

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      | ■  | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■  | ■  | ■  | ■  | ■             | 000000000003771  |                |
| 482          | BOV1         | ■  | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■  | ■  | ■  | ■  | ■             | 67677377777600   |                |
| 683          |              | ■  | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■  | ■  | ■  | ■  | ■             | 66407377777600   |                |
| 479          |              | ■  | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■  | ■  | ■  | ■  | ■             | 64001377777600   |                |
| 647          |              | ■  | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■  | ■  | ■  | ■  | ■             | 27777377737600   |                |
| ND           | BOY          | ■  | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■  | ■  | ■  | ■  | ■             | 67677777777600   |                |
| 592          | Canettii     | ■  | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■  | ■  | ■  | ■  | ■             | 00000000101000   |                |
| 26           | CAS1-Delhi   | ■  | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■  | ■  | ■  | ■  | ■             | 703777740003771  |                |
| 21           |              | ■  | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■  | ■  | ■  | ■  | ■             | 703377400001771  |                |
| 288          |              | ■  | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■  | ■  | ■  | ■  | ■             | 700377740003771  |                |
| ND           |              | ■  | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■  | ■  | ■  | ■  | ■             | 703777740003771  |                |
| 48           | EAI1-SOM     | ■  | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■  | ■  | ■  | ■  | ■             | 77777777413731   |                |
| 19           |              | ■  | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■  | ■  | ■  | ■  | ■             | 677777477413771  |                |
| 89           |              | ■  | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■  | ■  | ■  | ■  | ■             | 674000003413771  |                |
| ND           |              | ■  | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■  | ■  | ■  | ■  | ■             | 677777477413771  |                |
| 11           |              | ■  | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■  | ■  | ■  | ■  | ■             | 47777777413071   |                |
| 139          |              | ■  | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■  | ■  | ■  | ■  | ■             | 77777774413771   |                |
| 236          |              | ■  | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■  | ■  | ■  | ■  | ■             | //////////413111 |                |
| 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           | ■            |  | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■  | ■  | ■  | ■  | ■             | 7777777763771    |                |
| 1378         | ■            |  | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■  | ■  | ■  | ■  | ■             | 7777777770771    |                |
| 539          | Microti      | ■  | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■  | ■  | ■  | ■  | ■             | 00000000000600   |                |
| 593          | PINI1        | ■  | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■  | ■  | ■  | ■  | ■             | 07400003777600   |                |
| 637          |              | ■  | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■  | ■  | ■  | ■  | ■             | 0000000777600    |                |
| ND           |              | ■  | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■  | ■  | ■  | ■  | ■             | 07400003777600   |                |
| 34           | S            | ■  | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■  | ■  | ■  | ■  | ■             | 77637777760771   |                |
| 1737         |              | ■  | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■  | ■  | ■  | ■  | ■             | 777760017760771  |                |
| 53           |              | ■  | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■  | ■  | ■  | ■  | ■             | 77777777760771   |                |
| 280          |              | ■  | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■  | ■  | ■  | ■  | ■             | //////////60111  |                |
| 52           |              | ■  | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■  | ■  | ■  | ■  | ■             | 77777777760731   |                |
| 135          |              | ■  | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■  | ■  | ■  | ■  | ■             | 77777777760730   |                |
| 37           |              | ■  | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■  | ■  | ■  | ■  | ■             | 77737777760771   |                |
| 149          |              | ■  | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■  | ■  | ■  | ■  | ■             | 777000377760771  |                |
| 627          |              | ■  | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■  | ■  | ■  | ■  | ■             | 74173777760771   |                |
| 40           |              | ■  | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■  | ■  | ■  | ■  | ■             | 77777377760771   |                |
| 39           |              | ■  | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■  | ■  | ■  | ■  | ■             | 77777347760471   |                |
| 44           |              | ■  | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■  | ■  | ■  | ■  | ■             | 77777577760771   |                |
| 58           |              | ■  | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■  | ■  | ■  | ■  | ■             | 77777557760771   |                |
| 254          |              | ■  | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■  | ■  | ■  | ■  | ■             | 77760007760771   |                |
| 119          |              | X1                                       | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■  | ■  | ■  | ■  | ■             | ■                | 77777677760771 |
| 137          |              |  | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■  | ■  | ■  | ■  | ■             | ■                | 77777677760601 |
| 92           |              |  | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■  | ■  | ■  | ■  | ■             | ■                | 70007677760771 |
| 405          | ZERO         | ■  | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■  | ■  | ■  | ■  | ■             | 77777700000011   |                |

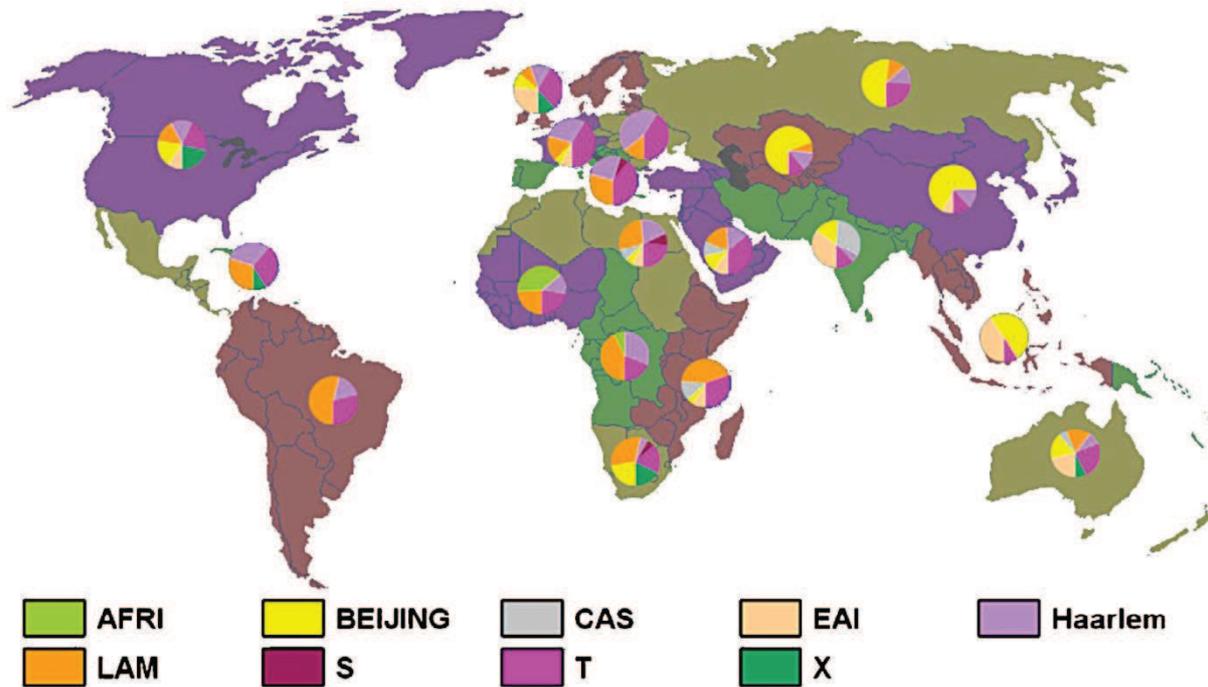


Figure 16: Distribution des lignées de spoligotype dans SITVITWEB (Demay *et al.*, 2012)

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).

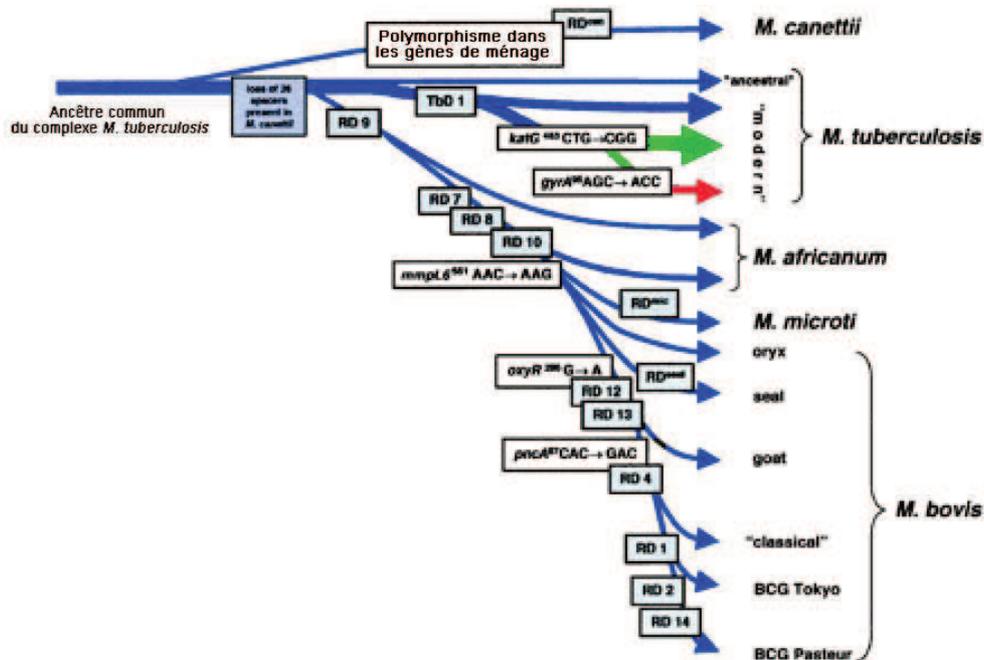
Des études ont démontré la circulation de souches particulières dans des zones précises. Le SIT109 est une souche endémique à Madagascar (Brudey *et al.*, 2006; Ferdinand *et al.*, 2005). Des études récentes ont suggéré que ces souches ont pu être importées en Arabie Saoudite par des malgaches lors des 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).

## II.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**

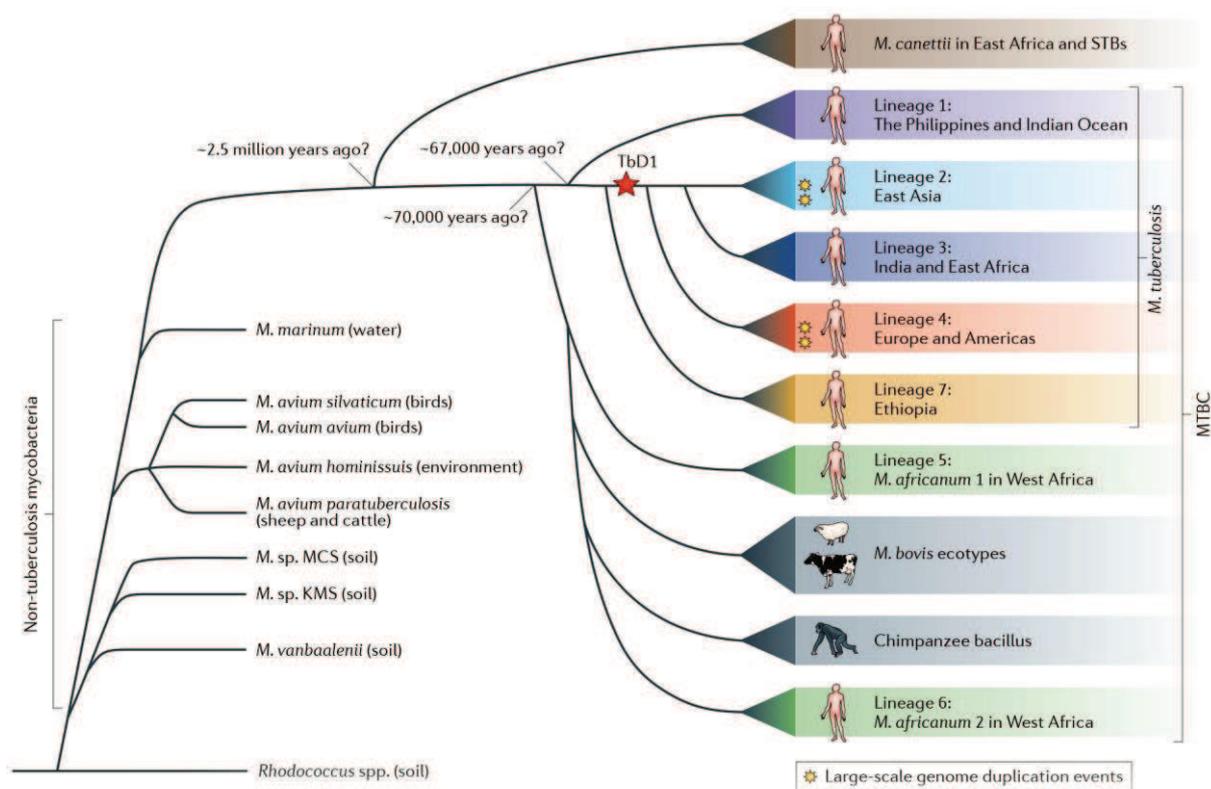
Schéma basé sur la présence ou l'absence de régions de délétion et de séquences polymorphes dans une sélection de 5 gènes. Les distances entre les branches ne correspondent pas à la phylogénie actuelle calculée par d'autres méthodes.

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).

## **II.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).

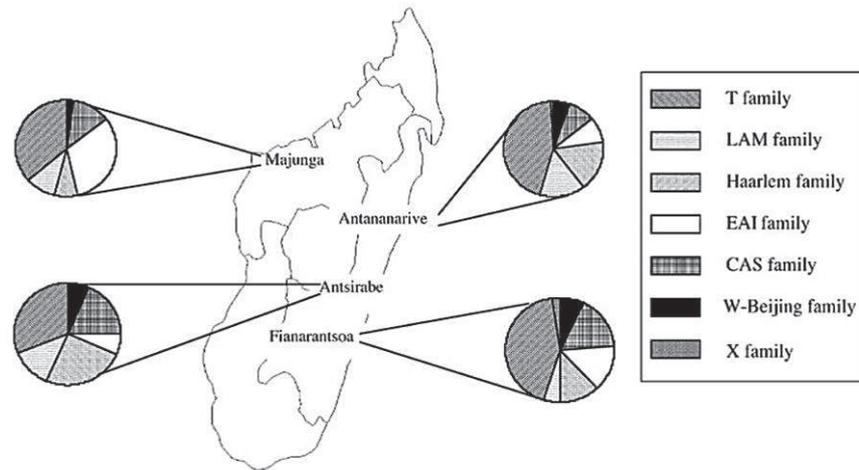


Figure 19: Description et distribution des principaux spoligotypes trouvés à Madagascar (Ferdinand *et al.*, 2005)

Des études ont montré l'existence de clusters spatiaux de cas de TB dans la capitale de Madagascar (figure 20) (Rakotosamimanana *et al.*, 2014; Randremanana *et al.*, 2009; Randremanana *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.

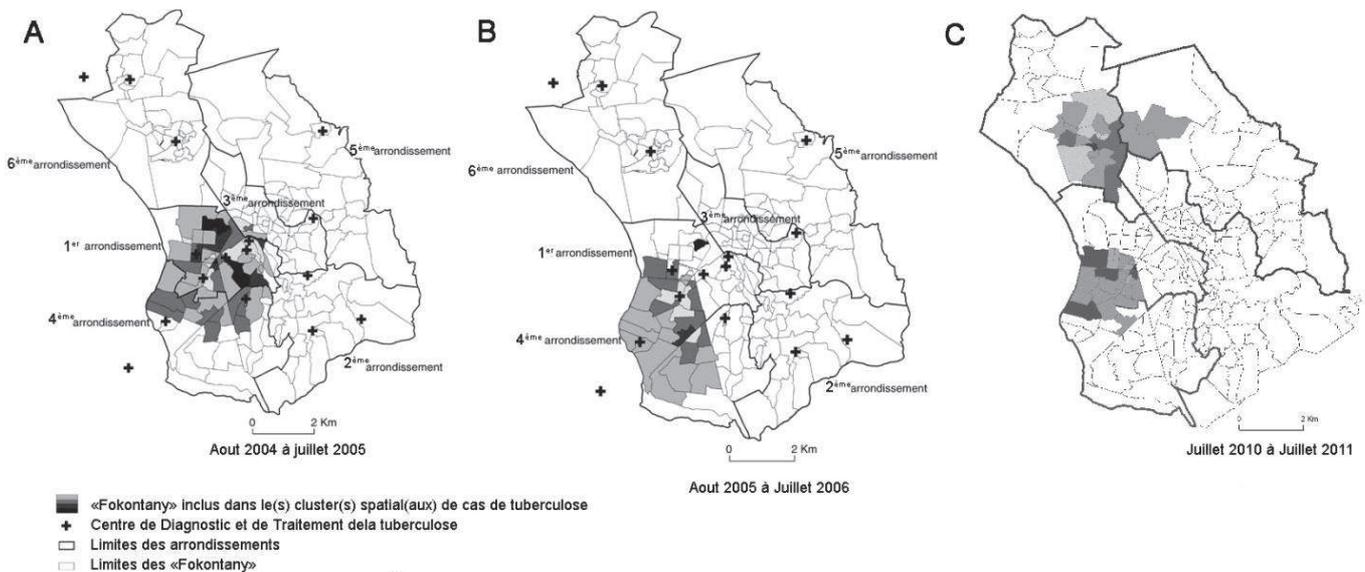


Figure 20: Les clusters spatiaux de cas de TB à Antananarivo, de 2005 à 2011

### 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**

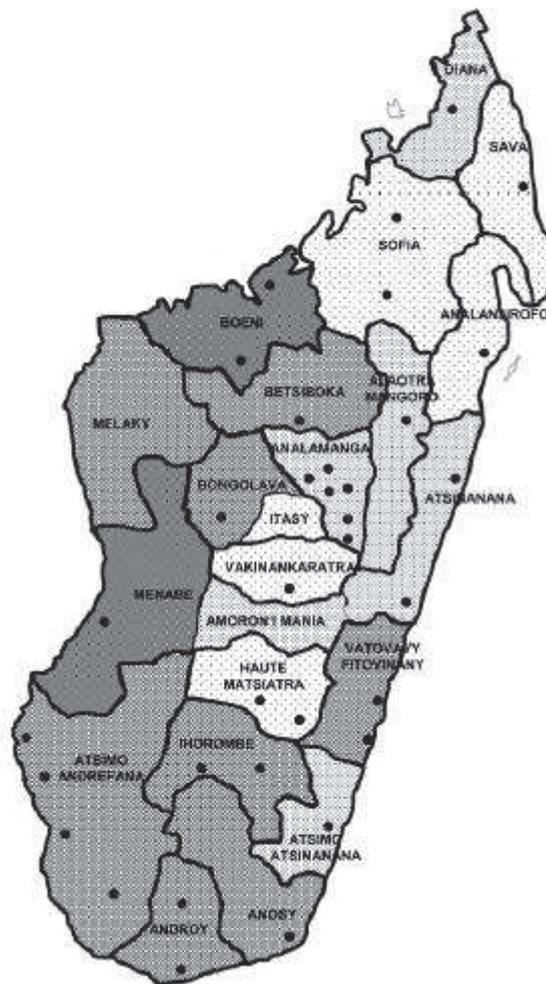
##### **III.2.2.1 DESCRIPTION DE LA ZONE D'ETUDE**

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).