

UTILISATION DES MARQUEURS DE TYPE SNPS POUR LE GENOTYPAGE DES SOUCHES CLINIQUES DE LEPRE EN COTE D'IVOIRE

AMON ABY CHRISTIANE^{1*}, DEHE BAHOU ROGER¹, KOUAKOU HENRI³, KAKOU N'GAZOA SOLANGE¹, DOSSO MIREILLE¹, BAMBA VAGAMON³, DJAMAN ALLICO JOSEPH^{1,2}, COULIBALY N'GOLO DAVID¹.

RÉSUMÉ

La lèpre est une maladie infectieuse, due à *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) ou bacille de Hansen. Elle est incultivable sur milieu axénique. La Côte d'Ivoire comme certains pays d'Afrique a atteint le seuil d'élimination de la maladie et la polychimiothérapie est disponible dans tout le pays. Cependant, des nouveaux cas apparaissent, reflétant une transmission continue du bacille de Hansen. La maladie sévit sous un mode endémique; malheureusement, le mécanisme exact de transmission de la lèpre n'est toujours pas connu. La différenciation des isolats de *M. leprae*, agent causal de la lèpre n'a pas encore été réalisée en Côte d'Ivoire. C'est dans ce cadre que cette étude d'épidémiologie moléculaire de *M. leprae* a été réalisée. Elle a pour but d'identifier les souches de *M. leprae* circulantes en Côte d'Ivoire.

Dans cette étude, 69 patients multibacillaires ont été recrutés dans la région de la Mé (Adzopé). Ces patients provenaient de l'Institut Raoul Follereau de Côte d'Ivoire (IRFCI) en charge des patients souffrant de cette maladie. Un total de 207 prélèvements dont 69

mucus nasals et 138 prélèvements de suc dermiques ont été obtenus des patients. L'extraction de l'ADN de *M. leprae* a été réalisée par la méthode manuelle utilisant un protocole mis au point utilisant le thiocyanate de guanidine. La détection de *M. leprae* a été réalisée par PCR conventionnelle en ciblant les séquences répétées de type *RLEP*.

Tous les échantillons ont été positifs par PCR avec la cible *RLEP* et ont été utilisées pour le génotypage de *M. leprae*. 44,92 % (31/69) de souches identifiées ont permis la recherche de polymorphisme d'un seul nucléotide (SNP) présent dans le génome de *M. leprae* aux positions 14 676, 1 642 875 et 2 935 685. Le génotype obtenu était le génotype 4 de *M. leprae*. Ce génotype correspond à ceux précédemment signalés comme répandus dans les pays de l'Afrique de l'ouest dont fait partie la Côte d'Ivoire. Aussi l'analyse phylogénétique a montré que les souches ivoiriennes sont proches de ceux de l'Inde, du Brésil et du Japon.

Mots-clés : Lèpre, *Mycobacterium leprae*, PCR-*RLEP*, Génotypage, Polymorphisme mono- nucléotide

-
- 1- Plateforme de Biologie Moléculaire, Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, BP 490 Abidjan, Abidjan, Côte d'Ivoire.
 - 2- UFR Biosciences, Laboratoire de Biologie et Santé, Université Felix Houphouët- Boigny, Abidjan, Côte d'Ivoire.
 - 3- Institut Raoul Follereau de Côte d'Ivoire, Adzopé, Côte d'Ivoire.

*Auteur correspondant: abychristiane@gmail.com; Dehe Bahou Roger email: rogerdehe@yahoo.fr ; Kouakou Henri email: kouakouhenri@yahoo.fr ; Kakou Ngazoa Salange, email: ngazoa_solange@yahoo.fr ; Dosso Mireille, email: mireilledosso@pasteur.ci ; Bamba Vagamon, email: vagamonbamba@yahoo.com ; Djaman Allico Joseph, email: djamanj@yahoo.fr ; Coulibaly N'Golo David, email: davidcoulibalyngolo@pasteur.ci

1-INTRODUCTION

Mycobacterium leprae (*M. leprae*) ou bacille de Hansen (BH) est un bacille acido-alcool-résistant (BAAR), responsable de la lèpre, une maladie infectieuse chronique touchant principalement la peau, les nerfs périphériques, la muqueuse, les voies respiratoires ainsi que les yeux (Adhikari *et al.*, 2013). Sans traitement, les symptômes évoluent vers des handicaps physiques irréversibles tels que la cécité et des difformités des membres. La lèpre est considérée comme faiblement contagieuse et ne se propage pas facilement dans les communautés.

Cependant, les patients atteints de cette pathologie sont victimes d'un préjudice social majeur, conduisant au rejet par la société. La lèpre est la troisième mycobactériose mondiale après la tuberculose et l'ulcère du Buruli (Aubry et Gauzière, 2021) et elle sévit à l'état endémique dans certaines régions du monde. Comme moyens de lutte, l'OMS a mis en place une polychimiothérapie (PCT) en 1981 pour le traitement de la lèpre et la gratuité des soins en 1994 (Sigg, 2019).

L'utilisation de la polychimiothérapie a permis la réduction de la prévalence de la lèpre de 80 % en 10 ans et d'épargner un million de patients de l'invalidité (Richardus et Oskam, 2015). Néanmoins, de nouvelle contamination continue à évoluer dans le monde et en 2020, l'Organisation mondiale de la santé cite 177 175 « cas enregistrés » et 202 185 « nouveaux cas » pour la fin 2019, dont 71 % ont été signalés en Asie du Sud et de l'Est.

La lèpre demeure donc un problème de santé publique et selon les données de l'OMS en 2018, l'Afrique occupe le 3^{ème} rang mondial après l'Asie et l'Amérique.

Face à cette situation, l'OMS s'est fixé trois objectifs majeurs pour le contrôle de la lèpre dans le monde qui sont l'interruption de la transmission, le traitement des patients et la prévention des déformations (OMS, 2019).

Concernant la transmission, le mode exact de transmission des bacilles de la lèpre n'a pas encore été élucidé. Cependant le contact avec une personne infectée dans le même ménage ou la même communauté est généralement reconnu comme un facteur de risque élevé d'infection

(Araujo *et al.*, 2016). Pour établir les schémas de transmission de la lèpre, de nombreuses enquêtes épidémiologiques se sont concentrées sur des facteurs cliniques ou sociaux généraux tels que l'âge (Vieira *et al.*, 2018), le sexe (Sarkar et Pradhan, 2016), le type de maladie (Nobre *et al.*, 2017), le niveau de vie (Serrano-Coll *et al.*, 2019), le régime alimentaire, la distributionspacial, la chronologie (Nazario *et al.*, 2017) ainsi que la génétique familiale (Cambri et Mira, 2018). Récemment, l'épidémiologie moléculaire des maladies infectieuses a connu une croissance rapide avec les progrès des techniques de typage moléculaire basées sur l'ADN, comme le génotypage et le séquençage nouvelle génération (NGS) (Wang *et al.*, 2015). Les méthodes de génotypages des mycobactéries reposent sur les polymorphismes d'un seul nucléotide (SNP) (Morgil *et al.*, 2020), les nombres variables de répétitions en tandem (VNTR) (Zeukeng *et al.*, 2021), les courtes répétitions en tandem (STR) (Wang *et al.*, 2020), les analyses des répétitions en tandem du nombre d'unités variables interspersées des mycobactéries (MIRU-VNTR) (Waing *et al.*, 2020), et les analyses de multiples locus variables de répétitions en tandem (MLVA) (Mateus *et al.*, 2019). Quant au génotypage de *M. leprae*, il est basé sur les polymorphismes d'un seul nucléotide (SNPs) et le nombre variable de répétitions en tandem (VNTR) qui ont été les seules permettant de révéler toute diversité génétique parmi les souches (Lavana *et al.*, 2015). Ces techniques ont contribué à une meilleure compréhension de l'étiologie, de la transmission et de la distribution spatiale des maladies infectieuses et ont donné un aperçu sur la variabilité génétique et l'évolution de l'agent responsable (Wang *et al.*, 2015).

La différenciation des souches de bacilles de la lèpre par l'étude du polymorphisme génomique des souches de *M. leprae* pourrait permettre de retracer les sources possibles d'infection, de différencier les cas de rechute des cas de réinfection et d'établir les liens possibles entre l'homme, l'animal et les réservoirs environnementaux.

La Côte d'Ivoire comme certains pays d'Afrique a atteint le seuil d'élimination de la maladie en tant que problème de santé publique (moins de 1

cas pour 10 000 habitants). De plus, la polychimiothérapie (PCT) est disponible dans tout le pays (**Anonyme, 2018**). Cependant, de nouveaux cas ont été observés dans la plupart des centres de traitements de la lèpre et de prise en charge des malades tels que l'Institut Raoul Follereau (**Fofana, 2019**). L'identification précoce des cas de lèpre est essentielle pour mettre en œuvre rapidement la PCT et ainsi prévenir la progression de la maladie.

Des travaux récents ont mis en évidence les types de souches circulants dans certains pays Africains. Aucune étude sur le génotypage de *M. leprae* permettant l'identification des souches n'a

encore été réalisée en Côte d'Ivoire. Les souches de *M. leprae* circulantes dans le pays sont donc méconnues, ce qui ne permet pas de déterminer leur niveau de transmission et l'échelle à laquelle se fait la transmission de la maladie (entre voisins ou entre des personnes de résidence éloignées). La méconnaissance des souches rend difficile l'identification des infections.

Ce travail de recherche ayant pour but d'identifier les souches de *M. leprae* circulantes en Côte d'Ivoire, pourrait apporter des éclaircissements à ces préoccupations.

2-MATÉRIEL ET MÉTHODES

2-1 APPROBATION ÉTHIQUE

Cette étude a été approuvée par le Comité National d'Éthique pour la science, de la vie et de la santé de Côte d'Ivoire comme décrit dans l'étude de **Coulibaly et al., 2020**.

2-2 POPULATION D'ÉTUDE

Les différents échantillons utilisés dans cette étude provenaient de l'Institut Raoul Follereau de Côte d'Ivoire (IRFCI), un centre de traitement de la lèpre à Adzopé dans la région de la Mé en Côte d'Ivoire. Soixante-neuf (69) patients diagnostiqués cliniquement comme faisant la lèpre et confirmés par la microscopie comme de la forme multibacillaire ont été utilisés dans cette étude. Les échantillons étaient constitués de mucus nasal et de suc dermiques prélevés au niveau du lobe de l'oreille gauche et droite des patients. Chaque prélèvement a constitué un échantillon au laboratoire ce qui a permis de collecter 207 échantillons.

2-3 EXTRACTION D'ADN

La méthode d'extraction chimique utilisée est celle décrite par **Amon et al., 2021**, en utilisant du thiocyanate de guanidine.

2-4 CONFIRMATION PAR PCR DES CAS CLINIQUES DE LÈPRE

La confirmation des cas cliniques a été réalisée par PCR conventionnelle avec pour cible les éléments répétés *RLEP* de *M. leprae*, selon le protocole décrit par **Dehe et al., 2020**.

2-5 GÉNOTYPAGE ET SÉQUENÇAGE DES SNP

La réaction PCR SNP a été réalisée à l'aide du kit de polymérase Gotaq G2 (PROMEGA, Madison, WI USA) dans un volume final de 25 µL contenant 5 µL d'ADN génomique et 10 µM d'amorces. Les marqueurs SNP aux positions 14676, 1642875 et 2935685 (système de numérotation des contraintes TN de référence) ont été évalués selon la méthode originale de Tio Coma **et al., 2019**.

Les amplifications ont été réalisées à l'aide d'un système de thermocycleur PCR GeneAmp® 9700 (Applied Biosystems, Singapour) selon le protocole de Reibel **et al., 2015**. Les produits de PCR ont été révélés dans un gel d'agarose 3% (Sigma) SybrGreen incorporé. Le séquençage a été réalisé selon la méthode décrite par **Amon et al., 2021**.

3-RÉSULTATS

3-1 CONFIRMATION DES CAS PAR PCR CLASSIQUE

L'électrophorèse sur gel d'agarose a révélé une amplification de 545 pb pour la séquence répétée *RLEP*, ce qui a donné une positivité de 100 % sur 207 échantillons analysés (Tableau I). Cette amplification a montré une spécificité de 100 % pour *M. leprae*.

Tableau I : PCR RLEP en fonction du type d'échantillons

Caractéristiques	PCR	
	Positif (%)	Négatif (%)
Gène		
<i>RLEP</i>	207 (100 %)	0 (0%)
Echantillons cliniques	Positif (%)	Négatif (%)
Suc dermique (n = 138)	138 (100 %)	0 (0%)
Mucus nasal (n = 69)	69 (100%)	0 (0 %)

3-2 AMPLIFICATION DES MARQUEURS SNPS

Les résultats de la PCR ont montré une positivité de 38,16 % (79 / 207), 50, 72 % (105 / 207) et 52,66 % (109 / 207) respectivement pour les loci 1, 2 et 3 (Tableau II). Quarante-vingt-six (86) échantillons correspondant à 58 patients ont été positifs pour les trois marqueurs SNPs. Le séquençage a été effectué sur 31 souches des 58 positifs dans cette étude en raison de la qualité d'ADN présent dans le gel. Les SNPs ont été déterminés avec un rendement de 44,52 % (31 / 69).

Tableau II : Résultats PCR des marqueurs SNPs

Gènes	locus 1 SNP (14676)		locus 2 SNP (1 642 875)		locus 3 SNP (2 935 685)	
	Positif	Négatif	Positif	Négatif	Positif	Négatif
Résultat PCR (%)	79 (38, 16 %)	128 (61,83%)	105 (50,72 %)	101 (48,79 %)	109 (52,66 %)	98 (47,34 %)

3-3 ANALYSE DES SÉQUENCES DES SNPS

L'analyse des séquences des SNPs a été réalisée pour affiner l'identification en utilisant la banque de données pour retrouver l'identité des souches. Tous les isolats analysés étaient comparés aux souches de *M. leprae* TN (AL583917.1) de l'Inde, de *M. leprae* Br4923 (FM211192.1) du Brésil, et de *M. leprae* Kyoto-2 (AP014567.1) du Japon existant déjà dans la banque de donnée NCBI. Les isolats cliniques se sont révélés très proches de ces souches en présentant 99, 48 % de similarité avec les souches de l'Inde et du Japon, et 100% de similarité avec la souche du Brésil (Tableau III).

Tableau III : Isolats de *M. leprae* et leur affiliation

Souche CIV	Affiliation	Pourcentage d'identité
<i>M. leprae</i>	<i>M. leprae</i> Br4923 (FM211192.1)	100%
	<i>M. leprae</i> Kyoto-2 (AP014567.1)	99,48%
	<i>M. leprae</i> TN (AL583917.1)	99,48%

3-4 IDENTIFICATION DES ISOLATS CLINIQUES

Pour déterminer l'origine possible de *M. leprae* trouvé dans les échantillons, les polymorphismes

mononucléotidiques (SNP) ont été analysés sur 3 loci signalés dans le génome de *M. leprae*. Une amplification par PCR suivie d'un séquençage direct a permis d'identifier la séquence sur les 3 loci.

L'analyse des trois positions génomiques polymorphes qui sont à la base du système de typage SNP a permis de constater que toutes les 31 souches de *M. leprae* qui ont été séquencées appartenaient au même groupe, dont le génotype 4 (Tableau III).

Ce type de SNP se caractérise par les nucléotides T, T et C qui constituent un code (TTC). Ce code a été trouvé pour les séquences obtenues par une substitution de C par T, une substitution de G par T et une substitution de A par C aux positions génomiques 14676, 1642875 et 2935685 respectivement (Figure 1).

Tableau III : Caractéristiques des mutations dans les polymorphismes mononucléotides (SNPs)

Marqueurs	Codon sauvage	Codon muté	Acide aminé muté
SNP14676	CCA	CTA	Pro ---> Leu
SNP1642875	CGT	CTT	Arg ---> Leu
SNP2935685	GAG	GCG	Glu ---> Ala

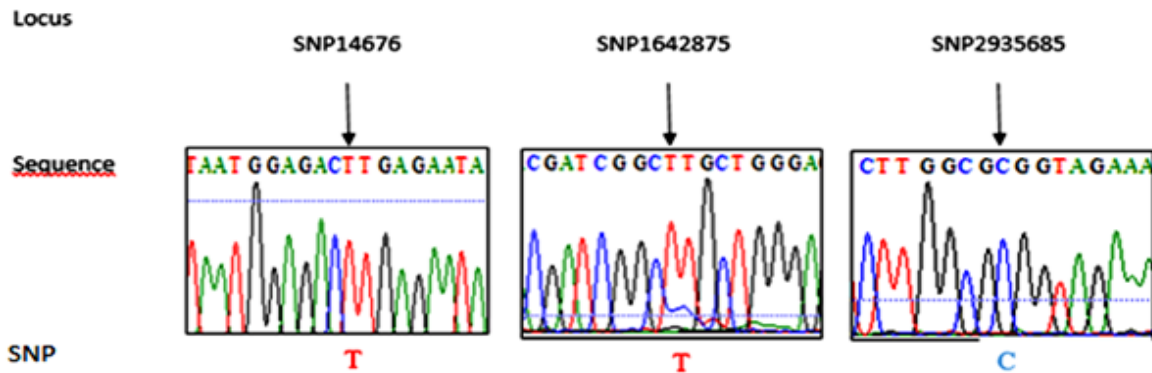


Figure 1 : Portions de chromatogrammes obtenus après séquençage des SNPs 14676 1642879 et 2935693 d’une souche ivoirienne. (Amon *et al.*, 2021)

4-DISCUSSION

La côte d’Ivoire, pays situé en Afrique de l’Ouest a éliminé la lèpre en tant que problème de santé publique depuis 2001 avec l’application de la polychimiothérapie dans les centres de traitements, tel que l’Institut Raoul Follereau d’Adzopé (Koffi *et al.*, 2018). Cependant, selon les estimations du Programme National d’Élimination de la lèpre cette maladie est encore loin d’être éradiquée. En effet, 567 nouveaux cas ont été dépistés en 2019 avec un taux d’infirmité de degrés II élevé à 22, 57% (OMS, 2020).

Pour comprendre la chaîne de transmission de la bactérie causale et déterminer la variabilité génétique des souches circulantes en Côte d’Ivoire, une analyse des marqueurs de polymorphismes d’un seul nucléotide (SNP) a été réalisée sur des échantillons provenant de patients multi-bacillaires qui fournissent suffisamment d’ADN chargé de bacilles. Dans cette étude, les échantillons ont été obtenus à partir de patients diagnostiqués à Adzopé dans la région de la Mé. En Côte d’Ivoire, malgré de nombreuses études sur la lèpre, l’épidémiologie moléculaire de *M. leprae* n’a pas encore été élucidée. Des études récentes ont rapporté quatre génotypes définis par trois SNPs. Les SNPs, qui sont rares chez *M. leprae*, ont été signalés comme étant utiles pour retracer la propagation mondiale de la lèpre (Salipante *et al.*, 2011). La présente étude a exploré la diversité génétique de *M. leprae* en utilisant des marqueurs SNPs pour révéler la dis-

tribution de la lèpre en Côte d’Ivoire. Cependant, après comparaison des séquences obtenues dans chaque locus avec la base de données GenBank (BLAST), une grande similarité (99-100%) a été établie entre la séquence de référence (TN) et les séquences des souches de la Côte d’Ivoire. Initialement, les analyses basées sur la PCR ont identifié quatre principaux types de SNP de 1 à 4. Cette classification a permis d’évaluer la distribution phylogéographique des preuves archéologiques dans le cadre de la distribution des souches modernes (Benjak *et al.*, 2018). Par la suite, les quatre principaux types de SNP ont été résolus en 16 sous-types de A à P (Schuene-mann *et al.*, 2018). La distribution des types de SNP est en corrélation avec la localisation géographique de *M. leprae*. Cette distribution pourrait s’expliquer en grande partie par les principaux mouvements de populations (Pfrengle *et al.*, 2021). En outre, il a été suggéré que le SNP de type 4 correspondant au génotype 4 de *M. leprae* est apparu en Afrique de l’Ouest (Pfrengle *et al.*, 2021). Les types de SNPs ont été examinés sur la base des polymorphismes nucléotidiques aux positions 14676, 164275 et 2935685 de l’ADN génomique de *M. leprae*. Quatre types de SNPs ont été rapportés selon les études. Il s’est agi des type 1 (CGA), type 2 (CTA), type 3 (CTC) et type 4 (TTC) (Phetsuksiri *et al.*, 2012). Le génotype 1 de *M. leprae* s’est avéré être répandu en Asie, dans les îles Pacifiques de la Nouvelle-Calédo-

nie et en Afrique de l'Est. Le type 3 a été observé dans les pays européens et les continents américains. Le type 2 serait localisé dans les souches de l'Éthiopie, Malawi, Népal, Inde du Nord et de Nouvelle Calédonie. Le type 4 a été retrouvé chez les souches de l'Afrique de l'Ouest et des Caraïbes (Benjak *et al.*, 2018). De plus, la seule souche circulante en Côte d'Ivoire est le génotype 4 de *M. leprae* obtenu à partir de tous les échantillons analysés. Ce type de génotype a été décrit dans les pays de l'Afrique de l'ouest, confirmant les résultats de la présente étude. Les SNPs de type 4 se seraient propagés en Afrique de l'Ouest pendant la période de la traite négrière (Holande *et al.*, 2020). En effet, la maladie de la lèpre était très répandue parmi les esclaves. Environ quatre millions d'esclaves ont été amenés du Brésil entre le 17^e et 19^e siècle. En Afrique de l'Ouest, les SNPs de type 4 ont été retrouvés au Bénin, au Mali, en Guinée et au Niger (Benjak *et al.*, 2018). La présence du génotype 4 dans ces pays voisins à la Côte d'Ivoire suggère une importation de ces souches. Ce sont les échanges avec ces pays et surtout l'hospitalité ancestrale et légendaire qui favoriseraient la présence de ce génotype dans le pays. La présence de cette souche au Brésil, en Corée et en Inde témoigne de l'exportation de ces souches dans ces pays. Cependant, beaucoup d'autres souches sont partagées avec le Brésil et l'Inde. Cela suggérerait des échanges plus fréquents de la lèpre entre ces pays et la Côte d'Ivoire.

Dans l'état de la Corée, la main-d'œuvre servile d'Afrique de l'Ouest était utilisée dans les plantations de canne à sucre pendant la période coloniale (Turankar *et al.* 2014 ; Fontes *et al.* 2015). Ainsi, la prédominance du génotype 4 en Corée serait directement liée aux esclaves ouest-africains (Matsuoka *et al.*, 2018). La prédominance du génotype 4, souche majoritairement asiatiques (Inde/Corée) et sud-américaine (Brésil), en Côte d'Ivoire pourrait aussi s'expliquer par la similarité du climat tropical de ces pays. Les analyses des SNPs permettent de dire que l'importation de la souche s'est éloignée dans le temps. Selon le schéma évolutif des souches de *M. leprae*, la souche typique de la Côte d'Ivoire, le génotype 4, a pour ancêtre le plus proche le

génotype 1 par deux substitutions au niveau du nucléotide G en T à la position 1642875 et du nucléotide A en C à la position 2935685. Le génotype 1 circule en Inde, en Corée du Sud, en Thaïlande et en Philippines. Cela suggère que cette souche mère proviendrait certainement de l'Inde et de Corée. Cependant, cette souche appartient à une même descendance et pourrait provenir de la transmission d'une seule souche depuis longtemps.

L'analyse phylogénétique des souches de *M. leprae* isolées en Côte d'Ivoire a montré que les souches de Côte d'Ivoire sont proches de celles du Brésil, de l'Inde et du Japon montrant une bonne corrélation entre l'origine géographique et le génotype 4 de *M. leprae* (Reibel *et al.*, 2015). La distribution phylogéographique des souches *M. leprae* dans le monde est dite associée avec les populations hôtes (Benjak *et al.*, 2018). Le génotype 4 de *M. leprae* des cas de lèpre diagnostiqués en Côte d'Ivoire s'alignent à leur distribution dans différentes régions du monde. Cependant, l'arbre phylogénétique montre que certains isolats s'éloignent plus ou moins de la souche de référence à cause de la variabilité génétique existant chez l'espèce *M. leprae* (Barreto *et al.*, 2011). Le pouvoir de discrimination ou de résolution de l'analyse du profil phylogénétique peut présenter des limites dans l'identification d'espèces de *M. leprae* génétiquement proches. Mais, sa combinaison avec l'analyse des régions hypervariables confère une excellente précision et une grande fiabilité à cette identification. Les résultats ont montré que de toutes les lignées principales existantes dans le monde, seul le génotype 4 circule en Côte d'Ivoire. Cela signifie que des échanges se sont faits entre la Côte d'Ivoire et d'autres régions du monde. Cette étude constitue la première qui décrit la distribution des souches de *M. leprae* circulant en Côte d'Ivoire. Malgré le niveau de discrimination relativement faible des SNPs utilisés, cette méthode permet une classification reconnue des souches de *M. leprae* dans le monde, une classification en concordance avec toutes les autres classifications faites avec les autres marqueurs génétiques. Cette limite n'a donc pas d'impact sur les objectifs de cette étude.

5-CONCLUSION

Le génotype 4 a été le seul génotype observé de tous les cas de lèpre diagnostiqués en Côte d'Ivoire. Ce type de génotype a été trouvé dans les pays de l'Afrique de l'Ouest, et identifié comme étant proche de l'Inde, du Japon, et du Brésil. Une étude dans différentes régions endémiques de Côte d'Ivoire permettrait de mieux évaluer la distribution de ce génotype.

LE FINANCEMENT

Cette étude a été financée par l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire.

REMERCIEMENTS

Les auteurs adressent leur remerciement à la direction de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire pour le financement des travaux de cette étude et l'Institut Raoul Follereau de Côte d'Ivoire pour la collecte des échantillons.

CONFLIT D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêts.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adhikari B., Shresthak P., Kaehler N., Raut S. & Chapman R.S. 2013. Community attitudes towards leprosy affected persons in Pokhara municipality of western Nepal. *Journal of Nepal Health Research Council*, 11: 264-268.
- Aubry P., & Gauzère B. 2021. Maladies tropicales négligées. *Medecine tropicale*. 56 : 344-356.
- Amon AC., Coulibaly ND., Dehe BR., Kouakou H., Kakou-N S., Djaman AJ., Bamba V., & Dosso M. 2021. SNP Typing of *Mycobacterium leprae* Clinical Strains in Côte d'Ivoire Reveals Genotype 4 Circulating. *American Journal of Biomedical Research*, 9 (2): 30-35.
- Anonyme, 2018. Données du Programme National d'Élimination de la Lèpre (PNEL) Côte d'Ivoire. Rapport annuel, 2p.
- Araujo S., Freitas L., Goulart L. & Goulart I. 2016. Molecular Evidence for the Aerial Route of Infection of *Mycobacterium leprae* and the Role of Asymptomatic Carriers in the Persistence of Leprosy. *Clinical Infectious Diseases*, 63 (11) : 1412-1420.
- Barreto J., Guimarães L., Leão M., Ferreira D., Lima R. & Salgado C. 2011. Anti-PGL-I seroepidemiology in leprosy cases: household contacts and school-children from a hyperendemic municipality of the Brazilian Amazon. *Leprosy Review*, 82: 358-370.
- Benjak A., Avanzi C., Singh P., Loiseau C., Girma S., Busso P., Fontes B., Miyamoto Y., Namisato M., Bobosha K., Salgado C., Silva M., Bouth R., Frade C., Filho F., Barreto J., Nery J., Bühner-Sékula S., Lupien A., Al-Samie A., Al-Qubati Y., Alkubati A., Bretzel G., Vera Cabrera L., Sakho F., Johnson C., Kodio M., Fomba A., Sow S., Gado M., Konaté O., Stefani M., Penna G., Suffys P., Sarno E., Moraes M., Rosa P., Baptista I., Spencer J., Aseffa A., Matsuoka M., Kai M. & Cole S. 2018. Phylogenomics and antimicrobial resistance of the leprosy bacillus *Mycobacterium leprae*. *Naure Communications*, 9: 352.
- Cambri G. & Mira M. 2018. Genetic Susceptibility to Leprosy From Classic Immune-Related Candidate Genes to Hypothesis-Free, Whole Genome Approaches. *Frontiers Immunology, Paraná (Brésil) Vol 9*, 1674 p.
- Coulibaly N, D, Dehe B, R, Kakou-N, S, Kouakou H, Amon A, C, Sylla A, Bidie A, Bamba V, Dosso M, 2020.
- Drugs Susceptibility Testing in Leprosy Patients from Côte d'Ivoire Reveals Multidrug Resistance Combination Cases to Dapsone, Rifampicin and Ofloxacin. *Am J Microbiol Res*, 8(4), 160-163.
- Dehe B., Coulibaly N., Kouakou H., Amon A., Kakou-N., Bamba V., Bidie A. & Dosso M. 2020. Comparative assessments of polymerase chain reaction (PCR) assay of repetitive sequence (RLEP) and proline rich antigen (PRA) gene targets for detection of *Mycobacterium leprae* DNA from paucibacillary (PB) and multibacillary (MB) patients in Côte d'Ivoire (CI). *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 11, 01: 085-092.
- Fofana M., 2019.** Aspects épidémiologiques et cliniques de la lèpre chez la femme à l'Institut Raoul Follereau de Côte d'Ivoire (IRF-CI), centre d'Adzope de 2013 à 2017. Thèse de Doctorat en Médecine. Université Peleforo Kong Coulibaly de Korogho, Korogho, Côte d'Ivoire, 169 p.

- Fontes A., Gomes H., Araujo M., Albuquerque E., Baptista I., & Moura M. 2015. Génotypage de *Mycobacterium leprae* présent sur des lames microscopiques colorées au Ziehl-Neelsen et dans des échantillons de biopsie cutanée de patients atteints de lèpre dans différentes régions géographiques du Brésil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 107 (1):143-149.
- Holanda M., Marques L., Macedo M., Pontes M., Sabadia J., Kerr L., Almeida R., & Frota C. 2020. Présence de *Mycobacterium leprae* de génotype 4 dans les eaux environnementales du nord-est du Brésil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 50 (2) : 135-139.
- Koffi Olivier Yao, Tia Yomi Félicien, Kouame Atta, Yoro Marcel Blé, Kone Drissa. 2018.
- Facteurs associés au retard du diagnostic et du traitement de la lèpre en côte d'ivoire : cas des patients sous traitement à l'Institut Raoul Follereau d'Adzope. *Revue espace territoires société et santé* 1(1) 108-119.
- Lavania M., Jadhav R., Turankar R., Singh I., Nigam A., & Sengupta U. 2015. Genotyping of *Mycobacterium leprae* strains from a region of high endemic leprosy prevalence in India. *Infect, Genetics and Evolution*, 36:256-261.
- Matsuoka M., Izumi S., Budiawan T., Nakata N., & Saeki K. 2018. *Mycobacterium leprae* ADN quotidiennement en utilisant de l'eau comme source possible d'infection par la lèpre. *Indian Journal of Leprosy*, 71 (1):61-67.
- Mateus de Souza Ribeiro Mioni, Karim Sidi-Boumedine, Felipe Morales Dalanezi,
- Sâmea Fernandes Joaquim, Renan Denadai, Wanderson Sirley Reis Teixeira, Marcelo Bahia Labruna, Jane Megid 2020. New Genotypes of *Coxiella burnetii* Circulating in Brazil and Argentina. *Pathogens* 9 : 30
- Morgil H., Gercek Y, Tulum I. 2020. "Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in plant genetics and breeding," in *The Recent Topics in Genetic Polymorphisms*, ed M. Çalişkan (London: InTech Open), 825-400.
- Nobre M., Illarramendi X., Dupnik K., Hacker M., Nery J., Jerônimo S. & Sarno E. 2017.
- Multibacillary leprosy by population groups in Brazil: Lessons from an observational study. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11 (2) : 5364.
- OMS 2020, Situation de la lèpre (maladie de Hansen) dans le monde, 2019: le moment est venu d'intensifier les initiatives de prévention Relevé épidémiologique hebdomadaire 95 (36) 417-440.
- OMS., 2019. Situation de la lèpre dans le monde 2019 : nécessité d'un dépistage précoce des cas. *Relevé Epidémiologique Hebdomadaire*, 90:461-474.
- Pfrengele S., Neukamm J., Guellil M., Keller M., Molak M., Avanzi C, Kushniarevich A., Montes N., Neumann G., Reiter E., Tukhbatova R., Berezina N., Buzhilova A., Korobov D., Hamre S., Matos V., Ferreira M., González-Garrido Laura., Wasterlain S., Lopes Célia., Santos A., Antunes-Ferreira N., Duarte Vitória., Silva A., Melo L., Sarkic N., Saag Lehti., Tambets Kristiina., Busso Philippe., Stewart T., Avlasovich A., Charlotte A., Alison S., Craig C., Robb John., Krause Johannes., Scheib C., Inskip S. & Schuenemann V. 2021. *Mycobacterium leprae* diversity and population dynamics in medieval Europe from novel ancient genomes. *BMC Biology*. 19 : 220.
- Phetsuksiri B., Srisungngam S., Rudeeaneksin J., Bunchoo S., Lukebua A., Wongtrungkapun R., Paitoon S., Sakamuri R., Patrick J., Brennan M., & Vissa V. 2012.
- SNP Genotypes of *Mycobacterium leprae* Isolates in Thailand and Their Combination with *rpoT* and *TTC* Genotyping for Analysis of leprosy Distribution and Transmission. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 65:52-56.
- Reibel F., Chauffour A., Brossier F., Jarlier V., Cambau E. & Aubry A. 2015. New Insights into the Geographic Distribution of *Mycobacterium leprae* SNP Genotypes Determined for Isolates From Leprosy Cases Diagnosed in Metropolitan France and French Territories. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6 (1):57-71.
- Richardus J. & Oskam L. 2015. Protecting people against leprosy: Chemoprophylaxis and immunoprophylaxis. *Clinics in Dermatology*, 33: 19-25.
- Sarkar R. & Pradhan S. 2016. Leprosy and women. *International Journal Women's Dermatology*, 2:117-121.
- Salipante S. & Hall B. 2011. Vers l'épidémiologie moléculaire de *Mycobacterium leprae* : Stratégies, réussites et lacunes. *Infection Genetics Evolution*, 11 (7): 1505-1513.
- Schuenemann V., Avanzi C., Krause-Kyora B., Seitz A., Herbig A., Inskip S. 2018. Ancient genomes reveal a high diversity of *Mycobacterium leprae* in medieval Europe. *PLoS Pathogens*. 14 (5):1006997.
- Sigg N., 2019. Interêt de la PCR quantitative dans de diagnostic de la lèpre, et impact du type et du nombre de sites prélevés. Thèse de Doctorat en médecine. Université d'Angers, Angers, France. 74p.

- Serrano-Coll H., Mora H., Beltrán J., Duthie M. & Cardona-Castro N. 2019. Social and environmental conditions related to *Mycobacterium leprae* infection in children and adolescents from three leprosy endemic regions of Colombia. *BMC Infectious Diseases*, 19: 520.
- Sigg N., Marion E., Gnimavo R., Johnson R., Martin L. & Habib A. 2019. Intérêt de la PCR quantitative pour le diagnostic de la lèpre. Étude en milieu rural au Bénin. *Annales de dermatologie et de vénéréologie*. 146 (12) : 276-277.
- Turankar R., Lavania M., Chaitanya V., Sengupta U., Darlong J., & Darlong F. 2014. Typage moléculaire basé sur le polymorphisme nucléotidique unique de *M. leprae* de familles multicas de patients atteints de la lèpre et de leur environnement pour comprendre la transmission de la lèpre. *Clinical Microbiology and Infection* 20 (3):142-149.
- Tió-Coma M., Wijnands T., Pierneef L., Schilling A., Alam K., Roy J., Faber W., Menke H., Pieters T., Stevenson K., Richardus J. & Geluk A. 2019. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA in soil: multiple needles in the haystack. *Sciences Reports*, 9:3165.
- Vieira M., Nery J., Paixão E., Andrade K., Penna G. & Teixeira M. 2018. Leprosy in children under 15 years of age in Brazil: A systematic review of the literature. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 12: 6788.
- Waing Waing Moe, Sann Wisés Namwat, Kiaticchai Faksri, Thyn Lei Swe, Kyi Kyi Swe, Thandar Thwin, Arunnee Sangka 2020. Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* using 24-locus MIRU-VNTR typing and Spoligotyping in Upper Myanmar. *The journal of infection in developing countries* 14(11):1296-1305.
- Wang Dong, Ruiyang Tao, Zhiqiang Li, Dun Pan, Zhuo Wang, Chengtao Li, Yongyong
- Shi 2020. STRsearch: a new pipeline for targeted profiling of short tandem repeats in massively parallel sequencing data. *Hereditas* 157:8
- Wang X., Jordan I. & Mayer L. 2015. Chapter 29 - A Phylogenetic Perspective on Molecular Epidemiology, *Molecular Medical Microbiology*, Second Edition, Atlanta (USA), pp 517-536.
- Zeukeng Francis, Anthony Ablordey, Solange E. Kakou-Ngazon, Stephen Mbigba, Ghogomu, David N'golo Coulibaly, Marie Thérèse Ngo Nsoga, Wilfred Fon Mbacham, Jude Daiga Bigoga, Rousseau Djouaka 2021. Community-based geographical distribution of *Mycobacterium Ulcerans* VNTR-genotypes from the environment and humans in the Nyong valley, Cameroon. *Tropical Medicine and Health* 49 :41.