

TABLE DES MATIERES

ABBREVIATION.....	i
GLOSSAIRE.....	ii
LISTE DES TABLEAUX	iv
LISTE DES FIGURES	v
<hr/>	
I. INTRODUCTION.....	1
II. GENERALITES.....	4
A. LA TUBERCULOSE	4
A.1. Historique	4
A.2. Physiopathologie de la tuberculose.....	4
A.2.1. Transmission	4
A.2.2. Infection tuberculeuse.....	5
A.2.2.a. Infection tuberculeuse latente.....	5
A.2.2.b. Tuberculose active	5
A.3. Réaction immunitaire de l'hôte face à l'infection par <i>M. tuberculosis</i>	5
A.3.1. Réponse immunitaire innée	5
A.3.2. Réponse immunitaire adaptative cellulaire (RIAC)	6
A.3.2..a. Réponse Th1.....	7
A.3.2..b. Réponse Th2.....	7
A.3.2..c. Réponse Th17.....	7
A.4. Diagnostic	7
A.4.1. Diagnostic clinique.....	7
A.4.2. Examens complémentaires.....	7
A.5. Traitement.....	8
A.6. Epidémiologie de la tuberculose à Madagascar.....	8
B. LES MYCOBACTERIES	8
B.1. Taxonomie.....	8
B.2. L'espèce <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	9
B.2.1. Caractéristiques bactériologiques	9
B.2.2. Caractères moléculaires du bacille	10
B.2.2.a. Le génome de <i>M. tuberculosis</i>	10

B.2.2.b. Les marqueurs génétiques ou moléculaires	10
i. <i>Polymorphic GC-rich repeat sequence (PGRS)</i>	10
ii. <i>La séquence d'insertion IS6110</i>	10
iii. <i>La région DR (« Direct Repeat »)</i>	11
iv. <i>MIRU-VNTR («Mycobacterial Interspersed Repetitive Units-Variable Number of Tandem Repeats typing»)</i>	11
v. <i>SNPs (« Single Nucleotide Polymorphism »)</i>	11
B.2.2.c. Méthodes de génotypage de <i>M. tuberculosis</i>	12
i. <i>IS6110-RFLP</i>	12
ii. <i>Spoligotyping</i>	13
iii. <i>Analyse des MIRU-VNTR</i>	13
iv. <i>Typage des SNPs</i>	13
B.2.3. Classification des souches <i>M. tuberculosis</i>	14
C. VIRULENCE, PATHOGENICITE ET DIVERSITE GENETIQUE	15
C.1. Diversité génétique et forme clinique.....	15
C.2. Diversité génétique et histopathologie clinique.....	16
C.3. Etude de la virulence sur des modèles expérimentaux	16
C.3.1. Etude de la virulence des souches sur les modèles cellulaires.....	16
C.3.2. Etude de la virulence sur les modèles animaux	17
D. POLYMORPHISME GENETIQUE DES SOUCHES <i>M. TUBERCULOSIS</i> A MADAGASCAR ..	22
III. MATERIELS ET METHODES.....	23
A. MATERIELS	23
A.1. Matériels biologiques	23
A.2. Matériels utilisés	23
A.2.1. Pour l'extraction et la quantification de l'ADN	23
A.2.2. Pour le génotypage	24
A.3. Réactifs et tampons	24
A.3.1. Réactifs Pour l'extraction d'ADN	24
A.3.2. Réactifs pour la quantification d'ADN	25
A.3.3. Pour le génotypage	25
B. METHODES.....	25
B.1. Extraction de l'ADN des souches <i>M. tuberculosis</i>	25

B.1.1. Principe	25
B.1.2. Méthode	26
B.2. Quantification de l'ADN.....	26
B.2.1. Electrophorèse en gel d'agarose.....	26
B.2.1.a. Principe	26
B.2.1.b. Préparation du minigel d'agarose 0,8% :	27
B.2.1.c. Dépôt des ADN à doser.....	27
B.2.1.d. Migration	27
B.2.1.e. Quantification de l'ADN extrait.....	27
B.2.2. Dosage avec le Spectrophotomètre Nanodrop.....	28
B.3. Génotypage	28
B.3.1. Principe	29
B.3.2. Précautions de travail	31
B.3.3. Les sondes et amorces utilisées	31
B.3.4. Préparation du « mix » ou mélange réactionnel.....	32
B.3.5. Ajout de l'ADN.....	33
B.3.6. Amplification.....	33
B.3.7. Lecture des résultats	34
B.4. Analyse des résultats.....	35
B.4.1. Classification des souches	35
B.4.2. Analyses statistiques	35
B.4.2.a. Association entre le génotype des souches bactériennes et la réponse en IFN- γ de l'hôte.....	36
B.4.2.b. Association entre le génotype des souches bactériennes et la réponse immunitaire du type Th1, Th2, Th17 de l'hôte.....	36
IV. RESULTATS.....	37
A. CLASSIFICATION.....	37
A.1. Description des spoligotypes des souches analysées	37
A.2. Génotypage des SNPs	37
A.2.1. Description du résultat	37
A.2.2. Corrélation entre les génotypes SNPs et les spoligotypes	39
B. ETUDE DE LA REONSE IMMUNE EN FONCTION DU GENOTYPE DES SOUCHES	41
B.1. Etude de la réponse en IFN- γ selon les lignées des souches.....	41

B.2. Etude de la réponse immune de types Th1, Th2 et Th17 selon les lignées de souches.....	43
B.2.1. Réponse du type Th1.....	43
B.2.2. Réponse Th2.....	44
B.2.3. Réponse Th17.....	46
V. DISCUSSION.....	48
VI. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	51

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXE

RESUME/ABSTRACT

SIGLES ET ABREVIATIONS

10X : Concentrée 10 fois à la normale

ADN : Acide désoxyribonucléique

BAAR : Bacille Acidoo-Alcooloo-Resistant

BET: Bromure d'éthidium

BK : Bacille de Koch

CAS : Central Asian

CMH : Complexe Majeur d'histocompatibilité

CTAB : Bromure de cétyltriméthylammonium

dNTP : Désoxyribonucléotide triphosphate

DOTS : Directly Observed Therapy Short-course

DR : Direct Repeat

EAI : East African Indian

ED : Eau distillée

EDTA : Ethylène Diamine Acide Tétraacétique

ELISPOT: Enzyme Linked ImmunoSPOT

ESAT 6: Early Secretory Antigenic Target 6

HPLC: High-performance liquid chromatography

IFN- γ : Interféron gamma

IL- β : Interleukine beta

IPM : Institut Pasteur de Madagascar

IS : Insertion Sequence

LAM : Latino-American an Mediterranean

LJ : Löweinsten-Jensen

MGB : Minor Groove Binder

MGIT : Mycobacterial Growth Indicator Tube

MIRU : Mycobacterial Interspersed Repetitive Units

mM : Millimolaire

NFQ : Non-Fluorescent Quencher

ng : Nanogramme

nm : Nanomètre

PBMC : Peripherals Bloods Mononuclear

PCR : Polymerase Chain Reaction

PGRS : Polymorphic GC-rich repeat sequence

PNLT : Programme National de Lutte contre la Tuberculose

PPD : Purifies Protein Derivative

qsp : quantité suffisante pour

RFLP : Restriction Fragment Length polymorphism

SDS : Sodium Dodécyl Sulfate

SNP : Single Nucleotide Polymorphism

ST : Shared Type

TbD : Tuberculosis Deletion

TBE : Tris Borate EDTA

TE : Tris EDTA

Th : Lymphocyte T helper

TNF- α : Tumor Necrosis Factor alpha

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

VNTR : Variable Number of Tandem Repeat

WHO : World Health Organization

GLOSSAIRE

- **Génome** : Ensemble du matériel génétique d'un individu ou d'une espèce (ADN).
- **Génotype** : Ensemble ou une partie donnée de la composition génétique d'un individu (forme allélique d'un gène).
- **Un allèle** : Une des formes alternatives d'un gène.
- **Phénotype** : Ensemble des caractéristiques (anatomiques, morphologiques, moléculaires, ou physiologiques) d'un individu résultant de l'expression de ses gènes et de leurs éventuelles interactions avec l'environnement
- **Génotypage** : Technique pour différencier les génotypes en déterminant la nature d'une variation génétique à une position spécifique dans le génome, pour un individu ou espèce donné.
- **Cytokine** : Une molécule sécrétée par un grand nombre de cellules, en particulier les lymphocytes et les macrophages et impliquée dans le développement et la régulation des réponses immunitaires.
- **Antigène** : Une substance étrangère à l'organisme capable de déclencher une réponse immunitaire visant à l'éliminer.
- **Hybridation moléculaire** : Appariement de chaînes d'acides nucléiques complémentaire simple brin.
- **Sonde nucléique** : Séquence nucléotidique complémentaire d'une séquence d'ADN avec laquelle elle va s'hybrider.
- **Amorce** : Un oligonucléotide qui, hybridé avec une matrice d'acide nucléique, permet à une polymérase d'initier la synthèse du brin complémentaire.
- **PCR ou « Polymerase Chain Reaction »** : Un procédé d'amplification *in vitro* d'une séquence définie d'ADN, faisant intervenir des cycles successifs d'appariements d'oligonucléotides spécifiques et d'elongation à l'aide d'une polymérase.
- **Marqueur génétique** : Une séquence d'ADN repérable spécifiquement.
- **Homoplasie** : La ressemblance d'un état de caractère chez différentes espèces qui ne provient pas d'un ancêtre commun. Cela peut être de la convergence lorsqu'un caractère évolué se retrouve dans ces espèces ou de la réversion (ou mutation inverse) quand un caractère évolué retourne à son état primitif.
- **Phylogénie** : Etude des liens existant entre espèces apparentées. La notion de phylogénie est indissociable de l'évolution, puisqu'elle part du principe que les organismes possèdent entre eux un lien de parenté.

- **Spoligotype** : profil génétique des souches *M. tuberculosis* selon l'analyse de la région DR du génome, un marqueur génétique, par la technique de typage appelée spoligotyping (cf page 13).
- **Muropeptide** : unité de polymère constituant la molécule de peptidoglycane de la paroi bactérienne.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Les différents types de classification des souches <i>M. tuberculosis</i> basés sur les SNPs et sur le spoligotype.	15
Tableau 2 : Etudes expérimentales explorant les différences dans la virulence parmi les différents génotypes des souches du complexe <i>M. tuberculosis</i>	18
Tableau 3 : Les SNPs (n=6) ou mutations caractéristiques des lignées de <i>M. tuberculosis</i>	28
Tableau 4 : Fonction des gènes analysés	29
Tableau 5 : Caractéristiques des sondes utilisées pour la détection de chaque SNP.	32
Tableau 6 : Caractéristiques des amorces sens « F » (Forward) et anti-sens « R » (Reverse). ...	32
Tableau 7 : Composition et volume des réactifs pour l'amplification par PCR.	32
Tableau 8 : Programme de la PCR.....	33
Tableau 9 : Distribution des souches selon leur spoligotype et selon la lignée de souches..	39

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure du Granulome.....	6
Figure 2 : Taxonomie des mycobactéries.....	9
Figure 3 : Thermocycleur Applied Biosystem-StepOne	24
Figure 4 : Dépôt des ADN à doser sur le gel d'agarose.....	27
Figure 5 : Principe de la détection de SNPs par PCR en temps réel TAQMAN®	30
Figure 6 : Courbe d'amplification représentant les intensités normalisées (Rn) des reporters dans chaque puits en fonction du nombre du cycle.....	34
Figure 7 : Représentation graphique des résultats du génotypage d'un SNPs obtenu par Taqman ®.....	35
Figure 8 : Classification des 164 souches par lignées <i>M. tuberculosis</i>	38
Figure 9 : Distribution des souches selon le groupe TbD1.....	38
Figure 10 : Dendrogramme des 155 souches classées selon leur profil spoligotype.....	40
Figure 11 : Nombre de cellules (PBMC) sécrétrices d'IFN- γ chez les patients tuberculeux (nombre de spots pour 106 cellules) après stimulation par l'antigène ESAT-6.....	42
Figure 12 : Nombre de cellules (PBMC) sécrétrices d'IFN- γ chez les patients tuberculeux (nombre de spots pour 106 cellules) après stimulation par l'antigène PPD.....	42
Figure 13 : Réponse immune Th1 chez les patients tuberculeux	44
Figure 14 : Réponse immune de type Th2 (IL-4, IL-5 et IL-10) chez les patients tuberculeux ..	45
Figure 15 : Réponse immune de type Th17 chez les patients tuberculeux	47

I. INTRODUCTION

La tuberculose (TB) est une maladie infectieuse transmissible causée par des mycobactéries du complexe *Mycobacterium tuberculosis*. Elle constitue l'une des maladies infectieuses les plus meurtrières causant environ 1,4 millions de décès chaque année. En 2011, 8,7 millions de nouveaux cas ont été observés (WHO 2012). Les habitants des pays en voie de développement sont les plus touchés. Les personnes présentant une co-infection avec le VIH ou celles qui ont leur système immunitaire affaibli présentent un risque élevé de développer la tuberculose active. La tuberculose est une cause majeure de décès chez les personnes vivant avec le VIH.

La tuberculose se manifeste sous différentes formes cliniques. La forme pulmonaire, qui est la forme contagieuse, est la plus fréquente. Suite à l'exposition à un cas de tuberculose, les sujets exposés peuvent être infectés ou non en fonction de la durée, de l'intensité de l'exposition, de la charge bacillaire des expectorations de la personne malade et de la potentialité de l'immunité innée à éliminer les bactéries. Seuls 5 à 10% des individus infectés développeront la maladie au cours de leur vie, généralement après une période de latence qui peut varier de quelques semaines à plusieurs décennies. L'activation de la maladie peut-être attribuée à des facteurs de l'hôte ou des facteurs environnementaux tels que la pauvreté, la malnutrition, le stress Des facteurs bactériens, comme la variabilité génétique des souches de *M. tuberculosis* pourraient aussi être impliqués.

Les connaissances sur la génétique des mycobactéries ont beaucoup progressé grâce au décryptage de la séquence du génome de la souche de référence *M. tuberculosis* H37Rv. De ce fait, et contrairement à ce que l'on pensait avant les années 1980, *M. tuberculosis* se trouve parmi les bactéries les mieux caractérisées sur le plan génétique avec une grande diversité. En effet, les souches constituant le complexe *M. tuberculosis* peuvent être identifiées et classifiées en famille de souches et/ou en lignées évolutives sur la base des différences génétiques et génomiques comme les polymorphismes de séquence ou les polymorphismes de marqueurs génétiques.

Plusieurs méthodes de typage de *M. tuberculosis* basées sur ces polymorphismes ont été mises au point. La méthode de typage par « Restriction Fragment Length Polymorphism » (RFLP) avec comme marqueur la séquence d'insertion IS6110 a été initialement considérée comme la méthode de référence (van Embden, Cave et al. 1993). Elle est basée sur la position et le nombre de copies de l'IS6110 dans le génome. Cette technique est un outil discriminatoire pour les enquêtes épidémiologiques mais elle n'est pas nécessairement la mieux adaptée pour l'analyse phylogénétique. Deux autres méthodes, le spoligotyping (« spacer oligonucleotide

typing ») (Kamerbeek, Schouls et al. 1997) et le typage de MIRU-VNTR (« *Mycobacterial Interspersed Repetitive Units-Variable Number of Tandem Repeats typing* ») (Supply, Lesjean et al. 2001) ont permis une standardisation de l'analyse génotypique. Le spoligotypage repose sur l'analyse de la région unique, polymorphe, dans le génome appelée région DR (Direct Repeats). Elle est techniquement simple, reproductible mais elle n'est pas suffisamment discriminatoire pour les souches étroitement apparentées (Gori, Bandera et al. 2005). En revanche, l'analyse des *loci* MIRU-VNTR, technique plus récente, est plus discriminatoire et reproductible et permet l'analyse à haut débit des isolats cliniques.

Les polymorphismes nucléotidiques simples ou « *Single Nucleotide Polymorphism* » (SNP) sont aussi des marqueurs utiles pour les études évolutives et épidémiologiques de *M. tuberculosis* (Sreevatsan, Pan et al. 1997; Baker, Brown et al. 2004; Filliol, Motiwala et al. 2006; Gagneux, DeRiemer et al. 2006; Gutacker, Mathema et al. 2006; Hershberg, Lipatov et al. 2008). Plusieurs SNP ont été proposés pour différencier les espèces du complexe *M. tuberculosis* en six groupes phylogénétiques distincts ou lignées. De plus, il a été observé que ces lignées peuvent avoir des propriétés phénotypiques différentes (Thwaites, Caws et al. 2008).

A Madagascar, plusieurs études sur la diversité génétique des souches *M. tuberculosis* circulant dans le pays ont été réalisées par l'Institut Pasteur de Madagascar (IPM). Elles ont permis d'observer un grand polymorphisme des souches *M. tuberculosis* suite à l'analyse de la séquence polymorphe IS6110 ainsi que la région DR du génome. Les souches avec une seule copie d'IS6110 sont relativement fréquentes. Par ailleurs, la majorité des familles de spoligotype décrites dans le monde (Beijing, Bovis, « Central Asian » [CAS], « East African Indian » [EAI], Haarlem, « Latino-American and Mediterranean » [LAM] ont été retrouvées, montrant la diversité des souches *M. tuberculosis* circulant dans le pays (Brudey, Driscoll et al. 2006).

D'autre part, les modèles cellulaires et animaux d'infection suggèrent que la lignée des souches *M. tuberculosis* a une influence sur l'évolution clinique de la maladie (Gagneux and Small 2007; Thwaites, Caws et al. 2008). En outre, une étude menée par l'IPM a montré que les souches *M. tuberculosis* de spoligotypes comme Beijing et CAS avaient tendance à induire une réponse IFN- γ faible comparées aux souches de spoligotype EAI (Rakotosamimanana, Raharimanga et al. 2010), ce qui suggère l'existence d'une relation entre les génotypes des souches *M. tuberculosis* et la réponse immune de l'hôte humain. De même, les différentes souches de *M. tuberculosis* pourraient induire des réponses immunitaires variables, comme la famille Beijing qui a tendance à donner une réponse Th1 faible représentée par une faible production d'IFN- γ (Rakotosamimanana, Raharimanga et al. 2010; Portevin, Gagneux et al. 2011) et une réponse anti-inflammatoire caractérisée par une faible production de TNF- α . (Lopez, Aguilar et al. 2003).

Introduction

Comme pour la première étude effectuée par Rakotosamimanana et al (2010), l'association entre le génotype de souches *M. tuberculosis* et le phénotype de l'hôte portait sur le spoligotype (permettant la classification des souches), dans cette étude, le SNPs a été utilisé pour typer les souches bactériennes car il permet la phylogénie des souches *M. tuberculosis*.

Ainsi, l'objectif de cette étude est de déterminer s'il existe une association entre la lignée phylogénétique des souches *M. tuberculosis* circulant à Madagascar, isolées à partir des malades tuberculeux, et le phénotype de l'hôte. Plus spécifiquement, il s'agit :

- d'étudier la diversité génétique des souches *M. tuberculosis* circulant à Antananarivo par la technique de typage des SNPs spécifiques des grandes lignées de *M. tuberculosis*,
- de rechercher s'il existe une association entre cette diversité et la réponse immune chez les patients.

.

II. GENERALITES

A. LA TUBERCULOSE

A.1. HISTORIQUE

La tuberculose a été décrite depuis le temps d'Hippocrate, environ 460 avant J.C., sous le terme de « phtisie », un terme grec signifiant le dépérissement. Hippocrate en dresse les symptômes, tels que l'amaigrissement progressif, la langueur, la toux et la présence de sang dans les crachats. Il décrit aussi les autres formes de tuberculose, comme la forme osseuse et la forme ganglionnaire.

La transmissibilité de la tuberculose a été démontrée en 1866 par Villemin qui, par méthode expérimentale, a prouvé l'inoculabilité de produits tuberculeux à l'animal et donc la contagion de la tuberculose.

En 1882, Robert Koch, un microbiologiste allemand a découvert la bactérie responsable de la tuberculose, le bacille tuberculeux ou bacille de Koch (BK). En 1890, le test à la tuberculine permettant de diagnostiquer la maladie a été mis au point par Koch.

En 1921, Albert Calmette et Camille Guérin ont mis au point le vaccin protégeant contre ce germe, le BCG (bacille Calmette-Guérin).

L'année 1944 marque le début de la chimiothérapie de la tuberculose grâce à la découverte de la streptomycine par un microbiologiste américain, Selman Abraham Waksman. Mais le traitement connaît des progrès révolutionnaires avec l'apparition de l'acide paraminosalicylique en 1948, l'isoniazide en 1952, le pyrazinamide en 1954, l'éthambutol en 1962 et la rifampicine en 1968.

Enfin, le séquençage complet du génome de *Mycobacterium tuberculosis* fut réalisé en 1998.

A.2. PHYSIOPATHOLOGIE DE LA TUBERCULOSE

A.2.1. Transmission

La tuberculose se transmet généralement par voie aérienne, par l'inhalation de gouttelettes émises par un individu atteint d'une tuberculose active lorsqu'il tousse, parle ou éternue. Ces gouttelettes en suspension dans l'air sont chargées de quelques bactéries.

A.2.2. Infection tuberculeuse

A.2.2.a. Infection tuberculeuse latente

L'infection tuberculeuse latente correspond au premier contact de l'organisme avec *M. tuberculosis*. Après cette primo-infection, le bacille peut rester longtemps dans l'organisme à l'état latent et attendre un affaiblissement des défenses immunitaires de l'hôte pour se multiplier. Ainsi, un foyer infectieux se développe au niveau du poumon provoquant une lésion ou « chancre d'inoculation » qui est caractéristique de l'infection latente. L'organisme de la personne infectée réagit par le développement d'une réponse immunitaire cellulaire et la formation d'un granulome (Kaufmann 2002; Peyron, Vaubourgeix et al. 2008). Dans 90% des cas, la maladie ne se développe pas. Le granulome se calcifie et la personne infectée ne présente aucun symptôme et n'est pas contagieuse. Ceci est le résultat d'un équilibre entre le système immunitaire et les bactéries.

A.2.2.b. Tuberculose active

La tuberculose active ne se développe que chez environ 5 à 10% des personnes infectées par *M. tuberculosis* (Kaufmann 2002), soit immédiatement après la primo-infection, soit après plusieurs années suite à la réactivation de l' « infection tuberculeuse latente » quand le système immunitaire de la personne infectée est défaillant. Dans ce cas, la lésion précédemment formée se nécrose et les bacilles tuberculeux quiescents sont libérés (Smith 2003), pouvant, plus rarement, créer de nouveaux foyers infectieux extrapulmonaires (osseuse, méningée, digestive..) via les systèmes lymphatique et sanguin (15% des cas).

La tuberculose pulmonaire est la forme la plus contagieuse et la plus commune de la tuberculose (85% des cas). La forme extrapulmonaire est plus fréquemment observée chez les patients infectés par le VIH (VIH séro-positifs)(Golden and Vikram 2005). Les nourrissons et les jeunes enfants présentent un risque plus élevé de développer des formes graves souvent mortelles telles que la méningite tuberculeuse.

A.3. REACTION IMMUNITAIRE DE L'HOTE FACE A L'INFECTION PAR *M. tuberculosis*.

A.3.1. Réponse immunitaire innée

Dans l'alvéole pulmonaire, *M. tuberculosis* est reconnu et phagocyté par les cellules phagocytaires telles que les macrophages alvéolaires et les cellules dendritiques. La reconnaissance a lieu grâce à différents récepteurs tels que les PRR ou « Pattern recognition receptors » reconnaissant des motifs antigéniques spécifiques de *M. tuberculosis*. L'activation de ces cellules provoque la phagocytose de la bactérie et induit une réponse inflammatoire localisée, caractérisée par la production de cytokines inflammatoires comme, le TNF α (« Tumor necrosis factor alpha), l'IL-6, l'IL-1b, recrutant par vagues successives les cellules du systèmes immunitaires telles que les neutrophiles, les cellules NK (« Natural killer »), et les cellules T

CD4+ et CD8+ vers le site infectieux. Chaque cellule, à son tour sécrète des cytokines différentes qui amplifient le recrutement cellulaire vers le foyer infectieux et permettent la restructuration de celui-ci.

A.3.2. Réponse immunitaire adaptative cellulaire (RIAC)

Dans la majorité des cas, la réponse innée à elle seule ne suffit pas à contrôler l'infection. Une immunité cellulaire T spécifique se développe suite à la réaction inflammatoire locale. Les lymphocytes T CD4+, T CD8+ et T $\gamma\delta$ jouent un rôle important dans la protection contre *M. tuberculosis*.

Les cellules dendritiques infectées vont activer les lymphocytes T CD4+ et T CD8+ en leur présentant les antigènes mycobactériens par l'intermédiaire des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II et I, respectivement. Les lymphocytes T ainsi activés vont alors migrer vers le foyer infectieux.

Il arrive que la réponse cellulaire ne parvienne pas à éliminer les mycobactéries. Les cellules T activées continuent à s'accumuler et à sécréter de façon chronique des cytokines conduisant à la formation de granulome, une structure caractéristique et efficace stoppant la prolifération des mycobactéries et empêchant leur dissémination. Le granulome est caractérisé par la présence des cellules géantes multinucléées résultant de la différenciation et fusion des macrophages activés, des macrophages infectés contenant le *M.tuberculosis* et des lymphocytes. (Figure 1)

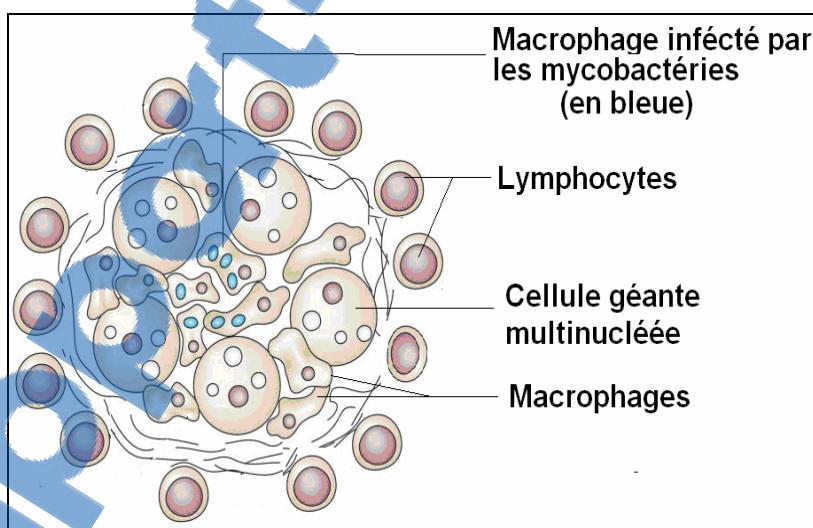


Figure 1 : Structure du Granulome (David G. Russell 2006)

Au cours de cette RIAC, les lymphocytes T CD4+ naïfs activés peuvent se différencier en trois sous populations effectrices Th1, Th2 et Th17. Ces différentes populations se

caractérisent par leur profil de sécrétion de cytokines qui leur permet de contrôler la réponse immunitaire.

A.3.2..a. Réponse Th1

Les lymphocytes Th1 sécrètent de l'IFN γ , de l'IL-2, du TNF- α et du TNF- β . L'IFN γ est la cytokine caractéristique des Th1 jouant un rôle clé dans la réponse immunitaire dirigée contre les pathogènes intracellulaires. Elle active les macrophages pour permettre la destruction et l'élimination de mycobactéries (Cooper, Adams et al. 2002).

A.3.2..b. Réponse Th2

Les lymphocytes Th2 sont caractérisés par la production d'IL-4, IL-5, IL-10, IL-6 et IL-13. L'IL-4 agit comme facteur de croissance et de différenciation sur les lymphocytes et comme cytokine anti-inflammatoire sur les macrophages. Par contre l'IL-5 intervient dans la différenciation des lymphocytes B et dans l'activation des éosinophiles lors d'une infection parasitaire (Ikutani, Yanagibashi et al. 2011). L'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire, inhibant spécifiquement la synthèse d'IFN γ qui est une cytokine pro-inflammatoire.

A.3.2..c. Réponse Th17

La population de lymphocytes Th17 produit principalement l'IL-17 et joue un rôle dans l'élimination de mycobactéries, que les lymphocytes Th1 et Th2 ne peuvent pas contrôler. L'IL-17 est une cytokine pro-inflammatoire car elle induit l'inflammation en stimulant les macrophages, les cellules épithéliales, à produire de multiples médiateurs et des cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN- γ (Khader, Bell et al. 2007).

A.4. DIAGNOSTIC

A.4.1. Diagnostic clinique

Le diagnostic clinique repose sur les symptômes généraux évocateurs de la maladie tels que l'anorexie, l'amaigrissement, l'asthénie, l'état subfébrile et des sueurs nocturnes, une toux persistante de plus de trois semaines, avec ou sans expectorations souvent sanguinolentes, et souvent accompagnée de douleurs thoraciques de type point de coté.

A.4.2. Examens complémentaires

Devant toute suspicion de tuberculose, des examens complémentaires peuvent être pratiqués. Il s'agit :

- des tests immunologiques comme l>IDR (ou l'Intradermoréaction tuberculinique), les tests QuantiFERON-TB® et TSPOT-TB® (mesure de la production d'IFN-

γ libéré après stimulation du sang ou PBMC du patient par des Ag spécifiques de *M. tuberculosis*).

- de l'examen radiographique (déttection des lésions formées au cours de l'infection telles que des infiltrats, des nodules et des cavernes).
- des examens bactériologiques, permettant l'identification du BK à partir d'expectoration ou d'autres prélèvements biologiques.
- de techniques moléculaires comme l'amplification génique (PCR).

A.5. TRAITEMENT

Le traitement de la tuberculose consiste en une polychimiothérapie avec quatre anti-tuberculeux : l'isoniazide, la rifampicine, le pyrazinamide et l'éthambutol.

A Madagascar, le traitement dure 6 à 8 mois et est administré selon la stratégie DOTS recommandée par l'OMS (traitement directement observé pendant les deux premiers mois). Il comprend deux phases : une prise quotidienne des quatre anti-tuberculeux ci-dessus pendant les deux premiers mois, puis une bithérapie avec l'éthambutol et l'isoniazide pendant six mois ou rifampicine et isoniazide pendant quatre mois.

A.6. EPIDÉMIOLOGIE DE LA TUBERCULOSE À MADAGASCAR.

A Madagascar, la tuberculose figure parmi les trois premières causes de la mortalité après le paludisme et la diarrhée. Selon le Programme National de Lutte contre la Tuberculose (PNLT - Ministère de la Santé), plus de 26700 patients tuberculeux ont été diagnostiqués en 2011, dont environ 15000 nouveaux cas de tuberculose pulmonaire à microscopie positive. Moins de 1% des patients tuberculeux sont VIH+, ce qui n'est pas le cas dans d'autres pays d'Afrique où le taux de la co-infection TB-VIH est très élevé.

B. LES MYCOBACTERIES

B.1. TAXONOMIE

Les mycobactéries appartiennent à la famille des Mycobacteriaceae, à l'ordre des Actinomycétales et à la classe des Actinobactéries (Figure 2). Elles ne contiennent qu'un seul et unique genre, *Mycobacterium*. Les mycobactéries sont classées en 3 catégories.

- La première catégorie correspond aux mycobactéries du complexe *M. tuberculosis* ou mycobactéries tuberculeuses. Cette catégorie regroupe toutes les mycobactéries capables de causer la tuberculose. On distingue principalement *M. tuberculosis* (BK), *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii* et *M. canetti*.

- Les mycobactéries atypiques ou non-tuberculeuses constituent la deuxième catégorie. Ce sont des mycobactéries de l'environnement, ne causant pas la tuberculose. Mais dans certaines circonstances (immunodépression, lésion, maladie préexistante...), certaines d'entre elles peuvent devenir pathogènes pour l'homme.

- On classe dans la troisième catégorie, *M. leprae* et *M. lepraemurium*, agents responsables de la lèpre chez l'homme et le rat.

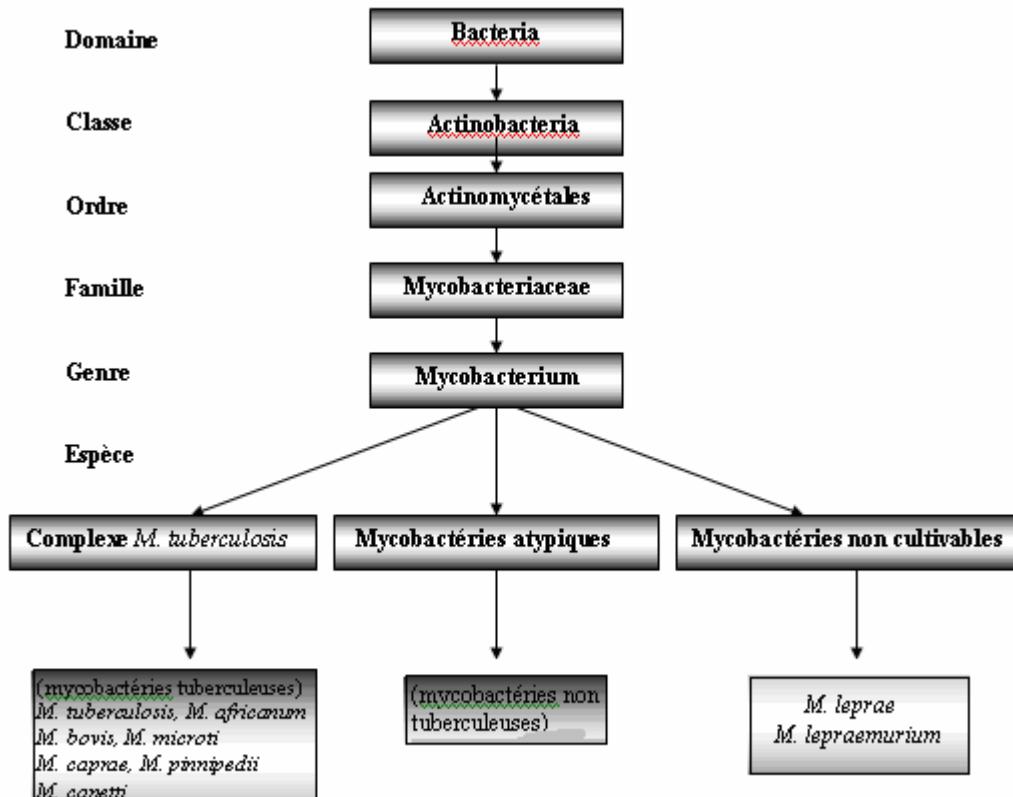


Figure 2 : Taxonomie des mycobactéries

B.2. L'ESPECE *Mycobacterium tuberculosis*

B.2.1. Caractéristiques bactériologiques

M. tuberculosis se présente sous la forme d'un bacille fin, de 2 à 5 µm de long et de 0,3 à 0,5 µm de large. Les bacilles tuberculeux sont aérobies stricts. La croissance de *M. tuberculosis* est particulièrement lente (temps de génération de 20 jours).

La culture de *M. tuberculosis* est réalisée le plus couramment sur le milieu solide de Löwenstein-Jensen (culture positive en 3 à 8 semaines) ou le milieu liquide Middlebrook (Mycobacteria Growth Indicator Tube MGIT), (culture positive après 2 semaines).

Une des caractéristiques majeures des mycobactéries est la richesse de leur paroi en lipides (60%) et, en particulier, en acides mycoliques (acides gras à longue chaîne). La coloration de Gram est donc difficilement réalisable. Pour obtenir une visualisation des mycobactéries au microscope, il est nécessaire de réaliser la coloration de Ziehl-Neelsen (fuchsine) dont le principe repose sur la capacité des mycobactéries de résister à la décoloration par les acides et alcools (Gangadharam and Droubi 1981), d'où l'appellation de « Bacille Acido-Alcool-Résistant » (ou BAAR).

B.2.2. Caractères moléculaires du bacille

B.2.2.a. Le génome de *M. tuberculosis*

Le génome de *M. tuberculosis* consiste en un chromosome circulaire d'environ 4,5 millions de paires de bases, contenant environ 4000 gènes. L'analyse de la séquence génomique a permis de mettre en évidence des particularités propres à *M. tuberculosis* (Cole, Brosch et al. 1998) :

- l'ADN présente une teneur élevée en guanine et cytosine (65,6% de GC), qui reste relativement constante à travers le génome.
- le génome possède une grande proportion de séquences codantes impliquées dans la production d'enzymes de la lipogenèse et de la lipolyse, ce qui distingue les mycobactéries des autres génomes bactériens.

B.2.2.b. Les marqueurs génétiques ou moléculaires

Le marqueur génétique ou moléculaire est défini comme « un locus polymorphe » dans le génome capable de renseigner sur le génotype de l'individu qui le porte. *M. tuberculosis* étant une espèce diversifiée, différents marqueurs moléculaires permettent donc de caractériser les souches de cette espèce (Cole, Brosch et al. 1998 ; Gagneux and Small 2007; Hershberg, Lipatov et al. 2008).

i. Polymorphic GC-rich repeat sequence (PGRS)

La PGRS est une séquence répétée courte de 96 pb, polymorphe, riche en guanine et cytosine avec un taux relativement supérieur à 65%. Elle est très abondante et hétérogène. (Poulet and Cole. 1995)

ii. La séquence d'insertion IS6110

L'IS6110, séquence d'insertion spécifique du complexe *M. tuberculosis* (Thierry, Brisson-Noel et al. 1990) composée de 1361 paires de bases, est le premier marqueur génétique décrit pour le complexe *M. tuberculosis*. La distribution de l'IS6110 varie d'une

souche à l'autre avec un nombre de copies variable et des localisations différentes sur le chromosome.

iii. **La région DR (« Direct Repeat »)**

La région DR est une région unique, présente uniquement chez les bactéries du complexe *M. tuberculosis*. Elle est formée de multiples séquences répétées directes courtes (10 à 50 selon les souches) appelées « séquence DR » de 36 paires de bases qui sont séparées par des séquences variables appelées « spacer » ou « espaceur » de 35 à 41 paires de bases. Ces séquences inter-DR varient d'une souche à l'autre par leur longueur, leur nombre et leur séquence. Une ou plusieurs copies de l'IS6110 sont insérées dans cette région pour la majorité des souches (Cole, Brosch et al. 1998).

iv. **MIRU-VNTR («Mycobacterial Interspersed Repetitive Units-Variable Number of Tandem Repeats typing»)**

Les MIRU-VNTR sont des séquences d'ADN de 40 à 100pb, répétées en tandem, dispersées dans des régions intergéniques du génome de *M. tuberculosis* et *M. leprae* (Supply, Magdalena et al. 1997).

Le chromosome de *M. tuberculosis* H37Rv contient au moins 41 *loci* MIRU-VNTR. Douze de ces *loci* affichent des polymorphismes dans le nombre de copies de répétitions en tandem, et dans la plupart des cas, des modifications de séquence des éléments répétés. Cependant, lors d'une étude récente portant sur l'analyse de 29 *loci* MIRU-VNTR sélectionnés, 24 MIRU-VNTR ont été déterminés polymorphes. Parmi ces 24 *loci*, 15 MIRU-VNTR ont un niveau de discrimination élevé et 9 *loci* auxiliaires ont un niveau de discrimination modéré (Allix, Walravens et al. 2006).

v. **SNP (« Single Nucleotide Polymorphism »)**

Les polymorphismes nucléotidiques simples ou SNP sont des variations de la séquence d'ADN portant sur un seul nucléotide avec une fréquence supérieure à 1%.

Les SNP sont dus à des mutations ponctuelles telles les substitutions nucléotidiques et parfois une insertion ou délétion d'un nucléotide. Ce sont des mutants naturels qui ne concernent qu'un seul nucléotide et qui peuvent se retrouver au sein de toutes les régions du génome, codantes ou non codantes. Dans le cas où les SNP se retrouvent au sein des régions codantes, la séquence des acides aminés de la protéine produite n'est pas obligatoirement changée, grâce à la dégénérescence du code génétique.

Selon la catégorie de la mutation, on distingue deux familles de SNP :

- les SNP « non synonymes » (SNPns) qui changent la séquence d'acide aminé codé. Ce type de SNP peut provoquer ainsi un changement de phénotype et entraîner

une sélection évolutionnaire. Ce type de SNPs est observé chez *M. tuberculosis* et se retrouve fréquemment au sein des gènes impliqués dans la résistance aux antibiotiques, conférant les phénotypes résistants.

- les SNP « synonymes » ou « silencieux » (SNPs) qui résultent des mutations « silencieuse » ou « neutre », qui n'altèrent pas la séquence en acides aminés des protéines. Ce sont, cependant, des marqueurs de l'évolution pouvant fournir une base pour des études phylogénétiques entre les souches.

Ainsi, les SNPs constituent une autre source de diversité génétique et sont susceptibles d'être un outil plus précis pour des études phylogénétiques (Goujon, Schneider et al. 2000; Filliol, Motiwala et al. 2006) puisqu'ils représentent des événements uniques et ne montrent pratiquement aucune homoplasie (Comas, Homolka et al. 2009)

*B.2.2.c. Méthodes de génotypage de *M. tuberculosis**

De nombreuses méthodes de génotypage des souches cliniques de *M. tuberculosis* ont été développées depuis une vingtaine d'années. Parmi les plus utilisées, on compte : la méthode de typage par « Restriction Fragment Length Polymorphism » (RFLP) avec le marqueur IS6110, le spoligotyping, le typage des MIRU-VNTR (Mathema, Kurepina et al. 2006) et le typage des SNPs .

i. IS6110-RFLP

L'IS6110-RFLP est basé sur la mise en évidence du nombre d'IS6110 et leurs localisations sur le génome par la méthode de RFLP. Elle s'effectue en plusieurs étapes :

- digestion de l'ADN par l'enzyme de restriction *PvuII* qui se situe au niveau de la séquence IS6110,
- séparation des fragments d'ADN ou fragments de restriction, selon leur taille, par électrophorèse en gel d'agarose,
- transfert de ces fragments sur une membrane par la technique de Southern – blot
- révélation des séquences correspondantes à l'IS6110 par hybridation avec une sonde spécifique.

Un profil de bandes de différentes tailles est alors observé en fonction du nombre de copies et des positions de la séquence IS6110 dans le génome de la souche étudiée(van Embden, Cave et al. 1993).

Cette technique constitue un excellent outil pour les enquêtes épidémiologiques, car elle est très discriminatoire, mais elle n'est pas la mieux adaptée pour l'analyse phylogénétique.

ii. Spoligotyping

Le spoligotyping (ou « spacer oligotyping ») est une méthode de typage reposant sur le polymorphisme dans la région DR et plus précisément sur l'absence ou la présence de certains spacers intercalant les séquences DR. Les 43 « spacers » les plus fréquents sont amplifiés *in vitro* par PCR à l'aide d'un seul couple d'amorces Dra et Drb qui est complémentaire des séquences répétées DR. Les produits de PCR obtenus sont ensuite hybridés sur une membrane où ont été fixés préalablement les 43 « spacers ». Une des amorces de PCR étant biotinylée, les hybridations positives sont alors détectées par la peroxydase couplée à la streptavidine. Ainsi, une empreinte d'hybridation est observée et reflète la présence ou l'absence des « spacers » au niveau de la région DR. Le « spoligotype » de la souche analysée est déterminé à partir de cette empreinte (Kamerbeek, Schouls et al. 1997).

Cette technique est plutôt simple, reproductible et facilement codée. Cela a facilité le développement de la base de données internationale SpolDB4 et a introduit un degré de cohérence dans la désignation des lignées majeures de *M. tuberculosis* (Sola, Filliol et al. 2001; Filliol, Driscoll et al. 2002).

iii. Analyse des MIRU-VNTR

L'analyse des régions génomiques présentant des nombres variables de répétitions en tandem (VNTR), proposée initialement par Frothingham, s'est également montrée très utile pour le génotypage de souches de *M. tuberculosis* (Frothingham and Meeker-O'Connell 1998; Mathema, Kurepina et al. 2006). Douze des 41 *loci* MIRU identifiés dans le génome de *M. tuberculosis* furent sélectionnés pour le génotypage des isolats cliniques (Supply, Mazars et al. 2000; Mazars, Lesjean et al. 2001). Le génotypage MIRU-VNTR repose sur l'amplification par PCR des régions ciblées et la détermination du nombre de répétitions de l'unité. Le résultat final est un code numérique à 12 chiffres correspondant au nombre de répétitions observées pour chaque locus chromosomique. Récemment, une technique standardisée basée sur l'analyse de 15 *loci* MIRU au lieu de 12, présentant un pouvoir discriminatoire élevé, a été proposée comme nouveau standard pour les études épidémiologiques de routine alors qu'un système à 24 *loci* a été proposé comme méthode à haute résolution pour les études phylogénétiques (Supply, Allix et al. 2006).

iv. Typage des SNPs

Plusieurs études ont rapporté l'utilisation des SNPs pour la classification phylogénétique du complexe *M. tuberculosis* (Sreevatsan, Pan et al. 1997; Baker, Brown et al. 2004; Filliol, Motiwala et al. 2006; Gutacker, Mathema et al. 2006; Hershberg, Lipatov et al. 2008). La technique est basée sur la détection des SNPs spécifiques dans le génome. Cependant, il n'existe pas de méthode universelle de typage des SNPs puisque chacune possède des

avantages et des inconvénients qui sont dépendants du type d'application, en particulier du nombre d'échantillons à analyser et du nombre de SNPs à typer. La plupart de ces méthodes comprennent une étape préalable qui consiste en l'amplification par PCR du ou des fragments d'ADN contenant le ou les SNPs d'intérêt puis la discrimination allélique, qui permet de générer des produits spécifiques à chaque allèle par diverses méthodes (une hybridation de sondes spécifiques, réaction d'extension d'amorces...).

Pour les mycobactéries du complexe *M. tuberculosis*, les méthodes de typage des SNPs les plus utilisées sont la PCR spécifique d'un allèle, la PCR en temps réel et le séquençage.

B.2.3. Classification des souches *M. tuberculosis*

Il existe différents types de classification phylogéographique selon les marqueurs génétiques étudiés.

B.2.3.a. Classification basée sur l'analyse des SNP.

La plupart des études phylogénétiques réalisées sur des échantillons contemporains publiés à ce jour sont basées sur l'analyse des SNP (Sreevatsan, Pan et al. 1997; Baker, Brown et al. 2004; Filliol, Motiwala et al. 2006; Gagneux, DeRiemer et al. 2006; Gutacker, Mathema et al. 2006; Hershberg, Lipatov et al. 2008). Actuellement, plusieurs SNPs ont été proposés pour différencier les espèces du Complexe *M. tuberculosis*, et particulièrement les isolats de *M. tuberculosis*, en six groupes phylogénétiques distincts ou lignées (Lignées 1, 2, 3, 4, 5, et 6) (Tableau 1) (Gagneux, DeRiemer et al. 2006; Comas, Homolka et al. 2009). Ces lignées sont très majoritaires dans certaines zones géographiques et nommées en fonction de leur répartition géographique : « Indo-Oceanic » (Lignée 1), « East-Asian » (Lignée 2), « East-African Indian » (Lignée 3), « Euro-American » (Lignée 4) et les lignées « West- African 1 and 2 » (Lignées 5 et 6) (Gagneux, DeRiemer et al. 2006).

B.2.3.b. Classification basée sur le spoligotype

Les profils de Spoligotypes permettent le regroupement des familles de souches épidémiologiquement importantes, telles que le Beijing, Bovis, « Central Asian » (CAS), « East African Indian » (EAI), Haarlem (H), LAM, S, T, X (Brudey, Driscoll et al. 2006).

Tableau 1 : Les différents types de classification des souches *M. tuberculosis* basés sur les SNPs et sur le spoligotype (Gagneux and Small 2007).

	Lignée 1	Lignée 2	Lignée 3	Lignée 4	Lignée 5	Lignée 6
SNP (Sreevatsan et al)	PGG1	PGG1	PGG1	PGG 2 et 3	PGG1	PGG1
SNP (Baker et al)	Lignée IV	Lignée I	Lignée III	Lignée II	ND	ND
LSP (Gagneux et al)	Lignée « Indo-Oceanic »	Lignée « East Asian »	Lignée « East African-Indian »	Lignée « Euro-American »	Lignée « West African 1 »	Lignée « West African 2 »
SNP (Gutacker et al)	Cluster I	Cluster II	Cluster II.A	Cluster III-VII	ND	ND
SNP (Filliol et al)	Groupe cluster 1	Groupe cluster 2	Groupe cluster 3a	Groupe cluster 3b-6b	ND	ND
Spoligotyping (Brudey et al)	EAI	Beijing	CAS	Haarlem, LAM, T, X	AFRI 2	AFRI 1

SNP : Polymorphisme nucléotidique simple

LSP : Polymorphisme de séquence large

PGG : Principal Groupe Génétique

AFRI : « Africanum »

EAI : « East African Indian »

CAS : « Central Asian »

LAM : « Latino-American an Mediterranean »

ND = Non déterminé

B.2.3.c. Classification basée sur la présence ou absence de TbD1

Sur la base de la présence ou absence de TbD1 dans la région RD1 (Région de Différence 1) du génome *M. tuberculosis*, ce dernier peut être divisé en deux groupes dont l'un « lignée ancestrale » ou « TbD1 positif » (présence de TbD1) et l'autre « lignée moderne » ou « TbD1 négatif » (absence de TbD1)(Brosch, Gordon et al. 2002).

C. VIRULENCE, PATHOGENICITE ET DIVERSITE GENETIQUE

La pathogénicité par définition, signifie la capacité des microbes à surmonter les défenses de l'hôte et à provoquer la maladie. La virulence se réfère au degré ou à l'intensité de la maladie produite.

C.1. DIVERSITE GENETIQUE ET FORME CLINIQUE

Bien que la tuberculose affecte principalement les poumons, elle peut en outre affecter de nombreux sites extrapulmonaires et présenter des manifestations diverses.

Des associations entre le génotype du complexe *M. tuberculosis* et la forme de la maladie ont été signalées dans quelques études. La lignée 3 et la lignée 1 ont été trouvées plus associées à la tuberculose extrapulmonaire et la lignée 4 semble plus associée à la tuberculose pulmonaire (Caws, Thwaites et al. 2008; Lari, Rindi et al. 2009; Click, Moonan et al. 2012). Pour la lignée 2 (famille Beijing), les résultats des études sont plus controversés. En effet, si la lignée 2 semble associée dans certaines études, à la tuberculose extrapulmonaire (Kong, Cave et al. 2005; Kong, Cave et al. 2007) ou la tuberculose méningée (Caws, Thwaites et al. 2008), d'autres études n'ont trouvé aucune association et l'ont associée à la tuberculose pulmonaire (Nicol, Sola et al. 2005; Click, Moonan et al. 2012). Une association plus étroite entre la lignée 2 et la coinfection par le VIH a aussi été remarquée (Caws, Thwaites et al. 2008; Middelkoop, Bekker et al. 2009).

C.2. DIVERSITE GENETIQUE ET HISTOPATHOLOGIE CLINIQUE

Les charges bacillaires sur le frottis semblent varier considérablement selon les lignées mais aucune association statistiquement significative entre les symptômes ou le résultat radiographique et la lignée *M. tuberculosis* n'a été observée (van Crevel, Nelwan et al. 2001; Borgdorff, Van Deutekom et al. 2004). Par contre, la famille Beijing a été trouvée moins associée à une fièvre et des sueurs nocturnes, et plus à une cavitation pulmonaire par rapport aux souches non-Beijing, ce qui suggère que ce génotype induit une réponse inflammatoire faible et un dommage tissulaire considérable (Sun, Lee et al. 2006). De plus, les patients tuberculeux infectés par ces souches auraient un risque plus élevé de rechute de la maladie (Sun, Lee et al. 2006; Burman, Bliven et al. 2009).

C.3. ETUDE DE LA VIRULENCE SUR DES MODELES EXPERIMENTAUX

Des études réalisées avec des modèles d'infection cellulaire ou des modèles animaux ont rapporté que la diversité génétique de *M. tuberculosis* peut avoir des conséquences sur l'évolution clinique de la maladie (Malik and Godfrey-Faussett 2005; Gagneux and Small 2007; Thwaites, Caws et al. 2008).

C.3.1. Etude de la virulence des souches sur les modèles cellulaires

Les souches de *M. tuberculosis* extrapulmonaires ont été trouvées hypervirulentes par rapport aux souches pulmonaires car elles infectent les macrophages de manière plus efficace et elles ont la capacité de s'y répliquer rapidement (Garcia de Viedma, G.Lorenzo et al. 2005).

D'autre part, les souches appartenant à la lignée « moderne » (Tbd1-) (Lignée 4, lignée 2 et lignée 3) induisent une réponse inflammatoire moindre par rapport aux souches de la lignée « ancestrale » (TbD1+) (lignée 1) (Portevin, Gagneux et al. 2011). Krishnan et al ainsi que Chancon-Salinas et al ont montré que la lignée 2 (famille Beijing) et la lignée 1 (EAI)

induisaient significativement plus de TNF α et IL -1 β que les souches de la lignée 4 et H37Rv (Krishnan, Malaga et al.; Chacon-Salinas, Serafin-Lopez et al. 2005). Or, d'autres études ont conclu que, comparées à la souche de référence H37Rv, les souches Beijing de la lignée 2 induisaient plus d'INF- γ et moins de cytokines inflammatoires ce qui les associent aux phénotypes anti-inflammatoires et hypervirulents (Reed, Domenech et al. 2004; Sun, Lim et al. 2006; Wang, Peyron et al. 2007; Sinsimer, Huet et al. 2008; Sohn, Lee et al. 2009; Tanveer, Hasan et al. 2009). La variabilité de ces résultats peut être liée aux différents types de macrophages utilisés par les différentes équipes ainsi que les souches de références utilisées.

C.3.2. Etude de la virulence sur les modèles animaux

Dans des modèles de souris utilisées, les souches extrapulmonaires ont la capacité de diffuser à travers d'autres organes que le poumon et sont associées à une diminution de la survie par rapport aux souches pulmonaires (Garcia de Viedma, G.Lorenzo et al. 2005; Tsenova, Harbacheuski et al. 2007; Hernandez Pando, Aguilar et al. 2010).

D'autre part, la lignée 2 (Beijing) semble être hypervirulente par rapport à H37Rv en raison de sa croissance beaucoup plus rapide dans les poumons des souris infectées (Lopez, Aguilar et al. 2003), de la réduction de la survie des souris infectées, de sa capacité d'induire des dommages pulmonaires sévères et d'une faible production de cytokines protectrices de type Th1 (telles que le TNF α , IL-12 et IFN- γ) chez l'hôte. Cette dernière caractéristique semble être, en partie, la responsable de la virulence accrue de la lignée 2 (Manca, Tsenova et al. 2001; Lopez, Aguilar et al. 2003; Aguilar Leon, Zumarraga et al. 2009; Tanveer, Hasan et al. 2009).

Par ailleurs, les souches hypovirulentes comme les souches H37Rv, Erdman (souche de laboratoire) semblent être associées à une meilleure réponse immunitaire protectrice de l'hôte (forte expression de l'IFN- γ et TNF- α et moins d'IL-4), une baisse de la mortalité des souris infectées, une charge bacillaire pulmonaire faible et des lésions tissulaires rares (Valway, Sanchez et al. 1998; Manca, Tsenova et al. 1999; Lopez, Aguilar et al. 2003; Dormans, Burger et al. 2004; Marquina-Castillo, Garcia-Garcia et al. 2009).

Le tableau 2 résume les résultats observés dans la littérature sur la virulence et la pathogénicité des différents génotypes des souches *M. tuberculosis* dans des modèles d'infection cellulaires et animaux. Les résultats sont classés selon la catégorie des souches étudiées (souches de laboratoire, souches Beijing, souches cliniques et lignées de souches) et en fonction du modèle d'infection utilisé.

Généralités

Tableau 2 : Etudes expérimentales explorant les différences dans la virulence parmi les différents génotypes des souches du complexe *M. tuberculosis*

Modèle d'infection	Type de souche	Résultats	référence
Etude de souches de laboratoire			
- Monocytes humains - murins	CDC1551 vs HN878	La souche CDC1551 est moins virulente induisant précocement de l'IL-12 et produisant un taux élevé de l'IFN-γ et TNF-α par rapport à NH878.	Manca et al (1999)
Lapins	Souche de laboratoire Erdman vs H37Rv	Erdman a produit plus de tubercules que H37Rv	Manabe et al (2003)
Etude de souches Beijing			
- Macrophages humains - cellules dendritiques	Beijing vs H37Rv	La famille Beijing induit un faible taux de l'IL-6, de TNF-α et de l'IL-10 par rapport à H37Rv	Wang et al (2010)
Macrophages dérivés de souris	Beijing (HN878, W4, W 10) vs H37Rv	Le glycolipide PLG produit par les souches de la famille Beijing inhibait la réponse immunitaire innée en induisant une faible production des cytokines IL-6, IL-12 et le TNF-α	Reed et al (2004)
	Beijing vs H37Rv	Les macrophages infectés par les souches Beijing exprimaient des niveaux élevés de l'iNOS, de l'IL-1β, de TNF-α, de l'IL-12 et des niveaux bas de l'IL-10 comparés aux cellules infectées par les souches H37Rv.	Schacon-calinas et al (2005)
	Les souches K (Beijing) vs H37Rv	Les niveaux des cytokines protectrices étaient faibles chez les cellules infectées par les souches K (une faible expression des cytokines IL-6, TNF-α et IL-12p40).	Sohn et al (2009)
Monocytes humains	Beijing vs H37Rv	- La lignée 2 (Beijing) se multiplie très rapidement dans le macrophage par rapport à H37Rv.	Li Q et al (2002)
	Souches cliniques Beijing	- Les différentes souches Beijing diffèrent dans leur capacité à induire des cytokines pro-inflammatoires en fonction de spoligotype des souches	Sinsimer et al (2008)

Généralités

Modèle d'infection	Type de souches	Résultats	référence
Cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC)	HN878 vs CDC1551	Les réponses en cytokines des cellules mononucléaires aux souches HN878 et CDC1551 étaient différentes : la souche HN878 induisait une faible immunité protectrice par rapport à CDC1551. Elle induit préférentiellement l'IL-4 et IL-13 contrairement à la souche CDC1551 qui induit une forte production d'IL-12 et d'autres molécules associées à l'activation des phagocytes et la réponse Th1.	Manca C et al (2004)
	Beijing vs non Beijing	La famille Beijing induisait une réponse inflammatoire faible et un dommage tissulaire par rapport aux souches non-Beijing. Elle a été trouvée associée à une faible fréquence de fièvre et de sueurs nocturnes et à une cavitation pulmonaire.	Sun YJ et al (2006)
Lignées cellulaires THP-1	CAS et Beijing vs H37Rv	Les isolats cliniques CAS1 et Beijing affichaient un niveau de croissance faible et induisaient des cytokines pro-inflammatoires réduites par rapport à H37Rv	Tanveer et al (2009)
Murin	HN878 vs H37Rv et CSU93	HN878 développait très rapidement dans le poumon et provoquait une sévère pathologie que H37Rv et CSU93	Ordway et al (2007)
	Beijing vs H37Rv	- Les différents génotypes de <i>M.tuberculosis</i> évoquaient une différence marquée dans la pathogénicité et la réponse immune. Les souches de génotype Beijing étaient très virulentes provoquant une mortalité significative des souris, une faible production de l'IFN-γ et de TNF-α par rapport à H37Rv	Lopez B et al (2003)
	Sous-lignées Beijing	Les souches du génotype Beijing représentatives des sous-lignées différentes présentent de phénotypes de virulence différents. Une forte virulence est associée à une forte mortalité des souris infectées, un dommage tissulaire considérable de poumon, une forte transmission, une production faible d'IFN-γ, une expression rapide mais éphémère de TNF-α. Par contre, un niveau de virulence faible est associé à un dommage tissulaire minime et une expression progressive de l'IFN-γ et TNF-α.	Aguilar L et al (2010)
	NH878 (souches Beijing) vs NHN5, HN60 et CDC1551	La souche HN878 est plus virulente et associée à une charge bacillaire pulmonaire élevée, un temps de survie des souris courte, une faible production IFN-γ, TNF-α, IL-12 et IL-6 par rapport aux NHN5, CDC1551	Manca et al (2001)

Généralités

Modèle d'infection	Type de souches	Résultats	référence
Lapin	Souches Beijing vs CDC1551	Les souches Beijing exhibaient une charge bacillaire élevée dans le cerveau et dans le fluide cérébro-spinal par rapport à CDC1551, favorisant la dissémination des bacilles dans d'autres organes et les manifestations cliniques plus sévères.	Tsenova et al (2005)
Etude de souches cliniques			
Macrophages	Souches cliniques extra-pulmonaires vs H37Rv	Les souches extra-pulmonaires hypervirulentes induisaient une expression rapide mais éphémère des cytokines pro-inflammatoires TNF- α .	Wong et al (2007)
- Macrophages - murin	Souches cliniques extra-pulmonaire vs souches clinique pulmonaires	Les souches extra-pulmonaires infectent les macrophages de manière plus efficace et ont la capacité de s'y répliquer rapidement par rapport aux souches pulmonaires.	Garcia de Viedma et al (2005)
Murin	Souches cliniques vs Erdman (souche de laboratoire)	Les souris infectées par les souches Erdman avaient 10 fois moins de bacilles par poumon que les souris infectées par les souches cliniques.	Valway et al (1998)
	Souches cliniques vs H37Rv	Huit souches présentaient 4 phénotypes différents basés sur le temps de survie des souris, la charge bacillaire, la réponse immune et la transmission.	Marquina-castillo et al (2009)
	Souches cliniques isolées chez les patients avec une Tuberculose méningite	Certaines souches spécifiques de <i>M. tuberculosis</i> sont très virulentes, capables de se disséminer et d'infecter le cerveau par rapport à H37Rv et aux souches pulmonaires. Ce phénotype est associé à une faible expression de l'IFN- γ , une expression éphémère de TNF- α et iNOS ainsi qu'à une forte expression de l'IL-4 dans le poumon et le cerveau.	Hernandez pando et al (2010)
cobayes	Souches cliniques vs H37Rv	Les souches cliniques montraient une variété de phénotypes de virulence sur la base de la nécrose pulmonaire et extra-pulmonaire ainsi sur la lésion cavitaire.	Palanisamy et al (2009)

Généralités

Modèle d'infection	Type de souches	Résultats	référence
Etude de lignées de souches			
- Macrophages - Monocytes	Collection des souches représentatives des lignées du complexe <i>M. tuberculosis</i>	Les souches appartenant à la lignée « moderne » (Lignée 4, lignée 2 et lignée 3) induisent une réponse inflammatoire moindre par rapport aux souches de la lignée « ancestrale » (taux des cytokines pro-inflammatoires faibles)	Portevin et al (2011)
- Macrophages - cellules dendritiques dérivés de souris - murin	Les souches représentatives des lignées 1, lignée 2 et lignée 4	<ul style="list-style-type: none"> - Les lignées 1 et 2 induisaient significativement plus TNF-α et IL-1β à partir des macrophages par rapport à la lignée 4 - La lignée 2 (famille Beijing) était détectable précocement dans le sang des souris infectées et se multipliait très rapidement dans le poumon 	Krishnan et al (2011)
Murin	19 souches différentes représentatives des 11 familles majeures de génotypes	<ul style="list-style-type: none"> - Les différentes souches montraient des phénotypes de virulence différents. - Une pathologie sévère est en corrélation avec la forte mortalité et une charge bacillaire pulmonaire élevée. 	Dormans et al (2004)
	Souches bovis isolées à partir de différents hôtes	Les isolats de <i>M. bovis</i> montrent des niveaux de virulence et des réponses immunes différents. Les souches isolées chez les animaux montraient une forte virulence et induisaient une réponse immunitaire non protectrice avec une faible expression de l' IFN- γ , TNF- α et de l'IL-4 par rapport aux souches isolées chez l'homme et les bétails qui étaient moins virulentes et induisaient une expression progressive de cytokine de type Th1, l'IFN- γ	Aguilar et al (2009)

D. POLYMORPHISME GENETIQUE DES SOUCHES *M. TUBERCULOSIS* A MADAGASCAR

Plusieurs études sur la diversité et le polymorphisme des souches *M. tuberculosis* circulant à Madagascar ont été réalisées par l'institut Pasteur de Madagascar. Un grand polymorphisme des souches a été observé suite à l'analyse de la séquence polymorphe IS6110 par RFLP ainsi que la région DR du génome bactérien. Les souches présentant une seule copie de IS6110 sont relativement fréquentes (Rasolofo-Razanamparany, G. Auregan et al. 1995; Rasolofo-Razanamparany, D. Ménard et al. 1999; Rasolofo-Razanamparanya, D. Ménarda et al. 2000; Rasolofo-Razanamparany, H. Ramarokoto et al. 2001; Rasolofo-Razanamparany, R. Quirin et al. 2005). De plus, la majorité des familles de spoligotypes décrites dans le monde (Beijing, Bovis, CAS, EAI, Haarlem, LAM) ont été retrouvées (Ferdinand, Christophe Sola et al. 2005). Par ailleurs, la première étude sur l'association entre le génotype des souches et la virulence a rapporté que les souches *M. tuberculosis* de spoligotypes récents comme Beijing et CAS avaient tendance à induire une réponse en IFN- γ faible par rapport aux souches de spoligotype ancestral comme les EAI (Rakotosamimanana, Raharimanga et al. 2010).

III. MATERIELS ET METHODES

A. MATERIELS

A.1. MATERIELS BIOLOGIQUES

a) L'étude a porté sur 166 souches cliniques de *M. tuberculosis* isolées à l'Institut Pasteur de Madagascar (IPM) dont 68 souches entre 2004 et 2005, 96 souches entre 2009 et 2010, une souche isolée en 1996 et une souche en 1999. Toutes ces souches ont déjà été typées par la méthode de spoligotyping et classées en famille de spoligotypes.

Deux études antérieures effectuées par l'IPM ont permis d'obtenir des données immunologiques correspondant aux patients d'où les souches ont été isolées. Ces données seront utilisées pour l'analyse de l'association entre le génotype des souches et la réponse immunitaire de l'hôte :

- Les souches de 2004-2005 ont été isolées au cours de l'étude VACSIS qui portait sur l'analyse de la réponse en IFN- γ des patients tuberculeux pulmonaires. Cette réponse a été déterminée par la technique ELISPOT après stimulation des cellules mononucléées isolées du sang périphérique (PBMC) du patient par des antigènes spécifiques de *M. tuberculosis*, ESAT-6 et PPD (Lalvani A et al 1997).
 - Les souches de 2009-2010 ont été obtenues à partir de patients tuberculeux pulmonaires pour lesquels le taux de cytokines (IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-10, IL-17) produites dans le plasma après stimulation du sang total par le PPD a été mesuré par la méthode ELISA, avec la technologie Luminex (Caroline Demangel, Roxane Simeone, IPP).
- b) La souche de laboratoire *M.tuberculosis* H37Rv est la souche de référence utilisée.

A.2. MATERIELS UTILISES

A.2.1. Pour l'extraction et la quantification de l'ADN :

- Bain marie (65 °C)
- Microcentrifugeuse réfrigérée (Eppendorf 5402)
- Vortex
- Evaporateur Speed Vac
- Générateur et cuve pour électrophorèse
- hotte

A.2.2. Pour le génotypage :

- Thermocycleur (*Applied Biosystem-StepOne cycler*)
- Logiciel d'analyse StepOne (*Applied Biosystem*)
- Microtubes et / ou microplaques PCR 48 puits (*ABGENE* réf AB-990)



Figure 3 : Thermocycleur Applied Biosystem-StepOne.

Le typage des SNPs est réalisé dans le thermocycleur Applied Biosystem-StepOne. (Figure 3). La machine dispose de 48 puits et elle est reliée à un ordinateur qui permettra de recueillir toutes les données et de les analyser. Les données de la fluorescence dans chaque microtube sont collectées avant et après la PCR. Le logiciel StepOne permet d'enregistrer toutes les données ainsi que de les analyser à la fin de la réaction.

A.3. REACTIFS ET TAMPONS :

La préparation des réactifs suivants est décrite en annexe.

A.3.1. Réactifs Pour l'extraction d'ADN :

- Tris (Hydroxyméthyl aminométhane) (*SIGMA*, réf. T-1503)
- EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) (*SIGMA*, réf. E-5134)
- TE 1X
- Lysozyme 10mg/ml (*SIGMA*, réf. L-6876)
- SDS 10% (Sodium Dodecyl Sulfate) (*SIGMA*, réf. L-4390)
- Protéinase K 10mg/ml (*BOEHRINGER MANNHEIM*, réf. 161497)
- NaCl 5M (*NORMAPUR, PROLABO*, réf. 27810295)
- CTAB (Bromure de cétyltriméthylammonium) (10%) / NaCL (0,7M)
- Chloroforme (*CARLO ERBA*, réf. 438601) / Alcool isoamylique (*BAKER*, réf. 8010) (24:1)
- Isopropanol (*RECTAPUR, PROLABO*, réf. 20839.297)
- Ethanol 70% (*MERCK*, réf. 983);

A.3.2. Réactifs pour la quantification d'ADN :

- Bleu 6X
- Eau distillée
- BET (Bromure d'Ethidium) (*SIGMA ALDRICH –A, ref. E8751*)
- Marqueurs de taille : λ DNA (50ng/ul)
- TBE 1X
- Agarose (*AMERSHAM, ref. 274007D*)

A.3.3. Pour le génotypage :

- Tampon Master mix QuantiTect Probe (*kit QIAGEN*)
- Eau HPLC (High-performance liquid chromatography)
- Amorces (**tableau 4**) (*SIGMA ALDRICH*)
- Sondes (**tableau 3**) (*APPLIED BIOSYSTEM*)

B. METHODES

B.1. EXTRACTION DE L'ADN DES SOUCHES *M. tuberculosis*

B.1.1. Principe

La technique d'extraction d'ADN utilisée dans cette étude est celle décrite par Van Embden et al (1993). Elle consiste à tuer les bactéries, extraire l'ADN génomique et le purifier. Sous l'action de la chaleur, les souches bactériennes en suspension sont tuées. L'action combinée du lysozyme et de la protéinase K permet la lyse des bactéries et la libération de l'acide nucléique dans la solution. Le lysozyme détruit la paroi bactérienne en catalysant l'hydrolyse des muropeptides qui forme la couche rigide de la paroi bactérienne et la protéinase K qui est une protéase, active à 65° C, digère les protéines membranaires, intracellulaires, notamment celles qui sont liées à l'ADN. L'action de la protéinase K est combinée avec un puissant détergent, le SDS qui est aussi un agent dénaturant. L'ADN libéré sera par la suite extrait ou isolé par action du mélange chloroforme-alcool isoamylque en milieu hyper salé et en présence de CTAB.

Le CTAB permet l'élimination des débris cellulaires, les protéines non digérées et les polysaccharides par des précipitations et des extractions sélectives au chloroforme/alcool isoamylque.

L'ADN est précipité en présence de l'isopropanol, puis il est purifié par de l'éthanol 70% qui permet l'élimination des sels.

B.1.2. Méthode

La première étape consiste à ensemencer les souches de *M.tuberculosis* sur le milieu de Loewenstein-Jensen (LJ). Les bactéries sont incubées à 37°C pendant 3 à 4 semaines.

Suite à cette première étape, des colonies de *M.tuberculosis* sont prélevées sur le milieu de LJ et mises en suspension dans 500µl de tampon TE 1X. Les colonies sont ensuite tuées par incubation de 20 minutes au bain marie sec à 80°C. Après refroidissement à température ambiante, 50µl de lysozyme 10mg/ml sont ajoutés dans la suspension. Le tout est mélangé au vortex et incubé au moins une heure à 37°C. Après ajout de 75µl d'une solution de Protéinase K 10mg/ml / SDS 10%, l'ensemble est mélangé au vortex et incubé pendant 10min à 65°C. La concentration en sel dans le tube est augmentée avec 100µl de NaCl 5M afin d'éviter la formation de précipité d'acide nucléique-CTAB. Puis, 100µl de CTAB/NaCl préchauffés à 65°C sont ajoutés. Le tout est mélangé au vortex jusqu'à l'obtention d'une solution à aspect laiteux, puis incubé 10min à 65°C. Le mélange est transvasé dans un microtube de 2ml et additionné de 750µl de chloroforme/alcool isoamylique. Après agitation, le mélange est centrifugé à 10000rpm à +4°C durant 5 min (microcentrifugeuse Eppendorf 5402). Le surnageant est ensuite récupéré dans un autre microtube de 1,5ml.

L'ADN est précipité par addition de 500µl d'isopropanol. La solution est mélangée par retournement du tube. Le filament d'ADN est alors observable. Après incubation à -20°C pendant au moins 1h et une centrifugation à 10000rpm à +4°C pendant 5min, le surnageant est éliminé et le culot lavé avec 1ml d'éthanol 70%. A la suite d'une nouvelle centrifugation à 10.000rpm à +4°C pendant 5min, le surnageant est enlevé par aspiration à la micropipette en évitant de toucher le culot. Le culot d'ADN est séché au speed-vac pendant 2min, puis remis en suspension dans 30µl de TE 1X pendant une nuit à +4°C. L'ADN est ensuite stocké -20°C.

B.2. QUANTIFICATION DE L'ADN

B.2.1. Electrophorèse en gel d'agarose

B.2.1.a. Principe

La quantification se fait par électrophorèse sur gel d'agarose. Sous l'effet d'un champ électrique homogène, l'ADN, qui est une macromolécule chargée négativement, migre de la cathode (-) vers l'anode (+) à travers la matrice du gel d'agarose dans un tampon de migration TBE 1X. Le principe de la quantification consiste à mesurer l'intensité de la fluorescence émise par l'ADN sur un gel d'électrophorèse contenant du BET.

Le BET est un réactif intercalant qui se fixe entre les bases nucléiques à l'intérieur de la double hélice. Cette molécule naturellement non fluorescente présente une fluorescence lorsqu'elle est intercalée entre les bases nucléiques et après excitation aux longueurs d'ondes ultraviolettes (UV). L'intensité de la fluorescence émise est proportionnelle à la quantité d'ADN.

La quantité d'ADN est estimée à partir du marqueur de taille moléculaire, λ DNA.

B.2.1.b. Préparation du minigel d'agarose 0,8% :

Une quantité de 0,8g de poudre d'agarose est ajoutée dans un erlenmeyer contenant 100ml de tampon TBE 1X et chauffée au four à micro-onde. Après dissolution totale de l'agarose, le mélange est refroidi à une température d'environ 50°C (température supportable au toucher), puis 5 μ l de BET (10mg/ml) y sont ajoutés. Le gel est ensuite coulé et laissé pendant 30min dans le moule à électrophorèse. Selon le nombre d'échantillons à quantifier, le moule est muni d'un ou plusieurs peignes dont les dents formeront, dans le gel, des puits qui serviront au dépôt des échantillons.

Une fois que le gel s'est solidifié, les peignes sont retirés et le gel est placé dans la cuve à électrophorèse contenant le tampon de migration TBE 1X.

B.2.1.c. Dépôt des ADN à doser

Un mélange de 3 μ l d'eau distillée, 1 μ l de bleu 6X et 2 μ l d'ADN est déposé dans chaque puits sauf dans les puits se trouvant aux deux extrémités où sont déposés 2 μ l de marqueur de taille λ DNA 50ng/ μ l. Chaque puits correspond à un échantillon donné.

Le bleu de bromophénol 6X est un tampon de charge qui densifie et colore la solution, ce qui permet de suivre la migration.

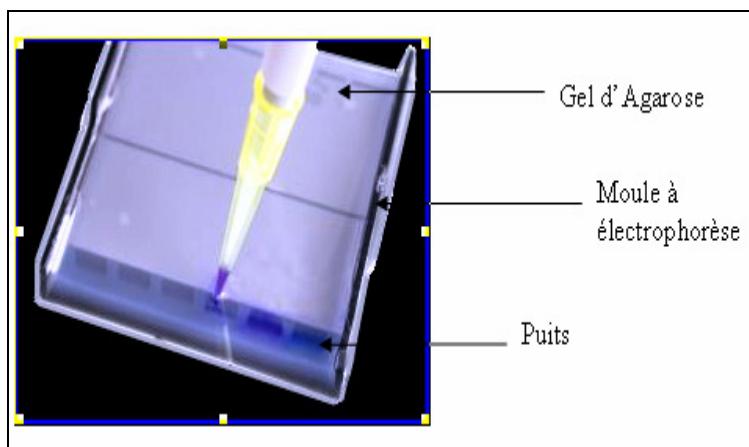


Figure 4: Dépôt des ADN à doser sur le gel d'agarose.

B.2.1.d. Migration

La migration se déroule pendant une heure à 100V.

B.2.1.e. Quantification de l'ADN extrait

Une fois la migration terminée, le gel est visualisé et photographié sous UV. La quantité

Matériels et Méthodes

d'ADN extrait est ensuite estimée pour chaque dépôt en comparant l'intensité de la bande d'ADN à celles des marqueurs λ DNA 50ng/ μ l.

B.2.2. Dosage avec le Spectrophotomètre Nanodrop

Le dosage par spectrophotométrie est effectué après avoir estimé approximativement par électrophorèse la quantité de l'ADN. Le spectrophotomètre Nanodrop ND 1000 permet de déterminer dans un petit volume d'échantillon (1 μ l) dilué ou non dilué, la quantité de l'ADN extrait ainsi que sa pureté. Il est basé sur la mesure de l'absorbance à 260nm (A260) qui est la zone d'absorbance maximale des acides nucléiques. Une seconde mesure à 280 nm (A280) permet de contrôler la pureté de l'extraction, à savoir la présence de protéines résiduelles dans la solution d'ADN. L'ADN est pur lorsque la valeur du rapport A260/A280 se situe autour de 1,8 (+ ou - 0,1).

Comme la concentration de l'ADN de travail pour le génotypage est égale à 5ng/ μ l, il est important de vérifier la concentration d'ADN (dilué à 5ng/ μ l). 1 μ l de chaque échantillon est déposé sur le Nanodrop. La concentration est exprimée en ng/ μ l.

B.3. GENOTYPAGE

Les SNPs qui ont été analysés dans cette étude sont listés dans le tableau 3.

Tableau 3: Les SNPs (n=6) ou mutations caractéristiques des lignées de *M. tuberculosis*.

Lignée	SNPs	Nom du Gène	Position nucléotidique	Codon	Nucléotide H37Rv	AA du H37Rv	Nucleotide du mutant	AA du mutant
Lignée 4 (" Euro - Americain ")	katG463	katG ou Rv1908c	1389	463	cGg	Arg	cTg	Leu
Lignée 2 (" East - Asian ")	Rv2952 _ 0526n	Rv2952	526	176	Ggg	Gly	Agg	Arg
Lignée 1 (" Indo - oceanic ")	Rv3221c _ 0085n	TB7.3 ou Rv3221c	85	29	Gtc	Val	Atc	Ile
Lignée 3 ("East – African - Indian"))	Rv3804c _0012n	fbpA ou Rv3804c	12	4	gtT	Val	gtC	Val
TbD1	gyrA1842	gyrA ou Rv0006	1842	614	atT	Ile	atC	Ile
Bovis	pstS1_1055	pstS1 ou Rv0934	1055	352	gTt	Val	gCt	Ala

- SNPs : Polymorphisme nucléotidique simple.
- H37Rv : Souche de référence *M. tuberculosis*.
- AA : Acide aminé

Le nucléotide muté est représenté en gras
n= nombre de SNPs analysés

Chaque lignée ou « lineage » a un SNPs spécifique (Comas, Homolka et al. 2009). Chaque SNP porte le nom du gène muté et la position nucléotidique où la mutation a eu lieu. Les fonctions de chaque gène analysé sont indiquées dans le tableau 4.

Tableau 4 : Fonction des gènes analysés (<http://tuberculist.epfl.ch/>).

Gène	Fonction
katG	<ul style="list-style-type: none"> Code pour la catalase et la peroxydase. Ces enzymes jouent un rôle dans la survie intracellulaire de mycobactéries dans les macrophages. Intervient dans la virulence et l'adaptation des mycobactéries dans l'hôte.
Rv2952	<ul style="list-style-type: none"> Impliqué dans le métabolisme intermédiaire et respiration.
TB7.3 (Rv3221c)	<ul style="list-style-type: none"> Impliqué dans le métabolisme lipidique. Code pour la protéine Biotinylée TB7.3.
fbpA (Rv3804c)	<ul style="list-style-type: none"> Il code pour le complexe Ag85A qui joue un rôle important dans la synthèse de la paroi cellulaire ainsi que dans la virulence des mycobactéries. Dans le métabolisme lipidique.
gyrA (Rv0006)	<ul style="list-style-type: none"> Code pour l'ADN gyrase.
pstS1 (Rv0934)	<ul style="list-style-type: none"> Intervient dans le processus cellulaire et dans la synthèse de la paroi cellulaire mycobactérienne

B.3.1. Principe

Dans cette étude, la méthode de PCR en temps réel Taqman® a été adoptée pour le typage des SNPs (**D. Stucki et S.Gagneux, communication personnelle**). Elle est réalisée dans le thermocycleur Applied Biosystème-StepOne (Figure 3). La méthode permet de coupler l'amplification et le génotypage en une seule étape.

Elle repose sur deux principes :

- Sur une PCR qui utilise deux sondes TaqMan® marquées avec deux fluorophores correspondant respectivement à l'allèle sauvage et à l'allèle muté (Figure 5 :1)
- Sur l'activité exonucléase 5'→3' de l'ADN polymérase utilisée.

Chaque sonde spécifique d'allèle est marquée à l'extrémité 5' par un fluorophore émetteur spécifique nommé « reporter », FAM (6 carboxy-fluorescéine ; longueurs d'ondes d'absorption : 494 et d'émission : 518) ou VIC (longueurs d'ondes d'absorption : 538 et d'émission : 554) et à l'extrémité 3' par un « quencher non fluorescent » (NFQ) qui est un fluorophore suppresseur inhibant l'émission du reporter lorsqu'ils sont à proximité. La sonde possède également à l'extrémité 3' une molécule MGB (« minor groove binder »), un ligand du petit sillon d' ADN permettant une meilleure discrimination allélique et stabilisant l'hybridation de la sonde Taqman® à la matrice.

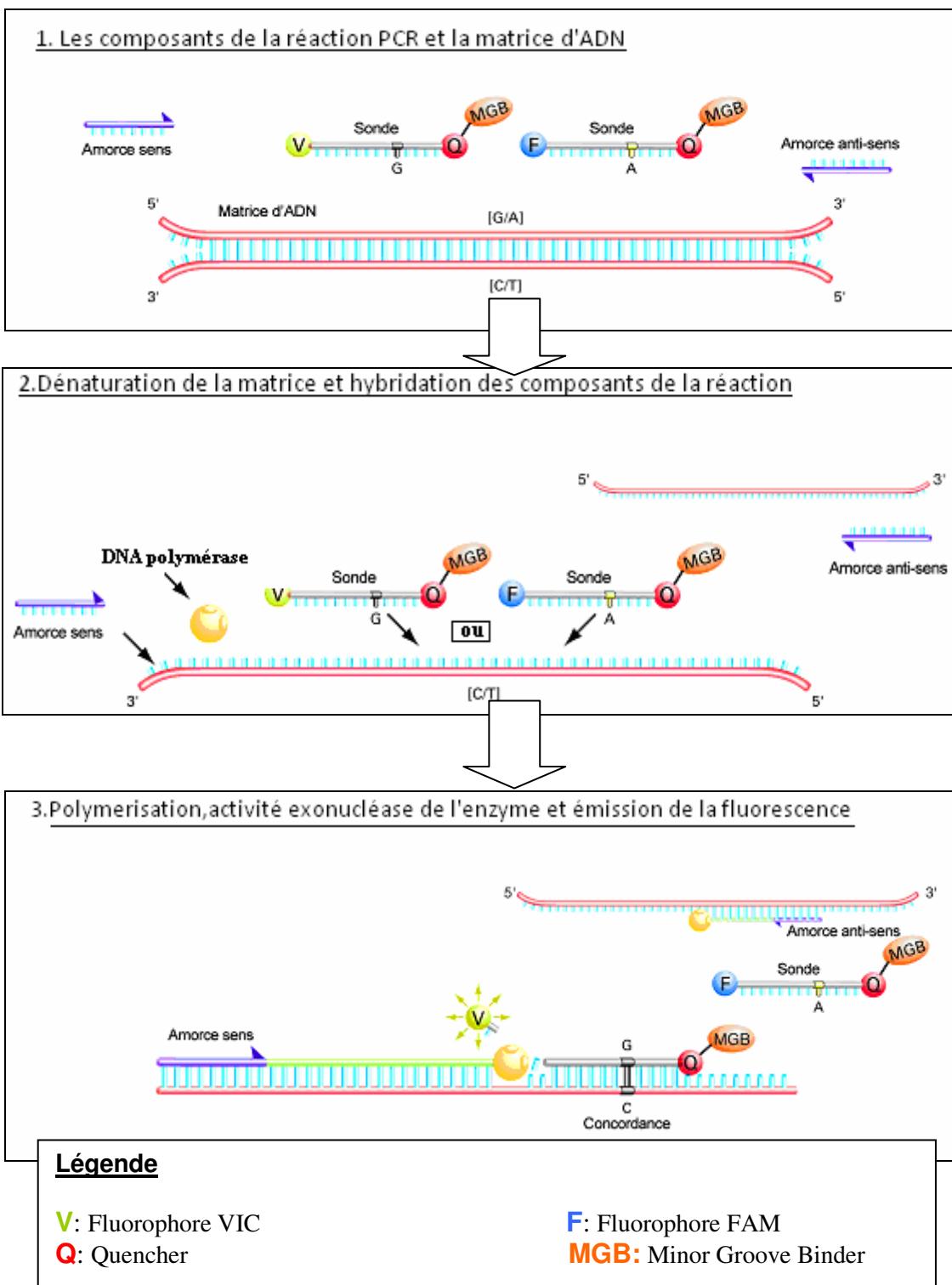


Figure 5: Principe de la détection de SNPs par PCR en temps réel TAQMAN® : 1) Deux sondes différentes marquées par deux fluorophores différents, VIC ou FAM, spécifiques respectivement de l'allèle sauvage et muté, deux amorces sens et anti-sens et la matrice d'ADN sont les éléments constitutifs principaux de la PCR. 2) Hybridation de la sonde complémentaire de la matrice d'ADN après dénaturation de l'ADN. Le type de la sonde qui va s'hybrider dépend du nucléotide présent dans la matrice (C ou T). 3) Polymérisation du nouveau brin complémentaire après hybridation de la sonde ainsi que de l'amorce sens et émission du signal (fluorescence) par le « reporter » suite à l'activité exonucléase 5'→3'.

La réaction de PCR nécessite deux amores spécifiques de la région à amplifier contenant le SNPs d'intérêt (Figure 5 :1). Elle commence par une dénaturation de l'ADN à une température élevée. Les sondes s'hybrident au SNP si la séquence est complémentaire (Figure 5 :2). A ce niveau, la sonde est intacte, le quencher est à proximité du reporter empêchant ainsi l'émission de signal par le reporter quand il est excité. Après fixation de l'amorce sens suite à une diminution de température, l'ADN polymérase synthétise le brin complémentaire de l'ADN. L'activité exonucléasique 5'->3' de l'ADN polymérase permet le clivage de la sonde hybridée sur la séquence cible et provoque ainsi la libération du reporter, par une séparation physique du quencher, ce qui aura pour conséquence l'émission de la fluorescence par le reporter quand celui-ci est excité (Figure 5 : 3).

La fluorescence émise est proportionnelle au nombre de sondes hydrolysées donc au nombre de fragments synthétisés. Elle est mesurable au moment de l'elongation et détectable par le thermocycleur en temps réel. Les variations de fluorescence subies par les reporters, dues par exemple aux variations de température ou d'enregistrement sont normalisées par la fluorescence du fluorophore de référence passive ROX, contenu dans la réaction.

La lignée est définie pour chaque souche à partir de la fluorescence, donc de la sonde ayant permis de détecter la présence ou non de SNPs. Ainsi, l'allèle présent dans l'échantillon est déterminé à partir de cette fluorescence.

B.3.2. Précautions de travail

En raison de la grande sensibilité de la PCR, des précautions très rigoureuses ont été prises durant la manipulation afin d'éviter les problèmes de contamination. La préparation du mélange réactionnel (mix) est effectuée dans une station propre (non contaminée par les acides nucléiques). Le port de gants neufs, d'une blouse propre et l'utilisation des matériels stérilisés (micropipettes, embouts, tubes eppendorf, vortex...) destinés à la salle de PCR, ont été respectés. Toutes les manipulations ont été réalisées dans la glace et sous hotte adéquate.

B.3.3. Les sondes et amores utilisées

Pour chaque SNP, les sondes et les amores ont été fournies respectivement par Applied Biosystem (ABI) et Sigma Aldrich. Les deux amores «sens» et «anti-sens» sont spécifiques de la séquence cible et les sondes sont spécifiques des allèles. Les caractéristiques de chaque sonde et des amores sont indiquées dans les tableaux 5 et 6 respectivement.

Tableau 5 : Caractéristiques des sondes utilisées pour la détection de chaque SNP.

Nom de la sonde sauvage	Séquences	Nom de la sonde mutée	Séquences
katG463_A	FAM-CAGATCCGGGCATC	katG463_B	VIC-CCAGATCCTGGCATC
Rv2952_A	FAM-CCCAGGAGGGTAC	Rv2952_B	VIC-CCCAGGAAGGTACT
Rvc3221c_A	FAM-ACAAGGGCGACGTC	Rv3221c_B	VIC-ACAAGGGCGACATC
Rv3804c_A	VIC-AAGAATGCAGCTTGTGA	Rv3804c_B	FAM-AAGAATGCAGCTTGTGCA
Rv0006_A	FAM-TCCAGATT CGCGGCT	Rv0006_B	VIC-TCCAGATCCGCGGCT
Rv0934_A	FAM-ACCAGGTTCATTTCC	Rv0934_B	VIC-ACCAGGCTCATTCC

La sonde « A » est spécifique d'allèle sauvage et la sonde « B » est spécifique d'allèle muté. Elles sont marquées à leur extrémité 5' par un fluorophore FAM ou VIC. Le nucléotide muté est représenté en gras.

Tableau 6 : Caractéristiques des amorces sens « F » (Forward) et anti-sens « R » (Reverse).

Amorce sens ou forward	Séquence	Amorce anti-sens ou reverse	Séquence
katG463_F	5'CCGAGATTGCCAGCCTTAAG3'	katG463_R	5'GAAACTAGCTGTGAGACAGTCAATCC3'
Rv2952_F	5'CCTTCGATTTGTGCTCAATGT3'	Rv2952_R	5'CATGCGGCGATCTCATTGT3'
RV3221c_F	5'TGTCAACGAAGGCGATCAGA3'	RV3221c_R	5'GACCGTTCCGGCAGCTT3'
Rv3804c_F	5'GCATGGATCGTTGAGATGA3'	Rv3804c_R	5'CGAGTCGACCGCGACATACC3'
Rv0006_F	5'CCAGCCCAGGAACGCATGCCA3'	Rv0006_R	5'AGCACCAAGGTACGGGCGTCGG3'
Rv0934_F	5'CACCGACGGCAACAAGGCCTC3'	Rv0934_R	5'TTCACCACCGCGGGCGGCAGCGGCT3'

B.3.4. Préparation du « mix » ou mélange réactionnel

Le mélange réactionnel est préparé dans la salle réservée à la préparation du mix. La microplaquette est utilisée pour la réaction. La composition du mélange réactionnel est donnée dans le tableau 7.

Tableau 7 : Composition et volume des réactifs pour l'amplification par PCR.

Réactifs	Concentration finale des sondes et amorces	Volume par Réaction (μl)
Master mix QuantiTect Pobe 2X		6
Sonde A (10μM)	0,21pmol/μl	0,25
Sonde B (10μM)	0,21pmol/μl	0,25
Amorce F (10μM)	0,83pmol/μl	1
Amorce R (10μM)	0,83pmol/μl	1
Eau (purifiée par HPLC)		1.5
ADN 5ng/μl		2
Volume total		12

Le mix nécessaire pour le nombre d'échantillons à amplifier est préparé dans un microtube de 1,5 ml. Ensuite, 10 μ l de mix sont distribués dans chaque puits de la microplaqué avant l'ajout de l'ADN à amplifier.

Le tampon Master mix QuantiTect Probe, fourni par le kit QuantiTect Probe PCR (QIAGEN), est constitué par les réactifs suivants :

- L'enzyme ADN Polymerase thermostable : HotStarTaq DNA polymerase
- Tampon de PCR constitué par Tris.Cl, KCL, (NH4)2 SO4. pH=8.7
- Les désoxyribonucléotides libres ou dNTP (dATP, dCTP , dGTC , dTTP)
- MgCl2 8mM
- Le fluorophore de référence passive : ROX

B.3.5. Ajout de l'ADN

La concentration de l'ADN utilisé est 5ng/ μ l. Ainsi, avant de réaliser la PCR, l'ADN stock est dilué dans du TE 1X à partir de la concentration estimée précédemment jusqu'à avoir une concentration de travail égale à 5ng/ μ l. 2 μ l d'ADN 5ng/ μ l sont ensuite ajoutés dans le mix (soit 10ng d'ADN par réaction). L'ajout se fait dans la salle dédiée à cela.

B.3.6. Amplification

La microplaqué de PCR dont chaque puits contient tous les réactifs nécessaires à la réaction (tableau 5) est mise dans le thermocycleur. Le programme d'amplification est indiqué dans le tableau 8.

Tableau 8 : Programme de la PCR.

Etapes	Durée	Température (°C)
Lecture Pré-PCR	30s	60
Dénaturation initiale	15 min	95
Dénaturation	15 s	94
Hybridation/Extension	1 min	60
Lecture Post-PCR	30 s	60

fois 40 cycles

➤ La première étape correspond à la lecture Pré-PCR pendant 30s à 60°C où la machine collecte et enregistre toutes les données avant la réaction.

➤ L'étape de dénaturation initiale à 95°C pendant 15 min permet de séparer la double hélice d'ADN matrice et active l'enzyme ;

➤ Ensuite, le cycle à 2 étapes de la réaction de la PCR, répété 40 fois : la première étape consiste en une dénaturation des deux brins d'ADN matrice à 94 °C durant 15s. La seconde est réalisée à 60 °C pendant 1 min combinant l'hybridation et l'extension ;

➤ l'étape finale à 60 °C pendant 30s correspond à la lecture Post-PCR durant laquelle le thermocycleur enregistre et analyses toutes les données recueillies.

B.3.7. Lecture des résultats

Le logiciel StepOne permet la détermination du génotype des échantillons d'ADN présents dans les tubes de réaction. D'abord, il normalise dans chaque puits la fluorescence des reporters sur la fluorescence du fluorophore de référence passive (ROX). Ensuite, il trace les intensités normalisées (R_n) des reporters de chaque échantillon (Figure 6) sur un graphique de discrimination allélique, ce qui met en évidence l'intensité des reporters pour les sondes spécifiques des allèles. Enfin, le logiciel attribue un génotype à chacun des échantillons en discriminant l'allèle correspondant selon les données de l'intensité des reporters. Ainsi, il positionne chaque souche sur le graphique (Figure 7) en fonction du génotype déterminé.

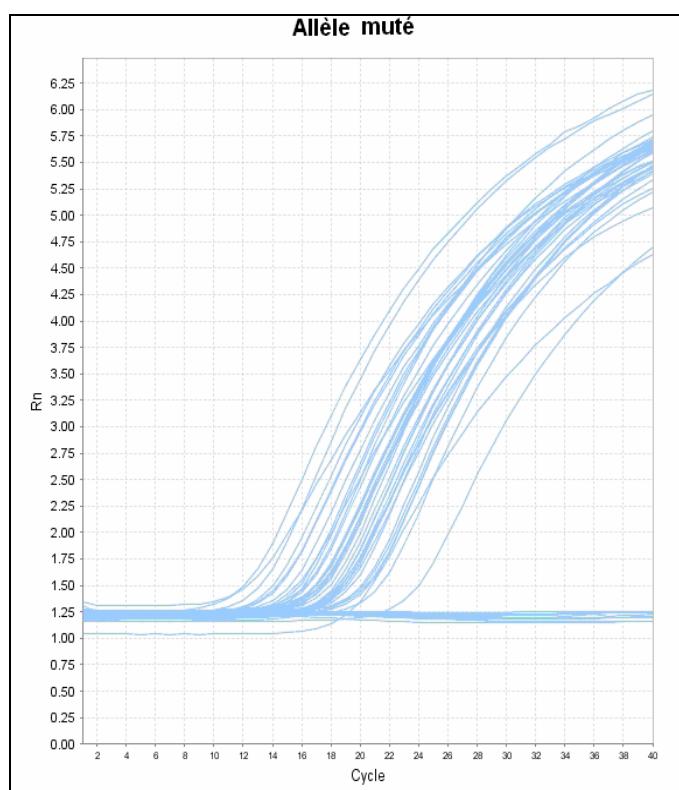


Figure 6 : Courbe d'amplification représentant les intensités normalisées (R_n) des reporters dans chaque puits en fonction du nombre du cycle. Dans cette figure, le reporter correspond à la sonde spécifique d'allèle muté. L'intensité de la fluorescence est proportionnelle au nombre de sondes hydrolysées donc au nombre de fragments synthétisés. Chaque courbe correspond à un échantillon.

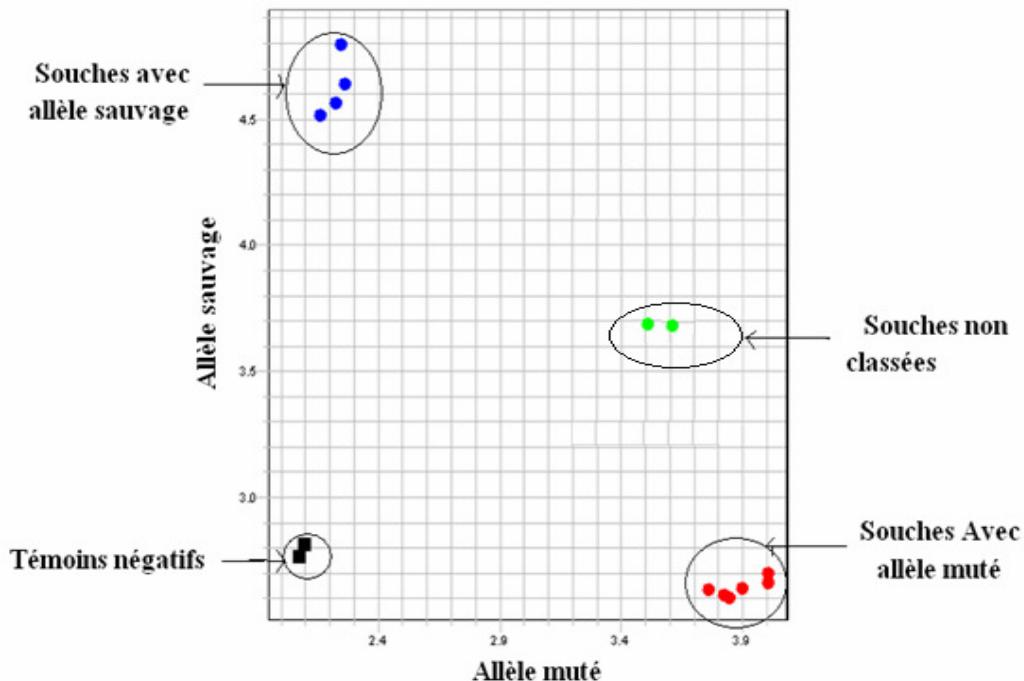


Figure 7 : Représentation graphique des résultats du génotypage d'un SNPs obtenu par Taqman ®. La figure correspond au graphe de discrimination allélique. L'axe des abscisses et l'axe des ordonnées indiquent respectivement les intensités des reporters des allèles muté et sauvage. L'amas de points de données peut s'étaler sur l'axe horizontal (Allèle muté), l'axe vertical (allèle sauvage) ou en diagonale (allèle non déterminé). Le génotype de chaque échantillon ou la lignée des souches est attribué selon leur position sur le graphique.

B.4. ANALYSE DES RESULTATS.

B.4.1. Classification des souches

Les souches sont classées sur la base de leurs profils génétiques. Ainsi, toutes les données sur le génotypage que ce soit le spoligotypage ou le typage des SNPs sont analysées avec le programme du site web <http://www.MIRU-VNTRplus.org>. Des dendrogrammes sont construits et analysés à partir de ces données.

Le dendrogramme a pour but d'obtenir une représentation schématique simple d'un tableau des données et de visualiser les regroupements possibles de profils génétiques. Le groupe génétique ainsi formé est défini comme « cluster génétique ». Un cluster de souches est défini comme un ensemble de souches ayant le même profil génétique.

B.4.2. Analyses statistiques

Les différences de niveaux d'expression des cytokines de l'hôte entre les lignées des souches ainsi qu'entre les groupes génétiques bactériens ont été analysées en utilisant le test de Mann-Whitney et le test Kruskal-Wallis. Le logiciel Prism 5.03 a été utilisé pour les analyses

Matériels et Méthodes

statistiques des données et la construction des graphes. Une valeur de $p < 0,05$ est considérée comme statistiquement significative.

B.4.2.a. Association entre le génotype des souches bactériennes (2004-2005) et la réponse en IFN- γ de l'hôte

Il s'agit d'étudier les variations de la réponse en IFN - γ de l'hôte en fonction de la lignée bactérienne et l'appartenance ou pas au groupe TbD1 de souches *M. tuberculosis* afin de déterminer s'il y a une association entre cette réponse immune de l'hôte et le génotype des souches.

La réponse en IFN- γ des patients tuberculeux a été obtenue lors d'une étude antérieure par le test ELISPOT. Le principe était de mesurer *in vitro* le nombre de PBMC secrétant de l'IFN- γ chez les patients tuberculeux en réponse à des Ag spécifiques (ESAT-6 et PPD).

B.4.2.b. Association entre le génotype des souches bactériennes (2009-2010) et la réponse immunitaire de types Th1, Th2, Th17 de l'hôte.

Le type de la réponse immunitaire de l'hôte peut être définie selon le profil de cytokines secrétées. Ainsi, les cytokines analysées lors de l'étude réalisée par l'IPM et l'IPP en 2010, ont été regroupées en cytokines du type Th1, Th2 et Th17. IL-2 et IFN- γ sont les cytokines du type Th1. La réponse du type Th2 est définie par la sécrétion d'IL-4, IL-5 et IL-10 ; et la réponse du type Th17 par la sécrétion d'IL-17. Pour cela, les réponses immunes de type Th1, Th2 et Th17 ont été comparées selon les lignées et les groupes TbD1 afin de voir si une association existe entre le génotype des souches *M.tuberculosis* et ces types de réponses immunes.

IV. RESULTATS

A. CLASSIFICATION

A.1. DESCRIPTION DES SPOLIGOTYPES DES SOUCHES ANALYSEES

Au total 166 souches de *M. tuberculosis* circulant à Antananarivo ont été analysées dont 68 isolées entre 2004 et 2006, 96 entre 2009 et 2010, une en 1999 et une souche en 1996.

Cent soixante quatre (164) sur 166 souches analysées ont été typées par le spoligotyping lors d'études antérieures au laboratoire des mycobactéries de l'IPM. Selon la base de données SpoldB4, la famille de spoligotypes ainsi que le « Shared-type (ou ST) » étaient définies pour 148 souches et pour 16 souches, les spoligotypes correspondants n'étaient pas répertoriés dans le SpoldB4. Ainsi, 62 spoligotypes ont été obtenus dont 42 de type unique et 20 correspondant à des clusters composés de 2 à 16 souches. Onze (11) familles de spoligotypes ont été identifiées: T (34,14%, n=65), CAS (10,98% ; n=18), LAM (10,98%, n=18), EAI (8,54%, n=14), Beijing (7,96%, n=13), Harleem (4,87%, n=8), U (1,82%, n=3), X (1,82%, n=3), Bovis (1,82%, n=3), S (1,22%, n=2) et Manu (0,61%, n=1) (Tableau 9). Pour 6 souches, le spoligotype n'a pas pu être validé car certains spacers n'ont pas pu être déterminés comme présents ou absents. Si on se réfère au shared-type, les ST 21(CAS1_KILI, n=15), ST 86(T1, n=15), ST1 (Beijing, n=13) et le ST 156 (T1, n=11) ont été trouvés majoritaires chez les souches de *M. tuberculosis* sélectionnées pour cette étude.

A.2. GENOTYPAGE DES SNPs

A.2.1. Description du résultat

Les 166 souches de *M. tuberculosis* ont été typées pour chacun de 6 SNPs.

Une souche appartient à la lignée 1 lorsque la mutation ou le SNPs correspondant, Rv3221c_0085n a été identifié. La lignée 2 a été identifiée par le SNPs Rv2952_0526n, la lignée 3 par le SNPs Rv3804c_0012 et la lignée 4 par le SNPs katG 463 (Tableau 3). Le SNPs Rv0934_1055 identifie la famille Bovis. Si aucun des SNPs spécifiques n'a pu être identifié pour une souche, celle-ci est définie comme souche de « lignée indéterminée » (IND). La répartition des 164 souches dans les 5 lignées est donnée dans la figure 8.

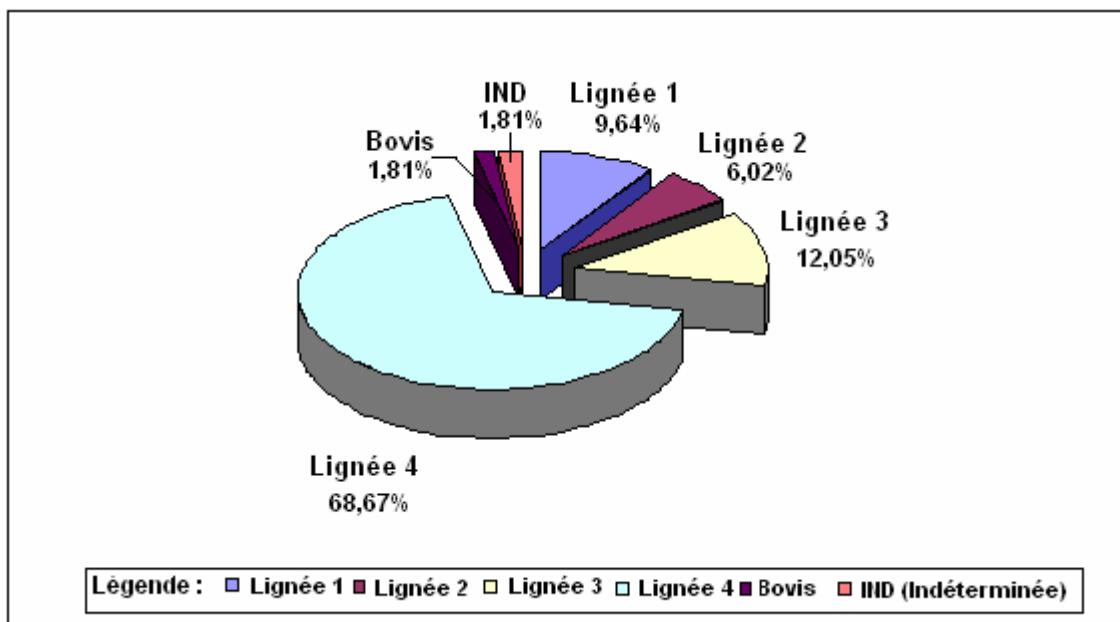


Figure 8 : Classification des 164 souches par lignées *M. tuberculosis*.

Par ailleurs, l'analyse du SNPs Rv 0006_1842 a permis de regrouper les souches en groupe « ancestral » ou TbD1+ et groupe « moderne » ou TbD1-. Ainsi, 145 souches (88, 41%) parmi les 164 étudiées appartenaient au groupe TbD1- et 19 (11, 59%) au groupe TbD1+ (Figure 8). La lignée 1 et Bovis ont été classées dans le groupe ancien, TbD1+, et les autres lignées 2, lignée 3 et la lignée 4, dans le groupe moderne, TbD1-.

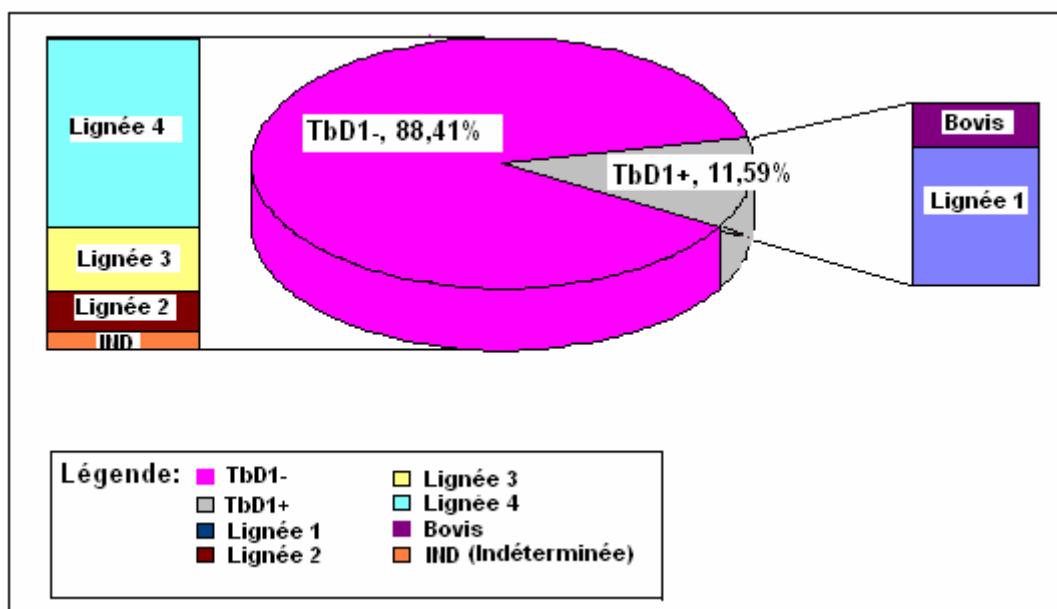


Figure 9: Distribution des souches selon le groupe TbD1.

A.2.2. Corrélation entre les génotypes SNPs et les spoligotypes.

Le tableau 6 montre la correspondance entre les lignées SNPs et les spoligotypes. Par ailleurs, nous avons construit un dendrogramme à partir du spoligotype des souches et nous y avons mis en évidence la lignée déterminée par le typage des SNPs, afin d'observer la concordance entre les deux techniques de génotypage (Figure 10).

Lors de la construction du dendrogramme, nous avons enlevé les 3 souches de lignée indéterminée et les 6 souches (n=6) dont le spoligotype n'a pas pu être validé.

- Les résultats sont concordants pour toutes les souches de famille spoligotype connue (100%) (Tableau 9) :
 - 13 souches de spoligotype Beijing sont retrouvées dans la lignée 2 ;
 - 18 souches de spoligotype CAS, dans la lignée 3 ;
 - 12 souches de spoligotype EAI, dans la lignée 1 ;
 - les souches de spoligotypes T, H, LAM, U, MANU et X sont toutes dans la lignée 4 ;
 - 3 souches de spoligotype Bovis sont dans la lignée Bovis.

Tableau 9 : Distribution des souches selon leur spoligotype et selon la lignée de souches.

Lignée des souches \ Famille Spoligotype	Lignée 1	Lignée 2	Lignée 3	Lignée 4	Bovis	IND	TOTAL
Beijing		13					13
CAS			18				18
EAI	12					2	14
HARLEM (H)				8			8
LAM				18			18
MANU				1			1
S				1		1	2
T				65			65
X				3			3
Bovis					3		3
U				3			3
Indéterminée	4		2	10			16
TOTAL	16	13	20	115	3	3	164

Famille spoligotype indéterminée : le spoligotype n'est pas retrouvé dans la banque SpoldB4

IND : Lignée indéterminée

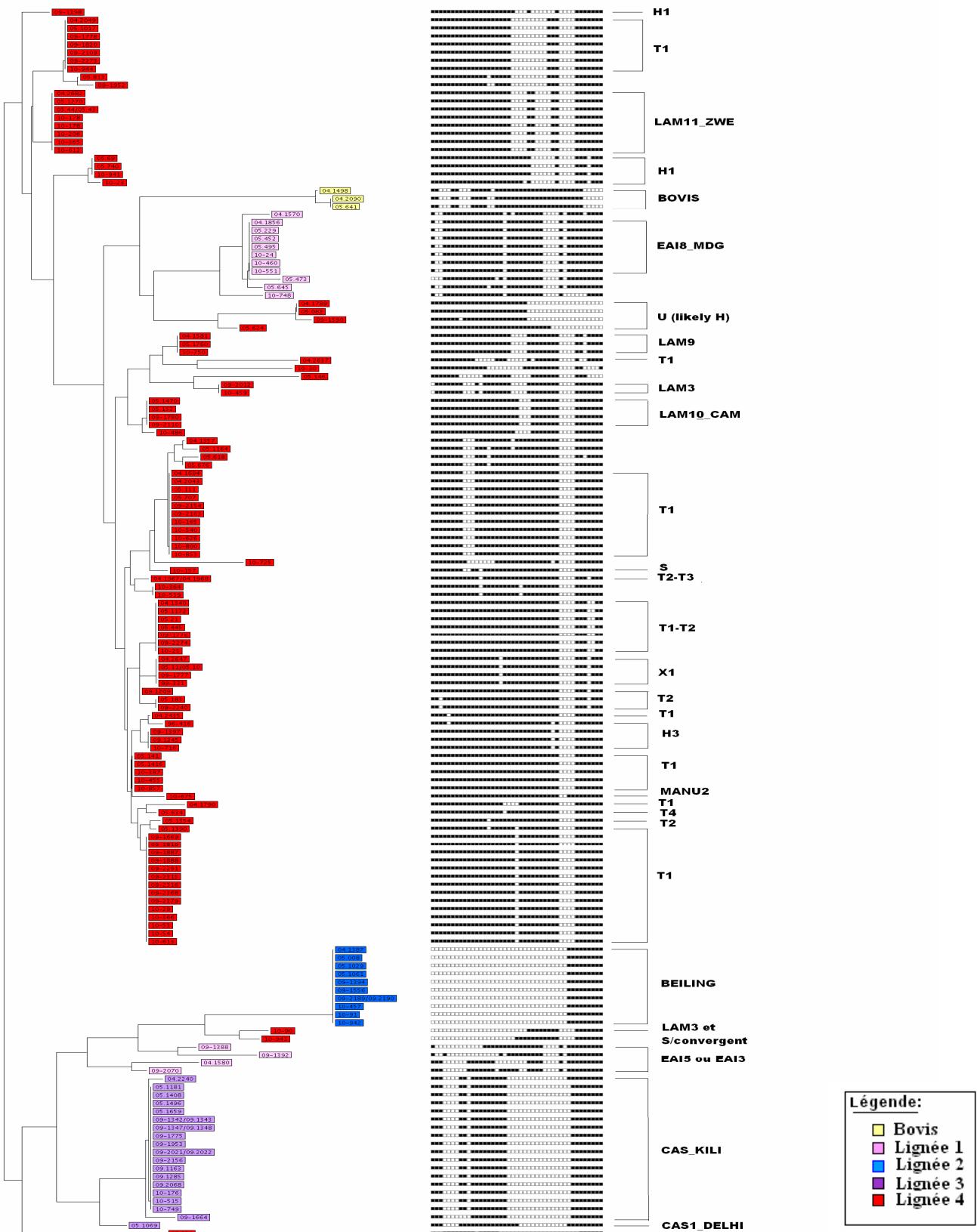


Figure 10: Dendrogramme des 155 souches classées selon leur profil spoligotype. Les lignées 1, 2, 3, 4 et Bovis sont représentées respectivement par les couleurs rose, bleue, violette, rouge et jaune permettant de mettre en évidence la concordance des résultats. Les spoligotypes sont représentés à droite de l'arbre.

B. ETUDE DE LA REONSE IMMUNE EN FONCTION DU GENOTYPE DES SOUCHES

Les souches analysées dans cette étude sont :

- les souches de 2004-2005, utilisées lors de l'étude VACSIS où la réponse en IFN- γ des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) des patients tuberculeux stimulées par des antigènes (Ag) spécifiques de *M. tuberculosis*, ESAT-6 et PPD a été analysée et observée ;
- les souches de 2009-2010, isolées lors d'une étude qui portait sur l'analyse de la réponse en cytokines telles que IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10, IL-5, IL-17 chez les patients tuberculeux dans lesquels les souches cliniques *M. tuberculosis* ont été isolées.

Ainsi, nous avons divisé l'analyse en deux parties :

- Analyse de la réponse en IFN- γ des PBMC des patients tuberculeux (souches de 2004-2005)
- Analyse de la réponse en cytokines IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10, IL-5 et IL-17 des patients tuberculeux (souches de 2009-2010)

Nous avons aussi analysé la réponse immune en fonction des deux groupes de génotypes observés :

- les lignées *M. tuberculosis* qui sont définies selon le génotype SNPs ;
- les groupes TbD1+ et TbD1-, selon la présence ou absence du SNPs Rv0006_1842.

B.1. ETUDE DE LA REONSE EN IFN- γ SELON LES LIGNEES DES SOUCHES (ISOLEES EN 2004-2005).

Pour déterminer si une association existe entre le génotype des souches et la réponse en IFN- γ , nous avons d'abord comparé le nombre de cellules sécrétrices d'IFN- γ après stimulation des PBMC par des Ag ESAT-6 et PPD chez les patients selon les 4 lignées majeures des souches infectantes (Lignée 1, 2, 3, et 4), puis selon les deux groupes TbD1 (figures 11 et 12).

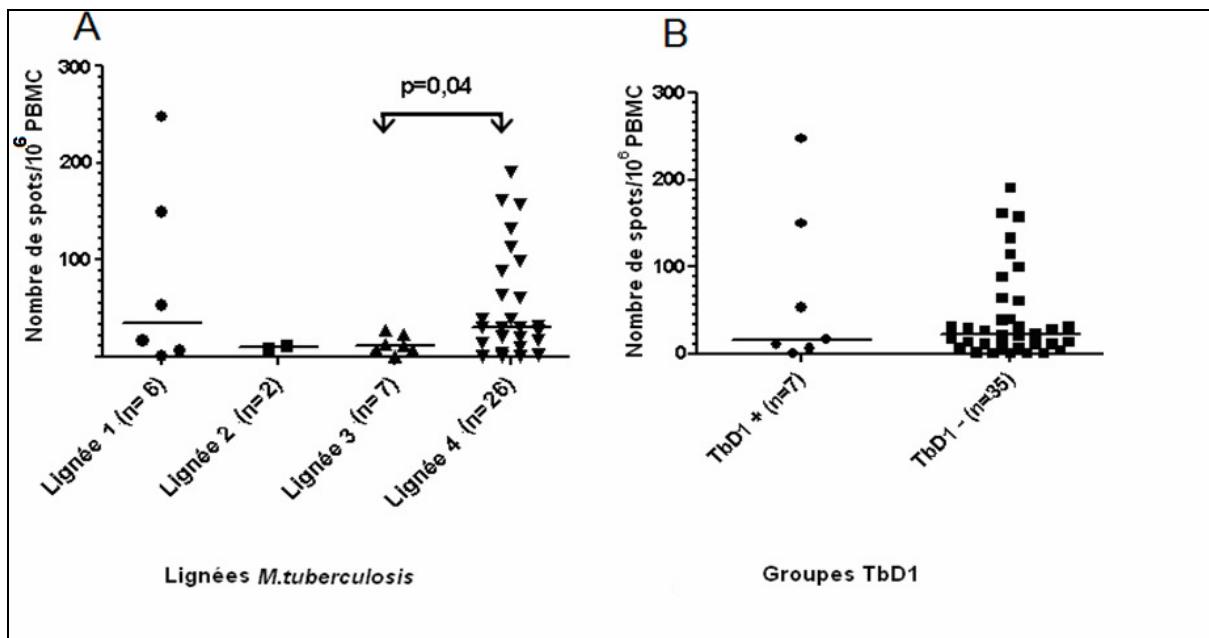


Figure 11 : Nombre de cellules (PBMC) sécrétrices d'IFN- γ chez les patients tuberculeux (nombre de spots pour 10^6 cellules) après stimulation par l'antigène ESAT-6 en fonction de la lignée *M. tuberculosis* de la souche infectante (A) et en fonction des groupes TbD1 (B). La différence significative entre les groupes ($p < 0,05$) est représentée par une flèche et le trait horizontal indique la médiane du nombre de spots par 10^6 PBMC

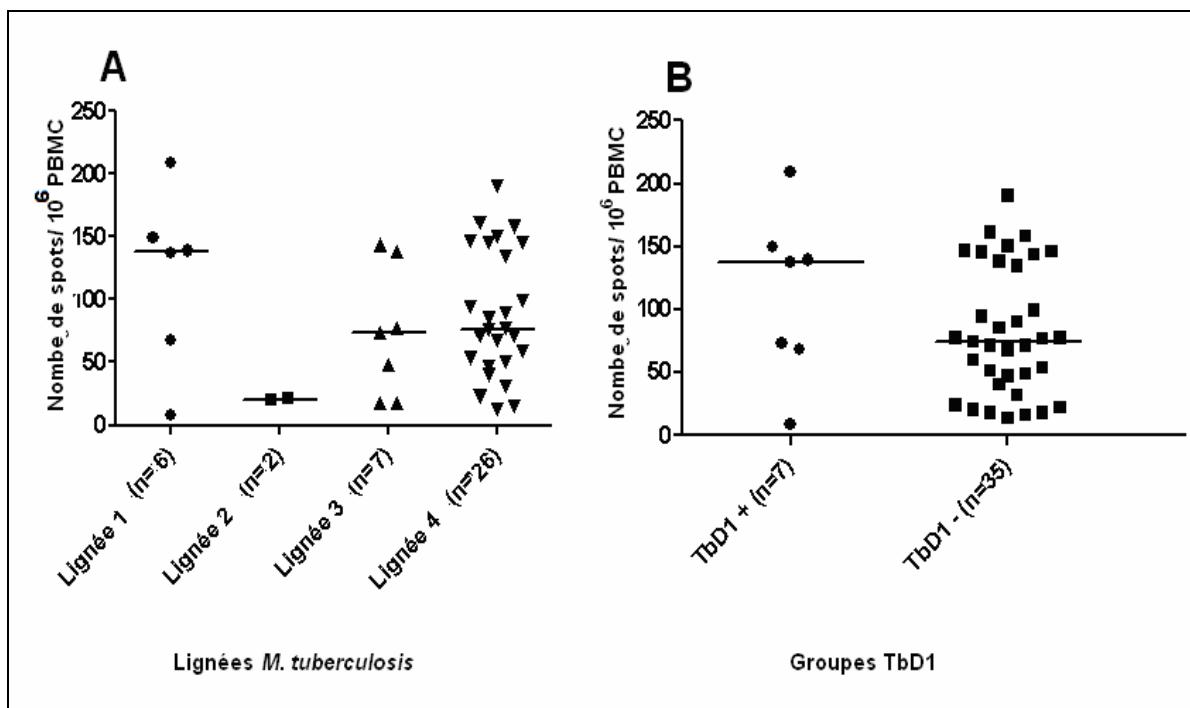


Figure 12 : Nombre de cellules (PBMC) sécrétrices d'IFN- γ chez les patients tuberculeux (nombre de spots pour 10^6 cellules) après stimulation par l'antigène PPD en fonction de la lignée *M. tuberculosis* de la souche infectante (A) ainsi qu'en fonction des groupes TbD1 (B). Le trait horizontal indique la médiane du nombre de spots par 10^6 PBMC.

Après stimulation par ESAT-6 et par PPD, la comparaison du nombre de cellules sécrétrices d'IFN- γ entre les patients infectés par les souches de différentes lignées n'a montré globalement aucune différence (p respectifs= 0,17 et 0,21 ; Figures 11A et 12A). Cependant, après la comparaison des groupes de patients deux à deux, il a été observé que les patients infectés par les souches de la lignée 4, après stimulation par ESAT-6, avaient une réponse significativement plus élevée en IFN- γ que ceux infectés par les souches de la lignée 3 ($p=0,04$; Figure 11A).

Pour les deux groupes de patients infectés par les souches TbD1+ et TbD1-, aucune différence significative n'a été observée quant à la réponse en IFN- γ après stimulation par PPD et par ESAT-6 (p respectifs =0,87 et 0.34 ; Figures 11B et12B).

B.2. ETUDE DE LA REPONSE IMMUNE DE TYPES TH1, TH2 ET TH17 SELON LES LIGNEES DE SOUCHES (ISOLEES EN 2009-2010).

Il s'agit de comparer la réponse immune de types Th1, Th2 et Th17 des patients tuberculeux en fonction des lignées des souches et selon les groupes TbD1 afin d'étudier l'existence d'une relation entre le génotype des souches et ces réponses immunes.

Pour la comparaison de la réponse en cytokines chez les patients, en fonction des lignées ou des groupes des souches infectantes, nous avons groupé les cytokines selon le type de réponse immunitaire (Th1, Th2 et Th17). Pour la réponse de type Th1, nous avons analysé le taux de cytokines majeures, IL-2 et IFN- γ . La réponse de type Th2 a été évaluée à partir du taux des cytokines IL-4, IL-5 et IL-10, et la réponse immune Th17 à partir du taux de l'IL-17.

B.2.1. Réponse Th1.

Une différence significative de la réponse en IL-2 a été observée chez les patients infectés par les souches de différentes lignées ($p=0,023$). La réponse est plus élevée chez les patients infectés par les souches de la lignée 3 (taux médian = 35, 19), que chez les patients infectés par les souches de la lignée 1 (taux médian = 10) et lignée 2 (taux médian = 10), et plus faible chez les patients infectés par les souches de la lignée 4(taux médian = 6, 23). Pour la réponse en IFN- γ , aucune différence significative n'a été observée entre les groupes de patients. Quand on compare les groupes de patients deux à deux, il a été observé que les patients infectés par les souches de la lignée 3 ont une réponse significativement plus élevée en IL-2 et en IFN- γ que ceux infectés par les souches de la lignée 4 (p respectifs = 0,005 et 0,03 ; Figure 13A).

Par contre, la comparaison de la réponse en IL-2 et en IFN- γ entre les deux groupes de patients infectés par les souches du groupe TbD1+ et du groupe TbD1– n'a montré aucune différence significative (p respectifs =0,52 et 0,87 ; Figure 13B).

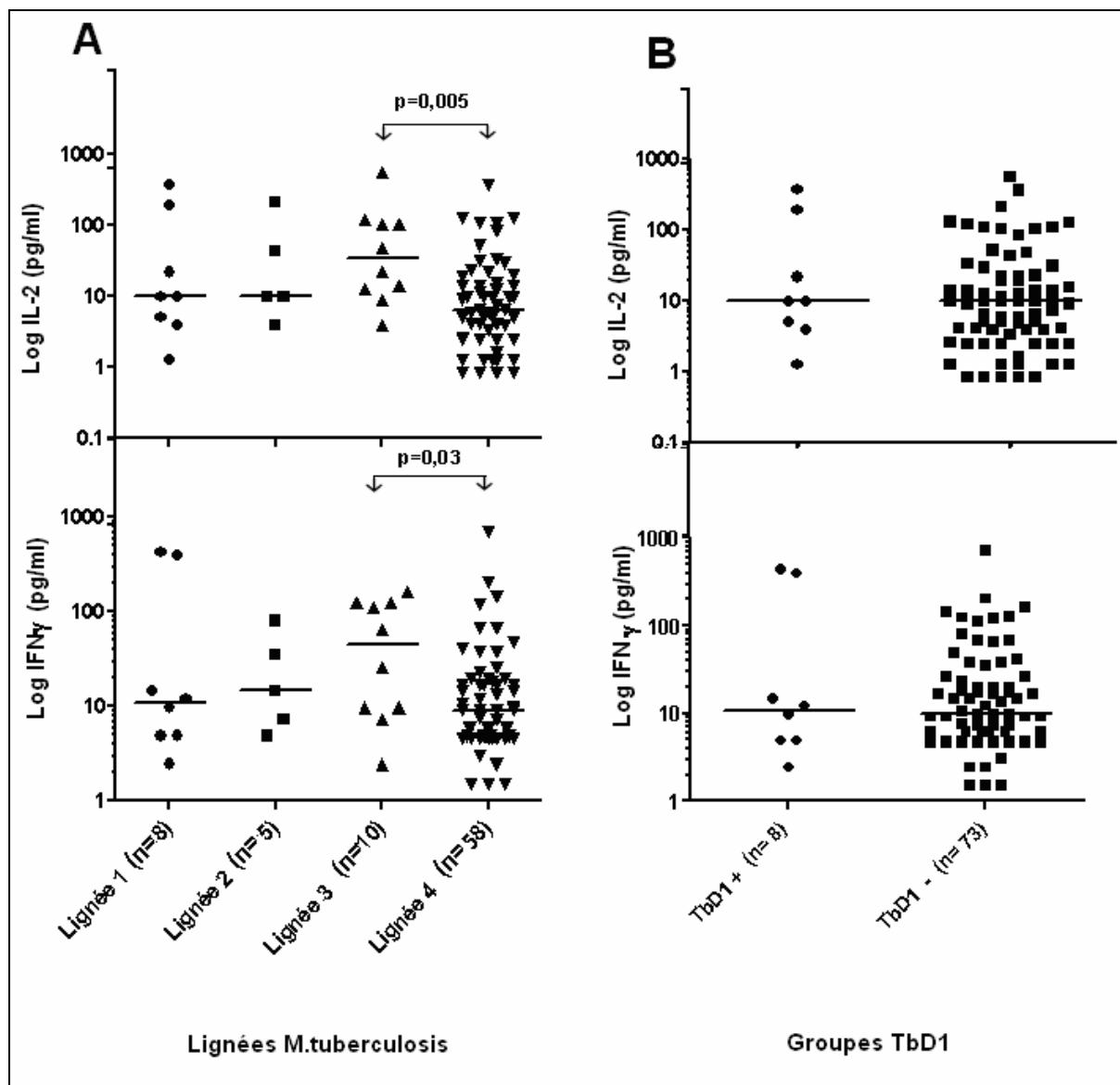


Figure 13: Réponse immune Th1 chez les patients tuberculeux en fonction des lignées génotypiques des souches cliniques *M. tuberculosis* (**A**) et en fonction des groupes TbD1 (**B**). Les réponses en IFN- γ et IL-2 ont été utilisées pour étudier la réponse Th1. Les différences significatives entre les lignées ($p < 0,05$) sont représentées par des flèches et le trait horizontal indique le taux médian de cytokines.

B.2.2. Réponse Th2

La comparaison du taux des cytokines de type Th2 produites chez les patients infectés par les souches de différentes lignées et chez les deux groupes de patients infectés par les souches TbD1+ et TbD1- a été réalisée.

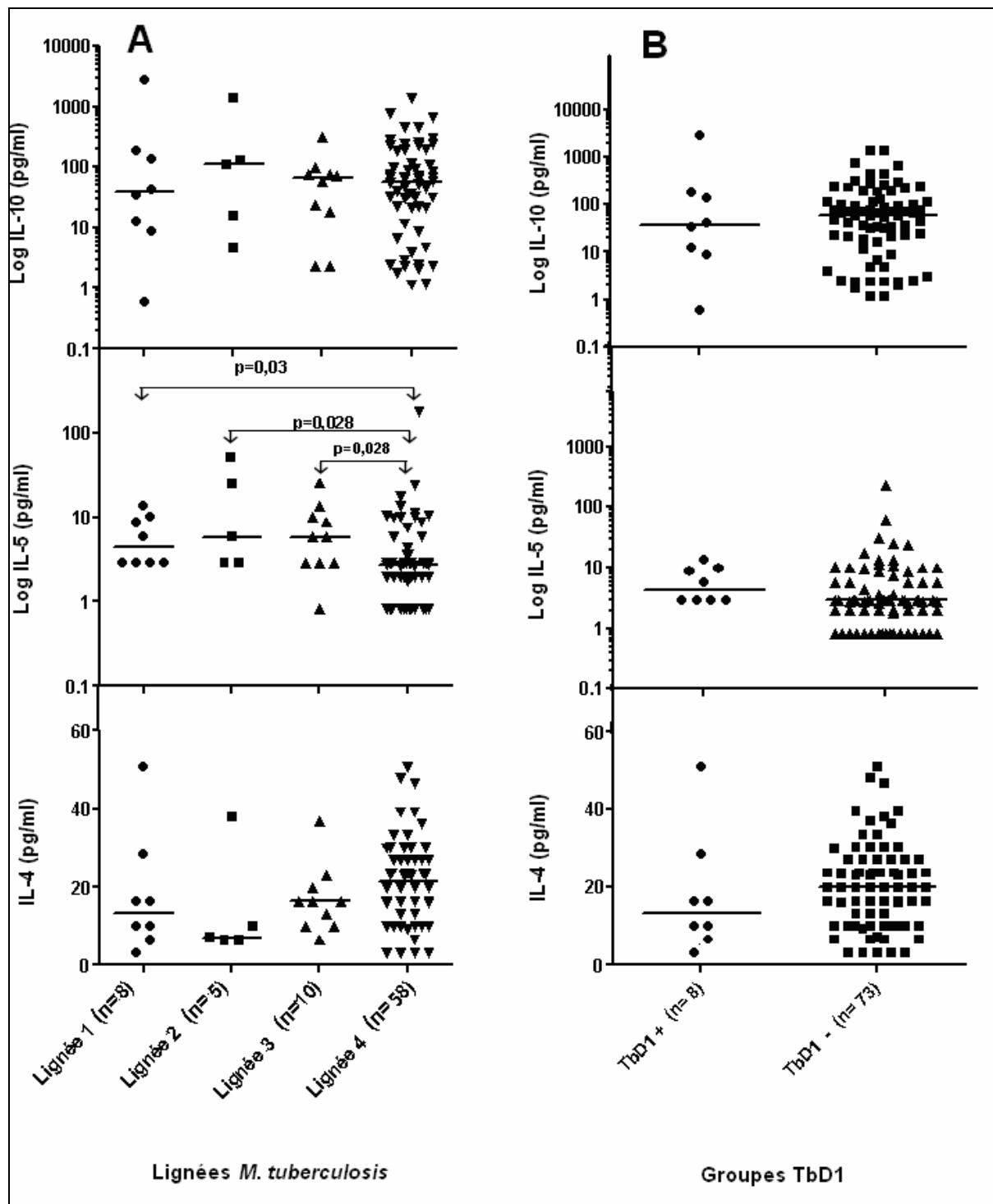


Figure 14 : Réponse immunitaire de type Th2 (IL-4, IL-5 et IL-10) chez les patients tuberculeux en fonction de la lignée *M. tuberculosis* de la souche infectante (A) et en fonction des groupes TbD1 (B). Les différences significatives entre les groupes de patients ($p < 0,05$) sont représentées par des flèches et le trait horizontal indique le taux médian de taux de cytokines.

Chez les patients infectés par les souches de différentes lignées, aucune différence significative globale n'a été observée quant à la réponse en IL-4 et en IL-10 ($p = 0,918$ et $0,116$ respectifs). Par contre, la réponse en IL-5 est significativement différente ($p=0,007$). Elle est plus élevée chez les patients infectés par les souches de la lignée 2 (taux médian = 5, 85) et 3

(taux médian = 5, 85), que chez les patients infectés par les souches de la lignée 1 (taux médian = 4,40), et la plus faible chez les patients infectés par les souches de la lignée 4 (taux médian = 2,73), (p respectifs = 0,03 ; 0,028 et 0,028) (Figure 14A).

Nous avons ensuite comparé la réponse immune du type Th2 chez les deux groupes de patients infectés par les souches TbD1+ et TbD1- et nous n'avons observé aucune différence significative entre ces deux groupes de patients (Figure 14B).

B.2.3. Réponse Th17

Nous avons recherché s'il existe une différence de réponse immune du type Th17 entre les patients infectés par les souches de différentes lignées et entre les groupes de patients infectés par les souches TbD1+ et TbD1-.

Selon les lignées de souches infectantes, une variation significative ($p=0.045$) de la réponse en IL-17 est observée. La réponse est plus élevée chez les patients infectés par les souches de la lignée 1 (taux médian = 40,52), que chez les patients infectés par les souches de la lignée 3 (taux médian = 32,17) et lignée 4 (taux médian = 18, 30), et elle est plus faible chez les patients infectés par la lignée 2 (taux médian = 13,19). De plus, lorsque on compare deux à deux les groupes de patients, le taux de cytokine IL-17 produite chez les patients infectés par les souches de la lignée 1 est significativement plus élevé que chez ceux infectés par les souches de la lignée 4 ($p = 0.006$; Figure 15A).

La comparaison de la réponse selon les deux groupes de patients infectés par les souches TbD1+ et TbD1- a montré que les patients infectés par les souches TbD1+ ont une réponse significativement plus élevée en IL-17 que les patients infectés par les souches TbD1- ($p=0.007$; Figure 15B).

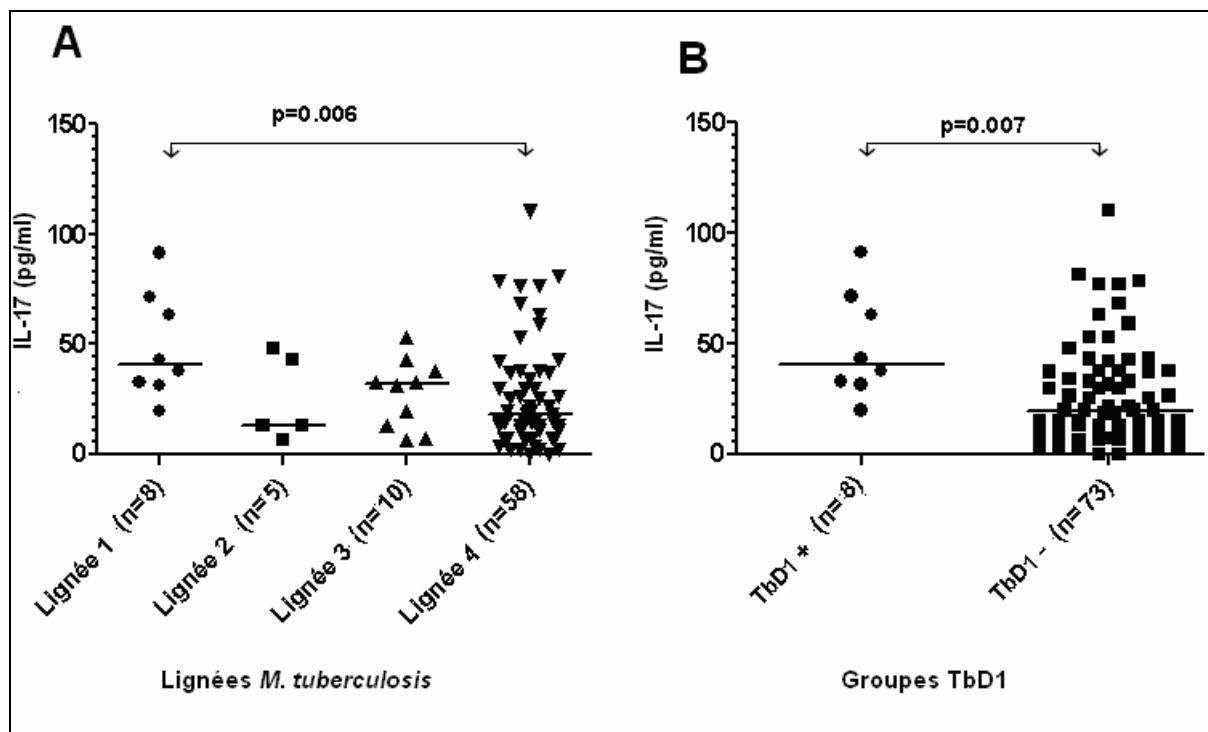


Figure 15 : Réponse immune de type Th17 chez les patients tuberculeux en fonction de la lignée *M. tuberculosis* de la souche infectante (A) ainsi qu'en fonction des groupes TbD1 (B). Les différences significatives entre les lignées ($p < 0,05$) sont représentées par des flèches et le trait horizontal indique le taux médian d'IL-17.

V. DISCUSSION

La compréhension de l'influence de la diversité génétique de *M. tuberculosis* sur l'issue clinique de la maladie pourrait être utile dans la lutte contre la tuberculose. Plusieurs études suggèrent que les souches de *M. tuberculosis* pourraient induire des réponses immunitaires variables. L'objectif de notre étude était de déterminer l'existence d'une association entre la diversité génétique des souches *M. tuberculosis* circulant à Madagascar et le phénotype de l'hôte. Ainsi, nous avons en premier lieu, étudié la diversité génétique des souches *M. tuberculosis* par la technique de typage des SNPs spécifiques des grandes lignées de *M. tuberculosis* et le spoligotyping, et en second lieu, nous avons recherché s'il existe une association entre la lignée de souches et la réponse immune en observant la réponse en IFN- γ après stimulation par des Ag spécifiques, PPD et ESAT-6, et la réponse immune de types Th1, Th2 et Th17 chez les patients infectés par les souches de différentes lignées.

L'analyse des 5 SNPs spécifiques de six lignées de *M. tuberculosis* (Lignées 1, 2, 3, 4, Bovis) a montré une grande diversité des souches *M. tuberculosis* circulant à Madagascar. Les 4 lignées majeures de *M. tuberculosis* (Lignées 1, 2, 3 et 4) ainsi que la famille Bovis ont été retrouvées dans notre étude. La lignée 4 (Euro-américain) a été trouvée très majoritaire, correspondant à environ 68% des souches étudiées suggérant que cette lignée est largement transmise dans la population malgache. Par le typage de SNPs Rv0006_1842, les souches ont été classées en deux groupes TbD1, le groupe TbD1- regroupant les souches de la lignée 2, 3 et 4, et le groupe TbD1+, la lignée 1 et Bovis, ce qui est similaire aux résultats observés dans la littérature (Baker, Brown et al. 2004; Gagneux, DeRiemer et al. 2006; Comas, Homolka et al. 2009). Les SNPs constituent un marqueur robuste pour la classification phylogénétique car ils sont informatifs des lignées phylogénétiques et montrent un très faible niveau d'homoplasie (Comas, Homolka et al. 2009). Ainsi, les SNPs dans la présente étude peuvent être utilisés pour typer les souches *M. tuberculosis* ou pour étudier la phylogénie des souches de Madagascar.

L'analyse de la corrélation entre les deux techniques de typages, le spoligotyping et le typage des SNPs, a montré que les résultats sont concordants à 100%. La famille spoligotype correspondant à chaque lignée de souches a été retrouvée dans la lignée elle-même lors du typage des SNPs, ce qui est similaire aux observations dans la littérature où les familles de souches définies par le spoligotyping sont en corrélation avec les lignées de souches définies par le typage des SNPs (Baker, Brown et al. 2004; Mostowy, Onipede et al. 2004; Brudey, Driscoll et al. 2006; Comas, Homolka et al. 2009).

Selon l'hypothèse que la diversité génétique de *M. tuberculosis* pourrait influencer sur la virulence d'une souche ou la réponse immunitaire de l'hôte, nous avons d'abord, analysé la variation de la réponse en IFN- γ chez les patients infectés par les souches de différentes lignées de *M. tuberculosis*. Ainsi, selon la lignée de souches, les patients infectés par les souches de la lignée 4 avaient une réponse significativement plus élevée en IFN- γ que ceux infectés par les souches de la lignée 3 après stimulation par ESAT-6, ce qui indique que la lignée 3 de *M. tuberculosis* pourrait être plus virulente que la lignée 4 et capable d'altérer la réponse immunitaire de l'hôte. Ces résultats ont permis de confirmer les observations de Rakotosamimanana et al, lors de la première étude à Madagascar montrant l'association entre le génotype de souches et la réponse de l'hôte (IFN- γ), où les souches de spoligotypes Beijing et CAS (lignées 2 et 3) avaient tendance à induire une réponse en IFN- γ plus faible que les souches de spoligotypes LAM, H, U, X, S (lignée 4) (Rakotosamimanana, Raharimanga et al. 2010). Ces résultats pourraient être expliqués par une étude suggérant que le faible phénotype inflammatoire induit par les souches de la ligne 3 (CAS) serait lié à une délétion chromosomique, au niveau du gène *Rv1519* (Newton, Smith et al. 2006).

Nous avons ensuite analysé la réponse immune de type Th1, Th2 et Th17 chez les patients tuberculeux selon les différentes lignées de *M. tuberculosis* et les groupes TbD1. Concernant la réponse de type Th1, une variation significative de la réponse en IL-2 a été observée. La réponse était statistiquement plus élevée chez les patients infectés par les souches de la lignée 3, que chez les patients infectés par les autres types de souches et était la plus faible chez les patients infectés par les souches de la lignée 4. De même, pour la réponse en IFN- γ , les patients infectés par les souches de la lignée 3 présentaient une réponse plus forte que les patients infectés par les souches de la lignée 4. Les réponses plus faibles en IFN- γ et en IL-2 induites par les souches de la lignée 4 suggèrent que celle-ci serait plus virulente que la lignée 3 car elle diminue la réponse immunitaire protectrice Th1 de l'hôte. Or, dans la littérature, la lignée 3 était trouvée plus virulente que la lignée 4, induisant une production faible des cytokines pro-inflammatoires (Newton, Smith et al. 2006; Tanveer, Hasan et al. 2009). Ces résultats variables peuvent être dus aux différentes techniques utilisées. Tanveer et Newtons et al ont utilisés des modèles cellulaires d'infection (Lignées cellulaires TPH-1 et monocytes respectivement). Par ailleurs, l'étude de Rakotosamimanana et al a porté sur la stimulation des PBMC et dans notre étude, sur le sang total, ce qui pourrait expliquer la différence des résultats.

Concernant la réponse immune Th2, aucune différence significative n'a été observée lors de l'analyse de la réponse en IL-10 et IL-4. Par contre, pour la réponse en IL-5, les patients infectés par les souches de la lignée 4 avaient une réponse significativement plus faible par rapport aux patients infectés par les souches de la lignée 1, lignée 2 et la lignée 3. Cependant ces résultats sont discutables car l'existence d'une co-infection avec des parasites chez les

patients pourrait influencer l'interprétation de résultat car l'IL-5 constitue la cytokine majeure dans l'infection parasitaire (Ikutani, Yanagibashi et al. 2011), ce que nous n'avons pas pu vérifier dans cette étude.

Pour la réponse du type Th17, nous avons observé que les patients infectés par les souches de la lignée 1 ont une réponse significativement plus importante que les patients infectés par les souches de la lignée 4. Ceci confirme encore la virulence de la lignée 4 par rapport aux autres lignées de souches en diminuant la réponse en IL-17, une cytokine pro-inflammatoire pouvant jouer un rôle important dans l'immunité contre l'infection mycobactérienne (Khader, Bell et al. 2007).

Par ailleurs, une variation de réponse est observée chez les patients infectés par les deux groupes TbD1. Les patients infectés par les souches du groupe TbD1+ avaient une réponse significative plus élevée en IL-17 que ceux infectés par les souches du groupe TbD1-. Ceci est en accord avec la différence significative de la réponse Th17 entre la lignée 4 et lignée 1, le groupe TbD1+ étant constitué par la lignée 1 et le groupe TbD1- par les 3 autres lignées incluant la lignée 4.

Une discordance des résultats a été ainsi observée quant à ces deux types d'analyses de la réponse immunitaire en fonction des différentes lignées de souches. Par l'analyse de la réponse en IFN- γ par la technique ELISPOT, la lignée 3 était plus virulente que la lignée 4 et l'inverse a été observé lors de l'analyse de la réponse immune en générale (réponse de types Th1, Th2 et Th17). Cette différence pourrait être due à plusieurs facteurs comme, par exemple, le mode différent de stimulations, les différents milieux de stimulations, les conditions de technique utilisées pour la stimulation,...(J.-L. Herrmann, N. Simonney et al. 2006; Chen, Bruns et al. 2010). La technique ELISPOT était utilisée pour la mesure de la réponse en IFN- γ des patients tuberculeux où les PBMC ont été stimulées par ESAT-6 et PPD et la méthode ELISA sur luminex a été adoptée pour le dosage des cytokines de types Th1, Th2 et Th17 produites dans le plasma après stimulation du sang total du patient par le PPD. Les PBMC sont des cellules mononucléées circulantes isolées à partir du sang total tandis que le sang total contient toutes les populations cellulaires (cellules mononucléées, polynucléées, globules rouges, plaquettes) ainsi que tous les éléments cellulaires indispensables à la viabilité cellulaire. Par ailleurs, les procédures de l'isolement des PBMC lors de l'ELISPOT peuvent également engendrer une perte de cellules lymphocytaires même lors de la culture, due à l'absence des éléments cellulaires du plasma essentiel au maintien de la viabilité cellulaire (Hodge, Hodge et al. 2000).

De point de vue pratique, la méthode de typage des SNPs par PCR Taqman est rapide, simple. De plus, elle s'est avérée sensible et spécifique dans de nombreuses études sur diverses espèces (Yesilkaya, Meacci et al. 2006; Nubel, Nitsche et al. 2012). Elle a l'avantage de permettre la classification des souches par la simple détection de la présence ou absence de SNPs dans le génome bactérien.

VI. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Notre étude a porté sur une nouvelle technique de typage, le typage des SNPs spécifiques des lignées de souches *M. tuberculosis*, au sein du laboratoire de mycobactéries à l'IPM en plus des autres techniques déjà adoptées comme la technique RFLP IS6110, le spoligotyping et l'analyse des MIRU-VNTR. La technique est simple et rapide permettant de détecter la présence ou l'absence du SNPs dans le génome bactérien et ainsi de classer les souches.

Le résultat du typage des SNPs a permis de confirmer que les 6 SNPs proposés (KatG 463, Rv 3804c, Rv 3221c, Rv 2952, Rv 0006, Rv 0934) étaient bien spécifiques des lignées majeures de *M. tuberculosis* et peuvent ainsi être utilisés lors d'une étude ou classification phylogénétique des souches de Madagascar car ils sont informatifs des lignées *M. tuberculosis*.

Par l'étude de l'association entre les lignées de souches et la réponse immune de l'hôte, la lignée 4 pourrait donc être plus virulente que la lignée 3 et associée à la diminution de la réponse immunitaire protectrice de l'hôte (taux de cytokines IFN- γ et IL-17 faible). Mais ces résultats doivent être confirmés par d'autres études et en particulier par la recherche de gènes ou de facteurs bactériens impliqués dans cette association.

Concernant les perspectives de cette étude :

- vu que le typage des SNPs a un pouvoir discriminatoire faible (les souches sont classées dans 4 clusters), il serait alors plus intéressant de le combiner avec une étude plus discriminante, l'analyse des *loci* MIRU-VNTR présentant un niveau de discrimination élevé afin d'affiner la classification en séparant les souches individuelles dans chaque lignée selon le profil MIRU-VNTR.
- Il serait aussi nécessaire de faire une étude plus poussée dans le but d'expliquer l'association entre la lignée de souches et la virulence.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aguilar Leon, D., M. J. Zumarraga, et al. (2009). "Mycobacterium bovis with different genotypes and from different hosts induce dissimilar immunopathological lesions in a mouse model of tuberculosis." *Clin Exp Immunol* **157**(1): 139-47.
- Allix, C., K. Walravens, et al. (2006). "Evaluation of the epidemiological relevance of variable-number tandem-repeat genotyping of *Mycobacterium bovis* and comparison of the method with IS6110 restriction fragment length polymorphism analysis and spoligotyping." *J Clin Microbiol* **44**(6): 1951-62.
- Baker, L., T. Brown, et al. (2004). "Silent nucleotide polymorphisms and a phylogeny for *Mycobacterium tuberculosis*." *Emerg Infect Dis* **10**(9): 1568-77.
- Borgdorff, M. W., H. Van Deutekom, et al. (2004). "*Mycobacterium tuberculosis*, Beijing genotype strains not associated with radiological presentation of pulmonary tuberculosis." *Tuberculosis (Edinb)* **84**(5): 337-40.
- Brosch, R., S. V. Gordon, et al. (2002). "A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(6): 3684-9.
- Brudey, K., J. R. Driscoll, et al. (2006). "*Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology." *BMC Microbiol* **6**: 23.
- Burman, W. J., E. E. Bliven, et al. (2009). "Relapse associated with active disease caused by Beijing strain of *Mycobacterium tuberculosis*." *Emerg Infect Dis* **15**(7): 1061-7.
- Caws, M., G. Thwaites, et al. (2008). "The influence of host and bacterial genotype on the development of disseminated disease with *Mycobacterium tuberculosis*." *PLoS Pathog* **4**(3): e1000034.
- Chacon-Salinas, R., J. Serafin-Lopez, et al. (2005). "Differential pattern of cytokine expression by macrophages infected in vitro with different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes." *Clin Exp Immunol* **140**(3): 443-9.
- Chen, J., A. H. Bruns, et al. (2010). "Comparative in vitro stimulation with lipopolysaccharide to study TNFalpha gene expression in fresh whole blood, fresh and frozen peripheral blood mononuclear cells." *J Immunol Methods* **357**(1-2): 33-7.
- Click, E. S., P. K. Moonan, et al. (2012). "Relationship between *Mycobacterium tuberculosis* phylogenetic lineage and clinical site of tuberculosis." *Clin Infect Dis* **54**(2): 211-9.
- Cole, S. T., R. Brosch, et al. (1998). "Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence." *Nature* **393**(6685): 537-44.
- Comas, I., S. Homolka, et al. (2009). "Genotyping of genetically monomorphic bacteria: DNA sequencing in *Mycobacterium tuberculosis* highlights the limitations of current methodologies." *PLoS One* **4**(11): e7815.
- Cooper, A. M., L. B. Adams, et al. (2002). "IFN-gamma and NO in mycobacterial disease: new jobs for old hands." *Trends Microbiol* **10**(5): 221-6.
- Dormans, J., M. Burger, et al. (2004). "Correlation of virulence, lung pathology, bacterial load and delayed type hypersensitivity responses after infection with different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes in a BALB/c mouse model." *Clin Exp Immunol* **137**(3): 460-8.
- Ferdinand, S., S. C. Christophe Sola, et al. (2005). "A study of spoligotyping-defined *Mycobacterium tuberculosis* clades in relation to the origin of peopling and the demographic history in Madagascar." *Infection, Genetics and Evolution* **5**: 340-348.
- Filliol, I., J. R. Driscoll, et al. (2002). "Global distribution of *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes." *Emerg Infect Dis* **8**(11): 1347-9.
- Filliol, I., A. S. Motiwala, et al. (2006). "Global phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* based on single nucleotide polymorphism (SNP) analysis: insights into tuberculosis evolution,

Références bibliographiques

- phylogenetic accuracy of other DNA fingerprinting systems, and recommendations for a minimal standard SNP set." *J Bacteriol* **188**(2): 759-72.
- Frothingham, R. and W. A. Meeker-O'Connell (1998). "Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats." *Microbiology* **144 (Pt 5)**: 1189-96.
- Gagneux, S., K. DeRiemer, et al. (2006). "Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(8): 2869-73.
- Gagneux, S. and P. M. Small (2007). "Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development." *Lancet Infect Dis* **7**(5): 328-37.
- Gangadharam, P. R. and A. J. Droubi (1981). "Identification of mycobacteria by smear examination of the culture." *Tuberclle* **62**(2): 123-7.
- Garcia de Viedma, D., G.Lorenzo, et al. (2005). "Association between the infectivity of *Mycobacterium tuberculosis* strains and their efficiency for extrarespiratory infection." *J Infect Dis*: 2059-2065.
- Golden, M. P. and H. R. Vikram (2005). "Extrapulmonary tuberculosis: an overview." *Am Fam Physician* **72**(9): 1761-8.
- Gori, A., A. Bandera, et al. (2005). "Spoligotyping and *Mycobacterium tuberculosis*." *Emerg Infect Dis* **11**(8): 1242-8.
- Goujon, C. P., V. M. Schneider, et al. (2000). "Phylogenetic analyses indicate an atypical nurse-to-patient transmission of human immunodeficiency virus type 1." *J Virol* **74**(6): 2525-32.
- Gutacker, M. M., B. Mathema, et al. (2006). "Single-nucleotide polymorphism-based population genetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains from 4 geographic sites." *J Infect Dis* **193**(1): 121-8.
- Hernandez Pando, R., D. Aguilar, et al. (2010). "Specific bacterial genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* cause extensive dissemination and brain infection in an experimental model." *Tuberculosis (Edinb)* **90**(4): 268-77.
- Hershberg, R., M. Lipatov, et al. (2008). "High functional diversity in *Mycobacterium tuberculosis* driven by genetic drift and human demography." *PLoS Biol* **6**(12): e311.
- Hodge, G., S. Hodge, et al. (2000). "Increased levels of apoptosis of leukocyte subsets in cultured PBMCs compared to whole blood as shown by Annexin V binding: relevance to cytokine production." *Cytokine* **12**(12): 1763-8.
- Ikutani, M., T. Yanagibashi, et al. (2011). "Identification of innate IL-5-producing cells and their role in lung eosinophil regulation and antitumor immunity." *J Immunol* **188**(2): 703-13.
- J.-L. Herrmann, N. Simonney, et al. (2006). "Avantages et limites des tests sanguins in vitro lymphocytes T/interféron gamma comparativement au test intradermique à la tuberculine pour le diagnostic de tuberculose." *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique* **46**: 543-547.
- Kamerbeek, J., L. Schouls, et al. (1997). "Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology." *J Clin Microbiol* **35**(4): 907-14.
- Kaufmann, S. H. (2002). "Protection against tuberculosis: cytokines, T cells, and macrophages." *Ann Rheum Dis* **61 Suppl 2**: ii54-8.
- Khader, S. A., G. K. Bell, et al. (2007). "IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge." *Nat Immunol* **8**(4): 369-77.
- Kong, Y., M. D. Cave, et al. (2005). "Distribution of insertion- and deletion-associated genetic polymorphisms among four *Mycobacterium tuberculosis* phospholipase C genes and associations with extrathoracic tuberculosis: a population-based study." *J Clin Microbiol* **43**(12): 6048-53.
- Kong, Y., M. D. Cave, et al. (2007). "Association between *Mycobacterium tuberculosis* Beijing/W lineage strain infection and extrathoracic tuberculosis: Insights from

Références bibliographiques

- epidemiologic and clinical characterization of the three principal genetic groups of *M. tuberculosis* clinical isolates." *J Clin Microbiol* **45**(2): 409-14.
- Krishnan, N., W. Malaga, et al.(2011) "Mycobacterium tuberculosis lineage influences innate immune response and virulence and is associated with distinct cell envelope lipid profiles." *PLoS One* **6**(9): e23870.
- Lari, N., L. Rindi, et al. (2009). "Association of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates of BOVIS and Central Asian (CAS) genotypic lineages with extrapulmonary disease." *Clin Microbiol Infect* **15**(6): 538-43.
- Lopez, B., D. Aguilar, et al. (2003). "A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes." *Clin Exp Immunol* **133**(1): 30-7.
- Malik, A. N. and P. Godfrey-Faussett (2005). "Effects of genetic variability of *Mycobacterium tuberculosis* strains on the presentation of disease." *Lancet Infect Dis* **5**(3): 174-83.
- Manca, C., L. Tsenova, et al. (1999). "*Mycobacterium tuberculosis* CDC1551 induces a more vigorous host response in vivo and in vitro, but is not more virulent than other clinical isolates." *J Immunol* **162**(11): 6740-6.
- Manca, C., L. Tsenova, et al. (2001). "Virulence of a *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolate in mice is determined by failure to induce Th1 type immunity and is associated with induction of IFN-alpha /beta." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(10): 5752-7.
- Marquina-Castillo, B., L. Garcia-Garcia, et al. (2009). "Virulence, immunopathology and transmissibility of selected strains of *Mycobacterium tuberculosis* in a murine model." *Immunology* **128**(1): 123-33.
- Mathema, B., N. E. Kurepina, et al. (2006). "Molecular epidemiology of tuberculosis: current insights." *Clin Microbiol Rev* **19**(4): 658-85.
- Mazars, E., S. Lesjean, et al. (2001). "High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(4): 1901-6.
- Middelkoop, K., L. G. Bekker, et al. (2009). "Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in a South African community with high HIV prevalence." *J Infect Dis* **200**(8): 1207-11.
- Mostowy, S., A. Onipede, et al. (2004). "Genomic analysis distinguishes *Mycobacterium africanum*." *J Clin Microbiol* **42**(8): 3594-9.
- Newton, S. M., R. J. Smith, et al. (2006). "A deletion defining a common Asian lineage of *Mycobacterium tuberculosis* associates with immune subversion." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(42): 15594-8.
- Nicol, M. P., C. Sola, et al. (2005). "Distribution of strain families of *Mycobacterium tuberculosis* causing pulmonary and extrapulmonary disease in hospitalized children in Cape Town, South Africa." *J Clin Microbiol* **43**(11): 5779-81.
- Nubel, U., A. Nitsche, et al. (2012). "Single-nucleotide polymorphism genotyping identifies a locally endemic clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *PLoS One* **7**(3): e32698.
- Peyron, P., J. Vaubourgeix, et al. (2008). "Foamy macrophages from tuberculous patients' granulomas constitute a nutrient-rich reservoir for *M. tuberculosis* persistence." *PLoS Pathog* **4**(11): e1000204.
- Portevin, D., S. Gagneux, et al. (2011). "Human macrophage responses to clinical isolates from the *Mycobacterium tuberculosis* complex discriminate between ancient and modern lineages." *PLoS Pathog* **7**(3): e1001307.
- Rakotosamimanana, N., V. Raharimanga, et al. (2010). "Variation in gamma interferon responses to different infecting strains of *Mycobacterium tuberculosis* in acid-fast bacillus smear-positive patients and household contacts in Antananarivo, Madagascar." *Clin Vaccine Immunol* **17**(7): 1094-103.

Références bibliographiques

- Rasolofo-Razanamparany, V., D. Ménard, et al. (1999). "Prevalence of *Mycobacterium bovis* in human pulmonary and extra-pulmonary tuberculosis in Madagascar." INT J TUBERC LUNG DIS **3**(7): 632–634.
- Rasolofo-Razanamparany, V., G. Auregan, et al. (1995). "Polymorphisme génétique des souches *M. tuberculosis* à Antananarivo." Arch Institut Pasteur de Madagascar **62**: 59-64
- Rasolofo-Razanamparany, V., H. Ramarokoto, et al. (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." J. Clin. Microbiol **39**: 1530-1535.
- Rasolofo-Razanamparany, V., R. Quirin, et al. (2005). "Usefulness of restriction fragment length polymorphism and spoligotyping for epidemiological studies of *Mycobacterium bovis* in Madagascar : Description of new genotypes." Veterinary Microbiology **114**: 115-122.
- Rasolofo-Razanamparanya, V., D. Ménarda, et al. (2000). "Transmission of tuberculosis in the prison of Antananarivo (Madagascar)." Res. Microbiol **151**: 785–795.
- Reed, M. B., P. Domenech, et al. (2004). "A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response." Nature **431**(7004): 84-7.
- Sinsimer, D., G. Huet, et al. (2008). "The phenolic glycolipid of *Mycobacterium tuberculosis* differentially modulates the early host cytokine response but does not in itself confer hypervirulence." Infect Immun **76**(7): 3027-36.
- Smith, I. (2003). "Mycobacterium tuberculosis pathogenesis and molecular determinants of virulence." Clin Microbiol Rev **16**(3): 463-96.
- Sohn, H., K. S. Lee, et al. (2009). "Induction of cell death in human macrophages by a highly virulent Korean Isolate of *Mycobacterium tuberculosis* and the virulent strain H37Rv." Scand J Immunol **69**(1): 43-50.
- Sola, C., I. Filliol, et al. (2001). "Spoligotype database of *Mycobacterium tuberculosis*: biogeographic distribution of shared types and epidemiologic and phylogenetic perspectives." Emerg Infect Dis **7**(3): 390-6.
- Sreevatsan, S., X. Pan, et al. (1997). "Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(18): 9869-74.
- Sun, Y. J., A. S. Lee, et al. (2006). "Association of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype with tuberculosis relapse in Singapore." Epidemiol Infect **134**(2): 329-32.
- Sun, Y. J., T. K. Lim, et al. (2006). "Tuberculosis associated with *Mycobacterium tuberculosis* Beijing and non-Beijing genotypes: a clinical and immunological comparison." BMC Infect Dis **6**: 105.
- Supply, P., C. Allix, et al. (2006). "Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*." J Clin Microbiol **44**(12): 4498-510.
- Supply, P., S. Lesjean, et al. (2001). "Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units." J Clin Microbiol **39**(10): 3563-71.
- Supply, P., J. Magdalena, et al. (1997). "Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component system operon." Mol Microbiol **26**(5): 991-1003.
- Supply, P., E. Mazars, et al. (2000). "Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome." Mol Microbiol **36**(3): 762-71.
- Tanveer, M., Z. Hasan, et al. (2009). "Reduced TNF-alpha and IFN-gamma responses to Central Asian strain 1 and Beijing isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in comparison with H37Rv strain." Trans R Soc Trop Med Hyg **103**(6): 581-7.
- Thierry, D., A. Brisson-Noel, et al. (1990). "Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis." J Clin Microbiol **28**(12): 2668-73.

Références bibliographiques

- Thwaites, G., M. Caws, et al. (2008). "Relationship between *Mycobacterium tuberculosis* genotype and the clinical phenotype of pulmonary and meningeal tuberculosis." *J Clin Microbiol* **46**(4): 1363-8.
- Tsenova, L., R. Harbacheuski, et al. (2007). "BCG vaccination confers poor protection against *M. tuberculosis* HN878-induced central nervous system disease." *Vaccine* **25**(28): 5126-32.
- Valway, S. E., M. P. Sanchez, et al. (1998). "An outbreak involving extensive transmission of a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis*." *N Engl J Med* **338**(10): 633-9.
- van Crevel, R., R. H. Nelwan, et al. (2001). "*Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains associated with febrile response to treatment." *Emerg Infect Dis* **7**(5): 880-3.
- van Embden, J. D., M. D. Cave, et al. (1993). "Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology." *J Clin Microbiol* **31**(2): 406-9.
- Wang, C., P. Peyron, et al. (2007). "Innate immune response to *Mycobacterium tuberculosis* Beijing and other genotypes." *PLoS One* **5**(10): e13594.
- WHO (2012). "Global Tuberculosis Report 2012." [HTM/TB/2012.6](#).
- Yesilkaya, H., F. Meacci, et al. (2006). "Evaluation of molecular-Beacon, TaqMan, and fluorescence resonance energy transfer probes for detection of antibiotic resistance-conferring single nucleotide polymorphisms in mixed *Mycobacterium tuberculosis* DNA extracts." *J Clin Microbiol* **44**(10): 3826-9.

ANNEXE**A. PREPARATION DES REACTIFS ET TAMPONS****1. Réactifs pour l'extraction d'ADN****- TE 10X (solution stock)**

Tris (hydroxyméthyl aminométhane) [Sigma, réf. T-1503]	1,211g
EDTA (éthylène diamine acide tétraacétique) [Sigma, réf. E-5134]	0,3722g
Eau distillée (ED) qsp	100ml

Le tampon est stérilisé à l'autoclave 120°C pendant 15 min et se conserve à température ambiante.

- TE 1X

TE 10X	50ml
ED qsp	500ml

- Lysozyme 10mg/ml

Lysozyme [Sigma, réf. L-6876]	10mg
ED qsp	1ml

La solution de lysozyme est distribuée en aliquote de 50µl et conservée à -20°C.

- SDS 10%

SDS (Sodium dodécyl sulfate) [Sigma, réf. L-4509]	10g
ED qsp	100ml

- Protéinase K 10 mg/ml

Protéinase K [Boehringer Mannheim, réf. 161497]	100mg
ED qsp.....	10ml

La solution de Protéinase K est distribuée par aliquotes de 50µl et est conservée à -20°C.

- Protéinase K 10mg/ml / SDS 10%

Protéinase K 10mg/ml	5µl
SDS 10%	70µl

- **NaCl 5M**

NaCl [Normapur, Prolabo, réf. 27810295]	29,2g
ED	80ml
ED qsp	100ml

La quantité NaCL est ajoutée dans l'ED et le volume est ajusté à 100ml par de l'ED. La solution est stérilisée à l'autoclave 120°C pendant 15 min et se conserve à température ambiante.

- **CTAB 10% /NaCl 0.7M**

NaCl [Normapur, Prolabo, réf. 27810295]	2,05g
ED qsp	40ml
CTAB (Bromure de cétyltriméthylammonium) [Merck, réf. 108130]	5g
ED qsp	50ml

Les deux réactifs sont préparés séparément et sont ensuite mélangés. Le mélange est conservé à température ambiante.

- **Chloroforme / Alcool isoamylique 1: 24**

Chloroforme [Carlo Erba, réf.438601]	96ml
Alcool isoamylique [Baker, réf. 8010]	4ml

- **Isopropanol [Rectapur, Prolabo, réf. 20839. 297]**

- **Ethanol 70%**

Ethanol [MERCK, réf.938]	70ml
ED qsp	100ml

2. Réactifs pour le dosage sur gel d'agarose (électrophorèse) :

- **Bleu 6X :**

Sucrose 40% [Sigma, réf. S-0389]	4g
Bleu de bromophénol [Sigma, réf. B-6131]	25mg
ED qsp	10ml

Le Bleu 6X est aliquoté et conservé à +4°C.

- **Marqueurs de taille λDNA (50ng/μl) :**

λDNA (500μg/ml) [SIGMA, Réf. D 9780]	10μl
TE 1X	157μl
Bleu 6X	33μl

Le λDNA se conserve à +4°C.

- **BET (Bromure d'éthidium) (10mg/ml) :**

Bromure d'éthidium [Sigma, réf. E-8751] 50mg

ED qsp 5ml

La solution de BET se conserve à +4°C.

- **TBE 10X (solution stock) :**

Tris [Sigma, réf. T-1378] 107,7g

Acide orthoborique [Normapur, Prolabo, réf. 20185.297] 55g

EDTA [Sigma, réf. E-5134] 9,3g

ED 800ml

ED qsp 1000ml

Le tris, l'Acide orthoborique et l'EDTA sont a la fois dissous dans 800µl d'ED, puis le volume est ajusté à 1000ml. Le tampon TBE 10X est stérilisé à l'autoclave 120°C pendant 15 min et conservé à température ambiante.

- **TBE 1X :**

TBE 10X 100ml

ED qsp 1000ml

- **Gel d'agarose 0,8% :**

Agarose [Gibco BRL, réf. 15510-027] 0,8g

TBE1X 100ml

BET 10mg/ml 5µl

3. Réactifs pour l'hybridation

- **Amorce 10mM**

Amorce 100mM [SIGMA ALDRICH] 5µl

ED qsp 45µl

Les amores sont conservées à -20°C

- **Sonde 10mM**

Sonde 100mM [APPLIED BIOSYSTEM] 5µl

ED qsp 45µl

Les sondes sont conservées à -20°C

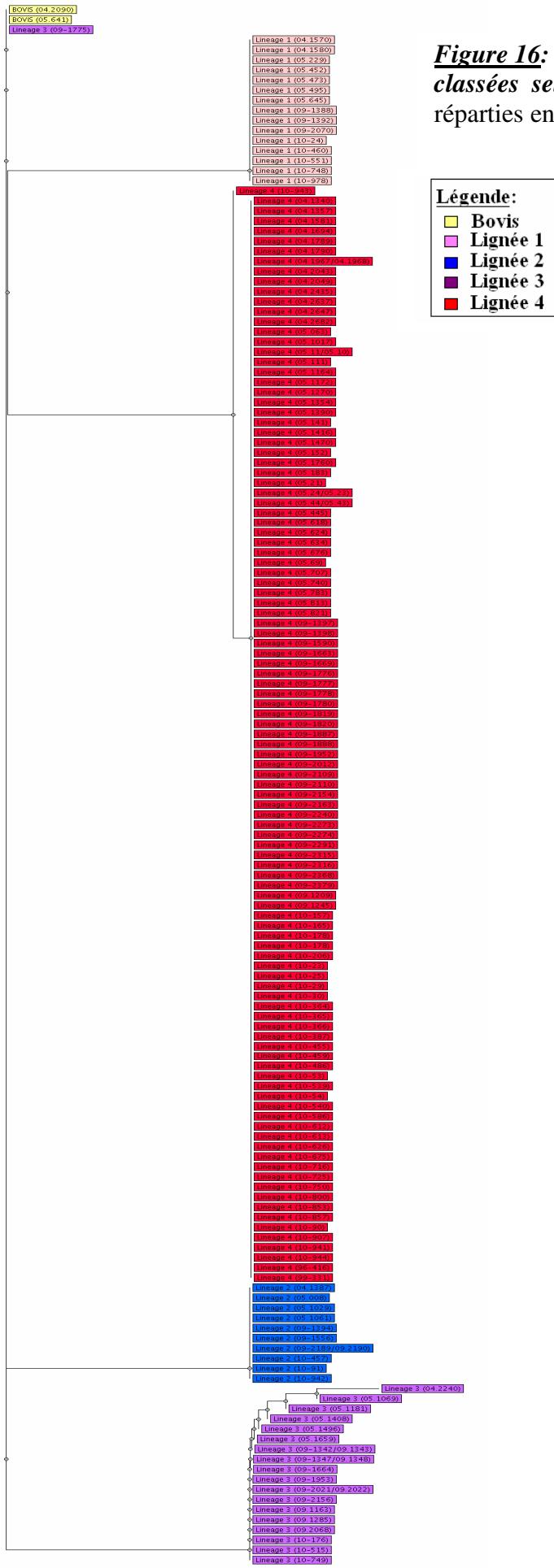


Figure 16: Dendrogramme des 155 souches classées selon le type de SNPs. Les souches sont réparties en 5 clusters ou lignées de souches.

ABSTRACT

Tuberculosis remains a major public health problem in Madagascar. It was observed that *M. tuberculosis* strains circulating in the country are highly polymorphic. Several SNPs have been proposed to classify strains of the *M. tuberculosis* complex in six distinct phylogenetic lineages. In addition, the genotypes of *M. tuberculosis* strains may be associated with the immune response of the human host. In this study, we investigated if an association exists between the phylogenetic lineage of *M. tuberculosis* strains circulating in Madagascar and the immune response in patients with Tuberculosis.

Specific SNPs for major lineages of *M. tuberculosis* (Lineages 1, 2, 3, and 4), Bovis, and TbD1 groups were analyzed to classify strains in *M. tuberculosis* lineages. The association between *M. tuberculosis* lineage and host immune response was determined by comparing the immune responses in patients with tuberculosis segregated by *M. tuberculosis* lineage and TbD1 groups of infecting strains. IFN- γ response induced after stimulation of PBMC with PPD and ESAT-6 from tuberculosis patients, and Th1, Th2 and Th17 responses after stimulation of whole blood with PPD were investigated.

The four major lineages of *M. tuberculosis* (Lineages 1, 2, 3 and 4) and *M. Bovis* lineage were found in 164 strains *M. tuberculosis* typed. Lineage 4 (Euro-American) was found predominant, corresponding to approximately 68% of the strains. By typing SNPs Rv0006_1842, strains were segregated into two TbD1 groups which group TbD1- includes strains of lineage 2, 3 and 4, and the group TbD1+ contains lineage 1 and Bovis. Patients infected the lineage 3 strains showed a higher Th1 response (IFN- γ and IL-2) than patients infected by strains from the lineage 4. Similarly, lineage 4 strains tended to induce a lower IL-17 than lineage 1 strains. Thus, lineage 4 strains may be more virulent than lineage 3 and might be associated with the reduction of the host protective immune response (lower levels of IFN- γ and IL-17)

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, Lineage, SNPs, virulence, polymorphism, immune response

RESUME

A Madagascar, la tuberculose demeure un problème majeur de santé et les souches *M. tuberculosis* circulant dans le pays semblent très diverses. Plusieurs SNPs ont été proposés pour classer les espèces du complexe *M. tuberculosis* en six groupes phylogénétiques. D'autre part, les génotypes des souches *M. tuberculosis* pourraient être associés à la variation de la réponse immunitaire de l'hôte humain. Dans cette étude, nous avons recherché une association entre la lignée phylogénétique des souches *M. tuberculosis* circulant à Madagascar et la réponse immune chez les patients tuberculeux.

Les SNPs spécifiques des 4 grandes lignées de *M. tuberculosis* (Lignées 1, 2, 3, et 4), de lignée *M. bovis* et le groupe TbD1 ont été analysés pour classer les souches *M. tuberculosis* en lignées *M. tuberculosis*. L'association entre la lignée *M. tuberculosis* et la réponse immune a été déterminée en comparant les réponses immunitaires des patients tuberculeux en fonction des lignées *M. tuberculosis* et les groupes TbD1 des souches infectantes. La réponse en IFN- γ induite après stimulation des PBMC par ESAT-6 et PPD, et les réponses de type Th1, Th2 et Th17 après stimulation du sang total par le PPD chez les patients tuberculeux ont été analysées.

Les 4 lignées majeures de *M. tuberculosis* (Lignées 1, 2, 3 et 4) ainsi que *M. bovis* ont été retrouvées sur 164 souches cliniques étudiées. La lignée 4 (Euro-américain) a été trouvée majoritaire, avec 68% des souches étudiées. Par le typage de SNPs Rv0006_1842, les souches ont été classées en deux groupes TbD1 dont le groupe TbD1- qui regroupe les souches de la lignée 2, 3 et 4, et le groupe TbD1+, la lignée 1 et *M. Bovis*. Les patients infectés par les souches de la lignée 3 présentaient une réponse de type Th1 plus forte (taux élevé d'IFN- γ et IL-2) que les patients infectés par les souches de la lignée 4. De même, la lignée 4 avait tendance à diminuer la réponse en IL-17 de l'hôte par rapport à la lignée 1. Ainsi, la lignée 4 pourrait être plus virulente que la lignée 3 et associée à la diminution de la réponse immunitaire protectrice de l'hôte (taux de cytokines IFN- γ et IL-17 faible).

Mots-clés : *Mycobacterium tuberculosis*, lignées, SNPs, virulence, réponse immunitaire, polymorphisme.