

TABLE DES MATIERES

DEDICACE.....	I
REMERCIEMENTS.....	II
RESUME.....	IV
ABSTRACT	V
TABLE DES MATIERES	VI
GLOSSAIRE.....	XI
LISTE DES TABLEAUX	XIII
LISTE DES FIGURES.....	XIV
I INTRODUCTION.....	1
II GENERALITES	4
II.1 Generalites sur la tuberculose.....	4
II.1.1 De l'infection à la maladie	4
II.1.2 Diagnostic.....	4
II.1.3 Traitement	5
II.1.4 Prévention.....	5
II.2 Les mycobactéries :	6
II.2.1 Taxonomie.....	6
II.2.2 Caractéristiques de <i>M. tuberculosis</i>	7
II.2.2.1 Caracteristiques morphologiques et phenotypiques.....	7
II.2.2.2 Le génome de <i>M.tuberculosis</i>	7
II.2.2.3 Les marqueurs genetiques de <i>M.tuberculosis</i>	8
II.2.2.4 Méthodes de géotypage de <i>M. tuberculosis</i>	10
II.2.3 Classification des souches du complexe <i>M.tuberculosis</i> (MTBC):	14
II.3 Base de données	16
II.4 Epidémiologie moléculaire des souches <i>M. tuberculosis</i> à Madagascar	17
II.5 Etude épidémiologique de la tuberculose utilisant le système d'information géographique (SIG).....	17
III MATERIELS ET METHODES	18
III.1 Recrutement.....	18
III.2 Methodes	21
III.2.1 Extraction d'ADN à partir de lames de diagnostic.....	21
III.2.1.1 Principe.....	21

III.2.1.2 Méthodes :	21
III.2.2 Spoligotyping	21
III.2.2.1 Principe.....	21
III.2.2.2 Méthodes	23
III.2.3 Enregistrement des données	31
III.2.3.1 Attribution des numeros IPM	31
III.2.3.2 Saisie des données et résultats sur Excel.....	31
III.2.4 Validation des résultats	31
III.2.5 Classification des souches	31
III.2.6 Analyse des clusters spatiaux de cas de tuberculose à Antananarivo :	31
III.2.7 Cartographie des Spoligotypes sur le logiciel Quantum Gis®.....	33
III.2.8 Association cluster spatial de cas et cluster génotypique.....	33
III.2.9 Analyse statistique.....	34
IV RESULTATS	35
IV.1 Caractéristiques de la population d'étude	35
IV.2 Distribution des patients selon leur tranche d'âge et leur sexe.....	37
IV.3 ANALYSE BACTERIOLOGIQUE des échantillons	38
IV.4 Résultat du spoligotyping sur membrane	39
IV.5 Genotypage des extraits de lames et de cultures	40
IV.6 Description des spoligotypes par comparaison des profils obtenus à la base de données internationale (Sitvitweb)	41
IV.6.1 Description des spoligotypes obtenus à partir des ADN extraits des lames de diagnostic	41
IV.6.2 Description et distribution des spoligotypes obtenus à partir des ADN extraits de culture.	43
IV.6.3 distribution des spoligotypes concordants entre les profils d'extraits de lame et culture	44
IV.7 Définition du nouveau cluster spatial de cas de tuberculose	45
IV.8 Cartographie des spoligotypes majeurs de <i>M. tuberculosis</i> à Antananarivo renivohitra a partir des extraits de cultures	47
IV.9 Analyse association cluster spatial de cas et clusters génotypiques à partir des extraits de cultures	49
V DISCUSSION	50
VI CONCLUSION ET PERSPECTIVES	53

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	54
ANNEXES.....	59

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	: Acide DesoxyriboNucléique
ARN	: Acide RiboNucléique
ARNr	: ARN ribosomal
BAAR	: Bacille Acido-Alcool-Resistante
BCG	: Bacille de Calmette et Guérin
BK	: Bacille de Koch
C	: Cyclosérine
CAS	: Central-Asian
CAP	: Capréomycine
CDT	: Centre de Diagnostic et de traitement de la Tuberculose
CMTB	: Complexe <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
CRISPR	: Clustured Regularly Interspersed Short Palindromic Repeats
DLT	: Direction de Lutte Contre la Tuberculose
DNTP	: DesoxyriboNucléotide Tri-Phosphate
DOTS	: Directly Observed Treatment Short Course
DR	: Direct Repeat
E	: Ethambutol
EAI	: East-African-Indian
EDTA	: Ethylène Diamine Tétra-Acétique
EDAC	: 1-ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbonimide
ET	: Ethionamide
ETR	: Exact tandem repeats
GC	: Guanine-Cytosine
GTG	: Guanine-thymine-guanine
H ou INH	: Isoniazide
IDR	: Intradermoréaction à la tuberculine
IFN- γ	: Interferon-gamma
IL	: Interleukine
IS	: Insertion Sequence, Séquence d'Insertion
IPM	: Institut Pasteur de Madagascar
ITL	: Infection Tuberculeuse Latente
K	: Kanamycine

LAM	: Latin-American-Mediterranean
LSP	: Large Sequence Polymorphism
LJ	: Loweinstein Jensen
MDR	: Multi Drug-Resistant
MIRU	: Mycobacterial Interspersed Repetitive Units
MPTR	: Major polymorphic tandem repeats
MTBC	: <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Complex
nsSNPs	: SNPs non synonymes
O	: Ofloxacin
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PGGs	: Principaux groupes génétiques
PGRS	: Polymorphic GC-rich sequences
PIT	: Primo-infection tuberculeuse
PNLT	: Programme National de Lutte contre la Tuberculose
R ou RIF	: Rifampicine
RD	: Region of Deletion
S	: Streptomycine
SIG	: Système d'Information Géographique
SDS	: Sodium Dodecyl Sulfate
SNPs	: Single nucleotid polymorphism
sSNP	: SNPs synonymes
SSPE	: Solution Saline Phosphate EDTA
ST	: Shared Type
TB	: Tuberculose
tbD	: délétion spécifique chez <i>Mycobactérium tuberculosis</i>
TDO	: Traitement directement observé
TPM+	: Tuberculose Pulmonaire à Microscopie Positive
VIH	: Virus de l'Immunodéficience Humaine
VNTR	: Variable Number Tandem Repeat, répétition en tandem en nombre variable
XDR	: extensively Drug-Resistant
Z	: Pyrazinamide

GLOSSAIRE

Asthénie : affaiblissement de l'organisme, fatigue physique.

Asymptomatique : qualificatif d'une maladie qui ne manifeste pas de symptômes.

Cluster génotypique : ensemble de souches ayant les mêmes génotypes.

Cluster spatial de cas de tuberculose : agrégat de cas de tuberculeux regroupés spatialement dont le taux de cas rapporté à la population est significativement supérieur au reste.

Dépistage : Recherche systématique, au moyen d'un test ou par enquête, des individus qui sont suffisamment exposés à un trouble donné sans pourtant avoir consulté pour ses symptômes pour tirer profit de recherches plus poussées ou d'une action préventive directe

Exhaustif : Qui inclut tous les éléments possibles d'une liste.

DOTS : Stratégie de lutte contre la tuberculose qui comprend diagnostic par examen microscopique, l'approvisionnement garanti en médicaments, le traitement sous observation directe, le suivi et le compte rendu systématique.

Epidémie : Importante multiplication des cas d'une maladie ou d'un phénomène pathologique donné dans une collectivité ou une région.

Génotypage : Le génotypage est la discipline qui vise à déterminer l'identité d'une variation génétique, à une position spécifique sur tout ou partie du génome, pour un individu ou un groupe d'individus donné appartenant à une espèce animale, végétale, fongique.

Génotype : Ensemble des caractéristiques génétiques d'un individu.

Incidence : L'incidence d'une maladie donnée est le nombre de nouveaux cas observés de cette maladie pendant une période donnée rapporté à la population exposée au risque pendant la période donnée. L'incidence correspond au risque moyen de contracter la maladie pendant la période étudiée pour n'importe quel individu de la population étudiée.

La prévalence : La prévalence est le nombre total de cas observés (nouveaux + anciens) à un moment donné sur la population dont sont issus les cas. Elle mesure la présence d'une maladie dans la population. La prévalence dépend de l'incidence et de la durée de la maladie. La prévalence est également un outil utilisé pour la planification des ressources sanitaires.

Maladie endémique : maladie constamment présente dans une population.

Morbidité : La morbidité est la fréquence des pathologies dans les populations c'est-à-dire le nombre de malades rapporté à la population étudiée pendant une période donnée.

Phénotype : L'ensemble des caractères observables chez un individu.

Phusion : enzyme DNA polymerase

Polymorphisme : diversité de forme ou d'aspect

Promiscuité : situation où plusieurs personnes sont contraintes à vivre dans un espace restreint.

Spoligotyping : technique de génotypage basée sur le polymorphisme de la région DR chez *Mycobacterium tuberculosis*

Spoligotype : génotype obtenu après « spoligotyping »

Subfebrilité : légère élévation de la température (non fiévreuse)

Quiescent : phase de repos, temps durant lequel une cellule arrête de se diviser et sort de son cycle cellulaire.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Liste des CDT inclus dans l'étude.....	18
Tableau 2: Dilution des solutions mères de sonde de capture pour le marquage de la membrane.....	26
Tableau 3 : Composition du mix réactionnel pour la PCR	27
Tableau 4 : Distribution des patients inclus par CDT de recrutement	35
Tableau 5 : Caractéristiques démographiques et cliniques de la population d'étude.....	36
Tableau 6 : Distribution des profils spoligotypes obtenus à partir des extraits de lames.....	42
Tableau 7 : Distribution des spoligotypes obtenus à partir des extraits des souches obtenues	44
Tableau 8 : Distribution des spoligotypes concordants entre profils spoligotypes des extraits de lames et cultures	45
Tableau 11 : Taux de clusterisation des ST à l'intérieur et à l'extérieur du cluster spatial de cas de tuberculose.....	49
Tableau 12 : Distribution des 13 ST majeurs dans le cluster et en dehors du cluster spatial de cas.....	49

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Taxonomie des mycobactéries.....	6
Figure 2: Image de <i>M. tuberculosis</i> par microscopie électronique à balayage (21228x).....	7
Figure 3 : Schéma représentatif de 12 loci MIRU-VNTR sur le génome de H37RV.....	9
Figure 4: Structure du locus DR chez le CMTB	10
Figure 5 : Les 3 étapes d'une amplification par PCR ou « Polymerase Chain Reaction ».	11
Figure 6 : Représentation du chromosome de <i>M.bovis</i> avec la région IS6110, les sites de restriction et le sonde de l'IS6110 utilisé pour le génotypage.....	12
Figure 7 : Classification du Complex <i>Mycobacterium tuberculosis</i> à partir des signatures spoligotypes et de leur régions de provenance	15
Figure 8: Schéma récapitulatif du circuit de recrutement jusqu'aux analyses.....	20
Figure 9: Schéma récapitulatif des différentes étapes du «Spoligotyping».	22
Figure 10: Photo du Minibolotter MN 45 (BIOMETRA).....	24
Figure 11: Etapes du marquage de membrane	25
Figure 12 : Image du thermocycleur MULTIGEN™ (LABNET).....	27
Figure 13 : Principe de la révélation de l'hybridation par autoradiographie.....	30
Figure 14 : Clusters spatiaux de cas de tuberculose à Antananarivo en 2004, 2005 et 2006...	32
Figure 15 : Clusters spatiaux de cas de tuberculose à Antananarivo en 2010 et 2011.....	33
Figure 16 : Recrutement des patients de l'étude	36
Figure 17 : Distribution des 441 patients inclus par tranches d'âge et sexe	37
Figure 18 : Description des échantillons obtenus.....	38
Figure 19: Exemple de film d'autoradiographie.	39
Figure 20 : Résultats du génotypage des souches à partir des ADN extraits de lames et de cultures	40
Figure 21 : Cluster spatial de cas de tuberculose à Antananarivo défini par l'association des clusters en 2004, 2005, 2006, 2010 et 2011.	46
Figure 22 : Distribution des 13 ST majeurs de <i>M. tuberculosis</i> à Antananarivo Renivohitra .	48

I INTRODUCTION

La tuberculose dont l'agent étiologique est *Mycobacterium tuberculosis* ou Bacille de Koch (BK) figure parmi les maladies infectieuses les plus meurtrières au monde. Elle demeure un problème de santé publique mondiale, accentué par la co-infection par le VIH-SIDA et l'émergence de souches multi-résistantes (MDR) et extra-résistantes (XDR) aux antituberculeux. Les souches MDR sont définies comme résistantes aux deux antibiotiques majeurs du traitement antituberculeux, la rifampicine (RIF) et l'isoniazide (INH). Tandis que les souches XDR sont définies comme à la fois MDR et résistantes à une quinolone et à au moins un antituberculeux de seconde ligne injectable. Cette situation rend difficile la lutte contre la tuberculose. En 2013, l'organisation mondiale de la santé a estimé que 9 millions de personnes ont contracté cette maladie et 1,5 millions en sont décédées dont 360 000 co-infectées par le VIH/SIDA. L'Afrique compte la plus grande proportion de nouveaux cas avec plus de 280 cas pour 100 000 habitants en 2013 (WHO, report 2014).

A Madagascar, d'après la Direction de Lutte contre la Tuberculose (DLT), 27 583 cas de tuberculose, toutes formes confondues, dont 17 907 nouveaux cas de tuberculose pulmonaire à microscopie positive ou TPM+ ont été dépistés en 2013 ; 8,14 % sont des enfants de 0 à 14 ans ce qui place Madagascar parmi les pays avec une forte prévalence en tuberculose. L'évaluation de la résistance aux antituberculeux des souches *M. tuberculosis* à Madagascar a montré un taux de MDR primaire de 0,2% et un taux de MDR acquise de 3,4 % (Ramarokoto *et al.*, 2010).

A Madagascar, le diagnostic et le traitement des cas de tuberculose sont pris en charge par la DLT. Le diagnostic dans les Centre de Diagnostic et de Traitement de la Tuberculose (CDT) de Madagascar se fait généralement par la bacilloscopie ou le dépistage des bacilles par la microscopie. La culture de BK sur milieu spécifique est le test de référence en diagnostic. Elle est plus sensible avec un seuil de détection de 10 à 100 bacilles/ml de crachat. La culture de bactéries sur milieu spécifique est aussi utilisée pour les tests de sensibilité aux antituberculeux (antibiogrammes). A Madagascar, ces antibiogrammes sont effectués uniquement au laboratoire de référence à l'Institut Pasteur de Madagascar (IPM).

Selon la stratégie DOTS ("Directly Observed Treatment Short course"), le traitement de la tuberculose suit un régime composé de quatre antibiotiques principaux: la rifampicine, l'isoniazide, l'éthambutol et la pyrazinamide. L'administration de ces antibiotiques est

effectuée dans les CDT sous observation direct du personnel de la santé suivant la recommandation de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS).

Selon les objectifs fixés par l'OMS, la DLT projette de réduire la tuberculose dans la population en augmentant le taux de détection et le taux de guérison, et en diminuant le taux de perdus de vue (PNLT, 2011). Cependant, ces actions requièrent beaucoup de ressources. L'identification des zones de transmission active de la tuberculose pourrait permettre d'orienter les stratégies de lutte contre la tuberculose. Les études d'épidémiologie classiques basées sur des enquêtes subjectives peuvent être utilisées pour suivre la transmission. Cependant, leurs applications sont limitées par leurs durées et leurs complexités.

Des techniques moléculaires de typage ont été développées pour la caractérisation, l'identification et la classification des souches *M. tuberculosis* et peuvent être utilisés pour l'épidémiologie moléculaire des souches cliniques. Des études ont montré l'utilisation de l'épidémiologie moléculaire pour apprécier la circulation des souches à Madagascar (Razanamparany *et al.*, 2009). L'utilité de l'épidémiologie moléculaire repose sur le fait que, les patients infectés par une même souche sont le résultat d'une transmission récente, alors que ceux infectés par des souches différentes sont des cas de transmission à distance suivie soit d'une activation de tuberculose latente, soit d'une réactivation d'une tuberculose ancienne (Burgos and Pym, 2002).

La réalisation des tests moléculaires pour les patients des centres de santé périphériques est cependant limitée par le transport des produits biologiques potentiellement dangereux vers l'IPM où les tests sont réalisés. Ainsi, la présente étude met en œuvre l'utilisation des extraits de lame de diagnostic de la tuberculose pour le génotypage vu que les lames sont plus faciles à transporter et ne nécessitent pas de moyen particulier de conservation.

Par ailleurs, des analyses de données d'imagerie spatiale au moyen du système d'information géographique ou SIG ont permis la localisation des foyers infectieux ou cluster de cas de tuberculose à Antananarivo. Ces études menées à l'IPM ont permis de détecter un regroupement spatial de cas de tuberculeux dans 3 des 6 arrondissements (1^{er}, 3^{ème} et 4^{ème} arrondissement) de la Commune Urbaine d'Antananarivo en 2004 ; puis une légère modification du regroupement en 2005, 2010 et 2011 (Rakotosamimanana *et al.*, 2014; Rendremanana *et al.*, 2009).

L'association de l'épidémiologie moléculaire et de l'analyse spatiale des cas de tuberculose pourrait permettre une détection plus précise de la transmission des souches à

l'intérieur des agrégats spatiaux de cas de tuberculose et pourrait servir d'outils d'épidémiologie pour cette maladie.

L'objectif principal de cette étude est de déterminer l'existence d'éventuelles zones de transmission active de la tuberculose à Antananarivo à partir des extraits de lames de diagnostic de la tuberculose pour le typage moléculaire.

Plus spécifiquement il s'agit :

- D'évaluer la faisabilité des techniques moléculaires de génotypage ("spoligotyping") à partir des extraits de lames de diagnostic microscopique positives, récoltées dans les centres de diagnostic de la ville d'Antananarivo ;
- D'étudier la diversité génétique des souches circulant à Antananarivo et de rechercher les clusters génotypiques de souches en 2013 et 2014 ;
- D'analyser l'association des clusters spatiaux de cas de tuberculose et des clusters génotypiques de souches.

II GENERALITES

II.1 GENERALITES SUR LA TUBERCULOSE

La tuberculose est une maladie contagieuse, se propageant par voie aérienne. Elle affecte fréquemment les poumons, mais peut aussi toucher d'autres organes comme les reins, la colonne vertébrale ou le cerveau, etc...

L'agent causal de la tuberculose humaine, le complexe *M. tuberculosis* (MTBC), est représenté par plusieurs espèces : *M. africanum* trouvé en Afrique de l'ouest (Bonard et al., 2000), *M. canetti* trouvé en particulier à Djibouti (van Soolingen *et al.*, 1997), *M. bovis* trouvé chez les bovins et les humains (O'Reilly and Daborn, 1995), *M. microti*, *caprae* et *pinnipedii* trouvés respectivement chez les rongeurs, les chèvres et les mammifères marins (Prodingier *et al.*, 2002).

II.1.1 DE L'INFECTION A LA MALADIE

La tuberculose se transmet dans la plupart des cas par inhalation des gouttelettes infectantes produites sous forme d'aérosol par les patients contagieux lors de la toux, la parole ou les éternuements. Les gouttelettes inhalées sont transportées et déposées dans les alvéoles pulmonaires où les bacilles sont phagocytés par les macrophages alvéolaires. Une fois activée, la réponse immunitaire spécifique est mise en place conduisant à la formation d'un granulome constitué de macrophage infectés et d'autres cellules immunitaires. A ce stade, le sujet reste asymptomatique, c'est la primo-infection tuberculeuse (PIT). Dans ces cellules phagocytaires, les bacilles peuvent échapper à la digestion enzymatique, persister et se multiplier.

Dans 90% des cas, l'infection est contrôlée au stade de primo-infection par le système immunitaire de l'organisme, le granulome se calcifie et les bacilles emprisonnés dans un caséum restent sous contrôle à l'état quiescent, et le sujet reste asymptomatique, on parle d'une infection tuberculeuse latente (ITL) (Smith, 2003). Dans 10% des cas, l'infection évolue vers une tuberculose maladie qui est qualifiée de tuberculose active.

II.1.2 DIAGNOSTIC

Le diagnostic de la tuberculose est évoqué par les signes cliniques de la maladie. L'apparition des symptômes comme la toux persistante (>3semaines), l'expectoration parfois teintées de sang, l'asthénie, l'anorexie, l'amaigrissement, la subfébrilité et la sudation nocturne, est le signe d'une tuberculose active diagnostiquée généralement par la

bacilloscopie. Cette dernière consiste à identifier les Bacilles Acido-Alcool-Résistants (BAAR) dans les frottis de produits pathologiques après coloration de Ziehl-Nelsen ou à l'auramine. Les manifestations cliniques extra-respiratoires comme les douleurs lombaires et articulaires, symptômes de tuberculose extra-pulmonaire, orientent le diagnostic vers des examens plus profonds tels que la radiologie ou l'imagerie (scanner).

Dans tous les cas, la culture de bactéries sur milieu spécifique est la méthode de référence pour l'identification des souches tuberculeuses et pour évaluer la résistance aux antituberculeux.

II.1.3 TRAITEMENT

A Madagascar, la DLT prend en charge le traitement de la maladie. Les nouveaux cas de tuberculose sont traités par un régime thérapeutique standardisé d'une durée de 6 mois : une combinaison de 4 antibiotiques [rifampicine (R), isoniazide (H), pyrazinamide (Z) et l'éthambutol (E)] pendant les 2 premiers mois correspondant à la phase d'attaque, puis de 2 antibiotiques (RH) pendant 4 mois pour la phase de continuation.

Les médicaments sont disponibles et dispensés gratuitement dans les CDT. Le traitement est administré sous observation directe ou «DOTS» ou en appliquant un suivi régulier permettant d'identifier rapidement les irréguliers. Des contrôles sont réalisés périodiquement afin de suivre l'évolution du patient.

Les rechutes, les reprises de traitement et les échecs bénéficient d'un régime de retraitement standardisé d'une durée de 8 mois dont 2 mois sous RHZE accompagné d'une injection de streptomycine (S), 1 mois sous RHZE, puis 5 mois sous RHE.

Les malades de la tuberculose multirésistante ou TB-MR sont traités dans des services spécialisés (Hospitalisés) avec un schéma de 3^{ème} ligne de longue durée comprenant 6 mois de phase initiale sous Z, Ethionamide (ET), Cyclosérine (C), Ofloxacine (O) accompagné d'une injection de Kanamycine (K) pendant les 3 premiers mois, puis 12 à 18 mois de phase d'entretien sous Z, ET,O.

II.1.4 PREVENTION

Les mesures préventives préconisées par la DLT consistent en un dépistage et traitement des cas de tuberculose pulmonaire à microscopie positive (TPM+), la vaccination par le BCG des enfants dès la naissance, le traitement préventif par l'isoniazide (chimio prophylaxie) des

enfants de moins de 5 ans et des personnes vivant avec le VIH (chez qui la maladie active de la tuberculose a été exclue) étant en contact avec un sujet tuberculeux.

II.2 LES MYCOBACTERIES :

II.2.1 TAXONOMIE

Les mycobactéries ou la famille des MYCOBACTERIACEAE comprend le genre *Mycobacterium*,, appartiennent à l'ordre des ACTINOMYCETALES et à la classe des ACTINOBACTERIES (Shinnick and Good, 1994).

Le genre *Mycobacterium* est formé de plusieurs espèces différentes regroupées en trois subdivisions : le complexe *M. tuberculosis* comprenant *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. microti* et *M. cannetti* qui sont les mycobactéries tuberculeuses ; les mycobactéries atypiques non tuberculeuses comme *M. avium-intracellulare*, *M. marinum*, *M. kansasii*, *M. xenopi*,et les mycobactéries non cultivables comme *M. leprae* et *M. lepraemurium* (Figure 1).

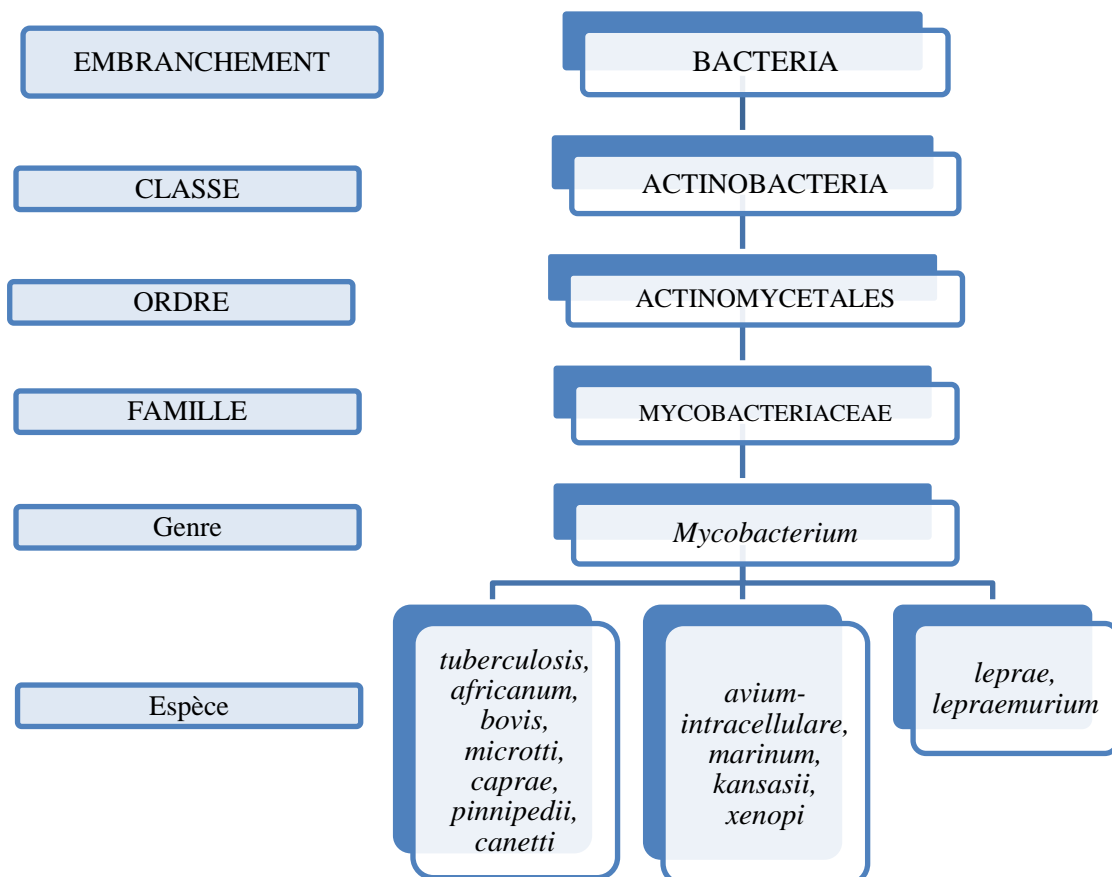


Figure 1: Taxonomie des mycobactéries

II.2.2 CARACTERISTIQUES DE *M. TUBERCULOSIS*

II.2.2.1 CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES ET PHENOTYPIQUES

M. tuberculosis se présente sous la forme d'un fin bâtonnet, de 1 à 10 µm de long et de 0,2 à 0,6 µm de large, d'où le nom de « bacille » (Figure 2). Les bacilles tuberculeux sont rectilignes ou légèrement incurvés, aérobies ou microaérophiles, non sporulant et dépourvus de capsule. La croissance de *M. tuberculosis* est particulièrement lente avec un temps de génération moyen de 20h (Harshey and Ramakrishnan, 1977).

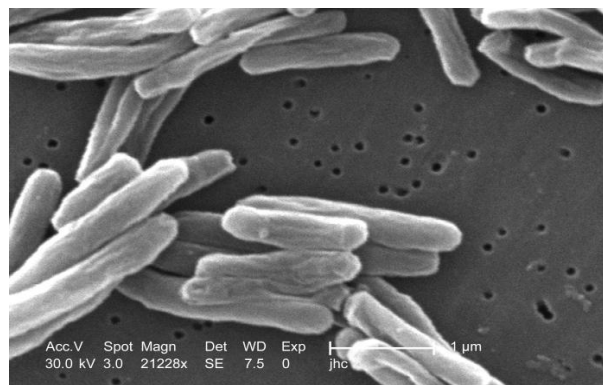


Figure 2: Image de *M. tuberculosis* par microscopie électronique à balayage (21228x)
(<http://phil.cdc.gov/phil/details.asp>)

Une des caractéristiques majeures de ces mycobactéries est la richesse de leur paroi en lipides (60%) et en particulier, en acides mycoliques (acides gras à longue chaîne). Ce qui les rend imperméables aux colorants basiques. Pour observer des mycobactéries au microscope, il est nécessaire de réaliser la coloration de Ziehl-Neelsen dont le principe repose sur l'acido-alcool-résistance de la mycobactérie, c'est-à-dire sa capacité de résister à la décoloration par les acides et alcools après une coloration à base d'arylméthane, telle que la fuchsine de Ziehl (Gangadharam and Droubi, 1981), d'où l'appellation de bacille acido-alcool-résistant ou BAAR.

II.2.2.2 LE GENOME DE *M.tuberculosis*

Le premier génome séquencé de *M. tuberculosis*, celui de la souche H37Rv, est formé d'un chromosome circulaire de 4 411 529 paires de bases (pb) contenant environ 4000 gènes. L'ADN présente une teneur élevée en guanine et cytosine (65,6% de GC) (Cole *et al.*, 1998).

D'autres génomes de *M. tuberculosis* ont été séquencés, tels que : *M. bovis* BCG souche Pasteur (Brosch *et al.*, 2007), *M. leprae* (Cole *et al.*, 2001) et *M. marinum* (Stinear *et al.*, 2008) et présentent à peu près les mêmes caractéristiques.

II.2.2.3 LES MARQUEURS GENETIQUES DE *M.tuberculosis*

Les espèces du complexe *M. tuberculosis* ont de fortes similarités de séquence ADN (>99,9%) (Garnier *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2009), des séquences d'ARNr 16s et des régions intergéniques 16S-23S très conservées entre les différentes souches (Frothingham *et al.*, 1994). Malgré cette similarité génétique, un important polymorphisme est observé dans les séquences répétées et dans certaines régions mobiles du génome.

II.2.2.3.1 Les séquences répétitives :

*II.2.2.3.1.1 Les séquences d'insertion ou IS (Thierry *et al.*, 1990)*

Le nombre et la position des séquences d'insertion (IS) varient d'une souche à l'autre ce qui permet leur classification. Parmi les différentes séquences d'insertion de *M. tuberculosis*, une des premières à avoir été utilisée comme marqueur génétique est l'IS6110 de par sa présence en un grand nombre de copies, permettant une classification des isolats cliniques pour des investigations sur leur transmission (Kremer *et al.*, 1999).

*II.2.2.3.1.2 Les séquences polymorphes riches en G+C (« polymorphic GC-rich sequences », PGRS) (Hermans *et al.*, 1992)*

Elles consistent en des répétitions de séquences de 96pb riches en GC, ce taux s'élevant jusqu'à 80% environ. Ces éléments sont présents en multiple copies et dans 26 sites du génome de *M.tuberculosis*.

II.2.2.3.1.3 Les MIRU ou « Mycobacterial Interspersed Repetitive Units »

Ce sont des minisatellites comprenant des répétitions en tandem et en nombre variable (« variable number tandem repeats » ou VNTR). Parmi ces répétitions, il y a les répétitions en tandem majeures et des séquences polymorphes (« major polymorphic tandem repeats » ou MPTR) et les répétitions en tandem exactes (« exact tandem repeats » ou ETR).

41 loci MIRU-VNTR ont été décrits dans le génome de *M. tuberculosis*. 15 loci ont été trouvés très discriminants et idéaux pour des études épidémiologiques (Figure 3), tandis que 24 loci ont été révélés importants pour des études phylogénétiques (Supply *et al.*, 2006).

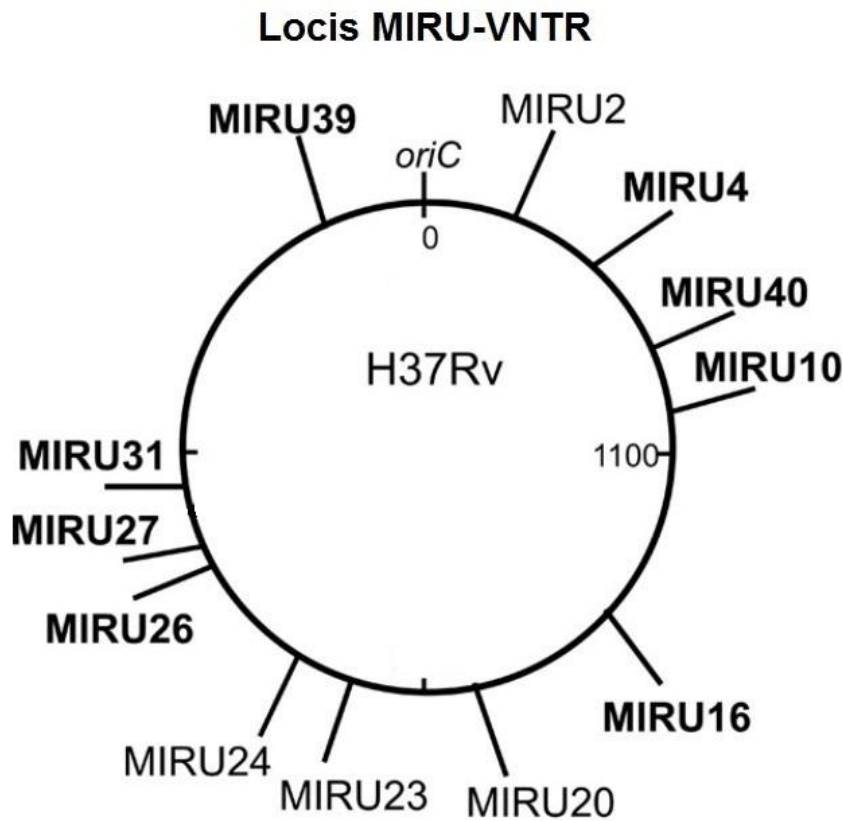


Figure 3 : Schéma représentatif de 12 loci MIRU-VNTR sur le génome de H37RV

II.2.2.3.1.4 Le locus CRISPR ou « direct repeat »(DR)

Le locus CRISPR (« Clustured Regularly Interspersed Short Palindromic Repeats ») est un marqueur génétique qui permet le génotypage de nombreuses bactéries pathogènes. Chez *M. tuberculosis*, il a été initialement caractérisé par l'équipe de J. van Embden sous le nom de « Direct Repeat locus » (Groenen *et al.*, 1993; Kamerbeek *et al.*, 1997).

Les loci CRISPR sont présents chez 100% des Archaea et 60% des bactéries. Constitués de parties fixes (les répétitions) et de parties variables (les « spacers ») (figure 4), ils auraient des rôles physiologiques, principalement dans la défense anti-phagique ou anti-plasmidique. Ils permettent d'obtenir une classification génotypique des isolats cliniques en relation avec les régions d'isolement des souches.

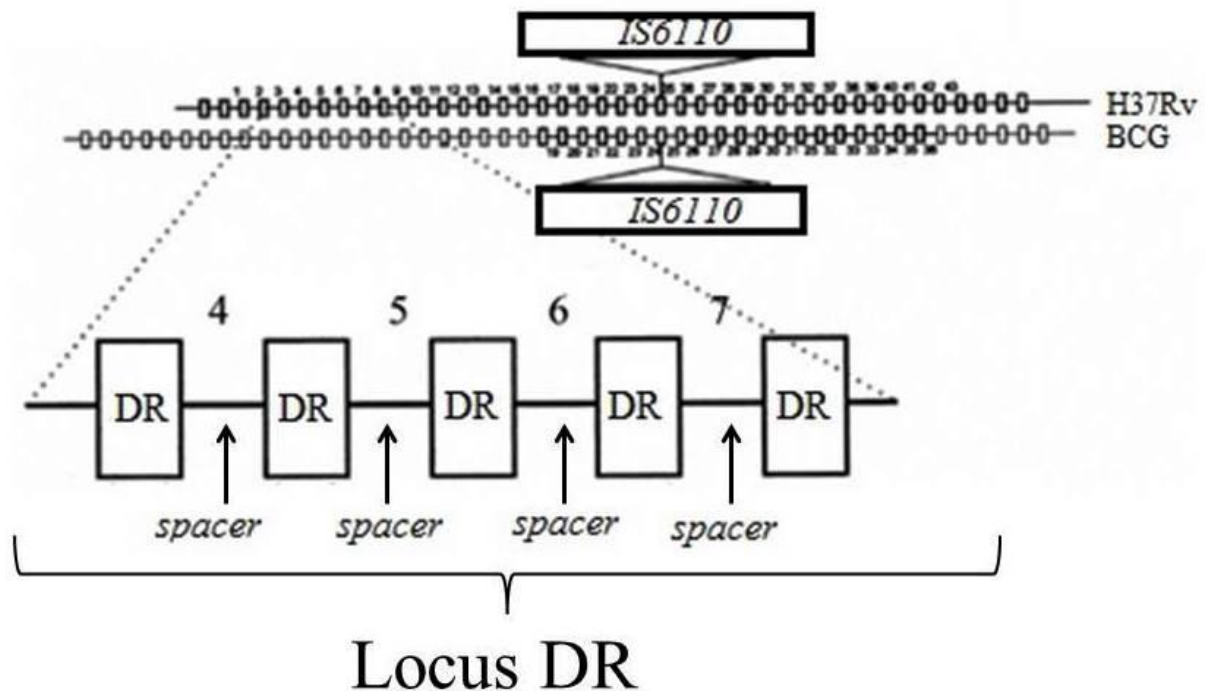


Figure 4: Structure du locus DR chez le CMTB (Kamerbeek et al., 1997)

Le locus DR chez *M.tuberculosis* (H37Rv) et *M.bovis* (BCG) est constitué des séquences répétitives DRs (en rectangle) intercalée par des séquences polymorphes appelées « spacers ». La séquence IS6110 peut s'insérer dans la région DR.

II.2.2.3.2 Les SNPs ou « single nucleotide polymorphism » :

Les SNPs sont des substitutions ponctuelles de nucléotides au niveau du génome. Ils peuvent entraîner des mutations synonymes (silencieuses) ou non-synonymes. Ces dernières peuvent entraîner des changements d'acides aminés pouvant provoquer un changement de phénotype comme la résistance aux antibiotiques.

A l'opposé, les SNPs synonymes n'altèrent pas la séquence d'acides aminés des protéines. Ces mutations sont souvent considérées comme fonctionnellement neutres et sont fréquemment utilisés en phylogénétique.

II.2.2.4 METHODES DE GENOTYPAGE DE *M. tuberculosis*

Les méthodes de génotypage les plus couramment utilisées actuellement sont basées sur la « Polymerase Chain Reaction » ou PCR. Cette dernière permet d'obtenir une multitude de copies d'un fragment du génome en quelques heures. Pour le génotypage, l'amplification des régions à étudier permet de mieux les analyser. La PCR s'effectue en cycles de trois étapes : la dénaturation, l'hybridation des amorces et l'élongation (Figure 5).

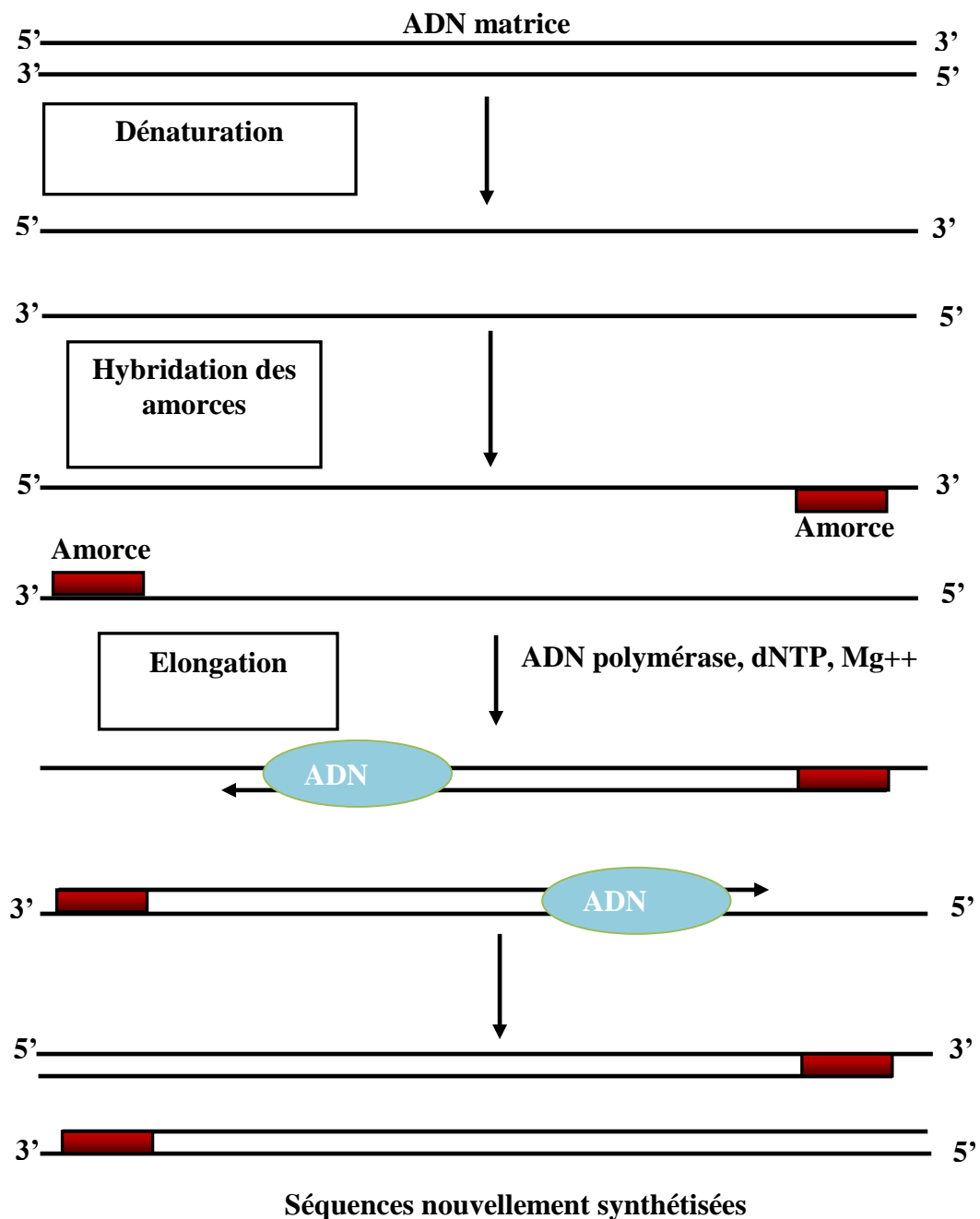


Figure 5 : Les 3 étapes d'une amplification par PCR ou « Polymerase Chain Reaction ».

L'étape de dénaturation correspond à la séparation des deux brins d'ADN sous l'action de la chaleur. L'hybridation des amorces correspond à la fixation des amorces en amont de la région à amplifier des 2 brins d'ADN. Enfin, l'élongation correspond à la synthèse d'un nouveau brin par l'ADN polymérase en présence d'ions cofacteurs tels que la Mg²⁺.

De nombreuses méthodes de génotypage des souches cliniques de *M. tuberculosis* ont été développées depuis une vingtaine d'années. Parmi les plus utilisées, on compte : le

spoligotyping, le MIRU-VNTR, la détection des SNPs et des polymorphismes de grande séquence (LSP).

II.2.2.4.1 IS6110-RFLP

La technique repose sur l'analyse du nombre et de la position des copies d'*IS6110*, observés par un polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) après clivage de l'ADN génomique au moyen d'un enzyme de restriction (Figure 6). Cette technique a permis de classifier *M. tuberculosis* en 30 familles selon le nombre de copie de *IS6110* (van Embden *et al.*, 1993) (Yeh *et al.*, 1998).

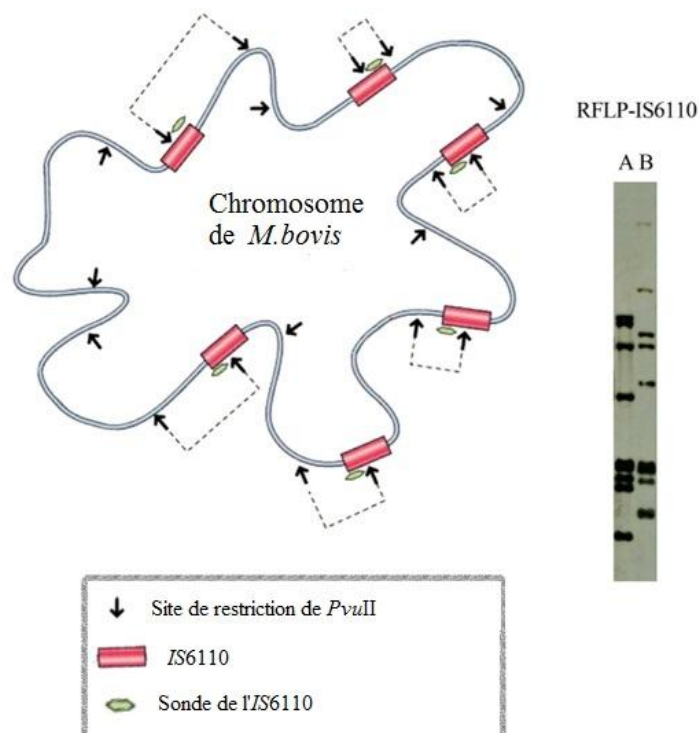


Figure 6 : Représentation du chromosome de *M. bovis* avec la région *IS6110*, les sites de restriction et le sonde de l'*IS6110* utilisé pour le génotypage.

A et B montrent des profils de bande correspondant à la taille des fragments entre 2 sites de restriction de *PvuII* (enzyme de restriction) et au nombre de copies d'*IS6110* (Otal *et al.*, 1991).

II.2.2.4.2 Spoligotyping

Le spoligotyping, ou typage oligonucléotidique des espaceurs ou « spacers » du locus DR (Figure 4), une des techniques fréquemment utilisées pour le génotypage des isolats du complexe *M. tuberculosis*. (Groenen *et al.*, 1993) (Kamerbeek *et al.*, 1997). Cette technique

repose sur le criblage de la région « DR ». Ces éléments « DR » sont séparés les uns des autres par des séquences uniques, non répétées, appelées « spacers ». L'ordre des « spacers » est identique chez toutes les souches mais leur présence/absence varie d'un isolat à l'autre. C'est ce polymorphisme qui est mis en évidence par la méthode de « spoligotyping » après amplification des « spacers » par PCR et hybridation des fragments amplifiés sur une membrane préalablement à des sondes complémentaires aux 43 « spacers » de référence. Etant donné que cette technique repose sur une amplification par PCR, elle nécessite une moindre quantité d'ADN (applicable sur un échantillon positif à l'examen direct). Le génotypage utilisant 43 ou 68 « spacers » chez le complexe *M. tuberculosis* possède une bonne reproductibilité intra et inter-laboratoires (Brudey *et al.*, 2006; Gomgnimbou *et al.*, 2013; Kamerbeek *et al.*, 1997).

II.2.2.4.3 **MIRU-VNTR**

Le génotypage MIRU-VNTR repose sur l'amplification par PCR de chacun des loci MIRU (unités répétitifs mycobactériens dispersés) et la détermination du nombre de répétitions de chaque unité (Crawford, 2003).

Le criblage de 15 loci MIRU semble être suffisant pour les études épidémiologiques de routine alors qu'un système à 24 loci a été proposé comme méthode à haute résolution pour les études phylogénétiques.

II.2.2.4.4 **Les SNPs**

La technique de génotypage à partir des SNPs semble être la plus robuste pour l'établissement des arbres phylogénétiques. Il consiste à amplifier et séquencer une région particulière du génome et de déterminer les éventuels polymorphismes par rapport à une séquence de référence déjà connue (comme la séquence de la souche H37Rv). Une plateforme en ligne «SNPsfinder» disponible sur le site (<http://snpsfinder.lanl.gov/>) peut être utilisée pour la détection des SNPs.

Le génotypage à partir des SNPs au niveau des gènes 3R (gènes de réparation, recombinaison, réplication) est la meilleure technique pour la réalisation des études évolutionnaire de *M. tuberculosis*. Des mutations au niveau de ces gènes peuvent conduire soit à la disparition de l'espèce bactérienne soit à une acquisition d'un nouveau caractère d'adaptation aux milieux où elle se trouve. Le génotypage à partir de ces gènes a permis de classer le CMTB en principaux groupes génétiques (PGG 1, 2 et 3) et en « SNPs-Cluster

Group » ou SCG (SCG1, 2, 3a, 3b, 4, 5, 6a, 6b et 7) concordant avec les familles de spoligotypes (Dos Vultos *et al.*, 2008).

II.2.2.4.5 Le LSP ou « large sequence polymorphism »

Cette technique met en évidence des grandes délétions au niveau des régions du génome de *M. tuberculosis*. Les LSP ont été utilisés pour classer *M. tuberculosis* en 6 groupes dont la lignée Indo-Oceanic, East Asian, East African-Indian, Euro-American, West African I et West African II (Gagneux *et al.*, 2006).

II.2.3 CLASSIFICATION DES SOUCHES DU COMPLEXE *M.TUBERCULOSIS* (MTBC):

L'utilisation des marqueurs SNPs et des LSPs a permis l'étude de la phylogénie de MTBC car ce sont des marqueurs stables, irréversibles. Les marqueurs MIRU, DR sont plus utilisés pour classer les souches dans les études épidémiologiques.

En épidémiologie moléculaire, le « spoligotyping », la technique la plus utilisée, permet de classer le MTBC en plusieurs lignées puis en sous-lignées liées phylogéographiquement et enfin en « Shared Type » ou ST qui désigne les souches ayant les mêmes profils spoligotypes. Parmi les principales lignées spoligotypes de *M. tuberculosis*, il y a la lignée « East-African-Indian » ou EAI caractérisée par l'absence des « spacers » 29 à 32 et 34, la lignée « Beijing » caractérisée par l'absence des « spacers » 1 à 34, la lignée « Central-Asian » ou CAS caractérisée par l'absence des « spacers » 4 à 7 et 23 à 34, la lignée « Haarlem » ou H caractérisée par l'absence des « spacers » 31 et 33 à 36, la lignée « Latin-American-Mediterranean » ou LAM, la lignée X caractérisée par l'absence des « spacers » 18 et 33 à 36, la lignée T caractérisée par l'absence des « spacers » 33 à 36, la lignée U caractérisée par l'absence des « spacers » 25 à 43, la lignée S caractérisée par l'absence des « spacers » 9-10 et 33 à 36.

Parmi les autres lignées spoligotypes du MTBC, il y a La lignée « AFRICANUM » ou AFR dont la sous lignée AFRI1 est caractérisée par l'absence des « spacers » 7 à 9 et 39, AFRI2 caractérisée l'absence des « spacers » 8 à 12, 21 à 24 et 37 à 39 ; AFR3 caractérisée par l'absence des « spacers » 8 à 12 et 37 à 39, la lignée « BOVIS » ou BOV caractérisée par l'absence des « spacers » 16 et 39 à 43, la lignée « CANETTII » caractérisée par l'absence de tous les « spacers » à part les « spacers » 30 et 36, la lignée « MICROTI » caractérisée par l'absence de tous les « spacers » à part les « spacers » 37 et 38, la lignée « PINNIPEDII »

La première colonne montre les numéros ST. La deuxième colonne présente les lignées et sous lignées. Et la troisième colonne montre les profils correspondants à chaque ST et sous lignée sous un format binaire : carré noir et blanc selon la présence ou l'absence respectivement des « spacers ». Les colorées en rouge constituent les signatures spécifiques de chaque lignée et sous lignée.

II.3 BASE DE DONNEES

SITVITWEB est une base de données de génotypes conçue à l'Institut Pasteur de Guadeloupe ou «IPG» (Brudey *et al.*, 2006; Demay *et al.*, 2012), mise à jour et entretenue régulièrement. Le SITVITWEB est une base de données multimarqueurs qui contient les données du génotypage de 62 582 isolats cliniques correspondant à des patients provenant de 153 pays. Les techniques de typage utilisées sont les suivantes :

- « Spoligotyping », la base contient 7 105 profils spoligotypes de 58 180 isolats cliniques, regroupés en 2 740 types communs ou SIT (Spoligotype International Types) pour 53 816 isolats cliniques et 4 364 profils orphelins.

- MIRU-VNTR 12 loci (génotypage à partir des 12 loci MIRU les plus discriminants), avec 2 379 profils MIRU enregistrés pour 8 161 isolats cliniques, regroupés en 847 types communs ou MIT (MIRU International Types) constitués par 6 626 isolats cliniques et 1 533 profils orphelins ; génotypage des 5 loci « Exact Tandem Repeat » (ETR) représentés par 458 profils obtenus à partir de 4 626 isolats cliniques, regroupés en 245 types communs ou VIT (VNTR International Types) constitués par 4 413 isolats cliniques et 213 profils orphelins.

SIT correspond à chaque spoligotype présent dans 2 souches ou plus de la base de données, et MIT à chaque profil MIRU présent dans 2 souches ou plus. Les numéros MIT relatifs aux formats MIRU-VNTR 12, 15 et 24 loci sont respectivement dénommés 12-MIT, 15-MIT et 24-MIT, tandis que ceux réservés aux ETR sont dénommés VIT. Le terme «orphelin» fait quant à lui référence aux profils décrits pour un seul isolat qui ne correspond à aucun des profils enregistrés dans la banque de la base de données SITVITWEB. Cette dernière peut être consultée librement sur http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE.

TB-lineage est aussi une base de données disponible en ligne sur http://tbinsight.cs.rpi.edu/run_tb_lineage.html. La base renferme 3198 profils spoligotypes, et

5430 profils MIRU-VNTR. Elle permet la détermination des lignées et sous-lignées des souches du complexe *M. tuberculosis* (Shabbeer *et al.*, 2012).

II.4 EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE DES SOUCHES *M. tuberculosis* A MADAGASCAR

L'analyse de la distribution des souches de *M. tuberculosis* à Madagascar, par la technique de spoligotyping, en 2005 a montré une prédominance de la ST86 de la lignée T, la ST109 de la lignée EAI et la ST21 de la lignée CAS. Les lignées trouvées à Madagascar ont montré une circulation de souches modernes dont T (35,6% des souches analysées), H (13,1%), LAM (2,3%), Cameroon (2,3%), Zimbabwean (1,7%), S (1%) et X (1,7%), et de souches anciennes (appartenant aux PGG1) dont EAI (23,5%), CAS (9,1%), Beijing (4%), Manu (2,7%) et *M. africanum* (0,3%) (Ferdinand *et al.*, 2005).

L'utilisation de la technique IS6110-RFLP a montré une prédominance des souches à une seule copie d'IS6110, fréquentes dans les îles de l'océan indien et distribuées largement dans les régions d'Asie du Sud (Razanamparany *et al.*, 2009).

II.5 ETUDE EPIDEMIOLOGIQUE DE LA TUBERCULOSE UTILISANT LE SYSTEME D'INFORMATION GEOGRAPHIQUE (SIG)

Des études utilisant le SIG ont permis la localisation des zones à taux de tuberculeux élevés à Antananarivo appelées clusters spatiaux de cas. Selon taux de cas rapportés au nombre d'habitants, des clusters primaires et secondaires ont été définis. Ces clusters spatiaux de cas de tuberculose ont été définis par la méthode de Kulldorff (Kulldorff, 1997). Cette méthode consiste à comparer statistiquement les différences de taux de cas de maladies rapportés à la population spatialement. Les clusters primaires sont définis comme des clusters spatiaux significatifs avec un $p = 0,000001$. Les clusters secondaires ont un $p = 0,001$. Les études effectuées en 2005, 2006, 2010 et 2011 ont permis de détecter des clusters spatiaux de cas de tuberculose dans le premier, troisième et quatrième arrondissement, dont des clusters primaires trouvés dans le premier et le quatrième arrondissement, et des clusters secondaires perçus dans le cinquième, et le sixième arrondissement (Rakotosamimanana *et al.*, 2014; Randremanana *et al.*, 2009).

III MATERIELS ET METHODES

III.1 RECRUTEMENT

Un recrutement des patients diagnostiqués TPM+ (figure 8) et résidant à Antananarivo Renivohitra a été fait exhaustivement dans 17 CDT d'Antananarivo et 3 CDT de référence de la périphérie d'Antananarivo (tableau 1) pendant une durée de 9 mois (du 5 Août 2013 au 6 Mai 2014).

Tableau 1: Liste des CDT inclus dans l'étude.

Code	Nom des CDT
T1	DAT / IHS
T26	HME Ambohimandra
T2	SMR Befelatanana
T45	Pédiatrie Befelatanana
T3	EKAR Anatihazo
T43	CSBU Anosipatrana
T31	HME Tsaralalana
T46	CSU Ambohimananarina
T55	AMIT
T25	CSBU Isotry Central
T54	OSTIE Behoririka
T42	CSBU Ambohipo
T5	CENHOSOA (Roques)
T37	CENHOSOA (Pédiatrie)
T24	CHD1 Ambohidroa
T47	CSBU Analamahitsy
T7	CHU Fenoarivo
T6	SALFA Ambohibao
T39	CHD2 Itaosy
T38	SALFA 67ha

Aucune distinction d'âge ni de sexe n'a été faite pour le recrutement. Tous les cas de TPM+ ont été inclus dans l'étude (nouveau cas, échec, rechute, reprise après abandon de traitement).

Seuls les patients résidant à Antananarivo Renivohitra pendant plus de 1 an ont été inclus.

Les lames de diagnostic microscopique de la tuberculose ainsi que les crachats correspondant ont été collectés. Les crachats ont été mis en culture sur le milieu solide de Loweïnstén - Jensen (LJ).

Le consentement a été demandé pour chaque patient et une fiche de renseignement (en annexe) a été remplie soit par le médecin traitant soit par un personnel du CDT.

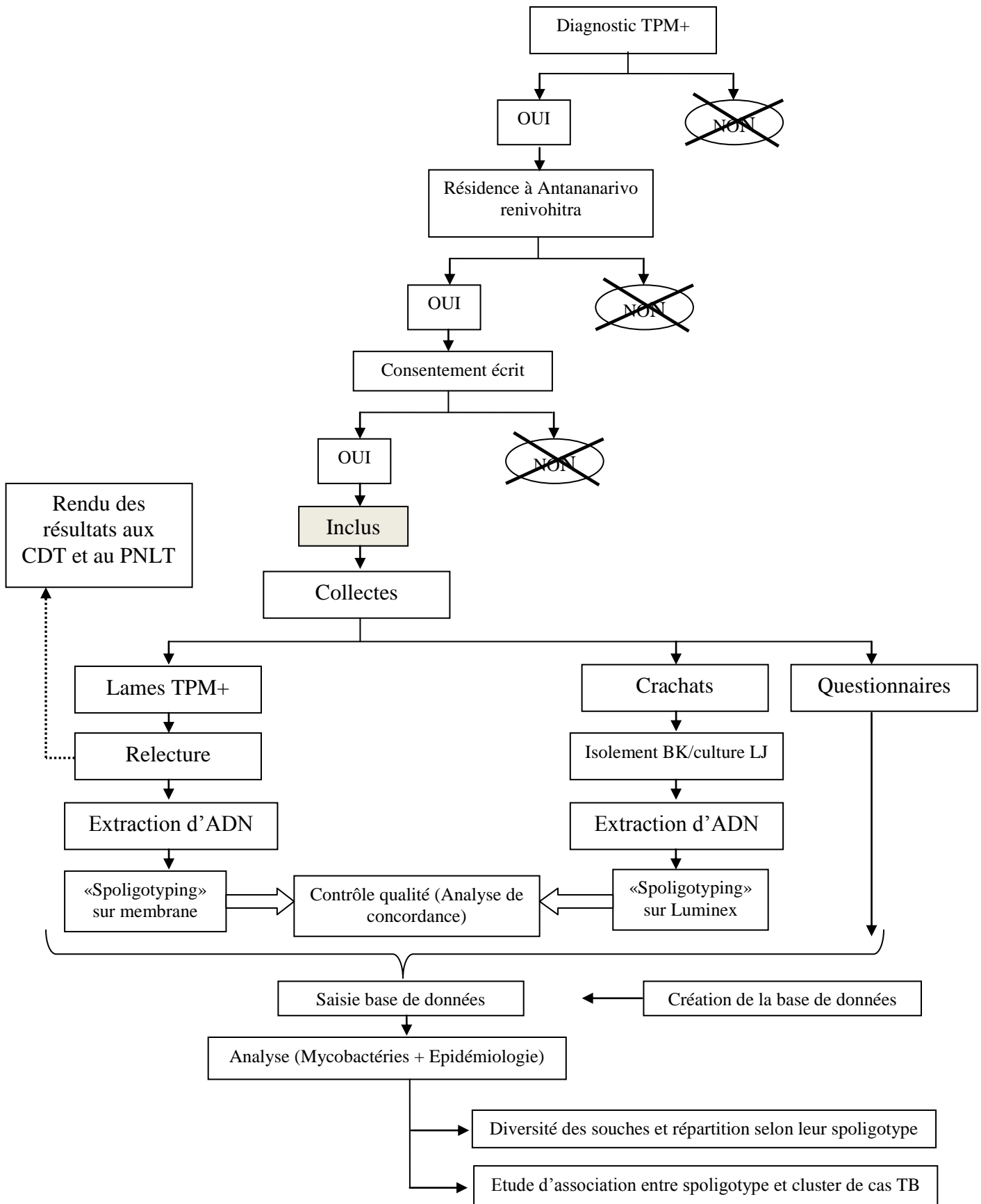


Figure 8: Schéma récapitulatif du circuit de recrutement jusqu'aux analyses

III.2 METHODES

III.2.1 EXTRACTION D'ADN A PARTIR DE LAMES DE DIAGNOSTIC

III.2.1.1 PRINCIPE

Cette étape consiste à gratter les frottis sur la lame avec un bistouri et avec quelques microlitres d'eau distillée, puis faire éclater les cellules bactériennes par chauffage en présence de Chelex 5%. Et enfin de récupérer par centrifugation la surnageant contenant les suspensions d'ADN.

La solution de Chelex fixe les ions présents dans le milieu, cela permet d'inhiber l'action des enzymes DNases et RNases qui dégradent les acides nucléiques (ADN et ARN).

III.2.1.2 METHODES :

Les lames obtenues sont d'abord rincées dans du xylène pour éliminer l'huile à immersion.

L'étape suivante consiste à gratter le frottis sur la lame à l'aide d'un bistouri, puis les résidus cellulaires obtenus sont mélangés dans 25µl d'eau distillée. Le tout est ensuite transféré dans un microtube Eppendorf renfermant 75µl de solution de Chelex 5%.

L'ensemble est mélangé au vortex et incubé pendant 30 minutes à 95°C pour lyser les membranes cellulaires. Puis, le mélange est refroidi à température ambiante et centrifugé à 13 000 rpm pendant 10 minutes pour récupérer les ADN qui sont contenus dans le surnageant. Ce dernier est transféré dans un microtube et peut être soit utilisé directement pour l'amplification, soit stocké à -20°C jusqu'à son utilisation.

III.2.2 SPOLIGOTYPING

III.2.2.1 PRINCIPE

Cette méthode repose sur la détection du polymorphisme de 43 « spacers » du génome de *M. tuberculosis*, dans le locus DR. La technique consiste à amplifier les «spacers » du locus DR par PCR en utilisant les amorces DRa biotinylé et DRb flanquants les espaceurs, puis à les hybrider sur une membrane où sont fixées de façon covalente 43 sondes complémentaires des 43 «spacers». Les fragments hybridés sur la membrane sont ensuite révélés par chimioluminescence. Les résultats obtenus sont analysés selon la présence ou l'absence des « spacers » dans le génome des souches testées. (Figure 9)

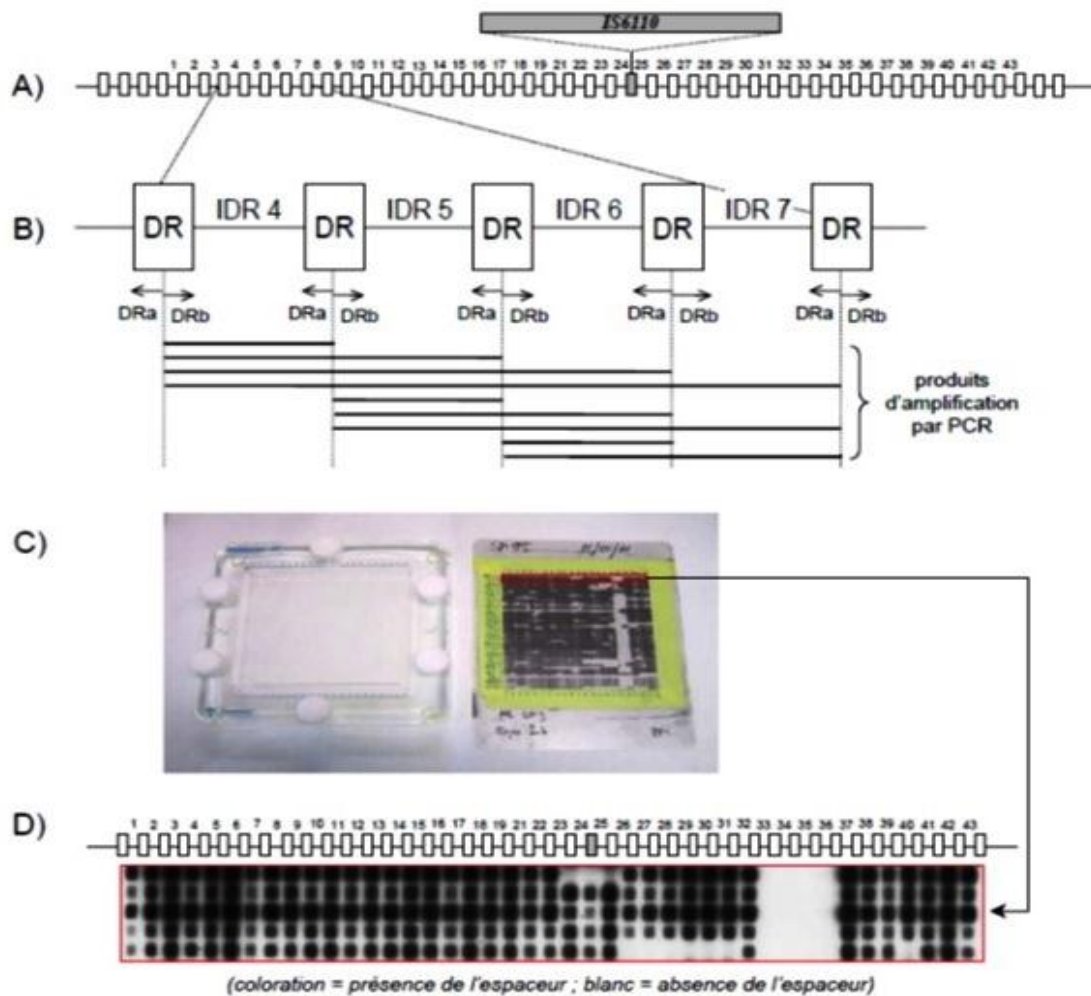


Figure 9: Schéma récapitulatif des différentes étapes du «Spoligotyping».

(A) Structure du locus DR du génome des mycobactéries. (B) Amplification *in vitro* de la région DR par PCR grâce aux amorces DRa et DRb. Chaque DR du locus peut servir de départ à l'amplification, donc le résultat d'amplification donne un mélange de fragments d'ADN de taille multiples. (C) Détection des sondes inter-DR (IDR) par hybridation sur un système matriciel, à gauche (membrane sur laquelle sont liées de façon covalente les 43 séquences oligonucléotidiques correspondant aux 43 « spacers »). A droite, photographie après révélation par Chimiluminescence (ECL, Amersham). (D) Motifs d'hybridation (spoligotypes) des souches de *M. tuberculosis* testées (une souche par ligne). La coloration noire indique la présence du « spacer » dans la souche considérée alors que le blanc indique l'absence de ce « spacer » (Groenen *et al.*, 1993; Kamerbeek *et al.*, 1997).

III.2.2.2 METHODES

III.2.2.2.1 Marquage de la membrane

Le marquage de la membrane a pour but de fixer les sondes de capture à la membrane pour le « spoligotyping ». La manipulation a été réalisée en plusieurs étapes (figure 11).

La première étape consiste à préparer les solutions de travail comme indiqué dans le tableau 2 à partir des solutions mères de sondes de capture (oligonucléotides) au nombre de 43.

Puis, une membrane de Biodyne C est découpée en carrée de 14,5 cm de côté pour qu'elle puisse correspondre aux canaux du miniblottter. Sur le côté en bas à droite de la membrane est marquée la date afin de déterminer l'orientation de la membrane.

La membrane est ensuite enroulée sur elle-même et introduite dans une bouteille rotative contenant au préalable, 12ml de solution d'EDAC pour activation. La bouteille est mise en rotation pendant 10 minutes à la température ambiante. La rotation de la bouteille permet de bien étaler la solution d'EDAC sur toute la surface de la membrane.

La membrane est ensuite placée dans un miniblottter (figure 10) en respectant l'orientation, la partie comportant la date face aux cannelures du miniblottter. Un papier mousse servant d'étanchéité est placé entre la membrane et la partie inférieure du miniblottter. Les liquides résiduels dans chaque cannelure du miniblottter contenant la membrane sont aspirés à l'aide d'une pompe à vide.

Les deux cannelures extrêmes du miniblottter sont remplies de 150 μ l d'encre de chine chacun servant de repère tandis que les cannelures restantes sont remplies chacune par 150 μ l de solution de sondes de capture dilués dans du NaHCO₃, en respectant l'ordre et en évitant la formation de bulles car ces dernières créent des espaces où l'hybridation ne s'opère pas.

Les sondes sont fixées à la membrane après 1 minute qui correspond au temps de remplissage des cannelures, puis ces dernières sont vidées par aspiration.

La membrane est ensuite désactivée pour éviter les hybridations non spécifiques par incubation dans une solution de NaOH 100mM pendant 5 minutes à la température ambiante.

Par la suite, la membrane désactivée subit 2 lavages de 250ml de 2xSSPE/0,1%SDS à 60°C sous agitation pendant 5 minutes pour éliminer les oligonucléotides non fixés spécifiquement à la membrane.

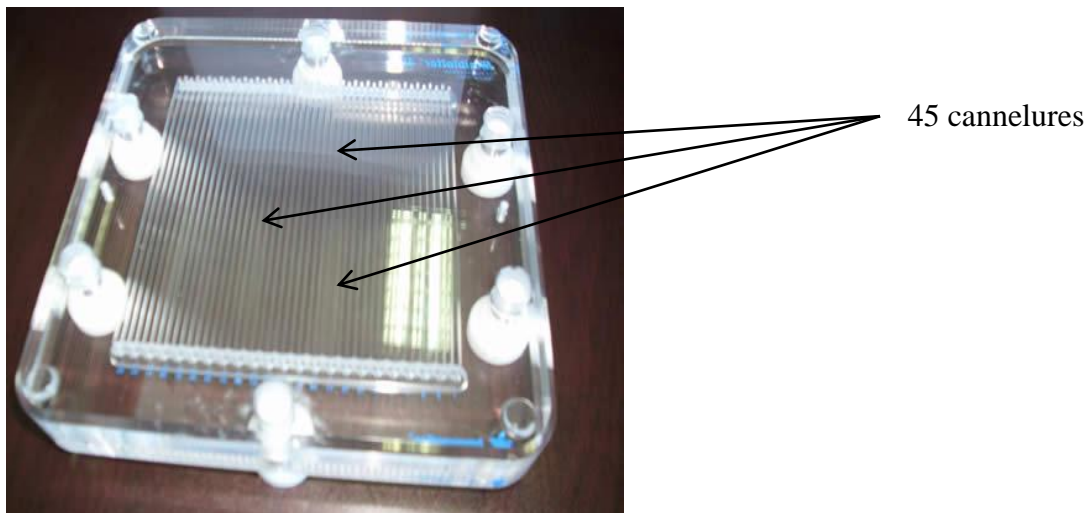
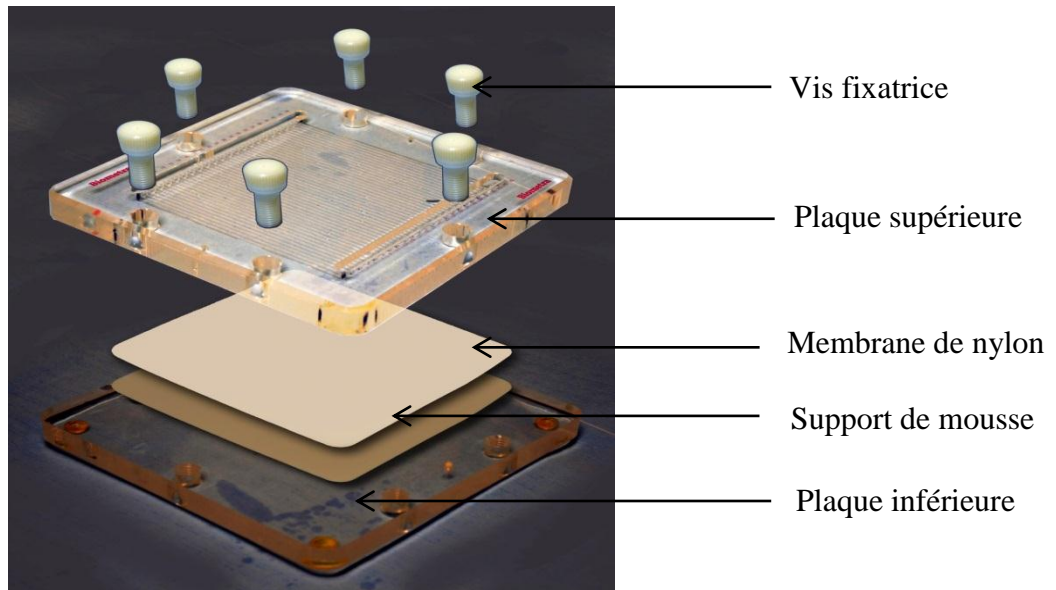


Figure 10: Photo du Miniblotter MN 45 (BIOMETRA)

Le Miniblotter MN 45 (BIOMETRA) est utilisé pour le marquage de la membrane avec les sondes de capture, et l'hybridation des « spacers ». Il comprend deux plaques : la plaque supérieure comportant 45 cannelures parallèles (ou puits) numérotées de 1 à 45, dans lesquelles s'effectue l'hybridation, et la plaque inférieure servant de support. Un support de mousse servant de joint est déposé sur la plaque inférieure, sur lequel est placée la membrane de nylon. Six vis fixatrices sont utilisées pour fixer et immobiliser le montage.

Puis la membrane est lavée 2 fois avec 250ml d'EDTA 20 mM pH 8 sous agitation pendant 15 minutes à température ambiante pour sa protection contre les nucléases et sa conservation. L'EDTA capte les ions présents dans le milieu, ces ions qui sont des cofacteurs enzymatiques.

La membrane est enfin scellée dans un sachet plastique contenant un peu d'EDTA 20 mM pH 8 pour éviter son dessèchement et conservée à 4°C jusqu'à utilisation.

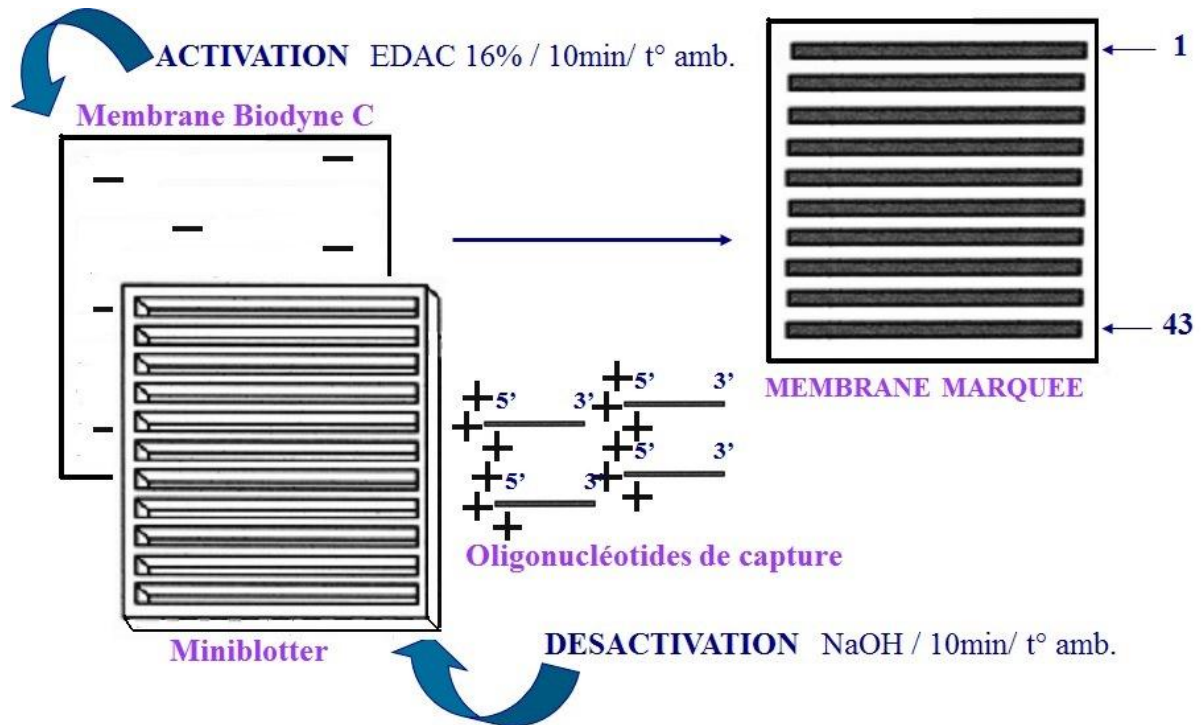


Figure 11: Etapes du marquage de membrane

Sous l'action de l'EDAC, la membrane de Biodyne C est activée, se charge négativement et peut ainsi fixer par liaisons covalentes des oligonucléotides préalablement modifiés à leur extrémités 5' par du NaHCO_3 pour comporter une terminaison amine ionisée. Puis, sous l'action du NaOH 100 mM, la membrane est désactivée et protégée des hybridations non spécifiques.

Tableau 2: Dilution des solutions mères de sonde de capture pour le marquage de la membrane. Ci : concentration initiale, Cf : concentration finale

Spacer	Séquence de la sonde correspondante	Ci (pmol/μl)	Cf(pmol/μl)
1	5' ATA GAG GGT CGC CGG CTC TGG ATC A 3'	536	12,5
2	5' CCT CAT GCT TGG GCG ACA GCT TTT G 3'	512	36
3	5' CCG TGC TTC CAG TGA TCG CCT TCT A 3'	450	12,5
4	5' ACG TCA TAC GCC GAC CAA TCA TCA G 3'	261	12,5
5	5' TTT TCT GAC CAC TGG TGC GGG ATT A 3'	510	12,5
6	5' CGT CGT CAT TTC CGG CTT CAA TTT C 3'	464	12,5
7	5' GAG GAG AGC GAG TAC TCG GGG CTG C 3'	372	40
8	5' CGT GAA ACC GCG CCC AGC CTC GCC G 3'	319	80
9	5' ACT CGG AAT CCC ATG TGC TGA CAG C 3'	367	12,5
10	5' TCG ACA CCC GCT CTA GTT GAC TTC C 3'	478	15
11	5' GTG AGC AAC GGC GGC GGC AAC CTG G 3'	542	30
12	5' ATA TCT GCT GCC CGC CCG GGG AGA T 3'	640	60
13	5' GAC CAT CAT TGC CAT TCC CTC TCC C 3'	416	12,5
14	5' GGT GTG ATG CGG ATG GTC GGC TCG G 3'	461	30
15	5' CTT GAA TAA CGC GCA GTG AAT TTC G 3'	482	95
16	5' CGA GTT CCC GTC AGC GTC GTA AAT C 3'	342	12,5
17	5' GCG CCG GCC CGC GCG GAT GAC TCC G 3'	445	100
18	5' CAT GAA CCC GGG CGA GCT GCA GAT G 3'	427	12,5
19	5' TAA CTG GCT TGG CGC TGA TCC TGG T 3'	479	12,5
20	5' TTG ACC TCG CCA GGA GAG AAG ATC A 3'	481	12,5
21	5' TCG ATG TCG ATG TCC CAA TCG TCG A 3'	433	80
22	5' ACC GCA GAC GGC ACG ATA GAG ACA A 3'	540	12,5
23	5' AGC ATC GCT GAT GCG CTC CAG CTC G 3'	350	50
24	5' CCG CCT GCT GGG TGA GAC GTG CTC G 3'	406	50
25	5' GAT CAG CGA CCA CCG CAC CCT GTC A 3'	372	25
26	5' CTT CAG CAC CAC CAT CAT CCG GCG C 3'	405	12,5
27	5' GGA TTC GTG ATC TCT TCC CGC GAT T 3'	441	25
28	5' TGC CCC GGC GTT TAG CGA TCA CAA C 3'	403	12,5
29	5' AAA TAC AGG CTC CAC GAC ACG ACC A 3'	339	12,5
30	5' GGT TGC CCC GCG CCC TTT TCC AGC C 3'	394	12,5
31	5' TCA GAC AGG TTC GCG TCG ATC AAG T 3'	396	25
32	5' GAC CAA ATA GGT ATC GGC GTG TTC A 3'	600	25
33	5' GAC ATG ACG GCG GTG CCG CAC TTG A 3'	405	100
34	5' AAG TCA CCT CGC CCA CAC CGT CGA A 3'	507	40
35	5' TCC GTA CGC TCG AAA CGC TTC CAA C 3'	656	12,5
36	5' CGA AAT CCA GCA CCA CAT CCG CAG C 3'	504	12,5
37	5' CGC GAA CTC GTC CAC AGT CCC CCT T 3'	627	12,5
38	5' CGT GGA TGG CGG ATG CGT TGT GCG C 3'	682	25
39	5' GAC GAT GGC CAG TAA ATC GGC GTG G 3'	451	25
40	5' CGC CAT CTG TGC CTC ATA CAG GTC C 3'	728	12,5
41	5' GGA GCT TTC CGG CTT CTA TCA GGT A 3'	452	12,5
42	5' ATG GTG GGA CAT GGA CGA GCG CGA C 3'	475	25
43	5' CGC AGA ATC GCA CCG GGT GCG GGA G 3'	400	80

Les solutions mères d'oligonucléotides sont diluées dans l'eau distillée stérile puis activées dans du tampon de NaHCO₃.

III.2.2.2.2 Amplification de la région DR par PCR

La réaction PCR est réalisée dans un thermocycleur MULTIGENTM (figure 12) dans des microtubes de 0,2 ml. La composition du mix réactionnel est décrite dans le tableau 3. Les ADN des souches *M. tuberculosis* de référence H37Rv et *M. bovis* BCG P3 ont été utilisés comme témoins positifs d'amplification.



Figure 12 : Image du thermocycleur MULTIGENTM (LABNET)

L'amplification des «spacers» est réalisée dans un thermocycleur MULTIGENTM. Programmable, la machine effectue en plusieurs cycles les trois étapes de la PCR : la dénaturation, l'hybridation des amorces et l'élongation (le programme pour le spoligotyping est décrit en annexe).

Tableau 3 : Composition du mix réactionnel pour la PCR

Solution	Concentration initiale	Concentration finale	Volume pour 1 tube (µl)
HF Buffer	5X	1X	10
MgCl ₂	50mM	5mM	5
DRa	5 pmole/µl	0,5	5
DRb	5 pmole/µl	0,5	5
DNTP	10mM	0,2mM	1
dmsO	100%	3%	1,5
Phusion		0,02U/µl	0,5
Eau distillée		Qsp 50µl	20
ADN			2
total			50

Le thermocycleur est programmé comme suit :

- 98°C pendant 1 minute, activation de l'enzyme polymérase ;
- 35 cycles de 3 étapes : la première étape, 98°C pendant 10 secondes, consiste en une dénaturation des 2 brins d'ADN. La deuxième étape, 55°C pendant 1 minute, favorise l'hybridation des amorces à leurs séquences complémentaires sur chaque brin d'ADN matrice. La troisième étape, 72°C pendant 30 secondes, permet à l'ADN polymérase de synthétiser le brin complémentaire à partir de la matrice.
- Enfin, 72°C pendant 10 minutes, correspondant à la fin d'extension.

Les produits PCR (amplicons) peuvent être utilisés immédiatement ou conservés à -20°C.

III.2.2.2.3 Hybridation reverse sur la membrane

La méthode a été décrite par Kamerbeek, *et al.* (1997). La première étape consiste à diluer 30µl de chaque amplicon dans 450µl de 2XSSPE/0,1%SDS puis, le mélange obtenu est porté dans un bain marie à 100°C pendant 10 minutes pour dénaturer les ADN, puis transféré immédiatement dans la glace pour éviter leur renaturation.

La deuxième étape consiste à rincer la membrane dans environ 250 ml de 2XSSPE/0,1%SDS à 60°C pendant 5 minutes pour éliminer la solution d'EDTA. La membrane est ensuite placée dans le miniblottter, de manière à ce que les cannelures soient perpendiculaires au sens de dépôt des sondes de capture (figure 9). Pour cela, les lignes d'encre sont utilisées comme repère pour l'orientation de la membrane. Le support de mousse est auparavant placé sur la plaque inférieure du miniblottter. Le montage est vissé fermement pour éviter les contaminations des échantillons.

La membrane de Biodyne C marquée aux 43 sondes de capture est orientée de telle sorte que les lignes d'encre soient perpendiculaires aux cannelures du miniblottter. Le support de mousse fait qu'il n'y ait pas d'échange entre les cannelures après vissage du miniblottter.

Les cannelures du miniblottter sont ensuite débarrassées des liquides résiduels par aspiration à l'aide d'une pompe à vide. Le premier et le dernier canal sont remplis de tampon 2XSSPE/0,1%SDS. Les canaux restants sont remplis avec 150µl des amplicons dénaturés et l'hybridation est réalisée par incubation du miniblottter à 60°C pendant 30 minutes.

Les canaux sont ensuite vidés par aspiration suivant l'ordre du remplissage, puis le miniblottter est démonté. La membrane est lavée 2 fois 10 minutes dans 250 ml de 2XSSPE\0,5%SDS à 60°C, dans un récipient sous agitation.

La membrane est refroidie jusqu'à 42°C, puis elle est placée dans une bouteille rotative, la face comportant les oligonucléotides du côté de la lumière du tube. Une température inférieure à 42°C est nécessaire pour la suite de la manipulation car la température élevée pourrait inactiver la peroxydase.

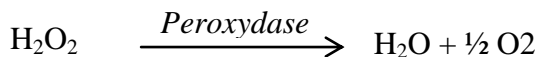
Une solution de conjugué streptavidin-peroxydase diluée au 1/4000 (3,5µl de conjugué streptavidin-peroxydase dans 14 ml de 2XSSPE\0,5%SDS) est versée dans la bouteille dans laquelle se trouve la membrane. La bouteille est mise en rotation pendant 45 minutes à 42°C. Cette étape permet à la streptavidin-peroxydase de se fixer à la biotine portée par les amplicons.

La membrane est lavée 2 fois 10 minutes dans 250 ml de 2XSSPE\0.5%SDS à 42°C, dans un récipient sous agitation puis rincée 2 fois 5 min. dans 250 ml de 2XSSPE à température ambiante, sous agitation, pour éliminer la SDS.

III.2.2.2.4 Révélation

III.2.2.2.4.1 Principe

La peroxydase catalyse l'eau oxygénée en H₂O et en oxygène selon la réaction :



L'oxygène libéré dans le milieu oxyde le luminol qui va émettre une luminescence qui sera captée par un film d'autoradiographie, ce qui permet de révéler les hybrides amplicon-sondes de capture (figure 13).

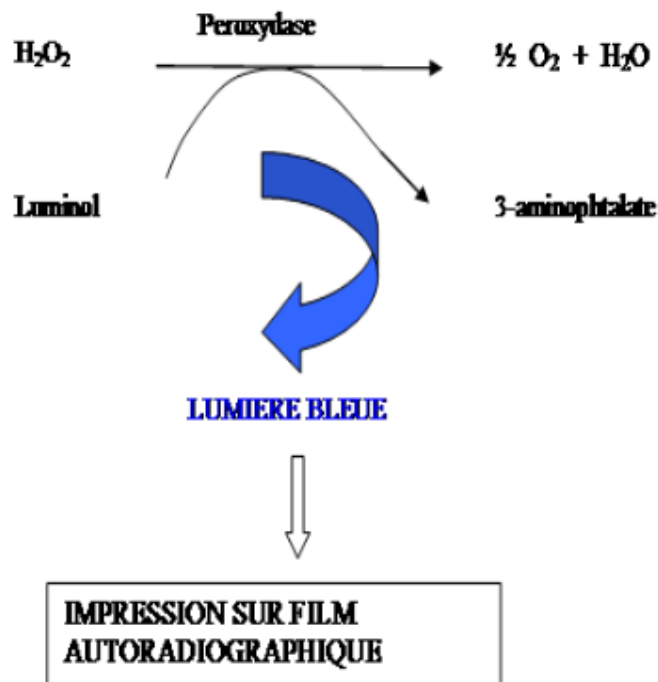


Figure 13 : Principe de la révélation de l'hybridation par autoradiographie.

III.2.2.2.4.2 Méthode

Après rinçage, la membrane est incubée à l'obscurité dans 40 ml de liquide de détection E.C.L (mélange de 20 ml de chacune des solutions de H_2O_2 et de luminol fournies dans le kit) pendant 2 minutes puis, placée dans une cassette d'autoradiographie tout en évitant la formation de bulles d'air ou de liquides. Le film d'autoradiographie est ensuite placé sur la membrane puis couvert d'écran. L'orientation de la membrane est de telle sorte que la partie comportant les oligonucléotides soit placée contre le film d'autoradiographie. La manipulation du film d'autoradiographie doit être faite à l'obscurité car ce dernier est très sensible à la lumière. La cassette est fermée puis placée à l'obscurité pendant 10 minutes. Puis sous lumière infrarouge, le film est trempé dans le liquide de révélation, qui va faire apparaître les tâches noires émises par la luminescence, puis rincé dans l'eau et trempé dans le liquide de fixation qui va désactiver le film. Après un dernier rinçage à l'eau, le film est séché.

Une membrane peut être réutilisée plusieurs fois après déshybridation mais les signaux obtenus deviennent de plus en plus faible après plusieurs utilisations.

III.2.3 ENREGISTREMENT DES DONNEES

III.2.3.1 ATTRIBUTION DES NUMEROS IPM

Un numéro de laboratoire précédé de l'année de réception a été attribué à chaque échantillon (Exemple : 13. 0472 où 13 correspond à l'année de réception et 472, le numéro de laboratoire). Les renseignements sur chaque patient sont enregistrés sur le logiciel Epi Info.

III.2.3.2 SAISIE DES DONNEES ET RESULTATS SUR EXCEL

Les renseignements sur chaque patient sont exportés sur Microsoft Excel® depuis Epi Info. Puis, les profils spoligotypes sont saisis manuellement. Les «spacers» présents sont marqués « n » ou « ■ », les « spacers » absents (« o » ou « □ ») et les «spacers» susceptibles d'être présents en « l » ou « ● » et les «spacers» susceptibles d'être absents en « m » ou « ○ ».

III.2.4 VALIDATION DES RESULTATS

Les spoligotypes saisis dans l'Excel sont ensuite vérifiés par une autre personne avant d'être validés définitivement.

III.2.5 CLASSIFICATION DES SOUCHES

Les profils obtenus sont classés en ST, puis en sous-lignée et en lignée. Le numéro ST est attribué en comparant les profils obtenus avec ceux qui sont inclus dans la base de données SITVITWEB, les sous-lignées et lignées correspondant à chaque ST sont aussi données par la base. Les profils référencés une seule fois dans l'étude et pour qui l'équivalent n'existe pas dans la base de données sont désignés orphelins. Les clusters ou groupe de profils identiques non reconnus dans la base de donnée sont classés «non déterminé» ou « ND ».

III.2.6 ANALYSE DES CLUSTERS SPATIAUX DE CAS DE TUBERCULOSE A ANTANANARIVO :

Les patients ont été localisés selon leur «fokontany» (quartier) d'appartenance. Les éventuels clusters spatiaux seront donc délimités par un agrégat de «fokontany» adjacents dont le taux de tuberculeux rapporté à la population est significativement supérieur à celui du reste des «fokontany». En supposant que les clusters spatiaux de cas de tuberculose ne varient pas significativement au cours du temps, les clusters spatiaux de cas de tuberculose primaire

définis en 2004, 2005, 2006, 2010 et 2011 (figure 14 et figure 15) ont été groupés en un seul cluster dans cette étude.

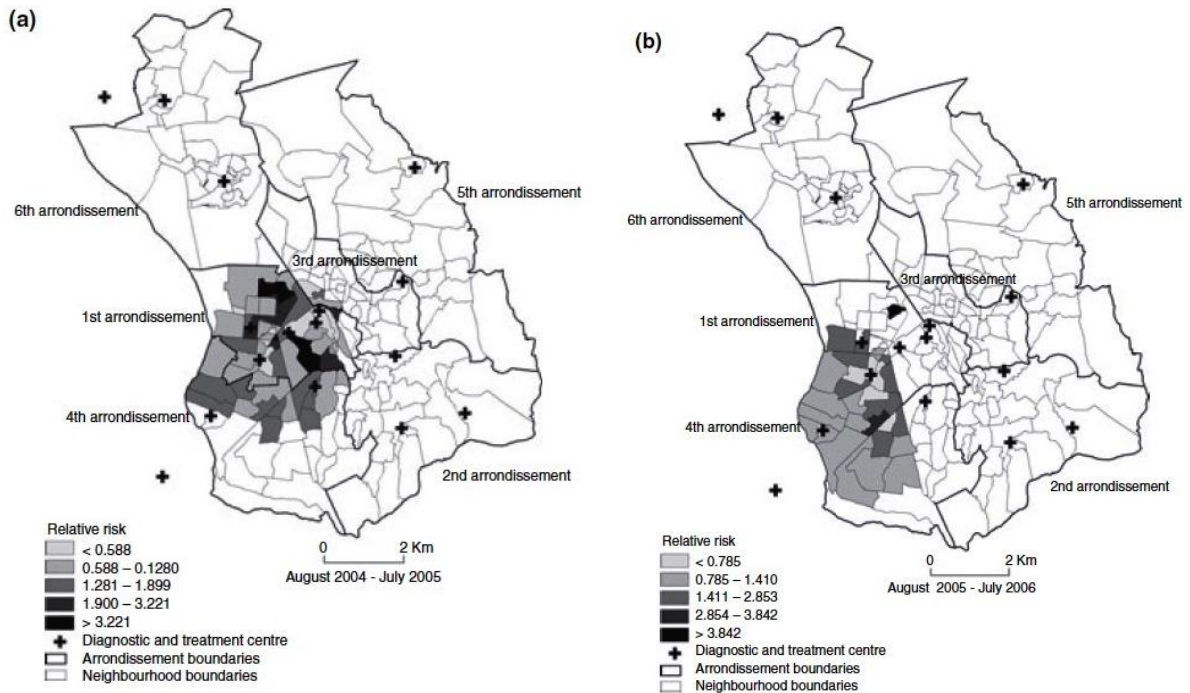


Figure 14 : Clusters spatiaux de cas de tuberculose à Antananarivo en 2004, 2005 et 2006 (Randremanana et al., 2009).

(a) Clusters spatiaux de cas trouvés entre Août 2004 et juillet 2005 dans le premier, le troisième et le quatrième arrondissement. (b) Clusters spatiaux de cas trouvés entre Août 2005 et juillet 2006 dans le premier et le quatrième arrondissement.

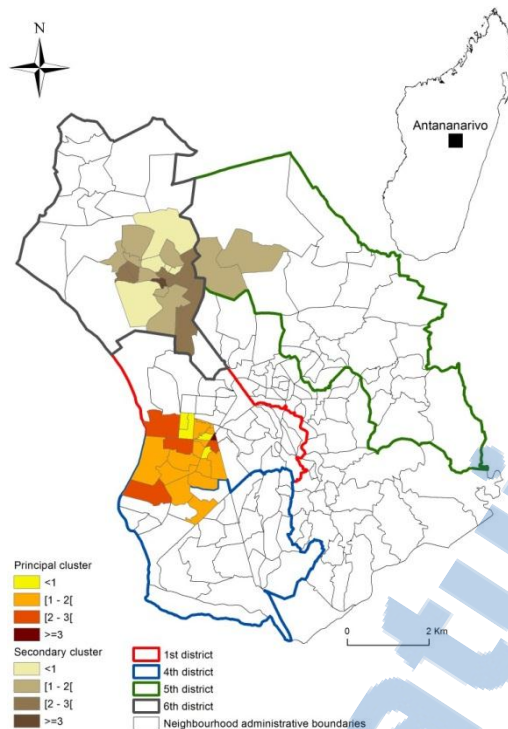


Figure 15 : Clusters spatiaux de cas de tuberculose à Antananarivo en 2010 et 2011 (Rakotosamimanana *et al.*, 2014).

Clusters secondaires définis dans le sixième, et le cinquième arrondissement et cluster primaire perçu dans le premier et le quatrième arrondissement.

III.2.7 CARTOGRAPHIE DES SPOLIGOTYPES SUR LE LOGICIEL QUANTUM GIS®

Les spoligotypes obtenus ont été distribués selon leur «fokontany» d'appartenance. La localisation des spoligotypes correspond à la localisation des patients correspondants. Comme l'idée de la cartographie était de localiser les clusters génotypiques des souches, seuls les spoligotypes référencés plus d'une fois et prédominants ont été représentés.

III.2.8 ASSOCIATION CLUSTER SPATIAL DE CAS ET CLUSTER GENOTYPIQUE

- **Approche 1** : Comparaison du taux de clusterisation génotypique à l'intérieur et à l'extérieur des clusters spatiaux de cas de tuberculose.

Le taux de clusterisation génotypique à l'intérieur et à l'extérieur du cluster spatial de cas a été comparé pour avoir un aperçu de la transmission de la tuberculose. (Le taux de clusterisation est défini comme le pourcentage des génotypes référencés au moins deux fois dans l'étude et dans une zone déterminée par rapport au nombre total d'échantillons inclus).

- **Approche 2** : Comparaison du taux de chaque ST majeur entre l'extérieur et l'intérieur de chaque cluster spatial de cas de tuberculose

Le taux de chaque ST par rapport au total des souches à l'intérieur d'un cluster spatial de cas de tuberculose a été testé indépendamment si ce dernier est significativement supérieur à celle de l'extérieur afin de déterminer une éventuelle transmission significative d'une souche.

III.2.9 ANALYSE STATISTIQUE

Le test de Khi2 ou le test exact de Fischer a été utilisé pour les différentes comparaisons de distributions. Une différence significative est indiquée par une valeur de $P < 0,05$.

III.2.9.1.1 Résultats attendus

- **Cas 1** : Si le taux de souches répétées dans chaque cluster spatial est significativement élevé à l'intérieur par rapport à l'extérieur du cluster spatial de cas, on suggère l'existence de zones de transmission active de la tuberculose dans ce cluster.
- **Cas 2** : Si on ne trouve pas de différence significative à l'intérieur et à l'extérieur du cluster spatial de cas, on suggère l'existence d'une zone à forts facteurs de risque de la tuberculose favorisant la réactivation des anciens cas de tuberculose et l'activation des cas de tuberculose latente.

IV RESULTATS

IV.1 CARACTERISTIQUES DE LA POPULATION D'ETUDE

Le recrutement des patients a été réalisé dans la période du 5 août 2013 au 6 mai 2014 dans les 20 CDT d'Antananarivo Renivohitra. Après information des patients sur l'objectif et le déroulement de l'étude, 523 patients ont donné leur consentement éclairé et ont été inscrits pour l'étude. Parmi les 523 patients, seuls 467 provenant de 14 CDT (Tableau 4) étaient résidents à Antananarivo et ont donc été inclus dans l'étude. Les crachats ainsi que les lames correspondants ont été obtenus pour chacun des patients inclus (Figure 16).

Tableau 4 : Distribution des patients inclus par CDT de recrutement

Code CDT	CDT	Nombres de patients inclus
T1	DAT / IHS	211
T2	SMR Befelatanana	7
T24	CHD1 Ambohidroa	7
T25	CSBU Isotry Central	56
T26	HME Ambohimandra	10
T3	EKAR Anatihazo	18
T38	SALFA 67ha	6
T42	CSBU Ambohipo	9
T43	CSBU Anosipatrana	1
T46	CSU Ambohimanmarina	37
T47	CSBU Analamahitsy	23
T5	CENHOSOA (Roques)	23
T6	SALFA Ambohibao	16
T7	CHU Fenoarivo	43
Total général		467

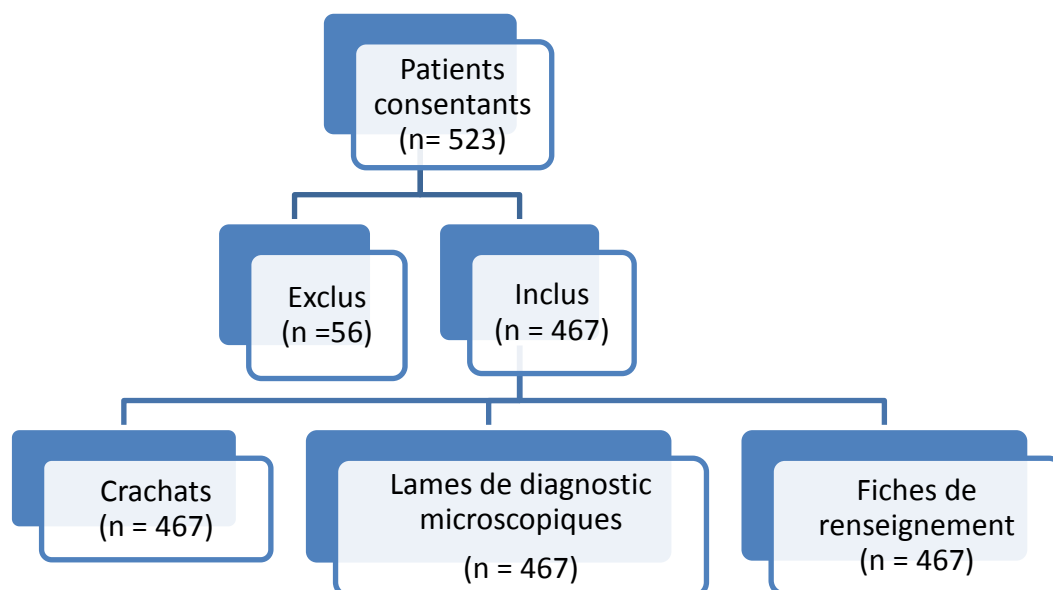


Figure 16 : Recrutement des patients de l'étude

Tous les cas de tuberculose ont été enregistrés (nouveau cas, rechute, reprise, échec). Les nouveaux cas représentent 92,51 % (432/ 465) de tous les cas recrutés. Sur les 467 patients inclus, 94,43 % (441/ 467) sont d'âge connus et 99,57 % (465/ 467) de sexe connu (tableau 5). Des informations supplémentaires sur les patients ont été obtenues mais sont incomplètes ; il s'agit des données environnementales parmi lesquelles ont été enregistrés la profession, le lieu de travail, le moyen de déplacement utilisé, le lieu de regroupement.

Tableau 5 : Caractéristiques démographiques et cliniques de la population d'étude

Nombres de patients inclus (N= 467)	N	%
Caractéristiques démographiques		
Age médian	40 (3- 76)	
Nombres de patients de sexe connu		
Féminin	175	37,63
Masculin	290	62,37
Caractéristiques cliniques		
Cas enregistrés	465	
Nouveau cas	432	92,9
Echec	1	0,22
Inconnue	8	1,72
Rechute	20	4,30
Reprise	4	0,86

IV.2 DISTRIBUTION DES PATIENTS SELON LEUR TRANCHE D'AGE ET LEUR SEXE

Parmi les 467 patients inclus, 441 (94,43 %) ont été d'âge et de sexe connus et classés en 7 tranches d'âge : « inférieur ou égale à 9 ans », « de 10 à 19 ans », « de 20 à 29 ans », « de 30 à 39 ans », « de 40 à 49 ans », « de 50 à 59 » et « supérieur ou égale à 60 ans » (figure 17).

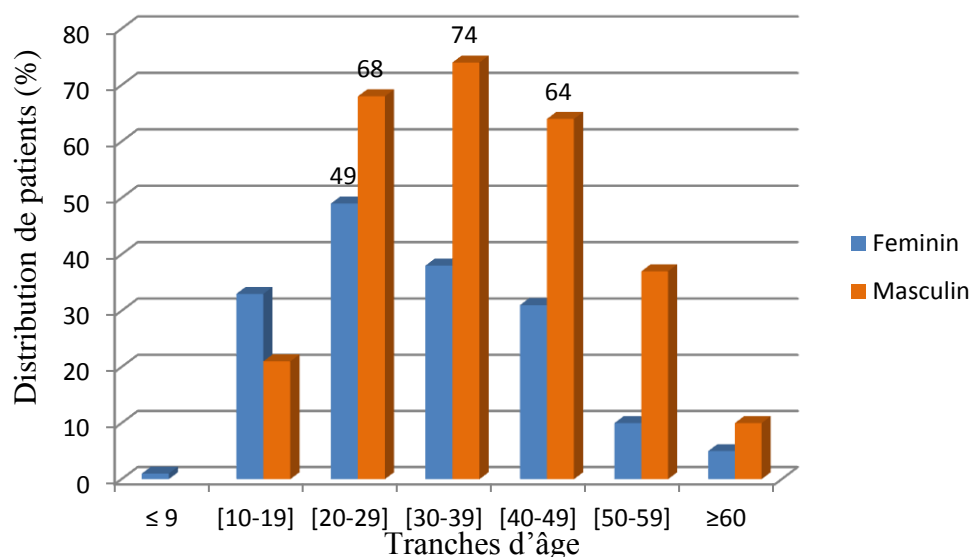


Figure 17 : Distribution des 441 patients inclus par tranches d'âge et sexe

Le nombre de cas recrutés était élevé dans les tranches d'âge [20-29] et [30-39] qui correspondent à la population jeune et active. Plus de cas ont été trouvés chez les hommes à partir de l'âge de 20 ans ($p > 0,05$).

IV.3 ANALYSE BACTERIOLOGIQUE DES ECHANTILLONS

40, soit 8,56 % des 467 crachats obtenus ont eu une culture négative et 1, soit 0,21 % des 467 lames de diagnostic a été microscopie négative.(figure 18)

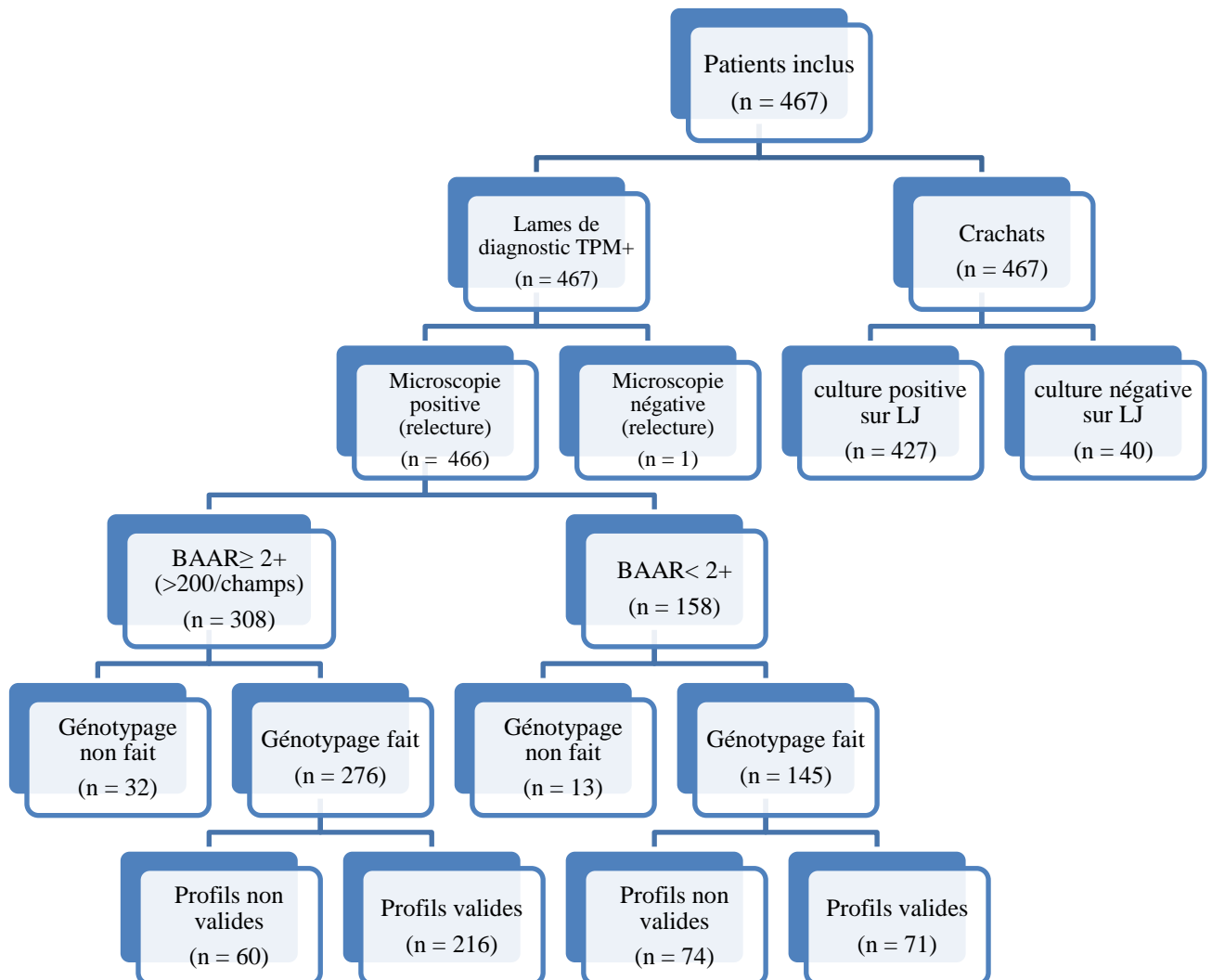


Figure 18 : Description des échantillons obtenus

IV.4 RESULTAT DU SPOLIGOTYPING SUR MEMBRANE

La figure 19 montre un exemple de film d'autoradiographie avec des profils spoligotypes.

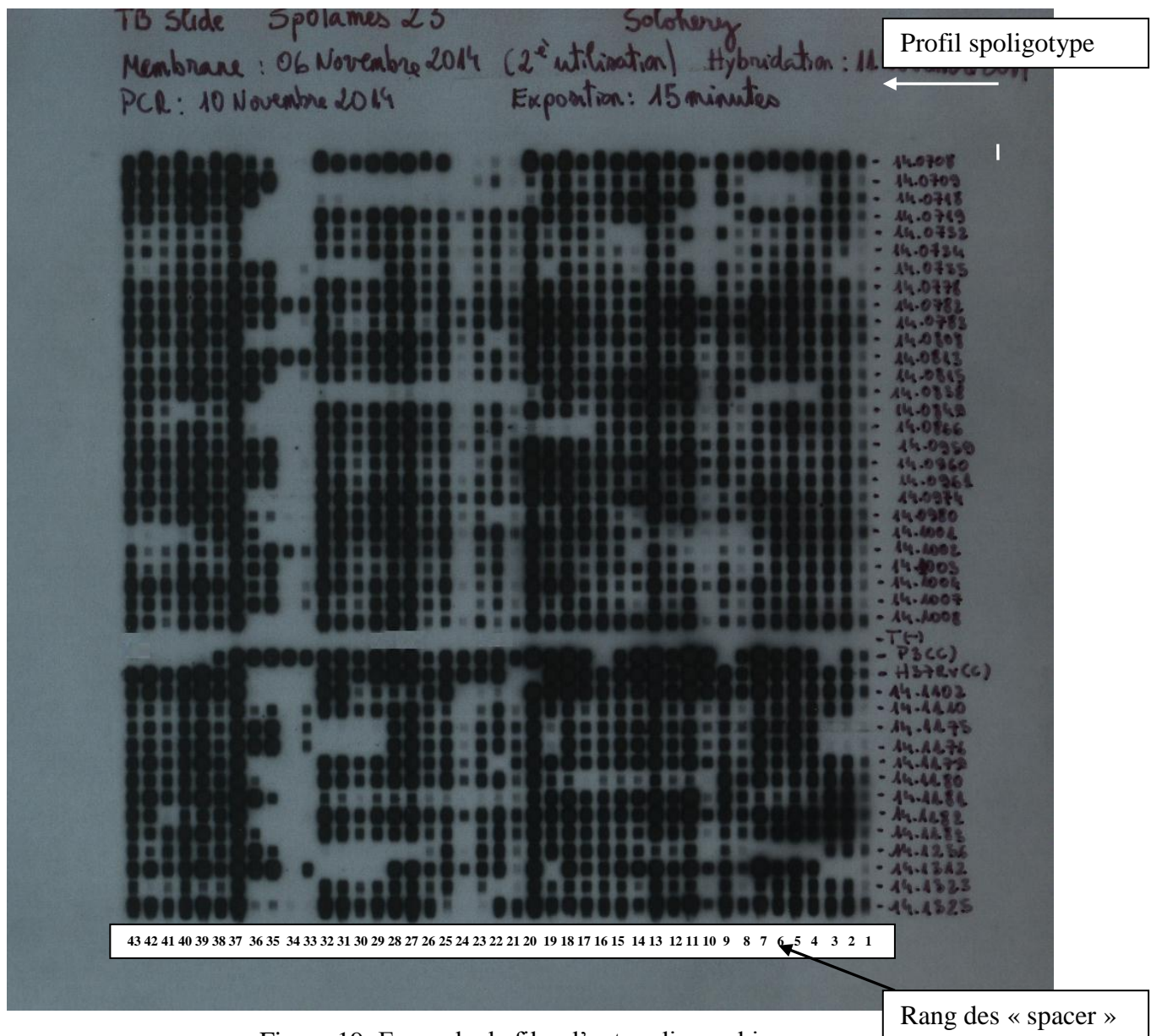


Figure 19: Exemple de film d'autoradiographie.

Les lignes représentent les profils spoligotypes allant du « spacer » 1 au « spacer » 43. 42 profils spoligotypes sont représentés parmi lesquels 2 sont les témoins positifs H37Rv et BCG P3, et 40 sont les échantillons codés par les numéros.

IV.5 GENOTYPAGE DES EXTRAITS DE LAMES ET DE CULTURES

Parmi les 466 lames TPM+, seulement 287 extraits d'ADN (61,59 %) ont donné des profils interprétables ; 43 extraits n'ont pas pu être génotypés et 136 ont donné des profils ininterprétables. Parmi les 287 profils spoligotypes, 216 profils ont été obtenus de lames à $BAAR \geq 2+$ et 71 profils de lames à $BAAR < 2+$.

Deux cent trois (70,73 %) des 287 profils ont été clustérisés en 32 ST constitués de 2 à 29 souches et 84 ont eu des profils uniques. De plus, 88,15 % (253/287) des profils ont été clustérisés en 19 sous-lignées constituées de 2 à 90 souches.

Après le typage par « spoligotyping » des ADN extraits de culot de cultures, 394 (92%) sur les 427 souches cultures obtenues ont donné des profils spoligotypes interprétables, dont 347 (88,07 %) des profils, clustérisés en 41 ST constitués de 2 à 39 souches et 47 correspondant à des profils uniques (Figure 20).

251 (53,75 %) patients sur les 467 inclus ont eu à la fois des profils spoligotypes à partir des extraits de lame et culture. Seul 141 (56,17 %) des 251 profils obtenus sont exactement concordants et 198 (78,88 %) sont similaires.

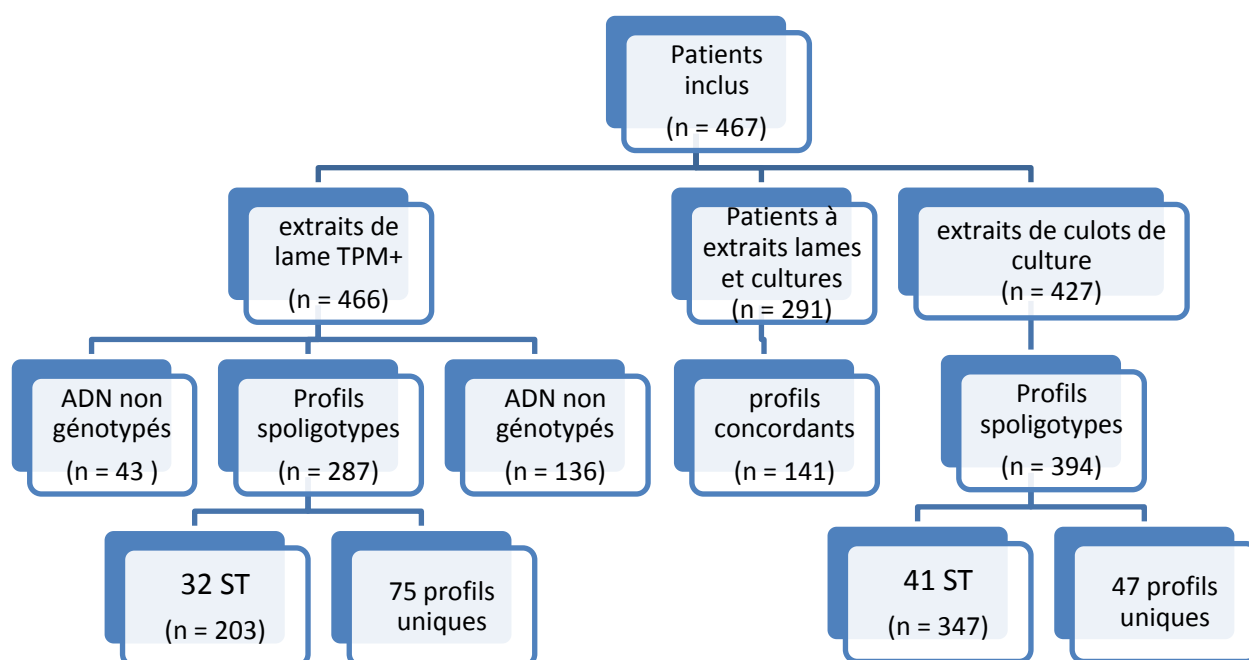


Figure 20 : Résultats du génotypage des souches à partir des ADN extraits de lames et de cultures

IV.6 DESCRIPTION DES SPOLIGOTYPES PAR COMPARAISON DES PROFILS OBTENUS A LA BASE DE DONNEES INTERNATIONALE (SITVITWEB)

IV.6.1 DESCRIPTION DES SPOLIGOTYPES OBTENUS A PARTIR DES ADN EXTRAITS DES LAMES DE DIAGNOSTIC

L'identification et la classification des 287 profils spoligotypes obtenus avec les extraits de lames ont montré que 11 lignées du MTBC étaient présentes à Antananarivo parmi lesquelles T, EAI, CAS, Beijing, Haarlem (H), LAM, U, X, S, MANU et BOVIS. Les profils obtenus ont été classifiés en lignées, sous-lignées et ST (Tableau 6).

La lignée T est prédominante, représentant 41,81 % (120/287) des profils obtenus. Elle prédomine avec la ST 53 de la sous-lignée **T1** qui a représentée 10,10 % de toutes les souches. La lignée T est représentée par 7 sous-lignées différentes dont les sous-lignées **T1** comprenant 14 ST différents (ST 31, ST 53, ST74, ST 86, ST136, ST156, ST242, ST291, ST373, ST612, ST966, ST1166, ST1214 et ST1223) 2 profils non déterminés ou « **ND** », **T1_RUS2** par la ST280, **T2** par les ST52, 118, 1332, et un profil ND, **T3** par un profil ND, **T3_ETH** par la ST149, **T5_MAD2** par la ST58, et une sous-lignée **ND** dans SpolDB4 représentée par 20 souches dont 9 sont de ST déterminés (ST 78 et 2409).

La lignée MANU (14,63 %) était présente avec ses 2 sous-lignées **MANU1** représentée par la ST100, un ST ND et un profil ND, **MANU2** représentée par les ST54, 1247, 1523, un ST ND et 10 profils ND.

4 sous-lignées différentes ont souligné la présence de la lignée EAI représentant 10,80 % des souches, dont les sous-lignées **EAI5** par 2 ST (ST342 et ST577), **EAI8_MDG** par la ST109 (figurant parmi les ST majeurs trouvés, représente 5,57 % de toutes les souches) et cinq profils ND, **EAI3_IND** par un profil et une sous-lignée **ND** (7 souches) dont 4 souches appartiennent à la ST10.

La lignée LAM (9,76 %) a été recensée avec ses sous-lignées **LAM10_CAM** représentée par quatre ST (ST 61, 2550, 2551 et 2552), **LAM11_ZWE** par la ST59, **LAM3** par les ST 33, 376, 1525 et un profil ND, **LAM4** par la ST60, **LAM6** par un ST ND, **LAM9** par les ST42, 162 et un profil ND.

4 sous-lignées différentes ont représenté la lignée Haarlem (8,01 %) : la sous-lignée **H1** comprenant les ST47, 62, 283, 1328 et 2 profils ND, la sous-lignée H2 représentée par un profil ND, la sous-lignée **H3** constituée par les ST 50, 99 et 1678, et une sous lignée **ND** constituée de une seule souche.

La lignée CAS (6,62 %) a été représentée par ses 2 sous-lignées, **CAS1_DELHI** avec les ST25 et ST26, et **CAS1_KILI** avec le ST21 et un profil ND.

La lignée Beijing avec son unique ST, le ST1 représente 2,79 % de toutes les souches.

Tableau 6 : Distribution des profils spoligotypes obtenus à partir des extraits de lames.

Lignée	Sous-lignée	Nombre de souches	Distribution(%)
BEIJING	BEIJING	8	2,79
BOVIS	BOV	1	0,35
cas	CAS1_DELHI	3	1,05
	CAS1_KILI	16	5,58
EAI	EAI3_IND	1	0,35
	EAI5	2	0,70
	EAI8_MDG	21	7,32
	ND	7	2,44
H	H1	13	4,53
	H2	1	0,35
	H3	8	2,79
	ND	1	0,35
LAM	LAM10_CAM	10	3,48
	LAM11_ZWE	6	2,09
	LAM3	5	1,74
	LAM4	1	0,35
	LAM6	2	0,70
	LAM9	4	1,39
MANU	MANU1	12	4,18
	MANU2	30	10,45
ND	ND	3	1,05
S	S	7	2,44
T	ND	20	7,02
	T1	90	31,36
	T1_RUS2	1	0,35
	T2	6	2,09
	T3	1	0,35
	T3_ETH	1	0,35
	T5_MAD2	1	0,35
U	ND	2	0,70
	U	1	0,35
X	X1	2	0,70
Total		287	100

% : Pourcentage par rapport aux 287 profils.

D'autres lignées ont été trouvées en faible proportion (5,58 %) dont : la lignée U représentée par 2 ST (ST237 et ST1196), la lignée S par les ST34, 494 et 2 profils ND, la lignée X par la sous-lignée X1 (ST336 et 352), la lignée BOVIS par la sous-lignée BOV (ST1673) et une lignée ND représentée par 3 souches.

IV.6.2 DESCRIPTION ET DISTRIBUTION DES SPOLIGOTYPES OBTENUS A PARTIR DES ADN EXTRAITS DE CULTURE.

Le « spoligotyping » à partir des 427 extraits de culture, utilisée pour vérification des résultats du « spoligotyping » à partir des extraits de lame de diagnostic, a donné 394 profils spoligotypes. Les profils spoligotypes ont été classés en 11 lignées du MTBC.

Les résultats ont montré une prédominance des lignées T (43,15 %), EAI (12,69 %), CAS (10,41 %), BEIJING (9,90 %), LAM (7,87 %) et H (7,87 %) sur les 394 profils obtenus (tableau 7).

Les ST 86 et 156 de la sous-lignée T1, le ST109 de la sous-lignée EAI8_MDG et le ST21 de la sous-lignée CAS1_KILI constituaient les ST majeurs. Ces ST représentaient 47,72 % (188/ 394) de tous les profils obtenus.

Les différentes lignées et sous-lignées obtenues par le « spoligotyping » des extraits de lames ont été retrouvées dans les résultats du « spoligotyping » des extraits de culture. La différence entre les résultats se situe au niveau du rang des lignées obtenues dans les 2 méthodes, parmi lesquelles la lignée MANU ne présentait qu'une faible minorité (2,02 %) des profils obtenus.

Tableau 7 : Distribution des spoligotypes obtenus à partir des extraits des souches obtenues

Lignée	Sous lignée	Nombre de souches	Distribution (%)
BEIJING	BEIJING	39	9,9
BOVIS	BOV	1	0,25
CAS	CAS1_DELHI	1	0,25
	CAS1_KILI	36	9,14
	ND	1	0,25
EAI	EAI5	1	0,25
	EAI8_MDG	37	9,39
EAI	ND	12	3,03
H	H1	17	4,31
	H3	11	2,79
	ND	3	0,76
LAM	LAM10_CAM	7	1,78
	LAM11_ZWE	12	3,05
	LAM3	6	1,52
	LAM4	1	0,25
	LAM9	4	1,02
	ND	1	0,25
MANU	MANU1	1	0,25
	ND	7	1,77
S	S	7	1,78
T	ND	37	9,37
	T1	122	30,94
	T1_RUS2	1	0,25
	T2	4	1,01
	T3	1	0,25
	T3_ETH	2	0,51
	T5	2	0,51
	T5_MAD2	1	0,25
U	ND	8	2,01
	U	3	0,76
X	ND	1	0,25
	X1	4	1,02
Total		394	100

% : Pourcentage par rapport aux 394 profils spoligotypes obtenus

IV.6.3 DISTRIBUTION DES SPOLIGOTYPES CONCORDANTS ENTRE LES PROFILS D'EXTRAITS DE LAME ET CULTURE

Seulement 251 (53,75 %) sur les 467 patients inclus ont eu à la fois des profils spoligotypes à partir des lames et des cultures. L'analyse des profils obtenus a montré une concordance exacte de 56,17 % (141/251) entre les deux résultats « spoligotyping » à partir d'extraits de lames et de cultures. Parmi les 141 profils exactement concordants, 44,62 % (112/ 251) ont été clustérisés en 18 ST. L'identification des profils concordants et leur classification ont montré que le rang des lignées prédominantes T (46,10 %), EAI (12,06 %),

LAM (12,06 %), H (11,35 %) et CAS (11,35 %) a été maintenu (tableau 8). Les concordances des lignées et sous-lignées obtenus des extraits de lame et culture sont 72,90 % (183/251), aussi bien pour les lignées que pour les sous-lignées (tableau 8).

Tableau 8 : Distribution des spoligotypes concordants entre profils spoligotypes des extraits de lames et cultures

Lignée	sous lignée	Nombre de souches	Distribution (%)
BEIJING	BEIJING	4	2,84
BOVIS	BOV	1	0,71
CAS	CAS1_DELHI	2	1,42
	CAS1_KILI	14	9,93
EAI	EAI8_MDG	12	8,51
	ND	5	3,55
H	H1	7	4,97
	H3	8	5,68
	ND	1	0,71
LAM	LAM10_CAM	5	3,55
	LAM11_ZWE	6	4,26
	LAM3	4	2,84
	LAM4	1	0,71
	LAM9	1	0,71
S	S	2	1,42
T	ND	10	7,1
	T1	50	35,46
	T1_RUS2	1	0,71
	T2	2	1,42
	T3_ETH	1	0,71
	T5_MAD2	1	0,71
U	ND	2	1,42
X	ND	1	0,71

% : Pourcentage par rapport aux 141 profils concordants des profils lames et cultures

IV.7 DEFINITION DU NOUVEAU CLUSTER SPATIAL DE CAS DE TUBERCULOSE

Après groupement de tous les clusters primaires de cas de tuberculose définis dans les études précédentes à Antananarivo Renivohitra depuis 2005, le nouveau cluster spatial de cas ainsi obtenu est constitué d'un cluster formé de 63 « fokontany » et localisé dans le premier et le quatrième arrondissement (figure 21).

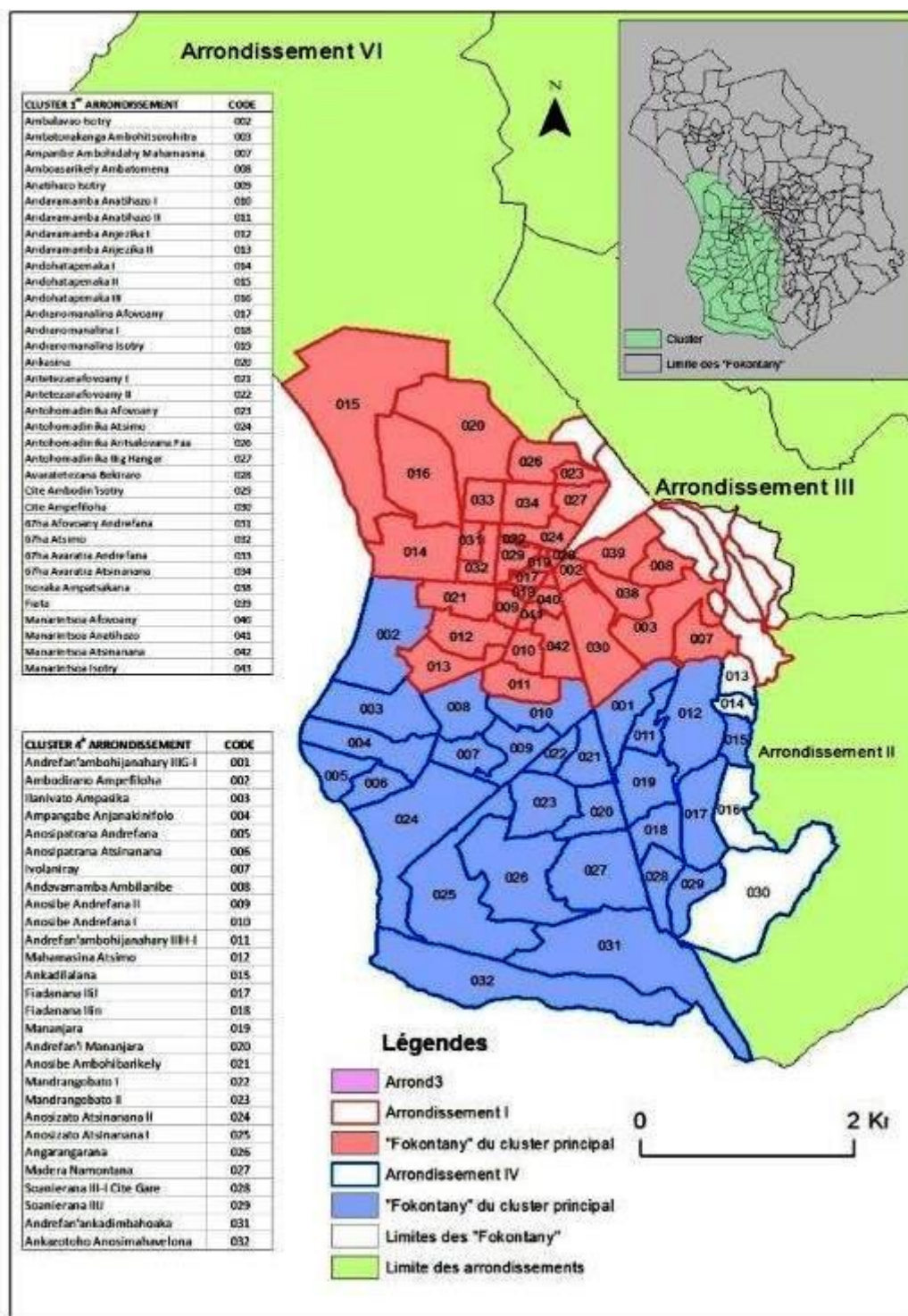


Figure 21 : Cluster spatial de cas de tuberculose à Antananarivo défini par l'association des clusters en 2004, 2005, 2006, 2010 et 2011 (Docteur Fanjasoa Rakotomanana, Unité Epidémiologie, Institut Pasteur de Madagascar. 2015).

IV.8 CARTOGRAPHIE DES SPOLIGOTYPES MAJEURS DE *M. tuberculosis* A ANTANANARIVO RENIVOHITRA A PARTIR DES EXTRAITS DE CULTURES

Antananarivo Renivohitra compte 192 « fokontany » ou quartier qui forment six arrondissements. Le géotypage par «spoligotyping» des souches contenues dans le crachat des 394 patients inclus dans l'étude a permis de déterminer leur spoligotypes. 87 spoligotypes ont été obtenus dont 41 sont clustérisés en ST et 47 sont des spoligotypes uniques. Parmi les 41 ST obtenus, 13 ont été majoritaires (ST1, 86, 156, 109, 21, 53, 78, 59, 62, 74, 34, 50 et 61) et ont été utilisés pour la cartographie.

La cartographie des spoligotypes (ST) majeurs a permis de voir la répartition des géotypes dans les « fokontany » d'Antananarivo (Figure 22). La localisation des ST correspond à la localisation des patients correspondants.

La carte a été réalisée à l'aide du logiciel Quantum Gis®. Sur la figure 22, les ST sont représentés par des symboles de formes et de couleurs différentes dans la carte. Les 13 ST majeurs ont été répartis dans leur 119 « fokontany » d'appartenance. La zone colorée en beige foncé correspond au cluster spatial de cas de tuberculose primaire obtenu par combinaison des anciens clusters de cas de 2004-2005, 2006 et 2010-2011. Le cluster spatial de cas de tuberculose primaire comptait 63 « fokontany » groupés dans le premier et le quatrième arrondissement d'Antananarivo Renivohitra. Les 13 ST majeurs appartenaient à 58 « fokontany » du cluster spatiale de cas.

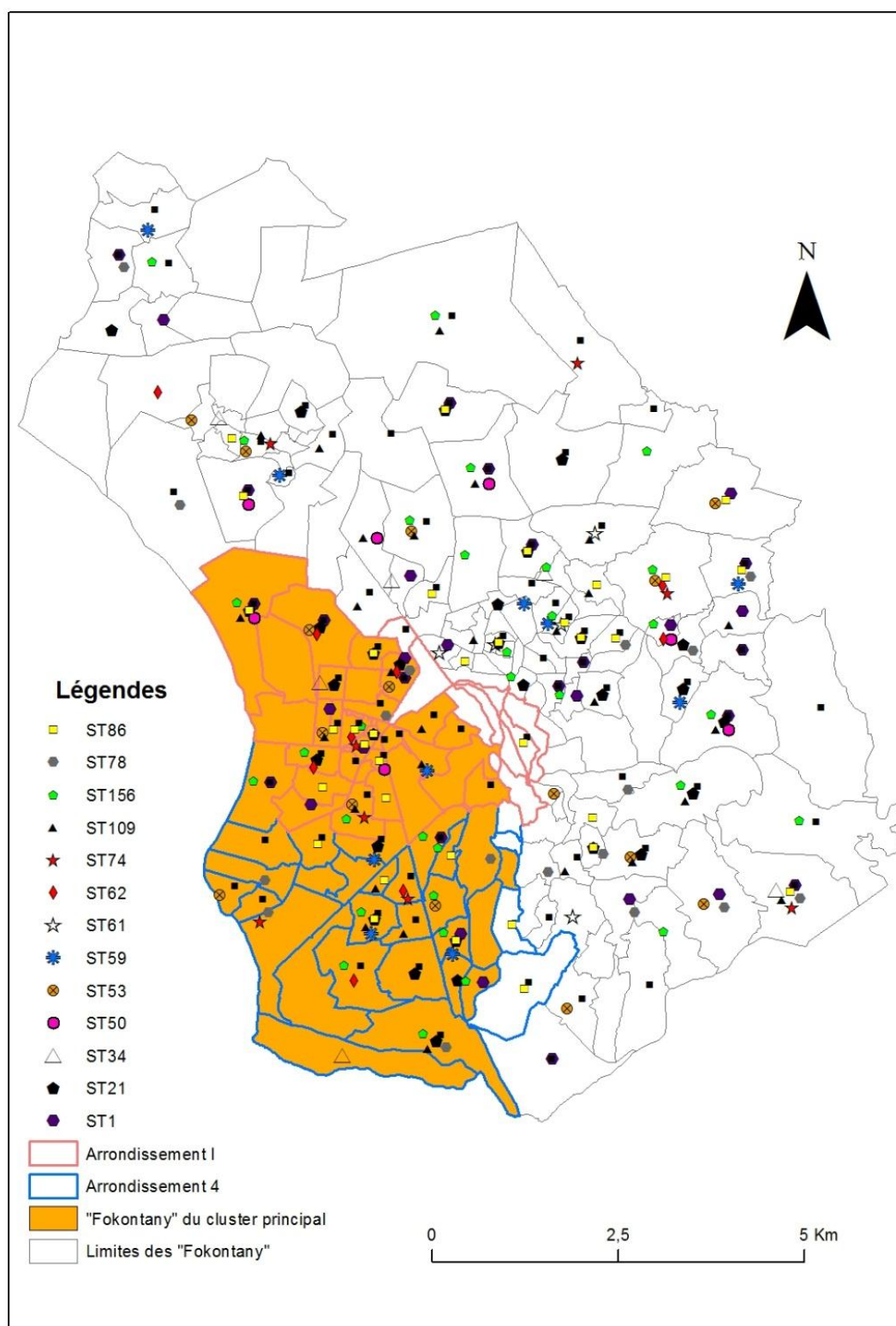


Figure 22 : Distribution des 13 ST majeurs de *M. tuberculosis* à Antananarivo Renivohitra (Docteur Fanjasoa Rakotomanana, Unité des Epidémiologie, Institut Pasteur de Madagascar. 2015)

IV.9 ANALYSE ASSOCIATION CLUSTER SPATIAL DE CAS ET CLUSTERS GENOTYPIQUES A PARTIR DES EXTRAITS DE CULTURES

17 clusters génotypiques (ST) ont été trouvés dans le cluster spatial de cas et 26 à l'extérieur. La comparaison des taux de clusterisation génotypique à l'intérieur, 10,82 % (17/157) et à l'extérieur 10,97 % (26/237) du cluster spatial de cas, dans notre étude, n'a montré de différence significative (tableau 11).

Tableau 9 : Taux de clusterisation des ST à l'intérieur et à l'extérieur du cluster spatial de cas de tuberculose

	Pourcentage des ST
Dans le cluster (%) ¹	10,82
Hors cluster (%) ²	11
Test statistique (Khi2)	p>0,05
(%) ¹ pourcentage par rapport aux 157 souches (%) ² pourcentage par rapport aux 237 souches	

L'existence d'une circulation d'un ST particulier à l'intérieur du cluster spatial de cas pourrait être suggérée si le taux de cet ST par rapport au total des souches à l'intérieur du cluster spatial de cas est significativement élevé par rapport à celui de l'extérieur. 157 souches étaient distribuées dans le cluster spatial de cas et 237 souches à l'extérieur. Les résultats obtenus, dans notre étude, ont montré qu'il n'y a pas de différence significative entre le taux de chaque ST à l'intérieur et à l'extérieur du cluster spatial de cas (tableau 12). Ces résultats n'ont donc pas permis de mettre en évidence la transmission d'un ST spécifique à l'intérieur du cluster spatial de cas.

Tableau 10 : Distribution des 13 ST majeurs dans le cluster et en dehors du cluster spatial de cas

ST	1	21	34	50	53	59	61	62	74	78	86	109	156
Dans cluster (%) ¹	7,64	11,46	1,27	1,27	4,46	3,82	0,00	3,82	3,18	3,82	10,19	8,28	11,46
Hors cluster (%) ²	11,39	7,17	2,11	2,11	4,64	2,53	2,95	1,27	1,69	5,06	9,70	10,13	8,44
Test statistique (Chi 2 ou Fisher exact)	p > 0,05												

(%)¹ : Pourcentage par rapport aux 157 profils à l'intérieur du cluster de cas, (%)² :

Pourcentage par rapport aux 237 profils à l'extérieur du cluster de cas

V DISCUSSION

L'association de l'étude moléculaire et l'étude spatiale est un outil idéal pour suivre la circulation des maladies. Les études spatiales utilisant le SIG effectuées à Antananarivo par les équipes de l'Unité Epidémiologie à l'Institut Pasteur de Madagascar ont permis la localisation des clusters spatiaux de cas de tuberculose et les facteurs influençant ces agrégations dans ces zones (Rakotosamimanana *et al.*, 2014; Rendremanana *et al.*, 2009). Aucune étude, jusqu'à présent, n'a été faite à Madagascar combinant l'analyse spatiale et l'épidémiologie moléculaire. La détermination des souches qui circulent dans les clusters de cas pourrait donner une idée sur l'existence ou non d'une zone de transmission active de tuberculose à Antananarivo. L'intervention directe dans ces zones stratégiques pourrait permettre de stopper la transmission de la maladie.

Dans notre étude, 92,9 % (432/465) des cas enregistrés sont des nouveaux cas, cela montre l'existence d'une transmission de la maladie. La tuberculose s'attaquait plus à la population active c'est-à-dire dans les tranches d'âge entre 20 à 29 ans et 30 à 39 ans dans lesquelles le nombre de cas de la tuberculose était élevé chez les hommes. Le recrutement dans les CDT était exhaustif dans les périodes du 5 août 2013 au 6 mai 2014 mais le nombre total de patients recrutés ne correspondait pas au nombre total de patients tuberculeux dans la ville et pendant la période de recrutement, des cas non diagnostiqués peuvent être envisagés. Ainsi, la différence du nombre de cas observée chez les hommes et les femmes pourrait être interprétée comme une différence de tendance à fréquenter les centres de diagnostic, ce qui suppose que les hommes étaient mieux diagnostiqués que les femmes. Le comportement social, les facteurs culturels, familiaux, occupation ont leur influence sur la distribution de la maladie selon le sexe selon Hudelson *et al.* (Hudelson, 1996). Des études ont rapportés une relation entre l'exposition aux facteurs tabac et alcool et la survenue d'une tuberculose active (Chiang *et al.*, 2007; Lonnoth *et al.*, 2008).

La diversité des lignées spoligotypes concordaient avec ceux obtenus dans les études de Rakotosamimanana *et al.* (Rakotosamimanana *et al.*, 2010) ce qui suppose une circulation continue des souches. La prédominance de la ST86 de la lignée T et la ST 109 de la lignée EAI déjà trouvée dans les études anciennes menés par Ferdinand *et al.* (Ferdinand *et al.*, 2005) suggèrent que ces souches pourraient être virulentes. La lignée EAI, définie comme ancestrale, a été retrouvée parmi les lignées majeures en circulation depuis de nombreuses années. Quant au ST1 de la lignée BEIJING, des études ont montré que dans cette lignée, de

nombreuses souches sont multi-résistantes aux antituberculeux ce qui fait que la circulation des souches appartenant à cette lignée est incontrôlable (Couvin and Rastogi, 2015). De même, il a été rapporté dans les études de Rakotosamimanana *et al.* (Rakotosamimanana *et al.*, 2010) que les souches des lignées BEIJING et CAS induisent une réponse immunitaire faible en IFN- γ , une cytokine qui active les macrophages, ce qui expliquerait la virulence de ces souches par rapport aux autres.

Un taux de clusterisation élevée de 88,15 % (253/287) à partir des extraits de lames et de 88,07 % (347/394) à partir des extraits de cultures, obtenues des patients à majorité de nouveau cas, suggère une transmission récente de souches soutenue par le fait que la transmission de tuberculose est une maladie accentuée par une forte densité de population (tel le cas d'Antananarivo Renivohitra, capitale de Madagascar), par la pauvreté notamment le manque d'hygiène dans la vie sociale favorisant la circulation de la maladie (WHO, Report 2013).

La mise au point de la technique de génotypage à partir des extraits de lame de diagnostic n'a pas été entièrement validée dans cette étude vue que la concordance avec la technique de référence a été faible (56,17 %). Le rendement du « spoligotyping » à partir des extraits de lames est assez faible avec 61,59 % (287/466) de profils valides. L'analyse a montré que 78,26 % (216/276) des lames TPM+ à densité de BAAR $\geq 2+$ ont donné des profils valides tandis que seulement 49 % (71/145) des lames TPM+ à densité de BAAR $< 2+$ ont donné des profils valides ($p < 0,05$), ce qui suggère que la densité de BAAR dans les lames aurait un impact sur les résultats du génotypage c'est-à-dire que les profils non valides, illisibles, pourraient être dus à la faible densité de BAAR dans les lames (0, 1+). Les profils illisibles peuvent être aussi dus à des contaminations dans les diverses étapes des travaux, du transport au génotypage, ou aussi à la présence possible de plusieurs types de souches dans un échantillon.

L'analyse des lignées prédominantes observées dans les 2 méthodes, spoligotyping à partir des extraits de lame et de culture, montre la même distribution de lignées majeures mais une émergence de la lignée MANU (14,63 %) dans les profils à partir des extraits de lame. Ces profils pourraient être issus d'une contamination due à la superposition de 2 profils ou une co-infection par 2 souches de *M. tuberculosis* différentes.

L'analyse des clusters génotypiques dans le cluster spatial de cas, situé dans le premier et le quatrième arrondissement d'Antananarivo Renivohitra, n'a pas permis de démontrer une transmission active de la maladie dans la zone car on n'a pas trouvé une différence

significative entre le taux de clusterisation de géotypes à l'intérieur et à l'extérieur du cluster spatial de cas. De plus, l'analyse du taux de chaque ST dans le cluster spatial de cas n'a pas montré la circulation d'un ST spécifique à l'intérieur du cluster. Il semble donc que la présence de clusters de cas de tuberculose à Antananarivo ne soit pas due à la circulation de souche(s) particulière(s). Cependant, il est possible que cette étude n'ait pas pu localiser des zones de transmission active à cause du nombre limité d'échantillons analysés. Par ailleurs, l'existence de facteurs de risque élevé comme la forte densité de population, la pauvreté, la malnutrition...favorisant la transmission de la tuberculose et/ou l'activation des tuberculoses latentes peut expliquer la présence de clusters de cas.

VI CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La technique de génotypage à partir d'extrait de lame de diagnostic n'a pas été entièrement validée. Malgré les faibles discordances des résultats obtenus confrontés à ceux de la culture, la technique pourrait être améliorée en entreprenant des mesures permettant d'éviter l'inter-contamination des lames depuis leur collecte dans les CDT jusqu'aux analyses. La technique de génotypage à partir des extraits de lame est cependant lourde ainsi, l'adoption d'un nouveau système de transport plus pratique tel que le GenoCard et la mise au point d'un nouveau technique de génotypage avec ce système pourraient être évaluées.

Le taux de clusterisation de génotypes élevé 88,15 % (253/287) à partir des extraits de lame et 88,07 % (347/ 394) à partir des extraits de culture suggère l'existence d'une transmission active de la tuberculose mais non localisée ; car la méthode proposée, combinaison d'analyse spatiale et d'analyse génotypique pour l'épidémiologie-surveillance de la tuberculose, n'a pas permis de détecter de circulation de souches à Antananarivo. Le cluster de cas observé pourrait être dû à l'activation de tuberculoses latentes favorisées par des facteurs de risque élevés dans la zone. Il est à noter que le génotypage a porté sur des souches isolées en 2013-2014 alors que les clusters de cas ont été définis antérieurement à cette période. Il serait donc plus approprié de déterminer les clusters de cas de tuberculose et les clusters génotypiques pour la recherche de la zone de transmission active de la maladie par une étude recrutant les patients tuberculeux pendant la même période.

En perspective, il serait plus judicieux de définir de nouveaux clusters de cas et d'élargir le champ d'étude. Il serait aussi intéressant de considérer les résultats de test de sensibilité aux antituberculeux dans les analyses pour dépister la moindre circulation de souches résistantes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Bonard, D., P. Msellati, L. Rigouts, P. Combe, D. Coulibaly, I.M. Coulibaly, and F. Portaels. 2000. What is the meaning of repeated isolation of *Mycobacterium africanum*? *Int J Tuberc Lung Dis* 4:1176-80.
2. 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.
3. Brudey, K., J.R. Driscoll, L. Rigouts, W.M. Prodinge, A. Gori, S.A. Al-Hajoj, 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. Narvskaia, Y.F. Ngeow, L. Naumann, S. Niemann, I. Parwati, Z. Rahim, V. Rasolofoa-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.
4. Burgos, M.V., and A.S. Pym. 2002. Molecular epidemiology of tuberculosis. *Eur Respir J Suppl* 36:54s-65s.
5. Chiang, C.Y., K.T. Luh, D.A. Enarson, S.L. Yang, Y.C. Wu, and T.P. Lin. 2007. Accuracy of classification of notified tuberculosis cases in Taiwan. *Int J Tuberc Lung Dis* 11:876-81.
6. 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.
7. 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.
8. Couvin, D., and N. Rastogi. 2015. Tuberculosis - A global emergency: Tools and methods to monitor, understand, and control the epidemic with specific example of the Beijing lineage. *Tuberculosis (Edinb)*.
9. Crawford, J.T. 2003. Genotyping in contact investigations: a CDC perspective. *Int J Tuberc Lung Dis* 7:S453-7.
10. Demay, C., B. Liens, T. Burguiere, V. Hill, D. Couvin, J. Millet, I. Mokrousov, C. Sola, T. Zozio, and N. Rastogi. 2012. SITVITWEB--a publicly available international multimarker database for studying *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity and molecular epidemiology. *Infect Genet Evol* 12:755-66.
11. 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.
12. Ferdinand, S., C. Sola, S. Chanteau, H. Ramarokoto, T. Rasolonavalona, 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.
13. Frothingham, R., H.G. Hills, and K.H. Wilson. 1994. Extensive DNA sequence conservation throughout the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol* 32:1639-43.
14. 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.
15. Gangadharam, P.R., and A.J. Droubi. 1981. Identification of mycobacteria by smear examination of the culture. *Tubercle* 62:123-7.
16. 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.
17. Gomgnimbou, M.K., I. Hernandez-Neuta, S. Panaiotov, E. Bachiyska, J.C. Palomino, A. Martin, P. del Portillo, G. Refregier, and C. Sola. 2013. Tuberculosis-spoligo-rifampin-isoniazid typing: an all-in-one assay technique for surveillance and control of multidrug-resistant tuberculosis on Luminex devices. *J Clin Microbiol* 51:3527-34.

18. 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.
19. Harshey, R.M., and T. Ramakrishnan. 1977. Rate of ribonucleic acid chain growth in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *J Bacteriol* 129:616-22.
20. Hermans, P.W., D. van Soolingen, and J.D. van Embden. 1992. Characterization of a major polymorphic tandem repeat in *Mycobacterium tuberculosis* and its potential use in the epidemiology of *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium goodii*. *J Bacteriol* 174:4157-65.
21. Hudelson, P. 1996. Gender differentials in tuberculosis: the role of socio-economic and cultural factors. *Tuber Lung Dis* 77:391-400.
22. 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.
23. 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. Yakus, 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.
24. Kulldorff, M. 1997. A spatial scan statistic. *Communications in statistics : Theory and Methods*. 26 : 1481-1496.
25. Lonnoth, K., B.G. Williams, S. Stadlin, E. Jaramillo, and C. Dye. 2008. Alcohol use as a risk factor for tuberculosis - a systematic review. *BMC Public Health* 8:289.
26. O'Reilly, L.M., and C.J. Daborn. 1995. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tuber Lung Dis* 76 Suppl 1:1-46.
27. 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.
28. PNL. 2011. Plan stratégique national de lutte contre la tuberculose à Madagascar 2012-2016. Ministère de la santé publique.
29. Prodinger, W.M., A. Eigentler, F. Allerberger, M. Schonbauer, and W. Glawischnig. 2002. Infection of red deer, cattle, and humans with *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* in western Austria. *J Clin Microbiol* 40:2270-2.
30. 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.
31. Rakotosamimanana, S., V. Mandrosovololona, J. Rakotonirina, J. Ramamonjisoa, J.R. Ranjalahy, R.V. Randremanana, and F. Rakotomanana. 2014. Spatial analysis of pulmonary tuberculosis in Antananarivo Madagascar: tuberculosis-related knowledge, attitude and practice. *PLoS One* 9:e110471.
32. Ramarokoto, H., O. Ratsirahonana, J.L. Soares, J. Ravaosolo, P. Ravololonandriana, A. Rakotoarisaonina, G. Ranjalahy, S. Ranaivohajaina, M. Mosa, R. Robinson, M. Ratsitorahina, V. Rasolofo, and B. Rarivoson. 2010. First national survey of *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance, Madagascar, 2005-2006. *Int J Tuberc Lung Dis* 14:745-50.
33. Randremanana, R.V., P. Sabatier, F. Rakotomanana, A. Randriamanantena, and V. Richard. 2009. Spatial clustering of pulmonary tuberculosis and impact of the care factors in Antananarivo City. *Trop Med Int Health* 14:429-37.
34. Razanamparany, V.R., H.H. Ramarokoto, E.J. Vololonirina, T. Rasolonalona, A. Michault, N. Pyndiah, R. Seenundun, P. Sandven, and S. Chanteau. 2009. RFLP clusters of *Mycobacterium tuberculosis* strains from the Indian Ocean Region: local and South Asian characteristics. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104:441-3.
35. Shabbeer, A., L.S. Cowan, C. Ozcaglar, N. Rastogi, S.L. Vandenberg, B. Yener, and K.P. Bennett. 2012. TB-Lineage: an online tool for classification and analysis of strains of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Infect Genet Evol* 12:789-97.
36. Shinnick, T.M., and R.C. Good. 1994. Mycobacterial taxonomy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 13:884-901.
37. Smith, I. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microbiol Rev* 16:463-96.
38. Smith, N.H., R.G. Hewinson, K. Kremer, R. Brosch, and S.V. Gordon. 2009. Myths and misconceptions: the origin and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Rev Microbiol* 7:537-44.
39. Stinear, T.P., T. Seemann, P.F. Harrison, G.A. Jenkin, J.K. Davies, P.D. Johnson, Z. Abdallah, 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.
40. 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.
41. Thierry, D., A. Brisson-Noel, V. Vincent-Levy-Frebault, S. Nguyen, J.L. Guesdon, and B. Gicquel. 1990. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. J Clin Microbiol 28:2668-73.
42. van Embden, J.D., M.D. Cave, J.T. Crawford, J.W. Dale, K.D. Eisenach, B. Gicquel, P. Hermans, C. Martin, R. McAdam, T.M. Shinnick, and et al. 1993. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. J Clin Microbiol 31:406-9.
43. van Soolingen, D., T. Hoogenboezem, P.E. de Haas, P.W. Hermans, M.A. Koedam, K.S. Teppema, P.J. Brennan, G.S. Besra, F. Portaels, J. Top, L.M. Schouls, and J.D. van Embden. 1997. A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. Int J Syst Bacteriol 47:1236-45.
44. WHO. Report 2013. Global tuberculosis report 2013.
45. WHO. report 2014. Global tuberculosis report 2014.
46. Yeh, R.W., A. Ponce de Leon, C.B. Agasino, J.A. Hahn, C.L. Daley, P.C. Hopewell, and P.M. Small. 1998. Stability of *Mycobacterium tuberculosis* DNA genotypes. J Infect Dis 177:1107-11.

ANNEXES

Annexe 1 : MATERIELS UTILISES

a) Pour l'extraction d'ADN à partir de lames

- Micropipette (P100)
- Microtubes Eppendorf de 1,5 ml
- Bistouri
- Bain marie 97°C
- Centrifugeuse (EPPENDORF, Centrifuge 5402)
- Minuterie

b) Pour le « spoligotyping »

b 1° Marquage de la membrane de spoligotyping

- Micropipettes (P10, P100, P200)
- Membrane de Biodyne C
- 43 sondes de capture correspondant aux 43 « spacers »
- Encre de Chine
- Miniblotter MN 45(BIOMETRA)
- Verreries : éprouvettes, bouteilles de 500 ml
- Pompe à vide
- Bouteille rotative
- Bain marie 60°C
- Agitateur
- Machine à glace
- Sachet plastique (Saran-wrap)
- Support de mousse
- Minuterie

b 2 « Polymerase Chain Reaction » ou PCR

- Micropipettes (P10, P100, P200, P1000)
- Hotte à flux laminaire
- Thermocycleur
- Microtubes et/ou microplaque PCR 96 puits

b 3 « Hybridation

- Micropipettes (P10, P100, P200)
- Pipettes de 25 ml
- Miniblotter MN 45(BIOMETRA)
- Verreries : éprouvettes, bouteilles de 500 ml
- Pompe à vide
- Glace
- Sachet plastique (Saran-wrap)
- Support de mousse
- Membrane marquée avec les sondes de capture
- Bain marie 60°C, 42°C
- Plaque chauffante 100°C
- Agitateur
- Etuve
- Minuterie
- Bouteille rotative

b 4 Révélation

- Film special E.C.L (Hyper film-ECL, Amersham)
- Cassette d'autoradiographie
- Papier buvard (papier Whatmann)
- Lampe Infra Rouge
- Minuterie

b 5 Déshybridation

- Bain 80°C
- Verreries : éprouvettes, bouteilles de 500 ml
- Agitateur
- Sachet plastique (Saran-wrap)

Annexe 2 : REACTIFS et TAMPONS

a) Pour l'extraction d'ADN à partir de la lame

- Xylène
- Eau Distillée
- Suspension de Chelex 5% (préparée extemporanément)

b) Pour le « spoligotyping »

b 1 Marquage de la membrane

- NaHCO₃ 500mM
- EDAC [1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbonimide] ou N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride 16%
- NaOH 100mM
- 2xSSPE/0,1%SDS (sodium dodecyl sulfate)
- EDTA 20mM

b 2 PCR

- Amorces DRa et DRb
 - DRa : 3' CAG CAG TCT GGG TTT TGG 5' biotine
 - DRb : 5' CCG AGA GGG GAC GGA AAC 3'
- dNTP 0,2 mM (dATP, dGTP, dCTP et dTTP) (Pharmacia Biotech, réf. 27-2035 01)
- MgCl₂ 7 mM (réf F-530, Thermo SCIENTIFIC)
- Tampon d'amplification HF buffer 5X (réf F-530, Thermo SCIENTIFIC)
- DmsO 100%
- ADN polymérase phusion (réf F-530, Thermo SCIENTIFIC)

b 3 Hybridation

- 2xSSPE/0,1%SDS
- 2xSSPE/0,5%SDS
- 2xSSPE
- Streptavidin-POD conjugate 500U (Réf 11 089 153 001) version 20

b 4 Révélation et lecture

- Le kit E.C.L (Amersham ECL western blotting detection reagent and analysis system, codes : RPN 2106/8/9 ; RPN 2209 ; RPN 2134)
- Révélateur Kodak [réf CAT 527 4394]
- Fixateur Kodak [réf CAT 522 4381]

Annexe 3 : PREPARATION DES REACTIFS ET TAMPONS

a) Préparation de suspension de Chelex 5% :

REACTIF	CONCENTRATION INITIALE	CONCENTRATION FINALE	POUR 10 ml
Chelex-100	Solide	5%	0,5g
SDS	10%	0,1%	100µl
Nonidet P40	100%	1%	100µl
Tween 20	100%	1%	100µl
Eau distillée			9,7 ml (quantité suffisante pour 10 ml)

b) Préparation des tampons pour spoligotyping :

1- 20XSSPE : 3M NaCl/0.2M NaH₂PO₄/0.02M EDTA Ph 7.4

NaCl :87,66g
 NaH₂PO₄ :15,60g
 EDTA :3,722g
 Eau distillée :400 ml
 Ajuster le pH avec NaOH 10N
 Eau distillée qsp :500 ml
 Autoclaver et garder à température ambiante

2- 2XSSPE :

20XSSPE :50 ml
 Eau distillée qsp :500ml

3- 2XSSPE/0.1% SDS

20XSSPE :50 ml
 SDS 10% :5 ml
 Eau distillée qsp :500 ml

4- 2XSSPE/0.5% SDS

20XSSPE :50 ml

- SDS 10% :25 ml
 Eau distillée qsp :500 ml
- 5- EDTA 20mM : pH 8
 EDTA :3,725g
 Eau distillée :400 ml
 Ajuster le pH avec NaOH 10N
 Eau distillée qsp :500 ml
 Autoclaver et garder à température ambiante
- 6- SDS 1% :
 SDS 10% :50 ml
 Eau distillée qsp :500 ml
 Filtrer à 0,22µm
- 7- Conjugué Streptavidin-POD (1/4000)
 Streptavidin-POD (Peroxydase) [Boehringer Mannheim réf. 11089 153
 001].....3,5µl
 2XSSPE / 0,5% SDS.....14ml
 La solution est préalablement chauffée à 42°C
- 8- Réactifs pour la révélation de l'hybridation :
Tampon de détection Detection reagent 1 / Detection reagent 2 :
 Detection reagent 1 [PIERCE, réf. 321.....20ml
 Detection reagent 2 [PIERCE, réf. 32106].....20ml
 Le tampon de détection est préparé extemporanément et gardé à l'obscurité.
- Révéléateur Kodak [réf CAT 527 4394]
 Kodak X-Omat EX II A.....125ml
 Kodak X-Omat EX II B12,5ml
 Kodak X-Omat EX II B6ml
 Eau distillée qsp 500ml
- Fixateur Kodak [réf CAT 522 4381]
 Kodak RP X-Omat LO A125ml
 Kodak RP X-Omat LO B10ml
 Eau distillée qsp 500ml

TITLE: SPATIAL DISTRIBUTION OF STRAINS GENOTYPES OF CLINICAL
Mycobacterium tuberculosis IN ANTANANARIVO, MADAGASCAR. PILOT STUDY

ABSTRACT:

Tuberculosis (TB) remains a public health problem in Madagascar. Previous studies using the Geographic Information System (GIS) detected spatial clustering of TB cases in Antananarivo. The genotyping technique from diagnosis slide extracts to replace genotyping from culture isolates could be used in molecular epidemiological studies and in particular for the identification of strains circulating in the town. The objective of this study is to identify the existence of an active transmission area of TB in Antananarivo Renivohitra by the association's analysis of spatial clusters of cases of TB predefined and genotypic clusters strains.

467 patients were enrolled in diagnostic and treatment centers for TB in Antananarivo between August 2013 and May 2014. 467 sputum and 466 sputum slides pulmonary tuberculosis patients with positive microscopy (PTM +) were collected for genotyping. The "spoligotyping" was conducted for strain genotyping and spatial analysis for mapping the distribution of strains was performed using Quantum GIS® software. Comparing the clustering genotypes rate inside and outside the spatial cluster of case was used to determine the existence of active transmission areas of TB.

Genotyping showed a diversity of strains with a dominance of T lineage (41.86%), and the presence of the EAI lines (10.8%), LAM (9.76%), H (8.01%) and CAS (6.62%). 80 % of the strains were clustered into 19 sublines of 2 to 90 strains. The combination of spatial clusters of cases of TB and genotypic clusters showed that there was no significant difference between the cluster ratio strains inside and outside the space of case clusters, which was therefore not possible to highlight areas of active transmission of TB in Antananarivo Renivohitra. The TB case spatial clusters identified in previous studies might be due to risk factors of the disease such as poverty, malnutrition, overcrowding ... A research with a larger number of patients should be conducted to bring more power to the study.

Keywords : *Mycobacterium tuberculosis*, genotyping, molecular epidemiology, spatial cluster, genotypic cluster, Antananarivo.

TITRE : DISTRIBUTION SPATIALE DES GENOTYPES DES SOUCHES CLINIQUES DE *Mycobacterium tuberculosis* A ANTANANARIVO, MADAGASCAR. ETUDE PILOTE

RESUME :

La tuberculose (TB) demeure un problème de santé publique à Madagascar. Des études précédentes utilisant le Système d'Information Géographique (SIG) ont détecté une agrégation spatiale des cas de tuberculose à Antananarivo. La technique de génotypage à partir des extraits de lame de diagnostic pour remplacer le génotypage à partir d'isolats de culture pourrait être utilisée dans des études d'épidémiologie moléculaire et en particulier pour l'identification des souches qui circulent dans la ville. L'objectif de cette étude est d'identifier l'existence d'une zone de transmission active de la TB à Antananarivo Renivohitra par l'association d'analyse des clusters spatiaux de cas de TB prédéfinis et des clusters génotypiques de souches.

467 patients ont été recrutés dans les centres de diagnostic et de traitement de la TB à Antananarivo entre Août 2013 et Mai 2014. 467 crachats et 466 lames de patients tuberculeux pulmonaires à microscopie positive (TPM+) ont été récoltés pour l'analyse génotypique. Le «spoligotyping» a été réalisé pour le génotypage des souches et l'analyse spatiale pour la cartographie de la distribution des souches a été réalisée à l'aide du logiciel Quantum Gis®. La comparaison du taux de clusterisation des génotypes à l'intérieur et à l'extérieur du cluster spatial de cas a été utilisée pour déterminer l'existence de zones de transmission active de TB.

Le génotypage a montré une diversité des souches avec prédominance de la lignée T (41,86 %), et la présence des lignées EAI (10,8 %), LAM (9,76 %), H (8,01 %) et CAS (6,62 %). 88 % des souches ont été clustérisées en 19 sous lignées de 2 à 90 souches. L'association des clusters spatiaux de cas de TB et des clusters génotypiques a montré qu'il n'y a pas de différence significative entre les taux de clusterisation des souches à l'intérieur et à l'extérieur des clusters spatiaux de cas, ce qui n'a donc pas permis de mettre en évidence des zones de transmission active de TB à Antananarivo Renivohitra. Les clusters spatiaux de cas de TB identifiés dans les études précédentes pourraient être dus aux facteurs de risque de la maladie comme la pauvreté, la malnutrition, la promiscuité... Une recherche avec un plus grand nombre de patients devrait être conduite pour apporter plus de puissance à l'étude.

Mots clefs : *Mycobacterium tuberculosis*, génotypage, épidémiologie moléculaire, cluster spatial, cluster génotypique, Antananarivo.