

II.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.

II.6.1 LA RESISTANCE NATURELLE AUX ANTITUBERCULEUX

Les membres du complexe *M. tuberculosis* sont naturellement résistants à la plupart des antibiotiques usuels (β -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 β -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 β -lactamase responsable de la résistance naturelle aux β -lactamines (Voladri *et al.*, 1998) ou l'aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase impliquée dans la résistance aux aminoglycosides (Ainsa *et al.*, 1997).

II.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).

II.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).

II.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.

II.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 ».

II.6.4 LES METHODES DE DIAGNOSTIC DE LA RESISTANCE AUX ANTITUBERCULEUX

II.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).

II.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 β 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>	β -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 β 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® MTBDRsI (Hillemann *et al.*, 2009; Kiet *et al.*, 2010)

Le test Genotype® MTBDRsI (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® MTBDRplus. 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 »).

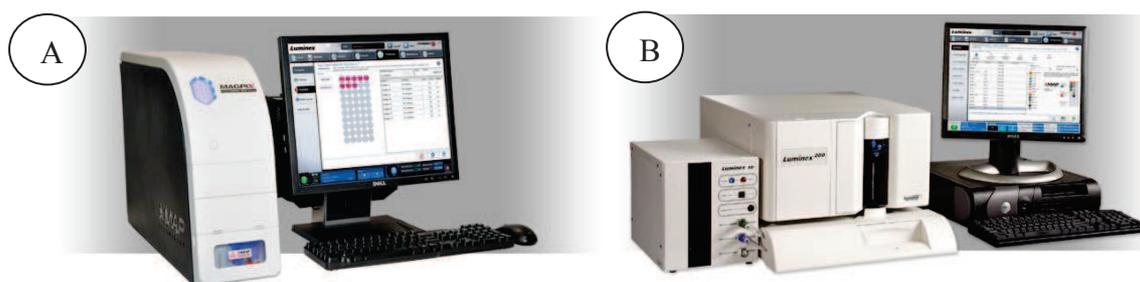


Figure 15: A- le Magpix; B- le Luminex 200

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).

II.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.

II.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*.

II.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).

II.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 géotypes 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).

II.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).

II.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).

II.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).

II.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).

II.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.