, D. J., L. Coen, M. Martinez, H. Sifveira, L. Amador, M. J. Aron, F. A. Vazquez, and H. M. Dedering. 2004. Increased interleukin-4 production by CD8 and gamma/delta T cells in health-care workers is associated with the subsequent development of active tuberculosis. *J. Infect. Dis.* 189:756–766.
46. Ramakrishna-Ramamurthy, V., R. Ramakrishna, G. Arangan, B. Gopal, and S. Chinnaiya. 2001. A combination of two genetic markers is sufficient for restriction fragment length polymorphism typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex in areas with a high incidence of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 39:1510–1515.
47. Ramakrishna-Ramamurthy, V., D. Howard, G. Arangan, B. Gopal, and S. Chinnaiya. 2002. Extrapulmonary and pulmonary tuberculosis in Amman-ade (Madagascar): high clustering rates in female patients. *J. Clin. Microbiol.* 40:3567–3570.
48. Reed, M. D., P. Donachie, C. Mace, R. Se, A. K. Jernat, B. N. Kretzsch, G. Kaplan, and C. E. Barry III. 2004. A glycolipid of hypervirulent *Mycobacterium tuberculosis* that inhibits the innate immune response. *Nature* 431:64–67.
49. Roberts, S., K. Dwyer, J. Haddad, C. Lewis, A. Bivva, P. E. Chalmers, M. B. Condit, N. Bock, and S. B. Berman. 2009. T-SPOT.TB responses during treatment of pulmonary tuberculosis. *BMC Infect. Dis.* 9:27.
50. Rostogi, D., G. Huet, C. Mace, L. Tassera, M. S. Koo, N. Kretzsch, B. Kana, R. Mathema, S. A. Morris, B. N. Kretzsch, C. Goffin, and G. Kaplan. 2008. The phenolic glycolipid of *Mycobacterium tuberculosis* differentially modulates the early host cytokine response but does not in itself confer hypervirulence. *Infect. Immun.* 76:3027–3036.
51. Ruge, R., L. I. Brude, S. M. Arad, M. E. Munk, M. Thomsen, T. H. Olesen, and P. Andersen. 2002. Epitope mapping of the immunodominant antigen TB10.4 and the two homologous proteins TB10.3 and TB10.5, which constitute a subfamily of the case-6 gene family. *Infect. Immun.* 70:5446–5451.
52. Smith, P. G., and A. E. Moss. 1994. Epidemiology of tuberculosis, p. 47–50. In B. R. Bloom (ed.), *Tuberculosis: pathogenesis, prevention, and control*. American Society for Microbiology, Washington, DC.
53. Sorensen, A. L., S. Nagai, G. Rosen, P. Andersen, and A. B. Andersen. 1985. Purification and characterization of a low-molecular-weight T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 63:1710–1717.
54. Sun, Y. J., T. K. Liu, A. E. Gao, D. C. Ho, G. T. Sack, and N. I. Patra. 2005. Tuberculosis associated with *Mycobacterium tuberculosis* Beijing and non-Beijing genotypes: a clinical and immunological comparison. *BMC Infect. Dis.* 5:105.
55. Taque, A., and E. Tena. 1991. Nouvelle technique d'inoculation des mycobactéries par la méthode de la sonde. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* 186:679–680.
56. Tawres, M., Z. Hassan, A. Kari, R. Hussein, and R. Hassan. 2006. Reduced TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  responses to *Centric Alnus* in comparison with H37Rv strain. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 100:661–667.
57. Tena, S. A., M. D. Carr, E. Hens, J. Wainwright, H. Lee, W. Maday, C. Whalen, and R. F. Silver. 2005. Differences in the growth of paired *Uptake* isolates of *Mycobacterium tuberculosis* within human mononuclear phagocytes correlate with epidemiological evidence of strain virulence. *Infect. Immun.* 73:665–678.
58. Tena, S. A., M. D. Carr, and E. D. Hens. 2005. Interleukin-12 production, growth rates and cytokine profiles of *Mycobacterium tuberculosis* strains with different transmission dynamics. *J. Infect. Dis.* 191:457–460.
59. Threlkeld, G., M. Carr, T. T. Chan, A. Eise, N. T. Lam, M. N. Hayes, R. Gagneux, P. T. An, B. Q. Tho, E. Tarkenton, N. T. Nguyen, P. M. Dey, J. Richardson, C. Harrison, T. T. Han, and J. Barrer. 2008. Relationship between *Mycobacterium tuberculosis* genotype and the clinical phenotype of pulmonary and meningitis tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 46:1363–1368.
60. Trosdt, L., E. Hens, R. Hens, A. L. Mouton, N. Kretzsch, M. B. Reed, R. Mathema, C. E. Barry III, and G. Kaplan. 2005. Virulence of selected *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in the rabbit model of meningitis is dependent on phenolic glycolipid produced by the bacilli. *J. Infect. Dis.* 192:345–355.
61. Ullrich, T., R. Seifert, S. H. Kretzsch, and M. E. Munk. 2003. Number of IFN- $\gamma$ -producing cells against ESAT-6 increase in tuberculosis patients during chemotherapy. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 4:1181–1185.
62. van Crevel, R., R. H. Hoogkamp, W. de Lencastre, Y. Verrugge, A. G. van der Zanden, Z. Amun, J. W. van der Meer, and D. van Soolingen. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains associated with islet response to treatment. *Emerg. Infect. Dis.* 9:680–683.
63. van Soolingen, D., P. W. Hermans, P. E. de Haas, D. R. Sell, and J. D. van Embden. 1991. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA probe as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 29:2576–2586.
64. WHO. 2009. Global tuberculosis control 2009: epidemiology, strategy, financing, vol. WHO/HTM/TB2009.411. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

## RESUME

### **Titre : Diversité des souches cliniques de *M. tuberculosis* à Madagascar : Impacts sur l'infection tuberculeuse**

**Mots-clés** : *M. tuberculosis*, diversité, réponse IFN $\gamma$ , CRISPR, îlots génomiques, évolution

La lutte contre la tuberculose (TB) est aujourd'hui orientée vers l'amélioration du traitement, du diagnostic et la recherche de vaccins plus efficaces. La production d'IFN $\gamma$  et la prolifération des lymphocytes T permettent d'évaluer la réponse immunitaire contre la maladie. L'existence d'une grande diversité génétique chez les bactéries du complexe *M. tuberculosis* (MTBC) et son influence sur la réponse immune sont cependant peu connues. Pour mieux comprendre la relation entre la diversité génétique des souches MTBC, ses effets sur la réponse de l'hôte et les facteurs génétiques bactériens pouvant causer cette diversité, la réponse ELISPOT-IFN $\gamma$  de patients tuberculeux et leurs contacts en fonction du spoligotype de MTBC isolées a été étudiée ici. Nos résultats montrent que les souches MTBC « modernes » induisent une réponse IFN $\gamma$  plus faible chez les cellules isolées du sang des sujets étudiés par comparaison à la réponse IFN $\gamma$  de ceux associés à des souches bactériennes « anciennes ». Dans une seconde étude, les îlots génomiques spécifiques des MTBC de souches cliniques ont été criblés par PCR et séquençage. La plupart de ces îlots génomiques sont conservées dans les souches cliniques. Des îlots polymorphes ont cependant été observés. Le polymorphisme des îlots génomiques dans les bactéries étudiées est associé au schéma évolutif des familles MTBC. Le nombre d'îlots polymorphes est plus élevé chez les souches « modernes » par rapport aux souches « ancestrales » et *M. bovis*. Le choix de cibles potentielles parmi les îlots génomiques conservés pourrait permettre l'élaboration de nouveaux antituberculeux et l'évaluation des futurs vaccins devrait être adaptée à la prévalence des souches dans les zones d'études.

#### **Laboratoires de recherche :**

- Unité de génétique Mycobactérienne, Institut Pasteur Paris
- Unité des Mycobactéries, Institut Pasteur de Madagascar



## ABSTRACT

**Title : Diversity of *M. tuberculosis* clinical isolates in Madagascar: Impacts on tuberculosis infection.**

**Keywords** : *M. tuberculosis*, diversity, IFN $\gamma$  response, CRISPR, genomic islands, evolution.

Researches and strategies against tuberculosis (TB), a worldwide public health problem, are focused on developing improved diagnostic tools, treatment, and TB prevention. IFN $\gamma$  production and T cells proliferation are the most used surrogate markers of immune response against TB. The *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) strains found worldwide are however prone to genetic diversity and the influences of this diversity on the human immune response are still poorly understood. For a better understanding of this relationship between the MTBC diversity and its effects on the host immune response and to study the genetic factors that could be involved in this diversity, we firstly studied the ELISPOT-IFN $\gamma$  response in the host according to the spoligotype of the infecting strains in TB patients and their contacts. Then, the MTBC-specific genomic islands (GEI) were screened in the strains by PCR and sequencing. Comparison of the IFN $\gamma$  responses according to the spoligotypes showed that “modern” MTBC strains induced lower IFN $\gamma$  responses than “ancient” strains in the studied cohorts. Despite the conservation of most of the GEI in the strains, some polymorphisms were observed in 13 GEI. These polymorphisms are associated to the evolution of the MTBC species. Our results suggest that the “modern” strains have more polymorph MTBC-specific GEI than those with ancestral genotypic traits and *M. bovis* strains. The control of TB disease could be improved by selecting potential anti-TB targets within the conserved genomic islands or by adapting the evaluation of future TB vaccines according to the prevalent TB strains in the area where the clinical trials are to be assessed.

**Research Laboratories :**

- Unité de génétique Mycobactérienne, Institut Pasteur Paris
- Unité des Mycobactéries, Institut Pasteur de Madagascar