



**HAL**  
open science

## Etudes descriptive, épidémiologique, moléculaire et spatiale des souches *Mycobacterium tuberculosis* circulant à Antananarivo, Madagascar

Noël Harijaona Ratovonirina

► **To cite this version:**

Noël Harijaona Ratovonirina. Etudes descriptive, épidémiologique, moléculaire et spatiale des souches *Mycobacterium tuberculosis* circulant à Antananarivo, Madagascar. Médecine humaine et pathologie. Université Paris-Saclay; Université d'Antananarivo; Institut Pasteur (Tananarive), 2017. Français. NNT : 2017SACLS527 . tel-01784738

**HAL Id: tel-01784738**

**<https://theses.hal.science/tel-01784738>**

Submitted on 3 May 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# Etudes descriptive, épidémiologique, moléculaire et spatiale des souches *Mycobaterium tuberculosis* circulant à Antananarivo, Madagascar

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay et de l'Université  
d'Antananarivo, préparée à l'Université Paris Sud 11

École doctorale n°577, Structure et dynamique des systèmes vivants  
Spécialité de doctorat: Sciences de la vie et de la santé

Thèse présentée et soutenue à Antananarivo, le 11 décembre 2017, par

**Mr Noël Harijaona RATOVONIRINA**

Composition du Jury :

M. V. Jeannoda Professeur émérite, Université d'Antananarivo (DBFA)	Président
Mme. D. Rakoto Professeur, Université d'Antananarivo (DBFA)	Rapporteur
M. P. Supply Professeur, Université Catholique de Louvain	Rapporteur
Mme B. Andrianarisoa Professeur titulaire, Université d'Antananarivo (DBFA)	Examinatrice
M. J. L. Pernodet, Professeur Professeur, Université Paris-Saclay (équipe MMA)	Examineur
Mme. V. Rasolofo Professeur, Institut Pasteur de Madagascar (Directrice scientifique)	Directeur de thèse
M. C. Sola Professeur, Université Paris-Saclay (IGEPE team)	Co-Directeur de thèse

# TABLE DES MATIERES :

<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>V</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>VI</b>
<b>I GENERALITES</b> .....	<b>1</b>
<b>I.1 GENERALITES SUR LA TUBERCULOSE</b> .....	<b>1</b>
I.1.1 QU'EST-CE QUE LA TUBERCULOSE ? .....	1
I.1.2 HISTOIRE ET DATES MARQUANTES DE LA TB .....	1
I.1.3 EPIDEMIOLOGIE DE LA TB DANS LE MONDE .....	3
I.1.3.1 <u>DISTRIBUTION MONDIALE DES CAS DE TB</u> .....	3
I.1.3.2 <u>EMERGENCE DES CAS DE RESISTANCE</u> .....	4
I.1.3.3 <u>EVOLUTION DE LA TB MONDIALE</u> .....	5
I.1.4 L'OMS ET LES MOYENS ET STRATEGIES DE LUTTE CONTRE LA TB.....	6
<b>I.2 LE DIAGNOSTIC DE LA TB ET L'IDENTIFICATION DES MYCOBACTERIES</b> .....	<b>6</b>
I.2.1 LES TESTS DE DIAGNOSTIC .....	7
I.2.1.1 <u>L'EXAMEN DIRECT PAR MICROSCOPIE</u> .....	7
I.2.1.2 <u>LA RADIOGRAPHIE</u> .....	8
I.2.1.3 <u>L'INTRADERMO-REACTION A LA TUBERCULINE</u> .....	8
I.2.1.4 <u>AUTRES TESTS IMMUNOLOGIQUES</u> .....	9
I.2.1.5 <u>LES TESTS MOLECULAIRES</u> .....	9
I.2.1.6 <u>LA CULTURE</u> .....	10
<b>I.3 LES MYCOBACTERIES ET LE COMPLEXE <i>M. TUBERCULOSIS</i></b> .....	<b>10</b>
I.3.1 SYSTEMATIQUE .....	10
I.3.2 CARACTERISTIQUES DU GENRE <i>Mycobacterium</i> .....	13
I.3.3 CARACTERISTIQUES DU GENOME DE <i>M. tuberculosis</i> .....	13
I.3.4 LES MARQUEURS GENETIQUES DE <i>M. tuberculosis</i> .....	14
I.3.4.1 <u>LES ELEMENTS D'INSERTION (IS)</u> .....	15
I.3.4.2 <u>LES MOTIFS PE ET PPE</u> .....	16
I.3.4.3 <u>LES PROPHAGES PhiRv1 ET PhiRv2</u> .....	17
I.3.4.4 <u>LES SEQUENCES REPETES</u> .....	18
a. <b>Les éléments REP13E12</b> .....	<b>18</b>
b. <b>Le locus DR</b> .....	<b>18</b>
I.3.4.5 <u>Les minisatellites</u> .....	20
I.3.5 LES METHODES DE GENOTYPAGE.....	21
I.3.5.1 <u>LE SPOLIGOTYPAGE</u> .....	21
I.3.5.2 <u>LES MIRU-VNTR</u> .....	23
I.3.5.3 <u>LA RFLPIS6110</u> .....	25
I.3.5.4 LA GENOMIQUE COMPARATIVE : LSPs , SNPs, WGS/NGS. ....	26
a. <b>Les LSPs</b> .....	<b>26</b>
b. <b>Les SNPs</b> .....	<b>27</b>
<b>I.4 TRANSMISSION ET DEVELOPPEMENT DE LA TB</b> .....	<b>28</b>
<b>I.5 LE TRAITEMENT DE LA TB</b> .....	<b>30</b>
I.5.1 TRAITEMENT DES CAS DE TB RESISTANTS ET MULTIRESISTANTS AUX ANTITUBERCULEUX .....	32
I.5.2 LA PREVENTION CONTRE LA TB ET LE VACCIN BCG .....	32
<b>I.6 LA RESISTANCE DE <i>M. TUBERCULOSIS</i> AUX ANTITUBERCULEUX</b> .....	<b>33</b>
I.6.1 LA RESISTANCE NATURELLE AUX ANTITUBERCULEUX.....	33
I.6.2 LA RESISTANCE ACQUISE AUX ANTITUBERCULEUX.....	33
I.6.2.1 <u>SELECTION DES MUTANTS RESISTANTS</u> .....	34

I.6.2.2	COUT BIOLOGIQUE LIE A L'ACQUISITION D'UNE RESISTANCE .....	35
I.6.3	LA RESISTANCE PRIMAIRE ET SECONDAIRE .....	36
I.6.4	LES METHODES DE DIAGNOSTIC DE LA RESISTANCE AUX ANTITUBERCULEUX .....	36
I.6.4.1	LES ANTIBIOGRAMMES SUR MILIEU DE CULTURE SOLIDE ET LIQUIDE .....	36
I.6.4.2	<u>LES METHODES MOLECULAIRES</u> .....	36
a.	Le test GenoType® MTBDR <sup>plus</sup> .....	37
b.	Le test Genotype® MTBDR <sup>sl</sup> .....	38
c.	Le Xpert® MTB/RIF .....	38
d.	Le SpoligoRIF .....	39
e.	Le TB-SPRINT .....	40
<b>I.7</b>	<b>EPIDEMIOLOGIE DE LA TB .....</b>	<b>40</b>
I.7.1	EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE DE LA TB .....	41
I.7.1.1	<u>PRINCIPE DE L'EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE</u> .....	41
I.7.1.2	<u>EXEMPLES D'APPLICATION DE L'EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE POUR LA TB</u> .....	42
I.7.1.3	<u>UTILITE DE L'EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE</u> .....	44
I.7.2	ASSOCIATION EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE ET CLASSIQUE DE LA TB .....	44
I.7.3	LES METHODES EPIDEMIOLOGIQUES UTILISANT LE SIG .....	45
I.7.4	ASSOCIATION EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE ET SIG .....	47
<b>I.8</b>	<b>LA PHYLOGEOGRAPHIE ET LA CLASSIFICATION DES SOUCHES <i>M. TUBERCULOSIS</i> ....</b>	<b>47</b>
<b>I.9</b>	<b>HISTOIRE EVOLUTIVE DES SOUCHES <i>M. TUBERCULOSIS</i> .....</b>	<b>51</b>
<b>I.10</b>	<b>LA TB A MADAGASCAR .....</b>	<b>54</b>
<b>II</b>	<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>57</b>
<b>III</b>	<b>ETUDE 1 : DIVERSITE ET DISTRIBUTION DES SOUCHES <i>M. TUBERCULOSIS</i> CIRCULANT A MADAGASCAR .....</b>	<b>61</b>
<b>III.1</b>	<b>PRESENTATION DE L'ETUDE.....</b>	<b>61</b>
<b>III.2</b>	<b>ARTICLE 1 (en préparation) .....</b>	<b>62</b>
III.2.1	OBJECTIF.....	62
III.2.2	MATERIELS ET METHODES .....	62
III.2.2.1	<u>DESCRIPTION DE LA ZONE D'ETUDE</u> .....	62
III.2.2.2	<u>ECHANTILLONNAGE</u> .....	62
III.2.2.3	<u>TRAITEMENT DES PRELEVEMENTS BIOLOGIQUES</u> .....	64
III.2.2.4	<u>DESACTIVATION DES SOUCHES ET EXTRACTION D'ADN</u> .....	64
III.2.2.5	<u>SPOLIGOTYPAGE</u> .....	64
III.2.2.6	<u>ANALYSE</u> .....	67
III.2.2.7	<u>CARTOGRAPHIE</u> .....	67
III.2.3	RESULTATS .....	68
III.2.3.1	<u>DESCRIPTION DES PATIENTS</u> .....	68
III.2.3.2	<u>SPOLIGOTYPAGE</u> .....	69
III.2.3.3	<u>DISTRIBUTION DES LIGNEES ET SOUS LIGNEES OBTENUES</u> .....	72
III.2.3.4	<u>COMPARAISON STATISTIQUE</u> .....	73
III.2.4	DISCUSSION .....	75
<b>III.3</b>	<b>CONCLUSION DE L'ETUDE 1 .....</b>	<b>78</b>
<b>IV</b>	<b>ETUDE 2 : DISTRIBUTION, DIVERSITE ET TRANSMISSION DE LA SOUCHE <i>M. TUBERCULOSIS</i> ENDEMIQUE MALGACHE : LE SIT109 (ARTICLE 2) .....</b>	<b>80</b>
<b>IV.1</b>	<b>PRESENTATION DE L'ETUDE.....</b>	<b>80</b>

IV.2	ARTICLE 2 .....	80
IV.3	CONCLUSION DE L'ETUDE 2 .....	110
V	<b>ETUDE 3 : EVALUATION DES ZONES HOTSPOTS DE TUBERCULOSE A ANTANANARIVO, MADAGASCAR PAR COMBINAISON D'ANALYSE SPATIALE ET DE GENOTYPAGE (ARTICLE 3).....</b>	<b>111</b>
V.1	PRESENTATION DE L'ETUDE.....	111
V.2	ARTICLE 3 .....	113
V.3	CONCLUSION DE L'ETUDE 3 .....	121
VI	DISCUSSION GENERALE.....	122
VII	CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	128
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	130
	PULICATIONS.....	
	RESUME : .....	
	ABSTRACT .....	

## DEDICACE

*Je dédie cette thèse :*

*A mes parents: Aucun hommage ne saurait être à la hauteur de l'amour dont vous n'avez jamais cessé de me combler par vos éducatons spirituelle et pédagogique. Ce modeste travail est le fruit de tant d'année d'efforts et de sacrifices. Sans la personnalité et la force intérieure que vous avez forgées en moi, il aurait été impossible d'arriver aussi loin. Maman, je te souhaite vivement de retrouver la pleine santé et Papa, je te souhaite de reposer en paix !*

*A ma femme: Reçois mes sincères remerciements, pour les aides, le soutien que tu m'as offerts avec amour au cours de ces années passées. Que le fruit de ce travail nous apporte une meilleure vie pleine de joie et remplace le vide et les sacrifices pour la confection de notre avenir.*

*A mes enfants: Mes sources de joie et de courage. Veuillez trouver dans ce travail le fruit des sacrifices et des absences dont vous aviez dû subir pour son accomplissement. Que l'avenir vous réserve une vie pleine de joie et de réussite. Qu'elle ne vous soit pas avare de sagesse, de savoir, de force, de santé et de plénitude.*

*A tous ce qui me sont chers: Je n'ai pas les mots pour exprimer ma gratitude. Mon entourage, familles, amis et collègues ont toujours été pour moi une source d'aide et de support incomparable. Sans vos mains qui m'ont été tendues, vos sourires, il a été difficile de trouver la force de travailler. Puisse Dieu vous garder, éclairer votre route et vous aider à réaliser à votre tour vos vœux les plus chers.*

## REMERCIEMENTS

La présente étude n'aurait pas vu le jour sans l'aide bienveillante, le dévouement d'un certain nombre de personnes qui par leur présence, leurs conseils et leurs aides, m'ont apporté leur soutien. Je les en remercie et m'excuse d'avance de ne pas pouvoir les citer exhaustivement.

Je suis profondément reconnaissant à la Direction de l'Institut Pasteur de Madagascar (IPM) et à la Direction de l'Institut de Biologie Intégrative de la Cellule (I2BC), et antérieurement de l'Institut de Génétique et de Microbiologie (IGM) UMR8621 de l'Université de Paris Sud 11 d'avoir bien voulu m'accueillir dans leurs établissements respectifs.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance et toute ma gratitude à mes deux co-directeurs de thèse :

Le Docteur Voahangy RASOLOFO RAZANAMPARANY, Chef de l'unité des Mycobactéries de l'Institut Pasteur de Madagascar, qui m'a accueillie avec bienveillance et amabilité à l'Unité des Mycobactéries de l'IPM et m'a accordé sa confiance et son soutien pour mener ce travail de recherche. Je la remercie aussi pour sa persévérance, ses conseils et ses encouragements.

Le Professeur Christophe SOLA, Chef de l'équipe « Infection, Génétique, Evolution des Pathogènes Emergents » (IGEPE), qui m'a aussi accueilli dans son laboratoire, m'a donné aides et conseils pour mener à bien ce travail. Je le remercie également pour sa disponibilité, sa persévérance, sa patience et son dévouement.

J'adresse également mes sincères remerciements aux membres du jury :

Au Pr. Victor JEANNODA, qui m'a fait l'honneur de présider le jury de cette thèse.

Au Pr. Doll RAKOTO et au Pr. Philip SUPPLY, qui m'ont fait l'honneur d'être les rapporteurs de cette thèse.

Au Pr. Blandine ANDRIANARISOA et au Pr. Jean Luc PERNODET, qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger cette thèse.

Ma reconnaissance va aussi à la Direction de l'IPM et l'équipe IGEPE pour le financement des projets de la thèse ainsi qu'aux responsables de l'attribution des différentes bourses (Bourse Girard de l'IPM, Bourse du Gouvernement français, Bourse d'aide aux thèses en cotutelle de l'Université Paris-Sud 11 et Bourse de Réseau International de l'Institut Pasteur) pour différents financements au cours de la thèse.

Ma reconnaissance va aussi au Ministère de la Santé malgache, à l'Unité d'épidémiologie de l'IPM, au PNLT (Programme National de Lutte contre la Tuberculose) ainsi qu'aux différents Centre de Diagnostic de de Traitement de la Tuberculose pour leurs collaborations et participation aux différentes études.

Mes plus vifs remerciements s'adressent également : au Docteur Niaina RAKOTOSAMIMANANA, au Docteur Guislaine REFREGIER, au Docteur Michel GOMGNIMBOU, au Docteur Fanjasoa RAKOTOMANANA, au Docteur Mamy Serge RAHERISON et au Docteur Andrianirina RAKOTOSON pour leurs précieuses aides.

Ma gratitude particulière à toute l'équipe de l'Unité des Mycobactéries de l'IPM et l'équipe de l'IGEPE pour leur soutien technique, collaboration, échanges fructueux et les relations sociales incomparables qui ont fait de ce travail une réussite.

Ma reconnaissance va aussi :

A Madame Muriel DECRAENE qui n'a pas ménagé d'effort pour les parties administratives à l'I2BC, ainsi que les personnels administratifs de l'IPM et de l'Université d'Antananarivo.

Je remercie également tous les enseignants de la Faculté des Sciences et tous les enseignants des classes antérieures pour m'avoir transmis leurs connaissances et expériences tout au long de mes études.

A tous ce qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de la thèse.

Et surtout à Ma famille qui m'a toujours soutenu tout au long de mes études.

*Un grand Merci à tous !*

## ABREVIATIONS

A	Adénine
ACP	Acyl carrier protein
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARN <sub>r</sub>	Acide ribonucléique ribosomal
ARN <sub>t</sub>	Acide ribonucléique de transfert
BAAR	Bacille Acido-Alcool Résistant
BCG	Bacille de Calmette et Guérin
BK	Bacille de Koch
C	Cytosine
CAS	CRISPR-associated
CCD	Charge coupled device
CDT	Centre de Diagnostic et de Traitement de la Tuberculose
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CNRM	Centre national de référence des Mycobactéries
CUA	Commune Urbaine d'Antananarivo
MTBC	Complexe <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de carbone
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
DOTS	Directly Observed Therapy Short-course (Traitement de courte durée sous observation directe)
DPO	Dual Priming oligonucléotide
DR	Direct repeat region
DS6	Deletion sequence 6
dTMP	Désoxythymidine mono phosphate
ECL	<i>Enhanced Chemo-Luminescence Detection kit</i>
EMB	Ethambutol
<i>et al.</i>	<i>et alter</i> (et les autres)
ETH	Ethionamide
ETR	Exact tandem repeat
FAD	Flavine Adénine Dinucléotide
GTG	Guanine-Thyrosine-Guanine
H	Heure
HGDI	Indice de Gaston et Hunter
His	Histidine
<i>i.e.</i>	<i>id est</i> (c'est-à-dire)
IDR	Intradermoréaction
IFN- $\gamma$	Interféron gamma
INH	Isoniazide
IPM	Institut Pasteur de Madagascar
IS	Insertion Sequence

kb	kilobase
LAMP PCR	Loop mediated isothermal amplification
LJ	Lohenstein Jensen
LSP	Large sequence polymorphism
MGIT	Mycobacteria Growth Indicator Tube (Tube indicateur de croissance mycobactérienne)
MIRU	Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit (unité répétitive dispersée dans le génome mycobactérien)
MOTT	<i>Mycobacteria other than tuberculosis</i>
MR	Multi-résistante
MTCB	Complexe <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NAD(P)	Nicotinamide Adénine Dinucléotide (Phosphate)
NTM	<i>Non tuberculosis mycobacteria</i>
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PAS	Acide p-aminosalicylique
pb	Paire de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction (Réaction de Polymérisation en Chaîne)
PE	Proline-glutamine
PGG	Principal Genetic Group (Groupe Génétique Principal)
PGRS	Polymorphic GC rich sequences
PIT	Primo-infection tuberculeuse
pmol	picomoles
PNLT	Programme National de Lutte contre la Tuberculose
POA	Acide pirazinoïque
PPD	Purified Protein Derivative
PPE	Proline-proline-glutamine
PZA	Pyrazinamide
QGis	Quantum GIS
QUB	Queen's university Belfast
RASA	Rapport d'activité sur la riposte contre le SIDA à Madagascar
RD	Region deleted
RFLP	Restriction fragment length polymorphism (Polymorphisme de la longueur de fragments de restriction)
RIF	Rifampicine
RRDR	Rifampin Resistance Determining Region
SCC	Short Course Chemotherapy (Thérapie médicamenteuse de courte durée)
SDS	Sodium dodecyl sulfate
Ser	Serine
SIDA	Syndrome d'Immuno-Déficiéncie Acquise
SIG	Système d'information géographique
SM	Streptomycine
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Polymorphisme au niveau d'un seul nucléotide)
Spoligo-RIF	Spoligotyping and rifampicin sensibility test

ST	Shared-type
SIT	Spoligo-international type
TB	Tuberculose
TBD1	Tuberculosis deletion region 1
TB-MR	Tuberculose multi-résistante aux antibiotiques
TB-SPRINT	tuberculosis-spoligotyping/rifampicin and isoniazid sensibility test
TB-TDR	Tuberculose totalement résistante aux antibiotiques
TB-UR	Tuberculose à ultra résistante aux antibiotiques
TCH	Acide thiophène-2-carboxylique
TDR	<i>Totally Drug resistant</i> – Résistant à tous les antituberculeux disponibles actuellement
THF	cofacteur tetrahydrofolate
UR	Ultra résistante
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VNTR	Variable Number of Tandem Repeat (Nombre variable de répétition en tandem)
WGS/NGS	Whole Genome Sequencing/Next Generation Sequencing : séquençage du génome de troisième génération
WHO	World Health Organization (Organisation Mondiale de la Santé - OMS)

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Liste des 104 oligonucléotides utilisés en spoligotypage correspondant aux espaceurs connus chez MTBC .....	19
Tableau 2: Liste des 24 locus VNTR standards utilisés actuellement pour la technique MIRU-VNTR .....	24
Tableau 3: Liste des antituberculeux disponibles actuellement .....	31
Tableau 4: Les régions génomiques associées à une diminution ou une perte de la sensibilité aux agents antituberculeux .....	37
Tableau 5: Les différentes classifications des souches <i>M. tuberculosis</i> .....	48
Tableau 6: Les familles et sous-familles de spoligotypes décrites dans SITVITWEB et leur règles d'identification.....	50
Tableau 7: Diversité des spoligotypes circulant à Madagascar .....	55
Tableau 8: Composition du mélange réactionnel pour l'amplification de la région DR pour le spoligotypage .....	65
Tableau 9: Cycle de température utilisé pour l'amplification de la région DR pour le spoligotypage .....	65
Tableau 10 : Stratification par âge des patients inclus dans l'étude .....	68
Tableau 11: Répartition des 1014 patients dans les 19 régions de Madagascar .....	68
Tableau 12 : Liste des spoligotypes les plus communs de l'étude .....	70
Tableau 13: Comparaison de la distribution des différentes lignées de spoligotypes entre les 6 provinces de Madagascar .....	74
Tableau 14: Comparaison de la distribution des souches EAI et des non EAI entre Antananarivo et les autres provinces.....	74
Tableau 15: Comparaison de la distribution des souches T et des non T entre Antananarivo et les autres provinces .....	74

## LISTE DES FIGURES

Figure 1: Découverte des antituberculeux et évolution du traitement de la TB au cours du temps.....	2
Figure 2: Incidence de la TB dans le monde en 2014 .....	4
Figure 3: Distribution des nouveau cas de TB MR en 2014 .....	5
Figure 4: Observation microscopique de frottis faisant apparaître des BAARs par la coloration de Ziehl-Nelsen (A) et par la coloration à l'Auramine O (B) .....	7
Figure 5: Radiographie d'un tuberculeux pulmonaire .....	8
Figure 6: Systématique des espèces du genre <i>Mycobacterium</i> .....	11
Figure 7: Arbre phylogénétique des mycobacteries à croissance lente selon la séquence du gène ARNr 16S. <i>M. fortuitum</i> a été utilisé comme « outgroup ». .....	12
Figure 8: Représentation du génome de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv .....	14
Figure 9: Distribution des 29 IS, des 2 prophages PhiRv1 et PhiRv2 et des 7 éléments REP13E12 sur le génome de la souche H37rv .....	16
Figure 10: Structure de la région DR .....	18
Figure 11: Distribution des 41 locus MIRU sur le génome de H37rv .....	21
Figure 12: Le spoligotype.....	22
Figure 13: Les sites de restriction IS6110 chez <i>M. bovis</i> .....	25
Figure 14: Formation et progression du granulome lors d'une infection à <i>M. tuberculosis</i> ....	29
Figure 15: A- le Magpix; B- le Luminex 200 .....	39
Figure 16: Distribution des lignées de spoligotype dans SITVITWEB .....	51
Figure 17: Modèle de schéma évolutif des espèces du MTBC selon Brosch <i>et al.</i> 2002 .....	52
Figure 18: Relation évolutive entre les membres du CMTB et les autres espèces de mycobactéries .....	53
Figure 19: Description et distribution des principaux spoligotypes trouvés à Madagascar ....	56
Figure 20: Les clusters spatiaux de cas de TB à Antananarivo, de 2005 à 2011 .....	56
Figure 21: Description de la zone d'étude et distribution des CDTs inclus dans l'étude .....	63
Figure 22: Distribution des lignées et des sous-lignées de spoligotypes obtenus .....	72
Figure 23: Distribution des lignées de spoligotypes dans les 6 provinces de Madagascar .....	73

# I GENERALITES

## I.1 GENERALITES SUR LA TUBERCULOSE

### I.1.1 QU'EST-CE QUE LA TUBERCULOSE ?

La tuberculose (TB) est une maladie infectieuse contagieuse dont la transmission est interhumaine et se fait par voie aérienne. La TB est une maladie mortelle mais curable qui constitue jusqu'à nos jours l'une des maladies les plus meurtrières dans le monde et particulièrement dans les pays en voie de développement (WHO, 2015). La TB humaine est due principalement à un nombre limité de variants d'une espèce de Mycobactéries regroupés sous l'appellation de « Complexe *Mycobacterium tuberculosis* » (MTBC) dont la plus importante est *Mycobacterium tuberculosis* connue aussi sous l'appellation de BK pour « Bacille de Koch ». Cette dernière cause la majorité des cas de TB humaine. L'homme demeure actuellement le principal réservoir naturel de *M. tuberculosis* (Van Soolingen *et al.*, 1997), mais la maladie touche également de nombreuses espèces animales. Les poumons sont à la fois la porte d'entrée des bacilles tuberculeux et l'organe de prédilection pour le développement de la maladie.

### I.1.2 HISTOIRE ET DATES MARQUANTES DE LA TB

La TB est l'une des maladies les plus anciennement connues par l'homme. Elle a déjà été mentionnée dans les textes des médecines grecque, chinoise, égyptienne et indienne datant de plus de 2000 ans (Daniel, 2005; Daniel, 2006). L'analyse d'échantillons de momies égyptiennes humains datant de 4400 ans avant aujourd'hui (2050-1650 BC) a démontré la présence de souches de *M. africanum* (Zink *et al.*, 2003).

Trois formes principales de maux ont été désignées par les historiens comme étant de la TB : le « mal de Pott » défini par des séquelles caractéristiques au niveau des vertèbres (Crubézy *et al.*, 1998), les scrofules correspondant à des ganglions infectés au niveau du cou avec écoulement de pus et la TB pulmonaire dont des épidémies à grande échelle ont été identifiées au XVII<sup>ème</sup> siècle. La maladie portait au XVII<sup>ème</sup> et XVIII<sup>ème</sup> siècle les noms de « phtisie pulmonaire » ou de « consommation » qui signifient respectivement amaigrissement excessif et décharnement (Aronowitz, 2004).

En 1865, le médecin Jean-Antoine Villemin démontra expérimentalement le caractère contagieux de la TB. Il démontra la transmission de la maladie à des lapins inoculés avec des broyats de lésions tuberculeuses humaines et bovines (Major, 1945).

Plus tard, en 1882, le microbiologiste allemand Heinrich Hermann Robert Koch a mis en évidence le lien existant entre la TB humaine et l'agent pathogène *M. tuberculosis* aussi dénommé Bacille de Koch (Major, 1945).

Les premières thérapies médicamenteuses commencèrent en 1944. Cette étape marqua une étape très importante dans l'histoire de la TB. Des composés tels que le sanocrysin (sel d'or proposé par Robert Koch), la vitamine D, des sulphones dont les efficacités n'ont jamais été prouvées ont été testées au tout début des thérapies antituberculeuses (Benedek, 2004; Dutau, 2005). L'activité antituberculeuse de la streptomycine (SM) fut mise en évidence plus tard et Lehman réalisa la synthèse de l'acide para-amino salicylique (PAS). Cette même année fut également marquée par l'identification des premiers cas de résistance à la streptomycine (McDermott *et al.*, 1947; Youmans *et al.*, 1947). L'isoniazide (INH) fut découvert par Domagk en 1952 et la rifampicine (RIF) en 1967. La RIF et l'INH deviendront les deux antituberculeux piliers de la lutte contre la TB plus tard. En 1980, la Pyrazinamide (PZA) fut introduite dans le schéma thérapeutique de base de la TB et une multi-thérapie combinée avec la RIF et l'INH permit d'obtenir la guérison de plus de 95% des patients avec une durée de traitement de 6 mois (Webb et Davies, 1998). L'évolution du traitement de la TB ainsi que les découvertes sont récapitulées dans la figure 1.

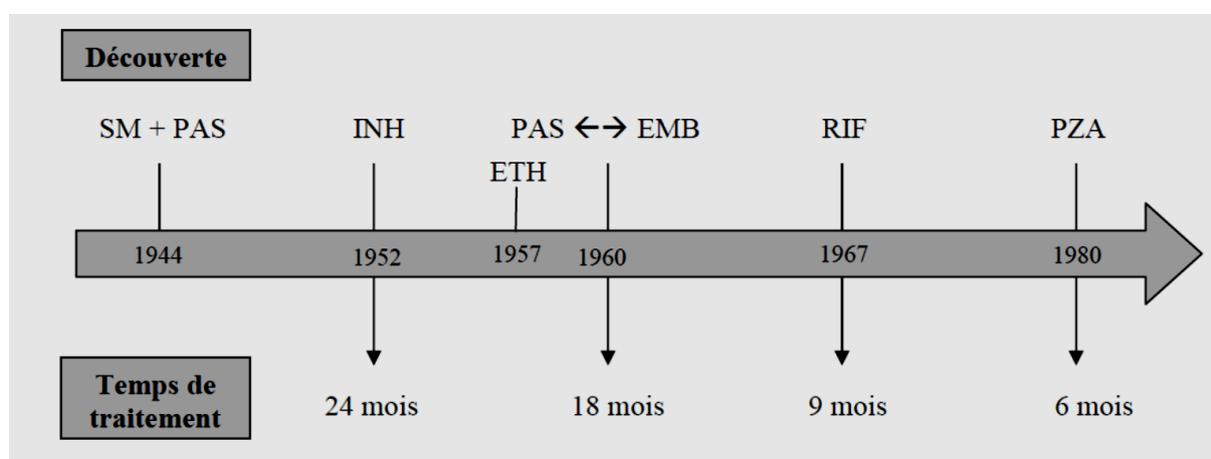


Figure 1: Découverte des antituberculeux et évolution du traitement de la TB au cours du temps

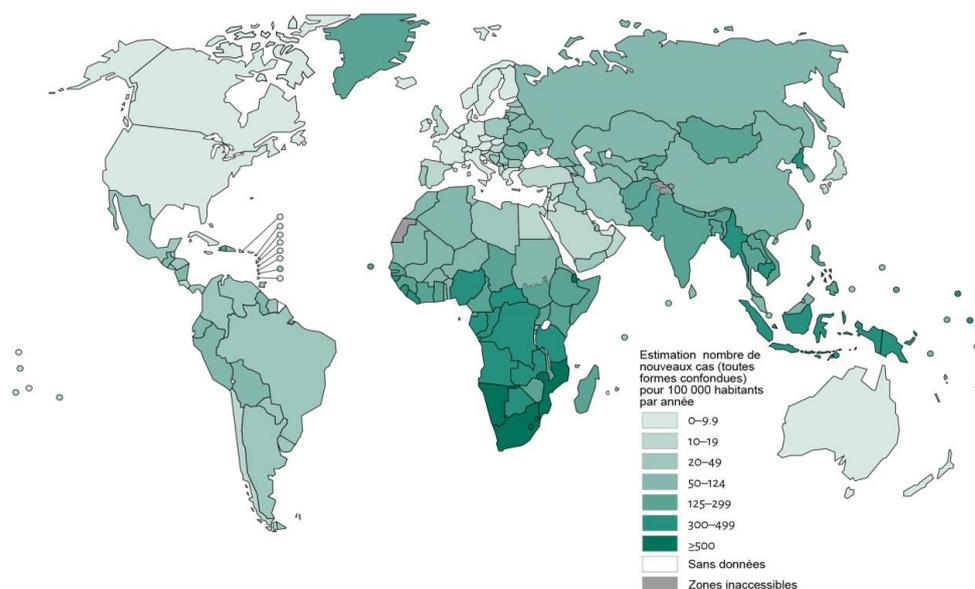
L'épidémie de VIH/SIDA a été à l'origine de la réémergence de la TB dans les années 1980, notamment dans les pays africains (Corbett *et al.*, 2003; Dye *et al.*, 2005). Une synergie existe entre l'infection par le VIH-SIDA et l'infection par la TB. En effet, l'infection par le VIH favorise l'évolution d'une TB latente en TB maladie active alors que *M. tuberculosis* stimule les répliquions du virus VIH et l'évolution naturelle du SIDA (Lesprit et Molina, 1996).

### **I.1.3 EPIDEMIOLOGIE DE LA TB DANS LE MONDE (WHO, 2015)**

Malgré les progrès de la lutte contre la TB et le potentiel de guérison de tous les cas de TB, la maladie figure désormais au même titre que le VIH-SIDA parmi les principales causes de décès dans le monde (WHO, 2015). D'après les estimations de l'OMS, la TB a tué 1,5 millions de personnes dont 400000 VIH-positives en 2014. 9,6 millions de personnes auraient contracté la TB en 2014 dont 12% de VIH-positives (WHO, 2015).

#### **I.1.3.1 DISTRIBUTION MONDIALE DES CAS DE TB**

Sur les 9,6 millions de nouveaux cas enregistrés en 2014, 58% proviennent des régions de l'Asie du Sud-Est et du Pacifique occidental. La région africaine comptabilisait 28% des cas avec la plus lourde charge par rapport à sa population (281 cas pour 100000 habitants), soit plus du double de la moyenne mondiale de 133 cas pour 100000 habitants. L'Inde, l'Indonésie et la Chine comptaient le plus grand nombre de cas : 23%, 10% et 10% respectivement du total mondial (figure 2). Un quart de la population mondiale est estimé être infecté par *M. tuberculosis*.



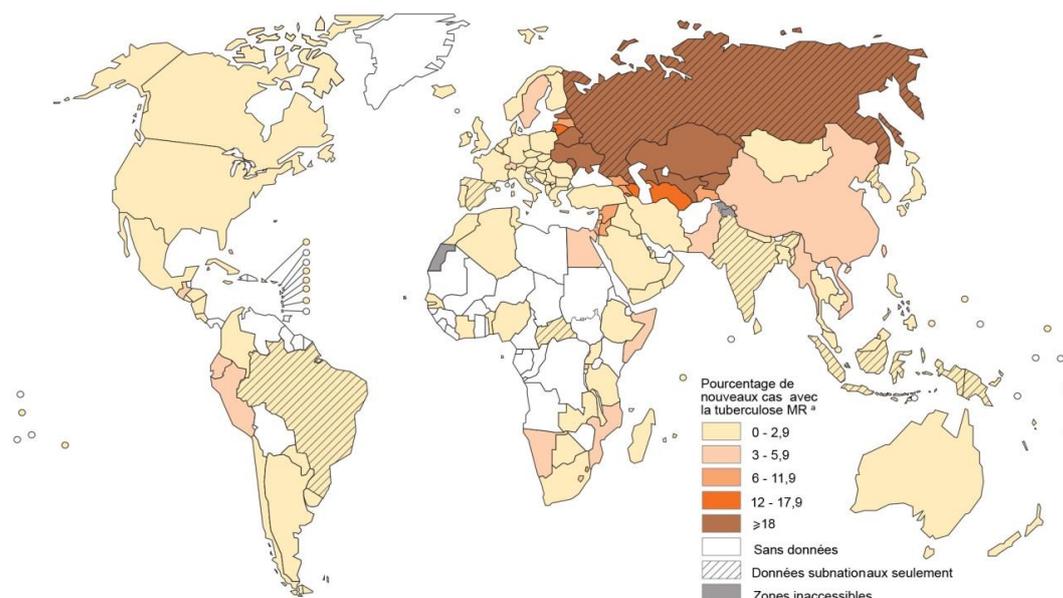
**Figure 2: Incidence de la TB dans le monde en 2014**

*\*Incidence estimée en nombre de nouveaux cas par 100000 habitants par année*

### I.1.3.2 EMERGENCE DES CAS DE RESISTANCE

Les facteurs pouvant expliquer l'émergence et la propagation des souches pharmaco-résistantes sont l'utilisation de traitements inappropriés, la mauvaise observance de ces traitements ou encore l'utilisation de médicaments de mauvaise qualité (WHO, 2001). Les souches MR définies comme des souches résistantes à au moins l'INH et à la RIF, sont plus complexes à traiter et nécessitent des traitements plus longs (jusqu'à 2 ans) et plus onéreux (jusqu'à 100 fois le prix d'un traitement d'une souche sensible) avec une efficacité réduite. (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/fr/print.html>).

En 2014, 480000 cas de TB ont été estimés MR dont un quart seulement ont été détectés et notifiés. 3,3% des nouveaux cas de TB (figure 3) et 20% des patients traités précédemment sont atteints de la TB-MR. 190000 décès ont été estimés dus à la TB-MR. Plus de la moitié des cas de TB-MR (54%) provient de l'Inde, de la Chine et de la Fédération de Russie.



**Figure 3: Distribution des nouveau cas de TB MR en 2014**

La TB Ultrarésistante (TB-UR), définie comme à la fois MR et résistante aux fluoroquinolones et à un antibiotique de seconde ligne injectable (aminoglycoside ou capréomycine) (CDC, 2006; Jassal et Bishai, 2009) a été signalée dans 105 pays en 2015. 9,7% des cas de TB-MR sont UR.

### I.1.3.3 EVOLUTION DE LA TB MONDIALE

Entre 1990 à 2015, la mortalité par TB a diminué de 47%. 43 millions de vies ont été sauvées entre 2000 et 2014 suite à des diagnostics et des traitements plus efficaces. L'objectif consistant à réduire de moitié le taux de mortalité par la TB en 2015 par rapport en 1990 a été atteint dans 4 régions de l'OMS : Amériques, Méditerranée occidentale, Asie du Sud-Est et Pacifique occidental ; ainsi que dans 11 pays à forte charge : Brésil, Cambodge, Chine, Ethiopie, Inde, Myanmar, Ouganda, Pakistan, Philippines, Viet Nam et Zimbabwe.

L'incidence mondiale de la TB a diminué en moyenne de 1,5% par an depuis l'an 2000 et est estimée à 18% inférieure à son niveau depuis cette année. La prévalence mondiale de la TB en 2015 était de 42% inférieure à son niveau de 1990. La prévalence réduite de moitié comparée aux données de 1990 a été atteinte pour 3 régions de l'OMS : Amériques, Asie du Sud-Est et Pacifique occidental ; ainsi que dans 9 pays à forte charge : Brésil, Cambodge, Chine, Ethiopie, Inde, Myanmar, Ouganda, Philippines et Viet Nam.

### **I.1.4 L'OMS ET LES MOYENS ET STRATEGIES DE LUTTE CONTRE LA TB**

En 1995, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a mis en place une stratégie de lutte contre la TB reposant sur le traitement chimio-prophylactique standardisé de courte durée des patients ou stratégie DOTS « Directly Observed Treatment of Short-course » (Corbett et Ravaglione, 2004). Cette stratégie repose sur la supervision des professionnels de la santé, de la prise des antituberculeux par les patients et sur leur soutien (conseils, informations) pour s'assurer du bon déroulement et du succès d'un traitement relativement long. L'objectif de l'OMS pour la stratégie DOTS dans les années 1995 à 2000 était la détection de 70% des cas de TB et la guérison de 85% d'entre eux.

En 2001, l'OMS décide de renforcer la stratégie DOTS et lance le plan mondial « Halte à la TB » visant « un monde sans TB » et dont l'objectif principal est de réduire drastiquement l'incidence de la maladie dans le monde d'ici 2015. La TB sera considérée comme éradiquée lorsque son incidence passera en dessous du seuil de un cas pour 100 000 habitants par an (WHO, 2010).

À partir de 2016, le but de l'OMS est de mettre un terme à l'épidémie mondiale de la TB. Adoptée par l'Assemblée mondiale de la Santé en mai 2014 et assortie de cibles liées aux nouveaux objectifs de développement durable, la Stratégie propose aux pays des pistes pour réduire le nombre de décès par TB de 90 % d'ici à 2030 (par rapport au niveau de 2015), réduire le nombre de nouveaux cas de 80 % et faire en sorte qu'aucune famille ne supporte de coûts catastrophiques liés à la TB (WHO, 2015).

## **I.2 LE DIAGNOSTIC DE LA TB ET L'IDENTIFICATION DES MYCOBACTERIES**

Plusieurs méthodes de diagnostic de la TB et d'identification des mycobactéries avec différents niveaux de sensibilité et spécificité sont utilisées actuellement. Les méthodes de diagnostic reposent sur l'examen microscopique direct à partir de prélèvements biologiques, sur la mise en évidence de bacilles dans ces prélèvements par la culture ou par des tests utilisant la biologie moléculaire à partir d'ADN ou encore des tests immunologiques. Les méthodes d'identification reposent sur l'aspect morphologique des colonies à partir de la culture ou sur des tests biochimiques ou encore des tests moléculaires. Certains tests

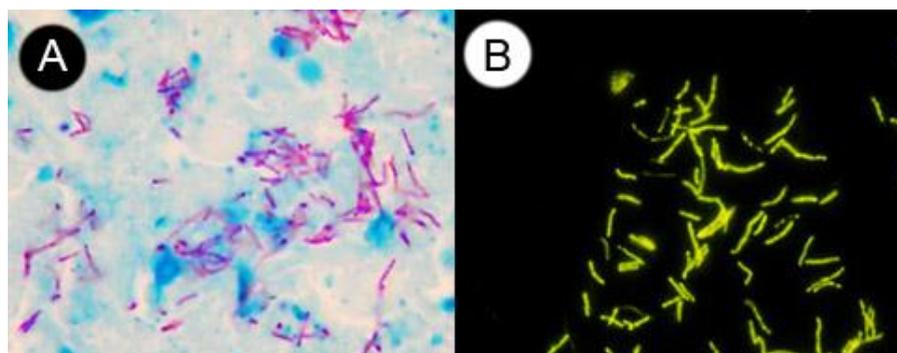
moléculaires servent à la fois de test de diagnostic de la TB et de test d'identification des mycobactéries. Quelques tests les plus fréquemment utilisés ainsi que les tests de références sont cités ci-après :

## I.2.1 LES TESTS DE DIAGNOSTIC

### I.2.1.1 L'EXAMEN DIRECT PAR MICROSCOPIE

En cas de suspicion de TB pulmonaire, à partir des signes cliniques d'un patient, des examens bactériologiques sont pratiqués sur l'expectoration du malade. Ils peuvent aussi être pratiqués sur des tubages gastriques (sécrétions bronchiques dégluties) ou des aspirations bronchiques. Pour les patients tuberculeux avec une localisation extra-pulmonaire soupçonnée, les prélèvements (biopsie) sont faits en fonction de la localisation de la maladie.

Un frottis, ou étalement du prélèvement biologique sur lame mince est effectué, puis coloré afin de mettre en évidence la propriété d'acido-alcool résistance spécifique des mycobactéries. Deux méthodes de coloration sont utilisées : la coloration de Ziehl-Neelsen, ou la coloration à l'auramine (fluorochrome) (figure 4). L'examen direct ne permet de détecter la présence des bacilles acido-alcool résistants (BAAR) dans un prélèvement biologique qu'à partir de 0,5 à 1,1 bactéries par microlitre de prélèvement biologique (Saltini, 2006).

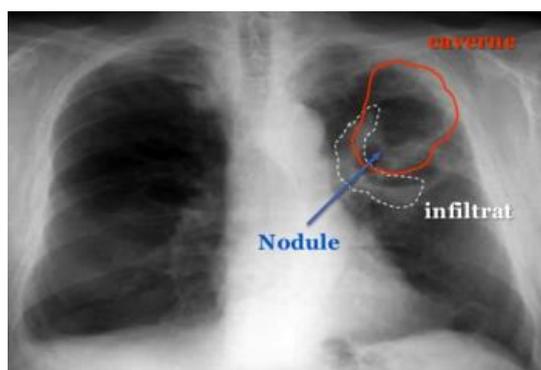


**Figure 4: Observation microscopique de frottis faisant apparaître des BAARs par la coloration de Ziehl-Neelsen (A) et par la coloration à l'Auramine O (B)**

Source : <http://ntcc.ucsd.edu> (Margaret A. Barlet, Ph. D, MT (ASCP) SM, Diplomate A.B.M.M., Medical Technology Program, University of Arkansas for Medical Sciences). Modification sur adobe Photoshop CS6

### I.2.1.2 LA RADIOGRAPHIE

La radiographie pulmonaire permet d'établir un bilan initial des lésions thoraciques de forme, de siège et de taille variable. L'aspect des lésions est sans rapport avec l'intensité de la maladie. La spécificité de la radiographie pour la tuberculose pulmonaire varie beaucoup selon différentes études (27% à 81%). Il existe quatre types de lésions : le nodule, le tuberculome, l'infiltrat et la cavene (figure 5).



**Figure 5: Radiographie d'un tuberculeux pulmonaire**

(source : [http://www.asnom.org/fr/428\\_tuberculose.html](http://www.asnom.org/fr/428_tuberculose.html). Modification sur Adobe Photoshop CS6)

- **L'infiltrat** se traduit comme des lésions débutantes de l'infection. Il se manifeste comme une partie peu opaque, hétérogène et étendue de l'imagerie radiographique.
- **Le nodule** est un granulome de taille variable, isolé ou groupé.
- **Le tuberculome** est un nodule isolé pseudo-tumoral.
- **La cavene** est une région vide due à une perte de substance au sein d'un infiltrat à paroi épaisse.

Dans sa forme pulmonaire, la TB se manifeste par la présence d'infiltrats et de nodules principalement localisés aux sommets des poumons et parfois associés à des cavernes.

### I.2.1.3 L'INTRADERMO-REACTION A LA TUBERCULINE

L'intradermo-réaction (IDR) à la tuberculine ou test de Mantoux est un test de diagnostic de la TB basé sur l'observation d'une réaction cutanée d'hypersensibilité retardée après injection intradermique de tuberculine (antigènes mycobactériens composés de mélange de protéines extraites de culture de MTBC et purifiées appelé PPD / « Purified Protein Derivative »). Cette réaction témoigne chez le patient de l'existence d'une immunité à

médiation cellulaire vis-à-vis des mycobactéries, réaction induite soit par une vaccination préalable par le BCG, soit par un contact antérieur avec le BK ou certaines mycobactéries atypiques. Le test IDR est utilisé aussi bien pour le diagnostic de la TB active que pour le diagnostic de la TB latente.

On parle de virage tuberculinique, si sur quelques mois d'intervalle, le résultat de l'IDR initialement négatif (<5 mm) ou faiblement positif (entre 5 et 9 mm) devient positif (>10 mm).

#### I.2.1.4 AUTRES TESTS IMMUNOLOGIQUES

Des tests immunologiques comme le test QuantiFERON-TB-Gold® et le test TSPOT-TB® ont été développés récemment pour le diagnostic de l'infection tuberculeuse latente (L'Hadj *et al.*, 2006; Lalvani, 2007). Ces tests présentent comme avantage de ne pas être perturbés par une vaccination antérieure au BCG ou par une infection causée par une autre mycobactérie (Al-Orainey, 2009; Bocchino *et al.*, 2009; Richeldi, 2006).

#### I.2.1.5 LES TESTS MOLECULAIRES

Aujourd'hui, de nombreuses techniques moléculaires adaptées au diagnostic de la TB utilisant l'ADN des mycobactéries sont utilisées. Ces tests sont basés sur l'amplification génique par la classique réaction de PCR (« Polymerase Chain Reaction ») sur des séquences spécifiques des souches *M. tuberculosis* (D'Amato *et al.*, 1995), par la PCR en temps réel comme pour le cas du Xpert MTB/RIF (§ I.6.4.2-c) (Blakemore *et al.*, 2010; Broccolo *et al.*, 2003; Helb *et al.*, 2010), ou aussi par la LAMP-PCR (Loop-mediated isothermal amplification) (Boehme *et al.*, 2007; Cao *et al.*, 2015) permettant la détection de séquences nucléiques spécifiques des bacilles tuberculeux ; cette PCR peut être suivie ou non de l'hybridation des produits d'amplification sur des sondes spécifiques. Cependant, ces techniques présentent, actuellement, une sensibilité insuffisante lorsqu'elles sont appliquées directement sur des échantillons biologiques (Kim *et al.*, 2009). Elles présentent par contre une sensibilité et une spécificité excellentes lors de leur utilisation à partir d'extraits de culture.

### I.2.1.6 LA CULTURE

La culture est la méthode de référence pour le diagnostic de la TB. Seule une culture positive à *M. tuberculosis* constitue une preuve formelle du diagnostic d'une TB. Elle est plus sensible que la microscopie. Sa sensibilité varie de 80% à 85% alors que la sensibilité varie de 50% à 80% pour la microscopie. Elle s'effectue sur milieu de culture enrichi, solide (milieu de Löwenstein-Jensen ou milieu de Colestos) où les résultats s'obtiennent entre 4 à 8 semaines ; ou sur milieu liquide (Middlebrook 7H11, 7H10, 7H9, MGIT/Mycobacteria Growth Indicator Tube ou Dubos) où les résultats s'obtiennent plus rapidement (environ 15 jours).

## I.3 LES MYCOBACTERIES ET LE COMPLEXE *M. TUBERCULOSIS*

### I.3.1 SYSTEMATIQUE

Le genre *Mycobacterium* appartient à la famille des MYCOBACTERIACEAE et à l'ordre des ACTINOMYCETALES (Garrity *et al.*, 2004). Ce genre regroupe actuellement plus de 120 espèces différentes (Shinnick et Good, 1994; Tortoli, 2006), classées en :

- **mycobactéries atypiques** qui regroupent les mycobactéries non tuberculeuses (NTM) connus aussi sous l'appellation de « *Mycobacteria other than tuberculosis* » – MOTT ou encore « Mycobactéries autres que *Mycobacterium tuberculosis* » - MAMT.

- **mycobactéries du complexe *M. tuberculosis* (MTBC)** qui regroupent les agents de la TB humaine ;

- et une distinction particulière faite pour *M. leprae*, et *M. ulcerans*, agents responsables respectivement de la lèpre et de l'ulcère de Buruli.

La systématique des espèces du genre *Mycobacterium* est représentée sur la figure 6.

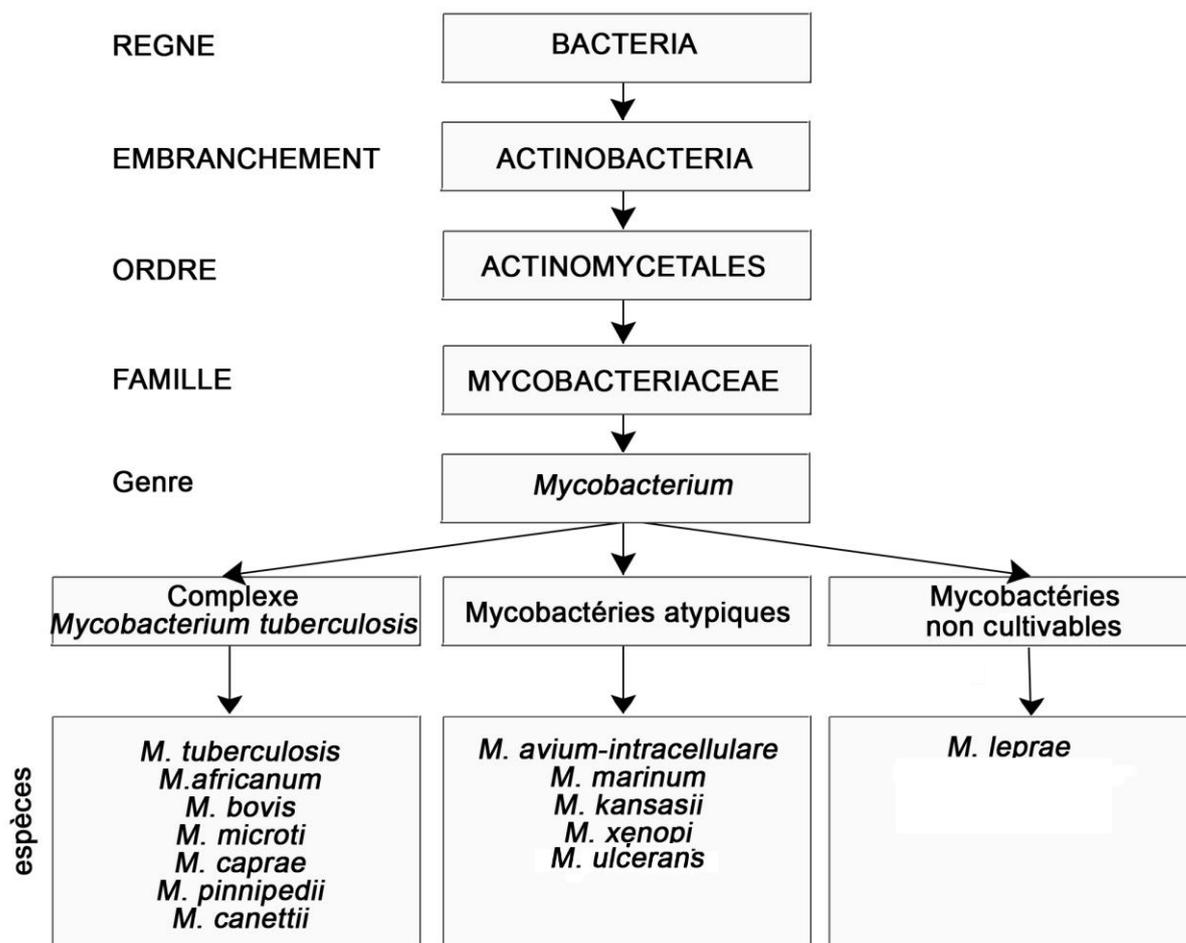
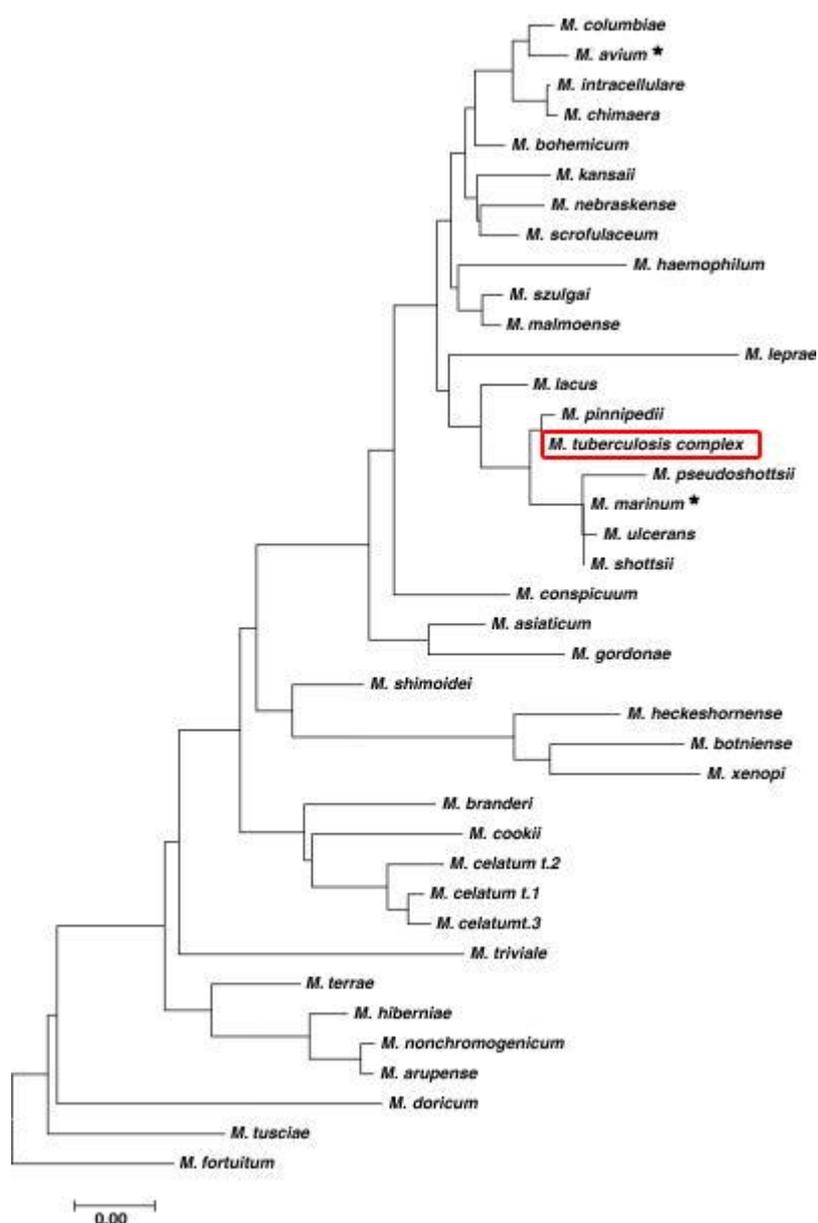


Figure 6: Systématique des espèces du genre *Mycobacterium*

De nouvelles sous-espèces ou de nouvelles espèces sont identifiées régulièrement. Entre 2003 et 2006, plus de 30 nouvelles espèces ont été décrites (Tortoli, 2006). L'arbre phylogénétique de la figure 7 montre la place de MTBC parmi les mycobactéries à croissance lente selon la séquence du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S (Tortoli, 2006).



**Figure 7:** Arbre phylogénétique des mycobactéries à croissance lente selon la séquence codant l'ARNr 16S  
*M. fortuitum* a été utilisé comme « outgroup ».

Les mycobactéries atypiques généralement non pathogènes pour l'homme (MAMT), peuvent être sources d'infections chez les personnes immunodéprimées. Elles se différencient du MTBC par leur moindre virulence et par l'absence de transmission inter-humaine. Ce sont des mycobactéries omniprésentes dans l'environnement. On peut citer parmi ces mycobactéries atypiques : *M. avium-intracellulare*, *M. marinum* (avec un \* sur la figure 7) ou encore *M. abscessus* (Bryant *et al.*, 2013).

### I.3.2 CARACTERISTIQUES DU GENRE *Mycobacterium*

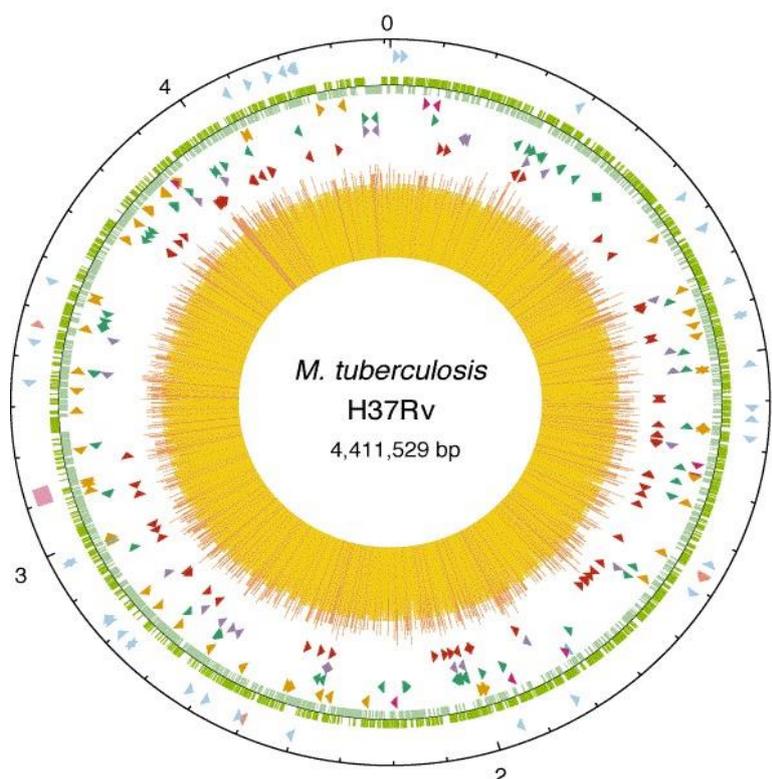
Les bactéries du genre *Mycobacterium* sont des bactéries aérobies strictes, généralement non sporulantes, non mobiles, et en forme de fin bâtonnet d'environ 4µm de long et 0,4µm de large ou légèrement incurvées et dépourvues de capsule.

Elles se caractérisent par leur acido-alcool-résistance c'est-à-dire leur capacité à résister à la décoloration par les acides et les alcools et leur croissance particulièrement lente avec un temps de dédoublement de 12h à 24h (Harshey et Ramakrishnan, 1977). Ces bactéries se caractérisent également par la composition en acides mycoliques (acides gras à longue chaîne) de leur paroi cellulaire conférant une haute imperméabilité de cette dernière et un faible niveau de fixation de la coloration de Gram qui leur donne la considération par défaut de bactéries Gram positives, ainsi que la résistance naturelle à certains antibiotiques usuels.

La non-sporulation des mycobactéries est admise par la majorité des chercheurs (Traag *et al.*, 2010).

### I.3.3 CARACTERISTIQUES DU GENOME DE *M. tuberculosis*

Le génome d'une souche *M. tuberculosis* de référence utilisée jusqu'à nos jours, la souche H37Rv a été séquencé et annoté en 1998 (Cole *et al.*, 1998). Il s'agit d'un génome constitué d'un chromosome unique et circulaire de 4.411.532 paires de bases, comprenant 3995 phases de lecture et formant environ 4000 gènes (figure 8). L'ADN de *M. tuberculosis* présente un taux élevé en guanine et en cytosine (65,6%) sauf dans quelques régions particulières telles que les gènes qui codent pour les protéines transmembranaires. Une grande partie des gènes (6% du génome) semble coder pour des enzymes impliqués dans la synthèse et la dégradation de lipides. Plus de 50% des protéines codées ont des fonctions connues actuellement. L'homologie entre les ADN des différentes sous-espèces du MTBC est très élevée (>99,9%) (Garnier *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2009) ce qui fait qu'il s'agit stricto sensu d'une seule espèce bactérienne. Cette restriction de la diversité nucléotidique peut être expliquée soit par une fidélité de réplication inhabituelle, soit par un système de réparation des erreurs très efficace, soit par une origine évolutive très récente, soit encore par un taux de mutation très faible compte tenu du style de vie de ce bacille (intracellulaire), aucune de ces raisons n'étant exclusive. Le génome est aussi caractérisé par l'utilisation du codon Guanine-Tyrosine-Guanine (GTG) comme codon d'initiation dans plus de 35% des gènes.



**Figure 8: Représentation du génome de *M. tuberculosis* H37Rv**

Le cercle extérieur indique l'échelle en megabases, 0 représente l'origine de réplication. Le premier cercle de l'extérieur représente les positions des gènes codant des ARN stables (ARNt en bleu, les autres en rose) et la région « Direct Repeat » (carré rose); le second cercle de l'intérieur montre les séquences codantes par brin (dans le sens horaire, vert foncé; antihoraire, vert clair); le troisième cercle représente les séquences répétées (les séquences d'insertion en orange; la famille REP13E12 en rose foncé; les prophages en bleu); le quatrième cercle montre les positions des membres de la famille des PPE (en vert); le cinquième cercle montre les membres de la famille des PE (en violets, à l'exclusion des PGRS); et le sixième cercle montre les positions des séquences PGRS (en rouge foncé). L'histogramme du centre représente le contenu en G+C, avec <math>< 65\%</math> G+C en jaune, et > 65% G+C en rouge. La figure a été générée avec le logiciel DNASTAR®. (Cole *et al.*, 1998)

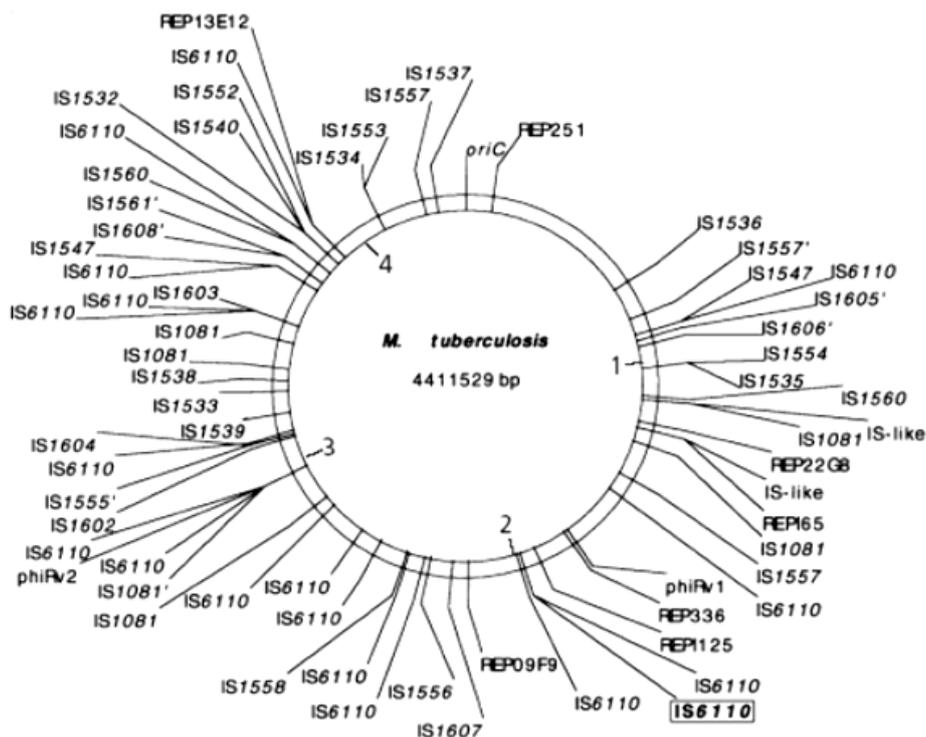
### I.3.4 LES MARQUEURS GENETIQUES DE *M. tuberculosis*

Le génome de *M. tuberculosis* est aussi caractérisé par des séquences nucléotidiques particulières polymorphes utilisées comme des marqueurs génétiques d'évolution et/ou d'épidémiologie. Ces marqueurs sont utilisés pour des études d'épidémiologie moléculaire, de classification ou de phylogénie. Parmi ces marqueurs génétiques, on trouve des séquences répétées (les CRISPR, les mini satellites ou les éléments d'insertion), des délétions ou insertions de courts ou de longs fragments d'ADN, des régions PE (Proline – Acide Glutamique) et PPE (Proline – Proline - Acide Glutamique) ou tout simplement des variations nucléotidiques individuelles ou SNPs.

Des techniques de typage spécifiques du MTBC conçues pour la détermination de ces variations au niveau de ces marqueurs ont été développées telles que : la RFLP *IS6110* (Van Embden *et al.*, 1993), qui fut longtemps la méthode de référence, le spoligotypage (Kamerbeek *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2010), les MIRU-VNTR (« Mycobacterial Interspersed Repetitive Units – Variable Number of Tandem Repeat ») (Supply *et al.*, 2000; Supply *et al.*, 2006), et depuis peu la génomique comparative par séquençage de nouvelle génération (« Whole Genome Sequencing » - WGS / « Next Generation Sequencing » - NGS : séquençage du génome de nouvelle génération). Ces techniques vont être décrites dans le paragraphe § 1.3.5. à la page 21.

#### I.3.4.1 Les éléments d'insertion (IS)

Le génome des mycobactéries présente 29 différentes séquences d'insertion transposables de taille de l'ordre de 1,4-2,5kb pouvant s'insérer dans de multiples sites du génome (Gordon *et al.*, 1999). Des régions « Hotspot » d'intégration de ces *IS* sont retrouvées au niveau d'autres familles de séquences telles que la région « *Direct Repeat* » (DR), les PE/PPE (Proline-Acide Glutamique / Proline-Proline-Acide Glutamique) ou des gènes codant pour des antigènes potentiels (Cole *et al.*, 1998; Warren *et al.*, 2000). L'*IS* le plus étudié chez les MTBC est l'*IS6110* de taille égale à 1361 paires de bases (Thierry *et al.*, 1990). Le polymorphisme du nombre et de la position des *IS6110* dans le génome des souches du MTBC a été utilisé pour leur génotypage (Van Embden *et al.*, 1993). Les *IS6110* sont conservées et très répandues dans les bactéries MTBC. Le génome de H37rv possède 16 copies *IS6110* réparties de manière inéquitable sur tout le génome (figure 9) (Cole *et al.*, 1998). Les rôles biologiques des *IS* ou la conséquence de leur insertion dans le génome de *M. tuberculosis* ne sont pas encore bien connus même si l'insertion de *IS6110* peut avoir des conséquences sur l'expression de certains gènes (Soto *et al.*, 2004). Une compensation de la perte de fitness a été observée chez une souche *M. bovis* provenant d'Espagne après insertion d'un *IS6110* en amont du locus *phoPR* (Gonzalo-Asensio *et al.*, 2014).



**Figure 9: Distribution des 29 IS, des 2 prophages PhiRv1 et PhiRv2 et des 7 éléments REP13E12 sur le génome de la souche H37rv**

*oriC* : origine de répliation. Echelle en mégabase à l'intérieur du cercle (Gordon *et al.*, 1999)

#### I.3.4.2 Les motifs PE et PPE

Les séquences nucléotidiques PE/PPE sont des régions du génome des mycobactéries contenant des gènes codant pour des protéines acides particulièrement riches en Proline et Acide Glutamique (Cole *et al.*, 1998). Ces protéines sont caractérisées par la présence de motifs « Proline-Acide Glutamique » (PE) ou « Proline-Proline-Acide Glutamique » (PPE) au niveau de leur extrémité N-terminale.

Les régions PE/PPE représentent environ 10% du génome de la souche H37Rv. Les gènes de ces séquences PE/PPE sont regroupés en clusters et répartis en multiples copies polymorphes sur tout le génome. Dans le génome de H37Rv, une centaine de régions PE/PPE ont été identifiées. Celles-ci ont été classées en 3 sous-familles, selon la nature et la présence ou non de motifs répétés associés aux PE/PPE : les PE-PGRS, les PPE-MPTR et les PE ou PPE.

La sous-famille des PGRS ou « polymorphic GC-rich sequences » particulièrement riche en G+C sont organisées en microsatellites dont les motifs varient d'une souche de

mycobactérie à une autre. La classe PE\_PGRS comporte 61 membres. Elle est caractérisée par des motifs répétés en tandem, c'est-à-dire en unité monomérique associées aux PE ou aux PPE. Les PE\_PGRS sont retrouvées exclusivement dans les bactéries MTBC.

Les fonctions de tous les gènes PE/PPE n'ont pas été précisées, il semble qu'ils soient impliqués dans des facteurs de virulence de la bactérie tels que la persistance des mycobactéries (Camacho *et al.*, 1999; Talarico *et al.*, 2005).

#### 1.3.4.3 Les prophages PhiRv1 et PhiRv2

Deux régions du génome de H37Rv possèdent des organisations similaires avec des gènes phagiques adjacents situés dans un même locus et ont été considérées comme des prophages dénommés PhiRv1 et PhiRv2 respectivement (Cole *et al.*, 1998). La présence et/ou la localisation des gènes de PhiRv1 semble être assez variable d'une souche à une autre. Une étude comparative des régions de différences entre quelques mycobactéries a en effet montré que le prophage PhiRv1 est absent dans 16% des souches cliniques étudiées et aussi absent chez la souche vaccinale BCG (Mahairas *et al.*, 1996). Les gènes du prophage PhiRv2 sont généralement toujours présents et sont relativement plus stables. La position des 2 prophages dans le génome de H37rv est représentée dans la figure 16. Le prophage PhiRv1 possède 7 sites d'attachements potentiels (ATT) dans le génome de H37Rv (Bibb et Hatfull, 2002; Bibb *et al.*, 2005; Hendrix *et al.*, 1999).

Le prophage PhiRv1 est par ailleurs flanqué de séquences REP13E12 (§ 1.3.4.4-a). Il a été suggéré que l'opéron biotine de la souche H37Rv a d'abord été interrompu par des séquences REP13E12 suite à un stress. Cette séquence REP13E12 aurait ensuite servi de site d'insertion du prophage PhiRv1 dans le génome de H37Rv (Gordon *et al.*, 1999).

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

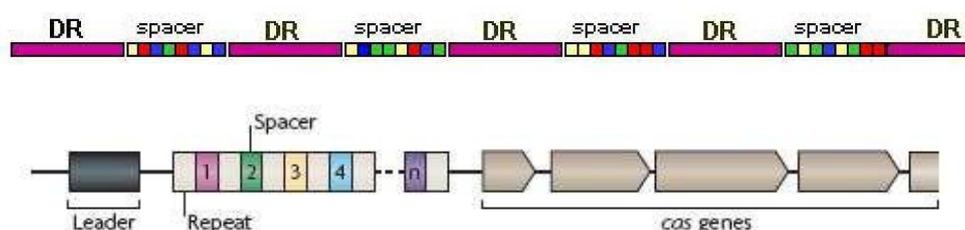
#### I.3.4.4 Les séquences répétées

##### a. **Les éléments REP13E12**

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

##### b. Le locus DR

Le locus DR (« Direct Repeat ») fait partie des séquences de la famille des CRISPR (« Clustered Regularly Interspersed Short Palindromic Repeats ») (Marraffini et Sontheimer, 2010a). Le locus DR chez *M. tuberculosis* est formé par des séquences nucléotidiques identiques répétées (les DR) de 36 pb entrecoupées par de courtes séquences uniques, non variables, de 35 à 41 pb appelées espaceurs. La structure de la région DR qui est unique chez *M. tuberculosis* est montrée sur la figure 10.



**Figure 10: Structure de la région DR (Marraffini et Sontheimer, 2010b)**

L'ordre des espaceurs est identique chez toutes les souches mais leur présence/absence varie d'un isolat à l'autre. Quarante-quatre espaceurs ont été retrouvés jusqu'à maintenant dans toutes les souches du MTBC dont certains espaceurs spécifiques de certaines espèces (tableau 1) (Caimi *et al.*, 2001; Van der Zanden *et al.*, 2002).

**Tableau 1: Liste des 104 oligonucléotides utilisés en spoligotypage correspondant aux espaceurs connus chez MTBC (Van der Zanden *et al.*, 2002)**

Les espaceurs dans les cellules bleues correspondent aux 43 espaceurs utilisées par Kamberberck *et al.* en 1997 pour le spoligotypage classique.

\*Sequences données dans le sens 3' → 5'

Numéro	Numéro espaceur en spoligotypage	Numéro espaceur dans le génome	séquence des oligonucléotides (5'→3')	Numéro	Numéro espaceur en spoligotypage	Numéro espaceur dans le génome	séquence des oligonucléotides (5'→3')
1	1	2	CGCTCCCCTAGTCGT	53	-	17	TCTTGAGCAACGCCATC
2	2	3	TGGGGCAGACCTTTGA	54	-	45	AAGTTGGCGCTGGGG
3	3	4	CTTCCAGTGATCGCCTT	55	-	48	AACCGTCCCACCTG
4	4	12	TCATACGCCGACCAATC	56	-	49	AACACTTTTTTGTGAGCGTGG
5	5	13	TTCTGACCATTGTGCGG	57	-	50	CGGAAACGCAGCACC
6	6	14	TCATTTCCGGCTT	58	-	54	CGATCATGAGAGTTGCG
7	7	15	TGAGGAGAGCGAGTACT	59	-	55	TTTTCGTGTGTGGTTCT
8	8	18	TGAAACCCCCCCAG	60	-	56e	AGCACCTCCCTTGACAA
9	9	19	ACTCGGAATCCCATGTG	61	-	57	TGCTGACTTCGCCTGTA
10	10	20	CTCTAGTTGACTTCCGG	62	-	58	CGAGCAGCGGCATAC
11	11	21	CAGGTGAGCAACGGC	63	-	59	GCATCCAATCGTCGC
12	12	22	ATGGGATATCTGCTGCC	64	-	60	TGGTAATTGGCTCACGG
13	13	23	ATTGCCATTCCCTCTCC	65	-	61	ACCATCCGAGCAGG
14	14	24	TTTCGGTGTGATGCGGA	66	-	66	CCACGCTACTGCTCC
15	15	25	TGAATAACGCGCAGTGAAT	67	-	67	CACCGCCGATGACAG
16	16	26	TCGACGAGTCCCG	68	-	68	GTGTTTCGCCCTGTC
17	17	27	CCGGCAACAATCGCG	69	-	69	GTTGCATTGTCGACTG
18	18	28	TGAGATGGTCCGGG	70	-	70	GGCGGCGCCGAGAA
19	19	29	TTGCGTAACTGGCTTG	71	-	71	TTCCATGACTTGACGCC
20	20	30	ATTTCCCTGACCTCGCC	72	-	72	CATGCGGCCACTAG
21	21	31	CGATGTGCATGTCCAA	73	-	73	GCTGACCCATGGATG
22	22	32	ACGGCAGATTGAGACA	74	-	74	CAACAAGGTCTACGCGT
23	23	33	GTCCAGCTCGTCCGT	75	-	75	GATCAGGGCAAGGGC
24	24	34	GCCTGCTGGGTGAGA	76	-	76	ATTGCAGCGACGGGC
25	25	35	GGAGCCGATCAGCGA	77	-	77	CAACGACGCTGTATTGG
26	26	36	CTTACGACCCACATCA	78	-	78	AGCAGCATGGACGTTT
27	27	37	TTCGTGATCTTCCCG	79	-	79	GCGGATGTGGTGCTC
28	28	38	GATCACAACCAACTAATG	80	-	80	GTACATAGCGAGCTG
29	29	39	GAAATACAGGCTCCACG	81	-	81	GCCGCGGTTTCGTT
30	30	40	TCTTGACGATGCGGTTG	82	-	82	GGGGCGTGTGTTCTG
31	31	41	TTCGCGTACAGAGGTT	83	-	83	CTGGTGTGCTTATGCTT
32	32	42	ACTCCGACCAATAGG	84	-	84	CAAATGTTTGACTGTGATC
33	33	43	TCGACACCGACATGAC	85	-	85	TTGTGCGCGCTTTTTT
34	34	44	GAAGTCACCTCGCCC	86	-	86	GTTTCAGTTTTCTTGTCCC
35	35	46	AGTCCGTACGCTCGAAA	87	-	87	CTGGTTGTTGCCCGG
36	36	47	CGAAATCCAGCACCACA	88	-	88	TGTTCCGTTGTTCTCCTG
37	37	51	TTTGAGCGCGAACTCGT	89	-	89	TCATGACGAGCCCGCA
38	38	52	TGGATGGCGGATGCG	90	-	90	ACACGGCTGATCGGT
39	39	53	AAATCGGCGTGGGTAAC	91	-	91	CGGATTGTCTGGCCC
40	40	62	TCATACAGGTCCAGTGC	92	-	92	TAAGCAGCGCTCTGTCA
41	41	63	GCTTTCCGGCTTCTATC	93	-	93	GACCACCGAATCACCAT
42	42	64	GACATGGACGAGCGC	94	-	94	TCTGGTAGTGGGCTTCT
43	43	65	CAGAATGCACCGGG	95	-	11	ACATGCCGTGGCTCA
44	-	1	CAACCCGGAATTCTTGC	96	-	16	CACGACGTTAGGGCA
45	-	5	CAGGCGTGGCTAGG	97	-	5	CGGCAGGCGTGGCTA
46	-	6	GTCGCGGTAAGTGCC	98	-	6	CCGTCGCGTAAGTG
47	-	7	GTTGACCACGAATTTTTCAG	99	-	17	GAGCAACGCCATCAT
48	-	8	GCTGGCGGCATCAT	100	-	11	TGAGCCACGGCATGT*
49	-	9	CCATATCGGGGACGG	101	-	16	ATGCCCTAACGTCGTG*
50	-	10	GCGTCGTGCCATCAG	102	-	5	TAGCCAGCCTGCCG*
51	-	11	CCGTGCACATGCCGT	103	-	6	CACTACGGCGACGG*
52	-	16	ACGTTAGGGCATGCAG	104	-	17	GATGATGGCGTTGCT*

L'évolution actuelle des espaceurs se fait de façon unidirectionnelle par délétion. Un espaceur perdu est enlevé en même temps que la région répétée qui lui est adjacente. Un bloc d'espaceurs peut être perdu au cours d'un seul ou de plusieurs évènements évolutifs. L'acquisition hypothétique de la région DR des MTBC aurait été faite par transfert horizontal (Bhaya *et al.*, 2011).

Des études *in silico* sur cette famille de séquences ont montré la présence des gènes *cas* pour « CRISPR-associated » associés aux séquences CRISPR (figure 17). On peut retrouver de nombreux gènes *cas* selon les génomes (Haft *et al.*, 2005; Jansen *et al.*, 2002). Ces gènes CAS ont des homologies de séquence avec des gènes impliqués dans la recombinaison et la réparation d'ADN, et ont différentes fonctions dans la mécanique des CRISPR.

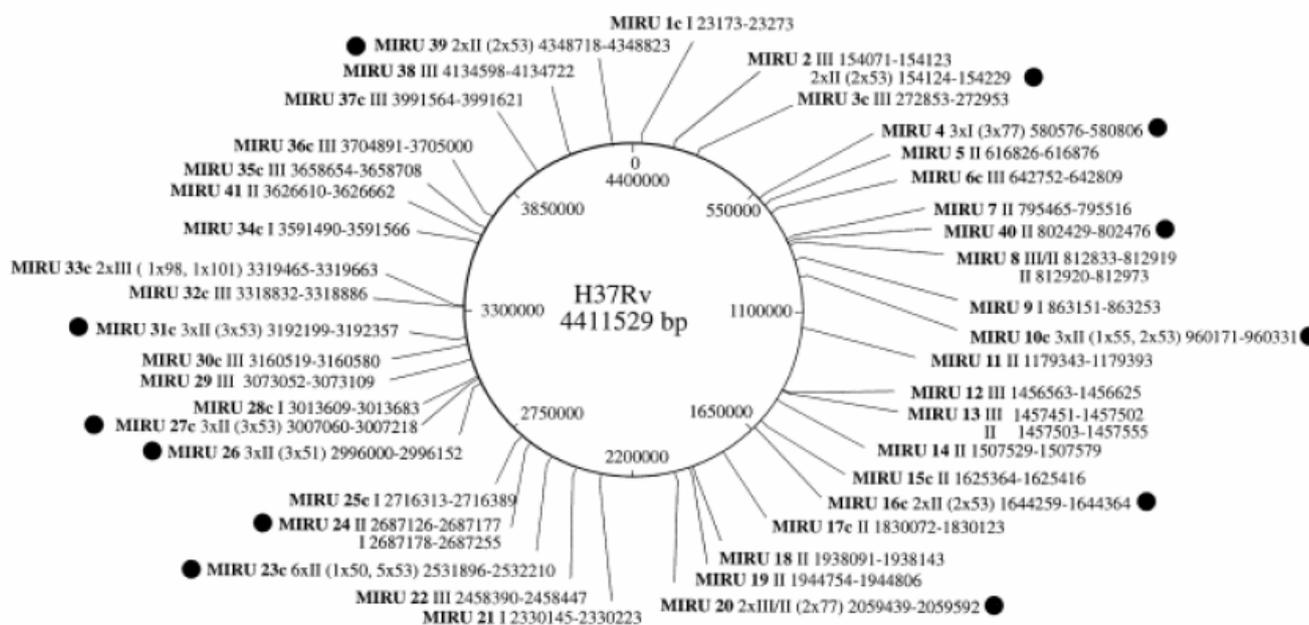
De récentes découvertes ont montré que les séquences des espaceurs composant les CRISPR correspondent à des portions d'éléments mobiles, comme des ADN de bactériophages ou de plasmides. Le rôle hypothétique de la région DR est la prévention de l'invasions par des éléments exogènes, ce qui implique aussi probablement un rôle dans le maintien de l'intégrité du génome bactérien (Barrangou *et al.*, 2007; Comas *et al.*, 2009; Van der Oost *et al.*, 2009).

La région DR présente un niveau de polymorphisme suffisant pour pouvoir classer phylogéographiquement les souches du MTBC. Ce polymorphisme est à la base du spoligotypage (§ 1.3.5.1.) (Kamerbeek *et al.*, 1997), une technique de génotypage spécifique du MTBC. Quarante-trois espaceurs les plus polymorphes ont été utilisés pour le typage classique des mycobactéries (Kamerbeek *et al.*, 1997). Des études pour augmenter le niveau de discrimination du spoligotypage ont été faites plus tard utilisant 25 espaceurs de plus en même temps que le développement d'une technologie sur microbilles qui remplace progressivement la technique classique sur membrane (Brudey *et al.*, 2004; Cowan *et al.*, 2004; Van der Zanden *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2010).

#### I.3.4.5 Les minisatellites

Des séquences classées parmi les minisatellites et localisées sur différents locus dans le génome sont nommées MIRU (« Mycobacterial Interspersed Repetitive Units ») et sont présentes dans le génome des MTBC. Ce sont des séquences nucléotidiques répétées en tandem avec des unités de taille comprise entre 46pb et 111pb. Ces séquences sont retrouvées généralement dans les régions intergéniques (Supply *et al.*, 2000). 41 locus ont été décrits

dans le génome de H37Rv (figure 11). Les rôles des MIRU sont méconnus. Le nombre de copies des motifs entre les différentes souches de MTBC est très variable. Ce polymorphisme de niveau très élevé est à la base de la méthode de typage spécifique du MTBC décrite dans le paragraphe § 1.3.5.2.



**Figure 11: Distribution des 41 locus MIRU sur le génome de H37rv**

Le numéro du locus est indiqué en gras. « c » désigne les MIRU orientés en sens contraire défini par Cole *et al.* (Cole *et al.*, 1998). I, II, III indique le type de MIRU. Les 12 locus utilisés par Supply *et al.* (2000) sont repérés par un rond noir.

### I.3.5 LES METHODES DE GENOTYPAGE

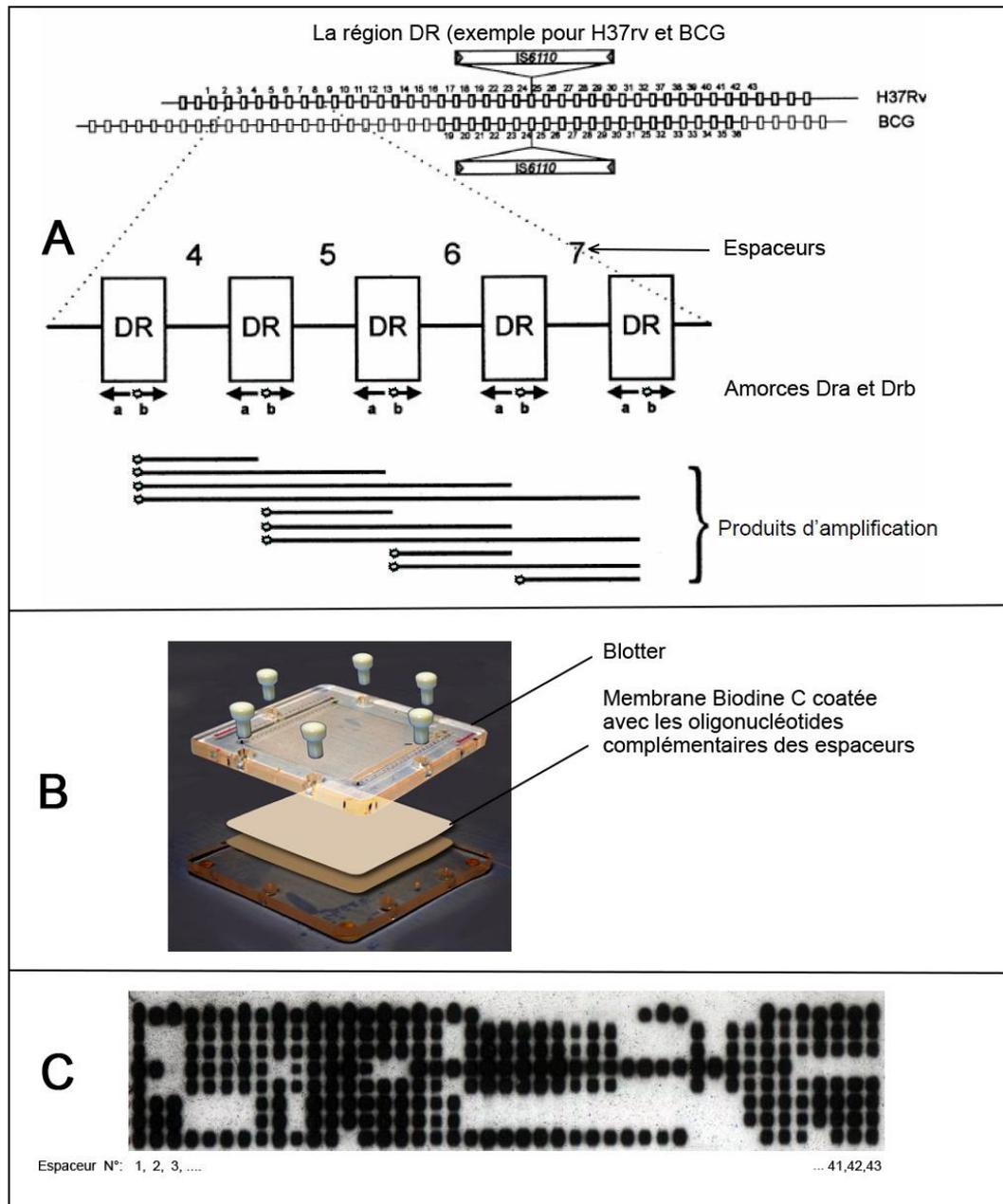
Les méthodes de génotypage du MTBC ont beaucoup évolué en 20 ans. Les plus fréquemment utilisées pour différents types d'études sont décrites ci-dessous.

#### I.3.5.1 Le spoligotypage

C'est une méthode de génotypage spécifique du MTBC qui repose sur le polymorphisme de la région DR (§ 1.3.4.4-b).

La technique consiste à amplifier les espaceurs de la région DR et à les identifier par hybridation inverse à un set de 43 oligonucléotides complémentaires de 43 espaceurs de référence (les plus polymorphes) préalablement fixés sur une membrane ou sur microbille. La

méthode est résumée sur la figure 12. Les spoligotypes obtenus sont sous la forme d'un code binaire de 43 caractères où les carrés blancs représentent les espaceurs absents et les carrés noirs représentent les espaceurs présents (figure 35-C). D'autres moyens de représentation comme des combinaisons de chiffres (8 ou 6) ont été aussi établis pour la représentation des spoligotypes (Dale *et al.*, 2001).



**Figure 12: Le spoligotypage**

A, L'amplification de la région DR ; B, Montage du système d'hybridation inverse ; C, Exemples de spoligotypes.

La technique nécessite une quantité moindre d'ADN que le typage par RFLP, car elle est basée sur une amplification de la région DR. Des études ont montré la faisabilité de la technique à partir de crachats de patients tuberculeux positifs à l'examen direct et même à partir d'extrait de lames de diagnostic microscopique positives de TB (Mallard *et al.*, 2010; Suresh *et al.*, 2007).

Une variante du spoligotypage utilisant 25 espaceurs en plus des 43 espaceurs a été développée plus tard (Brudey *et al.*, 2004; Van der Zanden *et al.*, 2002). Une version spoligotypage sur la plateforme Luminex® a été développée en 2004 au CDC et en 2010 en Europe (Zhang *et al.*, 2010) avec des combinaisons de 43 et 68 espaceurs. Le Spoligo-RIF, le TB-SPRINT et le TB-SPRINT*plus* (Gomgnimbou *et al.*, 2015; Gomgnimbou *et al.*, 2012; Gomgnimbou *et al.*, 2013) ont aussi été développées dernièrement pour combiner ce test avec des tests moléculaires de sensibilité aux antituberculeux. Entre autre, un outil disponible en ligne nommé « Spolpred » a été développé pour générer des spoligotypes *in silico* à partir des « reads » (mélange de courtes séquences oligonucléotidiques de 20 à 200 pb généré par les séquenceurs de nouvelle génération) du séquençage de la région DR (Coll *et al.*, 2012). D'autres études ont aussi développé des méthodes de détermination *in silico* des spoligotypes (Xia *et al.*, 2016).

Malgré son niveau de discrimination relativement faible par rapport à d'autres techniques et le niveau plus élevé d'homoplasie au niveau des espaceurs observé (Comas *et al.*, 2009; Warren *et al.*, 2002), le spoligotypage constitue aujourd'hui une des techniques les plus utilisées dans le monde. C'est une technique moins chère, moins lourde que les autres méthodes de typage et qui a surtout l'avantage d'être standardisée et reproductible dans tous les laboratoires de biologie moléculaire travaillant sur la TB (Sola *et al.*, 1999). Des recommandations de contrôle de qualité ont été également proposées récemment pour les laboratoires travaillant encore sur membrane (Abadia *et al.*, 2011).

#### I.3.5.2 Les MIRU-VNTR

La méthode du MIRU-VNTR repose sur l'identification du nombre de copies des unités répétées en tandem des locus VNTR. Pour cela, chaque locus MIRU est amplifié par des amorces flanquantes. Les produits de PCR sont mis à migrer sur électrophorèse sur gel d'agarose pour déterminer la taille des amplicons. Le nombre de copies des éléments répétés

est identifié à partir de références de tailles déjà connues (Supply *et al.*, 2000; Supply *et al.*, 2006). Les profils MIRU obtenus sont formés de la suite des chiffres concaténés correspondant chacun aux nombres de copies des unités répétées de chaque locus étudié.

Une sélection de 12 locus a été choisie au tout début du typage de *M. tuberculosis* par les MIRU-VNTR (Supply *et al.*, 2000). Mais plus tard des combinaisons de 15 et de 24 locus ont été adoptées pour optimiser le niveau de discrimination de la méthode (Supply *et al.*, 2006). D'autres études ont proposé diverses combinaisons de locus (Kam *et al.*, 2006; Kremer *et al.*, 2005; Smittipat *et al.*, 2005) mais après des soucis de standardisation inter-laboratoire, Les combinaisons de Supply *et al.* en 2006 sont actuellement retenues (tableau 2).

**Tableau 2: Liste des 24 locus VNTR standards utilisés actuellement pour la technique MIRU-VNTR selon leur position chromosomique (Supply *et al.*, 2006)**

Numéro	Locus	Taille de chaque unité
1	MIRU 4; ETR D	77
2	MIRU 26	51
3	MIRU 40	54
4	MIRU 10	53
5	MIRU 16	53
6	MIRU 31; ETR E	53
7	Mtub04	51
8	ETR C	58
9	ETR A	75
10	Mtub30	58
11	Mtub39	58
12	QUB-4156	59
13	QUB-11b	69
14	Mtub21	57
15	QUB-26	111
16	MIRU 2	53
17	MIRU 23	53
18	MIRU 39	53
19	MIRU 20	77
20	MIRU 24	54
21	MIRU 27; QUB-5	53
22	Mtub29	57
23	ETR B	57
24	Mtub34	54

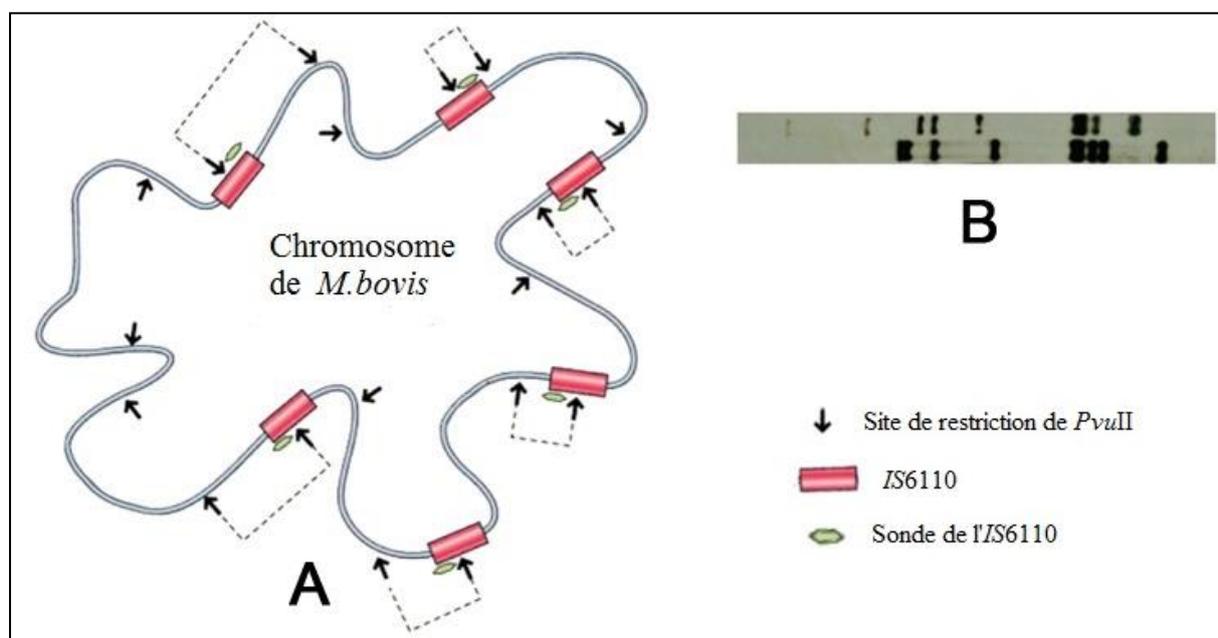
Des études ont mis au point des amplifications multiplexées des locus (Allix-Béguec *et al.*, 2008; Supply *et al.*, 2014; Supply *et al.*, 2001; Supply *et al.*, 2006; Yasmin *et al.*, 2014) ainsi que des détermination de taille d'amplicons sur des appareils de séquençage (ABI 377

automated sequencer ® ou autre) afin de réduire la lourdeur de la méthode (Chin et Jou, 2005; Supply *et al.*, 2001).

La méthode des MIRU-VNTR a un niveau de discrimination très élevé (Mazars *et al.*, 2001). La technique est surtout utilisée dans les études d'épidémiologie moléculaire et moins dans des études d'évolution et de phylogénie de *M. tuberculosis*, même si elle donne aussi d'excellents résultats.

### I.3.5.3 La RFLPIS6110

La RFLPIS6110 (« Restriction Fragment Length Polymorphism – Insertion sequence 6110 ») repose sur l'analyse du nombre et de la position des copies d'IS6110. Pour cela, l'ADN purifié des souches est clivé par une enzyme de restriction *PvuII*, puis mis à migrer par électrophorèse sur gel d'agarose pour déterminer le nombre et la taille des fragments de restriction puis les IS6110 sont identifiés par des sondes spécifiques (figure 13). Cette technique a permis de classer *M. tuberculosis* en une trentaine de familles selon le nombre de copies de IS6110 (Van Embden *et al.*, 1993; Yeh *et al.*, 1998).



**Figure 13: Les sites de restriction IS6110 chez *M. bovis***  
A, Représentation du chromosome de *M. bovis* avec la région IS6110, les sites de restriction et le sonde de l'IS6110 utilisé pour le génotypage. B, Exemples de profils RFLPIS6110

Malgré son niveau de discrimination très élevé, cette technique présente des inconvénients tels que l'utilisation d'une grande quantité d'ADN nécessitant donc de passer par la culture des mycobactéries nécessitant jusqu'à plusieurs semaines et la complexité de la technique. Une très difficile standardisation inter-laboratoire a aussi été observée (Sola *et al.*, 2003).

#### I.3.5.4 La génomique comparative : LSPs , SNPs, WGS/NGS.

##### **a. Les LSPs**

Des délétions de fragments de génome de différentes tailles appelées aussi régions de différence ou LSPs (« Large Sequence Polymorphisms ») ont été observées chez *M. tuberculosis* (Fleischmann *et al.*, 2002; Hirsh *et al.*, 2004; Tsolaki *et al.*, 2004). La survenue de la majorité de ces LSPs serait due à des évènements uniques et irréversibles dans l'évolution des espèces du MTBC (Hirsh *et al.*, 2004) ce qui élimine totalement le risque d'homoplasie. Quelques LSPs sont cependant phylogénétiquement non informatives. Des études de comparaison ont aussi montré que généralement, la majorité de ces LSPs ne sont pas liées à des différences fonctionnelles et phénotypiques entre les souches. De ce fait, ces marqueurs seraient plus appropriés pour des études phylogénétiques et de classification (Gagneux *et al.*, 2006b).

Le principe de ces techniques repose sur l'analyse PCR en utilisant des couples d'amorces dirigés respectivement contre les régions délétées et leurs séquences flanquantes, suivie éventuellement de séquençage des portions de génome d'intérêt.

Les premières régions de différence étudiées chez les MTBC et identifiées via la comparaison avec la souche *M. bovis* et les autres souches du MTBC sont les régions RD1, RD2 et RD3. RD1 correspond à une délétion spécifique de *M. bovis* BCG. Cette région contient les gènes codant pour un antigène sécrété des MTBC, l'ESAT-6 (« Early Secreted Antigenic target 6 ») jouant un rôle majeur dans la pathogénicité des souches du MTBC (Brosch *et al.*, 2002; Gordon *et al.*, 1999). RD2 correspond à des délétions de séquences répétées. RD3 correspond au prophage PhiRv1. D'autres régions de différences ont été étudiées plus tard.

Malgré le niveau de discrimination très faible de ces techniques de typage, ce sont des techniques qui permettent d'identifier avec certitude les branches phylogénétiques principales

du complexe de *M. tuberculosis*. Elles ne permettent pas cependant de retracer l'évolution de toutes les souches actuelles (Baker *et al.*, 2004; Filliol *et al.*, 2006; Gutacker *et al.*, 2006).

### **b. Les SNPs**

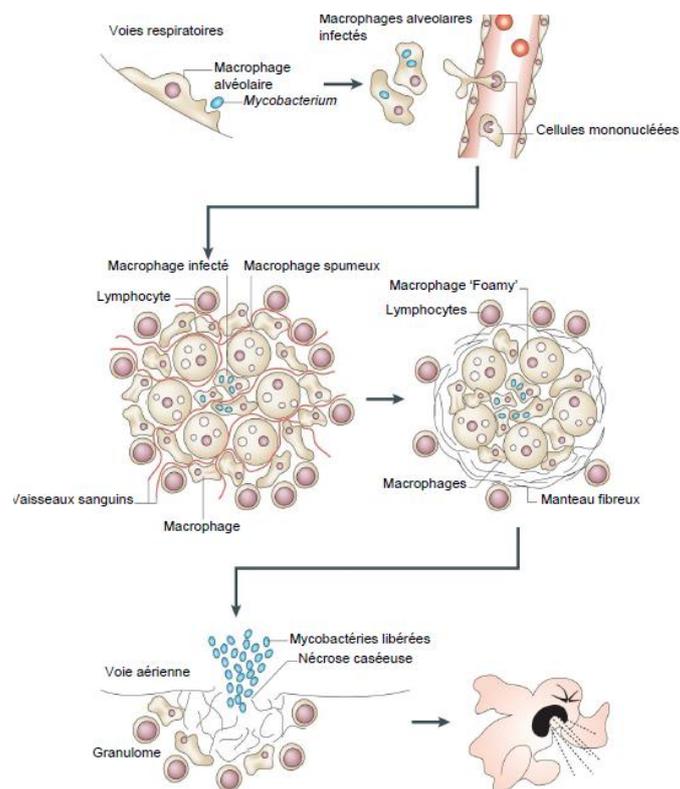
Les SNPs (« Single Nucleotide Polymorphism ») sont des variations au niveau nucléotidique entre les différentes souches. Ce sont des modifications qui se produisent spontanément à des fréquences plus ou moins connues. Il existe deux types de SNPs : les SNPs synonymes ou sSNPs qui sont considérés comme neutre ou presque d'un point de vue fonctionnel pour la bactérie et les SNPs non synonymes ou nsSNPs qui se traduisent par une modification de la séquence en acides aminés de la protéine induite. Les nsSNPs soumettent les bactéries à une pression de sélection interne et environnementale. De telles modifications sont à l'origine de la résistance acquise des bacilles tuberculeux aux antibiotiques utilisés contre la TB. Les sSNPs par contre lorsqu'ils sont situés au niveau des gènes structuraux ou « gènes de ménage » permettent de mieux suivre les liens évolutifs entre les souches.

Les SNPs sont peu sujettes à des phénomènes d'homoplasie et sont de ce fait utilisés pour des études phylogénétiques et de classification. Les techniques reposaient principalement sur le séquençage des gènes d'intérêt suivi d'analyse par comparaison de plusieurs séquences *in silico*. Actuellement, avec l'essor grandissant des outils de séquençage de nouvelle génération (NGS), de séquençage du génome complet (WGS) et d'outils bioinformatiques, il est très commun aujourd'hui de faire des études d'épidémiologie moléculaire, de comparaison, de classification ou de phylogénie avec les SNPs du génome entier de *M. tuberculosis*. Les études de transmission de TB par les SNPs permettent d'identifier plus précisément les sources primaires d'infections et de retracer un schéma de transmission de la TB (Gardy *et al.*, 2011; Schurch *et al.*, 2010; Walker *et al.*, 2013) mais aussi ont permis d'identifier ce qu'on appelle des « superspreader » qui sont des sujets ayant transmis massivement leurs souches tuberculeuses à d'autres cas (Schurch *et al.*, 2010). L'utilisation des SNPs semble avoir un maximum de discrimination dans les études épidémiologiques et dans des études de classification (Gardy *et al.*, 2011).

#### **I.4 TRANSMISSION ET DEVELOPPEMENT DE LA TB**

La TB se transmet par voie aérienne. La contamination se fait par inhalation de gouttelettes infectantes ou « gouttelettes de Flügge » de taille inférieure à 5 µm émises sous forme d'aérosol par un patient avec une TB pulmonaire en phase active, en toussant, en crachant, en parlant ou en éternuant. Les lieux mal aérés favorisent la transmission de la maladie mais des transmissions nosocomiales peuvent aussi avoir lieu au cours des manipulations des matériels biologiques tuberculeux et les ustensiles souillés (Kao *et al.*, 1997). Dans la majorité des cas, les bacilles tuberculeux sont arrêtés au niveau du nez et des bronches et bronchioles. Ils sont par la suite entraînés par les mucus vers le pharynx puis déglutis et détruits par l'acidité de l'estomac. Si quelques bacilles contenus dans ces gouttelettes parviennent au niveau des alvéoles pulmonaires, ils peuvent se multiplier et être à l'origine de ce qu'on appelle une primo-infection tuberculeuse (PIT).

Lors d'une PIT, les bacilles tuberculeux ayant atteint les alvéoles pulmonaires sont phagocytés par des macrophages dans lesquels ils vont survivre et se multiplier. Ou dans un cas plus favorable pour l'hôte, ils sont éliminés. Dans le premier cas, après quelques jours de multiplication, les macrophages migrent passivement vers les ganglions satellites du foyer primaire par les vaisseaux lymphatiques. Il y a alors activation des lymphocytes T suivie du développement d'une immunité cellulaire retardée. Au niveau des alvéoles pulmonaires, il se forme alors ce qu'on appelle un granulome ou tubercule constitué d'un noyau de macrophages infectés dégénérés (épithélioïdes) ou fusionnés, entouré de lymphocytes T et d'une couronne fibroblastique (Domingues *et al.*, 2016) (figure 14).



**Figure 14: Formation et progression du granulome lors d'une infection à *M. tuberculosis***

Pour les patients immunocompétents, on estime que dans 5% des cas, la PIT peut évoluer en TB maladie dans les 2 ans qui suivent la primo-infection et que dans 5%, cette évolution ne se fera que plusieurs années plus tard (Dye *et al.*, 1999; Society, 2000). De nombreux facteurs tels que l'âge du patient infecté influencent aussi cette transition (enfants de moins de 15 ans et personnes âgées) (Moyo *et al.*, 2010). Dans 90% des cas, la maladie ne se développe pas. Le granulome se calcifie et les bacilles emprisonnés restent sous contrôle à l'état quiescent, on parle d'infection tuberculeuse latente (ITL) (Smith, 2003). Ces patients ne sont pas contagieux et peuvent être infectés plusieurs années sans tomber malade.

Pour des patients immunodéprimés, l'évolution en TB maladie est beaucoup plus fréquente. 50 % des patients immunodéprimés infectés par *M. tuberculosis* sont estimés développer une TB maladie dans les deux ans suivant leur infection (Society, 2000). De plus, il a été montré qu'un taux de 5 à 10% des patients porteurs d'une TB latente et contractant le VIH développent une TB maladie (Clark-Curtiss et Haydel, 2003; Dye *et al.*, 1999) soulignant ainsi la complexité de l'association existant entre le VIH et *M. tuberculosis*.

Certains autres facteurs liés aux conditions et mode de vie des patients infectés peuvent aussi favoriser cette transition, tels que la malnutrition, l'alcoolisme, le tabagisme, la précarité, la toxicomanie, ou le diabète (Society, 2000). Enfin, la charge bactérienne, la

pathogénicité et la virulence de la population bactérienne ainsi que les facteurs génétiques de susceptibilité de l'hôte pourraient aussi intervenir dans l'évolution de la PIT à la TB maladie (Kritski et Melo, 2007; Underner et Meurice, 1999).

Les cas de TB latente peuvent évoluer en TB maladie pulmonaire. On parle dans ce cas de réactivation de l'infection tuberculeuse latente (Flynn et Chan, 2001). Il y a transformation du granulome par liquéfaction du caséum et création d'une cavité très riche en bacilles tuberculeux viables. Les bacilles retrouvent des conditions favorables à leur évolution (présence d'oxygène), et reprennent leur multiplication. Ils envahissent alors l'ensemble des bronches entraînant une réaction inflammatoire intense provoquant toux et expectoration chronique. C'est à ce stade que le patient est le plus contagieux (Korbel *et al.*, 2008). Ce foyer infectieux du poumon provoque la formation de lésion ou chancre d'inoculation. On parle ici de cas de TB pulmonaire active. Cette TB active ne se développe que chez environ 10% des personnes infectées par *M. tuberculosis* (Kaufmann, 2002). La TB active s'accompagne de signes cliniques et/ou radiologiques. Les signes cliniques de la TB pulmonaire sont une toux persistante avec des expectorations parfois accompagnées de sang, une douleur thoracique et des symptômes plus généraux comme fièvre, sudation nocturne, fatigue, perte d'appétit, et amaigrissement. Un diagnostic peut être proposé par radiographie ou scanner du thorax du patient.

Après dissémination via la circulation sanguine et lymphatique de bacilles tuberculeux, ceux-ci peuvent se développer et provoquer des lésions dans de nombreux autres organes tels que les os (mal de Pott), les méninges (méningite tuberculeuse), les reins, etc... On parle alors de TB extra-pulmonaire. La TB extra-pulmonaire est moins fréquente que la TB pulmonaire (moins de 15% des cas) (Hopewell et Jasmer, 2005). Pour la TB extra-pulmonaire, les symptômes peuvent varier en fonction de la région corporelle atteinte.

## **I.5 LE TRAITEMENT DE LA TB**

La TB est une maladie mortelle mais guérissable avec un traitement approprié et scrupuleusement respecté par le malade (WHO, 2015). La chimiothérapie antituberculeuse préconisée par l'OMS repose sur l'association de plusieurs antibiotiques antituberculeux. Les principaux antituberculeux sont : l'isoniazide (INH), la rifampicine (RIF), la pyrazinamide (PZA), l'éthambutol (EMB), et la streptomycine (SM). La multithérapie consiste à associer

plusieurs antituberculeux, ce qui permet de réunir 3 propriétés essentielles au traitement : un effet bactéricide (INH, RIF, PZA), un effet stérilisant (RIF et PZA) et un effet préventif pour l'apparition des formes de résistance aux antituberculeux (WHO, 2003). Les antituberculeux sont classés en antibiotique de première ligne *i.e.* antibiotiques utilisés en première intention chez les tuberculeux et antituberculeux de seconde ligne *i.e.* antibiotiques utilisés en seconde intention (tableau 3).

**Tableau 3: Liste des antituberculeux disponibles actuellement (NCCLS, 2003)**

Antituberculeux de première ligne	Antituberculeux de seconde ligne
Isoniazide	Acide p-aminosalicylique
Rifampicine	Ethionamide
Pyrazinamide	Cyclosérine
Ethambutol	Amikacine
Streptomycine	Kanamycine
	Capréomycine
	Fluoroquinolones
	Bedaquiline
	Linezolid

Le traitement standardisé de la TB maladie (pulmonaire ou extra-pulmonaire) appelé aussi « Short Course Chemotherapy – SCC » est d'une durée de six mois et comporte deux phases : deux mois de quadrithérapie associant INH, RIF, PZA, et EMB suivie d'une bithérapie de quatre mois associant RIF et INH.

L'OMS a par ailleurs défini des schémas thérapeutiques adaptés en fonction des formes de la TB (TB maladie ou TB latente), de sa localisation, de son degré de gravité, des antécédents de traitement du patient, de la coïnfection avec d'autres maladies telles que le VIH-SIDA et aussi en fonction des systèmes de santé des pays qui auront à les appliquer et de leurs moyens financiers disponibles (WHO, 2009).

Pour les cas de co-infection avec le VIH-SIDA, des interactions médicamenteuses entre les traitements utilisés contre le VIH-SIDA et la TB, notamment entre la RIF, antituberculeux majeur, et de nombreux antirétroviraux, viennent compliquer le traitement des patients co-infectés (Spigelman, 2007).

Un traitement préventif ou chimio-prophylaxie existe pour les patients ne présentant pas les symptômes d'une TB mais répondant positivement à l'IDR ainsi que pour les patients à

risque tels que les immunodéprimés (Silva et Ainsa, 2007). Le traitement préventif consiste en une prise quotidienne d'INH pendant six à neuf mois. Ce traitement a montré un taux de protection supérieur à 90% mais reste cependant associé aux effets indésirables de la prise à long terme de l'INH tels que l'hépatotoxicité (Lobue et Menzies, 2010).

### **I.5.1 TRAITEMENT DES CAS DE TB RESISTANTS ET MULTIRESISTANTS AUX ANTITUBERCULEUX**

Dans des cas de résistance ou de multirésistance aux antituberculeux, le traitement change et on a recours à des antituberculeux de seconde ligne qui sont moins efficaces et plus toxiques que les antituberculeux de première ligne. De plus, la durée du traitement est rallongée. Les antituberculeux de seconde ligne les plus utilisés sont : les aminoglycosides, les fluoroquinolones, l'acide p-aminosalicylique, les thioamides (Caminero *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2006). Des schémas thérapeutiques normalisés spécialement conçus ou des schémas thérapeutiques personnalisés existent pour les patients avec une TB-MR (WHO, 2009).

### **I.5.2 LA PREVENTION CONTRE LA TB ET LE VACCIN BCG**

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

## **I.6 LA RESISTANCE DE *M. TUBERCULOSIS* AUX ANTITUBERCULEUX**

La « résistance à un antibiotique » est un caractère phénotypique caractérisant la capacité d'une bactérie à survivre (et à se multiplier), en présence de cet antibiotique, à une concentration qui est habituellement bactéricide ou bactériostatique. La résistance d'une bactérie à un antibiotique entraîne la perte d'efficacité de ce médicament lors du traitement d'une infection causée par cette bactérie.

### **I.6.1 LA RESISTANCE NATURELLE AUX ANTITUBERCULEUX**

Les membres du complexe *M. tuberculosis* sont naturellement résistants à la plupart des antibiotiques usuels ( $\beta$ -lactamines, les macrolides, les cyclines, les sulfamides et les glycopeptides) (Veziris *et al.*, 2005). En effet, ils ne sont sensibles qu'à un petit nombre d'antibiotiques dits « antibiotiques antituberculeux ». Les mycobactéries non tuberculeuses présentent également une résistance naturelle à ces antibiotiques usuels. De plus, elles sont naturellement résistantes à la plupart des antibiotiques efficaces sur *M. tuberculosis* tels que l'INH, la PZA, l'EMB, le PAS... (Veziris *et al.*, 2005).

La faible perméabilité de la paroi mycobactérienne est la cause la plus évidente expliquant le niveau de résistance naturelle des mycobactéries aux antibiotiques (Jarlier et Nikaido, 1994). La paroi mycobactérienne est formée d'une architecture caractéristique et particulièrement complexe. Il a été estimé que la paroi des mycobactéries est 1000 fois moins perméable au  $\beta$ -lactamines que la paroi d'*E. coli* (Jarlier *et al.*, 1991). D'autres facteurs tels que la production d'enzymes modifiant les antibiotiques et leur activité ont également été décrits chez *M. tuberculosis* comme, la  $\beta$ -lactamase responsable de la résistance naturelle aux  $\beta$ -lactamines (Voladri *et al.*, 1998) ou l'aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase impliquée dans la résistance aux aminoglycosides (Ainsa *et al.*, 1997).

### **I.6.2 LA RESISTANCE ACQUISE AUX ANTITUBERCULEUX**

A la différence des autres bactéries pathogènes qui acquièrent en général leur résistance aux antibiotiques par transfert horizontal de plasmides ou transposons portant des gènes de résistance, l'acquisition de la résistance aux antituberculeux chez *M. tuberculosis* provient

généralement d'altérations spontanées de gènes chromosomiques spécifiques sous la forme de mutations ponctuelles non-synonymes, de délétions ou insertions (Davies, 1998). Jusqu'à présent, aucun plasmide ou transposon de résistance n'a encore été décrit chez les mycobactéries (Veziris *et al.*, 2005). Par conséquent, la résistance ne se transfère pas entre les mycobactéries présentes chez un même patient autrement que par multiplication, elle se transmet donc à la descendance de la bactérie mutée.

Actuellement, les mutations impliquées dans la résistance de *M. tuberculosis* aux antituberculeux ont été mises en évidence :

- dans des gènes codant les protéines cibles de l'antibiotique, diminuant l'affinité de la cible pour cet antibiotique ;
- dans des gènes codant une enzyme impliquée dans l'activation de l'antibiotique, empêchant son passage de la forme pro-drogue à la forme active ;
- ou dans une région génomique régulatrice provoquant la surexpression de la cible de l'antibiotique. C'est le cas de la résistance des souches tuberculeuses à l'INH ou on retrouve des mutations dans la région régulatrice du gène *ahpC* provoquant une surproduction de l'alkyl hydroperoxyde réductase AhpC impliquée dans la détoxification des peroxydes organiques.

Malgré ces avancées majeures, certains mécanismes de résistance aux antituberculeux ne sont pas encore élucidés. Certaines souches résistantes ne présentent pas de mutation(s) dans le(s) gène(s) identifié(s) comme impliqué(s) dans la résistance aux antibiotiques concernés. Dans certaines études, des souches sensibles ont aussi montré des mutations décrites impliqués dans la résistance à l'antibiotique concerné (Hazbõn *et al.*, 2005).

#### I.6.2.1 SELECTION DES MUTANTS RESISTANTS

Dès que la SM fut introduite comme agent anti-tuberculeux, l'émergence d'isolats résistants à la SM de *M. tuberculosis* fut observée (McDermott *et al.*, 1947). Le même scénario s'est répété par la suite pour chaque utilisation d'anti-tuberculeux en monothérapie: INH, RIF,... (McDermott *et al.*, 1947; Youmans *et al.*, 1947). Par ailleurs, lorsque les bactéries sont exposées à un antibiotique, la pression de sélection favorise le développement de mutants résistants (David, 1971).

L'apparition des bactéries résistantes aux antibiotiques suit la théorie de Darwin sur l'évolution. En effet, la bactérie ayant acquis spontanément une mutation lui conférant une résistance à un antibiotique, présente un avantage sélectif par rapport aux autres bactéries. Dans ces circonstances, elle peut survivre et se diviser chez le patient traité avec l'antibiotique en question (Zhang et Yew, 2009).

Diverses études ont montré que *M. tuberculosis* a acquis les mutations conférant les différentes résistances aux antibiotiques de façon spontanée et au hasard. La fréquence de ces mutations varie d'un antibiotique à l'autre. Quelques études ont essayé de déterminer cette fréquence malgré des résultats peu reproductibles d'une expérience à une autre (David, 1970; Tsukamura, 1972). La survenue de chaque mutant étant indépendante, la probabilité de développer un double mutant résistant à une bithérapie est égale au produit des fréquences de chaque mutant pris isolément, ce qui en fait un événement peu probable. La thérapie combinée apparaît donc très avantageuse pour le traitement de la TB (Iseman et Madsen, 1989; Veziris *et al.*, 2005).

Une situation alarmante et potentiellement très dangereuse pour la santé publique réside dans l'émergence de souches résistantes à plusieurs antibiotiques (Chan et Iseman, 2008). Aucune mutation spécifique conférant une multirésistance n'a été encore décrite. Les souches multirésistantes sont le résultat d'une accumulation séquentielle de mutations indépendantes, conférant chacune une résistance à un antibiotique différent (Ramaswamy et Musser, 1998).

#### I.6.2.2 COUT BIOLOGIQUE LIE A L'ACQUISITION D'UNE RESISTANCE A UN ANTIBIOTIQUE

La valeur sélective ou « fitness » d'une bactérie est une mesure de la capacité de celle-ci à survivre, se reproduire et être transmise (Cohen *et al.*, 2003; Toungousova *et al.*, 2004). Des études antérieures ont démontré et ont proposé une théorie selon laquelle les mutations qui mènent au développement de la résistance à un antibiotique s'accompagnent d'une réduction de « fitness » car elles compromettent des fonctions vitales de la bactérie (Gillespie, 2001; Maisnier-Patin et Andersson, 2004). De ce fait, en absence de la pression de sélection des antituberculeux, les souches résistantes ne sont pas compétitives par rapport aux souches sensibles (Andersson, 2003; Cohen et Murray, 2004; Toungousova *et al.*, 2004). On sait néanmoins actuellement que chez *M. tuberculosis* certaines mutations ne sont pas associées à une perte de fitness, on parle dans ce cas de mutation « no-cost » (Cohen et Murray, 2004;

Gagneux *et al.*, 2006a; Sander *et al.*, 2002). Des mutations de compensation de perte de fitness existent aussi.

### **I.6.3 LA RESISTANCE PRIMAIRE ET SECONDAIRE**

Une bactérie tuberculeuse résistante isolée d'un patient qui n'a jamais été traité pour une TB auparavant, est considérée comme une souche de « résistance primaire ». Par contre, une bactérie tuberculeuse résistante provenant d'un patient traité précédemment pour une TB (pendant au moins un mois), est probablement une mycobactérie mutante résistante apparue chez ce patient et est alors considérée comme une souche de « résistance secondaire ou acquise » (WHO, 1997). Plutôt que ces deux termes on préfère utiliser aujourd'hui respectivement les termes de « résistance initiale » et de « résistance acquise au traitement ».

### **I.6.4 LES METHODES DE DIAGNOSTIC DE LA RESISTANCE AUX ANTITUBERCULEUX**

#### **I.6.4.1 LES ANTIBIOGRAMMES SUR MILIEU DE CULTURE SOLIDE ET LIQUIDE**

Les tests d'antibiogramme consistent à tester la sensibilité des bactéries aux antibiotiques par base de tests de croissance sur le milieu Löwenstein Jensen, en présence de concentration critique d'antibiotique par la méthode des proportions décrite par Canetti (Canetti *et al.*, 1969; Canetti *et al.*, 1963). Pour les mycobactéries, les résultats ne s'obtiennent qu'après 4 à 6 semaines mais l'antibiogramme demeure le test de référence pour la détermination de la résistance aux antituberculeux. Sur MGIT 960, il est également possible et en moins de temps que sur milieu solide, d'obtenir un antibiogramme à tous les antituberculeux (Siddiqi *et al.*, 2012).

#### **I.6.4.2 LES METHODES MOLECULAIRES**

Les tests moléculaires ont été développés plus récemment et les résultats s'obtiennent en quelques heures ou quelques jours. Ces tests sont basés sur l'amplification des gènes impliqués dans la résistance à l'antibiotique concerné et à l'identification des mutations identifiées responsables de la résistance. Le tableau 04 récapitule les gènes connus actuellement impliqués dans la résistance de *M. tuberculosis* aux antibiotiques utilisés dans la thérapie anti-tuberculeuse.

**Tableau 4: Les régions génomiques associées à une diminution ou une perte de la sensibilité aux agents antituberculeux**

(Mathema *et al.*, 2006; Mathys, 2010; Wong *et al.*, 2011)

Antituberculeux	Gène	Produit du gène	Fréquence des mutations parmi les souches cliniques résistantes (%)
Streptomycine	<i>rpsL</i>	Protéine ribosomale S12	60
	<i>rrs</i>	rRNA 16S	<10
	<i>gidB</i>	rRNA 16S méthyl transférase	Non disponible
Rifampine	<i>rpoB</i>	Sous unité $\beta$ de la RNA polymérase	>95
Isoniazide	<i>katG</i>	Catalase-péroxydase	60-70
	<i>oxyR-ahpC</i>	Alkylhydorréductase	20
	<i>inhA</i>	Enoyl-ACP réductase	<10
	<i>kasA</i>	$\beta$ -Ketoacyl-ACP synthétase	<10
	<i>ndh</i>	NADH déshydrogénase	Non disponible
Ethambutol	<i>embCAB</i>	Arabinosyltransférases	70
Pyrazinamide	<i>pncA</i>	Amidase	70-100
Ethionamide	<i>inhA</i>	Enoyl-ACP réductase	<10
	<i>ethA</i>	Flavoprotéine monooxygénase	42
Kanamycine	<i>rrs</i> et son promoteur	rRNA 16S	65
Amikacine	<i>rrs</i> et son promoteur	rRNA 16S	Non disponible
Fluoroquinolone	<i>gyrA</i>	Sous unité de la DNA gyrase	>90
	<i>gyrB</i>	Sous unité $\beta$ de la DNA gyrase	Non disponible
Capréomycine	<i>tlyA</i>	rRNA méthyltransférase	Non disponible
	<i>rrs</i>	rRNA 16S	Non disponible
Acide para-aminosalicylique	<i>thyA</i>	Thymidylate synthétase	37

Ci-après quelques tests les plus utilisés et recommandés par l'OMS pour le diagnostic de la résistance de *M. tuberculosis* aux antituberculeux :

**a. Le test GenoType® MTBDRplus** (Hillemann *et al.*, 2007)

Le test GenoType® MTBDRplus (Hain Lifesciences, Nehren, Germany) est un test de détection rapide de mutations associées à la résistance aux 2 antituberculeux de première ligne, l'INH et la RIF (Hillemann *et al.*, 2007). Le test repose sur l'hybridation des produits PCR des gènes *rpoB*, *katG* et *inhA* sur une bandelette de nitrocellulose préalablement recouverte avec des sondes nucléotidiques complémentaires des principaux allèles mutés et

non mutés connus comme étant impliqués à la résistance à la RIF et à l'INH. Le test montre une sensibilité et une spécificité très élevées sur des extraits de cultures mais montre certaines limites sur des prélèvements directs auprès des patients diagnostiqués positifs par la microscopie (Somoskovi *et al.*, 2006) malgré des tests initiaux prometteurs (Hillemann *et al.*, 2006).

Plus tard, une version améliorée, le Genotype® MTBDRplus V.2.0 a été développée (Causse *et al.*, 2008). Cette version permet d'augmenter la sensibilité et la spécificité des tests à partir de prélèvements biologiques directs. Mais des études récentes ont encore montré les limites du test dans la détection des mutations associées à la résistance à la RIF et à l'INH (Rahman *et al.*, 2016).

**b. Le test Genotype® MTBDR<sub>sl</sub> (Hillemann *et al.*, 2009; Kiet *et al.*, 2010)**

Le test Genotype® MTBDR<sub>sl</sub> (Hain Lifesciences, Nehren, Germany) est un test de détection rapide des mutations associées aux antituberculeux de seconde ligne qui repose exactement sur le même principe que le Genotype® MTBDR<sub>plus</sub>. Le test amplifie des régions des gènes *gyrA*, *rrs* et *embB* associés respectivement à la résistance à la fluoroquinolone, à la capréomycine/kanamycine/Amikacine et à l'éthambutol (EMB).

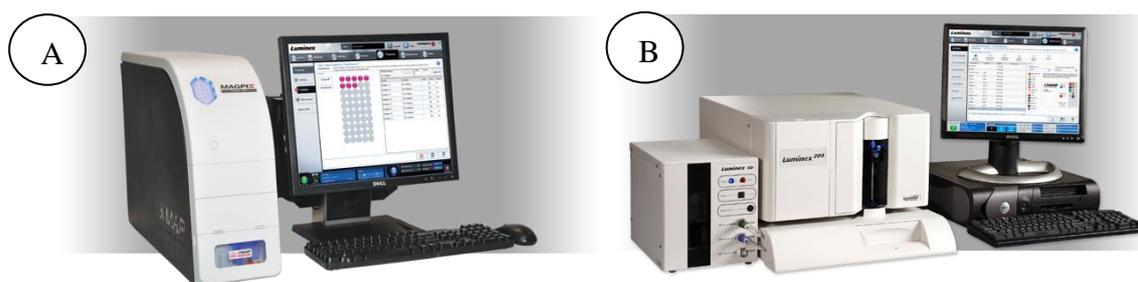
**c. Le Xpert® MTB/RIF (Blakemore *et al.*, 2010; Helb *et al.*, 2010)**

Le Xpert® MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) est une plateforme de tests de diagnostic moléculaire de la TB et de détection moléculaire de la sensibilité à la RIF (figure 16). Le Xpert® MTB/RIF se base sur l'amplification en temps réel de la région RRDR « Rifampicine Resistance Determining Region » et sur la détection des mutations dans cette région via l'hybridation de différentes sondes. La non détection de mutations sur cette région s'interprète comme la sensibilité à la RIF de la souche et réciproquement. La région RRDR est une courte séquence de 81 pb du gène *rpoB* présentant la majorité des mutations décrites actuellement responsables de la résistance à la RIF chez *M. tuberculosis*. Le Xpert® MTB/RIF fonctionne comme un système utilisant des cartouches uniques en vase clos avec des réactifs lyophilisés disponibles directement dans la cartouche. L'obtention des résultats est rapide (2h30). Les tests se font directement à partir de crachats de patients. La sensibilité et la spécificité sont élevées. L'excellente capacité du Xpert® MTB/RIF à identifier les

mutations responsables de la résistance à la rifampicine a été démontrée à plusieurs reprises par différentes études (Blakemore *et al.*, 2010; Helb *et al.*, 2010).

**d. Le SpoligoRIF** (Gomgnimbou *et al.*, 2012)

Le SpoligoRIF est une méthode qui associe à la fois le spoligotypage et un test moléculaire de sensibilité à la RIF. La méthode repose sur l'amplification simultanée en parallèle de la région DR (pour le spoligotypage) et de la région RRDR (pour les tests de sensibilité à la RIF) suivie d'une hybridation des produits de PCR sur des jeux de microbilles couplés au préalable avec des sondes complémentaires des 43 espaceurs du spoligotypage, des séquences sauvages de la région RRDR (*i.e.* non mutées) ainsi que des séquences de la région avec les mutations les plus fréquentes connus conférant la résistance à la RIF, et l'identification des microbilles hybridées sur la plateforme Luminex 200 ou Magpix (figure 15). La lecture se fait automatiquement par la machine et les valeurs obtenues sont enregistrées par le logiciel associé. L'identification des billes et des produits de PCR couplés se fait par émission de différentes fluorescences identifiant d'une part chaque microbille, et d'autre part, mesurant la quantité d'oligonucléotides hybridés spécifiquement sur ces billes. Deux sortes de billes sont utilisées selon l'appareil de lecture choisi : les billes en polystyrène pour le Luminex 200 et les billes magnétiques pour le Magpix. Le Luminex 200 repose sur la technique de cytométrie de flux tandis que le Magpix repose sur une technique d'imagerie CCD (« Charge Coupled Device »).



**Figure 15: A- le Magpix; B- le Luminex 200**

La détermination des hybridations positives se fait à partir de valeurs seuil délimitant les bruits de fond et les valeurs positives. La détermination du spoligotype de chaque souche suit les règles du spoligotypage classique (Kamerbeek *et al.*, 1997) et la détermination de la résistance à la RIF se fait par observation de la non hybridation d'une sonde sauvage

complémentaire de la région RRDR et/ou hybridation sur une sonde complémentaire de la région RRDR avec l'une des mutations les plus fréquentes associée à la résistance à la RIF.

e. **Le TB-SPRINT**(Gomgnimbou *et al.*, 2013)

Le **TB-SPRINT** est une évolution du test précédent (SpoligoRIF). Le TB-SPRINT reste sur le même principe de typer à la fois les souches par spoligotypage mais peut tester la sensibilité à deux antibiotiques de première ligne qui sont la RIF et l'INH. Deux autres cibles à amplifier ont été rajoutées, le gène *katG* et le promoteur du gène *inhA* qui sont les deux régions impliquées dans la majorité de la résistance à l'INH des souches *M. tuberculosis*. Une version « ULTRA » permettant la détection des résistances aux antibiotiques de deuxième ligne et à l'éthambutol est en développement (Klotoe *et al.* manuscrit en préparation).

## **I.7 EPIDEMIOLOGIE DE LA TB**

Plusieurs définitions de l'épidémiologie plus ou moins généralistes existent. Par exemple, l'épidémiologie est définie comme l'étude des facteurs influant sur la santé et les maladies des populations. Il s'agit d'une discipline qui se rapporte à la distribution, à la fréquence, à la gravité des états pathologiques, et à la recherche de facteurs de risque (Friis, 2010). Un autre point de vue définit l'épidémiologie comme étant une science quantitative étudiant le comportement des maladies à l'intérieur d'une population d'hôtes. Elle vise à l'interprétation de la distribution et des déterminants de l'infection à travers des mesures des paramètres de la maladie, et à la recherche des méthodes d'intervention les plus efficaces (Anderson, 1998). C'est cette dernière définition qui nous intéresse particulièrement dans notre étude qui se rapporte surtout sur l'épidémiologie de la TB.

L'épidémiologie de la TB a surtout aidé à comprendre les facteurs de risques associés à la TB. Une étude a par exemple trouvé que le faible niveau de scolarisation, la non possession de cuisine séparée et l'atteinte par le diabète sont les facteurs associés à la TB en Inde en 2006 (Shetty *et al.*, 2006). Une autre étude démontre que les mauvaises conditions de vie et de travail, la malnutrition, la co-infection avec le VIH-SIDA, l'abus d'alcool et de tabac, le diabète et la pollution de l'air sont associés à la transmission de la maladie (Lönnroth *et al.*, 2009). Une revue recensant une quarantaine de publications confirme que la multirésistance

aux antituberculeux est très fortement liée à un précédent traitement anti-TB (Faustini *et al.*, 2006).

Les études de transmission de la TB sont complexes. Les patients peuvent être infectés depuis longtemps et la TB peut rester à l'état latent et asymptomatique pendant plusieurs mois ou plusieurs années. Les patients ne peuvent donc pas situer exactement où et quand ils ont été infectés par le bacille de la TB. De ce fait, l'épidémiologie se contente d'essayer d'évaluer les risques mais ne peut pas confirmer avec certitude une chaîne de transmission de TB. Pour pallier ces limites, les scientifiques ont eu recours aux associations de différentes approches comme l'épidémiologie moléculaire, les analyses spatiales, les enquêtes autour des cas.

### **I.7.1 EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE DE LA TB**

Cette discipline est née du développement des outils moléculaires et génétiques de typage (Burgos et Pym, 2002). Il existe actuellement plusieurs types de méthode de génotypage pour le MTBC. Les plus utilisées ont été décrites dans le paragraphe I.3.3.2. Ces différentes méthodes de typage présentent différents niveaux de discrimination et de spécificité. Elles ont aussi été utilisées pour d'autres disciplines comme des études phylogénétiques ou phylogéographiques des souches *M. tuberculosis*.

#### **I.7.1.1 PRINCIPE DE L'EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE**

La reproduction du bacille tuberculeux est de type clonal, asexué et monoparental ; les souches donnent après division des souches strictement identiques sur le plan génétique, mises à part quelques variations liées aux taux de mutations (Sola *et al.*, 2000). Le typage moléculaire consiste à analyser et identifier des souches à partir de leurs matériels génétiques et de retracer l'histoire de ces souches clonales. L'importance de ces identifications est de pouvoir faire du suivi de transmission de souches entre des patients ou même à l'échelle d'une épidémie (Hunter, 1990). Ce sont ces identifications et suivis de transmission qui constituent l'épidémiologie moléculaire. Une chaîne de transmission de TB est donc constituée de patients portant les mêmes souches. L'ensemble des souches ayant le même génotype constituent ce qu'on appelle un « cluster » (grappe). Ces clusters sont constitués par au moins deux isolats avec des profils génétiques identiques ou très proches (Barnes *et al.*, 1997). Ces clusters permettent de faire des suivis de l'évolution statistique des cas associés à un génotype

donné, de faire des estimations sur la diversité des souches dans un territoire donné, d'évaluer le taux de transmission récente, de déterminer les spécificités géographiques de certaines souches mais aussi d'identifier des souches associées à des particularités comme la résistance aux antituberculeux ou encore d'autres facteurs de virulence.

Les mycobactéries font partie des bactéries les mieux caractérisées sur le plan génétique, en particulier *M. tuberculosis* qui a fait l'objet de très nombreux travaux génétiques et génomiques. Plusieurs séquences de génomes de plusieurs mycobactéries sont disponibles actuellement (Camus *et al.*, 2002; Cole *et al.*, 1998). Cela explique le nombre très élevé d'études d'épidémiologie moléculaire appliqué à la TB. Plusieurs bases de données sont disponibles en ligne actuellement fournissant des données WGS de plusieurs milliers de souches. Une des plus importantes nommée « PolyTB » contient les données de WGS de 1627 isolats recueillis dans plusieurs régions du monde (Coll *et al.*, 2014). Des milliers de SNPs, de délétions et d'insertions nucléotidiques par comparaison avec H37rv sont disponibles ainsi que les probables effets sur la protéine codée par le gène concerné par la modification dont particulièrement la résistance aux antituberculeux (Coll *et al.*, 2014). D'autres bases de données telles que GMTV (Chernyaeva *et al.*, 2014), The tbvar database (Joshi *et al.*, 2014), the *M. tuberculosis* Clinical Isolates Genetic Polymorphism Database (Bharti *et al.*, 2014) sont aussi disponibles. Une revue sortie en 2015 a démontré l'innovation apportée par le WGS et le NGS sur l'épidémiologie moléculaire de la TB dans le monde (Takiff et Feo, 2015).

#### I.7.1.2 EXEMPLES D'APPLICATION DE L'EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE POUR LA TB

L'épidémiologie moléculaire a permis de comprendre et d'élucider divers phénomènes importants dans la transmission de la TB :

La transmission récente est une notion faite pour désigner une ou des chaînes de transmission de TB localisées spatio-temporellement. Des isolats avec des génotypes identiques sont supposés provenir probablement d'une chaîne de transmission spatio-temporellement localisée alors que des isolats avec des profils génétiques uniques pourraient provenir soit d'une transmission récente mais de deux patients spatialement très éloignés, soit d'une réactivation de TB acquise depuis longtemps. L'épidémiologie dans ce domaine peut donc distinguer plus ou moins relativement ces cas de TB associés à une chaîne de

transmission récente et les cas de TB non associés à ces dernières. Ceci a une importance pour un programme de lutte contre la TB afin de localiser les cibles potentielles pour des dépistages actifs de cas de TB ou par l'identification des facteurs associés à l'épidémie. Ces méthodologies doivent cependant être associées à des données épidémiologiques, c'est-à-dire des données sur les lieux de travaux, les déplacements des patients, les liens entre les patients etc.... Des études ont montré que des patients avec des isolats de même génotype appartenaient à des chaînes de transmission récente en zone urbaine (Barnes *et al.*, 1997; Telenti *et al.*, 1997) tandis que des patients avec des isolats de même génotype n'appartenaient pas à des chaînes de transmission récente en zone rurale (Braden *et al.*, 1997).

Des transmissions nosocomiales de souches *M. tuberculosis* et d'autres mycobactéries MR et UR ont été identifiées dans plusieurs hôpitaux dans le monde entier (Agerton *et al.*, 1997; Basu *et al.*, 2007; Coronado *et al.*, 1993; Pearson *et al.*, 1992). Une de ces transmissions aux USA a été causée par l'intermédiaire d'un endoscope mal nettoyé et contaminé par une même souche multirésistante (Agerton *et al.*, 1997). Ces transmissions ont lieu entre patients en convalescence dans les hôpitaux mais aussi entre patients et agents de santé travaillant dans ces hôpitaux (Pearson *et al.*, 1992).

Dans les cas de TB récurrente, il est important de connaître la proportion de ceux correspondant à une réactivation endogène pour une meilleure prise en charge des patients. En effet, une rechute survient la plupart du temps après l'échec d'un traitement médicamenteux (Manabe et Bishai, 2000; Stead, 1967). La plupart du temps, cela confère une résistance ou une multirésistance des souches tuberculeuses. Cela est crucial pour pouvoir orienter et adapter le traitement du patient.

Une étude menée dans une prison à Antananarivo, la capitale de Madagascar, a pu déterminer que malgré l'existence de quelques cas de transmissions de TB confirmés dans cette prison, une grande part des cas de TB est due à la réactivation de TB latente (Rasolofo-Razanamparany *et al.*, 2000). Ceci démontre que la TB dans cette prison est due non seulement à des cas de transmission directe de souches entre les personnes incarcérés mais aussi à de mauvaises conditions de vie dans la prison favorisant la réactivation de TB latente. Une autre étude a démontré la facilité de la transmission de souches *M. tuberculosis* résistantes dans une prison publique (Chaves *et al.*, 1997).

D'autres études ont démontré l'association de certaines souches de *M. tuberculosis* avec des facteurs de virulence. Les souches présentant les spoligotypes Beijing, par exemple, ont été trouvées comme étant associées à une augmentation de la fréquence de multirésistance aux antituberculeux (Botelho *et al.*, 2014; Buu *et al.*, 2009; Hanekom *et al.*, 2011; Otlu *et al.*, 2009; Theus *et al.*, 2007; Wada *et al.*, 2009).

### I.7.1.3 UTILITE DE L'EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE

L'épidémiologie moléculaire permet de fournir une preuve de l'identité génotypique des souches transmises au cours des chaînes de transmission. Elle n'est pas soumise aux biais engendrés par la subjectivité des enquêtes entre patients et enquêteurs lors des méthodologies d'épidémiologie classique.

Les méthodes de typage moléculaire des souches tuberculeuses sont de plus en plus rapides et ne nécessitent pas forcément la culture des mycobactéries qui peut durer plusieurs semaines. La plupart de ces techniques est basée sur l'amplification d'une portion de l'ADN mycobactérien.

Toutefois, le génome en entier n'étant pas typé par les méthodes de génotypage classiques de MTBC le lien épidémiologique entre patient ayant les mêmes profils moléculaires n'est que potentiel (Pfyffer *et al.*, 1998). En effet, des souches s'avérant être éloignées phylogénétiquement peuvent avoir un même profil génotypique pour un même marqueur. Ce biais peut cependant être atténué par le choix de marqueurs génétiques plus discriminants ou par l'utilisation de plusieurs marqueurs simultanément (Filliol *et al.*, 2000).

### **I.7.2 ASSOCIATION EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE ET CLASSIQUE DE LA TB**

Pour pallier aux limites des méthodologies de détermination des chaînes de transmission de la TB prises individuellement, plusieurs approches méthodologiques peuvent être combinées. Ainsi beaucoup d'études associent l'épidémiologie moléculaire avec des méthodologies classiques utilisant des enquêtes directes auprès des patients (Alland *et al.*, 1994; Small *et al.*, 1994; Yeo *et al.*, 2006). Ces études ont pour concept de faire des investigations auprès des patients et/ou des contacts des patients afin de récolter les informations relatives à la TB. Le génotypage permet de faire le lien entre les souches, et les

informations permettent de confirmer les liens épidémiologiques. Ces types d'études ont beaucoup contribué à la compréhension des facteurs associés à la TB ou à sa transmission. Dans certains cas, c'est l'épidémiologie moléculaire qui suggère des chaînes de transmission retrouvées à l'enquête, dans d'autres cas, la suspicion de liens épidémiologiques au cours de l'enquête épidémiologique est confirmée par les résultats d'épidémiologie moléculaire. Cette fertilisation croisée est nécessaire pour améliorer les résultats.

Une première étude d'épidémiologie génomique a été menée aux Pays Bas, sur un clone circulant depuis 1993, le clone « Harlingen ». Cette étude a permis de mettre en évidence le peu de SNPs identifiées par WGS sur 3 souches connues comme étant épidémiologiquement liées. Elle a ensuite permis, sur la base de ces SNPs, de mieux mettre en évidence les liens épidémiologiques entre des souches clonales identifiées à partir du RFLPIS6110 et a pu mettre en évidence 5 chaînes de transmissions distinctes à partir de ces SNPs (Schurch *et al.*, 2010)

Une deuxième étude menée à Vancouver, au Canada par exemple, en utilisant les méthodes de traçage des contacts entre patients associés au typage avec les données du WGS, a pu démontrer que des souches identifiées auparavant comme clonales par les MIRU-VNTR et suspectées d'appartenir à une même chaîne de transmission de TB étaient plutôt composées de 2 lignées distinctes de souches (Gardy *et al.*, 2011). Cette étude a permis aussi de mieux préciser la vraie dynamique de transmission de la TB dans la zone d'étude, d'identifier l'ancêtre commun de ces souches ainsi que ce qui est dénommé « superspreader » qui est un patient hautement infectieux ayant transmis sa souche à plusieurs personnes (Gardy *et al.*, 2011).

### **I.7.3 LES METHODES EPIDEMIOLOGIQUES UTILISANT LE SIG**

La géographie de la santé, avec l'utilisation grandissante d'outils de statistique spatiale et l'utilisation des Systèmes d'Information Géographique (SIG), est une discipline qui se généralise pour identifier les zones à forte incidence de maladie. Cette approche permet de vérifier s'il existe des signatures spatiales particulières d'une maladie dans une zone donnée (Guernier, 2006) et peut également être utilisée pour identifier les zones favorables à une maladie (zones de contact entre hôte et vecteur par exemple) (Dale *et al.*, 1998) ou des facteurs liés à une maladie. Ainsi, on a pu démontrer le lien entre la déforestation et l'échinococcose (zoonose provoqué par un vers plat, l'échinocoque) (Craig *et al.*, 2000) ; le

lien entre la culture de cacao et la transmission de l'onchocercose (filariose cutanée due à *Onchocerca volvulus*) (Cadot *et al.*, 1999); la perturbation bioclimatique et le choléra (Reeves *et al.*, 1994) ou encore le paludisme et les résidences approchant les rizières (Dossou-Yovo *et al.*, 1998) constituent d'autres exemples. C'est avec ces méthodes que sont nées les notions de zones de transmission récente d'une maladie, de clusters spatiaux de cas de maladies ou encore de zones à risques de maladie qui sont des zones associées aux facteurs de risques mais qui ne présentent pas forcément des taux élevés de cas (Guernier, 2006).

Un cluster spatial peut se définir comme un groupement de cas de malades géographiquement proches, de taille et de concentration suffisante pour qu'il y ait peu de chances qu'il soit uniquement dû au hasard. Cet agrégat peut être référencé dans le temps pour détecter des pics épidémiques (Kulldorff et Nagarwalla, 1995).

Ces méthodes ont déjà été utilisées pour étudier la distribution spatiale de cas de TB humaine (Kistemann *et al.*, 2002; Moonan *et al.*, 2004; Munch *et al.*, 2003; Rakotosamimanana *et al.*, 2014; Randremanana *et al.*, 2009; Randremanana *et al.*, 2010). La méthodologie permet d'ajouter la dimension spatiale aux études épidémiologiques et aider ainsi les autorités compétentes à mieux cibler les zones prioritaires pour la lutte contre la TB. Ces méthodes ont pu par ailleurs, déterminer des zones à risques de transmission de TB qui n'ont pas pu être déterminées par les méthodes d'épidémiologie classique (Guernier, 2006). Des méthodes statistiques spatiales telles que le balayage spatial de Kulldorff (Kulldorff, 1997) ou l'analyse de l'autocorrélation spatiale de Moran (Moran, 1950) sont utilisées pour ces analyses spatiales.

Le logiciel SaTScan (Kulldorff, 2005) développé pour l'application de la méthode « spatial scan statistic » aux études épidémiologiques permet d'identifier les clusters spatiaux de cas d'une maladie sous l'hypothèse nulle ( $H_0$ ) que l'excès de cas observés dans une certaine zone géographique est uniquement dû au hasard. Un balayage de toute la zone d'étude est réalisé grâce à une fenêtre circulaire dont le diamètre varie de façon continue entre zéro et une valeur limite fixée par l'utilisateur. La fenêtre étant placée successivement au centroïde de chaque unité spatiale, la variation de taille de fenêtre permet d'inclure des unités spatiales voisines à plus ou moins longue distance, les agrégats pouvant donc apparaître à différentes échelles.

Ainsi on a pu déterminer des clusters spatiaux de cas de TB à Cape Town en Afrique du Sud (Munch *et al.*, 2003), en Gambie (Touray *et al.*, 2010), et au Portugal (Couceiro *et al.*, 2011). Une étude menée dans la capitale de Madagascar a pu démontrer que ces clusters spatiaux de cas de TB changeaient de place en l'espace d'une année (Randremanana *et al.*, 2009). Cela suggèrerait que les zones à risques de TB sont susceptibles de changer en peu de temps et qu'il s'avère nécessaire de faire des suivis périodiques de ces zones.

Ces méthodes ont également pu permettre de déterminer les facteurs associés à ces clusters spatiaux de cas de TB. Ainsi l'état de santé des patients et des facteurs socio-économiques ont été démontrés comme étant liés à la formation des clusters spatiaux de cas de TB à Antananarivo, Madagascar (Randremanana *et al.*, 2009).

#### **I.7.4 ASSOCIATION EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE ET SIG**

Très récemment, la méthode spatiale utilisant les SIG pour les analyses épidémiologiques de la TB a été associée aux méthodes de typage moléculaire pour des études de surveillance de la maladie. Cette association permet non seulement de localiser les zones d'agglomération de maladie mais a permis d'identifier avec plus de précision les zones de transmission active de BK. De telles études ont été menées aux USA (Moonan *et al.*, 2012), au Brésil (Ribeiro *et al.*, 2015), en Floride (Séraphin *et al.*, 2016), au Japon (Izumi *et al.*, 2015), au Pérou (Zelner *et al.*, 2015) ou en Australie (Gurjav *et al.*, 2015). Cette association révolutionne les études de suivi de la TB car elle permet le suivi de souches particulières telles que les souches MR ou UR (Zelner *et al.*, 2015) mais aussi de mieux cibler les zones prioritaires dans la lutte contre la TB. Ces études ont permis d'évaluer que les lieux d'activités des patients sont les lieux les plus probables de transmission de la TB au Japon (Izumi *et al.*, 2015) et que ces lieux de transmission de la TB ne sont pas forcément les lieux où on a le plus d'agglomération de cas de TB (Ribeiro *et al.*, 2015).

### **I.8 LA PHYLOGEOGRAPHIE ET LA CLASSIFICATION DES SOUCHES *M. TUBERCULOSIS***

La phylogéographie est l'étude des principes et processus qui gouvernent la distribution spatiale des lignées généalogiques, spécialement celle de niveau intra-spécifique (Avisé,

1998; Kidd et Ritchie, 2006). Les différents spoligotypes de souches tuberculeuses mondiales ont été classés selon leur zone d'isolement et/ou d'endémicité (Brudey *et al.*, 2006; Filliol *et al.*, 2002). Cependant, l'évolution grandissante des méthodes de typage moléculaire du MTBC a généré plusieurs classifications selon les marqueurs utilisés et selon les auteurs, généralement convergentes (tableau 5) (Gagneux et Small, 2007). Les différences de niveau de discrimination entre les différentes méthodes de typage ont généré des regroupements dans certaines cellules, comme pour la lignée 4 où au moins 4 profils de spoligotypes sont regroupés en une seule lignée dans d'autres classifications.

**Tableau 5: Les différentes classifications des souches *M. tuberculosis***  
\*Principal groupe génétique ; \*\*Sans classification (Gagneux et Small, 2007)

Auteur	Marqueur utilisé	Lignée 1	Lignée 2	Lignée 3	Lignée 4	Lignée 5	Lignée 6
(Sreevatsan <i>et al.</i> , 1997)	SNP	*PGG1	*PGG1	*PGG1	*PGG2 et *PGG3	*PGG1	*PGG1
(Baker <i>et al.</i> , 2004)	SNP	Lignée IV	Lignée I	Lignée III	Lignée II	**SC	**SC
(Gagneux et Small, 2007)	LSP	Indo-Oceanic	East Asian	East African-Indian	Euro-American	West African I	West African II
(Gutacker <i>et al.</i> , 2006)	SNP	Cluster I	Cluster II	Cluster Iia	Clusters III-VII	**SC	**SC
(Filliol <i>et al.</i> , 2006)	SNP	Cluster group 1	Cluster group 2	Cluster group 3a	Cluster group 3b-6b	**SC	**SC
(Brudey <i>et al.</i> , 2006)	CRISPR	EAI	Beijing	CAS	Haarlem, LAM, T, X	Africanum 2	Africanum 1
Régions géographiques associées		Afrique de l'Est, Asie du Sud-Est, Inde du Sud	Asie de l'Est, Russie, Afrique du Sud	Afrique de l'Est, Inde du Nord, Pakistan	Amériques, Europe, Afrique du Nord, Moyen orient	Ghana, Benin, Nigeria, Cameroun	Sénégal, Guinée Bissau, Gambie

Des bases de données mondiales répertoriant les souches de *M. tuberculosis* ont été créées dès 1999 et développées depuis. Une des plus utilisées nommée SITVITWEB (Demay *et al.*, 2012) contient actuellement 7105 spoligotypes provenant de 105 pays et correspondant à 58180 isolats de souches *M. tuberculosis*. Elle inclut également les profils MIRU-VNTR-12 marqueurs d'une partie des souches. Les spoligotypes sont répertoriés selon une numérotation conventionnelle appelée aussi Spoligo-International Type (SIT) ou Shared-type (ST) (Brudey *et al.*, 2006). La classification des spoligotypes a été faite selon observation des signatures de génotypes spécifiques associées à des régions géographiques précises (Filliol *et al.*, 2002; Filliol *et al.*, 2003). Les souches ont été classées en familles et en sous-familles selon ces

signatures (Dale *et al.*, 2001; Sola *et al.*, 2001). Actuellement, 10 familles de spoligotypes et 53 sous familles de *M. tuberculosis* ont été décrite dans la base de données en ligne. Les règles de classification sont décrites dans le tableau 6 (Brudey *et al.*, 2006; Demay *et al.*, 2012). La distribution des différentes lignées spoligotypes est représentée dans la figure 16.

Tableau 6: Les familles et sous familles de spoligotypes décrites dans SITVITWEB et leur règles d'identification

ST prototype	Sous-famille	Règles de détermination des spoligotypes															Code octal
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
181	AFRI1	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	7707777777671
331		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	77407760777071
438		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	77407777777071
ND		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	77477777777671
1	Beijing	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	00000000003771
482	BOV1	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	67677377777600
683		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	66407377777600
479		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	64001377777600
647		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	27773777377600
ND		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	67677777777600
592	Canettii	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	00000000101000
26	CAS1-Delhi	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	703777740003771
21		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	703377400001771
288		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	700377740003771
ND		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	703777740003771
48	EAI1-SOM	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	77777777413731
19		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	67777477413771
89		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	674000003413771
ND		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	67777477413771
11		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	47777777413071
139		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	77777774413771
236		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	//////////1413//11
591		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	77777757413771
1898		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	77777770003371
109		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	47777377413771
47	H1	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	77777774020771
2		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	00000004020771
50		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	7777777720771
127		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	77777477760771
451	T (H37Rv)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	5777777420771
20	LAM1	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	67777607760771
17		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	67737607760771
33		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	776177607760771
60		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	77777607760731
93		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	77737607760771
64		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	77777607560771
41		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	77777404760771
290		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	77777606760771
42		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	77777607760771
61		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	77777743760771
59		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	77777606060771
209		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	776017607760771
100	MANU1	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	7777777773771
54		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	77777777763771
1378		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	7777777770771
539	Microti	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	00000000000600
593	PINI1	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	07400003777600
637		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	0000000777600
ND		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	07400003777600
34	S	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	77637777760771
1737		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	777760017760771
53		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	77777777760771
280		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	//////////180//11
52		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	77777777760731
135		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	77777777760730
37		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	77737777760771
149		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	77700037760771
627		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	74173777760771
40		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	77777377760771
39		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	77777347760471
44		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	77777577760771
58		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	77777557760771
254		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	77760007760771
119		X1	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
137	■		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	77777677760601
92	■		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	70007677760771
405	ZERO	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	77777700000011

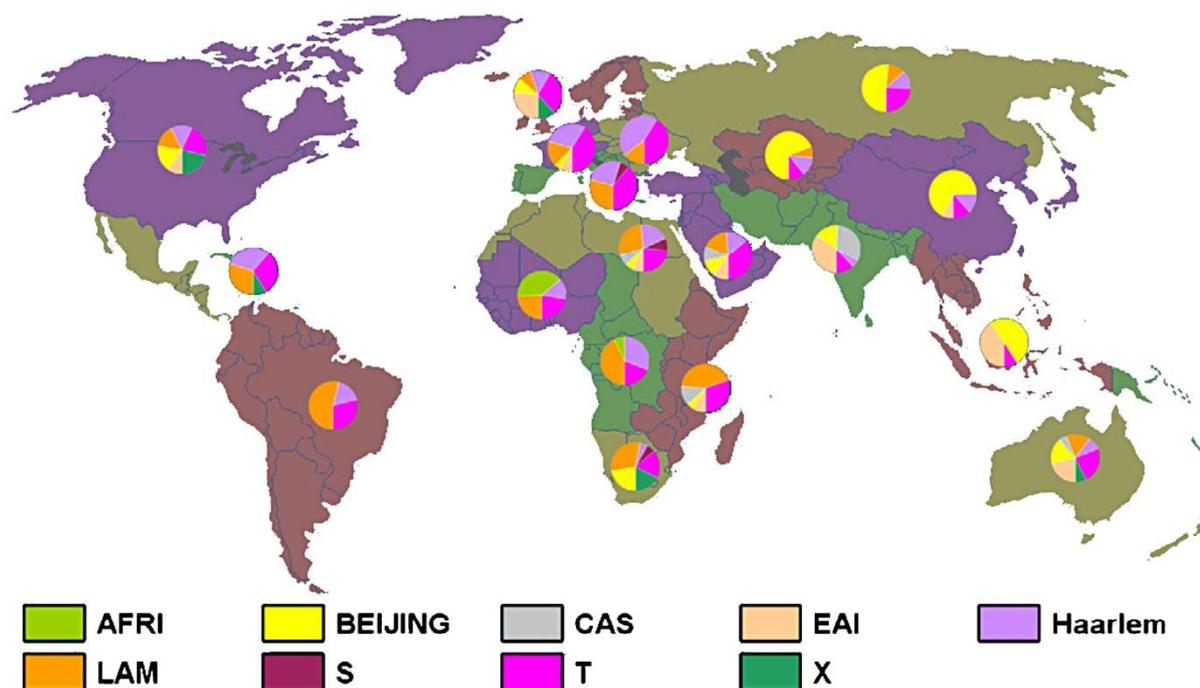


Figure 16: Distribution des lignées de spoligotype dans SITVITWEB (Demay *et al.*, 2012)

Une autre base de données en ligne, [www.miru-vntrplus.org](http://www.miru-vntrplus.org), permet de faire des analyses et des identifications similaires, à partir des profils MIRU-VNTR-24 marqueurs des souches *M. tuberculosis* (Allix-Béguec *et al.*, 2008).

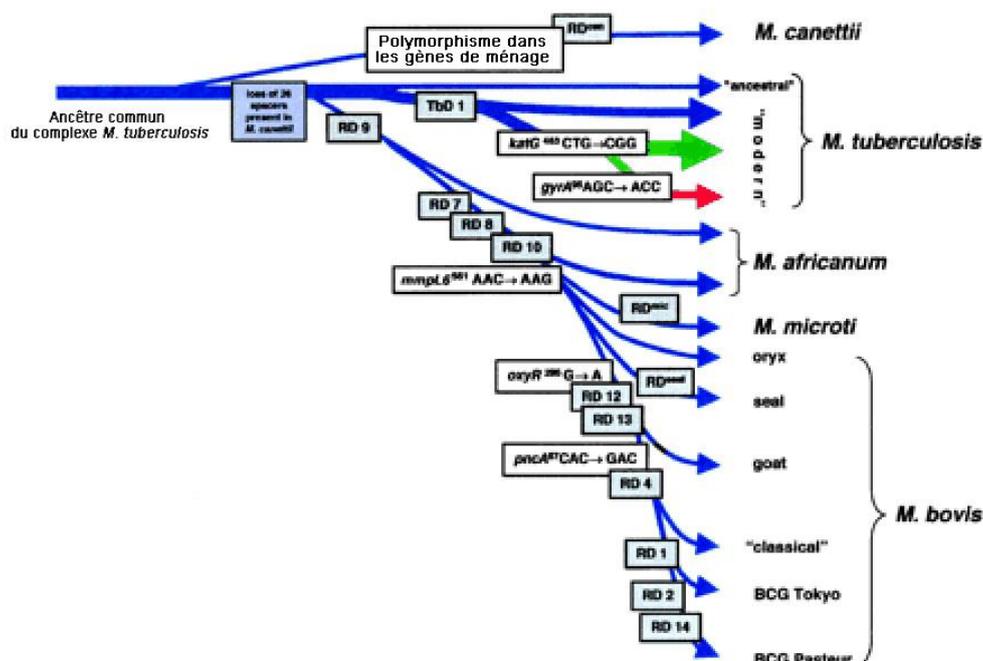
Des études ont démontré la circulation de souches particulières dans des zones précises. Le SIT109 est une souche endémique à Madagascar (Brudey *et al.*, 2006; Ferdinand *et al.*, 2005). Des études récentes ont suggéré que ces souches ont pu être importées en Arabie Saoudite par des malgaches lors des pèlerinages musulmans (Al-Hajoj *et al.*, 2007). D'autres souches de *M. tuberculosis* endémiques comme les souches portant la délétion DS6 ont été retrouvées au Québec, Canada (Nguyen *et al.*, 2004).

## **I.9 HISTOIRE EVOLUTIVE DES SOUCHES *M. TUBERCULOSIS***

A part les études d'épidémiologie moléculaire et de phylogéographie, les méthodes de génotypage servent aussi à faire des études de l'évolution de souches tuberculeuses.

Plusieurs scénarios de modèle d'évolution ont été proposés pour retracer l'histoire évolutive des souches du MTBC. Pour cela divers marqueurs moléculaires ont été utilisés.

La première étude, qui fait référence est celle de Brosch *et al.* en 2002 (figure 17). Le modèle a été élaboré à partir de 20 régions variables correspondant à des insertions et des délétions observées sur 100 souches de MTBC représentant 5 espèces (Brosch *et al.*, 2002).



**Figure 17: Modèle de schéma évolutif des espèces du MTBC selon Brosch *et al.* 2002**

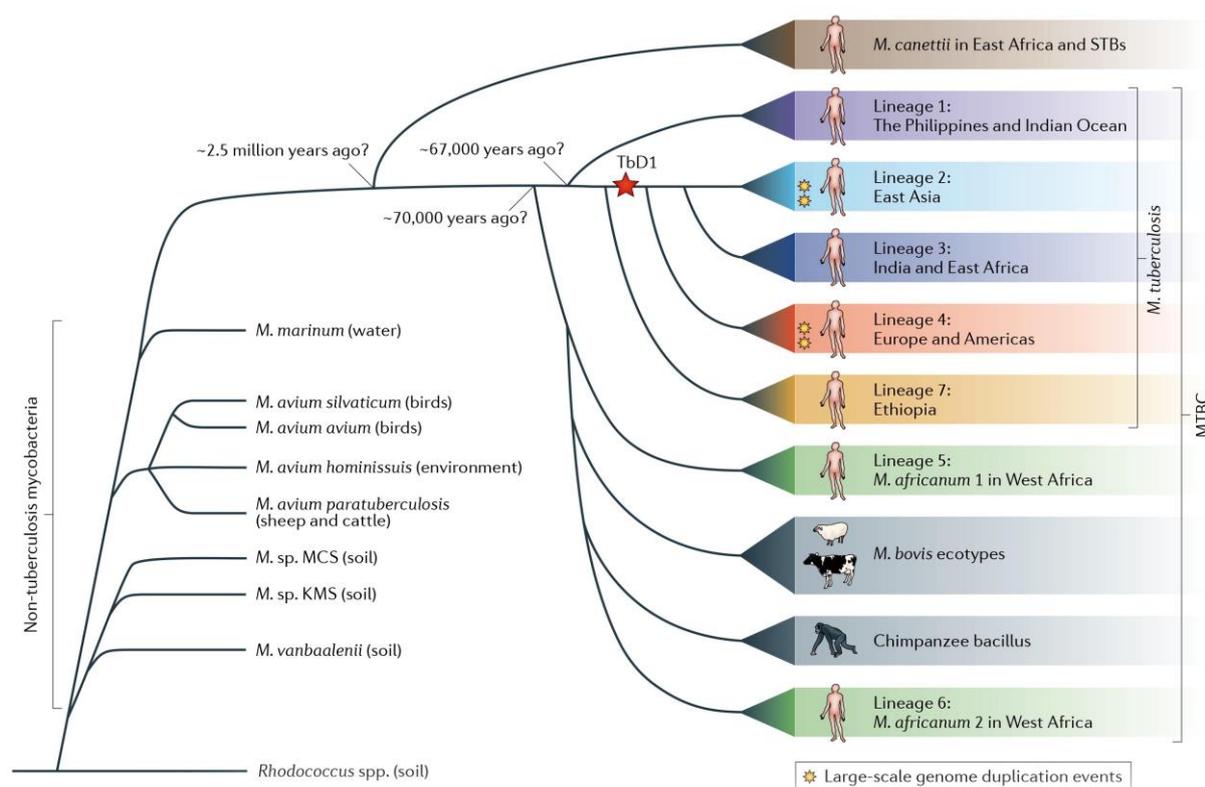
Schéma basé sur la présence ou l'absence de régions de délétion et de séquences polymorphes dans une sélection de 5 gènes. Les distances entre les branches ne correspondent pas à la phylogénie actuelle calculée par d'autres méthodes.

Le modèle d'évolution décrit que les souches *M. bovis* seraient apparues plus récemment que les souches *M. tuberculosis*. Ceci suggère que la TB humaine serait plus ancienne que la TB bovine (Brosch *et al.*, 2002). Le modèle décrit aussi la divergence des souches *M. tuberculosis* avec les 3 autres sous-espèces que sont *M. africanum*, *M. microti* et *M. bovis* par la délétion de la région RD9.

Parmi les souches de *M. tuberculosis*, la présence ou l'absence de la région TbD1 a permis de les classer soit dans une lignée ancienne (TbD1 présente) qui sont représentées par les souches avec la signature de spoligotypes « East African Indian » ou dans des lignées modernes (TbD1 absente) qui incluent tout le reste (Brosch *et al.*, 2002).

Une autre étude des souches du MTBC, analysant les spoligotypes, les profils MIRU-VNTR et des SNPs au niveau des gènes *katG* et *gyrA* montre que *M. tuberculosis* et des *M.*

*africanum* classés « type 1 » auraient eu un ancêtre commun et que *M. microti* et *M. bovis* dériveraient de *M. africanum* (Arnold, 2007). La revue de Galagan reprend les relations évolutives supposées entre les membres du complexe (non du genre) de *M. tuberculosis*, ainsi que les relations avec les autres mycobactéries (Figure 18) (Galagan, 2014).



**Figure 18: Relation évolutive entre les membres du CMTB et les autres espèces de mycobactéries**

Plusieurs études de datation phylogénétique ont été menées pour le genre *M. tuberculosis* pour estimer les périodes d'apparition, d'évolution ou de divergence des souches tuberculeuses (Kay *et al.*, 2015; Refrégier *et al.*, 2016). Cependant les méthodologies et les approches n'aboutissent pas à des résultats concordants. Le manque de souches bien datées ainsi que la calibration des méthodes de datations sont à la base de déficit dans ces études de datation (Bos *et al.*, 2014; Refrégier *et al.*, 2016; Wirth *et al.*, 2008).

## **I.10 LA TB A MADAGASCAR**

Madagascar est une île située au large de l'Océan Indien comptant 23 millions d'habitants en 2013 pour 590 000 km<sup>2</sup>. D'après les estimations de l'OMS en 2013, la prévalence de la TB à Madagascar était de 413 cas de TB pour 100 000 habitants. Les nouveaux cas se comptaient à 233 cas pour 100 000 habitants et 12 000 seraient décédés de la TB cette année (PNLT, 2013; WHO, 2014). La prévalence du VIH-SIDA à Madagascar est estimée à 0,37% en 2010 (RASA, 2012) le taux de co-infection VIH-SIDA parmi les cas de TB est estimé à 2% (WHO, 2014). Le taux de guérison des nouveaux cas diagnostiqués par la microscopie est à 82%. En 2013, le taux de TB-MR parmi les nouveaux cas est de 0,5% 100 000 et le taux parmi les cas ayant déjà été traités auparavant est de 3,9% (WHO, 2014).

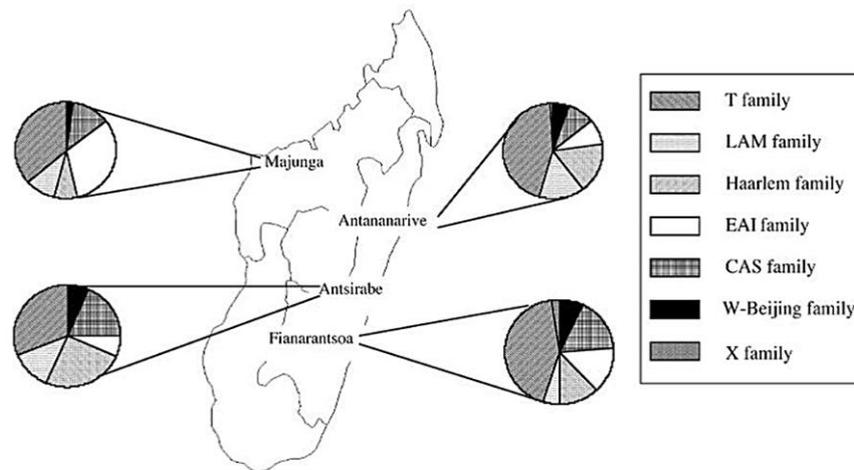
Antananarivo, la capitale de Madagascar compte plus de 1,1 millions d'habitants pour une superficie de 90 km<sup>2</sup>. La densité de population y est la plus élevée dans toute l'île (8687 habitants/km<sup>2</sup>). L'incidence de la TB pulmonaire dans la ville d'Antananarivo en 2004 serait la plus élevée de tout le pays avec 141 cas pour 100 000 personnes (données du Ministère de la Santé Malgache).

Le gouvernement malgache a mis en place en 1992 un nouveau Programme National de Lutte contre la TB (PNLT). Le but de ce plan est de fournir à tout acteur de la lutte contre la TB et aux différents partenaires, des stratégies efficaces, des objectifs clairs et des indicateurs pour le suivi et l'évaluation afin de faciliter la planification, la mise en oeuvre, la coordination, le suivi et l'évaluation des activités de la lutte contre la TB à tous les niveaux du système à Madagascar. Deux-cent vingt centres spécialisés dans le diagnostic et de traitement de la TB (CDT) sont dispersés dans toute l'île (PNLT, 2013).

Des études avec des souches représentatives de Madagascar datant de 1994 à 2000 ont montré une grande diversité des souches circulant dans le pays (tableau 7) ainsi que des spoligotypes spécifiques tels que le SIT109, les SIT1514 à SIT1525 (Ferdinand *et al.*, 2005; Rasolofo-Razanamparany *et al.*, 1994).

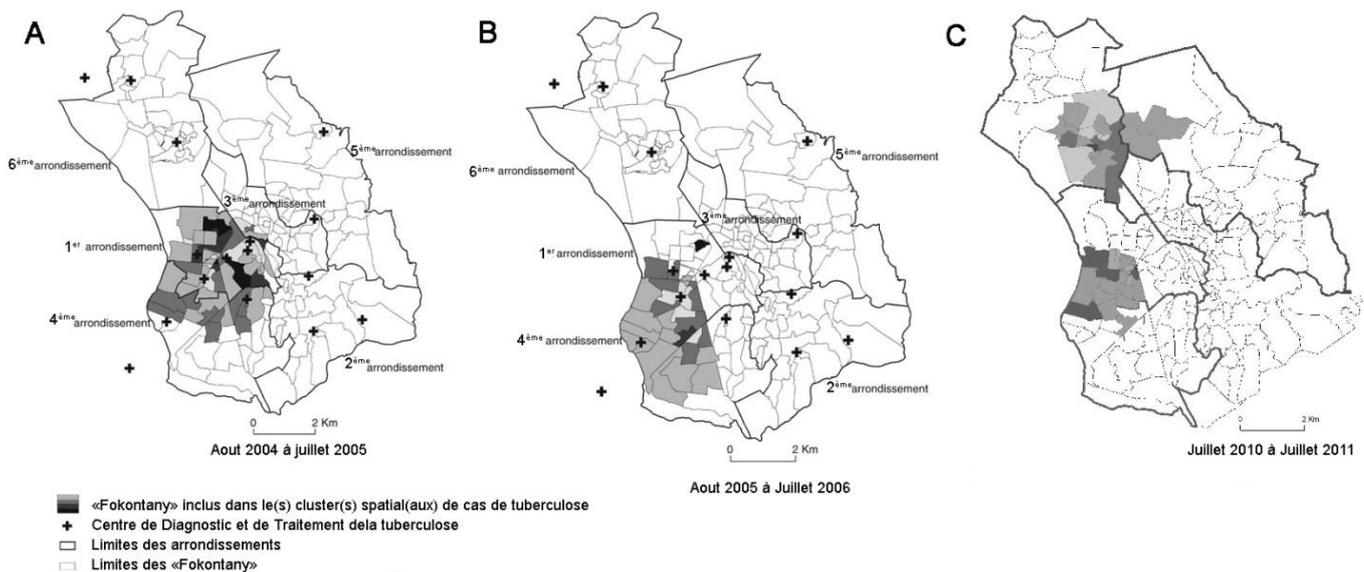


Cette même étude a montré la distribution des familles de spoligotypes circulant dans quatre grandes villes de Madagascar avec des associations significatives (Ferdinand *et al.*, 2005) (Figure 19).



**Figure 19: Description et distribution des principaux spoligotypes trouvés à Madagascar (Ferdinand *et al.*, 2005)**

Des études ont montré l'existence de clusters spatiaux de cas de TB dans la capitale de Madagascar (figure 20) (Rakotosamimanana *et al.*, 2014; Rendremanana *et al.*, 2009; Rendremanana *et al.*, 2010). Ces clusters spatiaux changent d'emplacement et de taille au cours du temps. De 2005 à 2006, l'unique cluster spatial de cas de TB s'étendant sur le 1<sup>er</sup> et le 4<sup>ème</sup> arrondissement d'Antananarivo, se déplaçait vers le sud et laissait place à un 2<sup>ème</sup> petit cluster dans le 1<sup>er</sup> arrondissement.



**Figure 20: Les clusters spatiaux de cas de TB à Antananarivo, de 2005 à 2011**

## II INTRODUCTION GENERALE

La TB, dont l'agent étiologique principal chez l'homme est *M. tuberculosis*, demeure actuellement la principale cause de décès dans le monde au même rang que le VIH-SIDA (WHO, 2015). Un quart de la population mondiale est estimé infecté par *M. tuberculosis* et le nombre de cas de TB ne cesse d'augmenter chaque année (WHO, 2015). D'après les estimations de l'OMS, la TB a tué 1,4 millions de personnes dont 400 000 VIH-positives en 2015 et 10,4 millions de personnes auraient contracté la TB (nouveaux cas) dont 12% de VIH-positives.

L'émergence des souches MR et UR, l'apparition des souches TDR, ainsi que la co-infection par le VIH/SIDA compliquent la lutte contre la TB. Quatre cent vingt mille cas de TB étaient estimés MR en 2014 dont 3,3% parmi les nouveaux cas de TB et 20% parmi les cas de TB déjà traités.

A Madagascar, pour environ 23 millions d'habitants en 2013, on compte environ 413 cas de TB pour 100000 habitants, 233 nouveaux cas de TB pour 100000 habitants et 12000 décès par la TB. La prévalence du VIH-SIDA est de 0,37% en 2010 (RASA, 2012) et le taux de coïnfection de TB-VIH SIDA est de 2% parmi les cas de TB. Le taux de TB-MR parmi les nouveaux cas est de 0,5% et le taux parmi les cas ayant déjà été traités auparavant est de 3,9% (WHO, 2015).

L'OMS recommande un régime composé de plusieurs antibiotiques dont la prise par le patient est directement observée (DOTS) pour le traitement de la TB. Selon l'état de sensibilité des souches tuberculeuses ou de l'état des patients, ce traitement peut varier. Une forte proportion des nouveaux cas de TB sensible aux antituberculeux sont guéri par ce traitement.

Des études utilisant des outils d'analyse spatiale intégrant le Système d'Information Géographique (SIG) ont démontré que les cas de TB étaient regroupés spatio-temporellement dans certains pays et certaines régions du monde (Kistemann *et al.*, 2002; Moonan *et al.*, 2004; Munch *et al.*, 2003) et aussi particulièrement à Antananarivo, la capitale de Madagascar (Rakotosamimanana *et al.*, 2014; Randremanana *et al.*, 2009; Randremanana *et al.*, 2010). Ces agrégations sont aussi connues sous l'appellation de clusters spatiaux de cas de TB. Ces

clusters spatiaux de cas de TB suggèrent que les zones touchées par ces fortes concentrations de cas de tuberculeux peuvent aussi être des zones à forte transmission de TB.

De son côté, l'épidémiologie moléculaire s'est révélée utile pour la surveillance de la TB. Le développement et l'essor d'outils de génotypage ont révolutionné ces types d'études mais aussi l'identification et la classification des souches tuberculeuses. Ces études ont démontré la grande diversité des souches de BK circulant dans le monde mais aussi la circulation de toutes les familles de souches existantes à Madagascar (Demay *et al.*, 2012; Ferdinand *et al.*, 2005; Rasolofo-Razanamparany *et al.*, 1994).

Des études associant analyses spatiales et génotypage ont aussi été menées pour identifier les zones de transmission active de la TB (Gurjav *et al.*, 2015; Izumi *et al.*, 2015; Moonan *et al.*, 2012; Ribeiro *et al.*, 2015; Séraphin *et al.*, 2016; Zelner *et al.*, 2015).

Par ailleurs, les outils de diagnostic de la TB et de la sensibilité aux antituberculeux ont beaucoup évolué en passant des techniques classiques (microscopie et culture) aux techniques moléculaires, beaucoup plus rapides et pratiques avec des sensibilités et spécificités appréciables.

Toutefois, malgré l'essor des outils en matière de lutte contre la TB, ainsi que l'existence d'une thérapie efficace, le nombre de cas de TB et le taux de mortalité par la TB demeure encore inacceptablement élevé surtout dans les pays en voie de développement comme Madagascar. Ceci est dû en partie à plusieurs facteurs :

- L'efficacité partielle du seul vaccin disponible actuellement contre la TB, le bacille de BCG (Bacille de Calmette et Guérin). Le vaccin peut prévenir des complications graves de la TB chez les enfants mais son efficacité dans la prévention de la TB pulmonaire chez les adultes est très controversée ;
- L'infection avec le VIH/SIDA favorise le développement de la TB. L'épidémie de VIH/SIDA a été à l'origine de la réémergence de la TB dans les années 80 dans les pays africains. De plus, l'existence d'interactions médicamenteuses entre le traitement utilisé contre les deux maladies, notamment entre la RIF et de nombreux rétroviraux complique le traitement des patients ;

- Le niveau de vie de la population et le manque d'accès aux soins favorisent le développement ainsi que la transmission des maladies infectieuses ;
- La non identification des souches circulantes dans certaines zones ne permet pas de déterminer le niveau de transmission des souches tuberculeuses et l'échelle à laquelle se font les transmissions de TB (entre voisins ou entre des personnes de résidence éloignées). Cela ne permet également pas l'identification des infections avec les souches reconnues relativement plus virulentes que d'autres telles que les souches avec les spoligotypes « Beijing » ainsi que les sources de transmission de la TB.
- L'inexistence ou la non performance des systèmes de surveillance de la TB qui ne permet pas d'identifier les zones clefs pour la lutte contre la TB. La surveillance de la TB dans la plupart des pays du monde repose encore actuellement sur des méthodes d'épidémiologie classique basée sur la récolte des données épidémiologique sur les patients. Ces méthodes sont lourdes, longues et sont biaisés par la subjectivité de réponses fournies pendant les enquêtes. Ce type de surveillance est efficace pour retrouver dans la majorité des cas, et en rétrospective, les facteurs liés à l'émergence de la maladie. Cependant, ces systèmes ne permettent pas de faire de ces méthodes des outils d'alerte à l'épidémie due à la lenteur de leur exécution. Elles ne permettent donc pas non plus de constituer des outils d'aide à la décision pour les priorités et les urgences en matière de lutte contre la TB.

Devant ces deux derniers facteurs non négligeables limitant la lutte contre la TB, la présente étude s'est proposé comme objectif principal : d'étudier la distribution et la dynamique de la TB ainsi que des BK au cours du temps et dans l'espace afin d'avoir un aperçu de l'état actuel de la TB dans le pays, du niveau de la transmission de la TB à Madagascar, du niveau d'évolution de la TB et des BK malgaches ainsi que l'identification les sources potentielles de la TB en commençant par la capitale.

Pour cela, différentes étapes et approches ont été faites :

1. Etudier la diversité génétique des souches circulant récemment à Madagascar. Cela implique d'identifier et de décrire les souches circulantes actuellement à Madagascar, d'avoir un aperçu de l'échelle globale de transmission des souches *M. tuberculosis* à Madagascar actuellement et d'identifier les origines potentielles de la TB à Madagascar.
2. Etudier la diversité d'une souche caractéristique et endémique de Madagascar, le SIT109. Cela permet d'estimer plus précisément l'échelle à laquelle se fait la transmission

de la TB au niveau d'une souche ainsi que le niveau et la vitesse d'évolution des souches tuberculeuses à Madagascar.

3. Développer un outil d'identification des zones à fort risque de transmission de la TB à Antananarivo, la capitale de Madagascar, en associant des méthodes d'analyse spatiale et des méthodes de géotypage. Cet outil pourrait servir de système de surveillance rapide, plus facile, plus accessible de la TB et un outil d'aide à la décision en matière de lutte contre la TB à Madagascar.

### III ETUDE 1 : DIVERSITE ET DISTRIBUTION DES SOUCHES *M. tuberculosis* CIRCULANT A MADAGASCAR

#### III.1 PRESENTATION DE L'ETUDE

Quelques études antérieures ont montré une grande diversité génétique des souches *M. tuberculosis* circulant à Madagascar en 1994 - 1995 (Ferdinand *et al.*, 2005; Rasolofo-Razanamparany *et al.*, 2001; Rasolofo-Razanamparany *et al.*, 1994). On y retrouve toutes les lignées présentes dans le monde avec une prédominance des deux lignées définies selon leur spoligotypes : T et EAI (Demay *et al.*, 2012). Mais aussi des inégalités dans la distribution géographique des différents génotypes de ces souches.

Toutefois ces études ont été faites sur un échantillon restreint de souches *M. tuberculosis* isolées seulement à partir de patients résidant dans 4 villes de Madagascar.

Par ailleurs, ces études ultérieures ont permis de suggérer que la majorité des souches avaient des similitudes génétiques avec les souches asiatiques. Il semblerait donc intéressant de voir si les souches circulant dans tout le pays possèdent ces mêmes caractéristiques ou s'il existe des variabilités selon les régions.

L'objectif principal de cette étude est de décrire la diversité des souches ayant circulé actuellement dans le pays, d'analyser leur distribution et d'essayer d'identifier l'origine de ces souches par comparaison des génotypes avec ceux des souches circulant dans les pays avoisinant ou en relation avec Madagascar.

Pour cela, plus d'un millier de souches *M. tuberculosis* isolées entre 2005 et 2007 dans 18 régions de Madagascar ont été typées par le spoligotypage. Les souches ont été classées selon leur famille respective. Des analyses statistiques et des comparaisons ont été faites pour essayer de décrire la dynamique de la TB à Madagascar et d'y identifier ses origines potentielles. Les détails de l'étude sont présentés dans les paragraphes qui suivent.

### **III.2 ARTICLE 1 (en préparation)**

## **Titre : La Distribution et la Diversité des Souches *M. tuberculosis* Décrit la Dynamique de la Tuberculose et Démontre les Origines Potentielles de la Maladie à Madagascar**

### **III.2.1 OBJECTIF**

L'objectif de l'étude est de décrire la distribution et la diversité des souches *M. tuberculosis* afin de décrire le mode de transmission de la TB et d'identifier les origines potentielles de la maladie à Madagascar.

### **III.2.2 MATERIELS ET METHODES**

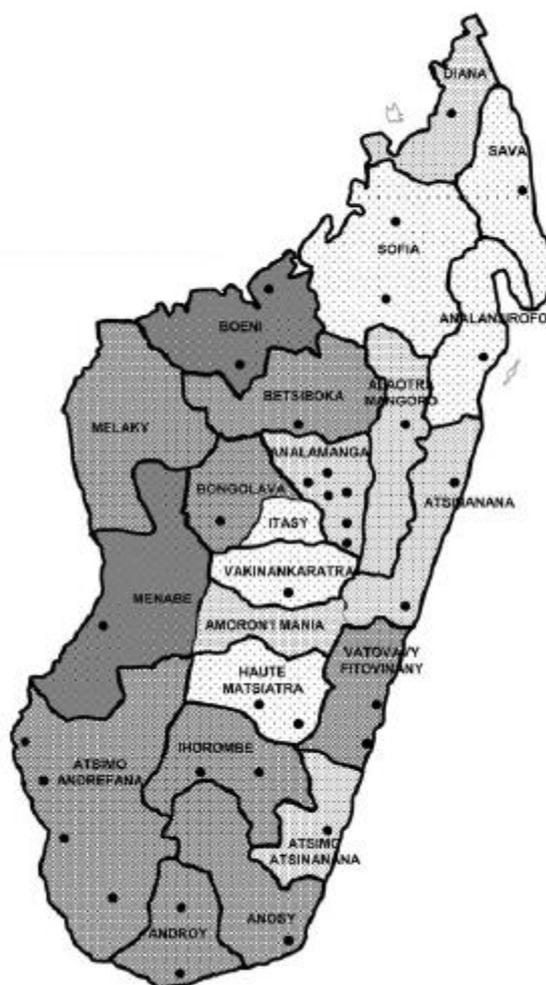
#### **III.2.2.1 DESCRIPTION DE LA ZONE D'ETUDE**

L'étude a été menée à Madagascar, la quatrième plus grande île au monde située au large de l'Océan Indien. Le pays compte 23 millions d'habitants en 2013 pour 590 000 km<sup>2</sup>. Madagascar est considéré comme un pays en voie de développement et est classé parmi les pays les plus pauvres au monde. Le pays est divisé en 22 régions regroupées en 6 provinces. Sa capitale qui est la Commune Urbaine d'Antananarivo (CUA ; 90km<sup>2</sup> ; 1,1 million d'habitants) se situe en plein centre, dans les Hauts Plateaux. La population y est la plus dense et on y retrouve le maximum d'activités commerciales et d'échanges inter-population. Il existe plus de 200 Centres de Diagnostic et de Traitement de la TB (CDT) répartis dans toute l'île qui traitent et prennent en charge la TB à Madagascar.

#### **III.2.2.2 ECHANTILLONNAGE**

L'échantillonnage est constitué des nouveaux cas de TB pulmonaires recrutés pendant la première investigation de surveillance de la résistance aux antituberculeux à Madagascar en 2005, 2006 et 2007 (Ramarokoto *et al.*, 2010b). Les prélèvements ont été faits dans 35 CDTs

répartis partout dans Madagascar et représentant 19 des 22 régions de l'île (Figure 21). L'échantillonnage s'est fait en grappe proportionnel. Trente patients remplissant les critères de sélection, pris au hasard par CDT (n=35) ont été inclus dans l'étude (total=1050). Les patients recrutés étaient ceux qui n'ont jamais reçu de traitement anti tuberculeux ou ceux ayant reçu le traitement en moins d'un mois. Pendant la période d'inclusion dans chaque CDT, les patients ayant déjà reçu un traitement avaient été recrutés pour la surveillance de la résistance acquise.



**Figure 21: Description de la zone d'étude et distribution des CDTs inclus dans l'étude**  
Les CDTs inclus dans l'étude sont représentés par des points sur la carte

Pour chaque patient inclus dans l'étude, deux prélèvements de crachat ont été récoltés, et mis en culture à l'Institut Pasteur de Madagascar. Les informations concernant le patient (âge, sexe, adresse de résidence, profession, antécédent de TB...) ont aussi été prises.

Les prélèvements biologiques ont été transportés depuis les CDTs concernés vers le Centre national de Référence des Mycobactéries (CNRM) à L'Institut Pasteur de Madagascar (IPM) dans des glacières isothermiques en respectant les chaînes de froid et en utilisant les moyens de transport les plus rapides (transport de 1 à 5 jours). Les échantillons ont été transportés sans ajout de réactifs de conservation.

### III.2.2.3 TRAITEMENT DES PRELEVEMENTS BIOLOGIQUES

Les crachats ont été décontaminés avec la méthode au Lauryl sulfate de sodium (Tison et Carbonnelle, 1972). Les crachats ont été ensuite mis en culture sur milieu solide de LJ et ont été incubés à 37°C pendant 4 à 12 semaines.

Les tests biochimiques d'identification ainsi que les antibiogrammes pour la sensibilité à la streptomycine, l'isoniazide la rifampicine et l'ethambutol a été faits comme décrit auparavant (Canetti *et al.*, 1963) pour tous les échantillons.

### III.2.2.4 DESACTIVATION DES SOUCHES ET EXTRACTION D'ADN

Les colonies obtenues après la culture ont été resuspendues dans du tampon TE1X (composition en annexe) et ont été désactivés à 95°C pendant 20 min.

L'ADN génomique a été extrait selon la méthode décrite par Van Embden (Van Embden *et al.*, 1993) et conservé à -30°C. Les extraits d'ADN ont été utilisés pour la première étude portant sur la surveillance de la résistance à Madagascar (Ramarakoto *et al.*, 2005). Seuls les ADN disponibles au moment de l'étude ont été inclus dans l'étude (n=1014 parmi les 1050). Le reste a été épuisé lors de la première étude.

### III.2.2.5 SPOLIGOTYPAGE

#### a) Amplification :

L'amplification utilise deux amorces complémentaires de la partie conservée de la région DR, Dra (5'-GGTTTTGGGTCTGACGAC-3') et Drb (5'-CCGAGAGGGGACGGAAAC-3'), dirigées vers l'extérieur, qui amplifient les séquences Inter-DR ou espaceurs (Figure 12 - A). L'amorce Dra est marquée à la biotine. La biotine se

lie à la streptavidine qui, couplée à la peroxydase, permet la détection des produits d'amplification après leur hybridation avec les sondes fixées sur la membrane. Pour l'amplification de chaque échantillon, 48 µl du mélange réactionnel a été préparé auquel ont été ajoutés 20 à 200ng d'ADN dans un microtube pour PCR. La composition du mélange réactionnel est récapitulée dans le tableau 8. Un échantillon par patient a été amplifié pour le spoligotypage.

**Tableau 8: Composition du mélange réactionnel pour l'amplification de la région DR pour le spoligotypage**

Solution	Concentration initiale	Concentration finale	Volume par tube (µl)
Tampon Tth	5X	1X	10
Dra	5pmol/µl		4
Drb	5pmol/µl		4
dNTP	10mM	0,2mM	1
MgCl <sub>2</sub>	50mM	7mM	7
Tth ADN polymerase	5U/µl	0,1	0,1
Eau distillée			21,9
ADN			2

Le mélange est ensuite inséré dans un thermocycleur (Labnet). Les cycles de température utilisés pour l'amplification sont récapitulés dans le tableau 9:

**Tableau 9: Cycle de température utilisé pour l'amplification de la région DR pour le spoligotypage**

Nombre de cycle	Temps en min.	Température en °C
1	3	96
30	1	96
	1	55
	5	72
1	10	72

### *b) Hybridation*

Pour chaque série d'hybridation, un témoin négatif fait avec de l'eau distillée et deux témoins positifs fait avec deux souches de référence avec des spoligotypes bien connus, H37rv et *M. bovis*, ont été utilisés avec les échantillons à typer (n=40). L'hybridation suit le protocole standard de Kamerbeek *et al.* (Kamerbeek *et al.*, 1997). La préparation de la membrane pour l'hybridation est présentée en annexe 1.

Pour chaque échantillon, vingt-cinq microlitres de produits de PCR ont été dilués dans 145 µl de tampon de 2XSSPE – 0,1% SDS. Les dilutions ainsi obtenues ont été chauffées à 100°C pendant 10 minutes dans un bain marie bouillant, afin de séparer les dimères de produits de PCR puis refroidies brutalement dans de la glace et déposées sur la membrane préalablement lavée dans 2 bains successifs (5 min par bain) de 2XSSPE – 0,1 % SDS à 60°C et mise en place dans le blotter (figure 12 – page 22). Une fois les produits de PCR en contact avec la membrane, celle-ci a été incubée à 60°C pendant 3h pour l'hybridation. Au terme de cette phase, le reste des produits de PCR a été aspiré et la membrane rincée dans 2 bains successifs (5 min par bain) de 2XSSPE – 0,5 % SDS à 60°C sous agitation. Afin de pouvoir détecter la présence de produits de PCR fixés à la membrane, 14 µl d'une solution de 2XSSPE – 0,5% SDS contenant 3 µl de streptavidine peroxydase ont été préparés et incubés à 42°C avec la membrane pendant environ 1 heure. La streptavidineperoxydase se liant aux fonctions amine des produits de PCR permet de révéler la présence de produits d'amplification après interaction de la peroxydase avec de l'ECL (Enhanced Chemo-Luminescence Detection kit ; Amersham). La chimioluminescence générée est détectée par exposition d'Hyperfilms ECL (Amersham) avec la membrane à température ambiante pendant 15 à 30 min. et la révélation du film obtenu a été faite par des produits standards de photographie (révélateur, fixateur, KODAK).

### *c) Saisie des résultats et création d'une base de données*

Les spoligotypes obtenus ont été saisis sous format binaire dans Microsoft Excel (un spoligotype = une série de 43 caractères). Les espaceurs présents sont identifiés par un caractère alphabétique « n » et les espaceurs absents par « o ». Les informations concernant chaque patient ont été intégrées dans la base de données. L'identité des patients a été codée pour la confidentialité de données obtenues.

d) Identification des ST, des lignées et des sous lignées des souches

Les SIT, les lignées et les sous lignées des souches ont été identifiés à partir de la plateforme en ligne SITVITWEB (Demay *et al.*, 2012). Les différentes régions du monde où on a pu identifier les SIT ont été récoltées dans la base de données en ligne SITVITWEB. Pour les profils non reconnus dans la base de données de SITVITWEB, une numérotation arbitraire a été attribuée pour chaque spoligotype (NC, NC2, NC3...). La lignée et la sous lignée d'appartenance de ces dernières ont été identifiées selon les règles établies par Demay *et al.* (Demay *et al.*, 2012) dans le tableau 6.

Les souches ayant les mêmes profils constituent ce qu'on appelle un « cluster génotypique ».

#### III.2.2.6 ANALYSE

La distribution des lignées par province a été comparée. Les tests statistiques de comparaison utilisés sont le test Chi<sup>2</sup> et le test de Fischer.

La distribution des lignées majoritaires entre Antananarivo et les provinces a aussi été comparée.

L'identification des pays où on a pu identifier les même ST (pour seulement ceux qui ont plus de 4 souches dans un même cluster génotypique) dans le monde entier a été faite à partir de la base de données en ligne SITVITWEB.

Les tests ont été faits avec le logiciel GraphPADPrism version 6. Pour toutes les comparaisons statistiques, une valeur de  $p$  inférieure à 0,05 est considérée comme significative.

#### III.2.2.7 CARTOGRAPHIE

La carte de distribution des génotypes des souches a été faite sur le logiciel QuantumGis 2.8 ® (QGIS Development Team, 2013).

### III.2.3 RESULTATS

#### III.2.3.1 DESCRIPTION DES PATIENTS

Parmi les 1050 ADN des 1050 patients recrutés lors de la surveillance de la résistance à Madagascar, seulement 1014 étaient disponibles pour le typage pour cette seconde étude. Les 36 autres extraits d'ADN ont été épuisés lors de cette première étude.

Parmi les 1014 patients inclus dans l'étude, 397 étaient des femmes, 598 étaient des hommes et 19 n'avaient pas d'informations disponibles. La stratification par âge est décrite dans le tableau 10.

**Tableau 10 : Stratification par âge des patients inclus dans l'étude**

Tranche d'âge	Nombre des cas
10 à 19	82
20 à 29	255
30 à 39	271
40 à 49	221
50 à 59	112
60 à 69	43
70 et plus	12
ND	18
<b>Total général</b>	<b>1014</b>

La répartition des patients par région de provenance est récapitulée dans le tableau 11.

**Tableau 11: Répartition des 1014 patients dans les 19 régions de Madagascar**

Région	nombre	Région (suite)	nombre
ALAO TRA MANGORO	25	BONGOLAVA	21
ANALAMANGA	219	DIANA	30
ANALANJIROFO	34	HAUTE MAHATSIATRA	64
ANDROY	65	IHOROMBE	50
ANOSY	18	MENABE	28
ATSIMO ANDREFANA	127	SAVA	33
ATSIMO ATSINANANA	30	SOFIA	49
ATSINANANA	66	VAKINANKARATRA	31
BETSIBOKA	22	VATOVAVY FITOVINANY	50
BOENY	52		

### III.2.3.2 SPOLIGOTYPAGE

Mille onze ADN ont pu être typés. Le typage a généré 217 spoligotypes dont 126 profils uniques et 91 clusters génotypiques de 2 à 271 souches (formés de 885 souches). Le taux de clusterisation génotypique est de :  $(885/1011)*100 = \underline{87,5\%}$ . Les SIT les plus fréquents sont : le SIT109 (271 ; 26,81% de toutes les souches), Le SIT 21 (82 ; 8,11% de toutes les souches), le SIT 1 (43 ; 4,25% de toutes les souches), le SIT 53 (39 ; 3,85% de toutes les souches) et le SIT 86 (35 ; 3,46% de toutes les souches) (Tableau 12). La totalité de ces 5 souches forment à elles seules 46,5% de toutes les souches. Les 35 spoligotypes les plus répétés sont répertoriés dans le tableau 12 ainsi que les régions dans le monde où on retrouve des souches portant ces spoligotypes.

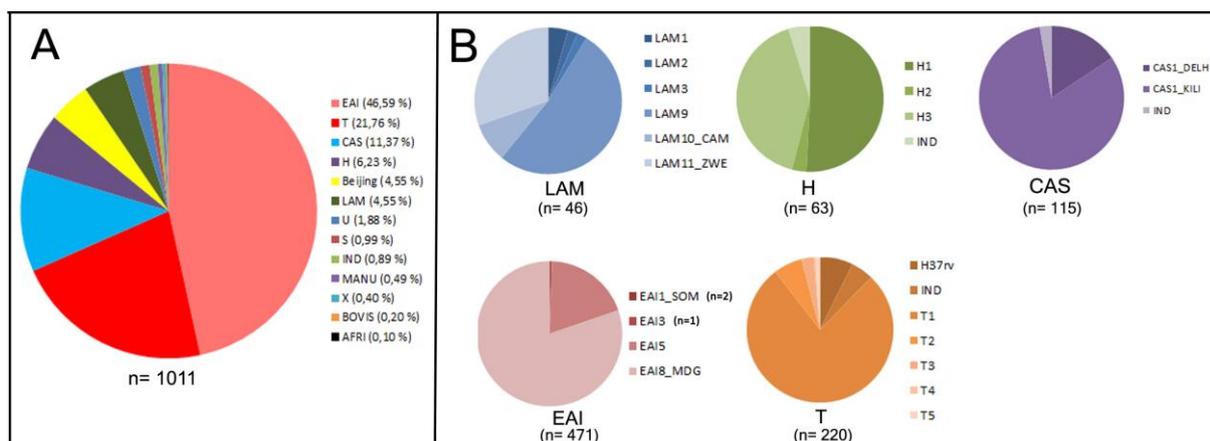




### III.2.3.3 DISTRIBUTION DES LIGNEES ET SOUS LIGNEES OBTENUES

Les lignées et sous lignées des souches ont été définies via la base de données en ligne SITVITWEB. Pour celles qui n’y sont pas présentes, les attributions se sont faites selon les règles établis par Demay *et al.* (Demay *et al.*, 2012).

La distribution des lignées montre la circulation à Madagascar des lignées principales existantes dans le monde. Une prédominance des souches de la lignée EAI (n=471 ; 46,6%) suivies des souches de la lignée T (Tuscan, n=220 ; 21,7%) a été observée. Les autres souches présentes sont : les souches de la lignée CAS (Central Asian, n=115 ; 11,4%), les souches H (Haarlem, n=63 ; 6,2%), les souches LAM (Latino American, n=46 ; 4,5%), les souches Beijing (n=46 ; 4,5%), les souches U (n=19 ; 1,9%), les souches S (n=10 ; 1%) et le reste des souches de la lignée Manu, X ainsi que d’autres mycobactéries du CMTB comme *M. bovis* (n=2) et *M. africanum* (n=1)(figure 22).



**Figure 22: Distribution des lignées et des sous-lignées de spoligotypes obtenus**

A : Distribution des lignées de toutes les souches. B : Distribution des sous lignées à l’intérieur des sous lignées. Seules les 5 lignées représentées par différents sous lignées (LAM, H, EAI, CAS et T) ont été mis sur la figure B, les autres lignées (Beijing, U, S, X, MANU) n’avaient qu’un seul sous lignée les représentants et n’ont donc pas besoin d’être détaillée. LAM= Latino American; EAI = East african Indian ; T = Tuscan ; CAS = Central asian ; H = Haarlem ; Afri = Africanum ; IND = indéfini  
BOVIS= *Mycobacterium bovis* ; AFRI= *Mycobacterium africanum*

La distribution des lignées de spoligotypes entre les 6 provinces de Madagascar (figure 23) montre une prédominance des souches EAI dans les provinces suivie des souches T tandis que dans la capitale (Antananarivo), ce sont les souches T qui prédominent suivies des

souches EAI. Toutes les autres lignées semblent être représentées dans tous les provinces de Madagascar avec des proportions plus ou moins égales.

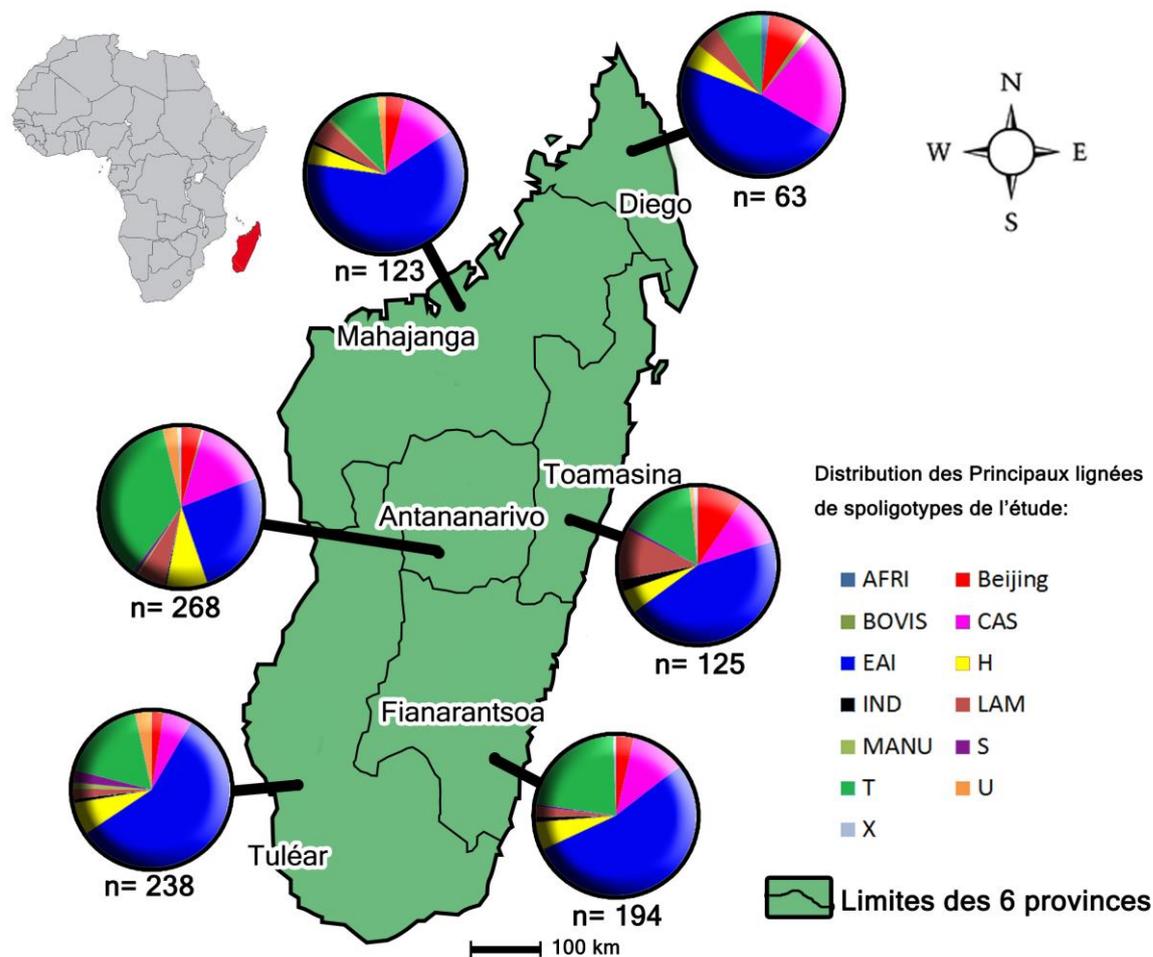


Figure 23: Distribution des lignées de spoligotypes dans les 6 provinces de Madagascar

### III.2.3.4 COMPARAISON STATISTIQUE

La distribution des lignées entre les différentes provinces a été comparée (tableau 13). Les tests statistiques montrent une différence significative entre la distribution des différentes lignées entre les 6 provinces de Madagascar ( $p < 0,0001$ ).

**Tableau 13: Comparaison de la distribution des différentes lignées de spoligotypes entre les 6 provinces de Madagascar**

Province	AFRI	Beijing	BOVIS	CAS	EAI	H	IND	LAM	MANU	S	T	U	X
Antananarivo		11	1	39	69	22	1	15	1	2	97	8	2
Diego	1	5	1	14	30	3		3			6		
Fianarantsoa		7		21	104	11	2	4		1	43		1
Mahajanga		5		14	76	5	1	6	1		13	2	
Toamasina		12		13	56	6	3	13		1	19	1	1
Tulear		6		14	136	16	2	5	3	6	42	8	

$p$  value < 0,0001

Les distributions des EAI et des souches T entre la capitale et les provinces ont aussi été comparées (Tableau 14 et 15). La comparaison des souches EAI montre une différence significative ( $p < 0,0001$ ). La comparaison des souches T montrent également une différence significative ( $p < 0,0001$ ).

**Tableau 14: Comparaison de la distribution des souches EAI et des non EAI entre Antananarivo et les autres provinces**

	EAI	Non EAI
Antananarivo	69	199
Les autres provinces	402	341

$p < 0,0001$

**Tableau 15: Comparaison de la distribution des souches T et des non T entre Antananarivo et les autres provinces**

	T	non T
Antananarivo	97	171
Les autres provinces	123	620

$p < 0,0001$

### III.2.4 DISCUSSION

L'objectif principal de l'étude était d'étudier la distribution et la diversité des souches *M. tuberculosis* à Madagascar afin d'avoir une idée du mode de transmission de la TB dans l'île et d'essayer d'identifier les sources potentielles de la TB.

Les résultats nous ont montré que la TB existe dans toutes les provinces et régions de l'île. Les tests statistiques de comparaison du taux d'incidence et de prévalence de la TB entre les différentes provinces n'ont pas été faits car notre échantillonnage n'a pas pris en compte la proportion entre les populations des différentes provinces. L'analyse des génotypes démontrant des clusters génétiques très grands (jusqu'à 271 souches) suggère une transmission assez récente de la TB dans l'île et appuie cette hypothèse de la transmission à grande échelle de la TB à Madagascar. Avec le niveau de discrimination du spoligotypage, on ne peut savoir avec précision si ces souches appartiennent vraiment à des chaînes récentes de transmission de la TB et on ne peut pas, de ce fait, calculer le taux de transmission récente. On sait actuellement que ce taux est largement surestimé en utilisant seul le spoligotypage. Cependant, il est certain que ces souches appartiennent toutes à une même descendance et pourraient provenir de la transmission d'une seule souche depuis longtemps. L'analyse via des marqueurs génétiques plus discriminants tels que les VNTR permettrait d'avoir plus de précision dans ce genre d'analyse.

Les résultats nous ont aussi montré que toutes les lignées principales existantes dans le monde circulent à Madagascar avec des proportions plus ou moins différentes dans les différentes provinces. Cela signifie que des échanges de souches se sont faits entre Madagascar et toutes les régions du monde. Sachant que Madagascar peut servir d'escale pour une grande majorité des voyages dans l'Océan Indien, le fort taux d'échange inter-humains dans l'île pourrait expliquer en partie cette grande diversité des souches circulant à Madagascar.

Plusieurs souches sont aussi en commun entre Madagascar et l'Arabie Saoudite (SIT109, SIT126, SIT10, SIT8, SIT1881, SIT21, SIT26, SIT25, SIT53, SIT451, SIT78, SIT52, SIT42, SIT50, SIT47, SIT1). Un flux d'échange de souches pendant les périodes de pèlerinage pourrait expliquer en partie cette similitude. Une ancienne étude sur la caractérisation des souches dans ce pays a aussi suggéré une exportation des souches malgaches dans ce pays (Al-Hajoj *et al.*, 2007).

La souche SIT109 est une souche endémique malgache (Brudey *et al.*, 2004 ; Ferdinand *et al.*, 2005). La présence de cette souche au Pays Bas, au Danemark, en Inde et en Grèce témoigne de l'exportation de ces souches dans ces pays. Cependant, beaucoup d'autres souches sont partagées avec les Pays Bas et le Danemark. Cela suggèrerait des échanges plus fréquents de TB entre ces pays et Madagascar et l'identification de quelques origines potentielles et récentes d'une part de la TB malgache.

La prédominance des souches EAI, qui sont des souches majoritairement asiatiques (Inde/Thaïland/Malaisie/Indonésie) surtout dans les provinces côtières pourrait s'expliquer par le nombre élevé d'asiatiques dans les provinces côtières de Madagascar. On peut émettre l'hypothèse que ces souches ont été importées d'Asie, mais ont ensuite été transmises massivement dans le territoire malgache. Pour savoir si cette importation est assez récente ou éloignée dans le temps, des analyses par les SNPs ainsi que des études de datation sont indispensables. La similitude des génotypes (SNPs) avec les pays concernés dans ce cas suggèrerait que ces souches ont été importées récemment tandis qu'une plus grande différence suggèrerait une plus ancienne importation de ces souches via ces pays.

La prédominance des souches T à Antananarivo suggère une importation plus importante de ces souches dans la capitale. C'est-à-dire que ce sont les échanges avec les européens et les africains qui favoriseraient la forte proportion de souches T dans la capitale. Cependant, une forte transmission non contrôlée de ces souches dans la capitale pourrait aussi expliquer cette disproportion des souches T.

On sait que la population malgache est constituée principalement de mélange d'africains bantous et d'indonésiens (Tofanelli *et al.*, 2009), des populations associées respectivement avec les souches T et les souches EAI. Le taux élevé de souches T et EAI à Madagascar suggère ainsi que la structuration des souches TB qui circulent actuellement a été apportée par les anciennes populations colonisatrices et pionnières au fil des siècles et/ou par des échanges récents vu que ce sont des régions avoisinant géographiquement Madagascar. Cependant Madagascar et l'Indonésie ne partagent aucune souche (zéro spoligotype en commun) des lignées EAI, ce qui est en contradiction avec l'hypothèse de l'importation ancienne ou récente de la TB via l'Indonésie.

Selon le schéma évolutif des souches *M. tuberculosis* du point de vue de la région DR, seule les délétions d'espaces sont possibles. En regardant le spoligotype de la souche

typique de Madagascar, le SIT109, le plus plausible est de dire que son ancêtre le plus proche est le SIT126 par délétion de l'espaceur numéro 19. Ce SIT ne circule pas non plus en Indonésie mais en Inde. Cela suggère que cette souche mère de la majorité des souches malgaches (plus de 45%) ne provient pas d'Indonésie et donc ne peut avoir été apportée par les Indonésiens colonisant Madagascar au second siècle de notre ère.

On sait que les souches EAI8 sont des souches endémiques malgaches. Ces souches constituent plus de 45% des souches circulantes. Ces souches proviendraient forcément de l'évolution d'une seule souche EAI circulant antérieurement à Madagascar même. La distribution de ces souches dans toutes les provinces témoigne donc de la transmission à très grande échelle spatiale de la TB à Madagascar. La distribution phylogéographique des souches *M. tuberculosis* dans le monde est dite associée avec les populations hôtes (Gagneux et Small, 2007). Cela s'explique par la transmission de la TB spatio-temporellement rapprochée et expliquerait l'endémicité des souches EAI8 à Madagascar.

La comparaison des proportions des souches avec l'étude de Ferdinand *et al.* (2005) montre une similarité de la distribution des souches (forte proportion de EAI et de T). Cela démontre une transmission plus ou moins homogène de la TB dans le Pays.

Les souches Beijing sont réputées être les plus virulentes et les plus transmissibles (Botelho *et al.*, 2014; Hanekom *et al.*, 2011; Otlu *et al.*, 2009). La distribution des souches montre que les souches Beijing sont les troisièmes à être plus nombreuses dans le pays mais encore loin derrière les souches EAI. Cette contradiction remet en cause la transmissibilité des souches Beijing à côté des souches EAI réputées être les moins transmissibles. Cela pourrait aussi s'expliquer par des facteurs écologiques plus importants que les facteurs génétiques qui ont favorisé une transmission non contrôlée et plus importante des souches EAI dans l'île.

Cette étude constitue la première qui décrit la distribution des souches *M. tuberculosis* circulant à Madagascar. Malgré le niveau de discrimination relativement faible du spoligotypage utilisé, cette méthode permet une classification reconnue des souches *M. tuberculosis* dans le monde, une classification en concordance avec toutes les autres classifications faites avec les autres marqueurs génétiques. Cette limite n'a donc pas d'impact sur les objectifs de cette étude. Le spoligotypage a un rapport qualité prix raisonnable et les résultats générés ont une très bonne reproductibilité et peuvent bien se comparer entre différents laboratoires.

Cette étude est cependant limitée par l'utilisation d'un seul marqueur génétique pour le typage des souches, du manque de données écologiques pour pouvoir identifier les facteurs associés à la distribution des souches et finalement la représentation non exhaustive de toutes les régions de Madagascar.

### **III.3 CONCLUSION DE L'ETUDE 1**

Cette étude nous a permis de démontrer la grande diversité des souches *M. tuberculosis* circulant à Madagascar. Toutes les lignées de spoligotypes circulant dans le monde y sont présentes avec une prédominance des souches T et des souches EAI. L'importation de la TB à Madagascar est suggérée provenir de tous les pays du monde entier. Des importations de souches peuvent être faites depuis la colonisation de l'île mais des importations plus récentes semblent être plus importantes. Ces importations ont été suivies de l'évolution des souches et la transmission de la TB partout dans l'île à très grande échelle. La TB continue à se transmettre d'une façon plutôt homogène. Quelques pays en particuliers tels que les Etats Unis, la France, l'Italie, le Pays Bas, l'Inde le Danemark et l'Arabie Saoudite semblent échanger plus de souches *M. tuberculosis* que d'autres avec Madagascar et pourraient être suggérés comme des sources potentielles récentes ou anciennes de cas de TB malgache.

Ce premier volet nous a permis de réponse partiellement aux questions :

D'où et comment se transmet la TB à Madagascar ? La TB semble ne pas avoir de préférence car toutes les zones malgaches sans exception sont touchées par elle. La circulation de la TB est encore d'actualité dans le pays. Des points comme la distribution de la prévalence de la TB dans chaque zone semblent être pertinents à approfondir, mais ce qui nous intéresse surtout c'est que toutes les régions de Madagascar sont des zones à risque de TB. Comme dans la plupart des pays en voie de développement dans le monde, la TB est en recrudescence. Le niveau de vie relativement précaire a été démontré être associé à la recrudescence et la transmission de la TB.

Comment est le niveau de la transmission de la TB à Madagascar ? On a pu voir que la transmission peut se faire entre patients résidant dans des zones très éloignées de Madagascar.

Ces réponses nous ont apporté généralement des éclaircissements sur le mode de transmission de la TB à Madagascar. Malgré que cette étape soit obligatoire pour pouvoir

faire des investigations plus précises, cela n'apporte pas cependant des informations plus utiles pour pouvoir cibler la lutte contre la TB à Madagascar.

Cela nous incite à poser la question suivante : Comment se fait la transmission au niveau d'un type de souche ? Pour répondre à cela, nous avons mené une seconde étude avec des souches du spoligotype endémique de Madagascar, le SIT109.

---

## **IV ETUDE 2 : DISTRIBUTION, DIVERSITE ET TRANSMISSION DE LA SOUCHE *M. tuberculosis* ENDEMIQUE MALGACHE : LE SIT109 (Article 2)**

### **IV.1 PRESENTATION DE L'ETUDE**

La phylogéographie des souches *M. tuberculosis* a démontré l'association des lignées de souches avec leur lieu de dispersion ou d'endémicité. De précédentes études ont montré l'existence d'une souche endémique et prédominante à Madagascar : Le SIT109. Le SIT109 appartient à la lignée EAI et à la sous-lignée des EAI8. Jusqu'à présent, aucune étude n'a jamais été faite sur ces souches. Cette étude constitue la première étude analysant le niveau de diversité des souches sous-jacentes à ce spoligotype endémique. L'objectif de l'étude étant d'étudier la diversité des SIT109 disponibles (n=156) au laboratoire des Mycobactéries de l'IPM par des méthodes de typage plus discriminantes du BK (le spoligotypage avec 68 espaceurs et les MIRU-VNTR). L'objectif secondaire étant de proposer une sélection minimale de locus VNTR pouvant typer les SIT109 avec un maximum de niveau de discrimination.

### **IV.2 ARTICLE 2**



22 **ABSTRACT (249 words)**

23 Previous studies demonstrated the presence of an endemic Lineage 1 *Mycobacterium*  
24 *tuberculosis* (MTB) strain circulating predominantly in Madagascar, the spoligo-international-  
25 type 109 (L1/SIT109). Until now, very little knowledge about the L1/SIT109 genetic diversity  
26 and the origin of this genotype was available. The aim of this study was to evaluate the  
27 genetic diversity level of the L1/SIT109 sublineage using more discriminant *M. tuberculosis*  
28 genotyping methods, and try to hypothesize on its origin.

29 To achieve this goal, a first sample of 53 L1/SIT109 isolates available at the Institut  
30 Pasteur of Madagascar were typed by the extended 68 spacers spoligotyping method using a  
31 high throughput method and using complementary 24 MIRU-VNTR typing. In parallel, a  
32 selection of the 10 most discriminant MIRU-VNTR loci among the 24 was chosen to assess a  
33 MIRU-VNTR genotyping method to evaluate the genetic diversity on a larger collection of  
34 clinical isolates (n=103). Results showed that spoligotypes with 68 spacers did not  
35 discriminate L1/SIT109 clinical isolates (HGDI=0.097). Only 4 spoligotypes were discriminated  
36 with 1 single cluster of 50 isolates and 3 unique spoligotypes, whereas 24 MIRU-VNTR  
37 showed a larger genetic diversity of the L1/SIT109 (41 profiles of which 36 unique patterns  
38 and 5 clusters of 2 to 7 isolates) with an HGDI of 0.978. The result of the 24 MIRU-VNTR  
39 typing showed 9 invariable loci (MIRU03, MIRU20, MIRU24, MIRU26, Mtub04, Mtub29,  
40 Mtu30, Mtub34 and Qub4156). The selection of the 10 most discriminant loci (ETRA, ETRB,  
41 ETRD, MIRU10, ETRE, MIRU40, Mtub21, Mtub39, Qub11b and Qub26; HGDI values: 0.142 to  
42 0.610) was used to subtype all of the L1/SIT109 isolates (n=156) with a similar discrimination  
43 level (HGDI=0.981). Finally we genotyped a panel of L1-specific SNPs to try to characterize  
44 the phylogenetic position of L1/SIT109.

45           The L1/SIT109 sublineage is a clonal complex that is likely to have been introduced in  
46 Madagascar long time ago, in relation to peopling. Thus, the transmission of the L1/SIT109  
47 clonal complex occurred in a broad spatial and temporal genetic landscape in Madagascar  
48 that remains difficult to decipher, and will tentatively be reconstituted by further WGS  
49 studies.

50

51 Key words: *Mycobacterium tuberculosis* complex, Lineage 1, East-African Indian, MIRU-  
52 VNTR, spoligotyping, SNPs, Indian Ocean Trade

53 **INTRODUCTION**

54 Tuberculosis (TB), caused by *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC), remains one  
55 of the infectious diseases causing the most deaths worldwide. One third of the world  
56 population is infected with *M. tuberculosis*. In 2014, according to WHO, 9.6 million people  
57 contracted TB and 1.5 million people died (of which 360.000 HIV-positive) [1].

58 Actually, molecular genotyping tests have been gradually used in TB transmission  
59 studies. This facilitates the identification of the scale of TB transmission (between closely  
60 patients or even in a population) [2-4]. These methods also allow to distinguish recent  
61 transmission cases, reactivation, latent, or exogenous reinfection cases [5, 6]. Genetic typing  
62 techniques such as spoligotyping [7], MIRU-VNTR [8], IS6110-RFLP [9] have been developed  
63 for TB genotyping. Associated with the geographical distribution data, these methods have  
64 been used to classify clinical isolates according to their biogeographical origin [10, 11].  
65 Spoligotyping, Region of Deletions, Whole genome analysis and SNPs, were used to classify  
66 *M. tuberculosis* in 7 lineages and many sublineages (L1/EAI, L2/Beijing, L3/CAS, L4/Euro-  
67 American, L5/africanum WA1, L6/africanum WA2 and bovis, L7/Ethiopia) [10, 12-14, 15, 16].

68 A previous study in Madagascar showed a large genetic diversity of *M. tuberculosis*  
69 clinical isolates circulating, a high percentage of the L1/EAI (14%) globally, and a component  
70 linked to East Africa (L3/CAS, L4.6.4.2/LAM\_ZWE) [17]. The prevalence of L1 was especially  
71 high in the coastal provinces of Madagascar and reciprocally L4 clinical isolates seems to  
72 predominate in the capital [17]. One predominant and endemic spoligotype, L1/SIT109 and  
73 its derivatives, also designated as L1/EAI8\_MDG was observed to represent up to 40% on the  
74 west coast of Madagascar [17, 18]. The L1/SIT109 is characterized with a spoligotype where  
75 spacers 2, 3, 19, 29, 30, 31, 32 and 34 are absent. The L1/SIT109 is found mainly but not

76 exclusively in Madagascar (it is found in Saudi Arabia) and no deeper characterization study  
77 was performed on this genotype.

78 The aim of this study was to analyze the genetic diversity of the Malagasy strain  
79 L1/SIT109 using more discriminant genotyping methods and to try to decipher the origin of  
80 this MTC genotype in relation to peopling origin, migration and trading routes in the Indian  
81 Ocean.

82

### 83 **METHODS**

#### 84 **Samples:**

85 A total of 156 *M. tuberculosis* clinical isolates previously typed by classical  
86 spoligotyping with 43 spacers and harboring the spoligotype L1/SIT109, available in the  
87 Mycobacteria unit of the *Institut Pasteur de Madagascar*, were used in the study. Clinical  
88 isolates were cultured and identified from Malagasy patients consulting for diagnosis in  
89 treatment centers (CDTs) around Madagascar between 1995 and 2010. Clinical isolates were  
90 cultured in Löwenstein-Jensen solid medium [19] and DNA was extracted from fresh sub-  
91 cultures using the cetyl-trimethyl ammonium bromide (CTAB) method [20].

92

#### 93 **Study flow:**

94 A first sample of 53 L1/SIT109 clinical isolates were typed with the high throughput  
95 spoligotyping method with 68 spacers on a Luminex® 200 system (Luminex Corp. Austin, TX)  
96 and by the 24 MIRU-VNTR method for identification of the most discriminant loci [8]. The  
97 rest of L1/SIT109 isolates (n=103) were typed using a selection of the 10 most discriminant  
98 MIRU-VNTR loci, and finally the diversity of the totality of isolates was analyzed with the  
99 selection of loci (Fig.1). The discrimination level of each method and each VNTR locus was

100 computed with the Hunter and Gaston Discriminatory Index (HGDI) method [21] and using  
101 online the “Discriminatory Power Calculator” site (<http://insilico.ehu.es/mini>  
102 [tools/discriminatory\\_power](http://insilico.ehu.es/mini)). A cluster was defined by two or more clinical isolates with  
103 identical spoligotypes and the genotypic clusterization rate was defined as the proportion of  
104 the sum of clinical isolates with the same profiles. Phylogenetic tree was built online in  
105 ([www.miru-vntrplus.org](http://www.miru-vntrplus.org)) using the maximum likelihood method.

106

107 **Spoligotyping:**

108 **Amplification:**

109 High-throughput Spoligotyping with 68 spacers on a Luminex 200® was done as  
110 described previously on a first sample of 53 L1/SIT109 DNAs [22]. Classical primers designed  
111 for spoligotyping described in 1997 were used for amplification of the DR region [7]. The  
112 reaction mixture contained 2 µl of a DNA sample (20 to 40 ng), 0.2 mM each  
113 deoxynucleoside triphosphate (dNTP), 1 µM of each primer, PCR buffer (10mM Tris-HCl,  
114 pH8.3, 50mM KCl), and 1.0U of *Taq* polymerase. The following PCR program was used: 3 min  
115 at 95°C, followed by 25 cycles of 30s at 95°C, 30 s at 55°C, and 30 s at 72°C, and a final  
116 elongation step at 72°C for 5 min.

117

118 **Hybridization:**

119 Oligonucleotide-precoupled MicroPlex beads (polystyrene microbeads) were used for  
120 hybridization. These reagents (research use only) are available from Beamedex® SAS  
121 ([www.beamedex.com](http://www.beamedex.com) , Orsay, France).

122 Hybridization of 2µl of the PCR products with a minimal numbers of 1,800 beads per  
123 analyte in 50µl of tetramethylammonium chloride buffer (1X TMAC) was performed after

6

124 denaturation for 10 min at 95°C and then 20 min at 50°C. After centrifugation at 4,000 rpm  
125 and replacement of 35 µl of supernatant by 1X TMAC, streptavidin-phycoerythrin Lumigrade  
126 solution (Roche Biochemicals, Meylan, France) prepared in 1X TMAC was added to a final  
127 concentration of 2 µg/ml, to reach a final volume of 75 µl. We allowed 5 min of incubation in  
128 the system (Luminex® 200 or Magpix) at 50°C before reading the samples.

129 The Luminex® 200 high-throughput system was used for reading and the xPonent®  
130 software (version 3.1.871) was used to analyze the results. Interpretation of results and  
131 determination of cut-off were made as in previous study [22].

132

### 133 **MIRU-VNTR:**

134 The standard 24 MIRU-VNTR loci method [8] was performed based on agarose gel  
135 electrophoresis. The simplex PCR product size was determined as previously reported [23].

136

### 137 **L1-Specific Multiplex SNP Analysis**

138 A specific Lineage 1 high-throughput Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Typing  
139 method was developed by E. Costa Conceicao et al. (results to be published elsewhere).  
140 Briefly, this method is a 24-Plex method using 12 DPO primers (dual-priming oligonucleotide)  
141 that targets 12 polymorphic SNPs in 12 genes previously shown to be polymorphic [14,  
142 15].The targeted SNPs are: hemL\_1104\_GA, ftsX\_303\_GA, moaC1\_375\_CA, dinP\_700\_GT,  
143 polA\_1629\_GC, dnaG\_51\_CG, rv0944\_205\_CT, rimM\_339\_CT, rv2707\_711\_GA,  
144 rv3915\_1056\_GA, glgB\_1038\_CT, alkA\_595\_GC.

145

### 146 **RESULTS:**

#### 147 **Sampling**

148 The Table 1 summarizes the geographic distribution of the collection analyzed in this  
149 study. This table shows that L1/SIT109 isolates are present in all provinces of Madagascar.  
150 The majority of isolates are found in the capital and in the province of Tulear and the highest  
151 proportion of isolates was recovered between 2005 and 2007.

152

#### 153 **Spoligotyping with 68 spacers:**

154 The genotyping results of a first collection of 53 L1/SIT109 are summarized in Table 2.  
155 Four different patterns only were obtained by spoligotyping using 68 spacers. The genotypic  
156 clusterisation rate was 94.34%. Three unique profiles and one cluster with 50 isolates were  
157 obtained. The HGDI value of a spoligotyping with 68 spacers in this case was 0.111.

158

#### 159 **24 MIRU-VNTR:**

160 Among the 53 L1/SIT109 clinical isolates, 41 patterns were obtained (Table 2). 36  
161 unique patterns and 5 genotypic clusters with 2 to 7 clinical isolates were identified. The  
162 genotypic clusterisation rate was 32.07%. The HGDI value of a 24 MIRU-VNTR is 0.978. The  
163 HGDI values of each locus varied from 0 to 0.6103 (Table 2). Nine loci were shown to be  
164 invariants within the L1/SIT109 clinical isolates: MIRU02, MIRU20, MIRU24, MIRU26,  
165 Mtub04, Mtub29, Mtub30, Mtub34 and Qub4156.

166

#### 167 **10 MIRU-VNTR:**

168 The ten most discriminant loci observed within the first sample of L1/SIT109 clinical isolates  
169 were: ETRA, ETRB, ETRD, MIRU10, ETRE, MIRU40, Mtub21, Mtub39, Qub11b and Qub26. The  
170 HGDI values were respectively: 0.2663, 0.5247, 0.4724, 0.2083, 0.2765, 0.3041, 0.4231,  
171 0.6103, 0.1422 and 0.4057. Analysis of all L1/SIT109 clinical isolates (n=156) showed 93

172 profiles with a clusterization rate of 54.48% (71 single profiles and 22 clusters containing  
173 from 2 to 13 isolates). Phylogenetic tree of the 156 L1/SIT109 clinical isolates with this 10  
174 MIRU-VNTR set is shown in Figure 2. The Phylogenetic tree showed a large diversity of  
175 clinical isolates in each cluster despite some geographically and temporally clustered cases  
176 that were not investigated more deeply.

177       If we focus on the largest genetic clusters (i.e. with more than two isolates, n=6), the  
178 first cluster designated as cluster A (Figure 2) showed 8 isolates recruited from 2005 to 2009.  
179 Five of these 8 isolates were from Antananarivo and the remainder cases were found in the  
180 3 provinces of Fianarantsoa, Mahajanga and Tulear. The second genetic cluster (named B)  
181 gathers 8 isolates recruited in 2005 and 2006. Two isolates are from Majunga, two from  
182 Toamasina, 2 from Tulear and 2 from Fianarantsoa. The third genetic cluster (named C)  
183 comprises 9 isolates from 2005 to 2006. Two are from Toamasina, 2 from Tulear, 1 from  
184 Antananarivo, 2 from Antsiranana, 1 from Fianarantsoa and 1 from Mahajanga. The fourth  
185 genetic cluster (named D) comprised 5 isolates from 2006. Only one of these isolates comes  
186 from Antananarivo and 4 come from Tulear. Two isolates very close genotypically to these  
187 isolates were also isolated from Tulear at the same period. The fifth genotypic cluster  
188 (named E) comprises 13 isolates collected between 2000 and 2010. Eight of these isolates  
189 came from Antananarivo, 3 from Fianarantsoa and 2 from Tulear. The sixth genotypic cluster  
190 (named F) comprised 7 isolates among which 2 were from Tulear, 2 From Toamasina, 1 from  
191 Mahajanga, 1 from Antananarivo and 1 from Fianarantsoa.

192       The HGDI values of a selection of 10 loci MIRU-VNTR for the totality of clinical isolates  
193 was 0.982.

194

195 **Comparison between spoligotyping 43 spacers, spoligotyping 68 spacers and 24 MIRU-**

196 **VNTR:**

197 The comparison of HGDI of the different *M. tuberculosis* genotyping methods for  
198 SIT109 clinical isolates is reported in the Table 3. Result showed a very less discriminatory  
199 power of the spoligotyping with 68 spacers among the SIT109 clinical isolates. The HGDI of  
200 the 24 MIRU-VNTR and the selection of 10 MIRU-VNTR is relatively close (respectively 0.978  
201 and 0.970) for the first sample of 61 clinical isolates and demonstrated a high level of  
202 diversity.

203

204 **L1-Specific Multiplex SNPs analysis**

205 During the course of the development of a L1-specific SNPs assay that would be used to  
206 distinguish L1 sublineages (E. Costa Conceição, manuscript in preparation), we genotyped a  
207 total of 105 SIT109 clinical isolates to assess their genotype on a panel of 12 L1-specific SNPs.  
208 We used as positive controls a set of DNAs belonging to L1.1 (SIT11/EAI3\_IND, (India)  
209 SIT139/EAI4\_VNM (Vietnam), SIT591/EAI6\_BGD (Bengladesh), or to L1.2 (SIT48/EAI1\_SOM  
210 (Somalia, or to SIT19/EAI2\_PHL ;Philippines, Manilla type). Even if not all of the 12 genes did  
211 allow to get a positive answer on the allelic status of each sample for the time-being, we got  
212 robust positive results for 8 genes for most of the samples. The Table 4 summarizes these  
213 results. As observed in this table, SIT109 would be a sublineage inside L1.1, since it show to  
214 be closer to L1.1/EAI3\_IND than to any other sublineage, since we observed only one SNP  
215 difference with typical L1.1/EAI3/SIT11, the most frequent L1 type in Tamil Nadu, South  
216 India [27], whereas there were at least 2 SNPs difference with the two other positive  
217 controls we used inside L1.2 , i.e. EAI2\_PHL/SIT19 and EAI1\_SOM/SIT48, both typical from  
218 L1.2. For the time-being, it is impossible to assign more precisely SIT109 within a more

219 precise phylogenetic position in the L1 phylogeentic tree, and to find the most recent  
220 common ancestor to the other L1.1. sublineages; only WGS of this clonal complex will allow  
221 to find a likely ancestor and allow to compute the date of divergence with the most recent  
222 common ancestor of all L1.1.

223

#### 224 **Phylogeography and Evolution of L1/SIT109 in Madagascar**

225 In the world-wide TB spoligo-database SITVITWEB, SIT109 is found mainly but not exclusively  
226 in Madagascar (56%, n=46), since many identical patterns are found in Saudi Arabia (35%,  
227 n=29) and elsewhere (9%, n=7) (See S1\_Table). The first description of SIT109 goes back to  
228 1994 in Madagascar. In Saudi Arabia, the origin of patients was mainly saoudian but also  
229 found with Indonesian, Afghanistan, and Ethiopian origins. The molecular evolution  
230 understanding of SIT109 will deserve whole genome sequencing of various SIT109 samples,  
231 however we already performed some hypothesis as suggested by spoligotyping evolution in  
232 Figure 3. Figure 3 suggests that L1/SIT236 is the most likely spoligotyping ancestor that  
233 allows to get, in two steps, the L1/SIT109 signature. Both L1/SIT126 and L1/SIT2671 are  
234 found as likely hypothetical step 1 ancestors in the SITVITWEB database if we hypothesize  
235 that loss of spacers 2-3 and loss of spacer 19 are independent events (Figure 3). The  
236 phylogeographical specificity of L1/SIT126 (n=77 in SITVITWEB) points to India (41%), Saudi  
237 Arabia (11%), Bengladesh (6%), Tanzania (6%), and this genotype is also anecdotally found in  
238 Malaysia, Senegal and Uganda (S1\_Table). This observation may be refined by considering  
239 that SIT126 is the second most prevalent spoligotype cluster in Tamil Nadu, South India  
240 (n=80) , just after SIT11 (n=336) in a three year study [27]. Thus, SIT11 and SIT109 might be  
241 two independent unique evolutionary events of SIT126. The phylogeographical specificity of

242 the second less likely ancestor, SIT2671 (n=2 in SITVITWEB), is restricted to Saudi Arabia and  
243 to one immigrant of unknown origin in the USA.

244

## 245 **DISCUSSION**

246 The aim of this study was to evaluate the intra-SIT109 genetic diversity of an  
247 historically highly prevalent Lineage 1 subtype in Madagascar, designated as “Malagasy *M.*  
248 *tuberculosis* clonal complex L1/SIT109 or L1/EAI8-MDG, using complementary genotyping  
249 methods. Addition of the 25 spacers to the classical 43 spacers in spoligotyping was  
250 previously shown to increase the discriminatory level of spoligotyping in L1 and L5-L6 of *M.*  
251 *tuberculosis* complex [24, 25]. We thus decided to use this method. However results were  
252 disappointing and showed that the SIT109 remained quite homogeneous with only slight  
253 variations. Conversely, as expected, a high level of genetic diversity by the MIRU-VNTR  
254 method was observed. The MIRU-VNTR method is known to be more discriminant than  
255 spoligotyping when applied to potentially epidemiologically-linked clinical isolates, also  
256 providing interesting phylogenetical information [26]. A quite high diversity within the  
257 SIT109 clinical isolates was observed in this study. The high level of genetic diversity  
258 observed by MIRU-VNTR suggests the historical spread of either a single founding clone  
259 (founding effect) or of a limited amount of similar founders clones. It also suggests that  
260 SIT109 has been circulating since a long time in Madagascar and had time to evolve.

261 The geographical distribution of isolates shows that the SIT109 strain is present  
262 throughout Madagascar. Assuming that these isolates are derived from a single clone, it may  
263 also suggest that the transmission of TB in Madagascar spread on a global scale during  
264 Madagascar TB outbreak history. Patients from very remote areas share apparently the  
265 same isolates using our methods than patients found in Antananarivo. This also suggests

266 ongoing transmission chains within this clonal complex. TB in Madagascar can therefore be  
267 easily transmitted through rapid contacts between tuberculosis patients and healthy people.

268         Concerning the distribution of clinical isolates inside each genotypic cluster, despite  
269 some clinical isolates isolated in the same period and the same region suggesting their  
270 recent transmission (5 isolates in Antananarivo inside the cluster A ; 2 isolates in Toamasina,  
271 in Mahajanga, in Fianarantsoa et in Tulear inside the cluster B ; 2 isolates from Antsiranana,  
272 Tulear an Toamasina in the cluster C ; 4 isolates from Tulear in the cluster D ; 8 isolates from  
273 Antananarivo, 3 from Fianarantsoa and 2 from Tulear inside the cluster E ; And 2 isolates  
274 from Tulear and 2 isolates from Toamasina inside the cluster F), a large diversity of clinical  
275 isolates isolated from different periods and different settings inside each genotypic cluster  
276 was observed. This support our hypothesis that the transmission of SIT109 clinical isolates  
277 was performed historically with progressive spatial and temporal transmission in some  
278 remote regions of Madagascar. This also suggests an homogenous transmission of this strain  
279 and probably the same transmission mode of TB in Madagascar.

280         However, the high prevalence of SIT109 clinical isolates in Madagascar compared to  
281 others clinical isolates relatively more virulent such as Beijing clinical isolates suggests that  
282 L1/SIT109 isolates are adapted to Malagasy populations, either since these isolates were  
283 more transmissible than other clinical isolates due to specific characteristics, or were  
284 introduced the most early in TB outbreak history in Madagascar and thus had time to spread  
285 and diversify. The co-evolution hypothesis is likely to favor since L1/EAI clinical isolates are  
286 known to be less virulent than other *M. tuberculosis* clinical isolates [18, 27, 28].

287         Previous studies showed characteristic MIRU-VNTR profiles for the EAI family with  
288 more than 4 copy number of MIRU23 and more than 1 copy of the MIRU 24 [29]. One strain  
289 however had 2 copies of MIRU23 which is in contradiction with this characteristic.

290

291 Previous study using 24 MIRU-VNTR showed that all of the 24 loci are variable by  
292 considering all of the lineages of *M. tuberculosis* clinical isolates. Except the MIRU02 with a  
293 HGDI value of 0.0518, other locus have HGDI values superior to 0.250 [30]. The 9 invariable  
294 loci (MIRU03, MIRU20, MIRU24, MIRU26, Mtub04, Mtub29, Mtub30, Mtub34 and Qub4156)  
295 are therefore characteristic of the SIT109 clinical isolates.

296 This study allows to better understand SIT109 strain characteristics circulating in  
297 Madagascar and to understand their evolution and their transmission mode. It is also the  
298 first subtyping study of one subfamily of *M. tuberculosis* clinical isolates within the EAI  
299 lineage.

300 Even if the Austronesian component is important and could be at the origin of L1/SIT109 in  
301 Madagascar, the Bantu component is also ancient and inherent of Madagascar historical  
302 peopling, in particular on the West coast of the island [31]. This component was already  
303 discussed by Lusitanian sailors during the XVI<sup>th</sup> century [31]. Thus, the Bantu peopling could  
304 equally be responsible of L1/SIT109 introduction in Madagascar. Another variant type of  
305 L1/EAI, SIT129 is found to be very prevalent in Mozambique and Malawi, and looks as being  
306 more prevalent on the coasts, and could represent a passed common history between  
307 Mozambique and Madagascar and could be linked to the historical Indo-Ocean trade (Figure  
308 4) [32]. Arab scholars also showed their important role in population movements in the  
309 Mozambique channel, long before European colonization, *i.e.* with an Arab presence in  
310 Comoro islands as early as the X<sup>th</sup> century [31].

311 The linguistic approach, pioneered by Otto Ch. Dahl in 1951 shows that Malagasy language  
312 and Maanjan have a common origin [33], and that this language points to South-East  
313 Kalimantan Barito ethnic group [31]. These people are indigenous ethnic group ; in the 2000

14

314 census they made up 2.8% of the Central Kalimantan population [34]. These people are  
315 supposed to have migrated to Madagascar island around 945 to 946 AD, sailing through the  
316 Indian Ocean on 1,000 leeboard sailboats [31, 35]. .

317 The recent human genetic study by Hurles *et al.* in 2005 confirms the historical and  
318 archeological sources: maternal and paternal heritages are broadly 50-50 between South-  
319 East Asian (Borneo) and African components in the Malagasy population. This results does  
320 not however facilitate our hypothesis to link L1/SIT109 to Asian or African origins. Based on  
321 an hypothetical South Indian L1/SIT126 phylogeographical specificity of L1/SIT109 ancestor,  
322 a more recent (XIXth) Indian immigration from South India could also explain the  
323 introduction of TB in Madagascar even though it seems that, given the demographical  
324 history of Indian communities in Madagascar, and the previous peopling history of the  
325 island, such a recent introduction history is less likely than the more ancient south-east Asian  
326 or African hypothesis [36].

327 Timing of migration estimation in relation to SNPs diversity once WGS data will be made  
328 available could ultimately shed more light on the African or Asian (Indian or South-East  
329 Asian) origin of L1/SIT109. Alternatively, specific geographic microsampling of both  
330 *Mycobacterium tuberculosis* and *Homo sapiens* in Mozambique, Borneo and in Madagascar  
331 could help to find the link between ancestral Y chromosome - Mt DNA haplotypes and  
332 genotypes of MTC that could be at the origin of tuberculosis introduction in Madagascar  
333 and more largely on the East African Indian shores.

334 Some limitation of this study are the lack of more precise clinical epidemiology data  
335 and the lack of any estimation time for the introduction of the studied clinical isolates in  
336 Madagascar. The second limitation is the poor representativity of samples of the different

337 provinces of Madagascar to analyze more precisely the distribution of the different  
338 frequencies of L1/

339 L1/SIT109 clinical isolates in all regions in Madagascar. And finally a true phylogeny  
340 using whole-genome sequencing data is needed to confirm phylogenetic relation between  
341 these clinical isolates and try to infer a more precise history of their evolution.

342

### 343 **CONCLUSION**

344 Addition of 25 supplementary spacers in spoligotyping was not sufficient to efficiently  
345 subtype the L1/SIT109 *M. tuberculosis* clinical isolates. The MIRU-VNTR method was able to  
346 discriminate different historically linked and may be epidemiologically linked clusters within  
347 L1/SIT109 clinical isolates however VNTR typing with 24 loci is not necessary. Typing with a  
348 selection of the 10 most discriminant loci is sufficient to discriminating different clusters  
349 within L1/SIT109 clinical isolates with the same discrimination level.

350 Malagasy L1/SIT109 clinical isolates appear to be quite diverse and can be considered  
351 as clinical isolates circulating in Madagascar since many centuries, either in relation to an  
352 introduction linked to south-east Asian (Kalimantan) Mannyan population migration during  
353 the X<sup>th</sup> century or to a Bantu-linked, East-African introduction. Even it seems less likely, we  
354 cannot eliminate the introduction of a more recent Indian-linked migration introduction of  
355 L1/SIT109 or its ancestor during modern history.

356

### 357 **ACKNOWLEDGEMENT**

358 I am grateful to the “Infection Genetics Emerging Pathogens Evolution team” of the  
359 Institute of Integrative Cell Biology, UMR9198, CEA-CNRS-University Paris Saclay, France and

360 the Mycobacteria unit of the *Institut Pasteur de Madagascar* for allowing this project to be

361 run, for samples collection, and for financing this project.

362

363 **BIBLIOGRAPHY**

- 364 1. WHO: Global Tuberculosis Report 2015. In.: WHO, Geneva, Switzerland; 2015.
- 365 2. Bryant JM, Schurch AC, van Deutekom H, Harris SR, de Beer JL, de Jager V, Kremer K, van Hijum  
366 SA, Siezen RJ, Borgdorff M *et al*: Inferring patient to patient transmission of *Mycobacterium*  
367 *tuberculosis* from whole genome sequencing data. *BMC Infect Dis* 2013, 13:110.
- 368 3. Gardy JL, Johnston JC, Ho Sui SJ, Cook VJ, Shah L, Brodtkin E, Rempel S, Moore R, Zhao Y, Holt R *et*  
369 *al*: Whole-genome sequencing and social-network analysis of a tuberculosis outbreak. *N Engl J Med*  
370 2011, 364(8):730-739.
- 371 4. Walker TM, Monk P, Smith EG, Peto TE: Contact investigations for outbreaks of *Mycobacterium*  
372 *tuberculosis*: advances through whole genome sequencing. *Clinical microbiology and infection : the*  
373 *official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2013,  
374 19(9):796-802.
- 375 5. Ford C, Yusim K, loerger T, Feng S, Chase M, Greene M, Korber B, Fortune S: *Mycobacterium*  
376 *tuberculosis*-heterogeneity revealed through whole genome sequencing. *Tuberculosis (Edinb)* 2012,  
377 92(3):194-201.
- 378 6. Ford CB, Lin PL, Chase MR, Shah RR, Iartchouk O, Galagan J, Mohaideen N, loerger TR,  
379 Sacchettini JC, Lipsitch M *et al*: Use of whole genome sequencing to estimate the mutation rate of  
380 *Mycobacterium tuberculosis* during latent infection. *Nature genetics* 2011, 43(5):482-486.
- 381 7. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A,  
382 Molhuizen H, Shaw R, Goyal M *et al*: Simultaneous detection and strain differentiation of  
383 *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 1997, 35(4):907-914.
- 384 8. Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rusch-Gerdes S, Willery E, Savine E, de Haas  
385 P, van Deutekom H, Roring S *et al*: Proposal for Standardization of Optimized Mycobacterial  
386 Interspersed Repetitive Unit-Variable-Number Tandem Repeat Typing of *Mycobacterium*  
387 *tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2006, 44(12):4498-4510.

- 388 9. Hermans PWM, Solingen DV, Dale JW, Schuitema RJ, Adam RM, Catty D, Embden JDAV:  
389 Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a useful tool for diagnosis and  
390 epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1990, 28:2051-2085.
- 391 10. Brudey K, Driscoll J, Rigouts L, Prodinger WM, Gori A, Al-Hajj SAM, Allix C, Aristimuno L, Arora J,  
392 Baumanis V *et al*: *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity : mining the fourth  
393 international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, Population Genetics, and  
394 Epidemiology. *BMC Microbiol* 2006, 6(6):23.
- 395 11. Demay C, Liens B, Burguière T, Hill V, Couvin D, Millet J, Mokrousov I, Sola C, Zozio T, Rastogi N:  
396 SITVITWEB – A publicly available international multimarker database for studying *Mycobacterium*  
397 *tuberculosis* genetic diversity and molecular epidemiology. *Infect Genet Evol* 2012, 12(4):755-766.
- 398 12. Gagneux S, Small PM: Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications  
399 for tuberculosis product development. *The Lancet Infectious diseases* 2007, 7(5):328-337.
- 400 13. Comas I, Homolka S, Niemann S, Gagneux S: Genotyping of genetically monomorphic bacteria:  
401 DNA sequencing in *Mycobacterium tuberculosis* highlights the limitations of current methodologies.  
402 *PLoS One* 2009, 4(11):e7815.
- 403 14. Coll F, Preston M, Guerra-Assuncao JA, Hill-Cawthorn G, Harris D, Perdigao J, Viveiros M,  
404 Portugal I, Drobniewski F, Gagneux S *et al*: PolyTB: A genomic variation map for *Mycobacterium*  
405 *tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)* 2014, 94(3):346-54(3):346-354.
- 406 15. Coll F, McNerney R, Guerra-Assuncao JA, Glynn JR, Perdigao J, Viveiros M, Portugal I, Pain A,  
407 Martin N, Clark TG: A robust SNP barcode for typing *Mycobacterium tuberculosis* complex strains.  
408 *Nature communications* 2014, 5:4812.
- 409 16. Stucki D, Brites D, Jeljeli L, Coscolla M, Liu Q, Trauner A, Fenner L, Rutaiwa L, Borrell S, Luo T *et*  
410 *al*: *Mycobacterium tuberculosis* lineage 4 comprises globally distributed and geographically restricted  
411 sublineages. *Nature genetics* 2016, 48(12):1535-1543.

- 412 17. Ferdinand S, Sola C, Chanteau S, Ramarokoto H, Rasolonavalona T, Rasolofo-Razanamparany V,  
413 Rastogi N: A study of spoligotyping-defined *Mycobacterium tuberculosis* clades in relation to the  
414 origin of peopling and the demographic history in Madagascar. *Infect Genet Evol* 2005, 5(4):340-348.
- 415 18. Rakotosamimanana N, Raharimanga V, Andriamandimby SF, Soares JL, Doherty TM,  
416 Ratsitorahina M, Ramarokoto H, Zumla A, Huggett J, Rook G *et al*: Variation in gamma interferon  
417 responses to different infecting strains of *Mycobacterium tuberculosis* in acid-fast bacillus smear-  
418 positive patients and household contacts in Antananarivo, Madagascar. *Clinical and vaccine*  
419 *immunology : CVI* 2010, 17(7):1094-1103.
- 420 19. David H, Levy-Frebault V, Thorel MF: Méthodes de laboratoire pour Mycobactériologie clinique.  
421 In., edn. Paris: Institut Pasteur; 1989: 1-87.
- 422 20. vanSoolingen D, Hermans PWM, Haas PEWd, Sool DR, Embden JDAv: The occurrence and stability  
423 of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion  
424 sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J Clin*  
425 *Microbiol* 1991, 29:2578-2586.
- 426 21. Hunter PR, Gaston MA: Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an  
427 application of Simpson's index of diversity. *J ClinMicrobiol* 1988, 26:2465-2466.
- 428 22. Zhang J, Abadia E, Refregier G, Tafaj S, Boschirolu ML, Guillard B, Andremont A, Ruimy R, Sola C:  
429 *Mycobacterium tuberculosis* complex CRISPR genotyping: improving efficiency, throughput and  
430 discriminative power of 'spoligotyping' with new spacers and a microbead-based hybridization assay.  
431 *J Med Microbiol* 2010, 59(Pt 3):285-294.
- 432 23. Bonura C, Gomgnimbou MK, Refregier G, Aleo A, Fasciana T, Giammanco A, Sola C, Mammina C:  
433 Molecular epidemiology of tuberculosis in Sicily, Italy: what has changed after a decade? *BMC Infect*  
434 *Dis* 2014, 14:602.
- 435 24. van der Zanden AG, Kremer K, Schouls LM, Caimi K, Cataldi A, Hulleman A, Nagelkerke NJ, van  
436 Soolingen D: Improvement of differentiation and interpretability of spoligotyping for *Mycobacterium*

- 437 *tuberculosis* complex isolates by introduction of new spacer oligonucleotides. *J Clin Microbiol* 2002,  
438 40(12):4628-4639.
- 439 25. Zhang J, Heng S, Le Moullec S, Refregier G, Gicquel B, Sola C, Guillard B: A first assessment of the  
440 genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* complex in Cambodia. *BMC Infect Dis* 2011, 11(1):42.
- 441 26. Bouklata N, Supply P, Jaouhari S, Charof R, Seghrouchni F, Sadki K, El Achhab Y, Nejari C, Filali-  
442 Maltouf A, Lahlou O *et al*: Molecular Typing of *Mycobacterium Tuberculosis* Complex by 24-Locus  
443 Based MIRU-VNTR Typing in Conjunction with Spoligotyping to Assess Genetic Diversity of Strains  
444 Circulating in Morocco. *PLoS One* 2015, 10(8):e0135695.
- 445 27. Narayanan S, Gagneux S, Hari L, Tsolaki AG, Rajasekhar S, Narayanan PR, Small PM, Holmes S,  
446 Deriemer K: Genomic interrogation of ancestral *Mycobacterium tuberculosis* from south India. *Infect*  
447 *Genet Evol* 2008, 8(4):474-483.
- 448 28. Theus S, Eisenach K, Fomukong N, Silver RF, Cave MD: Beijing family *Mycobacterium tuberculosis*  
449 strains differ in their intracellular growth in THP-1 macrophages. *Int J Tuberc Lung Dis* 2007,  
450 11(10):1087-1093.
- 451 29. Ferdinand S, Valetudie G, Sola C, Rastogi N: Data mining of *Mycobacterium tuberculosis* complex  
452 genotyping results using mycobacterial interspersed repetitive units validates the clonal structure of  
453 spoligotyping-defined families. *Res Microbiol* 2004, 155(8):647-654.
- 454 30. Devi KR, Bhutia R, Bhowmick S, Mukherjee K, Mahanta J, Narain K: Genetic Diversity of  
455 *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Assam, India: Dominance of Beijing Family and Discovery  
456 of Two New Clades Related to CAS1\_Delhi and EAI Family Based on Spoligotyping and MIRU-VNTR  
457 Typing. *PLoS One* 2015, 10(12):e0145860.
- 458 31. Allibert C: Migration austronésienne et mise en place de la civilisation malgache. Lectures  
459 croisées : linguistique, archéologie, génétique, anthropologieculturelle. *Diogenè* 2007, 218:6-17.
- 460 32. Sola C, Anselmo LMP, Klotoe B, Panaiotov S, Feliciano C, Costa-Conceição E, Namburete EI, Ferro  
461 JJ, Bollela VR: On the origin of L1/SIT129 in Beira, Sofala, and on the phylogeography and molecular

- 462 evolution of *Mycobacterium tuberculosis* complex in Mozambique and in South-East Africa. *Infection*  
463 *Genetics Evolution* submitted.
- 464 33. Dahl OC: Malgache et maanjan : une comparaison linguistique. Oslo: Egede-Instituted; 1951.
- 465 34. Ma'anyan people [[https://en.wikipedia.org/wiki/Ma%27anyan\\_people](https://en.wikipedia.org/wiki/Ma%27anyan_people)]
- 466 35. Hurler ME, Sykes BC, Jobling MA, Forster P: The dual origin of the Malagasy in Island Southeast  
467 Asia and East Africa: evidence from maternal and paternal lineages. *American journal of human*  
468 *genetics* 2005, 76(5):894-901.
- 469 36. Bardonnet D: Les minorités asiatiques à Madagascar, vol. 10; 1964.

470 **Legend of Figures:**

471

472 Figure 1: Study flow

473 Figure 2: Dendrogram of genetic relationships among the 156 L1/SIT109 clinical isolates  
474 based on the selection of the 10<sup>th</sup> most discriminant VNTR loci. The tree was built using  
475 neighbor-joining distance algorithm as described previously.

476 Figure 3: Hypothetical L1/SIT236 and L1/SIT126-based, evolutionary scenario of L1/SIT109  
477 emergence based on two consecutive spacers events; in parallel, other phylogeographical  
478 events appeared on other Asian or African countries

479 Figure 4: Geographical map built using QGIS ([www.qgis.org](http://www.qgis.org)) showing the prevalence of L1-L7  
480 in Madagascar and Mozambique (cf. S2\_Table for data source)

481

482 Table 1: geographic distribution of the 156 SIT109 clinical isolates within the 6 provinces of  
 483 Madagascar during the study period  
 484

Isolation year \ Province	1995	1996	1997	1999	2000	2001	2002	2003	2005	2006	2007	2008	2009	2010	total
Antananarivo	2	1	2	3	4	3	1	1	8	3	4	17	4	6	59
Antsiranana										3					3
Fianarantsoa									13	10	4				27
Mahajanga	1		1					1	12	2	1				18
Toamasina										13					13
Tulear							1		10	22	3				36
total	3	1	3	3	4	3	2	2	43	53	12	17	4	6	156

485  
 486



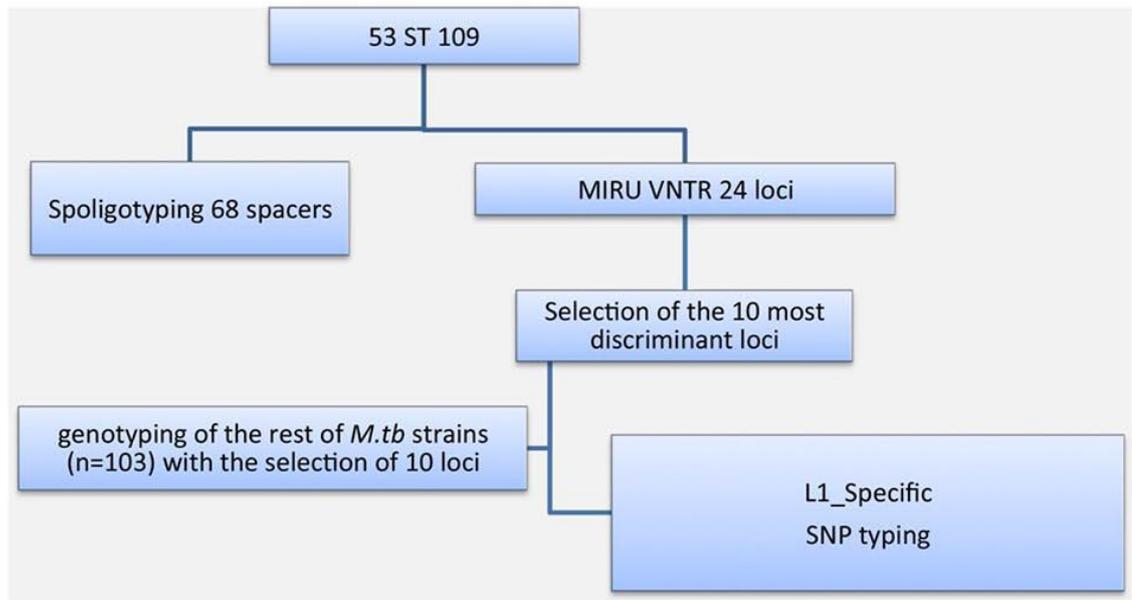
492 Table 3: Comparison of HGDI of different *M. tuberculosis* genotyping methods for L1/SIT109  
493 clinical isolates  
494

Method	Spoligotyping with 68 spacers	24 MIRU-VNTR	Selection of 10 MIRU-VNTR	Selection of 10 MIRU-VNTR
Samples	1 <sup>st</sup> sample 53 L1/SIT109	1 <sup>st</sup> sample 53 L1/SIT109	1 <sup>st</sup> sample 53 L1/SIT109	2 <sup>nd</sup> sample 156 L1/SIT109
HGDI	0.111	0.978	0.970	0.981

495

496

497 Fig.1

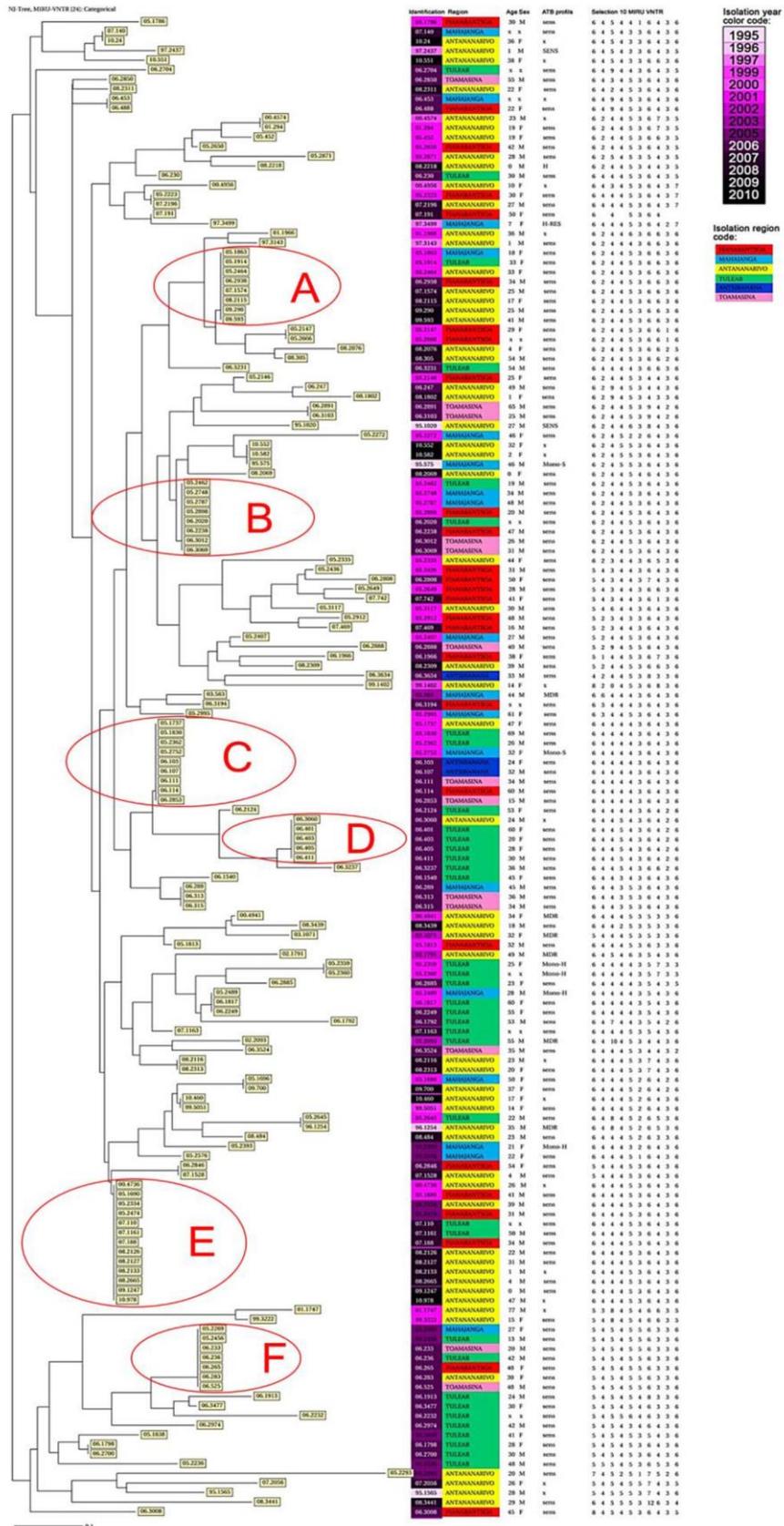


498

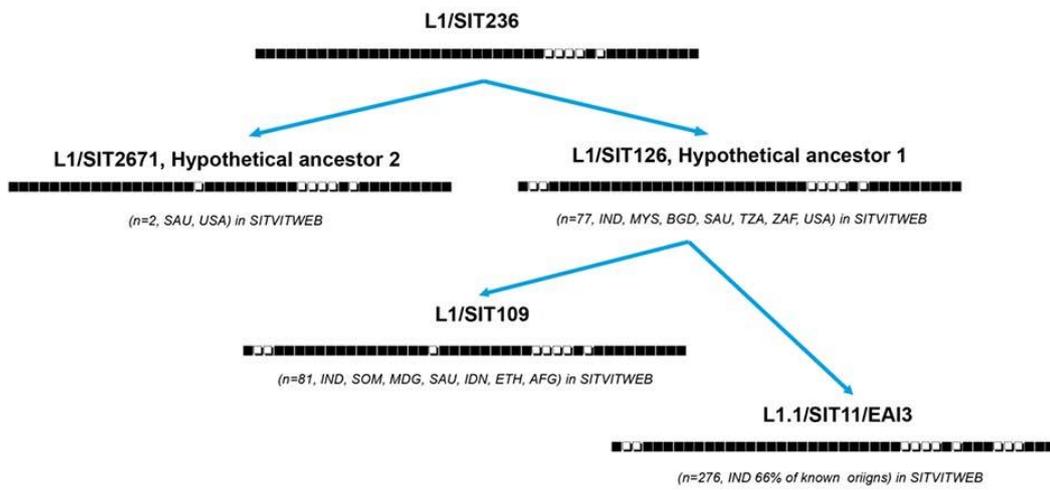
499

500 Fig.2

501



502 Fig.3



### **IV.3 CONCLUSION DE L'ETUDE 2**

Cette étude nous a permis de voir la grande diversité des souches SIT109 après leur sous typage par les MIRU-VNTR. Cette étude a aussi montré que ces souches sont présentes dans toutes les provinces de Madagascar pendant toute la période de l'étude. Ceci nous amène à conclure que ces souches ont circulé depuis longtemps à Madagascar, un temps où elles ont pu évoluer longuement. Leur distribution dans toute l'île, démontrant leur large transmission, nous permet de conclure que la transmission de la TB à Madagascar se fait à très grande échelle spatiale et qu'une souche donnée a le potentiel de se transmettre partout dans l'île.

## V ETUDE 3 : EVALUATION DES ZONES HOTSPOTS DE TUBERCULOSE A ANTANANARIVO, MADAGASCAR PAR COMBINAISON D'ANALYSE SPATIALE ET DE GENOTYPAGE (Article 3)

### V.1 PRESENTATION DE L'ETUDE

Différentes méthodologies ont été utilisées antérieurement pour faire des études de surveillance de la TB. Des études basées sur l'épidémiologie classique par des enquêtes directes auprès des patients ont permis de mieux comprendre les facteurs de risques liées à la tuberculose malgré la lourdeur des méthodes utilisées ainsi que les biais engendrés. D'autres études basées sur l'épidémiologie moléculaire ont permis de retracer les infections, de mesurer le niveau de transmission de la TB et l'échelle à laquelle se fait la transmission. D'autres études basées sur des analyses spatiales intégrant le SIG ont permis d'identifier des signatures spatio-temporelles particulières de la distribution des maladies, des patients ou des facteurs de risque. Cependant, utilisées seules, ces méthodes ne permettent pas de constituer un véritable outil de surveillance de la TB.

De récentes études combinant analyses spatiales et épidémiologie moléculaire ont permis d'identifier des zones à fort risque de transmission de la TB dans le monde (Ribeiro *et al.*, 2015 ; Moonan *et al.*, 2012 ; Izumi *et al.*, 2012). Ces approches combinées semblent révolutionner la surveillance des maladies transmissibles. Premièrement, les méthodologies sont relativement moins lourdes, et deuxièmement, ces outils servent d'aide à la décision pour la lutte contre la TB. En effet, la détermination des zones à forte risque de transmission de la TB serait un atout majeur pour la détermination des zones clés pour les actions de lutte contre la TB.

Récemment, des études ont démontré l'existence d'agglomération significative de cas de TB (clusters spatiaux de cas de TB) à Antananarivo, la capitale de Madagascar. Ces agglomérations constitueraient des zones à forte charge de TB. Cependant, ces types d'étude ne distinguent pas les cas de TB transmis récemment et les cas de réactivation de TB latente acquis plus ou moins loin dans le temps. Ce qui est intéressant en matière de santé publique c'est de pouvoir identifier là où il y a de la transmission non contrôlée, Donc de la transmission de TB active et récente. L'hypothèse serait que les souches ayant des génotypes

communes auraient plus de chance d'appartenir à une chaîne récente de transmission tandis que les souches avec des génotypes uniques auraient plus de chance de ressurgir de la réactivation de TB latente. Cela signifie que les éventuelles zones d'agglomération significative de ces souches appartenant à une chaîne de transmission récente de TB seraient potentiellement des zones à forte transmission de TB.

C'est ce qui nous a mené à notre objectif de monter un outil de surveillance de la TB à Madagascar en combinant des méthodes d'analyse spatiale et des méthodes d'épidémiologie moléculaire en particulier la technique du spoligotypage. La méthodologie consiste à identifier les souches susceptibles de provenir d'une chaîne de transmission récente, c'est-à-dire les souches ayant les mêmes génotypes. L'étude pilote se fera dans la commune urbaine d'Antananarivo (CUA), la capitale de Madagascar. Cette méthode pourrait servir pour la recherche des zones de transmission active de la TB à Madagascar mais aidera également le PNLT pour le choix des zones prioritaires pour les actions de lutte contre la TB.

Pour cela, les nouveaux cas de TB résidant dans la CUA et consultant les centres de diagnostic et de traitement de la TB (CDT) à Antananarivo ont été recrutés pendant une période de 9 mois. Leurs crachats ont été mis en culture et typés par le spoligotypage sur la plateforme Luminex 200. Les cas ont été localisés selon le quartier de résidence des patients correspondants. Ces cas ayant des souches clusterisées génotypiquement avec d'autres (PRS / « Patients associated with strains with Repeated Spoligotype ») sont scannés par la méthode de balayage spatial de Kulldorff afin de déterminer des tendances d'agglomération significative (clusters spatiaux). Les quartiers (Fokontany) touchés par les clusters spatiaux constitueraient les zones à risque de transmission de la TB.

V.2 ARTICLE 3

BMC Infectious Diseases

## RESEARCH ARTICLE

Open Access



# Assessment of tuberculosis spatial hotspot areas in Antananarivo, Madagascar, by combining spatial analysis and genotyping

Noël Harijaona Ratovonirina<sup>1,2</sup>, Niaina Rakotosamimanana<sup>1</sup>, Solohery Lalaina Razafimahatratra<sup>1</sup>, Mamy Serge Raheison<sup>1,3</sup>, Guislaine Refrégier<sup>2</sup>, Christophe Sola<sup>2</sup>, Fanjasoa Rakotomanana<sup>4</sup> and Voahangy Rasolofo Razanamparany<sup>1\*</sup>

## Abstract

**Background:** Tuberculosis (TB) remains a public health problem in Madagascar. A crucial element of TB control is the development of an easy and rapid method for the orientation of TB control strategies in the country. Our main objective was to develop a TB spatial hotspot identification method by combining spatial analysis and TB genotyping method in Antananarivo.

**Methods:** Sputa of new pulmonary TB cases from 20 TB diagnosis and treatment centers (DTCs) in Antananarivo were collected from August 2013 to May 2014 for culture. *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) clinical isolates were typed by spoligotyping on a Luminex® 200 platform. All TB patients were respectively localized according to their neighborhood residence and the spatial distribution of all pulmonary TB patients and patients with genotypic clustered isolates were scanned respectively by the Kulldorff spatial scanning method for identification of significant spatial clustering. Areas exhibiting spatial clustering of patients with genotypic clustered isolates were considered as hotspot TB areas for transmission.

**Results:** Overall, 467 new cases were included in the study, and 394 spoligotypes were obtained (84.4%). New TB cases were distributed in 133 of the 192 Fokontany (administrative neighborhoods) of Antananarivo (1 to 15 clinical patients per Fokontany) and patients with genotypic clustered isolates were distributed in 127 of the 192 Fokontany (1 to 13 per Fokontany). A single spatial focal point of epidemics was detected when ignoring genotypic data ( $p = 0.039$ ). One Fokontany of this focal point and three additional ones were detected to be spatially clustered when taking genotypes into account ( $p < 0.05$ ). These four areas were declared potential TB transmission hotspots in Antananarivo and will be considered as priority targets for surveillance in the future.

**Conclusion:** This method, combining spatial analysis and TB genotyping will now be used for further focused clinical and epidemiological studies in Madagascar and will allow better TB control strategies by public health authorities.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*, Geographic Information System, Genotyping, Spatial cluster, Antananarivo

\* Correspondence: vrasolof@pasteur.mg

<sup>1</sup>Unité des Mycobactéries, Institut Pasteur de Madagascar, Antananarivo, Madagascar

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2017 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

## Background

Tuberculosis (TB), caused by *Mycobacterium tuberculosis* complex (*M. tuberculosis*), remains one of the deadliest infectious diseases worldwide. In 2014, 9.6 million people contracted TB and 1.5 million died from the disease [1]. The number of deaths due to TB slowly declined between 2000 and 2013 due to effective diagnosis and treatment, but remains unacceptably high [2].

Spoligotyping is a method investigating the diversity at a highly variable CRISPR locus evolving by deletion in *M. tuberculosis* complex [3]. Spoligotyping has been widely used to classify *M. tuberculosis* clinical isolates by family and subfamily [4, 5] that were later found to be largely concordant with lineages as defined by a whole genome sequencing (WGS) approach, allowing single nucleotide polymorphisms (SNPs) to be identified [6]. In addition and despite a relatively low discrimination level of spoligotyping [7, 8] it can be used for first genetic identification of patient's clinical isolates and suggest or exclude recent transmission cases which should be investigated further using more discriminatory methods [7, 9, 10]. Previous studies demonstrated that spatial clustering of TB data when associated to genetic clustering of TB cases more easily allows to focus on adequate settings to distinguish most vulnerable populations and reactivation versus recent transmission cases [10–13].

Hence, geospatial tools may be helpful to study the TB dynamics of urban areas with high prevalence of TB. Geospatial tools incorporating Geographic Information Systems (GIS) enable the identification and mapping of spatiotemporal clustering of disease or patients [14]. The GIS method has been used to study the spatial distribution of human TB cases and has identified the heterogeneity of epidemic areas [10, 15]. To confirm recent TB transmission, isolates must be found to be clonal. Clonality must then be investigated by more discriminatory genotyping methods. In Antananarivo, an exhaustive thorough genomic characterization of clinical isolates either by 24 MIRU-VNTR or by WGS remains out of reach for economic reasons for the time-being. For this reason, we chose a classical spoligotyping approach, which remains a first-line method to characterize clinical isolates in resource-limited countries. Such a combination of approaches (spatial and genetic clustering) is interesting to locate spatial clusters of TB and attempt to assess where recent TB transmission cases may occur.

In Madagascar, the incidence of TB in 2013 was estimated to be approximately 233/100,000 inhabitants [16]. TB prevalence distribution in Madagascar is likely heterogeneous with particularly high rates in specific areas driven by uncontrolled transmission, as in most resource-limited countries with either remote or isolated settings [15, 17, 18]. A crucial element of TB control efforts is the identification of “TB Hotspot areas” for the orientation of

TB control strategies given the lack of resources. Therefore it would be beneficial for the TB program to have a tool for targeting areas of high transmission risk where interventions should be concentrated. Previous studies using genotyping techniques on clinical isolates have shown a large diversity of circulating *M. tuberculosis* genotypes in Madagascar [19–21]. A preliminary study based on TB notification rates identified spatial aggregation of TB cases in Antananarivo [15, 17]. This aggregation could be due either to actual transmission and/or to reactivation cases. Our aim here was to accumulate evidence concerning the possibility that previously identified TB hotspot areas in Antananarivo could be linked to transmission events.

We used a combination of spatial tools and genotyping to identify potential high-prevalence and likely higher recent transmission risk, TB areas in Antananarivo, Madagascar, as done recently in Brazil and Japan [11, 12]. These methods will be used in Madagascar for further understanding of the TB epidemiology in Antananarivo and the identification of priority targets for TB control strategies.

## Methods

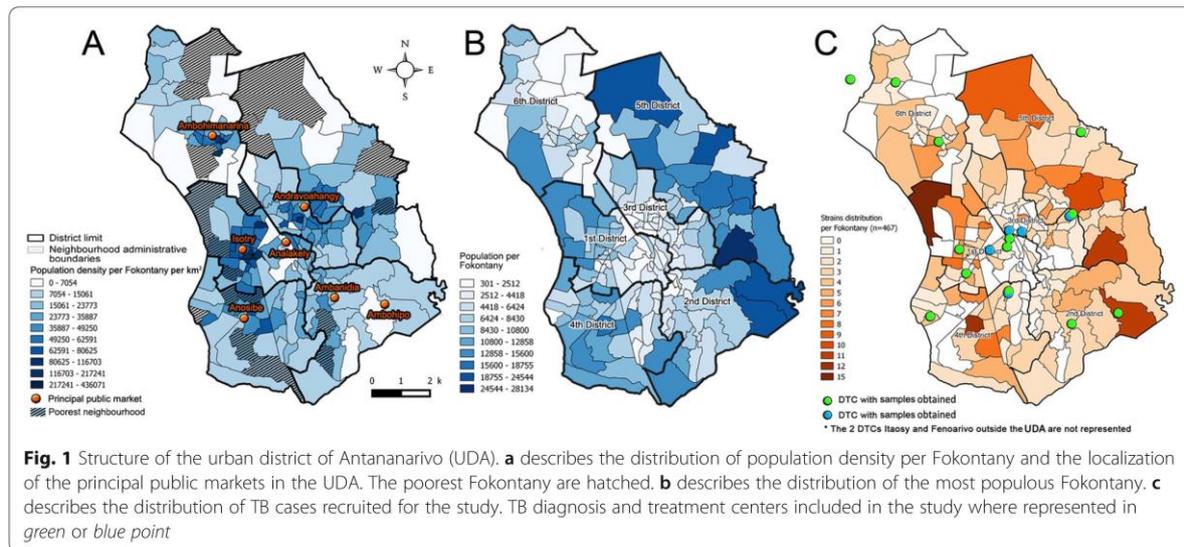
### Study area

The study was carried out in Antananarivo, the capital of Madagascar (surface area = 90 km<sup>2</sup>; 1.1 million inhabitants). Antananarivo is divided into six districts and sub-divided into 192 “Fokontany” that are administrative neighborhoods. Population density per Fokontany and population size is highly heterogeneous, as in many large cities (Fig. 1a and b); the poorest neighborhoods were classified by average household income; the 25% of all neighborhoods with the lowest average income were assigned as “poorest neighborhoods”; the most populous and poorest neighborhoods are localized in the periphery (Fig. 1a and b) [22]. Some public markets are distributed in the densest zones (Fig. 1a). There is circulation of poorest and most vulnerable populations in these public markets. The first district is among the poorest and most populous in Antananarivo. Cases were diagnosed and treated in TB diagnosis and treatment centers (DTCs) indicated in Fig. 1c.

Fokontany were identified by conventional alphanumeric codes and were geolocalized by their centroid. Data of the population census of the 192 Fokontany were provided by the Development Office of Antananarivo (DOA) and poorest neighborhoods were described previously [22].

### Study population

New confirmed TB cases for individuals were included without age limitation between August 2013 and May 2014 ( $n = 523$ ). Only patients living in Antananarivo for at least one year have been recruited since they are more



likely to have got TB in this study area. All 17 DTCs in the study area and three reference DTCs in the suburban zone of Antananarivo (Fenoarivo, Ambohibao, and Itaosy), totaling 20 DTCs were included in the study. The DTC of the central jail was excluded because of the potential transmission bias associated with this last area.

For each recruited patient, the objectives and nature of the study were explained by a DTC agent. Information written in Malagasy language was given to any patient or parents for children under 18 years. He/she was then asked if he/she agrees to participate in the study. Study subjects were allowed to refuse to participate in the study or withdraw from the study at any time without prior justification. When the subject agreed to participate in the study, he/she signed the informed consent form. An interview was conducted and the information was collected on a form. The residence address and Fokontany were recorded for every patient. The residence address provided by the patients in the questionnaire was confirmed by the DTC registers.

**Genotyping**

Fresh sputa were collected, stored, and cultured on Lowenstein Jensen (LJ) solid medium. Raw DNA was obtained from the clinical isolates by heating and killing a suspension of a culture colony in a hot dry bath at 80 °C for 30 min. After centrifugation at 13,000 \* G for 5 min, supernatant was transferred in a new tube and conserved at -20 °C. Raw DNA was shipped at -20 °C to Orsay, France where the spoligotyping was performed directly using a Luminex 200 platform as described by Zhang [23]. The spoligotype profiles were identified by their Shared-type (SIT – Spoligotyping International Types) and

lineage designation by using the SpolDB4/SITVITWEB rules and classification [4]. Moreover, to fit with current genome-based lineage designations, L1-L7 lineage labels were added to spoligotype families [24, 25]. Given the modest benefit of spoligotyping value when used alone in molecular epidemiological studies, we did not infer any recent transmission rate based on spoligotyping-based clustering, but used the genotyping information to correlate spatial and genetic clustering as a clue to define “Hot Spot TB area”.

**Spatial analysis**

TB patients were localized according to their Fokontany of residence. All data on the population denominators per Fokontany and metadata used for mapping were provided by the DOA. All TB patients and patients with genotypic clustered isolates (patients associated with isolates with repeated spoligotype or PRS) were scanned separately using the Kulldorff spatial scanning method. The populations per Fokontany with SaTScan™ were considered for the spatial analyses (<http://www.satscan.org>) [26]. For Satscan® parameters, a maximum radius of 1 km was defined for the spatial scanning. A p-value <0.05 determined by conducting Monte Carlo replications was considered to be statistically significant. We assumed that the number of TB patients in each Fokontany fits with the Poisson distribution. The identified Fokontany associated with spatial clusters representing TB focal points of epidemics were mapped using QuantumGis 2.8® (QGIS Development Team, 2013). Areas representing focal points of epidemics with highly genetically related isolates (clustered by spoligotyping) were considered to be potential TB hotspot transmission areas.

## Results

### Study participants

A total of 523 TB patients were recruited from 14 of the 20 DTCs included in the study. The recruited patients were localized to 142 of the 192 Fokontany of Antananarivo (1–15 patients/Fokontany). Fifty-six patients were excluded (the addresses of 46 patients were confirmed outside the study area and residence's Fokontany of 10 patients could not be identified). Among the 467 remaining included patients, 427 (91.4%) had positive bacterial cultures identified from the LJ-growth media (Fig. 2).

### Genotypic diversity of the clinical isolates

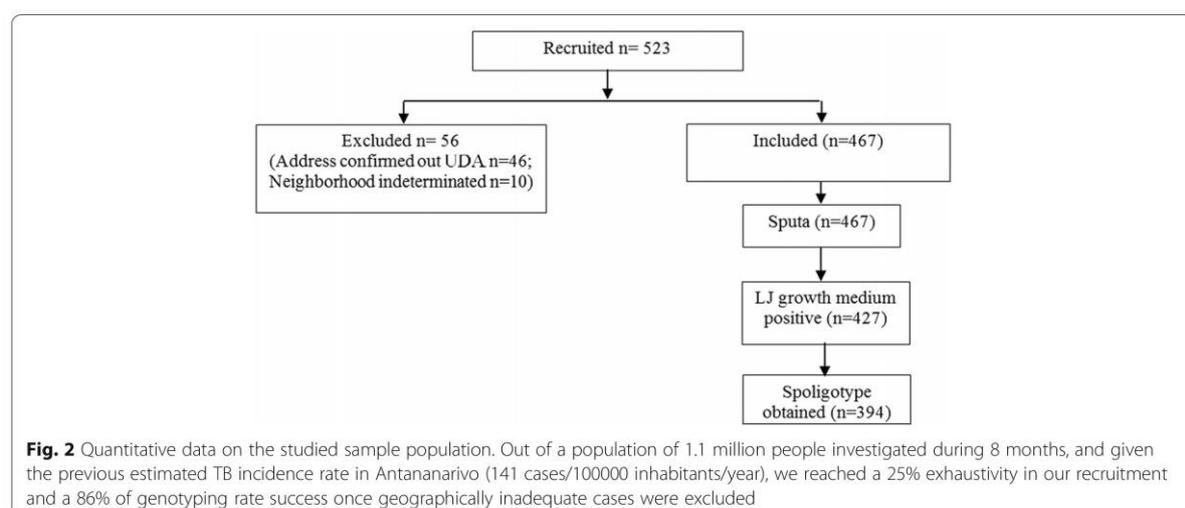
We obtained 88 individual spoligotype profiles from 394 clinical isolates (84.4% of the 467 recruited patients). We could not type 73 (16%) clinical isolates as 40 cultures were negative and 33 spoligotypes were non-interpretable. Of the individual 88 spoligotype profiles, 47 were unique and 41 were clustered, totaling 347 clustered isolates, found in clusters of 2 to 39 clinical isolates (Additional file 1: Table S1).

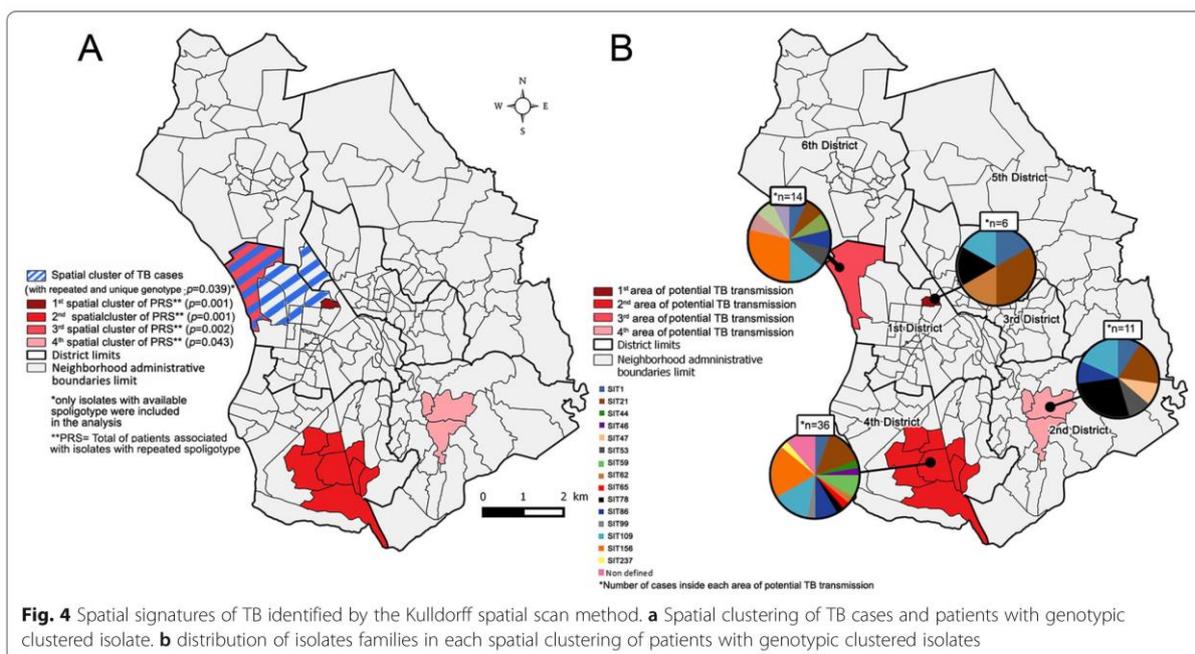
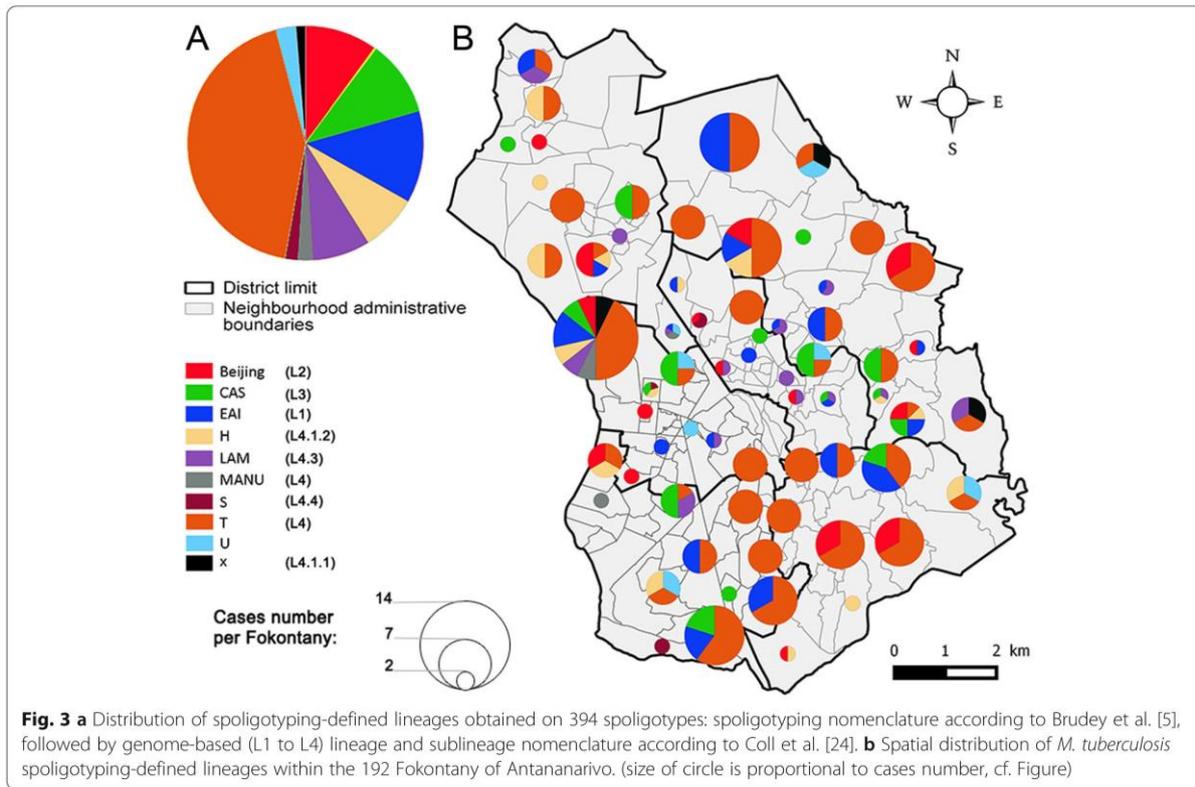
Clinical isolates belonging to the Euro-American/T spoligotyping family (included in Lineage 4; 43.1%) predominated, followed by the EAI lineage (Lineage 1; 12.7%), and the CAS lineage (Lineage 3; 10.4%), whereas the Beijing lineage (Lineage 2), the LAM, and the H sublineages (both belonging to Lineage 4) did not exceed 10% of the studied clinical isolates (Fig. 3). The 14 most prevalent SITs constituted 70.0% of all spoligotypes (276/394). Most prevalent SITs (more than 30 cases) were: SIT86 (T family), SIT1 (Beijing lineage), SIT156 (T family), SIT109 (EAI lineage), SIT21 (CAS lineage) (Additional file 1: Table S1).

### Spatial analysis

Residences of the included patients ( $n = 467$ ) were distributed in 133 of the 192 Fokontany (Fig. 1c). Spatial observations showed that the highest number of TB cases was observed in Fokontany Andohatapenaka II in the 1st district ( $n = 15$ ) whereas the district with the highest number of TB cases was the 5th district (112/467; 24.0%). The relatively most populous Fokontany at the periphery of Antananarivo had the higher TB cases number compared to the center of the city (3rd district) (Fig. 1b, c).

With the spatial scanning method of Kulldorff, we observed one significant spatial cluster of TB cases ( $p = 0.039$ ) formed by 6 Fokontany (localized in the 1st and the 6th neighboring districts) (Fig. 4a). The 394 patients with genotyped clinical isolates were distributed in 133 Fokontany. The patients with genotypic clustered isolates ( $n = 347$ ) were distributed in 127 of these 133 Fokontany (1 to 13 isolates per Fokontany); and when scanning these 347 patients, four significant spatial clusters were observed (Fig. 4a): a first cluster formed by one Fokontany (Antohomadinika Afovoany) in the 1st District ( $p = 0.001$ ), a second formed by eight Fokontany of the 4th District ( $p = 0.001$ ), a third cluster in one Fokontany (Andohatapenaka II) in the 1st district ( $p = 0.002$ ) which overlapped with the spatial cluster of all TB cases (Fig. 4a), and a 4th cluster formed by three Fokontany in the 2nd district ( $p = 0.043$ ). These spatial clusters represent potential areas of TB transmission. The spoligotype diversity in each spatial clustering is presented in Fig. 4b. The first area with potential TB transmission included two SIT21 isolates. There were seven SIT156 isolates in the second area, followed by SIT21 ( $n = 5$ ) and SIT109 ( $n = 5$ ). SIT156 ( $n = 4$ ) and





SIT109 ( $n = 2$ ) predominated in the 3rd area with potential TB transmission and SIT78 ( $n = 3$ ) and SIT59 ( $n = 3$ ) predominated in the 4th area (Fig. 4b). These TB hotspots could not be detected on the spatial distribution of the 11 lineages (Fig. 3b).

## Discussion

This study aimed to determine the spatial signature of TB by using a combination of genotyping and geospatial tools across the urban city of Antananarivo, Madagascar. The complementarity of both the genotyping and spatial analyses approaches has been used for the determination of TB transmission areas and risk studies in Brazil and Japan [11, 12]. These two methods are not new but they had never been combined for the detection of potential high risk areas of TB transmission in Antananarivo.

The combination of GIS and spoligotype data identified four hotspots with potential TB transmission in the city of Antananarivo. Analysis of all TB cases (without distinction of genotypic clustering of strains) identified a TB disease focal point overlapping with one of the potential transmission area (constituted by the Fokontany of Andohatapenaka II). TB hotspots such as that detected by the analysis taking only spatial data into account is likely constituted simultaneously by patients linked by indirect and relatively ancient TB transmission and by patients linked by local and recent TB transmission. Spatial clustering of patients with genotypically clustered isolates may therefore concern more patients associated with local and recent transmission. Additionally, our combination of approaches permitted the detection of spatial clusters of TB patients which were not detected with only the spatial scan of TB cases. TB transmissions might have occurred in these areas. For definitive proof of TB transmission, more discriminatory genotyping tools should however be used.

While previous studies determined risk factors associated with spatial clustering of TB cases in Antananarivo [15, 18], risk factors associated with transmission were poorly investigated. The first potential transmission hotspot is constituted by the Fokontany of Antohomadinika Afovoany that is localized in one of the poorest neighborhood in the 1st urban district of Antananarivo. Most of the houses in this area are made of precarious wooden hovels and the majority of the local population does not have standard health care access. While life under fragile conditions and environmental factors [14, 19] are known factors that contribute to TB reactivation [16], they could also foster local transmission as suggested by this study. The relatively high diversity of SITs seen in this poor area supports the previous findings that environmental factors also favor reactivation of latent TB. This area, containing the highest rate of TB, constitutes the first high risk area of TB transmission in Antananarivo.

The three other areas of potential TB transmission (#2, #3 and #4) host or lie close to three public markets (Anosibe, Isotry and Ambanidia market) where there is an important flow of people. Similar studies have shown that a flow of persons promotes TB transmission [11, 12]. This study further adds evidence for potential transmission in markets.

The discriminatory level of spoligotyping is relatively low, and the genotypic clustering cannot be used to estimate TB recent transmission rates. Thus isolates with the same spoligotype may be coming from different chains of transmission. However, when compared with isolates with single genotype, that might represent reactivation or relatively far recent transmission, these clustered isolates are more likely to have originated from recent spatially localized transmission. The aim of the study was to identify high risk areas, this limitation does therefore not invalidate this study and should be taken as a first step towards identification of real TB transmission hotspots.

From 1994 until 2000, studies of the *M. tuberculosis* genotype profiles present in Antananarivo reported six lineages and sub-lineages of *M. tuberculosis* clinical isolates: T, LAM, and H (Lineage 4), EAI (Lineage 1), CAS (Lineage 3), and Beijing (Lineage 2) [19]. The 6 lineages were shown to be present in the capital of Madagascar in 2004/2005, with the appearance of other minor sub-lineages such as S and X along with some unknowns (U) [27]. The distribution of the major circulating clinical isolates observed in these studies may have evolved slightly, but we noted no significant change since then, suggesting that all the lineages were being continuously transmitted in this area.

In this study, the population density in every studied Fokontany was taken into account, increasing the accuracy of spatial clustering identification. The use of spoligotyping as a first screen is a relatively simple and inexpensive method. It allowed us to identify clusters that were overlooked using only spatial information. We thus plan to keep this strategy as a first-line detection of potential transmission areas. A possible improvement in our approach would be the use of methods providing both spoligotyping and resistance data such as TB-SPRINT [28]. This high-throughput assay tests for rifampicin and isoniazid resistance simultaneously with spoligotyping on Luminex. It could be a useful strategy in the near future to survey and prevent the spread of MDR-TB cases.

Another limit of this study was the short recruitment time (9 months). However, this recruitment period was sufficient to achieve a large sample size, and given the stability of the population, such duration should not have created too much bias. Some of the enrolled patients did not agree to give consent to participate in the study, those residing in Antananarivo Renivohitra consulting with DTCs outside Antananarivo, and those not consulting with a DTC had to be removed from the inclusion. Finally, we

chose the patient residence to perform the spatial analysis although the patient residence is clearly not the unique site of possible TB transmission. Activity areas have been linked to transmission in other studies [11, 12]. We still chose to locate TB cases according to the residential Fokontany since people with most poor living condition and without work circulate most of their time in the same Fokontany in Antananarivo. A further investigation using the combined spatial methods on both working and residential areas could still be useful for TB epidemiological surveillance.

## Conclusion

Areas of high risk of TB transmission were suggested by the combination of *M. tuberculosis* spoligotyping and spatial analysis in the Urban District of Antananarivo. This method may be helpful for TB epidemiological surveillance in Madagascar and developing countries for guiding TB control strategies by the identification of priority target areas. Massive active diagnosis for children and susceptible persons can be suggested in these areas, as well as intense of TB awareness.

## Additional file

**Additional file 1: Table S1.** Distribution of the 88 spoligotypes obtained with the 394 typed patients. (DOCX 38 kb)

## Acknowledgements

The "Projet interne" of the Institut Pasteur de Madagascar funded the work. Our thanks go to the "Programme National de Lutte Contre la Tuberculose" represented by the Dr. Andrianantenaina RAKOTOSON for the authorization to conduct this study, the officials and staff of the various "Centre de Diagnostic et de Traitement de la Tuberculose", the Mycobacteria Unit of the IPM, the SIG cell of the Epidemiology Unit of IPM, and the IGEPE team of the Institute of Integrative Cell Biology, UMR9198, CEA-CNRS-University Paris Saclay, France, for their collaboration. We are also grateful to the TB patients who accepted to participate and provided biological samples to perform this study and the Development Office of Antananarivo (DOA) for the different datas used for the study.

## Availability of data and materials

All data generated or analyzed during this study are included in this published article and in the Additional file 1: Table S1.

## Authors' contributions

NHR: Initiated the research, wrote the study design, conducted the research, did data entry and analysis and wrote the manuscript. NR: Was involved in the data analysis and in the write up of the manuscript. SLR: Conducted a part of the research and participated in data analysis. MSR: Participated in the study design and in the conducting of the research. GR: Initiated the research. CS: Served as co-supervisor, initiated the research and write up the manuscript. FR: Served as co-supervisor, initiated the research involved in data analysis and write up the manuscript. VR: Served as main supervisor, initiated the research, involved in data analysis and write up the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## Ethics approval and consent to participate

The study was approved by the ethics committee of the Malagasy Ministry of Public Health (Authorization No: 057MSANP/EC – 04th July 2013).

## Consent for publication

Not applicable.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## Author details

<sup>1</sup>Unité des Mycobactéries, Institut Pasteur de Madagascar, Antananarivo, Madagascar. <sup>2</sup>Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 91198 Gif-sur-Yvette cedex, France. <sup>3</sup>Programme National de Lutte contre la Tuberculose (PNLT), Ministère de la Santé, Antananarivo, Madagascar. <sup>4</sup>Unité d'Epidémiologie, Institut Pasteur de Madagascar, Antananarivo, Madagascar.

Received: 24 March 2017 Accepted: 30 July 2017

Published online: 14 August 2017

## References

- WHO. Global Tuberculosis report 2015; 2015.
- WHO. WHO Report 2014. Global tuberculosis control 2014; 2014.
- Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol.* 1997;35(4):907–14.
- Demay C, Liens B, Burguière T, Hill V, Couvin D, Millet J, et al. SITVITWEB—a publicly available international multimarker database for studying *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity and molecular epidemiology. *Infect Genet Evol.* 2012;12(4):755–66.
- Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, Prodinger WM, Gori A, Al-Hajj SA, et al. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol.* 2006;6:23.
- Comas I, Homolka S, Niemann S, Gagneux S. Genotyping of genetically monomorphic bacteria: DNA sequencing in *Mycobacterium tuberculosis* highlights the limitations of current methodologies. *PLoS One.* 2009;4(11):e7815.
- Stucki D, Ballif M, Egger M, Furrer H, Altpeter E, Battegay M, et al. Standard genotyping overestimates transmission of *Mycobacterium tuberculosis* among immigrants in a low incidence country. *J Clin Microbiol.* 2016;54(7):1862–70.
- Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rusch-Gerdes S, Willery E, et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2006;44(12):4498–510.
- Small PM, Hopewell PC, Singh SP, Paz A, Parsonnet J, Ruston DC, et al. The epidemiology of tuberculosis in San Francisco—a population-based study using conventional and molecular methods. *N Engl J Med.* 1994;330(24):1703–9.
- Moonan PK, Ghosh S, Oeltmann JE, Kammerer JS, Cowan LS, Navin TR. Using genotyping and geospatial scanning to estimate recent *Mycobacterium tuberculosis* transmission, United States. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(3):458–65.
- Izumi K, Ohkado A, Uchimura K, Murase Y, Tatsumi Y, Kayebeta A, et al. Detection of tuberculosis infection hotspots using activity spaces based spatial approach in an Urban Tokyo, from 2003 to 2011. *PLoS One.* 2015;10(9):e0138831.
- Ribeiro FK, Pan W, Bertolde A, Vinhas SA, Peres RL, Riley L, et al. Genotypic and spatial analysis of *Mycobacterium tuberculosis* transmission in a high-incidence urban setting. *Clin Infect Dis.* 2015;61(5):758–66.
- Gurjav U, Burneebaatar B, Narmandakh E, Tumenbayar O, Ochirbat B, Hill-Cawthorne GA, et al. Spatiotemporal evidence for cross-border spread of MDR-TB along the Trans-Siberian Railway line. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2015;19(11):1376–82.
- Kulldorff M, Nagarwalla N. Spatial disease clusters: detection and inference. *Stat Med.* 1995;14(8):799–810.
- Randremanana RV, Sabatier P, Rakotomanana F, Randriamanantena A, Richard V. Spatial clustering of pulmonary tuberculosis and impact of the care factors in Antananarivo City. *Tropical Med Int Health.* 2009;14(4):429–37.
- WHO. Tuberculose: profil de pays/Madagascar. 2014.
- Rakotosamimanana S, Mandrosovololona V, Rakotonirina J, Ramamonjisoa J, Ranjalahy JR, Rendremanana RV, et al. Spatial analysis of pulmonary tuberculosis in Antananarivo Madagascar: tuberculosis-related knowledge, attitude and practice. *PLoS ONE.* 2014;9(11):e110471.

18. Randremanana RV, Richard V, Rakotomanana F, Sabatier P, Bicout DJ. Bayesian mapping of pulmonary tuberculosis in Antananarivo, Madagascar. *BMC Infect Dis*. 2010;10(1):21.
19. Ferdinand S, Sola C, Chanteau S, Ramarakoto H, Rasolonavalona T, Rasolofo-Razanamparany V, et al. A study of spoligotyping-defined *Mycobacterium tuberculosis* clades in relation to the origin of peopling and the demographic history in Madagascar. *Infect Genet Evol*. 2005;5(4):340–8.
20. Razanamparany VR, Ménard D, Aurégan G, Gicquel B, Chanteau S. Extrapulmonary and pulmonary tuberculosis in Antananarivo (Madagascar): high clustering rate in female patients. *J Clin Microbiol*. 2002;40(11):3964–9.
21. Rasolofo-Razanamparany V, Auregan G, Ratsirahonana O, Raharimanana R, Ramarakoto H, Gicquel B, et al. Genetic polymorphism of *M. tuberculosis* strains in Antananarivo. *Arch Inst Pasteur Madagascar*. 1994;62(1):59–64.
22. Wachsberger J-M. Les quartiers pauvres à Antananarivo. *Autrepart*. 2009(3): 117–37. <http://www.cairn.info/revue-autrepart-2009-3-page-117.htm>. Accessed 3 June.
23. Zhang J, Abadia E, Refregier G, Tafaj S, Boschioli ML, Guillard B, et al. *Mycobacterium tuberculosis* complex CRISPR genotyping: improving efficiency, throughput and discriminative power of 'spoligotyping' with new spacers and a microbead-based hybridization assay. *J Med Microbiol*. 2010; 59(Pt 3):285–94.
24. Coll F, McNerney R, Guerra-Assunção JA, Glynn JR, Perdigão J, Viveiros M, et al. A robust SNP barcode for typing *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Nat Commun*. 2014;5:4812.
25. Coll F, Preston M, Guerra-Assunção JA, Hill-Cawthorn G, Harris D, Perdigão J, et al. PolyTB: a genomic variation map for *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*. 2014;94(3):346–54.
26. Kulldorff M. A spatial scan statistic. *Communications in statistics*. 1997;26:1481–96.
27. Rakotosamimanana N, Raharimanga V, Andriamandimby SF, Soares JL, Doherty TM, Ratsitorahina M, et al. 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*. 2010;17(7):1094–103.
28. Gomgnimbou MK, Hernandez-Neuta I, Panaiotov S, Bachiyiska E, Palomino JC, Martin A, et al. 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*. 2013;51(11):3527–34.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)



### **V.3 CONCLUSION DE L'ETUDE 3**

Cette dernière étude nous a permis de développer un outil associant génotypage et analyse spatiale pour identifier les zones à fort risque de transmission de la TB. Cet outil nous a permis d'identifier 4 zones potentiellement à risque de transmission de la TB dans la commune urbaine d'Antananarivo. Ces 4 zones doivent être prises en compte dans l'identification des zones prioritaires dans la lutte contre la TB à Antananarivo. Cet outil pourrait servir aux autorités compétentes pour rechercher les Hotspots de transmission de la TB dans tout Madagascar.

## VI DISCUSSION GENERALE

L'objectif principal de la thèse était de décrire le mode de transmission des souches *M. tuberculosis* à Madagascar afin de comprendre la dynamique de la TB et proposer un outil d'aide à la décision efficace permettant de cibler les actions de lutte contre la TB dans le pays. Les quelques questions d'où, où, comment et quand se transmet la TB ont pu trouver réponse même partiellement dans ces études. Il a été démontré ainsi par diverses approches que :

- Il existe une grande diversité de souches *M. tuberculosis* circulant dans toute l'île, toutes les lignées de souches existantes dans le monde sont présentes dans les 6 provinces avec des proportions plus ou moins différentes ;
- La transmission active de la TB est toujours d'actualité et se fait à très grande échelle à Madagascar ;
- les souches réputées les plus virulentes telles que les génotypes Beijing circulent à Madagascar ;
- la distribution des souches est différente entre la capitale et les provinces de l'île ;
- la souche SIT109 et beaucoup de souches de la sous lignée EAI8 endémiques et caractéristiques de Madagascar sont distribuées dans toute l'île, ce sont des souches qui ont évolué à l'intérieur de l'île depuis longtemps ;
- et enfin, il existe des zones à haut risque de transmission de la TB dans la capitale de Madagascar.

Du point de vue de la lutte contre la TB, cette étude nous a donc permis d'aborder les problématiques tels que la mise à jour et l'amélioration des connaissances sur les souches *M. tuberculosis* circulant à Madagascar, le mode et l'état actuel de la transmission de la TB et ainsi que l'échelle à laquelle se fait la transmission. Elle a également pu aider à identifier des zones clefs dans la lutte contre la TB même si ces résultats concernent la capitale seulement.

Par rapport aux données disponibles de caractérisation des BK à Madagascar, des mises à jour et améliorations ont été faites en utilisant des échantillons plus récents et plus nombreux. Pour la description des souches, l'échantillonnage est représentatif de toute l'île en représentant 19 des 22 régions du pays. C'est la première étude à décrire les souches des 4 provinces de Madagascar qui sont : Diego, Toamasina, Tuléar et Fianarantsoa. Cette étude a

été faite avec plus d'un millier de souches pendant une période de 2 ans et demi. Ce qui est correct et assez puissant pour une étude de description des BK circulant dans un pays.

Les méthodologies utilisées dans toutes ces études reposent toutes sur le spoligotypage, un outil de typage de *M. tuberculosis*. C'est un outil dont le niveau de discrimination n'est pas approprié pour des études de transmission de TB mais largement suffisant pour l'identification des souches ainsi que leur classification. Le spoligotypage est rapide, peu cher et est très reproductible. Ce qui fait que c'est la méthode la plus utilisée dans le monde jusqu'à maintenant pour le typage des souches *M. tuberculosis*. Plusieurs bases de données recueillent aujourd'hui des dizaines de milliers de spoligotypes obtenues à partir de souches isolées dans les quatre coins du monde (Demay *et al.*, 2012; Weniger *et al.*, 2010). Cependant sa réalisation dans notre cas a nécessité la culture des BK qui peut durer jusqu'à plusieurs semaines et le transport des crachats potentiellement infectieux des différents CDT vers le laboratoire de référence à l'Institut Pasteur de Madagascar. Une alternative serait d'utiliser les lames de diagnostic microscopique de la TB ou encore le papier buvard, comme source d'ADN, à la place des échantillons de crachat. Beaucoup d'études ont démontré des résultats prometteurs utilisant des extraits de lames pour le diagnostic de la TB (Cauwelaert *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2011; Suresh *et al.*, 2007). Cela diminue le risque infectieux et facilite également le transport en évitant les conditions de température rugueuses requises. Couplé avec la méthode MIRU-VNTR, le spoligotypage est encore aujourd'hui un outil incontournable pour les études d'épidémiologie moléculaire de *M. tuberculosis*.

L'étude sur le SIT109 constitue la première caractérisation de ces souches malgaches. Elle a permis d'obtenir des informations sur sa grande diversité et sur sa large distribution à Madagascar, mais également a permis d'avoir un aperçu du niveau d'évolution de ces souches ainsi que de connaître les souches qui leur sont rapprochées phylogénétiquement. L'étude a utilisé les méthodes de typage hautement discriminantes reconnues pour *M. tuberculosis* et a permis de développer une méthode de typage minimisée mais hautement discriminante de ces souches SIT109.

L'étude de l'identification des zones de transmission de TB comparée aux études d'épidémiologie classique basées sur les enquêtes directes auprès des patients tuberculeux a l'avantage de la rapidité. Les méthodes choisies ne sont pas nouvelles mais leur applications sont innovantes et passe par une approche multidisciplinaire. Elle ne nécessite pas de faire des enquêtes répétitives auprès des patients. De plus, elle n'est pas biaisée par la subjectivité et la

non précision des données fournies par les enquêtes. La méthode de typage des souches *M. tuberculosis* choisie est une méthode rapide et moins coûteuse comparée aux autres méthodes utilisées par les autres études utilisant la combinaison analyse spatiale et génotypage (Izumi *et al.*, 2015; Ribeiro *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2010). L'étude combinant analyse spatiale et biologie moléculaire a permis d'identifier des clusters spatiaux de cas de TB non identifiables par les analyses spatiales seules. En appliquant le Scan spatial de kulldorff sur nos échantillons, nous avons identifié un seul cluster spatial de cas de TB à côté des 4 clusters spatiaux identifiés quand on a distingué par la biologie moléculaire les cas appartenant probablement à des chaînes de transmission récente. En outre, des légers changements de la taille et de l'emplacement périodiques des clusters spatiaux de cas de TB à Antananarivo ont été démontrés par des études antérieures (Rakotosamimanana *et al.*, 2014; Randremanana *et al.*, 2009; Randremanana *et al.*, 2010). Nos données qui datent de 2013 constituent donc une mise à jour plus récente de la connaissance de ces clusters spatiaux de cas de TB à Antananarivo.

Toutefois des améliorations peuvent encore être apportées :

1. La durée de l'étude peut encore être réduite considérablement en remplaçant l'utilisation des crachats pour les tests par les lames de diagnostic microscopique de la TB. Des études antérieures ont montré la possibilité de faire des tests moléculaires à partir d'extraits de ces lames (Cauwelaert *et al.*, 2011; Van Der Zanden *et al.*, 2003). Cette alternative présente l'avantage de ne pas travailler sur des échantillons biologiques potentiellement infectieux et non conservables, et permettant la réduction du nombre de récolte dans chaque centre de Diagnostic de la TB en un seul voyage. Cela évite également de passer par la culture qui nécessite des attentes de plusieurs mois pour *M. tuberculosis* (Pfyffer *et al.*, 1997).
2. Le spoligotypage peut être remplacé par le TB-SPRINT*plus*, une méthode de typage des mycobactéries encore plus rapide et donnant à la fois les résultats du spoligotyping mais aussi teste la sensibilité de chaque souche à la rifampicine, l'isoniazide et à des antituberculeux de seconde ligne.

Des actions comme la détection active de la TB dans ces zones devraient être menées. La détection active a été prouvée pouvoir réduire considérablement la mortalité liée à la TB (Murray et Salomon, 1998) malgré des études antérieures pas très convaincantes menées en Europe et au Japon (Krivinka *et al.*, 1973) ainsi que le coût exorbitant de ce type

d'investigation (Murray et Salomon, 1998; Taylor et O'Brien, 2001). Pour améliorer le rapport cout efficacité de cette intervention dans ces zones potentiellement dangereuses, les populations les plus vulnérables (les enfants, les personnes âgées, les plus démunis ou les VIH-SIDA positives diagnostiqués) qui seront les premières cibles de la TB peuvent aussi être traitées spécialement.

Des études combinant génotypage et analyse spatiale ont aussi été faites dans quelques endroits du monde récemment (Izumi *et al.*, 2015; Ribeiro *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2010). À côté de ces études, en utilisant des outils relativement plus simples (spoligotypage + scan spatial), on est arrivé au même résultat de pouvoir identifier des zones à risque de transmission de la TB. Certaines de ces études ont pu démontrer des chaînes concrètes de transmission de la TB, mais dans le domaine de la santé publique, identifier ces cas concrets de transmission n'est pas si pertinent du fait que c'est tardif. L'explication est que les patients identifiés appartenant à la chaîne sont soit guéris (s'ils prennent la thérapie appropriée au moment de découvrir qu'ils sont malade de la TB) soit morts après l'identification de ces chaînes de transmission. Ils ont déjà aussi pu transmettre la TB à de nouveaux patients qui ne seront pas identifiés dans l'étude. Ce qui fait qu'aucune intervention n'est plus possible sur ces patients après avoir identifié qui les ont transmis la TB. Cependant à côté de ces autres études combinant analyse spatiale et génotypage, notre étude n'a pas pu étudier les facteurs de risques par manque de données sur l'environnement et les facteurs écologiques à Madagascar.

D'autres points très importants dans la lutte contre la TB n'ont pas été évoqués tels que :

la lutte contre la résistance aux antituberculeux. Pouvoir retracer spatialement les cas de résistance comme nous l'avons fait avec des génotypes serait fortement intéressant. Cela identifierait les zones de transmission de TB résistantes ou multi résistantes et de pouvoir y prendre des mesures. Le taux des souches avec le génotype Beijing, réputées pour être associées à la multirésistance aux antituberculeux, trouvées dans nos études est de 4,5%. Ce taux est relativement faible par rapport à d'autres pays avec une forte prévalence de la TB telle qu'en Russie (66,6%) (Drobniewski *et al.*, 2005) ou au Vietnam (An *et al.*, 2009). Ceci pourrait expliquer en partie le faible taux de résistance dans le pays (Taux de résistance primaire :0.2% et taux de résistance secondaire de 3.4%) (PNLT, 2013; Ramarokoto *et al.*, 2010a). La course aux nouveaux antibiotiques sont en cours actuellement (Koul *et al.*, 2011), de nouveaux antibiotiques ont été trouvés et seront validées bientôt pour permettre de

nouvelles thérapies plus efficaces et pour surmonter le problème de la résistance aux antituberculeux.

De même, la recherche de nouveaux vaccins est toujours d'actualité. Avoir à disposition un nouveau vaccin avec une efficacité continue chez les adultes serait un bond dans la lutte contre la TB. Seule une vaccination efficace peut freiner la transmission de la TB surtout dans les pays en voie de développement. L'immunité maintenue chez l'adulte peut également diminuer significativement la réactivation de la TB latente.

D'autres points importants sont aussi non négligeables pour l'amélioration de la lutte contre la TB à Madagascar comme :

Le dépistage des cas de TB non identifiés. Plusieurs cas de TB ne sont pas déclarés dans les CDTs. Ces cas cependant constituent des sources potentielles de nouveaux cas de transmission de la TB car en restant un certain temps sans traitement, ces personnes demeureront des cracheurs potentiels de BK.

L'éducation de la population sur la TB, sur le traitement et la prise en charge des cas de TB, sur le mode de vie à prendre pour se défendre de la maladie doit être améliorée. La non connaissance des moyens de prévention de la TB favorise la transmission de la maladie. La non connaissance de la prise en charge de la TB et des traitements laisse certains cas sans traitements et transforme aussi ces derniers en cracheurs de BK.

Le diagnostic de la TB latente. Une partie des cas de TB provient de la réactivation de la TB latente. Pouvoir traiter ces cas latents avant l'expression de la maladie diminuerait donc le nombre de cas mais élimine aussi des réservoirs potentiels de BK.

Le diagnostic de la sensibilité aux antituberculeux pour tous nouveaux cas de TB confirmés. Ces tests permettent de donner un traitement approprié aux nouveaux cas, évitent une reprise de nouvelle thérapie après plusieurs mois de thérapie non adaptée et améliore donc l'espérance de guérison des cas de TB en cour de traitement. L'amélioration du suivi des patients pour éviter les pertes de vue augmente aussi les chances de guérison des patients de TB.

Et dernièrement, l'identification des facteurs favorisant la transmission de la TB à Madagascar et la réémergence des cas de TB latente est essentielle. La connaissance des facteurs de risque permet d'orienter les stratégies de lutte contre la TB. Cela permet d'agir sur

les facteurs écologiques ou anthropologiques favorisant la transmission de la TB ou la réémergence de la TB latente.

## VII CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

La TB est une maladie encore endémique à Madagascar. Malgré l'existence de dépistage et un traitement disponible de la TB suivant les normes de l'OMS, le taux de prévalence et d'incidence de la TB reste encore élevé.

Une part de la TB malgache a pu être importée par le peuplement d'origine malgache mais la majorité des cas actuels semblent être importés assez récemment de partout dans le monde. La TB se transmet encore continuellement dans tout Madagascar à grande échelle jusqu'à nos jours. Certaines zones présentent des agglomérations de cas de TB dû à des facteurs de risque encore mal connus.

Dans la capitale, des zones à risque de transmission de la TB ont été démontrées dans les Fokontany d'Antohomadinika Afovoany, SoanieranaIIIJ, Madera Namontana, Soanierana cité gare, Fiadanana, Angararangana, MangrangobatoII, Andrefan'i Mananjara, Andrefan'Ankadimbahoaka, Ambanidia, Ambatoroka, et Ambohimandra.

La TB actuelle à Madagascar est due surtout à des cas de transmissions récentes incontrôlées, mais aussi à la réactivation de TB latente acquise depuis plus longtemps.

L'association de techniques moléculaires de typage et d'analyses spatiales pourrait permettre de mieux identifier les zones à risque de transmission de TB à Madagascar et de mieux cibler les zones clefs dans la lutte contre la TB à Madagascar.

### **Perspectives :**

Pour compléter ces résultats il serait aussi intéressant :

De typer les souches tuberculeuses avec des marqueurs plus discriminants tels que les MIRU VNTR ou par WGS. Les marqueurs utilisés dans nos études possèdent un niveau de discrimination relativement faible. Augmenter le niveau de discrimination des méthodes de typage utilisées améliorerait la résolution des analyses.

De faire des études d'évolution des souches malgaches. Des études évolutives et de datation permettraient d'estimer les périodes d'apparition des souches malgaches ou encore les périodes d'importation de certaines souches circulant dans le pays.

D'identifier les zones de transmission des souches résistantes. Pouvoir identifier les zones de transmission des souches résistantes aux antituberculeux pourrait diminuer considérablement les cas de résistance primaire.

D'élargir l'identification des zones de transmission partout dans Madagascar avec un temps de recrutement plus large. Notre étude constituait une étude pilote pour l'identification des zones de transmission de la TB. Il serait intéressant de refaire ces analyses dans toutes les grandes villes de Madagascar.

Et de valider l'utilisation des lames de diagnostic microscopique de la TB pour les méthodes de typage des souches *M. tuberculosis*. Cela améliorerait nos méthodes en évitant les contraintes de transport des crachats lors de la période de recrutement et la culture des mycobactéries.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Abadia, E., J. Zhang, V. Ritacco, K. Kremer, R. Ruimy, L. Rigouts, H.M. Gomes, A.R. Elias, M. Fauville-Dufaux, and K. Stoffels. 2011. The use of microbead-based spoligotyping for *Mycobacterium tuberculosis* complex to evaluate the quality of the conventional method: providing guidelines for Quality Assurance when working on membranes. BMC infectious diseases 11:110.
2. Agerton, T., S. Valway, B. Gore, C. Pozsik, B. Plikaytis, C. Woodley, and I. Onorato. 1997. Transmission of a highly drug-resistant strain (strain W1) of *Mycobacterium tuberculosis*: community outbreak and nosocomial transmission via a contaminated bronchoscope. Jama 278:1073-1077.
3. Ainsa, J.A., E. Pérez, V. Pelicic, F.X. Berthet, B. Gicquel, and C. Martin. 1997. Aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase genes are universally present in mycobacteria: characterization of the aac (2')-Ic gene from *Mycobacterium tuberculosis* and the aac (2')-Id gene from *Mycobacterium smegmatis*. Molecular microbiology 24:431-441.
4. Ait-Khaled, N., D.A. Enarson, and T.B.I. Stop. 1999. Tuberculose: manuel pour les étudiants en médecine.
5. Al-Hajoj, S.A., T. Zozio, F. Al-Rabiah, V. Mohammad, M. Al-Nasser, C. Sola, and N. Rastogi. 2007. First insight into the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* in Saudi Arabia. J Clin Microbiol 45:2467-73.
6. Al-Orainey, I.O. 2009. Diagnosis of latent tuberculosis: Can we do better? Annals of thoracic medicine 4:5.
7. Alland, D., G.E. Kalkut, A.R. Moss, R.A. McAdam, J.A. Hahn, W. Bosworth, E. Drucker, and B.R. Bloom. 1994. Transmission of tuberculosis in New York City--an analysis by DNA fingerprinting and conventional epidemiologic methods. New England Journal of Medicine 330:1710-1716.
8. Allix-Béguec, C., D. Harmsen, T. Weniger, P. Supply, and S. Niemann. 2008. Evaluation and strategy for use of MIRU-VNTR<sub>plus</sub>, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. Journal of clinical microbiology 46:2692-2699.
9. An, D.D., N.T.H. Duyen, N.T.N. Lan, D.T.M. Ha, V.S. Kiet, N.V.V. Chau, N.H. Dung, D.N. Sy, J. Farrar, and M. Caws. 2009. Beijing genotype of *Mycobacterium tuberculosis* is significantly associated with high-level fluoroquinolone resistance in Vietnam. Antimicrobial agents and chemotherapy 53:4835-4839.

10. Anderson, R.M. 1998. Epidemiology, p. 75-116, *In* B. S. publications, ed. Modern parasitology - A textbook of parasitology, 2 ed, Oxford, Boston.
11. Andersson, D.I. 2003. Persistence of antibiotic resistant bacteria. *Current opinion in microbiology* 6:452-456.
12. Arnold, C. 2007. Molecular evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical microbiology and infection* 13:120-128.
13. Aronowitz, R. 2004. The Rise of Causal Concepts of Disease: Case Histories. Codell Carter K. Aldershot UK: Ashgate Publishing, 2003, pp. 248,(HB)£ 55.00 ISBN: 0-7546-0678-3. IEA.
14. Avise, J.C. 1998. The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology* 7:371-379.
15. Baker, L., T. Brown, M.C. Maiden, and F. Drobniowski. 2004. Silent nucleotide polymorphisms and a phylogeny for *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerg Infect Dis* 10:1568-1577.
16. Barnes, P.F., Z. Yang, S. Preston-Martin, J.M. Pogoda, B.E. Jones, M. Oyata, K.D. Eisenach, L. Knowles, S. Harvey, and M.D. Cave. 1997. Patterns of tuberculosis transmission in Central Los Angeles. *Jama* 278:1159-1163.
17. Barrangou, R., C. Fremaux, H. Deveau, M. Richards, P. Boyaval, S. Moineau, D.A. Romero, and P. Horvath. 2007. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315:1709-1712.
18. Basu, S., J.R. Andrews, E.M. Poolman, N.R. Gandhi, N.S. Shah, A. Moll, P. Moodley, A.P. Galvani, and G.H. Friedland. 2007. Prevention of nosocomial transmission of extensively drug-resistant tuberculosis in rural South African district hospitals: an epidemiological modelling study. *The Lancet* 370:1500-1507.
19. Benedek, T.G. 2004. The history of gold therapy for tuberculosis. *Journal of the history of medicine and allied sciences* 59:50-89.
20. Bharti, R., R. Das, P. Sharma, K. Katoch, and A. Bhattacharya. 2014. MTCID: a database of genetic polymorphisms in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 92:166-172.
21. Bhaya, D., M. Davison, and R. Barrangou. 2011. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annual review of genetics* 45:273-297.
22. Bibb, L.A., and G.F. Hatfull. 2002. Integration and excision of the *Mycobacterium tuberculosis* prophage-like element,  $\phi$ Rv1. *Molecular microbiology* 45:1515-1526.

23. Bibb, L.A., M.I. Hancox, and G.F. Hatfull. 2005. Integration and excision by the large serine recombinase  $\text{Int}\beta$  integrase. *Molecular microbiology* 55:1896-1910.
24. Blakemore, R., E. Story, D. Helb, J. Kop, P. Banada, M.R. Owens, S. Chakravorty, M. Jones, and D. Alland. 2010. Evaluation of the analytical performance of the Xpert MTB/RIF assay. *Journal of clinical microbiology* 48:2495-2501.
25. Bocchino, M., B. Bellofiore, A. Matarese, D. Galati, and A. Sanduzzi. 2009. IFN-gamma release assays in tuberculosis management in selected high-risk populations. *Expert review of molecular diagnostics* 9:165-177.
26. Boehme, C.C., P. Nabeta, G. Henostroza, R. Raqib, Z. Rahim, M. Gerhardt, E. Sanga, M. Hoelscher, T. Notomi, and T. Hase. 2007. Operational feasibility of using loop-mediated isothermal amplification for diagnosis of pulmonary tuberculosis in microscopy centers of developing countries. *Journal of clinical microbiology* 45:1936-1940.
27. Botelho, A., J. Perdigao, A. Canto, T. Albuquerque, N. Leal, R. Macedo, I. Portugal, and M.V. Cunha. 2014. Pre-multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strain associated with disseminated tuberculosis in a pet dog. *J Clin Microbiol* 52:354-6.
28. Braden, C.R., G.L. Templeton, M.D. Cave, S. Valway, I.M. Onorato, K.G. Castro, D. Moers, Z. Yang, W.W. Stead, and J.H. Bates. 1997. Interpretation of restriction fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a state with a large rural population. *Journal of Infectious Diseases* 175:1446-1452.
29. Broccolo, F., P. Scarpellini, G. Locatelli, A. Zingale, A.M. Brambilla, P. Cichero, L.A. Sechi, A. Lazzarin, P. Lusso, and M.S. Malnati. 2003. Rapid diagnosis of mycobacterial infections and quantitation of *Mycobacterium tuberculosis* load by two real-time calibrated PCR assays. *Journal of clinical microbiology* 41:4565-4572.
30. Brosch, R., S.V. Gordon, M. Marmiesse, P. Brodin, C. Buchrieser, K. Eiglmeier, T. Garnier, C. Gutierrez, G. Hewinson, and K. Kremer. 2002. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proceedings of the national academy of Sciences* 99:3684-3689.
31. Brudey, K., M.C. Gutierrez, V. Vincent, L.M. Parsons, M. Salfinger, N. Rastogi, and C. Sola. 2004. *Mycobacterium africanum* genotyping using novel spacer oligonucleotides in the direct repeat locus. *Journal of clinical microbiology* 42:5053-5057.
32. Brudey, K., J.R. Driscoll, L. Rigouts, W.M. Prodinger, A. Gori, S.A. Al-Hajoj, C. Allix, L. Aristimuo, J. Arora, and V. Baumanis. 2006. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC microbiology* 6:23.

33. Bryant, J. M., Harris, S. R., Parkhill, J., Dawson, R., Diacon, A. H., van Helden, P., Louw, C. (2013). Whole-genome sequencing to establish relapse or re-infection with *Mycobacterium tuberculosis*: a retrospective observational study. *The Lancet Respiratory Medicine*, 1(10), 786-792.
34. Burgos, M.V., and A.S. Pym. 2002. Molecular epidemiology of tuberculosis. *European Respiratory Journal* 20:54s-65s.
35. Buu, T.N., M.N. Huyen, N.T.N. Lan, H.T. Quy, N.V. Hen, M. Zignol, M.W. Borgdorff, F.G.J. Cobelens, and D. Van Soolingen. 2009. The Beijing genotype is associated with young age and multidrug-resistant tuberculosis in rural Vietnam. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 13:900-906.
36. Cadot, E., P. Barbazan, and M. Boussinesq. 1999. Les déterminants géographiques de la transmission de l'onchocercose en zone de transition forêt-savane: l'exemple de deux villages du foyer du Mbam (région du Centre, Cameroun). *Cahiers d'études et de recherches francophones/Santé* 8:429-435.
37. Caimi, K., M.I. Romano, A. Alito, M. Zumarraga, F. Bigi, and A. Cataldi. 2001. Sequence Analysis of the Direct Repeat Region in *Mycobacterium bovis*. *Journal of clinical microbiology* 39:1067-1072.
38. Camacho, L.R., D. Ensergueix, E. Perez, B. Gicquel, and C. Guilhot. 1999. Identification of a virulence gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* by signature-tagged transposon mutagenesis. *Molecular microbiology* 34:257-267.
39. Caminero, J.A., G. Sotgiu, A. Zumla, and G.B. Migliori. 2010. Best drug treatment for multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis. *The Lancet infectious diseases* 10:621-629.
40. Camus, J.-C., M.J. Pryor, C. Médigue, and S.T. Cole. 2002. Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis H37Rv*. *Microbiology* 148:2967-2973.
41. Canetti, G., W. Fox, A.a. Khomenko, H.T. Mahler, N.K. Menon, D.A. Mitchison, N. Rist, and N.A. Å melev. 1969. Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. *Bulletin of the World Health Organization* 41:21.
42. Canetti, G., S. Froman, J.a. Grosset, P. Hauduroy, M. Langerova, H.T. Mahler, G. Meissner, D.A. Mitchison, and L. Å ula. 1963. Mycobacteria: laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance. *Bulletin of the World Health Organization* 29:565.

43. Cao, D., L. Hu, M. Lin, M. Li, Z. Ye, H. Sun, J. Huang, H. Yang, and J. Tian. 2015. Real-time fluorescence Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) for rapid and reliable diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Journal of microbiological methods* 109:74-78.
44. Causse, M., P. Ruiz, J.B. Gutierrez, J. Zerolo, and M. Casal. 2008. Evaluation of new GenoType-MTBDR*plus* for detection of resistance in cultures and direct specimens of *Mycobacterium tuberculosis*. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 12:1456-1460.
45. Cauwelaert, N.D., H. Ramarokoto, P. Ravololonandriana, V. Richard, and V. Rasolofo. 2011. DNA extracted from stained sputum smears can be used in the MTBDR*plus* assay. *Journal of clinical microbiology* 49:3600-3603.
46. CDC. 2006. Revised definition of extensively drug-resistant tuberculosis-United States, 1993-2006. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report* 55:1176.
47. Chan, E.D., and M.D. Iseman. 2008. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a review. *Current opinion in infectious diseases* 21:587-595.
48. Chaves, F., F. Dronda, M.D. Cave, M. Alonso-Sanz, A. Gonzalez-Lopez, K.D. Eisenach, A. Ortega, L. Lopez-Cubero, I. Fernandez-Martin, and S. Catalan. 1997. A longitudinal study of transmission of tuberculosis in a large prison population. *American journal of respiratory and critical care medicine* 155:719-725.
49. Chernyaeva, E.N., M.V. Shulgina, M.S. Rotkevich, P.V. Dobrynin, S.A. Simonov, E.A. Shitikov, D.S. Ischenko, I.Y. Karpova, E.S. Kostryukova, and E.N. Ilina. 2014. Genome-wide *Mycobacterium tuberculosis* variation (GMTV) database: a new tool for integrating sequence variations and epidemiology. *BMC genomics* 15:308.
50. Chin, P.-J., and R. Jou. 2005. A modified automated high-throughput mycobacterial interspersed repetitive unit method for genotyping *Mycobacterium tuberculosis*. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 53:325-327.
51. Clark-Curtiss, J.E., and S.E. Haydel. 2003. Molecular genetics of *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. *Annual Reviews in Microbiology* 57:517-549.
52. Cohen, T., and M. Murray. 2004. Modeling epidemics of multidrug-resistant *M. tuberculosis* of heterogeneous fitness. *Nature medicine* 10:1117-1121.
53. Cohen, T., B. Sommers, and M. Murray. 2003. The effect of drug resistance on the fitness of *Mycobacterium tuberculosis*. *The Lancet infectious diseases* 3:13-21.
54. Colditz, G.A., T.F. Brewer, C.S. Berkey, M.E. Wilson, E. Burdick, H.V. Fineberg, and F. Mosteller. 1994. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis: meta-analysis of the published literature. *Jama* 271:698-702.

55. Cole, S., R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S.V. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, and C.E. Barry, 3rd. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393:537-544.
56. Coll, F., K. Mallard, M.D. Preston, S. Bentley, J. Parkhill, R. McNerney, N. Martin, and T.G. Clark. 2012. SpolPred: rapid and accurate prediction of *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes from short genomic sequences. *Bioinformatics* 28:2991-2993.
57. Coll, F., M. Preston, J.A. Guerra-Assunção, G. Hill-Cawthorn, D. Harris, J. Perdigão, M. Viveiros, I. Portugal, F. Drobniowski, and S. Gagneux. 2014. PolyTB: a genomic variation map for *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 94:346-354.
58. Comas, I., S. Homolka, S. Niemann, and S. Gagneux. 2009. Genotyping of genetically monomorphic bacteria: DNA sequencing in *Mycobacterium tuberculosis* highlights the limitations of current methodologies. *PloS one* 4:e7815.
59. Corbett, E.L., and M. Ravaglione. 2004. Global burden of Tuberculosis: past, present and future.
60. Corbett, E.L., C.J. Watt, N. Walker, D. Maher, B.G. Williams, M.C. Raviglione, and C. Dye. 2003. The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. *Archives of internal medicine* 163:1009-1021.
61. Coronado, V.G., C.M. Beck-Sague, M.D. Hutton, B.J. Davis, P. Nicholas, C. Villareal, C.L. Woodley, J.O. Kilburn, J.T. Crawford, and T.R. Frieden. 1993. Transmission of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* among persons with human immunodeficiency virus infection in an urban hospital: epidemiologic and restriction fragment length polymorphism analysis. *Journal of Infectious Diseases* 168:1052-1055.
62. Couceiro, L., P. Santana, and C. Nunes. 2011. Pulmonary tuberculosis and risk factors in Portugal: a spatial analysis. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 15:1445-1455.
63. Cowan, L.S., L. Diem, M.C. Brake, and J.T. Crawford. 2004. Transfer of a *Mycobacterium tuberculosis* genotyping method, spoligotyping, from a reverse line-blot hybridization, membrane-based assay to the Luminex multianalyte profiling system. *Journal of Clinical Microbiology* 42:474-477.
64. Craig, P.S., P. Giraudoux, D. Shi, B. Bartholomot, G. Barnish, P. Delattre, J.P. Quere, S. Harraga, G. Bao, and Y. Wang. 2000. An epidemiological and ecological study of human alveolar echinococcosis transmission in south Gansu, China. *Acta tropica* 77:167-177.

65. Crubézy, E., B. Ludes, J.-D. Poveda, J. Clayton, B. Crouau-Roy, and D. Montagnon. 1998. Identification of *Mycobacterium* DNA in an Egyptian Pott's disease of 5400 years old. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series III-Sciences de la Vie* 321:941-951.
66. D'Amato, R.F., A.A. Wallman, L.H. Hochstein, P.M. Colaninno, M. Scardamaglia, E. Ardila, M. Ghouri, K. Kim, R.C. Patel, and A. Miller. 1995. Rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis by using Roche AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* PCR test. *Journal of Clinical Microbiology* 33:1832-1834.
67. Dale, J.W., D. Brittain, A.A.n. Cataldi, D. Cousins, J.T. Crawford, J. Driscoll, H. Heersma, T. Lillebaek, T. Quitugua, and N. Rastogi. 2001. Spacer oligonucleotide typing of bacteria of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: recommendations for standardised nomenclature [The Language of Our Science]. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 5:216-219.
68. Dale, P.E., S.A. Ritchie, B.M. Territo, C.D. Morris, A. Muhar, and B.H. Kay. 1998. An overview of remote sensing and GIS for surveillance of mosquito vector habitats and risk assessment. *Journal of vector ecology: journal of the Society for Vector Ecology* 23:54-61.
69. Daniel, T.M. 2005. Robert Koch and the pathogenesis of tuberculosis [Founders of Our Knowledge]. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 9:1181-1182.
70. Daniel, T.M. 2006. The history of tuberculosis. *Respiratory medicine* 100:1862-1870.
71. David, H.L. 1970. Probability distribution of drug-resistant mutants in unselected populations of *Mycobacterium tuberculosis*. *Applied microbiology* 20:810-814.
72. David, H.L. 1971. Resistance to D-cycloserine in the tubercle bacilli: mutation rate and transport of alanine in parental cells and drug-resistant mutants. *Applied microbiology* 21:888-892.
73. (ed.) 1998. *Genetics and Tuberculosis: Novartis Foundation Symposium 217*. Wiley Online Library.
74. 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 multimer database for studying *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity and molecular epidemiology. *Infect Genet Evol* 12:755-66.
75. Domingues, J.D.S., L. Ducasse, and A. Peixoto. 2016. Exploring the mechanisms of granuloma formation in vivo to prevent dissemination of a respiratory *Mycobacterium tuberculosis* infection: A live imaging approach. *Eur Respiratory Soc*.

76. Dossou-Yovo, J., J.M.C. Doannio, S. Diarrassouba, and G. Chauvancy. 1998. Impact d'aménagements de rizières sur la transmission du paludisme dans la ville de Bouaké, Côte d'Ivoire. *Bull Soc Pathol Exot* 91:327-33.
77. Drobniowski, F., Y. Balabanova, V. Nikolayevsky, M. Ruddy, S. Kuznetsov, S. Zakharova, A. Melentyev, and I. Fedorin. 2005. Drug-resistant tuberculosis, clinical virulence, and the dominance of the Beijing strain family in Russia. *Jama* 293:2726-2731.
78. Dutau, G. 2005. [The history of tuberculosis]. *Archives de pediatrie: organe officiel de la Societe francaise de pediatrie* 12:S88-95.
79. Dye, C., S. Scheele, P. Dolin, V. Pathania, and M.C. Raviglione. 1999. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. *Jama* 282:677-686.
80. Dye, C., C.J. Watt, D.M. Bleed, S.M. Hosseini, and M.C. Raviglione. 2005. Evolution of tuberculosis control and prospects for reducing tuberculosis incidence, prevalence, and deaths globally. *Jama* 293:2767-2775.
81. Faustini, A., A.J. Hall, and C.A. Perucci. 2006. Risk factors for multidrug resistant tuberculosis in Europe: a systematic review. *Thorax* 61:158-163.
82. 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.
83. Filliol, I., S. Ferdinand, L. Negroni, C. Sola, and N. Rastogi. 2000. Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* based on variable number of tandem DNA repeats used alone and in association with spoligotyping. *Journal of clinical microbiology* 38:2520-2524.
84. Filliol, I., J.R. Driscoll, D. Van Soolingen, B.N. Kreiswirth, K. Kremer, G. Valétudie, D.D. Anh, R. Barlow, D. Banerjee, and P.J. Bifani. 2002. Global distribution of *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes.(Dispatches). *Emerging infectious diseases* 8:1347-1350.
85. Filliol, I., J.R. Driscoll, D. van Soolingen, B.N. Kreiswirth, K. Kremer, G. Valétudie, D.D. Anh, R. Barlow, D. Banerjee, and P.J. Bifani. 2003. Snapshot of moving and expanding clones of *Mycobacterium tuberculosis* and their global distribution assessed by spoligotyping in an international study. *Journal of Clinical Microbiology* 41:1963-1970.
86. Filliol, I., A.S. Motiwala, M. Cavatore, W. Qi, M.H. Hazben, M.B. Del Valle, J. Fyfe, L. Garcia-Garcia, N. Rastogi, and C. Sola. 2006. Global phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* based on single nucleotide polymorphism (SNP) analysis: insights into

tuberculosis evolution, phylogenetic accuracy of other DNA fingerprinting systems, and recommendations for a minimal standard SNP set. *Journal of bacteriology* 188:759-772.

87. Fleischmann, R.D., D. Alland, J.A. Eisen, L. Carpenter, O. White, J. Peterson, R. DeBoy, R. Dodson, M. Gwinn, and D. Haft. 2002. Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. *Journal of bacteriology* 184:5479-5490.

88. Flynn, J.L., and J. Chan. 2001. Tuberculosis: latency and reactivation. *Infection and immunity* 69:4195-4201.

89. Friis, R.H. 2010. *Epidemiology* 101 Jones & Bartlett Learning.

90. Gagneux, S., and P.M. Small. 2007. Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development. *The Lancet infectious diseases* 7:328-337.

91. Gagneux, S., C.D. Long, P.M. Small, T. Van, G.K. Schoolnik, and B.J.M. Bohannan. 2006a. The competitive cost of antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 312:1944-1946.

92. Gagneux, S., K. DeRiemer, T. Van, M. Kato-Maeda, B.C. de Jong, S. Narayanan, M. Nicol, S. Niemann, K. Kremer, and M.C. Gutierrez. 2006b. Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America* 103:2869-2873.

93. Galagan, J.E. 2014. Genomic insights into tuberculosis. *Nature Reviews. Genetics* 15:307.

94. Gardy, J.L., J.C. Johnston, S.J.H. Sui, V.J. Cook, L. Shah, E. Brodtkin, S. Rempel, R. Moore, Y. Zhao, and R. Holt. 2011. Whole-genome sequencing and social-network analysis of a tuberculosis outbreak. *New England Journal of Medicine* 364:730-739.

95. Garnier, T., K. Eiglmeier, J.-C. Camus, N. Medina, H. Mansoor, M. Pryor, S. Duthoy, S. Grondin, C. Lacroix, and C. Monsempe. 2003. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100:7877-7882.

96. Garrity, G.M., J.A. Bell, and T.G. Lilburn. 2004. Taxonomic outline of the prokaryotes. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer, New York, Berlin, Heidelberg.

97. Gillespie, S.H. 2001. Antibiotic resistance in the absence of selective pressure. *International journal of antimicrobial agents* 17:171-176.

98. Gomgnimbou, M.K., B.J. Klotoe, B. Molina, J. Dominguez, G. Refrégier, and C. Sola. 2015. An "all-in-one" solution for simultaneous spoligotyping and drug resistance gene

analysis of *Mycobacterium tuberculosis*: TB-SPRINT and TB-SPRINT<sub>plus</sub>. International Journal of Mycobacteriology 4:13-14.

99. Gomgnimbou, M.K., E. Abadia, J. Zhang, G. Refrégier, S. Panaiotov, E. Bachiyska, and C. Sola. 2012. "Spoligorifotyping" a dual-priming-oligonucleotide-based direct-hybridization assay for tuberculosis control with a multianalyte microbead-based hybridization system. Journal of clinical microbiology 50:3172-3179.

100. Gomgnimbou, M.K., I. Hernández-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. Journal of clinical microbiology 51:3527-3534.

101. Gordon, S.V., B. Heym, J. Parkhill, B. Barrell, and S.T. Cole. 1999. New insertion sequences and a novel repeated sequence in the genome of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Microbiology 145:881-892.

102. Guernier, V. 2006. Combiner analyse spatiale et épidémiologie pour l'aide à la décision dans la lutte contre la tuberculose en Guyane française, Université d'Orléans, Orléans.

103. Gurjav, U., P. Jelfs, G.A. Hill-Cawthorne, B.J. Marais, and V. Sintchenko. 2015. Genotype heterogeneity of *Mycobacterium tuberculosis* within geospatial hotspots suggests foci of imported infection in Sydney, Australia. Infection, Genetics and Evolution.

104. Gutacker, M.M., B. Mathema, H. Soini, E. Shashkina, B.N. Kreiswirth, E.A. Graviss, and J.M. Musser. 2006. Single-nucleotide polymorphism-based population genetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains from 4 geographic sites. Journal of Infectious Diseases 193:121-128.

105. Haft, D.H., J. Selengut, E.F. Mongodin, and K.E. Nelson. 2005. A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. PLoS Comput Biol 1:e60.

106. Hanekom, M., N.C. Gey van Pittius, C. McEvoy, T.C. Victor, P.D. Van Helden, and R.M. Warren. 2011. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype: a template for success. Tuberculosis (Edinb) 91:510-23.

107. Harshey, R.M., and T. Ramakrishnan. 1977. Rate of ribonucleic acid chain growth in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Journal of bacteriology 129:616-622.

108. Hazbõn, M.H., M.B. del Valle, M.I. Guerrero, M. Varma-Basil, I. Filliol, M. Cavatore, R. Colangeli, H. Safi, H. Billman-Jacobe, and C. Lavender. 2005. Role of *embB* codon 306 mutations in *Mycobacterium tuberculosis* revisited: a novel association with broad drug

resistance and IS6110 clustering rather than ethambutol resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 49:3794-3802.

109. Helb, D., M. Jones, E. Story, C. Boehme, E. Wallace, K. Ho, J. Kop, M.R. Owens, R. Rodgers, and P. Banada. 2010. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology. *Journal of clinical microbiology* 48:229-237.

110. Hendrix, R.W., M.C.M. Smith, R.N. Burns, M.E. Ford, and G.F. Hatfull. 1999. Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: all the world phage. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96:2192-2197.

111. Hillemann, D., S. Rüsç-Gerdes, and E. Richter. 2006. Application of the GenoType-MTBDR assay directly on sputum specimens [Technical Note]. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 10:1057-1059.

112. Hillemann, D., S. Rüsç-Gerdes, and E. Richter. 2007. Evaluation of the GenoType MTBDR*plus* assay for rifampin and isoniazid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical specimens. *Journal of clinical microbiology* 45:2635-2640.

113. Hillemann, D., S. Rüsç-Gerdes, and E. Richter. 2009. Feasibility of the GenoType MTBDR*sl* assay for fluoroquinolone, amikacin-capreomycin, and ethambutol resistance testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical specimens. *Journal of clinical microbiology* 47:1767-1772.

114. Hirsh, A.E., A.G. Tsolaki, K. DeRiemer, M.W. Feldman, and P.M. Small. 2004. Stable association between strains of *Mycobacterium tuberculosis* and their human host populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:4871-4876.

115. Hopewell, P.C., and R.M. Jasmer. 2005. Overview of clinical tuberculosis, p. 15-31, *In* S. T. Cole, et al., eds. *Tuberculosis and the tubercle bacillus*. ASM Press, Washington.

116. Hunter, P.R. 1990. Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. *Journal of Clinical Microbiology* 28:1903-1905.

117. Iseman, M.D., and L.A. Madsen. 1989. Drug-resistant tuberculosis. *Clinics in chest medicine* 10:341-353.

118. Izumi, K., A. Ohkado, K. Uchimura, Y. Murase, Y. Tatsumi, A. Kayebeta, Y. Watanabe, and N. Ishikawa. 2015. Detection of Tuberculosis Infection Hotspots Using Activity Spaces Based Spatial Approach in an Urban Tokyo, from 2003 to 2011. *PLoS one* 10:e0138831.

119. Jansen, R., J.D.A. van Embden, W. Gaastra, and L.M. Schouls. 2002. Identification of a novel family of sequence repeats among prokaryotes. *Omics: a journal of integrative biology* 6:23-33.
120. Jarlier, V., and H. Nikaido. 1994. Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics. *FEMS microbiology letters* 123:11-18.
121. Jarlier, V., L. Gutmann, and H. Nikaido. 1991. Interplay of cell wall barrier and beta-lactamase activity determines high resistance to beta-lactam antibiotics in *Mycobacterium chelonae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 35:1937-1939.
122. Jassal, M., and W.R. Bishai. 2009. Extensively drug-resistant tuberculosis. *The Lancet infectious diseases* 9:19-30.
123. Joshi, K.R., H. Dhiman, and V. Scaria. 2014. tbvar: a comprehensive genome variation resource for *Mycobacterium tuberculosis*. Database 2014.
124. Kam, K.M., C.W. Yip, L.W. Tse, K.L. Leung, K.L. Wong, W.M. Ko, and W.S. Wong. 2006. Optimization of variable number tandem repeat typing set for differentiating *Mycobacterium tuberculosis* strains in the Beijing family. *FEMS microbiology letters* 256:258-265.
125. 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.
126. Kao, A.S., D.A. Ashford, M.M. McNeil, N.G. Warren, and R.C. Good. 1997. Descriptive profile of tuberculin skin testing programs and laboratory-acquired tuberculosis infections in public health laboratories. *Journal of clinical microbiology* 35:1847-1851.
127. Kaufmann, S.H.E. 2002. Protection against tuberculosis: cytokines, T cells, and macrophages. *Annals of the rheumatic diseases* 61:54-58.
128. Kay, G.L., M.J. Sergeant, Z. Zhou, J.Z.M. Chan, A. Millard, J. Quick, I. Szikossy, I. Pap, M. Spigelman, and N.J. Loman. 2015. Eighteenth-century genomes show that mixed infections were common at time of peak tuberculosis in Europe. *Nature communications* 6.
129. Kidd, D.M., and M.G. Ritchie. 2006. Phylogeographic information systems: putting the geography into phylogeography. *Journal of Biogeography* 33:1851-1865.
130. Kiet, V.S., N.T.N. Lan, D.D. An, N.H. Dung, N. van Vinh Chau, N.T. Chinh, J. Farrar, and M. Caws. 2010. Evaluation of the MTBDRsl test for detection of second-line-drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of clinical microbiology* 48:2934-2939.

131. Kim, J.Y., M.J. Ferraro, and J.A. Branda. 2009. False-negative results obtained with the Gen-Probe Amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test caused by unrecognized inhibition of the amplification reaction. *Journal of clinical microbiology* 47:2995-2997.
132. Kistemann, T., A. Munzinger, and F. Dangendorf. 2002. Spatial patterns of tuberculosis incidence in Cologne (Germany). *Soc Sci Med* 55:7-19.
133. Korbelt, D.S., B.E. Schneider, and U.E. Schaible. 2008. Innate immunity in tuberculosis: myths and truth. *Microbes and Infection* 10:995-1004.
134. Koul, A., E. Arnoult, N. Lounis, J. Guillemont, and K. Andries. 2011. The challenge of new drug discovery for tuberculosis. *Nature* 469:483-490.
135. Kremer, K., C. Arnold, A. Cataldi, M.C. Gutiérrez, W.H. Haas, S. Panaiotov, R.A. Skuce, P. Supply, A.G.M. van der Zanden, and D. van Soolingen. 2005. Discriminatory power and reproducibility of novel DNA typing methods for *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Journal of clinical microbiology* 43:5628-5638.
136. Kritski, A., and A.F.d. Melo. 2007. Tuberculosis in Adults, p. 487-524, *In* J. C. Palomino, et al., eds. *Tuberculosis 2007 - From Basic Science to Patient Care, Brazil*.
137. Krivinka, R., J. Drapela, A. Kubik, D. Dankova, J. Krivanek, J. Ruzha, Z. Mikova, and E. Hejdova. 1973. Epidemiological and clinical study of tuberculosis in the district of Kolin, Czechoslovakia. Second report (1965-1972). *Bulletin of the World Health Organization* 51:59-69.
138. Kulldorff, M. 1997. A spatial scan statistic. *Communications in statistics : Theory and Methods*. 26: 1481-1496.
139. Kulldorff, M.
140. Information Management Services. 2005. SatscanTM. Release 6.0. Kulldorff, M.
141. Information Management Services.
142. Kulldorff, M., and N. Nagarwalla. 1995. Spatial disease clusters: detection and inference. *Statistics in medicine* 14:799-810.
143. L'Hadj, M., A. Fissah, and S. Nafti. 2006. Les nouveaux tests de diagnostic de la tuberculose. *Revue des maladies respiratoires* 23:85-87.
144. Lalvani, A. 2007. Diagnosing tuberculosis infection in the 21st century: new tools to tackle an old enemy. *CHEST Journal* 131:1898-1906.
145. Lesprit, P., and J.M. Molina. 1996. La co-infection VIH-tuberculose: causes et conséquences. *Médecine et maladies infectieuses* 26:918-921.
146. Lobue, P., and D. Menzies. 2010. Treatment of latent tuberculosis infection: an update. *Respirology* 15:603-622.

147. Locht, C. 2008. A common vaccination strategy to solve unsolved problems of tuberculosis and pertussis? *Microbes and Infection* 10:1051-1056.
148. Lönnroth, K., E. Jaramillo, B.G. Williams, C. Dye, and M. Raviglione. 2009. Drivers of tuberculosis epidemics: the role of risk factors and social determinants. *Social science & medicine* 68:2240-2246.
149. Mahairas, G.G., P.J. Sabo, M.J. Hickey, D.C. Singh, and C.K. Stover. 1996. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *Journal of bacteriology* 178:1274-1282.
150. Maisnier-Patin, S., and D.I. Andersson. 2004. Adaptation to the deleterious effects of antimicrobial drug resistance mutations by compensatory evolution. *Research in Microbiology* 155:360-369.
151. Major, R.H. 1945. *Classic Descriptions of Disease* Charles C Thomas. Publisher, Springfield, Ill.
152. Mallard, K., R. McNERney, A.C. Crampin, R. Houben, R. Ndlovu, L. Munthali, R.M. Warren, N. French, and J.R. Glynn. 2010. Molecular detection of mixed infections of *Mycobacterium tuberculosis* strains in sputum samples from patients in Karonga District, Malawi. *Journal of clinical microbiology* 48:4512-4518.
153. Manabe, Y.C., and W.R. Bishai. 2000. Latent *Mycobacterium tuberculosis*-persistence, patience, and winning by waiting. *Nature medicine* 6:1327.
154. Marraffini, L.A., and E.J. Sontheimer. 2010a. Self vs. non-self discrimination during CRISPR RNA-directed immunity. *Nature* 463:568.
155. Marraffini, L.A., and E.J. Sontheimer. 2010b. CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nature Reviews Genetics* 11:181-190.
156. Mathema, B., N.E. Kurepina, P.J. Bifani, and B.N. Kreiswirth. 2006. Molecular epidemiology of tuberculosis: current insights. *Clinical microbiology reviews* 19:658-685.
157. Mathys, V. 2010. Contribution à la compréhension des mécanismes moléculaires de résistance de *Mycobacterium tuberculosis* aux agents anti-tuberculeux, Université libre de Bruxelles, Bruxelles.
158. Mazars, E., S. Lesjean, A.-L. Banuls, M. Gilbert, V. Vincent, B. Gicquel, M. Tibayrenc, C. Locht, and P. Supply. 2001. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proceedings of the national academy of Sciences* 98:1901-1906.

159. McDermott, W., C. Muschenheim, S.J. Hadley, P.A. Bunn, and R.V. Gorman. 1947. Streptomycin in the treatment of tuberculosis in humans: I. Meningitis and generalized hematogenous tuberculosis. *Annals of internal medicine* 27:769-822.
160. Moonan, P.K., S. Ghosh, J.E. Oeltmann, J.S. Kammerer, L.S. Cowan, and T.R. Navin. 2012. Using genotyping and geospatial scanning to estimate recent *Mycobacterium tuberculosis* transmission, United States. *Emerg Infect Dis* 18:458-465.
161. Moonan, P.K., M. Bayona, T.N. Quitugua, J. Oppong, D. Dunbar, K.C. Jost, Jr., G. Burgess, K.P. Singh, and S.E. Weis. 2004. Using GIS technology to identify areas of tuberculosis transmission and incidence. *Int J Health Geogr* 3:23.
162. Moran, P.A.P. 1950. Notes on continuous stochastic phenomena. *Biometrika* 37:17-23.
163. Moyo, S., S. Verver, H. Mahomed, A. Hawkrigde, M. Kibel, M. Hatherill, M. Tameris, H. Geldenhuys, W. Hanekom, and G. Hussey. 2010. Age-related tuberculosis incidence and severity in children under 5 years of age in Cape Town, South Africa. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 14:149-154.
164. Munch, Z., S.W. Van Lill, C.N. Booysen, H.L. Zietsman, D.A. Enarson, and N. Beyers. 2003. Tuberculosis transmission patterns in a high-incidence area: a spatial analysis. *Int J Tuberc Lung Dis* 7:271-7.
165. Murray, C.J.L., and J.A. Salomon. 1998. Modeling the impact of global tuberculosis control strategies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95:13881-13886.
166. NCCLS. 2003. Susceptibility testing of *Mycobacteria*, *Nocardia*, and other aerobic actinomycetes ; apporved standard, Vol. 23. NCCLS, Wayne, Pennsylvania.
167. Nguyen, D., P. Brassard, D. Menzies, L. Thibert, R. Warren, S. Mostowy, and M. Behr. 2004. Genomic characterization of an endemic *Mycobacterium tuberculosis* strain: evolutionary and epidemiologic implications. *Journal of clinical microbiology* 42:2573-2580.
168. Otlu, B., R. Durmaz, S. Gunal, C. Sola, T. Zozio, and N. Rastogi. 2009. Beijing/W and major spoligotype families of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from tuberculosis patients in Eastern Turkey. *New Microbiol* 32:255-63.
169. Pearson, M.L., J.A. Jereb, T.R. Frieden, J.T. Crawford, B.J. Davis, S.W. Dooley, and W.R. Jarvis. 1992. Nosocomial transmission of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: a risk to patients and health care workers. *Annals of internal medicine* 117:191-196.
170. Pfyffer, G.E., A. Strassle, N. Rose, R. Wirth, O. Brandli, and H. Shang. 1998. Transmission of tuberculosis in the metropolitan area of Zurich: a 3 year survey based on DNA fingerprinting. *European Respiratory Journal* 11:804-808.

171. Pfyffer, G.E., H.-M. Welscher, P. Kissling, C. Cieslak, M.J. Casal, J. Gutierrez, and S. Räsch-Gerdes. 1997. Comparison of the Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) with radiometric and solid culture for recovery of acid-fast bacilli. *Journal of Clinical Microbiology* 35:364-368.
172. PNLT. 2013. Plan stratégique national de lutte contre la tuberculose à Madagascar - 2012 à 2016, Madagascar.
173. Rahman, A., M. Sahrin, S. Afrin, K. Earley, S. Ahmed, S.M.M. Rahman, and S. Banu. 2016. Comparison of Xpert MTB/RIF Assay and GenoType MTBDR plus DNA Probes for Detection of Mutations Associated with Rifampicin Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *PloS one* 11:e0152694.
174. Rakotosamimanana, S., V. Mandrosovololona, J. Rakotonirina, J. Ramamonjisoa, J.R. Ranjalahy, R.V. Rendremanana, and F. Rakotomanana. 2014. Spatial Analysis of Pulmonary Tuberculosis in Antananarivo Madagascar: Tuberculosis-Related Knowledge, Attitude and Practice. *PloS one* 9:e110471.
175. Ramarokoto, H., O. Ratsirahonana, J.L. Soares, J. Ravaosolo, P. Ravololonandriana, A. Rakotoarisaonina, G. Ranjalahy, S. Ranaivohajaina, M. Mosa, and R. Robinson. 2010. Première enquête nationale sur la résistance de *Mycobacterium tuberculosis* aux antituberculeux à Madagascar, 2005-2006. *Int J Tuberc Lung Dis* 14:745-750.
176. Ramaswamy, S., and J.M. Musser. 1998. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tubercle and Lung disease* 79:3-29.
177. Rendremanana, 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. *Tropical Medicine & International Health* 14:429-437.
178. Rendremanana, R.V., V. Richard, F. Rakotomanana, P. Sabatier, and D.J. Bicout. 2010. Bayesian mapping of pulmonary tuberculosis in Antananarivo, Madagascar. *BMC infectious diseases* 10:21.
179. RASA, R.A.S.A.M. 2012. Rapport d'activité sur la riposte au SIDA à Madagascar.
180. Rasolofo-Razanamparany, V., H. Ramarokoto, G. Aurégan, B. Gicquel, and S. Chanteau. 2001. A combination of two genetic markers is sufficient for restriction fragment length polymorphism typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex in areas with a high incidence of tuberculosis. *Journal of clinical microbiology* 39:1530-1535.
181. Rasolofo-Razanamparany, V., D. Ménard, M. Ratsitorahina, G. Aurégan, B. Gicquel, and S. Chanteau. 2000. Transmission of tuberculosis in the prison of Antananarivo (Madagascar). *Research in microbiology* 151:785-795.

182. Rasolofo-Razanamparany, V., G. Auregan, O. Ratsirahonana, R. Raharimanana, H. Ramarokoto, B. Gicquel, and S. Chanteau. 1994. [Genetic polymorphism of *M. tuberculosis* strains in Antananaviro]. Archives de l'Institut Pasteur de Madagascar 62:59-64.
183. Rastogi, N., E. Legrand, and C. Sola. 2001. The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. Revue Scientifique Et Technique-Office International Des Epizooties 20:21-54.
184. Reeves, W.C., J.L. Hardy, W.K. Reisen, and M.M. Milby. 1994. Potential effect of global warming on mosquito-borne arboviruses. Journal of medical entomology 31:323-332.
185. Refrégier, G., E. Abadia, T. Matsumoto, H. Ano, T. Takashima, I. Tsuyuguchi, E. Aktas, F. Cömert, M.K. Gomgnimbou, and S. Panaiotov. 2016. Turkish and Japanese *Mycobacterium tuberculosis* sublineages share a remote common ancestor. Infection, genetics and evolution 45:461-473.
186. Ribeiro, F.K.C., W. Pan, A. Bertolde, S.A. Vinhas, R.L. Peres, L. Riley, M. Palaci, and E.L. Maciel. 2015. Genotypic and spatial analysis of *Mycobacterium tuberculosis* transmission in a high-incidence urban setting. Clinical Infectious Diseases:civ365.
187. Richeldi, L. 2006. An update on the diagnosis of tuberculosis infection. American journal of respiratory and critical care medicine 174:736-742.
188. Saltini, C. 2006. Chemotherapy and diagnosis of tuberculosis. Respiratory medicine 100:2085-2097.
189. Sander, P., B. Springer, T. Prammananan, A. Sturmfels, M. Kappler, M. Pletschette, and E.C. Böttger. 2002. Fitness cost of chromosomal drug resistance-conferring mutations. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 46:1204-1211.
190. Schurch, A.C., K. Kremer, O. Daviena, A. Kiers, M.J. Boeree, R.J. Siezen, and D. van Soolingen. 2010. High-resolution typing by integration of genome sequencing data in a large tuberculosis cluster. Journal of clinical microbiology 48:3403-3406.
191. Séraphin, M.N., M. Lauzardo, R.T. Doggett, J. Zabala, J.G. Morris Jr, and J.K. Blackburn. 2016. Spatiotemporal Clustering of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Genotypes in Florida: Genetic Diversity Segregated by Country of Birth. PloS one 11:e0153575.
192. Shetty, N., M. Shemko, M. Vaz, and G. D'Souza. 2006. An epidemiological evaluation of risk factors for tuberculosis in South India: a matched case control study. The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease 10:80-86.
193. Shinnick, T.M., and R.C. Good. 1994. Mycobacterial taxonomy. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 13:884-901.

194. Siddiqi, S., A. Ahmed, S. Asif, D. Behera, M. Javaid, J. Jani, A. Jyoti, R. Mahatre, D. Mahto, and E. Richter. 2012. Direct drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* for rapid detection of multidrug resistance using the Bactec MGIT 960 system: a multicenter study. *Journal of clinical microbiology* 50:435-440.
195. Silva, M.R., M.D.C. Guimarães, V.M.d. Oliveira, A.d.S. Moreira, R.R.d. Costa, K.C.F. Abi-Zaid, A.d.S. Rocha, and P.N. Suffys. 2011. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex based on amplification and sequencing of the oxyR pseudogene from stored Ziehl-Neelsen-stained sputum smears in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 106:09-15.
196. Silva, P.A.d., and J.A. Ainsa. 2007. Drugs and Drugs Interactions, p. 593-633, *In* J. C. Palomino, et al., eds. *Tuberculosis 2007 - From Basic Science to Patient Care, Brazil*.
197. Small, P.M., P.C. Hopewell, S.P. Singh, A. Paz, J. Parsonnet, D.C. Ruston, G.F. Schecter, C.L. Daley, and G.K. Schoolnik. 1994. The Epidemiology of Tuberculosis in San Francisco-A Population-Based Study Using Conventional and Molecular Methods. *New England Journal of Medicine* 330:1703-1709.
198. Smith, I. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clinical microbiology reviews* 16:463-496.
199. 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*. *Nature Reviews Microbiology* 7:537-544.
200. Smittipat, N., P. Billamas, M. Palittapongarnpim, A. Thong-On, M.M. Temu, P. Thanakijcharoen, O. Karnkawinpong, and P. Palittapongarnpim. 2005. Polymorphism of variable-number tandem repeats at multiple locus in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of clinical microbiology* 43:5034-5043.
201. Society, A.T. 2000. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. *Am J Respir Crit Care Med* 161:1376-1395.
202. Sola, C., I. Filliol, E. Legrand, and N. Rastogi. 2000. [Recent developments of spoligotyping as applied to the study of epidemiology, biodiversity and molecular phylogeny of the *Mycobacterium tuberculosis* complex]. *Pathologie-biologie* 48:921-932.
203. Sola, C., I. Filliol, M.C. Gutierrez, I. Mokrousov, V. Vincent, and N. Rastogi. 2001. Spoligotype database of *Mycobacterium tuberculosis*: biogeographic distribution of shared types and epidemiologic and phylogenetic perspectives. *Emerging infectious diseases* 7:390.
204. Sola, C., A. Devallois, L. Horgen, J. Maïsetti, I. Filliol, E. Legrand, and N. Rastogi. 1999. Tuberculosis in the Caribbean: using spacer oligonucleotide typing to understand strain origin and transmission. *Emerging infectious diseases* 5:404.

205. Sola, C., I. Filliol, E. Legrand, S. Lesjean, C. Locht, P. Supply, and N. Rastogi. 2003. Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics. *Infection, Genetics and Evolution* 3:125-133.
206. Somoskovi, A., J. Dormandy, D. Mitsani, J. Rivenburg, and M. Salfinger. 2006. Use of smear-positive samples to assess the PCR-based genotype MTBDR assay for rapid, direct detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex as well as its resistance to isoniazid and rifampin. *Journal of clinical microbiology* 44:4459-4463.
207. Soto, C.Y., M.C. Menéndez, E. Pérez, S. Samper, A.B. Gomez, M.J. Garcia, and C. Martin. 2004. IS6110 mediates increased transcription of the *phoP* virulence gene in a multidrug-resistant clinical isolate responsible for tuberculosis outbreaks. *Journal of clinical microbiology* 42:212-219.
208. Spigelman, M.K. 2007. New tuberculosis therapeutics: a growing pipeline. *Journal of Infectious Diseases* 196:S28-S34.
209. Sreevatsan, S., X.I. Pan, K.E. Stockbauer, N.D. Connell, B.N. Kreiswirth, T.S. Whittam, and J.M. Musser. 1997. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94:9869-9874.
210. Stead, W.W. 1967. Pathogenesis of a first episode of chronic pulmonary tuberculosis in man: recrudescence of residuals of the primary infection or exogenous reinfection? *American Review of Respiratory Disease* 95:729-745.
211. Supply, P., E. Mazars, S. Lesjean, V.r. Vincent, B. Gicquel, and C. Locht. 2000. Variable human minisatellite • like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Molecular microbiology* 36:762-771.
212. Supply, P., S. Lesjean, E. Savine, K. Kremer, D. Van Soolingen, and C. Locht. 2001. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *Journal of clinical microbiology* 39:3563-3571.
213. 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.

214. Suresh, N., J. Arora, H. Pant, T. Rana, and U.B. Singh. 2007. Spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis* DNA from Archival Ziehl-Neelsen-stained sputum smears. *Journal of microbiological methods* 68:291-295.
215. Takiff, H.E., and O. Feo. 2015. Clinical value of whole-genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis*. *The Lancet Infectious Diseases* 15:1077-1090.
216. Talarico, S., M.D. Cave, C.F. Marrs, B. Foxman, L. Zhang, and Z. Yang. 2005. Variation of the *Mycobacterium tuberculosis* PE\_PGRS33 gene among clinical isolates. *Journal of clinical microbiology* 43:4954-4960.
217. Taylor, Z., and R.J. O'Brien. 2001. Tuberculosis elimination: are we willing to pay the price? *American journal of respiratory and critical care medicine* 163:1-2.
218. Telenti, A., W.J. Philipp, S. Sreevatsan, C. Bernasconi, K.E. Stockbauer, B. Wieles, J.M. Musser, and W.R. Jacobs. 1997. The emb operon, a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol. *Nature medicine* 3:567-570.
219. Theus, S., K. Eisenach, N. Fomukong, R.F. Silver, and M.D. Cave. 2007. Beijing family *Mycobacterium tuberculosis* strains differ in their intracellular growth in THP-1 macrophages. *Int J Tuberc Lung Dis* 11:1087-93.
220. Thierry, D., M.D. Cave, K.D. Eisenach, J.T. Crawford, J.H. Bates, B. Gicquel, and J.L. Guesdon. 1990. IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis complex*. *Nucleic acids research* 18:188-188.
221. Tison, F., and B. Carbonnelle. 1972. Recherche, isolement et étude du bacille tuberculeux et des autres mycobactéries en pratique courante Crouan et Roques.
222. Tofanelli, S., S. Bertoncini, L. Castracci, D. Luiselli, F. Calafell, G. Donati, and G. Paoli. 2009. On the origins and admixture of Malagasy: new evidence from high-resolution analyses of paternal and maternal lineages. *Molecular biology and evolution* 26:2109-2124.
223. Tortoli, E. 2006. The new mycobacteria: an update. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 48:159-178.
224. Toungousova, O.S., D.A. Caugant, P. Sandven, A.O. Mariandyshev, and G. Bjune. 2004. Impact of drug resistance on fitness of *Mycobacterium tuberculosis* strains of the W-Beijing genotype. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 42:281-290.
225. Touray, K., I.M. Adetifa, A. Jallow, J. Rigby, D. Jeffries, Y.B. Cheung, S. Donkor, R.A. Adegbola, and P.C. Hill. 2010. Spatial analysis of tuberculosis in an urban west African setting: is there evidence of clustering? *Tropical Medicine & International Health* 15:664-672.

226. Traag, B.A., A. Driks, P. Stragier, W. Bitter, G. Broussard, G. Hatfull, F. Chu, K.N. Adams, L. Ramakrishnan, and R. Losick. 2010. Do mycobacteria produce endospores? *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107:878-881.
227. Tsolaki, A.G., A.E. Hirsh, K. DeRiemer, J.A. Enciso, M.Z. Wong, M. Hannan, K. Aman, M. Kato-Maeda, and P.M. Small. 2004. Functional and evolutionary genomics of *Mycobacterium tuberculosis*: insights from genomic deletions in 100 strains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:4865-4870.
228. Tsukamura, M. 1972. The pattern of resistance development to rifampicin in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tubercle* 53:111-117.
229. Underner, M., and J.C. Meurice. 1999. Tuberculose pulmonaire et primo-infection tuberculeuse: Epidémiologie, diagnostic, évolution, traitement, prévention. *La Revue du praticien* 49:867-876.
230. Van der Oost, J., M.M. Jore, E.R. Westra, M. Lundgren, and S.J.J. Brouns. 2009. CRISPR-based adaptive and heritable immunity in prokaryotes. *Trends in biochemical sciences* 34:401-407.
231. Van Der Zanden, A.G.M., E.M. Te Koppele-Vije, N.V. Bhanu, D. Van Soolingen, and L.M. Schouls. 2003. Use of DNA extracts from Ziehl-Neelsen-stained slides for molecular detection of rifampin resistance and spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of clinical microbiology* 41:1101-1108.
232. Van der Zanden, A.G.M., K. Kremer, L.M. Schouls, K. Caimi, A. Cataldi, A. Hulleman, N.J.D. Nagelkerke, and D. Van Soolingen. 2002. Improvement of differentiation and interpretability of spoligotyping for *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by introduction of new spacer oligonucleotides. *Journal of clinical microbiology* 40:4628-4639.
233. Van Embden, J.D., M.D. Cave, J.T. Crawford, J.W. Dale, K.D. Eisenach, B. Gicquel, P. Hermans, C. Martin, R. McAdam, and T.M. Shinnick. 1993. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *Journal of clinical microbiology* 31:406-409.
234. Van Soolingen, D., T. Hoogenboezem, P.E.W. De Haas, P.W.M. Hermans, M.A. Koedam, K.S. Teppema, P.J. Brennan, G.S. Besra, F. Portaels, and J. Top. 1997. A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 47:1236-1245.
235. Veziris, N., E. Cambau, W. Sougakoff, J. Robert, and V. Jarlier. 2005. Résistance aux antituberculeux. *Archives de pédiatrie* 12:S102-S109.

236. Voladri, R.K.R., D.L. Lakey, S.H. Hennigan, B.E. Menzies, K.M. Edwards, and D.S. Kernodle. 1998. Recombinant expression and characterization of the major B-lactamase of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 42:1375-1381.
237. Wada, T., S. Fujihara, A. Shimouchi, M. Harada, H. Ogura, S. Matsumoto, and A. Hase. 2009. High transmissibility of the modern Beijing *Mycobacterium tuberculosis* in homeless patients of Japan. *Tuberculosis (Edinb)* 89:252-5.
238. Walker, T.M., C.L.C. Ip, R.H. Harrell, J.T. Evans, G. Kapatai, M.J. Dedicoat, D.W. Eyre, D.J. Wilson, P.M. Hawkey, and D.W. Crook. 2013. Whole-genome sequencing to delineate *Mycobacterium tuberculosis* outbreaks: a retrospective observational study. *The Lancet infectious diseases* 13:137-146.
239. Warren, R.M., S.L. Sampson, M. Richardson, G.D. Van Der Spuy, C.J. Lombard, T.C. Victor, and P.D. Van Helden. 2000. Mapping of IS6110 flanking regions in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* demonstrates genome plasticity. *Molecular microbiology* 37:1405-1416.
240. Warren, R.M., E.M. Streicher, S.L. Sampson, G.D. Van Der Spuy, M. Richardson, D. Nguyen, M.A. Behr, T.C. Victor, and P.D. Van Helden. 2002. Microevolution of the direct repeat region of *Mycobacterium tuberculosis*: implications for interpretation of spoligotyping data. *Journal of Clinical Microbiology* 40:4457-4465.
241. Webb, V., and J. Davies. 1998. Antibiotics and antibiotic resistance in mycobacteria. *Mycobacteria. Molecular Biology and Virulence*:287-306.
242. Weniger, T., J. Krawczyk, P. Supply, S. Niemann, and D. Harmsen. 2010. MIRU-VNTR *plus*: a web tool for polyphasic genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *Nucleic acids research* 38:W326-W331.
243. WHO. 1997. Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis. Global Tuberculosis Programme World Health Organisation (WHO) Geneva and International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD) Paris.
244. WHO. 2001. Surveillance standards for antimicrobial resistance, Genève.
245. WHO. 2003. Le traitement de la tuberculose : principes à l'information des programmes nationaux, Genève.
246. WHO. 2004. BCG vaccine. WHO position paper. Relevé épidémiologique hebdomadaire/Section d'hygiène du Secrétariat de la Société des Nations= Weekly epidemiological record/Health Section of the Secretariat of the League of Nations 79:27.
247. WHO. 2009. Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis.
248. WHO. 2010. The global plan to stop TB 2011-2015 Genève.

249. WHO. 2014. Tuberculose: profil de pays / Madagascar.
250. WHO. 2015. Global Tuberculosis report 2015.
251. Wong, S.Y., J.S. Lee, H.K. Kwak, L.E. Via, H.I.M. Boshoff, and C.E. Barry. 2011. Mutations in gidB confer low-level streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrobial agents and chemotherapy 55:2515-2522.
252. Xia, E., Y.-Y. Teo, and R.T.-H. Ong. 2016. SpoTyping: fast and accurate in silico *Mycobacterium spoligotyping* from sequence reads. Genome medicine 8:1.
253. Yasmin, M., M.K. Gomgnimbou, R.T. Siddiqui, G. Refrégier, and C. Sola. 2014. Multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity and clues on recent transmission in Punjab, Pakistan. Infection, Genetics and Evolution 27:6-14.
254. Yeh, R.W., A.P. 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. Journal of Infectious Diseases 177:1107-1111.
255. Yeo, I.K.T., T. Tannenbaum, A.N. Scott, R. Kozak, M.A. Behr, L. Thibert, and K. Schwartzman. 2006. Contact investigation and genotyping to identify tuberculosis transmission to children. The Pediatric infectious disease journal 25:1037-1043.
256. Youmans, G.P., G.W. Raleigh, and A.S. Youmans. 1947. The tuberculostatic action of para-aminosalicylic acid. Journal of bacteriology 54:409.
257. Zelter, J.L., M.B. Murray, M.C. Becerra, J. Galea, L. Lecca, R. Calderon, R. Yataco, C. Contreras, Z. Zhang, and J. Manjourides. 2015. Identifying Hotspots of Multidrug-Resistant Tuberculosis Transmission Using Spatial and Molecular Genetic Data. Journal of Infectious Diseases:jiv387.
258. Zhang, J., E. Abadia, G. Refregier, S. Tafaj, M.L. Boschioli, B. Guillard, A. Andremont, R. Ruimy, and C. Sola. 2010. *Mycobacterium tuberculosis* complex CRISPR genotyping: improving efficiency, throughput and discriminative power of "spoligotyping" with new spacers and a microbead-based hybridization assay. Journal of medical microbiology 59:285-294.
259. Zhang, Y., and W.W. Yew. 2009. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* [State of the art series. Drug-resistant tuberculosis. Edited by CY. Chiang. Number 1 in the series]. The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease 13:1320-1330.
260. Zhang, Y., K. Post-Martens, and S. Denkin. 2006. New drug candidates and therapeutic targets for tuberculosis therapy. Drug discovery today 11:21-27.

261. Zink, A.R., C. Sola, U. Reischl, W. Grabner, N. Rastogi, H. Wolf, and A.G. Nerlich. 2003. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex DNAs from Egyptian mummies by spoligotyping. *Journal of Clinical Microbiology* 41:359-367.

# ANNEXES

**Annexe 1****Réactifs et tampons pour l'hybridation lors du spoligotyping****1- 20XSSPE pH 7,4 qui va nous servir de solution mère**

NaCl.....87,66g  
 NAH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> .....15,60g  
 EDTA..... 3,722g  
 Eau distillée .....400ml  
 Ajuster le pH avec NaOH 10N  
 Eau distillée qsp.....500ml  
 Autoclaver et garder à température ambiante

**2- 2XSSPE :**

20XSSPE .....50ml  
 Eau distillée .....500ml

**3- 2XSSPE/0,1% SDS : 2XSSPE/0,5% SDS (x2) :**

20XSSPE .....50ml 20XSSPE..... 50ml  
 SDS 10% .....5ml SDS 10%.....25ml  
 ED qsp.....500ml ED qsp .....500ml

**4- EDTA 20 Mm : pH8**

EDTA..... 3 ,725g  
 ED .....400ml  
 Ajustement du pH avec NaOH 10N  
 Ed qsp .....500ml  
 Autoclaver et garder à température ambiante

## Annexe 2

### Préparation de la membrane

Grâce à leur terminaison 5'-amine, les oligonucléotides ont été fixées de manière covalente à une membrane de nylon Biodyne C (Pall Biosupport, Portsmouth, England) préalablement activée par incubation dans de l'EDAC (N-Ethyl-N'-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide) à 16% (poids/volume). Par ce procédé, la membrane a pu ainsi être hybridée, deshybridée et réhybridée plusieurs fois (plus de 10 fois). Après activation de la membrane, celle-ci a été rincée et placée dans un miniblottier (système Miniblottier 45, Immunetics, Cambridge, USA). Les 43 puits ont été remplis avec 150 µl d'oligonucléotides dilués dans du NaHCO<sub>3</sub> (500 mM, pH 8,4). Après le dépôt, la membrane a été rincée et inactivée à la soude 100 mM pendant 10 minutes puis lavée sous agitation à 60 °C dans 250 ml de tampon SSPE (Standard Sodium Phosphate – EDTA) 2X – 10% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) pendant 10 minutes (2 fois) et rincée dans 250 ml d'EDTA à 20 mM (pH 8,0) pendant 15 minutes (2 fois) pour finalement être stockée à +4°C dans un emballage évitant son dessèchement.

---

**LISTE DES PUBLICATIONS ECRITES ET AFFICHEES****ARTICLES SCIENTIFIQUES:**

1. **“Assessment of High Risk Transmission of Tuberculosis in Antananarivo by spatial analysis and spoligotyping combined”** Noël H. Ratovonirina, Niaina Rakotosamimanana, Michel Gomgnimbou, Solohery L. Razafimahatratra, Mamy S. Raheison, Andrianantenaina Rakotoson, Guislaine Refregier, Christophe Sola, Fanjasoa Rakotomanana, Voahangy Rasolofo Razanamparany. (Publié dans BMC Infectious disease en Aout 2017 - DOI 10.1186/s12879-017-2653-9)
  
2. **“The Shared-Type 109 Malagasy *Mycobacterium tuberculosis* strain”** Noël H. Ratovonirina, Niaina Rakotosamimanana, Guislaine Refregier, Christophe Sola, Voahangy Rasolofo Razanamparany (En cours de soumission - PlosOne)
  
4. **“Spoligotype profile analyses of *M. tuberculosis* clinical strains isolated from the six different provinces of Madagascar”**, Noël Harijaona RATOSONIRINA, Niaina Rakotosamimanana, Anja Ratsiferana, Josuah RABEMIARANA, Herimanana RAMAROKOTO, Christophe Sola, Nalin Rastogi, Voahangy Rasolofo (en cours de soumission – PlosOne)
  
5. **“TB SPRINT and DST of 930 *Mycobacterium tuberculosis* strains”** Noël Harijaona RATOSONIRINA, Leen Rigouts, Voahangy Rasolofo, Christophe Sola (en cours de préparation- PlosOne)

**POSTERS :**

1. Poster pour le symposium du RIIP du 10 au 13 Septembre 2014:

**Spoligotype profile analyses of *M. tuberculosis* clinical strains isolated from the six different provinces of Madagascar**

Niaina Rakotosamimanana, Noël Harijaona RATOVNIRINA, Anja Ratsiferana, Josuah RABEMIARANA, Herimanana RAMAROKOTO, Christophe Sola, Nalin Rastogi, Voahangy Rasolofo

2. Poster pour le symposium du RIIP du 10 au 13 Septembre 2014:

**Spatial distribution of *Mycobacterium tuberculosis* clinical strain genotypes in Antananarivo: a pilot study**

Noël H. RATOVNIRINA, Mamy S. Raheison, Solohery L. RAZAFIMAHATRATRA, Niaina RAKOTOSAMIMANANA, Sahondra J. RAMBELOARISON, Andrianantenaina RAKOTOSON, Fanjasoa RAKOTOMANANA, Voahangy RASOLOFO

3. Poster pour le Congrès de la faculté de médecine d'Antananarivo du 30 Septembre au 02 Octobre 2014

**Distribution spatiale des génotypes des souches cliniques *Mycobacterium tuberculosis* à Antananarivo: étude pilote**

Noël H. RATOVNIRINA, Mamy S. Raheison, Solohery L. RAZAFIMAHATRATRA, Niaina RAKOTOSAMIMANANA, Sahondra J. RAMBELOARISON, Andrianantenaina RAKOTOSON, Fanjasoa RAKOTOMANANA, Voahangy RASOLOFO

**Titre :** Etudes descriptive, épidémiologique, moléculaire et spatiale des souches de *Mycobacterium tuberculosis* circulant à Antananarivo, Madagascar

**Mots clés :** *M. tuberculosis*, génotypage, épidémiologie, Antananarivo, Cluster spatial, ST 109

Pour l'amélioration de la lutte contre la tuberculose à Madagascar, nous avons décidé de mener des études sur l'analyse de la diversité et la distribution des génotypes de BK y circulant au cours du temps et dans l'espace afin de connaître le mode de transmission de la TB et les sources potentielles de la TB malgache. Plus spécifiquement il s'agit premièrement, d'étudier la diversité génétique et la distribution des génotypes des BK dans le pays pour évaluer le niveau de transmission de la maladie et d'essayer de retracer les sources potentielles d'importation de la TB malgache ; deuxièmement, étudier la diversité de la souche endémique de Madagascar, le SIT109, afin de voir le niveau de transmission d'une souche à l'intérieur de l'île ainsi que son niveau d'évolution ; et troisièmement, identifier les zones de transmission de la TB par combinaison d'analyse spatiale et de génotypage en commençant par une étude pilote dans la capitale.

Pour réaliser cela, 1014 souches représentatives de Madagascar isolés de 2005 à 2007 ont été typés par le spoligotypage. Les génotypes définis ont servi pour l'estimation de la transmission de la TB et l'identification des sources potentielles de la TB ; ensuite, 156 BK endémiques de Madagascar portant l'identité SIT109 ont été typés par la méthode des MIRU-VNTR (« Mycobacterial Interspersed Repetitive Units – Variable Number of Tandem Repeat ») afin d'étudier leur diversité, leur niveau d'évolution et le niveau de distribution de la TB au niveau d'une seule souche et enfin, 523 patients ont été recrutés à Antananarivo en 2013 afin de typer par le spoligotypage leur BK, d'identifier à partir de leur

génotype ceux qui sont potentiellement associés à des cas de transmission récente et d'analyser leur clusterisation spatiale par la méthode de Kulldorff.

Les résultats nous ont montré une grande diversité génétique des BK circulant dans le pays avec une prédominance de deux lignées de BK qui sont les souches « East african Indian » et « Tuscan » ; une distribution particulière des BK dans la capitale par rapport aux autres provinces ; des similitudes particulières des BK circulant avec des pays comme les USA, la France, l'Italie, le Danemark, l'Arabie Saoudite ou encore le Pays Bas ; une grande diversité des souches SIT109 ainsi que leur distribution dans tout le pays ; ainsi que quatre clusters spatiaux de cas de TB associé à la transmission récente dans la capitale.

Cette étude nous a permis de déterminer que la transmission de la TB à Madagascar est toujours très active et se fait à très grande échelle, une petite part de la TB à Madagascar a pu être importée par les populations d'origines mais la majorité des cas actuels provient d'importation assez récente de BK de plusieurs régions du monde. Douze Fokontany de la capitale correspondent à des zones à risque de transmission de la TB et méritent une attention particulière aux responsables de la lutte contre la TB à Madagascar et enfin la méthode combinant génotypage et analyse spatiale permet la détection de ces zones à risque et pourrait servir pour le « Programme National de Lutte contre la Tuberculose » d'outil d'aide à la décision pour les stratégies de lutte contre la TB dans tout Madagascar.

**Title :** Descriptive, epidemiological, molecular and spatial studies of *Mycobacterium tuberculosis* strains circulating in Antananarivo, Madagascar

**Keywords :** *M. tuberculosis*, genotyping, epidemiology, Antananarivo, Spatial cluster, L1/SIT 109

For improving the fight against tuberculosis in Madagascar, we decided to conduct studies on the analysis of the diversity and spatio-temporally distribution of BK genotypes circulating in Madagascar for analyzing the TB transmission mode and the potential origins of Malagasy TB. More specifically, it is to study the genetic diversity and distribution of genotypes of *M. tuberculosis* strains in the country to assess the transmission level of the disease and to identify the potential sources of Malagasy TB; secondly, to study the diversity of the endemic strain of Madagascar, SIT109, in order to assess the transmission level of the strain inside the island and its level of evolution; and third, to identify TB transmission areas by combining spatial analysis and genotyping, starting with a pilot study in the capital.

To achieve this, 1014 BK representative of Madagascar isolated in 2005 to 2007 were typed by the spoligotyping. Defined genotypes were used to estimate the TB transmission level and the identification of potential sources of malagasy TB; after, 156 endemic BK from Madagascar bearing the identity SIT109 were typed by the MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units – Variable Interspersed Repeative Units) method to study their diversity, their evolution level and the level of TB transmission at a single strain; and finally, 523 patients were recruited in Antananarivo in 2013 in order to type by spoligotyping their BK, to identify from their

genotype those that are potentially associated with recent transmission cases and to analyze their spatial clustering by the Kulldorff method.

The results showed a high genetic diversity of BK circulating in the country with a predominance of two strains, "East African Indian" and "Tuscan"; a particular distribution of BK genotypes in the capital compared to the other provinces and particular similarities of the BK circulating with countries such as the USA, France, Italy, Denmark, Saudi Arabia or the Netherlands; a high variety of SIT109 strains and their distribution throughout the country; as well as four TB cases associated with recent transmission spatial clusters in the capital.

This study allowed us to determine that the TB transmission in Madagascar is still very active and it is done on a very large scale, a small part of TB in Madagascar could be imported by the origin populations but the majority of cases is due to relatively recent importations of BK from several regions of the world. Twelve Fokontany in the capital corresponds to TB high risk transmission areas and need special attention to those responsible for the control of TB in Madagascar and finally the method combining genotyping and spatial analysis allows the detection of these high risk areas and could be used for the "Programme National de Lutte contre la TB" as a decision tool for orientation of the TB fight strategies throughout Madagascar.

