L'Université des Antilles et de la Guyane
Faculté des Sciences Exactes et Naturelles

Année 2011

N° attribué par la bibliothèque
/ / / / / / / / / / /

THESE

Pour obtenir le grade de docteur de l'Université des Antilles et de la Guyane,
Discipline : Sciences de la vie

Evaluation de marqueurs génétiques du complexe *Mycobacterium tuberculosis* combinée à l'utilisation d'outils bioinformatiques : apport en épidémiologie et phylogénie de la tuberculose

Présentée et soutenue publiquement le 7 juin 2011 par

Julie MILLET

JURY :

Président :	Professeur Thérèse MARIANNE-PEPIN
Rapporteur :	Professeur Isabel PORTUGAL
Rapporteur :	Docteur Philip SUPPLY
Examinateur :	Professeur Max LOUIS
Examinateur :	Docteur Antoine TALARMIN
Directeur de thèse :	Docteur Nalin RASTOGI

Remerciements

Je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté de prendre le temps de participer à l'examen de mon travail de thèse.

Un très grand merci à Nalin Rastogi, mon directeur de thèse et guru dans le bon sens du terme. Je salue son incroyable énergie contagieuse et bénéfique et sa motivation sans faille. Merci pour tout ce que j'ai pu apprendre de précieux durant ces années passées au sein de l'unité des mycobactéries.

Mes remerciements s'adressent aussi aux directeurs successifs de l'Institut Pasteur de la Guadeloupe, qui ont soutenu et ainsi contribué au bon déroulement de ce travail de thèse, Monsieur Jean-Louis Cartel, Monsieur Ronald Perraut et Dr. Antoine Talarmin.

Je suis très reconnaissante à l'ensemble des membres l'équipe de l'unité des mycobactéries pour tous les bons moments passés ensemble au laboratoire. Merci beaucoup à l'équipe actuelle : Docteur Thierry et Véronique Hill pour leur disponibilité, Mylène pour tous ces moments de partage, Fred pour ses chants tonitruants qui nous font rappeler que l'on est vivant et David pour tous les coups de pouce donnés ! Je n'oublie pas tous ceux qui, un temps, ont fait partie de notre quotidien avant de voguer sur d'autres mers … je pense tout particulièrement à Chdem, Jessica et Thomas.

A mes amis et collègues de l'Institut Pasteur de Guadeloupe, merci pour votre bonne humeur et pour tout ce que vous apportez de bon et de joyeux dans nos journées de travail passées ensemble. Je remercie tout spécialement Stéphanie G., Stéphanie B., Tony, Marie-Odile, et Jeannette pour leur soutien et leurs encouragements précieux.

A Pierre et Gaspard, les plus importants à mon monde, et leur amour infini. A mes parents, pour la beauté, la générosité de leur don.

Table des matières

Liste des abréviations 9

Liste des tableaux 10

Liste des figures 11

Introduction 13

1. La tuberculose dans le monde, un problème de santé publique 13
1.1. Epidémiologie globale de la maladie 13
1.2. Facteurs expliquant cette propagation et moyens de lutte 14
1.2.1. L'épidémie de VIH/Sida 14
1.2.2. L'émergence et la propagation de souches résistantes aux antituberculeux 15
1.2.3. Autres facteurs 15
1.3. Moyens de lutte 16
1.3.1. DOTS et Halte à la tuberculose 16
1.3.2. BCG 17
1.3.3. Traitements 18

2. Pathogenèse et évolution de la maladie 18
2.1. Agent responsable 18
2.2. La maladie 21

3. Diagnostic et traitement de la maladie 23
3.1. Démarche diagnostique 23
3.2. L'examen radiologique 24
3.3. L'intradermo-réaction à la tuberculine (Test de Mantoux) 24
3.4. Confirmation du diagnostic : l'examen bactériologique 25
3.4.1. L'examen direct 25
3.4.2. La culture 26
3.4.3. L'identification 26
3.4.4. Antibiogramme 28
3.5. Traitement 28
3.5.1. Chimio-prophylaxie 28
3.5.2. Traitement de la tuberculose maladie 30
3.5.3. Traitement de la tuberculose à bacilles résistants et multirésistants 30

4. Résistance et multirésistance aux antituberculeux 30
4.1. Mécanismes de résistance aux antibiotiques de première ligne 30
4.1.1. Isoniazide 30
4.1.2. Rifampicine 31
4.1.3. Éthambutol 31
4.1.4. Pyrazinamide 33

4.2. Mécanismes de résistance aux antibiotiques de deuxième ligne **33**
4.3. Détection des résistances aux antituberculeux de *M. tuberculosis* **34**

5. Marqueurs génétiques pour le typage moléculaire des isolats du complexe *M. tuberculosis* **35**
5.1. Le génome des souches du complexe M. tuberculosis **35**
5.2. Marqueurs génétiques pour le typage moléculaire des isolats du complexe *M. tuberculosis* **36**
5.2.1. Les séquences d'insertion 36
5.2.2. Les courtes séquences d'ADN répétées 36
5.2.2.1. Le locus DR 36
5.2.2.2. Les minisatellites 38
5.2.3. Régions de différence (RD) et Single Nucleotide Polymorphism (SNP) 40
5.3. Buts et applications du typage moléculaire **41**
5.3.1. Sélection de marqueurs moléculaires et propriétés requises 41
5.3.2. Structure de la population et évolution des souches du complexe M. tuberculosis 42
5.3.2.1. Structure de la population de souches du complexe *M. tuberculosis* 42
5.3.2.2. Evolution du complexe *M. tuberculosis* 45
5.3.3. Application du génotypage pour le suivi et la prise en charge des patients tuberculeux 46
5.3.3.1. Détermination des cas de transmission récente 47
5.3.3.2. Identification des cas de rechute et de réinfection 47
5.3.3.3. Résistance aux antituberculeux 48
5.3.3.4. Contaminations croisées au laboratoire 48

Intérêt et objectifs de notre recherche **51**

Matériel et Méthodes **55**

1. Génotypage **55**
1.1. Extraction d'ADN **56**
1.2. IS6110-RFLP **56**
1.2.1. Préparation de la sonde de détection de l'IS6110 56
1.2.2. Digestion de l'ADN génomique 56
1.2.3. Electrophorèse des produits de digestion 57
1.2.4. Transfert sur membrane (Southern Blot) 57
1.2.5. Hybridation et détection des IS 57
1.3. Spoligotypage **57**
1.3.1. Préparation de la membrane 58
1.3.2. L'amplification 59
1.3.3. L'hybridation 59
1.4. MIRU-VNTR **60**
1.4.1. Amplification 60
1.4.1.1. 5 ETR et 12 MIRU-VNTR 60
1.4.1.2. QUB 11a, 11b, 18, 26, 1451, 1895 et 4156 60
1.4.1.3. Mtub 04 et 21, 29 et 34, 30 et 39 60
1.4.2. Détermination du nombre de copies 62
1.5. Etude de la région NTF **62**

2. Exploitation des données épidémiologiques et des profils de génotypage obtenus **63**
2.1. Analyses statistiques **63**

2.2. Calcul du pouvoir de discrimination ou index de Hunter-Gaston (HGDI) 63
2.3. Calcul des taux de souches en grappes et de transmission récente 63
2.4. Les bases de données de génotypage du bacille tuberculeux : SpolDB4 et SITVIT2 64
2.4.1. Présentation générale 64
2.4.1.1. SpolDB4 64
2.4.1.2. SITVIT2 64
2.4.2. Entrée, analyse et exploitation des données 65
2.4.2.1. Entrée de données 65
2.4.2.2. Analyse et exploitation des données 65
2.4.3. Autres bases de données de génotypage 67
2.5. Arbres phylogénétiques 67

Chapitre I : Epidémiologie moléculaire 69

1. Epidémiologie classique et épidémiologie moléculaire 69
1.1. Epidémiologie classique 69
1.1.1 Prévalence 69
1.1.2. Taux d'incidence 70
1.1.3. Mortalité / Morbidité 70
1.2. Epidémiologie moléculaire 70
1.2.1. Principe 70
1.2.2. Définition d'une grappe 71
1.2.3. Taux de transmission récente et taux de souches en grappe 71
1.2.4. Dynamique de transmission de la tuberculose 72
1.2.5. Epidémiologie moléculaire et programmes de lutte contre la tuberculose 72

2. Le modèle des DFA : un modèle insulaire à faible incidence vs un modèle continental à forte incidence 73
2.1. L'étude de l'épidémie de 2004 à 2005 et apport des nouveaux marqueurs de typage (Article 1) 74
2.1.1. Présentation de l'étude 74
2.1.2. Résultats 75
2.1.2.1. Incidence 75
2.1.2.2. Sex-ratio et âge des patients 75
2.1.2.3. Pays d'origine et taux de co-infection VIH/tuberculose 76
2.1.2.4. Résistances aux antibiotiques 76
2.1.2.5. Profils de spoligotypage 76
2.1.2.6. Profils 12-locus MIRU-VNTR 77
2.1.2.7. Combinaison du spoligotypage et des profils 12-locus MIRU-VNTR 78
2.1.3. Conclusion et perspectives 81
2.2. Le suivi de l'épidémie de tuberculose en Guadeloupe (Articles 2 et 3) 82
2.2.1. Présentation de l'étude 82
2.2.2. Résultats 82
2.2.2.1. Sex-ratio, âge, origine et profils de résistance aux antituberculeux 82
2.2.2.2. Caractéristiques socio-économiques 83
2.2.2.3. Informations médicales et délais de prise en charge des patients 84
2.2.2.4. Génotypage 86
2.2.2.5. Facteurs de risque de transmettre la tuberculose 87
2.2.3. Conclusion et perspectives 89

3. Le modèle continental européen : cas d'un pays à faible endémicité (la Suède) (Article 4) **89**
3.1. Présentation de l'étude **89**
3.2. Résultats **90**
3.2.1. Origine des patients 90
3.2.2. Âge et sexe des patients 90
3.2.3. Manifestations cliniques de la maladie 91
3.2.4. Origine des patients, manifestations cliniques et profils de génotypage des souches 91
3.2.5. Résistance aux antituberculeux 95
3.3. Conclusion et perspectives **95**

Chapitre II : Marqueurs génétiques des souches de la famille Beijing **97**

1. Présentation de la famille Beijing **97**

2. Sélection de marqueurs génétiques pour une meilleure discrimination des souches de la famille Beijing **101**
2.1. Sélection de marqueurs génétiques pour les souches de la famille Beijing circulant au Japon (Article 5) **101**
2.1.1. Présentation de l'étude 101
2.1.2. Résultats 102
2.1.2.1. Données épidémiologiques et profils de résistance 102
2.1.2.2. Spoligotypage 103
2.1.2.3. Génotypage des souches n'appartenant pas à la famille Beijing 103
2.1.2.4. Génotypage des souches de la famille Beijing 105
2.1.3. Conclusion et perspectives 105
2.2. Sélection de marqueurs génétiques pour les souches de la famille Beijing circulant en Russie (Article 6) **106**
2.2.1. Présentation de l'étude 106
2.2.2. Résultats 107
2.2.2.1. Génotypage du premier échantillon de souches 107
2.2.2.2. Génotypage du deuxième échantillon de souches 107
2.2.3. Conclusion et perspectives 108

3. Structure de la population de souches de la famille Beijing au Japon **109**
3.1. Structure de la population de souches de la famille Beijing à Kobe basée sur 12-locus MIRU-VNTR **109**
3.2. Structure de la population de souches de la famille Beijing à Okinawa basée sur 12, 15 et 24-locus MIRU-VNTR (Article 7) **116**

Chapitre III : Une première étude de la biodiversité génotypique de la tuberculose dans la Caraïbe et les pays limitrophes **119**

1. La Caraïbe **119**
1.1. Présentation de l'espace caribéen **119**
1.2. Epidémiologie de la tuberculose dans la Caraïbe et en Amérique latine (Article 8) **123**
1.2.1. Présentation de l'étude 123
1.2.2. Résultats 123
1.2.2.1. Echantillons, culture, identification 123

1.2.2.2. Données démographiques, épidémiologiques et profils de résistance des isolats de *M. tuberculosis* 124
1.2.2.3. Génotypage 126
1.2.3. Conclusion et perspectives 128

2. Trinidad-et-Tobago **129**
2.1. Présentation de Trinidad-et-Tobago **129**
2.2. Etude de l'épidémie de tuberculose à Trinidad-et-Tobago (Articles 9 et 10) **130**
2.2.1. Présentation de l'étude 130
2.2.2. Résultats 131
2.2.2.1. Caractérisation des patients tuberculeux de Trinidad-et-Tobago. 131
2.2.2.2. Génotypage des isolats cliniques de Trinidad-et-Tobago 131
2.2.3. Conclusion et perspectives 134

Conclusion et perspectives **135**

Références bibliographiques **141**

Liste des abréviations

Français

ADN : Acide Désoxyribonucléique
AEC : Association des États de la Caraïbe
AMK : Amikacine
ARN : Acide Ribonucléique
BAAR : Bacilles Acido-Alcoolo Résistants
BCG : Bacille de Calmette et Guérin
BET : Bromure d'Ethidium
CD4+ : Cluster de différentiation 4 (Glycoprotéine)
CPM :Capreomycine
CSHPF : Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France
CTAB : cétyl-triméthyl-ammonium-bromide (N-cétyl-N,N,N,-triméthyl-ammonium bromide)
DFA : Départements Français d'Amérique
DMSO : Diméthylsulfoxyde
dNTP : Désoxyribonucléoside triphosphate
EDTA : Acide éthylène-diamine-tétra-acétique
EMB : Ethambutol
ETH : Ethionamide
FQ : Fluoroquinolone
IDR : Intradermoréaction
INH : Isoniazide
INSEE : Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques
IPG : Institut Pasteur de Guadeloupe
KM : Kanamycine
ODESSA : Observatoire Départemental Social et Sanitaire
OMS: Organisation Mondiale de la Santé
ORSaG : Observatoire Régional de la Santé de Guadeloupe
Pb : Paires de bases
PIB : Produit Intérieur Brut
PIT : Primo-infection Tuberculeuse
PZA : Pyrazinamide
RIF : Rifampicine
SM : Streptomycine
TB : Tuberculose
TBE : Tris-Borate-EDTA
UV : Ultra-Violets
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

Anglais

CAS : Central-Asian
DOTS : Directly Observed Treatment, Short-course
DR : Direct Repeat
EAI : East-African-Indian
ETR : Exact Tandem Repeat
Ipl : Insertion Preferential Locus
IS : Insertion Sequence
LAM : Latin-American-Mediterranean
LSP : Large Sequence Polymorphism
MAC : *M. avium-M. intracellulare* complex
MDR : MultiDrug-Resistant
MGIT : Mycobacteria Growth Indicator Tube
MLVA : Multiple Locus VNTR Analysis
MOTT : Mycobacteria Other Than Tuberculosis
MTbC : *Mycobacterium tuberculosis* Complex
NTM: Nontuberculous Mycobacteria
NTP: National Tuberculosis control Program
PCR : Polymerase Chain Reaction
PGG : Principal Genetic Group
QUB : Queen's University Belfast
RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism
TbD1: *M. tuberculosis* specific deletion 1
VNTR : Variable Number of Tandem Repeats
XDR : Extensively Drug-Resistant

Liste des tableaux

Tableau 1: Schémas thérapeutiques préconisés par l'OMS

Tableau 2: Gènes de résistance des bactéries du complexe *M. tuberculosis* et principales mutations identifiées

Tableau 3: Définition des trois Groupes Génétiques Principaux (PGG) selon le polymorphisme du codon 463 du gène *katG* et du codon 95 du gène *gyrA*

Tableau 4: Les 62 lignées identifiées par spoligotypage

Tableau 5 : Liste des marqueurs minisatellites (locus et nom) étudiés pour le génotypage de *M. tuberculosis*

Tableau 6: Grappes identifiées lors du génotypage des 54 isolats de *M. tuberculosis* collectés en Guadeloupe par combinaison du spoligotypage et des profils 12-locus MIRU-VNTR en 2004-2005

Tableau 7: Grappe identifiée lors du génotypage des 32 isolats de *M. tuberculosis* collectés en Martinique par combinaison du spoligotypage et des profils 12-locus MIRU-VNTR en 2004-2005

Tableau 8: Grappe identifiée lors du génotypage des 90 isolats de *M. tuberculosis* collectés en Guyane française par combinaison du spoligotypage et des profils 12-locus MIRU-VNTR en 2004-2005

Tableau 9: Grappe identifiée lors du génotypage des 176 isolats de *M. tuberculosis* collectés dans les trois DFA par combinaison du spoligotypage et des profils 12-locus MIRU-VNTR en 2004-2005

Tableau 10: Profils de spoligotypage obtenus pour les 129 isolats cliniques de *M. tuberculosis* de l'étude et comparaison avec la base de données SITVIT2

Tableau 11: Présentation des différents minisatellites et des combinaisons de locus utilisés pour l'étude des souches de *M. tuberculosis* isolées à Okinawa

Tableau 12: Évolution phylogénétique probable de spoligotypes dont les profils MIRU sont identiques

Tableau 13: Liste des 1002 souches de la famille Beijing sélectionnées dans SITVIT2 pour la réalisation du MST et leur origine géographique

Tableau 14: Profils de spoligotypage obtenus pour les 1255 souches de *M. tuberculosis* en grappe de Kobe

Tableau 15: Profils de spoligotypage obtenus pour les 136 souches de *M. tuberculosis* collectées à Okayama

Tableau 16: Profils de spoligotypage obtenus pour les 101 souches de *M. tuberculosis* collectées à Okinawa

Tableau 17: Diversités alléliques observées pour les souches de la famille Beijing par spoligotypage

Tableau 18: Données géographiques, démographiques et économiques concernant les 38 états et territoires composant l'espace caribéen

Liste des figures

Figure 1: Incidence de la tuberculose estimée par pays en 2009
Figure 2: Classification des mycobactéries
Figure 3: Mycobactéries du complexe *Mycobacterium tuberculosis* en microscopie électronique à balayage (MEB)
Figure 4: Formation et progression du granulome lors d'une infection à *M. tuberculosis*
Figure 5: Frottis faisant apparaître des BAARs par coloration à l'Auramine O (A) ou selon la méthode de Ziehl-Nelsen (B)
Figure 6: Le locus DR (*M. bovis* BCG**)**
Figure 7: Schéma représentant la position des 41 locus MIRU-VNTR décrits par P. Supply et al. (2000) [253] sur le chromosome de la souche de référence H37Rv de *M. tuberculosis*
Figure 8: Comparaison de quatre phylogénies globales de *M. tuberculosis* basées sur: (A) une combinaisons de sSNP tels que définie par Backer et al., 2004 [16] ; (B) les marqueurs LSP (Gagneux et al., 2006 [101]) ; (C) le polymorphisme nucléotidique du codon 493 du gène *katG* et du codon 95du gène *gyrA* (Sreevatsan et al., 1997 [240]), une combinaison de SNP telle que présentée par Filliol et al., 2006 [95]
Figure 9: Distribution phylogéographique des souches du complexe *M. tuberculosis*
Figure 10: Chemin évolutif des bacilles tuberculeux proposé par Roland Brosch et al. (2002) [33] basé sur la présence ou l'absence de régions de délétions et le polymorphisme de 5 gènes spécifiques
Figure 11: Représentation du chromosome de *M. tuberculosis* avec la localisation de trois principaux marqueurs de génotypage : les séquences d'insertion IS6110, le locus DR, et les minisatellites MIRU-VNTR (d'après Barnes et al., 2003 [18])
Figure 12: Étapes du spoligotypage mis au point par Kamerkeek et al. (1997) [144]
Figure 13: Etapes d'obtention de numérisation et d'exploitation des données de génotypage
Figure 14: Définition des délais de diagnostic de la tuberculose [90]
Figure 15 Sex-ratios observés à travers le monde pour tous les nouveaux cas de tuberculose à frottis positifs notifiés en 2007 d'après les chiffres publiés par l'OMS [201]
Figure 16a: Proportions de tuberculoses pulmonaires et extrapulmonaires (P/E ratio) observées par clade pour les patients originaires d'Europe et d'Afrique
Figure 16b: Proportions de tuberculoses pulmonaires et extrapulmonaires (P/E ratio) observées par clade pour les patients originaires du Moyen orient et d'Asie
Figure 17: Phylogénie des souches de la famille Beijing. La région de délétion RD105 définit la lignée « Est-Asiatique » au sein de laquelle la famille Beijing se caractérise par la délétion RD207, correspondant à la perte des espaceurs n°1 à 34 du locus DR
Figure 18: Schéma descriptif de la région NTF du génome de *M. tuberculosis* avec localisation des couples d'amorces utilisées (MDR-6 et MDR-7) pour l'amplification des sites potentiels d'insertion des séquences IS*6110* (d'après Plikaytis et al., 1994 [213])
Figure 19: Arbre décisionnel pour l'interprétation des résultats lors de l'amplification des sites potentiels d'insertion des séquences IS*6110* dans la région NTF du génome de *M. tuberculosis*
Figure 20: Localisation d'Okinawa dans l'archipel des Ryükyü au Japon
Figure 21: Carte du Japon
Figure 22: Distribution géographique des différents clades observés au Japon dans les villes de Kobe, d'Okayama et d'Okinawa
Figure 23: MST établi à partir des profils 12-locus MIRU-VNTR de 1002 souches de la famille Beijing
Figure 24: Les 38 états et territoires de l'espace Caraïbe
Figure 25: Localisation géographique de Trinidad et Tobago

Introduction

1. La tuberculose dans le monde, un problème de santé publique

1.1. Epidémiologie globale de la maladie

Elevée par l'OMS en 1993 au rang d'urgence mondiale, la tuberculose est, avec le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et le paludisme, l'une des premières causes mondiales de mortalité par maladie infectieuse. En 2009, le bacille tuberculeux, *Mycobacterium tuberculosis*, a été responsable de la mort de plus de 1,7 millions de personnes, soit 4700 décès par jour [296]. Cette même année, l'OMS a dénombré plus de 9,4 millions de nouveaux cas de tuberculose. La distribution mondiale des cas de tuberculose montre que la grande majorité d'entre eux survient en Asie (55%) et en Afrique (30%) ; l'Inde, la Chine, l'Afrique du Sud, le Nigéria, et l'Indonésie comptant à eux seuls près de la moitié des cas de tuberculose estimés en 2009 (4,7 millions ou 49,8% des cas ; Figure 1).

PAYS	INCIDENCE*
Inde	2000
Chine	1300
Afrique du sud	490
Nigéria	460
Indonésie	430
Pakistan	420
Bangladesh	360
Éthiopie	300
Philippines	260
RD du Congo	250
Myanmar	200
Vietnam	180
Russie	150
Kenya	120
Uganda	96
Mozambique	94
Thaïlande	93
Zimbabwe	93
Brésil	87
Tanzanie	80
Cambodge	65
Afghanistan	53

* Incidence estimée exprimée en nombre de cas en milliers [296]

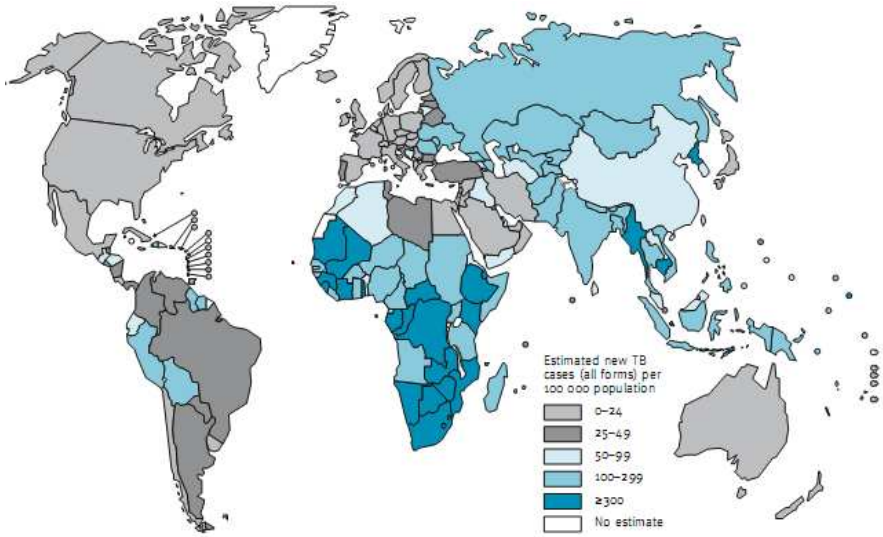


Figure 1 : Incidence de la tuberculose estimée par pays en 2009 [296]

En 2009, les taux de tuberculoses résistantes aux traitements antituberculeux sont les plus importants jamais rapportés avec 3,3% de souches multirésistantes (MDR) parmi les nouveaux cas de tuberculose, soit 440 000 cas, et un taux record de 28,3% de souches MDR atteint en Russie [296]; la tuberculose multirésistante se définissant comme une tuberculose résistant à l'isoniazide et à la rifampicine, les deux médicaments les plus importants utilisés pour le traitement de cette maladie. Quatre-vingt-six pourcent des souches MDR provenaient de 27 pays dont 15 pays européens [296] et l'OMS a par ailleurs estimé que 5,4% d'entre elles étaient extrêmement résistantes (XDR) ; la tuberculose XDR se définissant comme une tuberculose MDR résistant à une fluoroquinolone ainsi qu'à au moins un des trois antituberculeux de seconde intention injectables (capreomycine, kanamycine et amikacine).

1.2. Facteurs expliquant cette propagation et moyens de lutte

1.2.1. L'épidémie de VIH/Sida

L'épidémie de VIH/Sida a été à l'origine de la réémergence de la tuberculose dans les années 1980, notamment dans les pays africains [59, 81], l'infection par le VIH favorisant l'évolution d'une tuberculose latente en tuberculose maladie active et donc contagieuse, et *M. tuberculosis* stimulant les réplications du virus VIH et l'évolution naturelle du sida [59, 189]. De plus, les patients porteurs du VIH semblent présenter un risque accru d'être infectés et/ou réinfectés par une souche de *M. tuberculosis* par comparaison avec une tuberculose simple [64, 273, 274]. La co-infection VIH/ tuberculose est d'autant plus problématique que le diagnostic de la tuberculose par injection de dérivés de protéines purifiées (intradermoréaction) n'est pas fiable chez les patients porteurs du VIH dont le taux de lymphocytes T CD4+ est inférieur à 200/µl et que coexistent chez ces patients deux formes de tuberculose, pulmonaire et disséminée [189].

Enfin, l'existence d'interactions médicamenteuses entre les traitements utilisés contre ces deux maladies, notamment entre la rifampicine, antituberculeux majeur, et de nombreux antirétroviraux, vient compliquer le traitement de ces patients [241]. Actuellement, l'augmentation du nombre de cas de co-infection VIH/tuberculose aggrave considérablement la situation de la tuberculose dans le monde en favorisant notamment l'émergence et la circulation de bacilles tuberculeux MDR. On estime qu'en 2009 12% des nouveaux cas de tuberculose (soit 1,1 millions de cas) étaient VIH-positifs, majoritairement localisés en Afrique (80%) [296].

1.2.2. L'émergence et la propagation de souches résistantes aux antituberculeux

Parmi les facteurs ayant favorisé l'épidémie actuelle de tuberculose, l'apparition puis la circulation de bacilles tuberculeux résistants aux traitements médicamenteux a joué un rôle important. Les facteurs pouvant expliquer l'émergence et la propagation des souches résistantes sont l'utilisation de traitements inappropriés, la mauvaise observance de ces traitements ou encore l'utilisation de médicaments de mauvaise qualité [302]. Peu de temps après la découverte et l'utilisation des premiers antituberculeux, des cas de tuberculoses résistantes ont été décrits conduisant à la mise en place de traitements basés sur l'association de plusieurs molécules.

Malgré cette mesure, et du fait de la réémergence des cas de tuberculose dans les années 1980, la proportion de souches résistantes est de nos jours un problème majeur dans la lutte contre la maladie. En effet, l'incidence moyenne mondiale des souches résistantes à au moins un antituberculeux est estimée à 11,1% et varie de 0% en Islande à 22,3% en Azerbaïdjan [305]. Les souches MDR sont plus complexes à traiter et nécessitent des traitements plus longs (jusqu'à 2 ans), plus onéreux (jusqu'à 100 fois le prix d'un traitement d'une souche sensible) et d'efficacité réduite par comparaison aux souches sensibles (http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/fr/print.html).

On estime ainsi que les patients infectés par une souche MDR ont un risque plus élevé de mourir de leur tuberculose que ceux porteurs d'une souche sensible aux antituberculeux, des taux de guérisons variant de 11% à 60% ayant été décrits pour des tuberculoses MDR contre 63% à 90% de guérison pour des tuberculoses déclarées comme sensibles [84].

1.2.3. Autres facteurs

L'accroissement démographique, l'augmentation de la pauvreté, le manque d'accès aux soins, le manque de moyens financiers, logistiques et humains, l'absence ou la désorganisation des programmes de contrôle de la maladie, le désengagement des pouvoirs publics sont autant de facteurs qui ont contribué à la transmission et à la propagation de la tuberculose dans le monde et dont certains figurent parmi le plan de lutte « Halte à la tuberculose » mis en place par l'OMS.

1.3. Moyens de lutte

1.3.1. DOTS et Halte à la tuberculose

En 1995, soit 2 ans après avoir reconnu la tuberculose comme urgence mondiale, et devant l'ampleur de l'épidémie, l'OMS met en place une stratégie de lutte contre la tuberculose reposant sur le traitement chimio-prophylactique standardisé de courte durée des patients ou stratégie DOTS (Directly Observed Treatment, Short-course). Les objectifs principaux annoncés de ce plan de lutte étaient la détection de 70% des cas de tuberculose maladie et la guérison de 85% d'entre eux d'ici l'an 2000 lequel reposait sur 5 principes :

- L'engagement des gouvernements et des pouvoirs public
- Un dépistage de qualité reposant sur l'examen direct de frottis
- Un traitement normalisé des patients avec surveillance directe de la prise du traitement
- L'approvisionnement ininterrompu en antituberculeux de qualité
- Le suivi et l'évaluation des effets de la mise en place du programme DOTS

En 2001, après des résultats encourageants obtenus avec la stratégie DOTS mais face à la dégradation de la situation épidémique dans certains pays d'Afrique et d'Europe de l'est notamment, l'OMS décide de renforcer la stratégie DOTS et lance le plan mondial « halte à la tuberculose » visant « un monde sans tuberculose » et dont l'objectif principal est de réduire drastiquement l'incidence de la maladie dans le monde d'ici 2015. La tuberculose sera considérée comme éradiquée lorsque son incidence passera en dessous du seuil de un cas pour 1 000 000 d'habitants par an [303]. Ainsi, le programme propose de lutter contre les principaux facteurs favorisant la propagation de la maladie et s'organise en six lignes directrices:

- Poursuivre l'extension du programme DOTS,
- Lutter contre les cas de co-infection tuberculose/VIH et les tuberculoses multirésistantes aux traitements médicamenteux,
- Contribuer au renforcement des systèmes de santé
- Impliquer l'ensemble des soignants
- Donner des moyens d'agir aux malades et aux communautés,
- Renforcer la recherche

Enfin, la tuberculose est une maladie sociale reflétant souvent la dégradation des conditions de vie d'une population. De ce fait, une étude récente a suggéré que les plans de lutte contre cette épidémie intègrent aussi, et c'est là une difficulté, la lutte contre les facteurs de risque de contracter et de développer la

maladie, incluant les conditions de vie et de travail dégradées, la malnutrition, le tabac, le diabète, l'alcoolisme, et la pollution de l'air [59, 164].

1.3.2. BCG

Mis au point entre les années 1908 et 1921, le vaccin préparé à partir du Bacille de Calmette et Guérin (BCG) est, encore actuellement, le seul disponible contre la tuberculose humaine. La vaccination par le BCG consiste à injecter par voie intradermique des bacilles tuberculeux bovins atténués par 230 passages successifs sur un milieu à base de pomme de terre glycérinée, de manière à stimuler une réaction immunitaire à médiation cellulaire et humorale de l'organisme sans pour autant provoquer la maladie [3]. Injecté dès la naissance ou pendant l'enfance, il protège l'individu pendant 50 à 60 ans mais avec une efficacité décroissante au cours du temps et extrêmement variable selon la zone géographique considérée et la localisation de la maladie [10, 14].

Le vaccin BCG confère une meilleure protection contre les formes graves de tuberculose (milliaire, extrapulmonaire ou méningée) que contre les formes pulmonaires. Il n'empêche pas la survenue d'une primo-infection tuberculeuse, et encore moins la réactivation d'une tuberculose pulmonaire latente. Son effet sur la transmission du bacille tuberculeux est par conséquent limité. Néanmoins l'OMS maintient ses recommandations concernant la vaccination systématique des enfants dès la naissance dans les pays à forte prévalence de tuberculose du fait de l'effet protecteur avéré du vaccin BCG contre la méningite tuberculeuse et la tuberculose disséminée chez l'enfant [292].

En France, depuis juillet 2007 et sur avis du Comité Supérieur d'Hygiène Publique de France (CSHPF) du 9 mars 2007, la vaccination des enfants et adolescents par le vaccin BCG n'est plus obligatoire mais reste fortement recommandée pour les enfants les plus exposés et répondant à au moins l'un des critères suivants (http://www.sante.gouv.fr/vaccinations-par-le-bcg-nouvelles-recommandations.html) :

- enfant né dans un pays de forte endémie de tuberculose (selon les chiffres publiés par l'OMS),
- enfant dont au moins l'un des parents est originaire de l'un de ces pays,
- enfant devant séjourner au moins un mois d'affilée dans l'un de ces pays,
- enfant ayant des antécédents familiaux de tuberculose,
- enfant résidant en Île-de-France ou en Guyane française,
- enfant dans toute situation jugée par le médecin à risque d'exposition au bacille tuberculeux notamment enfants vivant dans des conditions de logement défavorables (habitat précaire ou surpeuplé) ou en contact régulier avec des adultes originaires d'un pays de forte endémie.

1.3.3. Traitements

Les objectifs principaux du traitement par chimiothérapie de la tuberculose sont :

- de guérir le malade,
- d'éviter qu'il ne décède d'une tuberculose évolutive ou de ses effets tardifs,
- d'éviter les rechutes,
- de réduire la transmission de la tuberculose à d'autres personnes,
- d'éviter l'apparition d'une résistance acquise aux antituberculeux.

Pour atteindre ces objectifs, le traitement de la tuberculose repose sur l'association de plusieurs antibiotiques antituberculeux, les principaux étant l'isoniazide (INH), la rifampicine (RIF), la pyrazinamide (PZA), l'éthambutol (EMB), et la streptomycine (SM). L'association de plusieurs antituberculeux permet en effet de réunir 3 propriétés essentielles au traitement : un effet bactéricide (INH, RIF, PZA, SM), un effet stérilisant (RIF) et la capacité de prévenir l'apparition d'une résistance [298].
L'OMS a par ailleurs défini des schémas thérapeutiques normalisés adaptés en fonction du type de tuberculose rencontré mais aussi en fonction des systèmes de santé des pays qui auront à les appliquer et de leurs moyens financiers disponibles. Ces schémas normalisés présentent l'avantage de :

- réduire le risque d'erreur de prescription et par conséquent, celui de l'apparition d'une pharmacorésistance,
- faciliter l'estimation des besoins en médicaments ainsi que l'achat, la distribution et la surveillance des médicaments,
- simplifier la formation du personnel,
- réduire les coûts,
- favoriser un approvisionnement régulier en médicaments lorsque des patients se déplacent d'une région à une autre.

2. Pathogenèse et évolution de la maladie

2.1. Agent responsable

L'histoire de la tuberculose est étroitement liée à celle de l'homme puisque la maladie est déjà mentionnée par les textes des médecines grecque, chinoise, égyptienne et indienne plus de 2000 ans auparavant [65, 66]. Trois formes principales de tuberculose ont été identifiées par les historiens : le « mal de Pott » dont les séquelles caractéristiques au niveau des vertèbres ont été retrouvées chez des momies en Egypte, les

scrofules correspondant à des ganglions infectés au niveau du cou avec écoulement de pus, mentionnés dans des textes du Moyen Âge, et la tuberculose pulmonaire dont l'épidémie commença au XVII^{ème} siècle pour devenir la principale cause de décès chez les adultes au XVIII^{ème}. La maladie actuellement appelée tuberculose pulmonaire portait au XVII^{ème} et XVIII^{ème} siècle les noms de phtisie pulmonaire ou de consomption, les deux appellations, d'origine grecque et latine respectivement, signifiant un amaigrissement excessif, un décharnement.

Au cours du temps, différentes théories ont été émises pour expliquer la survenue d'une phtisie pulmonaire dont l'une supposait déjà dès le XVI^{ème} siècle le caractère contagieux de la maladie. Ainsi, la tuberculose pulmonaire était une maladie à déclaration obligatoire à Venise à partir du milieu du XVIII^{ème} siècle. Une autre théorie impliquait la faible nature, l'état maladif, les dispositions héréditaires, les comportements des patients tuberculeux mais aussi le climat dans le processus d'apparition de la tuberculose pulmonaire. Ce n'est finalement qu'en 1882, que le microbiologiste allemand Hermann Heinrich Robert Koch mit en évidence le lien existant entre la tuberculose humaine et l'agent pathogène *Mycobacterium tuberculosis* qu'il nomme alors bacille de Koch (BK) [65, 66].

Selon la classification actuelle, le genre *Mycobacterium* appartient à la famille des *Mycobacteriaceae*, de l'ordre des *Actinomycetales* [105]. Ce genre regroupe plus de 120 espèces différentes [263], classées en mycobactéries atypiques (ou mycobactéries non tuberculeuses) ou en mycobactéries du complexe *Mycobacterium tuberculosis* (MTbC) (Figure 2). De nouvelles espèces sont identifiées chaque année : entre 2003 et 2006, plus de 30 nouvelles espèces ont été décrites [263]. Les mycobactéries atypiques, si elles ne sont généralement pas pathogènes pour l'homme, peuvent être sources d'infections chez les personnes immunodéprimées. Elles se différencient du MTbC par leur moindre virulence et l'absence de transmission d'homme à homme. Une distinction particulière est cependant faite pour *M. leprae*, et *M. ulcerans*, responsables respectivement de la lèpre et de l'ulcère de Buruli, puisque tout en étant pathogènes elles n'appartiennent pas au MTbC.

La tuberculose chez l'homme est causée par les mycobactéries du MTbC, principalement par *M. tuberculosis* mais aussi par *M. africanum* et *M. bovis*. Les cas de tuberculose à *M. africanum* sont quasi-exclusivement répertoriés en Afrique de l'ouest où ils peuvent représenter plus de la moitié des cas [27, 71, 72, 73, 74, 119, 181]. *M. bovis* est responsable de la tuberculose bovine et peut contaminer d'autres mammifères (chèvres, moutons, chiens, chats, …) ainsi que l'homme [15, 75, 205]. Parmi les autres sous-espèces du MTbC, *M. caprae*, *M. microti* et *M. pinnipedii* ont été isolés respectivement chez les caprins [13, 155], les rongeurs [47] et les mammifères marins [60], mais leur spécificité pour un hôte défini n'est que relative puisque des souches de ces sous-espèces ont été isolées chez certains autres mammifères, ainsi que chez l'homme [159, 202, 215, 280]. Enfin, *M. canettii*, est une sous-espèce très rare, majoritairement isolée chez des patients originaires ou ayant séjourné en Afrique de l'est [277]. En 2002, une nouvelle

classification des sous-espèces du MTbC proposée par Brosch et al., place *M. canetti* en position ancestrale, proche de l'ancêtre commun du complexe [33].

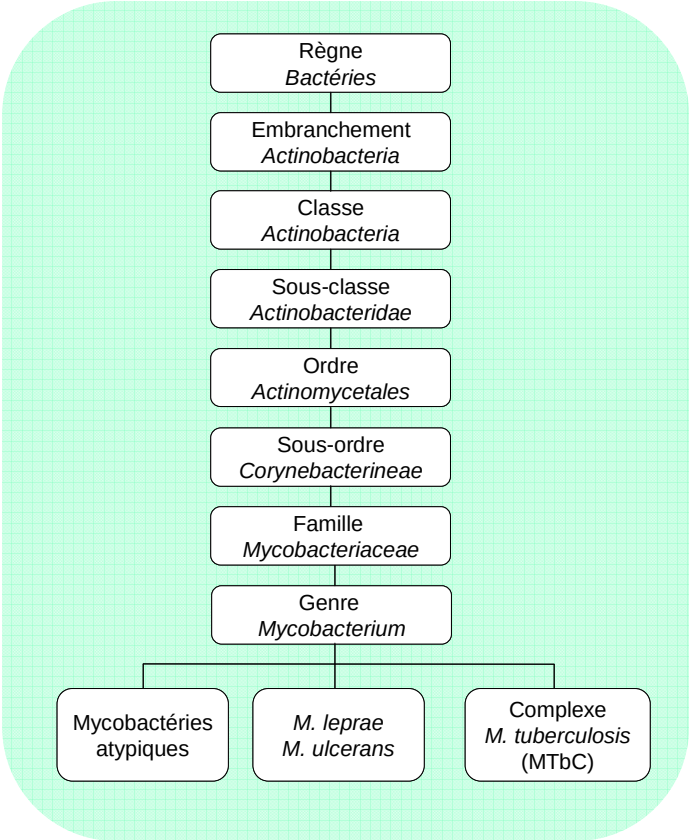


Figure 2 : Classification des mycobactéries

Les bactéries du genre *Mycobacterium* sont aérobies strictes, non sporulantes, et non motiles, en forme de bâtonnet ou légèrement incurvées (Figure 3). Elles se caractérisent par leur acido-alcoolo-résistance, la composition en acides mycoliques de leur paroi cellulaire ainsi que la proportion de cytosine et guanine de leur génome (de 61 à 71% du génome chez toutes les mycobactéries à l'exception de *M. leprae*). D'une taille comprise entre 2 à 5 µm sur 0,3 à 0,5 µm, elles fixent difficilement la coloration de Gram et sont considérées par défaut comme bactéries Gram positives.

Source: http://phototheque.pasteur.fr (Mary Jackson et Stéphanie Guadagnini, Microscopie ultrastructurale, 2004)

Figure 3: Mycobactéries du complexe *M. tuberculosis* en microscopie électronique à balayage (MEB)

2.2. La maladie

La tuberculose est une maladie contagieuse dont la transmission est interhumaine et se fait par voie aérienne. Les poumons sont à la fois la porte d'entrée des bacilles tuberculeux et l'organe de prédilection pour le développement de la maladie. La contamination se fait par inhalation de gouttelettes infectantes, ou gouttelettes de Flügge, de taille inférieure à 5 µl, émises sous forme d'aérosol par un patient contaminé lorsque celui-ci tousse, crache ou éternue.

Si les quelques bacilles contenus dans ces gouttelettes parviennent au niveau des alvéoles pulmonaires, ils peuvent alors se multiplier et être à l'origine d'une primo-infection tuberculeuse (PIT). Lors d'une PIT, les bacilles tuberculeux ayant atteint les alvéoles pulmonaires sont phagocytés par des macrophages dans lesquels ils vont survivre et pouvoir se multiplier. Après quelques jours de multiplication, les macrophages migrent passivement vers les ganglions satellites du foyer primaire par les vaisseaux lymphatiques. Il y a alors dissémination des bacilles tuberculeux dans l'organisme et activation des lymphocytes T. Une immunité cellulaire retardée se développe, perceptible par le test cutané à la tuberculine ou intradermoréaction (IDR). Au niveau des alvéoles pulmonaires, il se forme alors un granulome ou tubercule constitué d'un noyau de macrophages infectés dégénérés (épithélioïdes) ou fusionnés, entouré de lymphocytes T et d'une couronne fibroblastique [225] (Figure 4). Au centre du granulome, contenant des bacilles tuberculeux quiescents, il peut apparaître une nécrose riche en lipides ou caséum. Cette lésion n'est généralement pas repérable cliniquement (asymptomatique) ou par radiographie mais peut néanmoins être détectée par IDR.

Pour les patients immunocompétents, on estime que dans 5% des cas, la PIT peut évoluer en tuberculose maladie ou tuberculose patente dans les 2 ans qui suivent la primo-infection et que dans 5 autres pourcents, cette évolution ne se fera que plusieurs années plus tard [9, 80]. De nombreux facteurs influencent cette transition tels que l'âge du patient infecté (enfants de moins de 15 ans et personnes âgées) ou son statut immunitaire (personnes immunodéprimées) [193]. Chez des patients immunodéprimés, cette évolution est beaucoup plus fréquente puisqu'on estime que 50% des patients immunodéprimés infectés par *M. tuberculosis* développeront une tuberculose maladie dans les deux ans suivant leur infection [9]. De plus, il a été montré qu'un taux de 5 à 10% des patients porteurs d'une tuberculose latente et contractant le VIH développent une tuberculose maladie par an [52, 80], soulignant ainsi la complexité de l'association existant entre le VIH et *M. tuberculosis*. Certains autres facteurs, liés aux conditions de vie et aux pratiques addictives des patients infectés, peuvent favoriser cette transition, tels que la malnutrition, l'alcoolisme, le tabagisme, la précarité, la toxicomanie, ou le diabète [9]. Enfin, la charge bactérienne, la pathogénicité et la virulence de la population bactérienne, et les facteurs génétiques de susceptibilité de l'hôte pourraient aussi intervenir dans l'évolution de la primo-infection à la tuberculose maladie [153].

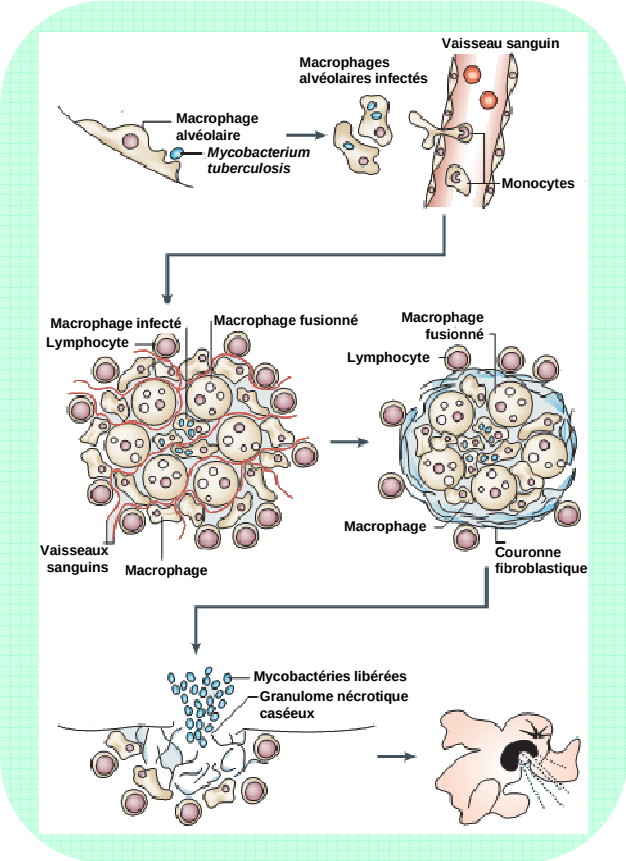


Figure 4: Formation et progression du granulome lors d'une infection à *M. tuberculosis* (d'après Russel, 2007 [225])

Lors de la transition de la tuberculose latente en tuberculose pulmonaire, il y a évolution du granulome par liquéfaction du caséum et création d'une cavité très riche en bacilles tuberculeux viables. Les bacilles retrouvent des conditions favorables à leur évolution (présence d'oxygène), et reprennent leur multiplication. Ils envahissent alors l'ensemble des bronches entraînant une réaction inflammatoire intense provoquant toux et expectoration chronique. C'est à ce stade que le patient est le plus contagieux [148]. Après dissémination via la circulation sanguine et lymphatique de bacilles tuberculeux, ceux-ci peuvent se développer et provoquer des lésions dans de nombreux autres organes tels que les os (mal de Pott), les méninges (méningite tuberculeuse), les reins, etc. On parle alors de tuberculose extra-pulmonaire.

3. Diagnostic et traitement de la maladie

La suspicion d'une tuberculose chez un patient, suite à l'altération générale de son état de santé ou dans le cadre d'un contexte épidémiologique favorable, conduira à la mise en place d'une démarche diagnostique, à la réalisation d'examens cliniques et bactériologiques puis, dans un certain nombre de cas, à la mise sous traitement du patient.

En France, la tuberculose est une maladie à déclaration obligatoire, ainsi les cas probables ou confirmés de tuberculose maladie chez l'adulte ainsi que les cas d'infection tuberculeuse chez l'enfant de moins de 15 ans devront être notifiés (http://www.invs.sante.fr/surveillance/tuberculose/index.htm).

3.1. Démarche diagnostique

Le diagnostic d'une tuberculose doit être évoqué lors d'une situation épidémique favorable ou en présence d'une personne présentant des signes généraux évocateurs de la maladie. Ainsi, le diagnostic de tuberculose sera privilégié pour les personnes en provenance d'une zone à forte prévalence de tuberculose, infectées par le VIH, ou encore sous traitement immunosuppresseur, ainsi que celles vivant dans l'entourage d'un patient tuberculeux. Néanmoins, quel que soit le contexte épidémiologique, l'altération de l'état général d'une personne avec perte de poids, asthénie, et fièvre modérée doit orienter le diagnostic vers une tuberculose, surtout si l'ensemble de ces signes persiste au-delà de trois semaines. Ces signes généraux peuvent aussi s'accompagner de manifestations respiratoires telles qu'une toux persistante et de plus en plus fréquente, une hémoptysie ou encore une dyspnée [58].

Dans le cas d'une tuberculose latente, celle-ci ne s'accompagne généralement ni de symptômes, ni de signes cliniques, ni de signes radiologiques. Son diagnostic s'effectue le plus souvent dans le cadre d'un

contexte épidémiologique favorable (arrivée en provenance d'une pays à forte endémicité de tuberculose, personnes infectées par le VIH, …) ou d'une enquête de dépistage effectuée dans l'entourage d'un patient ayant une tuberculose avérée, et repose essentiellement sur l'intradermo-réaction (IDR) ou test de Mantoux. Plus récemment, des tests basés sur la détection in vitro du taux d'interféron gamma après stimulation des lymphocytes T par des antigènes de *M. tuberculosis* ont été développés, tels que T-SPOT.TB® test (Oxford Immunotec Ltd) ou encore QuantiFERON®-TB GOLD (Cellestis Ltd).

Pour une tuberculose maladie, les signes cliniques viennent orienter le diagnostic, qui repose alors sur la radiographie des poumons, et sera confirmée par des examens bactériologiques.

3.2. L'examen radiologique

La radiographie pulmonaire permet d'établir le bilan initial des lésions thoraciques pouvant être de morphologie et d'étendue variable, sans rapport avec l'intensité de la maladie. On retrouve trois types de lésions élémentaires : le nodule, l'infiltrat et la caverne.

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

3.3. L'intradermo-réaction à la tuberculine (Test de Mantoux)

L'intradermo-réaction (IDR) à la tuberculine est une réaction cutanée d'hypersensibilité retardée provoquée par l'afflux de lymphocytes T et de macrophages au niveau du site d'injection intradermique de tuberculine (antigènes mycobactériens). Cette réaction témoigne de l'existence d'une immunité à médiation cellulaire vis-à-vis des mycobactéries chez le patient, induite soit par une vaccination préalable par le BCG, soit par un contact antérieur avec le BK ou certaines mycobactéries atypiques.

L'IDR consiste à injecter 0,10 ml de solution liquide de tuberculine dans le derme de la face antérieure de l'avant bras et à mesurer le diamètre de l'induration induite après 72 heures. Le test sera positif si ce diamètre est supérieur à 5 mm et très positif s'il est supérieur à 10 mm. Dans ce deuxième cas, il y aura présomption de tuberculose maladie.

On parle de virage tuberculinique si à quelques mois d'intervalle (2 à 3 mois) le résultat de l'IDR initialement négatif (<5 mm) ou faiblement positif (entre 5 et 9 mm) devient positif (>10 mm). Ce cas de figure se rencontre généralement lors d'enquête autour d'un cas de tuberculose, et correspond alors à un cas d'infection récente.

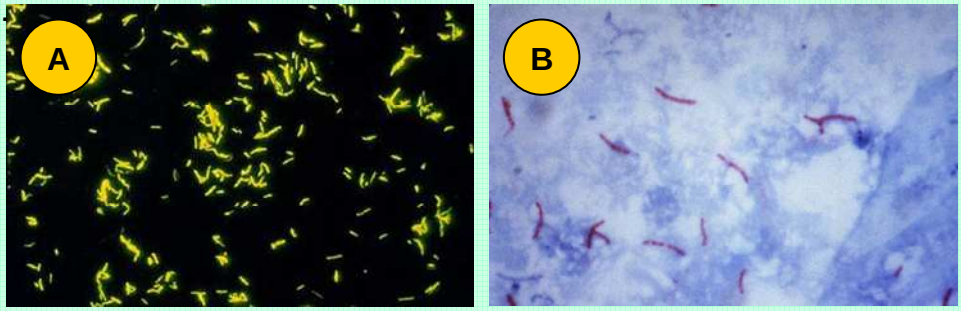
Il peut cependant arriver que l'IDR reste négative même en cas de tuberculose maladie. C'est le cas chez les personnes âgées, immunodéprimées et les patients porteurs du VIH.

3.4. Confirmation du diagnostic : l'examen bactériologique

La mise en évidence de la présence de *M. tuberculosis* dans des prélèvements biologiques constitue le véritable diagnostic de tuberculose. En cas de tuberculose pulmonaire, les examens bactériologiques seront pratiqués avant tout traitement sur l'expectoration du malade trois jours de suite. Ils peuvent aussi être pratiqués sur des tubages gastriques (sécrétions bronchiques dégluties) ou des aspirations bronchiques. Pour les patients chez lesquels une localisation extra-pulmonaire de la tuberculose est soupçonnée, les prélèvements seront faits en fonction de la localisation de la maladie.

3.4.1. L'examen direct

Un frottis, ou étalement du prélèvement biologique sur lame mince est effectué, puis coloré afin de mettre en évidence la propriété spécifique des mycobactéries : leur acido-alcoolo résistance. Pour cela, deux méthodes peuvent être utilisées, la méthode de Ziehl-Neelsen, ou celle de l'auramine (fluorochrome). La coloration de Ziehl-Neelsen fait apparaître les Bacilles Acido-Alcoolo-Résistants (BAAR), sous forme de petits bâtonnets rouges isolés ou en petits amas sur fond bleu, tandis qu'ils apparaîtront comme de petits bâtonnets jaunes-verts brillants sur fond sombre avec la coloration à l'auramine (Figure 5).



Source: http://ntcc.ucsd.edu (Margaret A. Bartelt, Ph.D., MT(ASCP)SM, Diplomat A.B.M.M., Medical Technology Program, University of Arkansas for Medical Sciences).

Figure 5: Frottis faisant apparaître des BAARs par coloration à l'Auramine O (A) ou selon la méthode de Ziehl-Nelsen (B)

Il est important de souligner que l'examen direct de BAAR dans un prélèvement biologique ne permet pas de faire la distinction entre *M. tuberculosis* et les autres mycobactéries. De plus, cette méthode ne permet pas de détecter la présence de BAAR dans un prélèvement biologique pauci bacillaire puisqu'il a en effet été montré que l'examen direct ne détectait la présence de BAAR qu'à partir de 0,5 à 1,1 bactéries par microlitre de prélèvement biologique [226].

3.4.2. La culture

Seule une culture positive à *M. tuberculosis* constitue une preuve formelle du diagnostic d'une tuberculose. Celle-ci est pratiquée quelque soit le résultat de l'examen microscopique. Elle s'effectue, après une étape de décontamination par homogénéisation des prélèvements biologiques, sur milieu de culture enrichi, solide ou liquide. L'étape d'homogénéisation permet d'obtenir un prélèvement plus fluide et de décontaminer l'échantillon avant ensemencement des milieux de culture, afin que des bactéries n'appartenant pas au genre *Mycobacterium* ne contaminent la culture.

Si la mise en culture sur milieu de Löwenstein-Jensen constitue la méthode la plus couramment utilisée du fait de son faible coût et de sa grande sensibilité, les cultures sur milieux liquides tendent à se développer car ils permettent de réduire sensiblement les délais de diagnostic. L'identification des colonies bactériennes se déduit de la combinaison de propriétés macroscopiques avec plusieurs outils d'investigation, tels que les tests biochimiques, les sondes nucléiques, et les tests basés sur l'amplification génique par PCR. Sur milieu de culture solide, les principales caractéristiques macroscopiques étudiées sont la vitesse d'apparition de la colonie, le nombre de colonies, leur aspect rugueux ou lisse, la présence ou non d'une pigmentation, tandis que sur milieu liquide, c'est l'aspect du frottis qui permet d'orienter l'identification. Ainsi, sur milieu solide de Löwenstein-Jensen, les colonies de *M. tuberculosis* apparaissent en quatre à six semaines, sont d'aspect rugueux dit en « chou-fleur », de couleur crème et eugoniques, tandis que le frottis réalisé à partir de cultures en milieu liquide montre des colonies en corde ou en moustache avec très peu de bactéries isolées.

3.4.3. L'identification

* Les tests biochimiques.

Ils évaluent la thermosensibilité de la catalase, la production de niacine, la réduction des nitrates, la croissance en présence d'acide thiophène-2-carboxylique (TCH), l'activité arylsulfatasique, l'hydrolyse du Tween, l'activité β-glucosidasique et l'activité uréasique. *Mycobacterium tuberculosis* a une catalase thermolabile, produit de la niacine (ou acide nicotinique), réduit les nitrates, et pousse en présence de TCH. Les autres tests biochimiques ont été développés pour l'identification des mycobactéries atypiques. Si l'identification n'est toujours pas formelle ou par mesure de contrôle, des outils supplémentaires existent tels que les sondes nucléiques ou les tests basés sur la PCR.

* Les sondes nucléiques.

Le système AccuProbe (Gen-Probe, San Diego, USA) est une technique d'hybridation d'une sonde moléculaire sur une région cible située au niveau du gène codant pour l'ARN 16S des mycobactéries. Cette technique s'utilise sur culture en milieu solide ou liquide. Il existe des sondes pour l'identification des mycobactéries du complexe *M. tuberculosis* (MTbC), du complexe *M. avium-M. intracellulare* (MAC) ainsi que des espèces *M. kansasii* et *M. gordonae*.

* Tests basés sur l'amplification génique par PCR.

Des tests réalisables à partir de cultures liquides ou solides permettent la détection l'identification de nombreuses espèces mycobactériennes en trois étapes : une étape d'extraction d'ADN, une étape d'amplification par PCR de régions d'intérêt et une étape d'hybridation inverse. Le test INNO-LiPA MYCOBACTERIA (Innogenetics) permet la détection des bactéries du genre *Mycobacterium* et l'identification de 16 espèces mycobactériennes différentes. L'amplification génique concerne la région codant l'espace 16S-23S de l'ARN ribosomal et l'identification se fait par hybridation inverse des produits de PCR avec des sondes d'ADN biotinylées et immobilisées sur des bandelettes. Le test Hain utilise lui aussi les principes de l'hybridation inverse mais l'amplification concerne des régions différentes en fonction de l'identification souhaitée : les sous-espèces du complexe *M. tuberculosis* (GenoType® MTBC), les mycoabctéries atypiques communes (GenoType® Mycobacterium CM (Common Mycobacteria)) ou les autres mycobactéries atypiques (GenoType® Mycobacterium AS (Additional Species)).

* Autres développements :

- Les tests immuno-chromatographiques : permettent la détection de l'Antigène MPT64, protéine uniquement secrétée par les souches du MTbC (« S.D. BioLINE TB MPT64 Rapid », Standard Diagnostic et « Capilia TB Neo », Tauns laboratories). Utilisables à partir de colonies provenant de cultures sur milieu solide ou liquide, ils permettent une distinction rapide (en quelques minutes) entre les souches du MTbC et les mycobactéries atypiques,

- Les tests de détection et d'identification des mycobactéries à partir de prélèvements biologiques : basés sur l'amplification d'ADN (COBAS® TaqMan® MTB Test, Roche Diagnostics) ou d'ARN (AMPLIFIED MTD®, Gen-Probe ; GenoType® Mycobacteria Direct, Hain Lifescience), ils permettent d'identifier les bactéries du MTbC dans les prélèvements à examen direct positif en quelques heures. Cependant, ces tests restent moins sensibles que la méthode de référence qui nécessite la mise en culture des prélèvements biologiques et seront donc principalement employés en première intention pour un nombre restreint de situations qui auront été préalablement définies [48].

- GeneXpert MTB/RIF Assay (Cepheid) : méthode d'identification des mycobactéries du complexe MTbC et de détection de la résistance à RIF par real-time PCR multi-colorimétrique. L'ensemble de réactifs étant contenu sous forme lyophilisée dans une cartouche prête à l'emploi, cette méthodologie réduit notablement les risques de contamination et de faux positifs inhérents aux outils de biologie moléculaire [25, 26, 125].

3.4.4. Antibiogramme

L'antibiogramme ne constitue pas en lui-même un acte de diagnostic de la tuberculose mais peut aider à la détermination de l'espèce incriminée en cas de présence d'une mycobactérie atypique.

3.5. Traitement

La tuberculose est une maladie dont on guérit si un traitement approprié est prescrit et que celui-ci est scrupuleusement respecté par le malade.
En fonction du cas de tuberculose rencontré (tuberculose maladie ou tuberculose latente), de sa localisation et de son degré de gravité, du résultat du frottis (positif ou négatif), des antécédents de traitement du patient, quatre schémas thérapeutiques distincts ont été définis par l'OMS. Ces schémas tiennent par ailleurs compte de l'âge et de l'état de santé des patients tuberculeux (associations d'autres maladies telles que le VIH), ainsi que du contexte global de prise en charge des patients tuberculeux (Tableau 1) [297].

3.5.1. Chimio-prophylaxie

On entend par chimio-prophylaxie le traitement préventif de patients ne présentant pas les symptômes d'une tuberculose mais ayant fait un virage tuberculinique récent ou présentant une IDR positive ainsi que de patients présentant un risque accru de développer une tuberculose (patients immunodéprimés par exemple) [8]. Le traitement préventif classique consiste en une prise quotidienne d'INH en monothérapie pendant six à neuf mois. Ce traitement a prouvé son efficacité avec un taux de guérison supérieur à 90% mais reste cependant associé à de sérieux effets indésirables tels que l'hépatotoxicité [163].

Catégorie de diagnostic	Cas concernés	**Schémas thérapeutiques**[i]	
		Phase initiale	Phase de continuation
I	Nouveaux cas à frottis positifs ; nouveaux cas de TBP à frottis négatif avec lésions parenchymateuses étendues ; Grave infection à VIH concomitante ou formes sévères de TB extrapulmonaire[ii]	**De préférence** 2 HRZE[iii]	**De préférence** 4 (HR) 4 $(HR)_3$
		Optionnel 2 $(HRZE)_3$ ou 2 HRZE[iv]	**Optionnel** 4 $(HR)_3$ ou 6 HE[v]
II	Cas de TBP à frottis positif précédemment traités : - rechute - traitement après interruption	**De préférence** 2 HRZES /1 HRZE[vi]	**De préférence** 5 HRE[vi]
		Optionnel 2 $(HRZES)_3$/1 $HRZE_3$	**Optionnel** 5 $(HRE)_3$
	– Echec thérapeutique de la catégorie I[vii] dans les conditions suivantes : – bonnes performances du programme – données représentatives de la surveillance des résistances montrant une forte proportion de TB multirésistante et/ou moyens de faire des épreuves de sensibilité individuelles – disponibilité de schémas thérapeutiques de la catégorie IV	Des schémas thérapeutiques normalisés spécialement conçus ou des schémas individualisés sont souvent nécessaires pour ces patients	
	Dans les conditions suivantes : – données représentatives de la surveillance des résistances montrant une faible proportion de TB-MR ou tests de sensibilité établissant la sensibilité du cas ou dans les conditions suivantes : – mauvaises performances du programme – absence de données représentatives de la surveillance des résistances – ressources insuffisantes pour instaurer des traitements de la catégorie IV	**De préférence** 2 HRZES /1 HRZE[vi]	**De préférence** 5 HRE[vi]
		Optionnel 2 $(HRZES)_3$/1 $HRZE_3$	**Optionnel** 5 $(HRE)_3$
III	Nouveaux cas de TBP à frottis négatif (autres que ceux de la catégorie I) ; formes de tuberculose extra-pulmonaire sans caractère de gravité	De préférence 2 HRZE[viii]	De préférence 4 (HR) 4 $(HR)_3$
		Optionnel 2 $(HRZE)_3$ ou 2 HRZE	Optionnel 4 $(HR)_3$ ou 6 HE
IV	Cas de tuberculose chronique (à frottis positif après retraitement sous surveillance) ; TB multirésistante avérée ou suspectée[ix]	Schémas thérapeutiques normalisés spécialement conçus ou schémas individualisés	

i Les chiffres précédant les schémas thérapeutiques indiquent la durée du traitement (en mois) avec les antibiotiques de première ligne suivants : isoniazide (H), rifampicine (R), pyrazinamide (Z), éthambutol (E), streptomycine (S). Les chiffres en indice indiquent la fréquence de l'administration (nombre de jours par semaine). Leur absence signifie que les médicaments doivent être pris tous les jours. La supervision directe de l'ingestion des médicaments est toujours requise au cours de la phase initiale du traitement, elle est fortement recommandée pendant la phase d'entretien si celle-ci comporte de la rifampicine et elle est requise en cas d'administration intermittente du traitement. Les associations à doses fixes sont fortement recommandées, pour la phase initiale comme pour la phase d'entretien.
ii Une TB extrapulmonaire est jugée sévère s'il en résulte une menace aiguë pour la vie du sujet, un risque de grave handicap, ou les deux (ex. TB méningée).
iii On peut utiliser SM à la place d'EMB. En cas de tuberculose méningée, remplacer EMB par SM.
iv On ne recommande pas le traitement intermittent pour la phase initiale, si l'on prévoit de prescrire INH et EMB pour la phase d'entretien.
v On peut envisager ce schéma thérapeutique dans le cas où le schéma de préférence ne peut être administré suivant les recommandations. Ce schéma s'associe néanmoins à un taux plus élevé d'échecs et de rechutes, par rapport au schéma 4HR pour la phase d'entretien. Le traitement intermittent n'est pas recommandé pour la phase initiale s'il est suivi de 6HE pour la phase d'entretien.
vi On préfère les traitements quotidiens. Toutefois, le traitement trihebdomadaire pendant la phase d'entretien ou pendant les deux phases est une option envisageable.
vii Les échecs thérapeutiques entraînent une augmentation du risque de tuberculose multirésistante, en particulier si RIF a été prescrite pour la phase d'entretien. Pour ces cas, on recommande de procéder à des épreuves de sensibilité si on en a la possibilité. Les cas d'échecs présentant une de tuberculose multirésistante connue ou suspectée doivent être traités avec un schéma thérapeutique de la catégorie IV.
viii On peut omettre EMB pendant la phase initiale pour les patients VIH négatifs présentant une tuberculose pulmonaire limitée, non cavitaire, à frottis négatif, les patients présentant des formes de tuberculose extrapulmonaire sans caractères de gravité et les jeunes enfants présentant une tuberculose primaire.
ix On recommande de procéder à des épreuves de sensibilité pour les patients en contact avec des cas de TB multirésistante.

Tableau 1: Schémas thérapeutiques préconisés par l'OMS [298]

3.5.2. Traitement de la tuberculose maladie

Le traitement standardisé de la tuberculose maladie, qu'elle soit pulmonaire ou extra-pulmonaire, d'une durée de six mois, comporte deux phases. Pendant les deux premiers mois le traitement est une quadrithérapie associant INH, RIF, PZA, et EMB. Il s'en suit une bithérapie d'une durée de quatre mois alliant RIF et INH. Si la PZA ne peut être administrée, la phase de continuation sera prolongée de trois mois portant alors la durée totale du traitement à neuf mois.

3.5.3. Traitement de la tuberculose à bacilles résistants et multirésistants

En dépit de sa toxicité, c'est la durée du traitement, le plus souvent supérieure à six mois, qui est à l'origine de la mauvaise observance par les patients. Ce phénomène est le principal mode de sélection des souches MDR voire XDR et nécessitera l'emploi d'antituberculeux de seconde ligne lors de la prise en charge du patient. Ces antituberculeux de seconde ligne (aminoglycosides, fluoroquinolones, acide para-aminosalicylique, thioamides) sont moins efficaces ou plus toxiques que les antituberculeux de première intention rendant le traitement bien plus compliqué qu'en présence d'une souche tuberculeuse sensible [42, 311].

4. Résistance et multirésistance aux antituberculeux

4.1. Mécanismes de résistance aux antibiotiques de première ligne

4.1.1. Isoniazide

L'isoniazide (INH) est l'antibiotique le plus largement utilisé pour le traitement de la tuberculose maladie aussi bien que de la tuberculose latente, les souches de *M. tuberculosis* étant naturellement sensibles à l'INH [313]. L'INH nécessite d'être activée par une catalase peroxydase (codée par le gène *kat*G) pour être efficace. Une fois activée, elle inhibe alors la synthèse des acides mycoliques de la paroi en interagissant avec l'enzyme enoyl-ACP réductase codée par le gène *inh*A, et favorise ainsi l'accumulation de radicaux libres par la bactérie. Les mutations ponctuelles du gène *kat*G, en empêchant l'activation de l'INH, sont un mécanisme principal de résistance à cet antibiotique et concernent de 50 à 95% des souches résistantes à INH [313]. Bien que de nombreuses mutations aient été décrites pour le gène *kat*G [234, 282], c'est la mutation du codon 315 qui prédomine avec une occurrence comprise entre 60 et plus de 90% des souches résistantes à l'INH [174, 175, 186, 197] (Tableau 2). Certains autres gènes de résistance ont été identifiés,

tels que *inh*A, *ahp*C, *kas*A, *ndh*, *efp*A ou encore la région promotrice de l'opéron *mab*A/*inh*A, notamment la mutation -15C/T, et la région promotrice du gène *ahp*C [20, 123, 197, 219, 220, 231, 243, 282, 309]. Ces mutations additionnelles, ne semblent pas conférer à elles seules une résistance à INH, et pourraient permettre aux bactéries de compenser le coût biologique de la résistance à INH [123].

4.1.2. Rifampicine

Utilisée depuis 1966, la rifampicine (RIF) est avec l'isoniazide un des antibiotiques majeurs du traitement de première intention de la tuberculose. L'essentiel de la résistance à RIF est associé à des mutations ponctuelles intervenant dans une région cible de 81 paires de bases (pb) ou région RRD (RIF Resistance Determining) du gène *rpo*B codant pour la sous-unité β de l'ARN polymérase [312] (Tableau 2). En effet, plus de 95% des souches résistantes à RIF montrent une mutation dans cette région RRD [259, 309]. Les mutations les plus fréquentes interviennent au niveau des codons 531, 526 et 516 et sont généralement associées à de hauts niveaux de résistance tandis que celles intervenant au niveau des codons 511, 516, 518, et 522, ont été associées à de faibles niveaux de résistance [313].

4.1.3. Éthambutol

L'éthambutol (EMB) inhibe la croissance bactérienne en interrompant la synthèse d'arabinogalactane, composant indispensable de la paroi bactérienne [255]. Les mutations de l'opéron *emb*CAB, codant pour une arabinosyl transférase impliquée dans la synthèse d'arabinogalactane, sont les principaux mécanismes actuellement identifiés de résistance à EMB, notamment la mutation du codon 306 d'*emb*B [245, 260] (Tableau 2). Cette mutation a en effet été retrouvée chez 47 à 68% des souches de *M. tuberculosis* présentant de forts taux de résistance à EMB [245, 260, 312]. Cependant chez 25 à 35% des souches présentant une faible résistance à EMB aucune résistance n'a pu être détectée au sein de l'opéron *emb*CAB, ce qui suggère l'existence d'autres mécanismes de résistance [5, 260].

Antibiotique	Gène cible	Fonction du gène	Position des mutations les plus fréquemment détectées [a]	
Antibiotiques de première ligne				
INH	*kat*G	Catalase peroxydase	S315T	
	*inh*A	Enoyl-ACP réductase	-15C/T	
			-16A/G	
			-8T/C	
			-8T/A	
RIF	*rpo*B	Sous-unité β de l'ARN polymérase	C531T	Région RRD [b]
			C531G	
			C526T	
			C526G	
			A526G	
			AC526TG	
			T511C	
			T511G	
			C511G	
			A516T	
			G516T	
			A518C	
			C522T	
EMB	*emb*B	arabinosyltransférase	G306A	
			G306C	
			G306T	
PZA	*pnc*A	Amidase	ND	
Antibiotiques de deuxième ligne				
SM	*rps*L	Protéine ribosomale S12	A43G	
			A88G	
	rrs	ARN 16S	ND	
AMK/KM	*rrs*	ARN 16S	A1401G	
			C1402T	
			G1484T	
CPM	*rrs*	ARN 16S	A1401G	
			C1402T	
			G1484T	
	tlyA	methyltransférase	ND	
FQ	*gyr*A	Sous-unité α de l'ADN gyrase	A94G	Région QRD [c]
			A94C	
	*gyr*B	Sous-unité β de l'ADN gyrase	A510C	
ETH	*inh*A	Enoyl-ACP réductase	ND	
	*eth*A	Mono-oxygenase	ND	

(a) d'après http://www.tbdreamdb.com/index.html, Pierre-Audigier C & Gicquel B. 2010. The contribution of molecular biology in diagnosing tuberculosis and detecting antibiotic resistance. (disponible sur http://www.eumednet-tb.org) et Zhang et al., 2009 [313]. (b) la région RRD (Rifampicine Resistance Determining Region) est une zone de 81pb entre les codons 507 et 533 du gène *rpo*B. (c) la région QRD (Quinolones Resistance Determining Region) est une zone de 39pb entre les codons 67 et 106 du gène *gyr*A. ND : non disponible car les mutations identifiées sont trop nombreuses ou non significativement associées à une résistance phénotypique.

Tableau 2: Gènes de résistance des bactéries du complexe *M. tuberculosis* et principales mutations identifiées

4.1.4. Pyrazinamide

La PZA, un analogue de la nicotinamide, est une pro-drogue nécessitant d'être convertie par une pyranizamidase en en acide pyrazinoique pour être effective [147]. Cet antibiotique est actif sur les bacilles tuberculeux semi-dormants ou persistants, et son inclusion au traitement de première ligne de la tuberculose a ainsi permis d'en réduire la durée à 6 mois [68, 287, 310]. Pléthore de mutations du gène *pnc*A, codant pour la pyrazinamidase, a été associée à la résistance à PZA, ce qui complique notablement la mise au point de tests de détection de résistance à cet antibiotique [244] (Tableau 2). On estime qu'entre 72% et 97% des souches résistantes à PZA présentent au moins une mutation du gène *pnc*A réparties sur l'ensemble du gène et de sa région promotrice [165, 214, 228, 313].

4.2. Mécanismes de résistance aux antibiotiques de deuxième ligne

Les aminoglycosides (streptomycine, SM ; kanamycine, KM ; amikacine, AMK ; capreomycine, CPM) sont des inhibiteurs de la synthèse protéique des mycobactéries et interagissent avec les protéines ribosomales [312]. Des mutations au niveau des gènes *rps*L et *rrs* codant respectivement pour les protéines ribosomales S12 et 16SrRNA constituent l'essentiel des mécanismes de résistance à SM. Elles sont retrouvées chez 50% et 20% des souches résistantes à SM [96, 130, 198, 312]. Les résistances à AMK et KM sont associées à des mutations au niveau des codons 1401, 1402 et 1484 du gène *rrs* tandis que la résistance à CPM a été associée à des mutations des gènes *rrs* et *tly*A [177].

Les fluroquinolones (FQ) agissent en inhibant l'ADN gyrase des mycobactéries [313]. Les mutations des codons 74, 83, 87, 88, 90, 91, 94 au sein d'une région QRD (Quinolones Resistance Determinant) du gène *gyr*A ont été identifiées comme majeures dans le phénomène de résistance des bacilles tuberculeux aux fluoroquinolones [4, 50, 209, 219, 249, 256]. Des mutations au sein du gène *gyr*B ont aussi été identifiées mais ne semblent pas conférer à elles seules une résistantes aux FQ, elles pourraient complémenter les mutations en *gyr*A et permettre à la bactérie de développer de hauts niveaux de résistance aux FQ.

L'éthionamide (ETH), de même que l'INH, agit en inhibant la production d'acides mycoliques, indispensables à la construction de la paroi de *M. tuberculosis* [17]. Les mutations du gène *inh*A et de sa région promotrice confèrent à la fois une résistance à ETH et à INH tandis que les mutations du gène *eth*A confèrent une résistance à ETH et autres thioamides [21, 69, 190].

4.3. Détection des résistances aux antituberculeux de *M. tuberculosis*

On peut distinguer deux types et donc deux méthodes de détermination des résistances aux antituberculeux des mycobactéries du complexe *M. tuberculosis* : une résistance phénotypique et une résistance génétique.
La méthode des proportions est la méthode de référence pour la détermination de la résistance phénotypique des bactéries du complexe *M. tuberculosis* aux antituberculeux [46]. Elle s'effectue généralement sur milieu de culture solide contenant les antibiotiques à tester, par inoculation d'une suspension bactérienne et comparaison de la croissance bactérienne avec un milieu de culture sans antibiotique. Une souche sera déclarée résistante à l'isoniazide (INH), la rifampicine (RIF), la streptomycine (SM) ou l'éthambutol (EMB), si la proportion de bacilles résistants, donc se développant sur milieu avec antibiotique, est supérieure à 1% de la population bacillaire totale. Il est aussi possible de déterminer la résistance phénotypique des bacilles du complexe *M. tuberculosis* sur milieu de culture liquide en y ajoutant l'antibiotique à tester à la concentration critique (ou concentration définie comme étant la plus faible concentration minimale inhibitrice, CMI, permettant de différencier les souches résistantes des souches sensibles).

La détection de la résistance génétique aux antituberculeux implique la mise en évidence de mutations au niveau de la séquence de gènes codant pour la cible des principaux antibiotiques (Tableau 2). Différents outils de détection de ces mutations ont été mis au point, et se basent sur l'amplification par PCR puis l'hybridation inverse des produits de PCR avec une sonde préalablement fixée sur une bandelette (INNO-LiPA Rif TB Assay, Innogenetics ; GenoType MTBDRPlus et GenoType MTBDRsl, Hain Lifescience), la real-time PCR (GeneXpert MTB/RIF Assay, Cepheid), le séquençage des gènes de résistance, ou encore les puces à ADN [268]. Le séquençage des gènes de résistance reste la méthode moléculaire la plus fiable puisqu'elle permet d'identifier l'ensemble des mutations au sein des gènes étudiés et de détecter les mutations silencieuses ou synonymes ne conférant à priori pas de résistance à la bactérie [268].

Une souche sera déclarée multirésistante (MDR) si elle présente une résistance à la fois à INH et RIF, et extrêmement résistante (XDR) si en plus d'être MDR elle a développé une résistance à une fluoroquinolone quelle qu'elle soit, et à au moins un antituberculeux injectable sur les trois utilisés pour le traitement de la tuberculose (CPM, KAN, AMK) [297].

5. Génome et marqueurs génétiques pour le typage moléculaire des souches du complexe *M. tuberculosis*

5.1. Le génome des souches du complexe *M. tuberculosis*

Les génomes complets de neuf organismes du complexe *M. tuberculosis* (1 *M. africanum*, 2 *M. bovis*, et 6 *M. tuberculosis*) ainsi que ceux de 24 mycobactéries non-tuberculeuses sont actuellement disponibles (http://genome.tbdb.org/annotation/genome/tbdb/GenomesIndex.html).

Le génome de la souche de référence *M. tuberculosis* H37Rv, premier génome mycobactérien à avoir été séquencé, est constitué de 4 411 529 pb, dont 3989 gènes, et se caractérise par un contenu en guanine et cytosine (G+C) élevé estimé à 65.6% [54]. La relative homogénéité du pourcentage de G+C sur l'ensemble du génome de la souche de référence H37Rv laisse supposer que le phénomène de transfert horizontal de matériel génétique est quasi-absent chez *M. tuberculosis* [242]. Par ailleurs, le transfert horizontal de gène n'a probablement pas été à l'origine des propriétés de pathogénicité développées par le bacille tuberculeux puisque aucun des gènes localisés dans les régions du génome présentant des variations significatives de densité de G+C n'a été identifié comme gène de virulence [34]. Parmi les régions présentant une variation significative de la teneur en G+C, un groupe de gènes spécifique aux mycobactéries, à très fort pourcentage de G+C (>80%), et codant pour les protéines PE ou PPE a été identifié. A l'inverse quelques gènes à relativement faible pourcentage de G+C (<50%) ont été identifiés codant pour des protéines transmembranaires ou des polykétide synthases.

En étudiant la distribution des gènes sur les 2 brins constitutifs de l'ADN chez *M. tuberculosis*, on observe que 59% des gènes sont transcrits avec la même polarité ce qui correspond à une distribution relativement homogène des gènes codants sur les 2 brins d'ADN et pourrait être un facteur contribuant au faible taux de croissance des bacilles tuberculeux [53]. Par ailleurs, il n'a été détecté qu'un seul opéron codant pour l'ARN ribosomal (opéron *rrn*) lequel est situé à 1,5Mpb du locus initiant la réplication ou locus *ori*C ce qui est plus élevé que la distance observée chez les autres eubactéries et pourrait là encore être un facteur intervenant dans le faible taux de réplication des bacilles tuberculeux [34].

Deux prophages ont été détectés dans le génome de la souche de référence H37Rv identiques en taille et en structure, PhiRv1 et PhiRv2, bien que PhiRv1, avec 7 sites potentiels d'insertion identifiés chez H37Rv et une séquence tronquée ou réarrangée chez les autres souches de *M. tuberculosis*, présente une plus grande variabilité que PhiRv2 [53,97].

Chaque séquence codante identifiée est numérotée par ordre d'apparition sur le génome et se voit attribuer un numéro Rv. En 2002, une mise à jour des annotations du génome de la souches de référence H37Rv a permis l'identification de 82 nouveaux gènes sans pour autant modifier les numéros de Rv préalablement

attribués. En effet, des lettres ont été attribuées aux numéros préalablement existants (par exemple Rv3724a, Rv3724b, et Rv3724d) afin d'intégrer les nouveaux gènes identifiés à la nomenclature en place. On notera que lors de la ré-annotation du génome en 2002, suite à l'identification de 4 erreurs de séquençage, la taille du génome de H37Rv et le nombre de gènes identifiés sont passés de 4 411 529 pb à 4 411 532 pb et de 3989 à 4009 respectivement [44] (http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/).

5.2. Marqueurs génétiques pour le typage moléculaire des isolats du complexe *M. tuberculosis*

5.2.1. Les séquences d'insertion

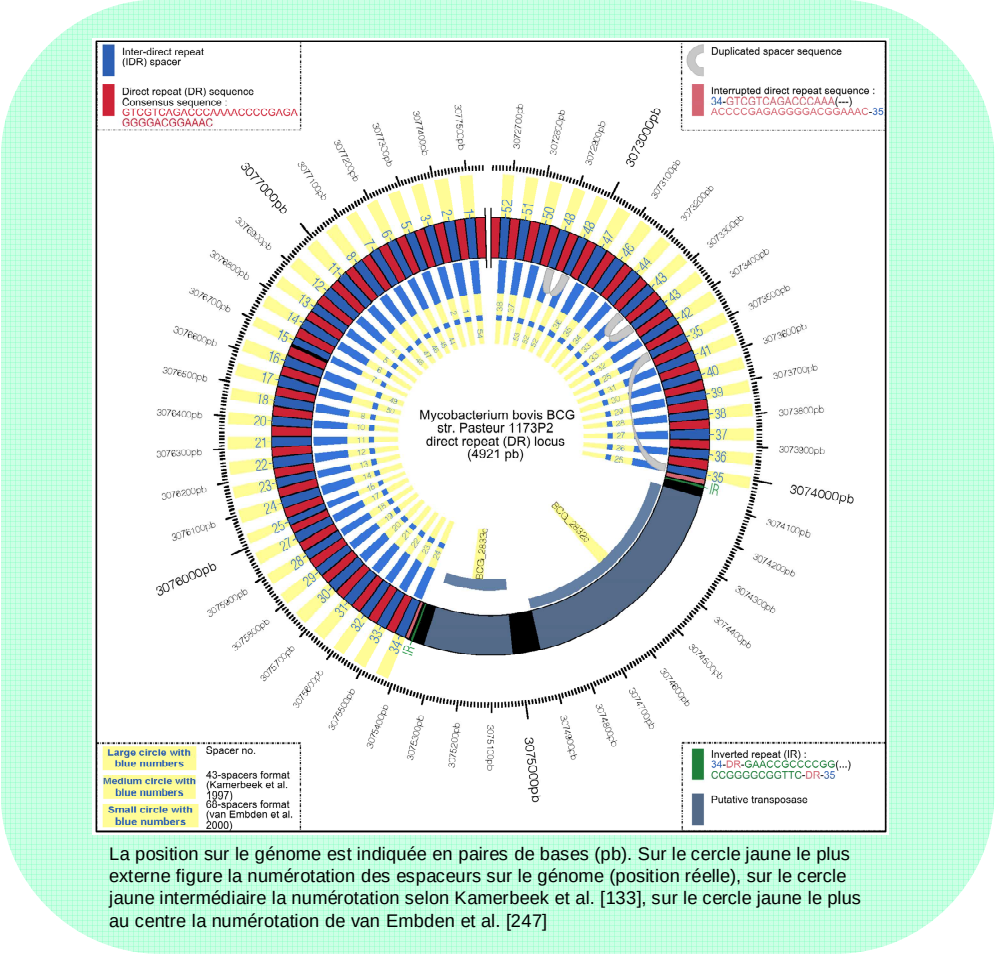
Les séquences d'insertion (IS) font partie de la famille des éléments génétiques transposables présents chez de nombreuses bactéries. Les IS ne contiennent aucune information génétique si ce n'est celle utile à leur transposition (transposase). Suite au séquençage du génome de la souche de référence *M. tuberculosis* H37Rv, de nombreux IS ont été découverts et l'on dénombre 56 séquences d'insertion intactes ou tronquées dans le génome de H37Rv, dont les IS*1081*, IS*1547*, IS*6110*, ou encore l'élément IS-like [54, 55, 88, 173, 262]. L'IS*6110* est le plus étudié (1361 pb) et n'est par ailleurs retrouvé que chez les souches du complexe *M. tuberculosis* [128, 261]. Le nombre de copies d'IS*6110* au sein du génome de *M. tuberculosis* varie de zéro chez quelques rares bacilles tuberculeux à 26 [156, 179] et leur distribution est plus ou moins aléatoire malgré l'existence de séquences préférentielles d'insertion (ipl: insertion preferential locus [89]). Les séquences d'insertion IS*6110* sont analysées par Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) permettant de d'estimer le nombre de copies présentes dans un génome ainsi que leur position. En 1993, une standardisation de la méthode d'IS*6110*-RFLP permettant la comparaison de profils obtenus dans des laboratoires différents a été mise au point [271].

5.2.2. Les courtes séquences d'ADN répétées

5.2.2.1. Le locus DR

En 1993, PM Groenen étudia en premier le locus DR (Direct Repeat) du complexe *M. tuberculosis* [115], décrit précédemment par Hermans et al. (1991) chez *M. bovis* BCG [127], tandis que la méthode de génotypage de ce locus ou spoligotypage fut mise au point en 1997 par Kamerbeek et al. [144]. Le locus DR est un CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) identifié chez un nombre croissant de bactéries. Chez les mycobactéries, il n'est retrouvé qu'au sein du complexe *M. tuberculosis* et se compose d'un nombre variable de répétitions directes (DRVs) d'une séquence conservée de 36 pb,

séparées les unes des autres par des régions non répétitives, les espaceurs ou inter-DR (IDR) dont la taille varie entre 35 et 41pb (Figure 6). L'évolution des profils obtenus ou spoligotypes est unidirectionnelle et se fait dans le sens de la perte d'espaceurs par recombinaison homologue des DRVs ou suite à des réarrangements après transposition de séquences d'insertion comme l'IS*6110* [77, 115].



La position sur le génome est indiquée en paires de bases (pb). Sur le cercle jaune le plus externe figure la numérotation des espaceurs sur le génome (position réelle), sur le cercle jaune intermédiaire la numérotation selon Kamerbeek et al. [133], sur le cercle jaune le plus au centre la numérotation de van Embden et al. [247]

Figure 6 : Le locus DR (*M. bovis* BCG) (Source : Hill V. et al, données non publiées)

Dans un premier temps, 43 espaceurs ont été identifiés et sélectionnés pour le spoligotypage, 37 à partir du génome de *M. tuberculosis* H37Rv et 6 à partir de celui de *M. bovis* BCG [144]. Depuis, 61 espaceurs supplémentaires ont été décrit chez d'autres sous-espèces du complexe *M. tuberculosis* [40, 267, 272]. Ainsi l'utilisation du spoligotypage à 43 espaceurs permet de distinguer certaines sous-espèces du complexe *M. tuberculosis*, telles que *M. bovis* caractérisée par l'absence des espaceurs 39 à 43 et la présence des espaceurs 33 à 36, ou *M. africanum* par l'absence des espaceurs 8, 9, 39 et par la présence des espaceurs 33 à 36. L'utilisation du spoligotypage avec 61 espaceurs augmenterait le pouvoir discriminant

de la méthode et permettrait d'identifier d'autres sous-espèces du complexe *M. tuberculosis*. C'est le cas des espaceurs n°69 à 94 qui ne sont retrouvés que chez *M. canettii* [272]. Les espaceurs n'étant pas dupliqués à l'exception des espaceurs 25, 33, et 52, et leur ordre étant conservé d'une souche à l'autre, il a été possible d'identifier et d'établir les signatures spécifiques des grandes lignées génétiques de *M. tuberculosis* [36, 247, 283] ultérieurement confirmées par l'utilisation d'autres marqueurs génétiques tels que les SNPs. Du fait son évolution unidirectionnelle, le locus DR peut être étudié pour des analyses phylogénétiques ainsi que pour retracer l'histoire évolutive des bacilles tuberculeux du complexe *M. tuberculosis*.

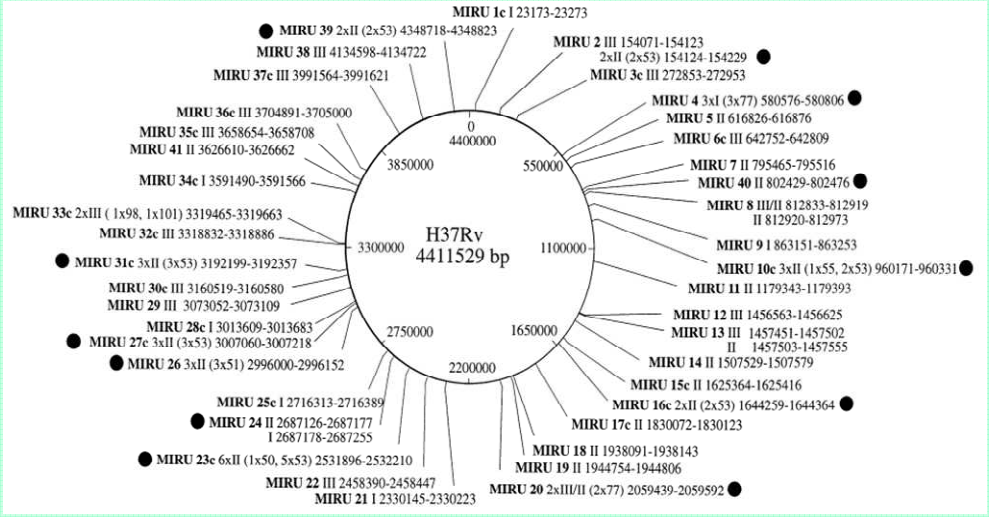
5.2.2.2. Les minisatellites

Les minisatellites sont de courtes séquences d'ADN répétées (entre 10 et 1000 pb) et consécutives, retrouvées chez tous les organismes procaryotes et eucaryotes. Un locus contenant des séquences répétées en tandem en nombre variable de type minisatellite a été décrit pour la première fois dans le génome des mycobactéries en 1994 simultanément par Zhang et al. [314] et Goyal et al. [114]. A la suite de ces travaux, Supply et al. [252] décrivent, en 1997, un ensemble d'autres locus similaires contenant des séquences répétées en tandem et homologues sur le génome de *M. tuberculosis*, alors dénommés MIRU (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units), le terme de VNTR (Variable Number of tandem Repeats) étant employé pour la première fois en 1998 par Frothingham, R. et W.A. Meeker-O'Connell [99] pour désigner les séquences répétées dont certaines avaient précédemment été décrites par Supply et al. [252]. La variabilité du nombre de copies d'un seul locus a dans un premier temps été montrée [169, 170, 252], suivie de celle d'un ensemble de 12 et de 41 locus MIRU [253]. Depuis, le développement du MLVA (Multiple locus VNTR Analysis) a permis de mettre en évidence et d'intégrer aux stratégies de génotypage de nombreux locus VNTR susceptibles d'être utilisés pour des analyses épidémiologiques ou phylogénétiques.

Le génotypage des souches de *M. tuberculosis* par la méthode des minisatellites MIRU-VNTR repose sur l'analyse du nombre d'exemplaires des séquences répétées pour chacun des loci étudiés. Ces séquences étant retrouvées sur l'ensemble du génome, leur méthode d'analyse porte généralement sur plusieurs loci simultanément. Pour l'étude des mycobactéries, plusieurs minisatellites VNTR ont été identifiés notamment depuis le séquençage du génome de la souche de référence H37Rv : les ETR (Exact Tandem Repeat) [99], les QUB (Queen's University Belfast) [224, 233], les Mtub [162], les MIRU [250, 251] ou encore les locus Hyper-Variables (HV) [141, 224, 237, 250] (http://minisatellites.u-psud.fr/).

Si l'étude des 5 ETR (identifiés de A à E) pour la distinction des cas épidémiologiquement liés montre une bonne reproductibilité (97%) [152], la méthode présente un pouvoir discriminant inférieur à celui de la méthode de référence IS*6110* (83% vs. 97%) [94] et a été remplacée par celle des 12-locus MIRU, introduite par Supply et al. [253]. Les MIRU sont des séquences répétées de 50 à 111 pb réparties dans les

régions intergéniques du génome de *M. tuberculosis*. Le chromosome de *M. tuberculosis* H37Rv comporte 41 MIRU-VNTR, numérotés de 1 à 41 et répartis sur l'ensemble du génome dont 12 ont été retenus pour leur variabilité (Figure 7) permettant de distinguer les cas épidémiologiquement distincts [178, 251] tout en restant stables pour les cas liés épidémiologiquement [122, 157, 227].



Les chiffres en gras indiquent le numéro du locus, la lettre "c" correspond aux loci dont l'orientation est inversée par apport au sens définit par Cole et al., (1998), les chiffre romains indiquent le type de MIRU-VNTR (I, II ou III) et la position exacte sur le génome est donné par les chiffres apparaissant après les chiffres romains.
Les ronds noirs indiquent les 12-loci MIRU-VNTR initialement sélectionnés parmi les 41 décrits pour le génotypage de M. tuberculosis.

Figure 7: Schéma représentant la position des 41 loci MIRU-VNTR décrits par P. Supply et al. (2000) [253] sur le chromosome de la souche de référence H37Rv de *M. tuberculosis*

La méthode de génotypage basée sur les 12-locus MIRU présente une très bonne reproductibilité (100%) [251] en faisant une méthode de choix pour les études d'épidémiologie moléculaire en association avec le spoligotypage. Néanmoins, le recours à la méthode de référence IS*6110*-RFLP, dans un certain nombre de cas, afin de distinguer les cas non liés épidémiologiquement des souches de la famille Beijing ou au sein de la famille *M. bovis* par exemple, a montré l'utilité de la mise au point d'outils de génotypage basés sur l'utilisation de nouveaux sets de marqueurs minisatellites intégrant les QUB ou les Mtubs. Ainsi en 2006, 29 marqueurs minisatellites ont été évalués pour des études d'épidémiologie moléculaire et de phylogénie, dont 12 correspondent aux MIRU-VNTR décrits par Supply et al. précédemment [251]. Après évaluation, il a été proposé deux sets de génotypage, l'un basé sur 15-loci MIRU-VNTR préconisé pour les études d'épidémiologie moléculaire, et l'autre comportant 24-loci MIRU-VNTR pour les études de phylogénie [250].

5.2.3. Régions de différence (RD) et Single Nucleotide Polymorphism (SNP)

A partir de l'obtention de la séquence des génomes complets des souches de *M. tuberculosis* (H37Rv et CDC1551) [54, 97] et *M. bovis* (AF2122/97 et BCG Pasteur) [32, 104], des études de génomique comparative ont été entreprises permettant la mise en évidence de polymorphismes de séquences (LSP : Large Sequence Polymorphism) entre les souches étudiées [129, 265]. Le polymorphisme de ces séquences reposant principalement sur des phénomènes de réarrangements consécutifs à des délétions [35], ils représenteraient des évènements uniques et irréversibles permettant ainsi leur utilisation en phylogénie du complexe *M. tuberculosis* [33, 112, 265]. Un total de 14 régions de différences (RD ; RD1-RD14) ont été identifiées dans le génome de H37Rv et se sont avérées être absente de celui de la souche avirulente *M. bovis* BCG Pasteur [22, 113]. De même, 5 régions de délétions spécifiques de la souche de référence H37Rv ont été identifiées (RvD1-5) ainsi que la région de délétion TbD1 (*M. tuberculosis* specific deletion 1) qui permet une distinction entre les souches *M. tuberculosis* « anciennes », pour lesquelles la séquence TbD1 est présente, et les souches « modernes », pour lesquelles la région TbD1 est absente [33]. L'étude des LSP a permis la distinction de 6 lignées génétiques au sein du complexe *M. tuberculosis*: « Indo-Oceanic », « East Asian », « East African Indian », « Euro-American », « West African-1 », et « West African-2 » [101].

Par ailleurs, des mutations ponctuelles ont été identifiées par séquençage et comparaison de plusieurs génomes du complexe *M. tuberculosis*. Ces mutations ponctuelles, qu'elles soient synonymes (sSNP) ou non synonymes (nsSNP), représentent une variabilité des génomes et ainsi une source d'information exploitable tant pour la caractérisation de clones, que pour retracer les liens phylogénétiques existant entre les représentants de ce complexe [176].

Les nsSNP, qui se traduisent généralement par une modification de la séquence en acides aminés de la protéine induite, sont soumises à une pression de sélection interne et environnementale. De telles mutations sont par exemple à l'origine des résistances phénotypiques des bacilles tuberculeux aux antibiotiques utilisés dans le traitement de la maladie et leur détection peut permettre d'identifier mais aussi de suivre et de caractériser la dynamique de transmission des souches résistantes et multirésistantes au sein d'une population donnée.

Les sSNP sont considérées comme neutres ou presque d'un point de vue fonctionnel pour les bactéries. Cette caractéristique a permis, lorsque ces mutations sont situées au niveau de gènes structuraux ou « gènes de ménage », leur utilisation pour la détermination des liens évolutifs au sein du complexe *M. tuberculosis*. Ainsi, certaines de ces mutations ponctuelles ont permis l'identification de groupes génétiques majeurs tels que les 3 PGG (Principal Genetic Group) [242], les 4 lignées décrites par Baker et al. [16], les 6 SCG (SNP

Cluster Group ; SCG 1 à 6) définis par Alland et al. (2003) [7] et Filliol et al. (2006) [95] et les 9 groupes SNP (sSNP-I à sSNPVIII et sSNPIIa) décrits par Musser et al. [196] et Gutacker et al. [117, 118].

5.3. Buts et applications du typage moléculaire

5.3.1. Sélection de marqueurs moléculaires et propriétés requises

Les bacilles tuberculeux, longtemps catégorisés à partir de leurs propriétés biochimiques ou l'étude de séquences génétiques ponctuelles et restreintes, peuvent, depuis les récents progrès de la biologie moléculaire d'une part, et le séquençage du génome complet du bacille tuberculeux en 1998 d'autre part, [54], être dorénavant caractérisés sur la base de plusieurs marqueurs génétiques. Si l'étude de certains marqueurs génétiques dépend en grande partie de leur capacité à répondre aux questions posées, elle est par ailleurs très fortement dépendante de leurs propriétés intrinsèques et de la méthode d'analyse employée. Ainsi, (i) la reproductibilité, ou capacité du système de typage à attribuer le même profil génétique à une souche testée lors d'essai indépendants, (ii) la robustesse, ou capacité d'applicabilité du système de typage à des souches distinctes (le plus représentatif possible de l'ensemble de la population de souches en circulation), (iii) la stabilité, ou capacité d'un système à reconnaître une relation clonale, et (iv) la variabilité, ou capacité d'un système de typage à distinguer des souches différentes, seront des critères important d'évaluation et de sélection de marqueurs moléculaires (un système de typage intégrant le marqueur moléculaire et la méthode de typage employée) [191, 250].

Au sein du génome des membres du complexe *M. tuberculosis*, plusieurs séquences polymorphes ou marqueurs génétiques ont été identifiés et ont permis d'établir des « empreintes génétiques » des bacilles tuberculeux, lesquelles reflètent à la fois l'histoire de la transmission de la maladie (épidémiologie) et l'histoire évolutive des souches du complexe *M. tuberculosis* (phylogénie) [236]. La comparaison d'empreintes génétiques provenant de souches de patients différents est la méthodologie employée lors d'études d'épidémiologie moléculaire. Ainsi, l'observation de deux empreintes (ou profils) génétiques identiques chez deux souches provenant de patients distincts, suggère l'existence d'une chaîne de transmission directe ou indirecte entre les patients, tandis que l'absence de similitude laisse supposer l'absence de contact entre ces patients. Concernant les études phylogénétiques des bacilles tuberculeux, certaines conditions doivent préalablement être respectées concernant les marqueurs moléculaires sélectionnés. Il convient en effet, afin de pouvoir déterminer sans ambiguïté les relations phylogénétiques liant les membres du complexe *M. tuberculosis*, de sélectionner des marqueurs moléculaires uniques, d'évolution unidirectionnelle et non soumis à une quelconque pression de sélection [7, 101]. Ces marqueurs

devraient par ailleurs idéalement disposer d'une « horloge moléculaire » stable, moins rapide que celle des marqueurs sélectionnés pour les études d'épidémiologie moléculaire.

5.3.2. Structure de la population et évolution des souches du complexe M. tuberculosis

5.3.2.1. Structure de la population de souches du complexe *M. tuberculosis*

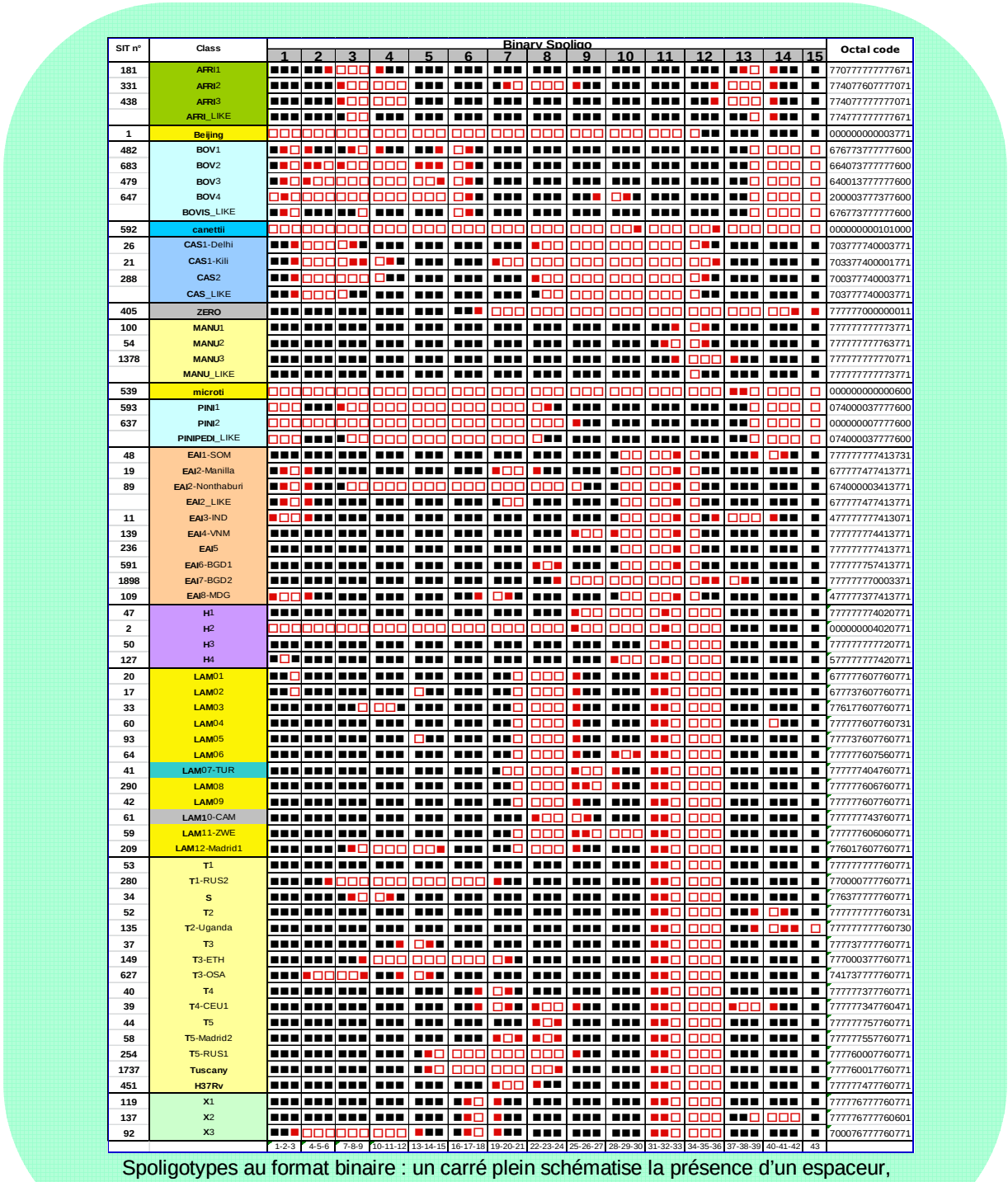
Plusieurs lignées génétiques ont été décrites en se basant sur l'étude de SNPs. Ainsi trois grands groupes génétiques ont été défini par Sreevatsan S. et al. (1997) [242], sur la base du polymorphisme nucléotidique du codon 463 du gène *katG* et le codon 95 du gène *gyrA* : les groupes génétiques principaux 1, 2, et 3 (Tableau 3).

	Groupe 1		**Groupe 2**	**Groupe 3**
Mutations	*katG* 463 CTG *gyrA* 95 ACC		*katG* 463 CGG *gyrA* 95 ACC	*katG* 463 CGG *gyrA* 95 AGC
	Groupe 1a	**Groupe 1b**		
	katG 203 ACT	*katG* 203 ACC	*katG* 203 ACC	*katG* 203 ACC

Tableau 3: Définition des trois Groupes Génétiques Principaux (PGG) selon le polymorphisme du codon 463 du gène *katG* et du codon 95 du gène *gyrA* [242]

De plus, l'étude de 230 SNP par Gutacker et al. [117, 118] a permis de définir au sein du complexe *M. tuberculosis* neuf groupes génétiques lesquels sont fortement corrélés aux quatre lignées définies par Baker et al. [16] ainsi qu'aux six « cluster group » décrits par Filliol et al. [95] en se basant sur l'étude de 212 SNP.

Par ailleurs, au sein du complexe *M. tuberculosis*, l'étude du locus DR, dont l'évolution par perte d'espaceurs est considérée comme unidirectionnelle et donc irréversible, permet de faire une distinction entre les différentes sous-espèces du complexe, à savoir *M. tuberculosis*, *M.* bovis, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. microti*, et *M. pinnipedii*. Au total, 62 lignées et sous-lignées ont été identifiées au sein du complexe *M. tuberculosis* sur la base de leur profil de spoligotypage, parfois en association avec d'autres marqueurs et en intégrant l'origine géographique des souches [36] (Tableau 4).



Spoligotypes au format binaire : un carré plein schématise la présence d'un espaceur, un carré vide son absence. Les signatures (présence et/ou absence spécifique d'espaceurs) des différentes lignées sont identifiées en rouge.

Tableau 4: Les 62 lignées identifiées par spoligotypage [36]

Ainsi, six lignées génétiques principales ont été identifiées pour les sous-espèces *M. tuberculosis* et *M. africanum* au sein du complexe *M. tuberculosis* de manière convergente par les différentes études basées sur les SNP [16, 95, 117, 118] ainsi que celles employant les LSP [101] et correspondent aux lignées: Indo océanique, Est asiatique, Est africaine et indienne, Euro américaine, Ouest africaine I et Ouest africaine II. Quatre de ces lignées concernent uniquement la sous-espèce *M. tuberculosis* (Figure 8).

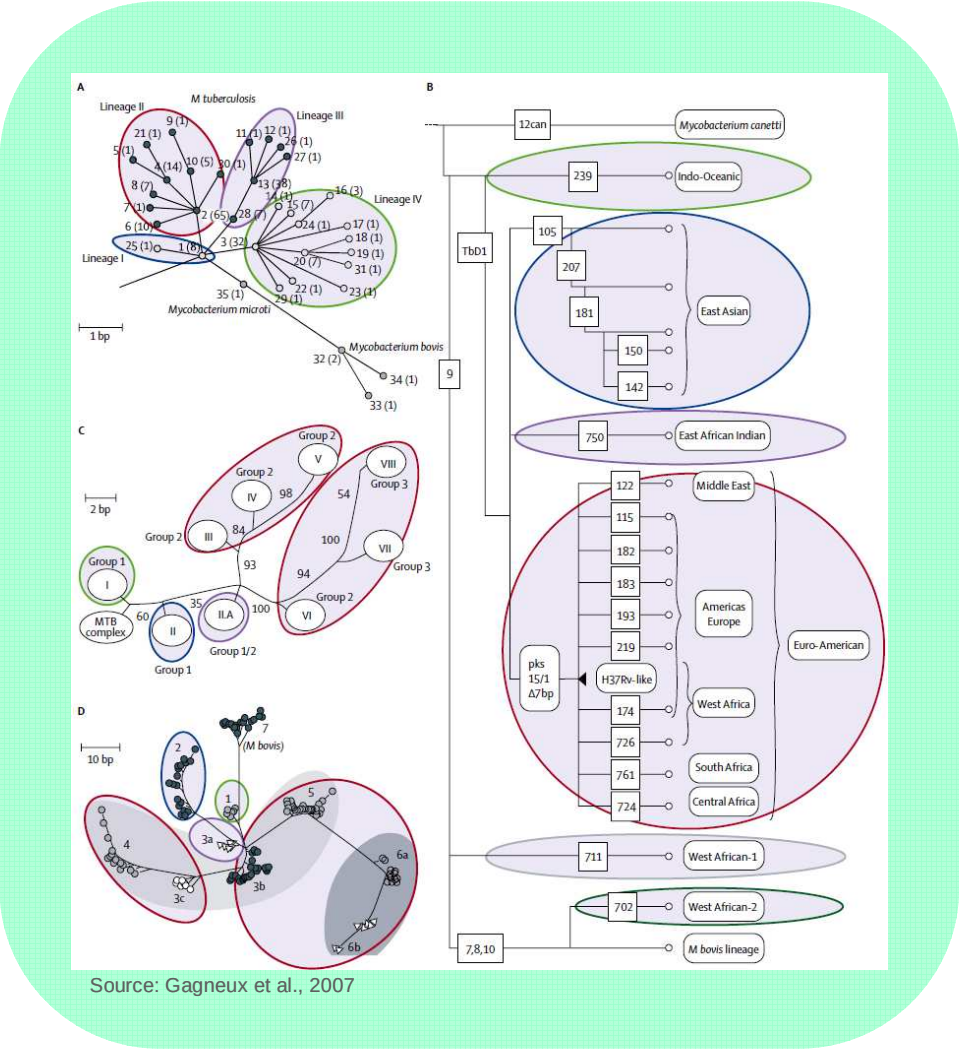


Figure 8: Comparaison de quatre phylogénies globales de *M. tuberculosis* basées sur: (A) une combinaisons de sSNP tels que définie par Backer et al., 2004 [16] ; (B) les marqueurs LSP (Gagneux et al., 2006 [101]) ; (C) le polymorphisme nucléotidique du codon 493 du gène *katG* et du codon 95du gène *gyrA* (Sreevatsan et al., 1997 [240]), une combinaison de SNP telle que présentée par Filliol et al., 2006 [95]

On parle pour ces lignées génétiques de distribution phylogéographique, la représentativité de ces différentes lignées variant selon la zone géographique considérée. Les souches de *M. tuberculosis* étant pathogènes strictes de l'homme, elles sont donc intimement associées aux mouvements migratoires des populations humaines. On suppose ainsi que les différentes lignées génétiques identifiées correspondraient

à une forme d'adaptabilité du pathogène à sa population d'hôte [101, 129], leur distribution suivant fidèlement celle de ces populations humaines (Figure 9).

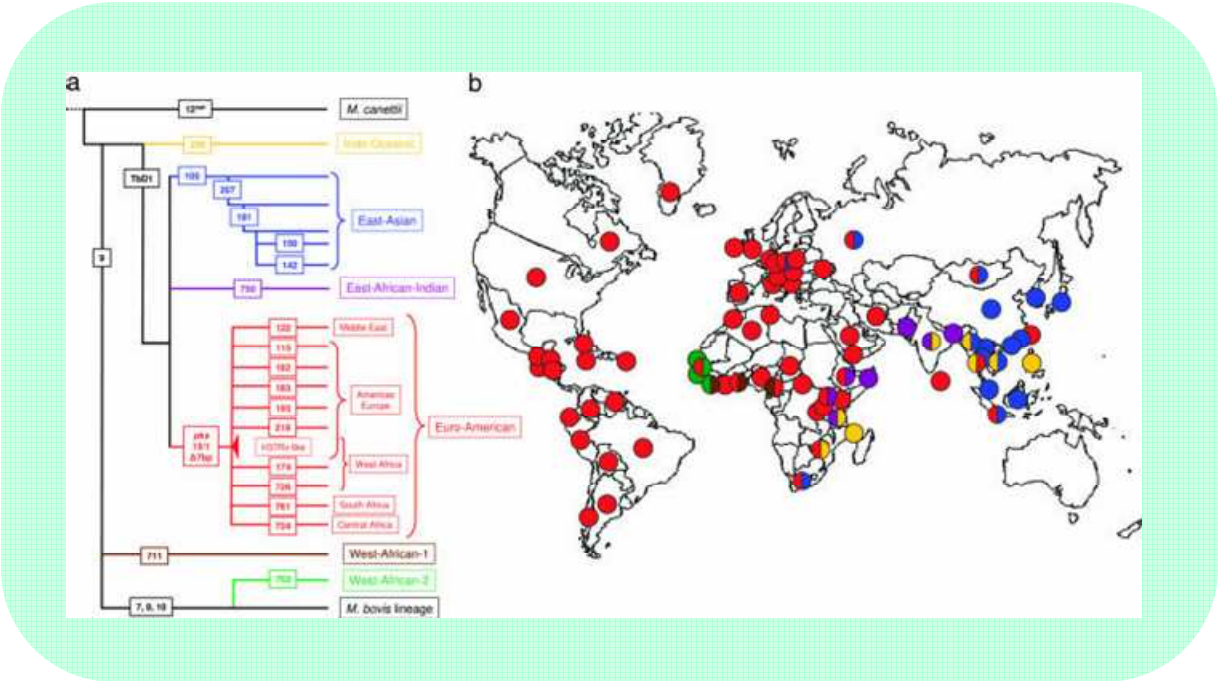


Figure 9: Distribution phylogéographique des souches du complexe *M. tuberculosis* (Gagneux et al., 2006 [101])

5.3.2.2. Evolution du complexe *M. tuberculosis*

Au sein du complexe *M. tuberculosis*, si la quasi-absence de diversité des séquences nucléotidiques observée révèle le très haut degré de clonalité des bacilles de ce complexe, on suppose qu'elle pourrait par ailleurs être le reflet d'une dissémination récente des bacilles tuberculeux et/ou de l'existence d'un « goulot d'étranglement » (« Bottleneck ») dans l'histoire évolutive du complexe *M. tuberculosis* estimé entre 15 000 et 20 000 ans auparavant [33, 145, 242].

L'évolution des souches du complexe *M. tuberculosis* a été décrite par Brosch et al. [33] sur la base de régions de délétions et du polymorphisme de cinq gènes spécifiques. Une distinction peut être faite entre les souches du complexe *M. tuberculosis* anciennes et modernes en fonction de la présence d'une région appelée TbD1 (Figure 10).

Par ailleurs, la présence de la région TbD1 et la délétion spécifique RD9 permettent de caractériser la branche de l'arbre phylogénétique distincte de celle comprenant les souches actuelles de *M. tuberculosis* et

comprenant les sous-espèces *M. africanum*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. caprae* et *M. bovis*. Chacune de ces sous-espèces seraient en effet spécifiques de leurs hôtes animaux auxquels ils se seraient adaptés [191].

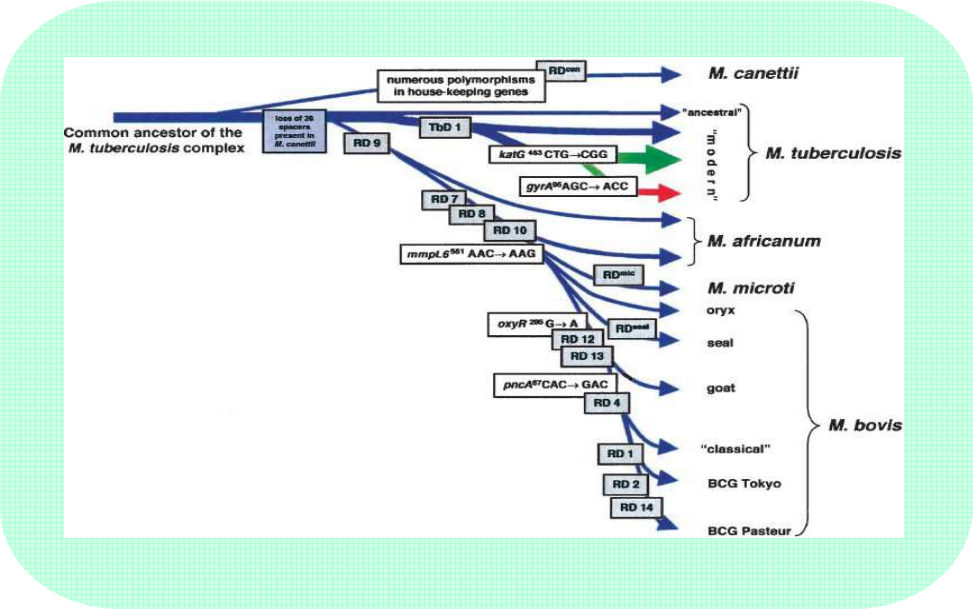


Figure 10: Chemin évolutif des bacilles tuberculeux proposé par Roland Brosch et al. (2002) [33] basé sur la présence ou l'absence de régions de délétions et le polymorphisme de 5 gènes spécifiques

Un cas particulier concerne la classification de la sous-espèce *M. africanum*. Initialement identifiée sur la base de propriétés biochimiques [192], il a été montré que la sous-espèce était elle même composée de 2 sous-lignées, *M. africanum* 1 et *M. africanum* 2 dont le génotypage et l'étude des LSP notamment a permis montrer qu'elles étaient phylogénétiquement distinctes. Ainsi, *M africanum* 2 correspondrait à une sous-lignée de *M. tuberculosis* sensu stricto tandis que *M. africanum* 1 serait associé à deux lignées du complexe *M. tuberculosis* [33, 101, 192].

5.3.3. Application du génotypage pour le suivi et la prise en charge des patients tuberculeux

Le génotypage des isolats cliniques collectés lors d'études d'épidémiologie moléculaire fournit un grand nombre d'informations exploitables dans de nombreuses situations [18, 275].

5.3.3.1. Détermination des cas de transmission récente

Le typage moléculaire d'isolats de *M. tuberculosis* et la comparaison des empreintes génétiques obtenues permettent d'identifier des souches dites « en grappe ». Une grappe se définit par au moins deux isolats avec des profils génétiques identiques ou très proches [18].

De cette observation, il est possible de distinguer, au sein d'une population, les cas de tuberculose correspondant à des réactivations d'anciennes infections de celles correspondant à des cas de transmission récentes. En effet, les cas de tuberculose isolés, c'est-à-dire présentant des profils génétiques uniques, non retrouvés dans la population étudiée, sont généralement considérés comme des cas de réactivation. A l'inverse, les souches en grappe ou présentant des profils de génotypage identiques ou très proches, sont généralement considérées comme des cas de transmission récente [6, 235].

Il existe plusieurs limites à ce concept, la notion de transmission récente devant être corroborée par des données épidémiologiques concernant les patients. Il a en effet été montré que des cas de tuberculose en grappe représentaient effectivement des cas de contamination récente en zone urbaine [19, 260] ce qui ne correspond pas à l'observation faite en milieu rural [31]) d'où l'importance de disposer de données épidémiologiques concernant les patients afin de pouvoir apprécier au mieux les cas de transmission récente. Par ailleurs, les modalités d'échantillonnage (durée, taille de l'échantillon, ...) et les outils de génotypage sélectionnés (nombre et types de marqueurs moléculaires) seraient aussi susceptibles d'influencer l'estimation des taux de transmission récente et de réactivation.

5.3.3.2. Identification des cas de rechute et de réinfection

Lors d'épisodes récurrents de tuberculose chez un patient, il est difficile voire impossible de différencier un cas de réactivation endogène d'une réinfection exogène en se basant uniquement sur les données cliniques, épidémiologiques et/ou microbiologiques [176]. Cependant, grâce aux outils de typage moléculaire, et lorsque les isolats cliniques de *M. tuberculosis* des épisodes successifs de tuberculose sont disponibles, les cas de réinfection peuvent être différenciés des cas de rechute. En effet, lors d'un second épisode de tuberculose chez un patient, la comparaison des profils génétiques des isolats de *M. tuberculosis* des épisodes successifs de tuberculose permet de distinguer une réactivation endogène ou rechute (les deux souches présentent les mêmes empreintes génétiques), d'une réinfection exogène à *M. tuberculosis* (les profils de génotypage sont différents) [18]).

Il est important de connaître, parmi les cas récurrents de tuberculose, la proportion de ceux correspondant à une réactivation endogène, pour une meilleure prise en charge des patients, et l'établissement de programmes de lutte adaptés contre la maladie. En effet, une rechute correspondant le plus souvent à une réactivation endogène d'un épisode de tuberculose suite à l'échec du traitement médicamenteux [171, 246],

il est crucial de pouvoir comprendre les raisons de cet échec (une des raisons pouvant être le développement d'une résistance) et d'éventuellement pouvoir adapter le traitement. L'existence de cas correspondant à des réinfections exogènes a longtemps été négligée, leur contribution exacte dans l'épidémie de tuberculose sévissant actuellement dans le monde restant encore mal connue. Il a néanmoins été montré que la proportion des rechutes par réinfection exogène est proportionnelle au taux d'incidence de la maladie dans une zone géographique ou une population donnée [51, 223, 274, 284].

5.3.3.3. Résistance aux antituberculeux

Les études d'épidémiologie moléculaire concernant les souches résistantes aux traitement médicamenteux permettent de mieux connaître la nature de souches résistantes en circulation (lignée génétique concernée par les résistances, mutations conférant la résistance), leur distribution dans une population donnée (association d'une mutation conférant une résistance à une population de patients ou une famille génétique par exemple) et d'identifier les facteurs de risque de contracter une souche résistante ou d'acquérir cette résistance [176].

Le génotypage permet notamment de distinguer les cas de résistance primaire des résistances secondaires ou acquises [167, 306]. En effet, le génotypage de souches isolées chez un même patient avec des profils de sensibilité aux antibiotiques différents permet de définir, si ces isolats sont identiques, une résistance acquise. En revanche, si les isolats sont différents, la résistance observée correspondra à une résistance primaire signifiant que le patient a été directement contaminé par une souche résistante. On comprendra l'importance de cette distinction dans l'établissement des programmes de lutte contre la tuberculose et de suivi des patients puisque dans le cadre d'une tuberculose primaire, il faudra identifier le cas source ainsi que les contacts éventuels afin de stopper la transmission du bacille résistant.

5.3.3.4. Contaminations croisées au laboratoire

On estime qu'environ 3% des cultures positives de *M. tuberculosis* correspondent à des contaminations croisées se produisant au sein du laboratoire, les patients concernés n'étant pas porteurs du bacille tuberculeux [18]. La contamination croisée d'échantillons biologiques de patients non porteurs de bacilles tuberculeux est d'autant plus problématique que l'examen bactériologique constitue la base du diagnostic de la tuberculose et que tout examen positif entrainera l'hospitalisation et/ou la mise sous traitement du patient. Une culture de *M. tuberculosis* correspond d'autant plus probablement à une contamination croisée que le frottis est négatif et qu'un seul échantillon est positif.

Intérêt et objectifs de notre recherche

Entre 2000 et 2020, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime que près d'un milliard de personnes seront nouvellement infectées par le bacille tuberculeux dont 35 millions mourront de la maladie si aucune amélioration n'est apportée dans le contrôle de cette infection. De plus, la co-infection TB/VIH et l'apparition de tuberculose multirésistante compliquent encore la gestion de la maladie ce qui constitue un réel problème de santé publique au niveau mondial et notamment dans la zone Caraïbe – Amérique latine. Dans ce contexte, le laboratoire de recherche et de référence sur la tuberculose et les mycobactéries de l'Institut Pasteur de la Guadeloupe (IPG) a développé une approche globale basée sur le diagnostic moléculaire de la tuberculose, la surveillance et l'étude de la résistance aux antibiotiques, le développement et la mise en place de méthodes de typage moléculaire pour la surveillance de la tuberculose et l'étude des filières de transmission. Cette approche se révèle très utile pour la surveillance épidémiologique de la tuberculose et l'étude des chaînes de transmission de la maladie au niveau local, régional et international.

L'ensemble de ce travail de thèse s'organise autour de trois axes portant sur la caractérisation de l'épidémie de tuberculose, la sélection de marqueurs moléculaires pour l'étude de la famille phylogénétique Beijing et une première étude de la biodiversité génotypique de la tuberculose dans la Caraïbe et les pays limitrophes. Les études effectuées permettent de mieux comprendre la situation épidémique de la tuberculose dans les zones géographiques étudiées et de disposer ainsi de données récentes pour l'élaboration de plans de lutte contre la maladie. Ce travail a par ailleurs permis d'évaluer un certain nombre de marqueurs moléculaires pour l'étude des clones tuberculeux de la famille Beijing prédominants dans de nombreuses régions du sud-est asiatique afin d'améliorer la discrimination de ces souches et de favoriser l'étude de leur transmission dans les régions où celles-ci sont largement prévalentes. Enfin nous disposons d'une meilleure connaissance des génotypes du bacille tuberculeux circulant actuellement dans le monde, puisque ce travail de thèse révèle désormais pour la première fois la diversité génétique des isolats cliniques de *M. tuberculosis* collectés dans la région Caraïbe – Amérique latine.

(i) La première partie de ce travail porte sur l'épidémiologie moléculaire de la tuberculose en se basant sur plusieurs modèles : insulaire vs continental, à faible et forte endémicité de tuberculose (TB). Dans les trois Départements Français d'Amérique (DFA), les données épidémiologiques collectées sur une période de deux ans (2004-2005), nous ont permis de caractériser les populations de patients tuberculeux de

Guadeloupe et de Martinique, territoires insulaires à faible incidence de TB (autour de 7 cas / 100 000 habitants) ainsi que de Guyane française, territoire continental où l'incidence TB, probablement sous évaluée, dépasse néanmoins les 40 cas pour 100 000 habitants. Nous avons par ailleurs cherché à améliorer la stratégie de typage des souches isolées dans les trois DFA et avons ainsi testés l'apport du typage des 12-locus MIRU-VNTR au spoligotypage pour les souches circulant dans cette zone géographique.

- Dans un contexte de recrudescence des cas de tuberculose en Guadeloupe depuis 2003, nous avons souhaité disposer d'une meilleure connaissance de l'épidémiologie des nouveaux cas de tuberculose dans ce département. Une étude prospective a été conduite de 1999 à 2005 afin de décrire la population des malades tuberculeux, d'estimer la part des infections récentes et les facteurs associés à ces infections récentes, et d'évaluer l'apport de la biologie moléculaire dans la reconstitution des filières de contamination. Le travail visait également à développer les liens partenariaux entre les différents acteurs de la lutte anti-tuberculeuse en Guadeloupe.

- Enfin, nos études d'épidémiologie moléculaire ont portées sur l'épidémie de tuberculose dans un pays à faible endémicité, la Suède. Nous nous sommes intéressés à l'impact des cas de tuberculose d'importation dans ce pays par l'étude comparative des données épidémiologiques des patients, des manifestations cliniques de la maladie, des profils génotypiques des bacilles tuberculeux entre les différents groupes de patients tuberculeux.

(ii) Afin de mieux comprendre l'épidémie actuelle de tuberculose qui sévit dans le monde il est important de pouvoir définir les filières de transmission et donc de disposer d'outils performants de caractérisation des bacilles tuberculeux circulant mondialement. Dans ce cadre, nous nous sommes intéressés aux bacilles tuberculeux de la famille Beijing prévalents dans le sud-est asiatique et pouvant représenter jusqu'à 90% des cas de tuberculose dans cette région. Les isolats cliniques de cette famille phylogénétiques étant particulièrement difficiles à distinguer par les outils classiques de génotypage actuellement utilisés, nous avons souhaité évaluer de nouveaux marqueurs minisatellites préalablement sélectionnés pour leur pouvoir discriminant élevé. Ces études d'évaluation de nouveaux marqueurs ont porté sur des isolats cliniques de la famille Beijing collectés à au Japon (Okinawa) ainsi que dans plusieurs provinces de Russie. Nous avons enfin étudié la structure de la population de souches de la famille Beijing au Japon (Okinawa et Kobe) en nous basant sur les profils de génotypage obtenus par l'étude des 12, 15 et 24 locus MIRU-VNTR.

(iii) Le développement d'un réseau de contrôle et de surveillance de la tuberculose dans la Caraïbe semble primordial pour renforcer le potentiel de diagnostic et de recherche des laboratoires de cette zone

géographique et ainsi combattre au mieux la maladie. Dans ce cadre, nous avons souhaité dresser une première cartographie de l'état actuel de la tuberculose dans 12 pays de la zone Caraïbe (Bahamas, Barbade, Belize, Dominique, Guyana, Jamaïque, St Kitts et Nevis, Ste Lucie, Suriname, Trinidad et Tobago, les îles Turques et Caïques, St Vincent). Par conséquent, une première étude collaborative de la biodiversité génotypique de la tuberculose dans ces pays a consisté à génotyper les isolats cliniques collectés chez des patients tuberculeux entre septembre 2006 et août 2008. Un volet de ce travail s'est par ailleurs axé sur l'épidémie de tuberculose à Trinidad et Tobago et a permis de mettre en évidence l'unicité de la structure de la population de bacille tuberculeux dans cette île ainsi que l'existence d'un clone bactérien spécifique de Trinidad et Tobago.

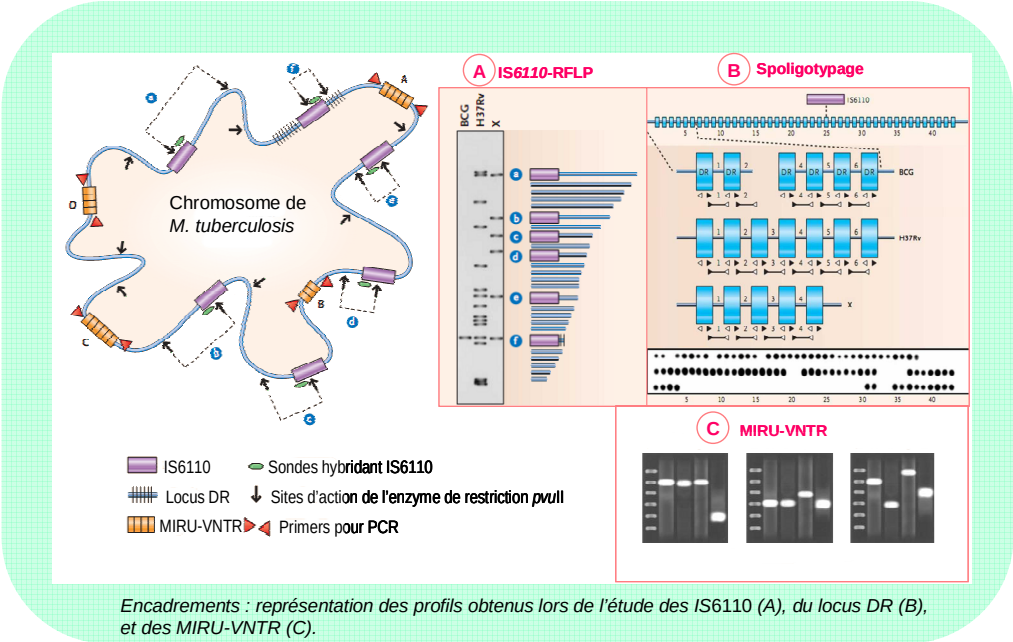
Les résultats obtenus à travers ce travail de thèse fournissent une meilleure vue de l'épidémie de tuberculose sévissant actuellement dans le monde et particulièrement dans la Caraïbe et contribuent à la sélection de marqueurs génétiques pour l'étude moléculaire des souches du complexe *M. tuberculosis* notamment celles de la famille phylogénétique Beijing.

Matériel et Méthodes

1. Génotypage

Au cours de ce travail de thèse, le génotypage des souches de M. tuberculosis s'est appuyé sur trois marqueurs moléculaires principaux (Figure 11) :

- l'élément d'insertion IS*6110* présent en nombre et en position variable selon les souches de *M. tuberculosis*,
- le locus DR et notamment la détection de la présence ou de l'absence de séquences inter-DR uniques et séparées les unes des autres par des séquences DR répétées et invariables,
- les minisatellites, séquences répétées en tandem, dispersées dans les régions intergéniques et dont le nombre de séquences répétées par locus est variable d'une souche à l'autre.



Encadrements : représentation des profils obtenus lors de l'étude des IS6110 (A), du locus DR (B), et des MIRU-VNTR (C).

Figure 11: Représentation du chromosome de *M. tuberculosis* avec la localisation de trois principaux marqueurs de génotypage : les séquences d'insertion IS6110, le locus DR, et les minisatellites MIRU-VNTR (d'après Barnes et al., 2003 [18])

1.1. Extraction d'ADN

L'ADN mycobactérien est extrait au cétyl-triméthyl-ammonium-bromide (N-cétyl-N,N,N,-triméthyl-ammonium bromide) (CTAB) selon le protocole mis en place et décrit par van Soolingen et al. (1994) [276]. A partir de cultures ayant poussé sur milieu solide (milieu de Löwenstein-Jensen ou Middlebrook 7H11), quelques colonies sont prélevées et lysées par ajout de lysozyme (10 mg/ml) et de protéinase K (10 mg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). L'ADN est ensuite séparé des débris cellulaires et des protéines par utilisation de NaCl 5 M et de NaCl/CTAB (NaCl 0,73 M ; CTAB 10% poids/volume) puis isolé au chloroforme : alcool isoamylique 24 : 1 (v/v). Le mélange biphasique permet de récupérer l'ADN dans la phase supérieure pour ensuite le précipiter au propan-2-ol.

1.2. IS6110-RFLP

1.2.1. Préparation de la sonde de détection de l'IS6110

La sonde est préparée par amplification d'un fragment de 245 pb localisé dans une séquence d'insertion IS*6110* de la souche de référence *M. tuberculosis* MT14323. Pour l'amplification environ 10 ng d'ADN de la souche MT14323 sont ajoutés à 40 µl d'un mélange réactionnel comprenant 5 µl de tampon (10 X) de la Taq polymérase, 1,5 µl de chlorure de magnésium (MgCl2, 50 mM), 1 µl de chaque amorce (INS1 : 5'-CGTGAGGGCATCGAGGTGGC-3' et INS2 : 5'-GCGTAGGCGTCGGTGACAAA-3') [271] à 50 µM chacune, de 5 µl de diméthylsulfoxyde 100 % (DMSO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 1 µl d'une solution de dNTP à 10 mM, 2,5 U de rTaq (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) et de l'eau ultra-pure (qsp 40 µl).Pour l'amplification, après une phase de dénaturation initiale de 7 min à 94°C puis 40 cycles de 1 min à 94°C, 1 min à 55°C et 1 min à 72°C, suivis d'une phase d'extension finale de 10 min à 72°C.Le contrôle de l'amplification s'effectue par électrophorèse d'1 µl de produit de PCR sur gel d'agarose à 2% (Invitrogen, Carlsbad, USA). Les sondes obtenues sont ensuite marquées à la peroxydase grâce au kit ECL RPN3000 (Amersham), conformément aux instructions du fabricant.

1.2.2. Digestion de l'ADN génomique

Environ 5 µg d'ADN génomique extrait par CTAB sont digérés une nuit entière à 37°C par 50 U d'enzyme de restriction PvuII (Gibco BRL), dont les sites de restriction, CAG/CTG *ou* GTC/CAG sont présents dans les séquences d'insertion IS6110.

1.2.3. Electrophorèse des produits de digestion

Suite à la digestion, environ 1 µg d'ADN digéré est séparé par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8% (poids/volume), préparé dans du TBE (Tris-Borate-EDTA), à 40 V pendant une nuit. Cette électrophorèse permet de séparer les différents fragments d'ADN obtenus après digestion préparant ainsi l'étape de Southern Blot suivante.

1.2.4. Transfert sur membrane (Southern Blot)

Une étape de Southern blot permet d'effectuer le transfert des produits de digestion sur une membrane Hybond N+ (Amersham, England), après dépurination, dénaturation et neutralisation du gel. La dépurination est un lavage du gel dans 1 litre d'une solution d'HCl à 0,2 M pendant 10 min, la dénaturation un lavage dans une solution de 0,5 M de NaOH et 1,5 M de NaCl pendant 40 min, et la neutralisation un lavage dans une solution de 1,5 M de NaCl et 1 M de Tris (pH 8,00) pendant 40 min. Dépurination, dénaturation et neutralisation ont lieu sous agitation douce à température ambiante.
Le southern-blotting s'effectue dans un bain de SSC 10X (Standard Sodium Citrate) pendant au moins 4 heures. Les ADN ainsi transférés sont fixés sur la membrane par exposition de la membrane à la lumière ultra-violette, 4 min à 365 nm ou 1 min à 254 nm.

1.2.5. Hybridation et détection des IS

L'hybridation de la sonde avec l'ADN transféré sur la membrane s'effectue grâce au kit ECL conformément aux instructions du fabricant. Dans un premier temps, la membrane est dans un pré-hybridée pendant 45 à 60 min dans un tampon d'hybridation (Amersham) puis hybridée avec la sonde préalablement marqué à la peroxydase pendant 1 nuit à 42°C dans une bouteille rotative.
Après lavages de la membrane dans deux bains successifs de SSC 0,5X – SDS 0,4% et SSC 2X, la membrane est incubée dans 30 ml d'un réactif de détection du kit ECL préparé extemporanément et exposition d'un Hyperfilm ECL (Amersham) avec la membrane pendant une nuit.

1.3. Spoligotypage

Le spoligotypage est une méthode de génotypage du locus DR des mycobactéries du complexe *M. tuberculosis* basée sur l'hybridation inverse de produits de PCR ciblant le locus DR avec des sondes

correspondant aux espaceurs du locus DR préalablement fixées sur une membrane. La méthode est pratiquée au laboratoire selon la méthode publiée [144] et avec quelques modifications [272].

1.3.1. Préparation de la membrane

Grâce à leur terminaison 5'-amine, les oligonucléotides sont fixées de manière covalente à une membrane de nylon Biodyne C (Pall Biosuppport, Portsmouth, England) préalablement activée par incubation dans de l'EDAC (N-Ethyl-N′-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide) à 16% (poids/volume). Par ce procédé, la membrane peut ainsi être hybridée, deshybridée et réhybridée plusieurs fois (plus de 10 fois) sans altération de la qualité du signal. Après activation la membrane, celle-ci est rincée et placée dans un miniblotter (système Miniblotter 45, Immunetics, Cambridge, USA). Les 43 puits sont remplis avec 150 µl d'oligonucléotides dilués dans du NaHCO3 (500 mM, pH 8,4). Après le dépôt, la membrane est rincée et inactivée à la soude 100 mM pendant 10 minutes puis lavée sous agitation à 60 °C dans 250 ml de tampon SSPE (Standard Sodium Phosphate – EDTA) 2X – 10% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) pendant 10 minutes (2 fois) et rincée dans 250 ml d'EDTA à 20 mM (pH 8,0) pendant 15 minutes (2 fois) pour finalement être stockée à +4°C dans un emballage évitant son dessèchement.

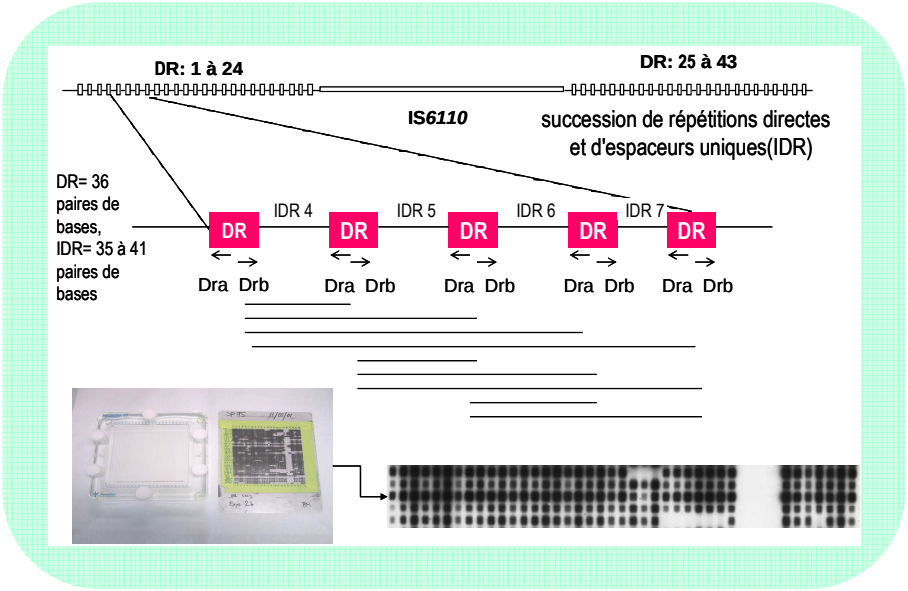


Figure 12: Étapes du spoligotypage mis au point par Kamerkeek et al. (1997) [144]

1.3.2. L'amplification

L'amplification utilise deux amorces complémentaires de la partie conservée de la région DR, Dra (5'-GGTTTTGGGTCTGACGAC-3') et Drb (5'-CCGAGAGGGGACGGAAAC-3'), dirigées vers l'extérieur, qui amplifient les séquences Inter-DR (Figure 12). L'amorce Dra est marquée à la biotine. La biotine se lie à la streptavidine qui, couplée à la peroxydase, permet la détection des produits d'amplification après leur hybridation avec les sondes fixées sur la membrane. Pour l'amplification, 48 µl d'un mélange réactionnel sont préparés auxquels sont ajoutés de 20 à 200ng d'ADN. Le mélange réactionnel contient 5 µl de tampon de réaction de l'enzyme (10X), du magnésium à la concentration finale de 7mM, 1µl d'amorce Dra et 1 µl d'amorce Drb (20 pmol/µl chaque amorce), 0,5 µl de dNTP (25 mM, Fermentas Life Sciences, INC.), 2,5 Unités de HotStart Taq Polymerase (QIAGEN, INC.) ainsi que 10 µl de Q-solution (5X). Les cycles d'amplification sont les suivants : une dénaturation initiale de 15 minutes à 95°C puis 35 cycles comportant une dénaturation d'une minute à 94°C, l'hybridation à 54°C pendant 1 minute et l'élongation à 72°C pendant 10 minutes. Enfin l'amplification s'achève par une élongation finale à 72°C pendant 10 minutes.

1.3.3. L'hybridation

Vingt-cinq microlitres de produits de PCR sont dilués dans 145 µl d'un tampon de 2X SSPE – 0,1% SDS. Les dilutions ainsi obtenues sont chauffées à 100 °C pendant 10 minutes afin de séparer les dimères de produits de PCR puis refroidies et déposées sur la membrane préalablement lavée dans 2 bains successifs (5 min par bain) de 2X SSPE – 0,1 % SDS à 60°C. Une fois les produits de PCR en contact avec la membrane, celle-ci est placée à 60°C dans un four à sec pendant 1h30 pour l'hybridation. Au terme de cette phase, les produits de PCR sont éliminés et la membrane rincée dans 2 bains successifs (5 min par bain) de 2X SSPE – 0,5 % SDS à 60°C sous agitation. Afin de pouvoir détecter la présence de produits de PCR fixés à la membrane, 14 µl d'une solution de 2X SSPE – 0,5% SDS contenant 3 µl de streptavidine peroxydase sont préparés et incubés à 42°C (maximum) avec la membrane pendant environ 1 heure. La streptavidine-peroxydase se lie alors aux fonctions amine des produits de PCR, permettant de révéler la présence de produits d'amplification après interaction de la peroxydase avec de l'ECL (Enhanced Chemo-Luminescence Detection kit ; Amersham). La chimioluminescence ainsi générée est détectée par exposition d'Hyperfilms ECL (Amersham) avec la membrane une nuit complète à 37°C et révélation du film obtenu par des produits standards de photographie (révélateur, fixateur, KODAK).

1.4. MIRU-VNTR

Cette méthode est basée sur l'amplification par PCR de minisatellites, en utilisant des amorces spécifiques de chaque locus et sur la détermination de la taille des produits de PCR obtenus, la taille des amplicons reflétant le nombre de répétitions au niveau des locus respectifs (Tableau 5). La composition des mélanges réactionnels des PCR ainsi que les paramètres des cycles d'amplification diffèrent selon le locus étudié.

1.4.1. Amplification

1.4.1.1. 5 ETR et 12-locus MIRU-VNTR

Pour l'amplification, de 20 à 40 ng d'ADN sont ajoutés à 29 µl d'un mélange réactionnel comportant 3 µl de tampon de réaction de l'enzyme, 1,2 µl de $MgCl_2$ (50 mM), 2 µl de chaque amorce (sens et anti-sens, 4 µM chaque amorce), 3 µl de DMSO 100 % (Sigma-Aldrich, St Louis, USA), 0,6 µl d'un mélange de dNTP (25 mM) (Qbiogene), 0,5 U de rTaq (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) et de l'eau ultra-pure (qsp 29 µl). Les cycles d'amplification sont les suivants : une dénaturation initiale de 10 min à 94°C, suivie de 35 cycles comportant une phase de dénaturation de 30s à 94°C, puis l'hybridation d'1 minute à 60°C et l'élongation de 2 minutes à 72 °C et pour finir une phase d'élongation terminale de 10 min à 72°C.

1.4.1.2. QUB 11a, 11b, 18, 26, 1451, 1895 et 4156

Pour l'amplification, de 20 à 40 ng d'ADN sont ajoutés à 29 µl d'un mélange réactionnel comportant 3 µl de tampon de réaction de l'enzyme, 2 µl de chaque amorce (20 µM chaque amorce), 3 µl de DMSO 100 %, 1 µl d'un mélange de dNTP (25 mM chaque dNTP), 0,5 U de rTaq et de l'eau ultra-pure (qsp 29 µl). La concentration finale de $MgCl_2$ varie d'un mélange réactionnel à l'autre. Elle est de 1,7 mM pour les QUB 1451, 1895 et 4156 et de 2 mM pour les QUB 11a, 11b, 18 et 26. Les cycles d'amplification sont similaires à ceux décrits pour les 12 MIRU et les 5 ETR pour les QUB 1451, 1895 et 4156 tandis que la température d'hybridation est modifiée, 55°C au lieu de 60°C, pour les QUB 11a, 11b, 18 et 26.

1.4.1.3. Pour les Mtub 04 et 21, 29 et 34, 30 et 39

Pour l'amplification, de 20 à 40 ng d'ADN sont ajoutés à 29 µl d'un mélange réactionnel comportant 3 µl de tampon de réaction de l'enzyme, 2 µl de chaque amorce (4 µM chaque amorce), 3 µl de DMSO 100 % (DMSO), 0,6 µl d'un mélange de dNTP (25 mM chaque dNTP) (Qbiogen), 0,5 U de rTaq et de l'eau ultra-pure (qsp 29 µl). La concentration finale de $MgCl_2$ varie d'un mélange réactionnel à l'autre. Elle est de 1,5 mM pour les Mtub 04 et 21, de 2 mM pour les Mtub 29 et 34 et de 3 mM pour les Mtub 30 et 39. Les

cycles d'amplification sont identiques à ceux décrits pour les 12 MIRU et les 5 ETR pour les Mtub 04, 21, 30 et 39, tandis que la température d'hybridation est de 59°C pour les Mtub 29 et 34.

Locus	Nom	Taille (pb)	Amorces (données dans le sens 5'-3')	Combinaisons de marqueurs minisatellites				
				5-loci VNTR	12-loci MIRU-VNTR	15-loci MIRU-VNTR	24-loci MIRU-VNTR	Loci HV
154	MIRU 2	53	TGGACTTGCAGCAATGGACCAACT TACTCGGACGCCGGCTCAAAAT		X		X	
580	MIRU 4; ETR D	77	GCGCGAGAGCCCGAACTGC GCGCAGCAGAAACGCCAGC	X	X	X	X	
960	MIRU 10	53	GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT		X	X	X	
1644	MIRU 16	53	TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA CCCGTCGTGCAGCCCTGGTAC		X	X	X	
2059	MIRU 20	77	TCGGAGAGATGCCCTTCGAGTTAG GGAGACCGCGACCAGGTACTTGTA		X		X	
2531	MIRU 23	53	CTGTCGATGGCCGCAACAAAACG AGCTCAACGGGTTCGCCCTTTTGTC		X		X	
2687	MIRU 24	54	CGACCAAGATGTGCAGGAATACAT GGGCGAGTTGAGCTCACAGAA		X		X	
2996	MIRU 26	51	TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC CATAGGCGACCAGGCGAATAG		X	X	X	
3007	MIRU 27; QUB 5	53	TCGAAAGCCTCTGCGTGCCAGTAA GCGATGTGAGCGTGCCACTCAA		X		X	
3192	MIRU 31; ETR E	53	ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA GTGCCGACGTGGTCTTGAT	X	X	X	X	
4348	MIRU 39	53	CGCATCGACAAACTGGAGCCAAAC CGGAAACGTCTACGCCCCACACAT		X		X	
802	MIRU 40	54	GGGTTGCTGGATGACAACGTGT GGGTGATCTCGGCGAAATCAGATA		X	X	X	
2165	ETR A	75	AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT CGAAGCCTGGGGTGCCCGCGATTT	X		X	X	
2461	ETR B	57	ATGGCCACCCGATACCGCTTCAGT CGACGGGCCATCTTGGATCAGCTAC	X			X	
577	ETR C	58	CGAGAGTGGCAGTGGCGGTTATCT AATGACTTGAACGCGCAAATTGTGA	X		X	X	
2163a	QUB 11a	69	CCCATCCCGCTTAGCACATTCGTA TTCAGGGGGGATCCGGGA					
2163b	QUB 11b	69	CGTAAGGGGGATGCGGGAAATAGG CGAAGTGAATGGTGGCAT			X	X	
1982	QUB 18	78	GGCAACTGAAAGCCGCTT AATACCGGGGATATCGGT					
4052	QUB 26	111	AACGCTCAGCTGTCGGAT GGCCAGGTCCTTCCCGAT			X	X	
1451	QUB 1451	57	GGTAGCCGTCGTCGAGAAGC CGCCACCACCGCACTGGC					
1895	QUB 1895	57	GGTGCACGGCCTCGGCTCC AAGCCCCCGCCGCCAATCAA					
3232	QUB 3232	56	CCCCAGCCTTACGACTGA GTCGGGCTTGGTGAAGG					X
4156	QUB 4156	59	CTGGTCGCTACGCATCGTG TGGTGGTCGACTTGCCGTTGG			X	X	
424	Mtub 04	51	CTTGGCCGGCATCAAGCGCATTATT GGCAGCAGAGCCCGGGATTCTTC			X	X	
1955	Mtub 21	57	AGATCCCAGTTGTCGTCGTC CCACATCGCCTGGTTCTGTA			X	X	
2347	Mtub 29	57	GCCAGCCGCCGTGCATAAACCT AGCCACCCGGTGTGCCTTGTATGAC				X	
2401	Mtub 30	58	CTTGAAGCCCCGGTCTCATCTGT ACTTGAACCCCCACGCCCATTAGTA			X	X	
3171	Mtub 34	54	GGTGCGCACCTGCTCCAGATAA GGCTCTCATTGCTGGAGGGTTGTAC				X	
3690	Mtub 39	58	CGGTGGAGGCGATGAACGTCTTC TAGAGCGGCACGGGGGAAAGCTTAG			X	X	
3820	VNTR 3820	57	ACCTTCATCCTTGGCGAC TGCGCGGTGAATGAGACG					X
4120	VNTR 4120	57	GTTCACCGGAGCCAACC GAGGTGGTTTCGTGGTCG					X

D'après Frothingham et al., 1998 [99], Iwamoto et al., 2007 [141], Le Flèche et al., 2002 [162], Roring et al., 2002 [224], Skuce et al. 2002 [222], Smittipat et al., 2000 [237], Supply et al., 2001 [251], Supply et al., 2006 [250]

Tableau 5 : Liste des marqueurs minisatellites (locus et nom) étudiés pour le génotypage de *M. tuberculosis*

1.4.2. Détermination du nombre de copies.

Les produits de PCR sont ensuite déposés sur gel d'agarose ultra-pure à 2% (poids/volume) pour électrophorèse. Après migration et coloration au Bromure d'Ethidium (BET), la taille des amplicons est déterminée relativement à un marqueur de poids moléculaire (100 bp DNA Ladder, Invitrogen, Carlsbad, USA) déposé simultanément aux produits de PCR sur le gel d'agarose. Une correspondance a été établie entre la taille des amplicons et le nombre de copies des séquences répétées pour chaque locus relativement à la souche de référence H37Rv.

1.5. Etude de la région NTF

La détection du nombre d'insertion d'IS*6110* dans la région NTF du génome des souches de *M. tuberculosis* de la famille génétique Beijing a été réalisée par amplification de deux régions de ce locus en se référant au protocole décrit par Plikaytis et al. [213] avec les modifications apportées par Wada et al. [286]. Deux régions du locus NTF ont été amplifiées par PCR avec les couples d'amorces suivants :
MDR6-F (5'-CCAGATATCGGGTGTGTCGAC-3') (Plikaytis et al. [213])
MDR6-R (5'-TGCCGTTGTCGAAATCTAAACCC-3') (Wada et al. [286])
et
MDR7-F (5'-CGCGAGATCTCATCGACAACC-3') (Plikaytis et al. [213])
MDR7-R (5'-GTACGAAACAGCACGGTGCGG-3') (Wada et al. [286]).

Pour l'amplification, de 20 à 40 ng d'ADN sont ajoutés à 20 µl d'un mélange réactionnel comportant 2,2 µl de tampon de réaction de l'enzyme, 1,3 µl de $MgCl_2$ (25 mM), 1,1 µl de chaque amorce (20 µM chaque amorce), 2,2 µl de DMSO 100%, 0,7 µl d'un mélange de dNTP (25 mM chaque dNTP), 0,2 µl de rTaq et de l'eau ultra-pure (qsp 20 µl). Les cycles d'amplification sont les suivants : une dénaturation initiale de 5 min à 95°C, suivie de 40 cycles comportant une phase de dénaturation de 30s à 94°C, puis l'hybridation d'1 min à 60°C et l'élongation de 1 min et 30 secondes à 72 °C et pour finir une phase d'élongation terminale de 10 min à 72°C. L'obtention d'un produit d'amplification de 1,5 kb avec les amorces MDR6-7 et MDR6-R signifie la présence d'un IS*6110* dans la région NTF du génome caractérisant ainsi les Beijing modernes, tandis qu'un produit d'amplification de 302 pb correspond à l'absence d'IS6110 dans cette région du génome caractérisant ainsi les Beijing anciennes. L'amplification de la région NTF des souches Beijing modernes avec les amorces MDR7-F et MDR7-R permet de distinguer les souches W/Beijing pour lesquelles une deuxième insertion d'IS6110 a été relevée aboutissant à l'obtention d'un amplicon de 1,5 kb (amplicon de 280 pb pour les souches Beijing modernes non-W/Beijing).

2. Exploitation des données épidémiologiques et des profils de génotypage obtenus

2.1. Analyses statistiques

Pour l'ensemble des études réalisées, les proportions sont comparées par le test du chi carré de Pearson, et les moyennes par le test T de Student. Pour toute mesure d'association entre une manifestation de la tuberculose et un facteur d'exposition, nous avons utilisé l'Odds Ratio (OR).

2.2. Calcul du pouvoir de discrimination ou index de Hunter-Gaston (HGDI)

L'index de Hunter-Gaston permet d'évaluer le pouvoir discriminant des marqueurs génétique [133]. Il est calculé selon la formule suivante :

$$HGDI = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^{S} n_j (n_j - 1)$$

Où N est le nombre total de souches dans la population étudiée, S est le nombre total de types décrits, et n_j est le nombre de souches appartenant au $j^{ème}$ type.

2.3. Calcul des taux de souches en grappes et de transmission récente

Une grappe est constituée lorsqu'au moins deux souches présentent des profils génétiques identiques, que ces profils soient établis à partir d'une méthode unique de génotypage (IS*6110*-RFLP, spoligotypage ou typage des minisatellites VNTR) ou par la combinaison de celles-ci. Il est ainsi possible d'estimer le taux de transmission récente selon la méthode dite « n-1 » avec la formule suivante :

$$\text{Taux de transmission récente} = \frac{[(\text{Nombre de souches en grappe}) - (\text{Nombre de grappes})]}{\text{Nombre total de souches}}$$

Cette méthode considère qu'il existe un cas index (ou source) par grappe, déduit du décompte des cas de transmission active de la maladie [6].

Le taux de souches en grappe permet d'estimer le nombre de patients inclus dans une chaîne de transmission et se calcule par la formule « n » :

$$\text{Taux de souches en grappe} = \frac{\text{Nombre de souches en grappe}}{\text{Nombre total de souches}}$$

2.4. Les bases de données de génotypage du bacille tuberculeux : SpolDB4 et SITVIT2

Le laboratoire de recherche sur la Tuberculose et les Mycobactéries de l'Institut Pasteur de la Guadeloupe a développé depuis 2001 des bases de données internationales sur le polymorphisme génétique des bacilles tuberculeux afin de pouvoir disposer de nouveaux outils de détection de clones émergent et de suivi des principaux génotypes de bacilles tuberculeux circulant dans le monde. La première base de données, en 2001, comportait 700 profils de spoligotypage et 53 types distincts, la seconde publiée en 2001 comportait 3319 profils regroupés en 259 types [238], la troisième publiée en 2002, 11708 profils et 813 types [92, 93] et enfin la quatrième, publiée en 2006, est la base de donnée SpolDB4 décrite ci-après.

2.4.1. Présentation générale

2.4.1.1. SpolDB4.

SpolDB4 est la version publiée en 2006 de notre base de données génotypes du bacille *M. tuberculosis*, contenant les profils de spoligotypage de 39.295 isolats provenant de 122 pays d'isolement et comprenant 1939 types [36]. Cette base de données, malgré un déséquilibre dans le recrutement des cas au niveau mondial, avec une surreprésentation des souches provenant d'Europe et d'Amérique du nord (65.5% des souches), ainsi que des souches *M. bovis* en Europe et en Amérique du sud (30 et 25% des souches respectivement), constitue une première description de la distribution mondiale des profils génétiques de *M. tuberculosis*.

2.4.1.2. SITVIT2

SITVIT2 correspond à la version actualisée de notre base de données et constitue à ce jour la plus grande base de données mondiale de génotypes du bacille tuberculeux. Comparativement à l'ancienne base de données, SpolDB4, cette nouvelle version comporte, en plus des nouveaux marqueurs génétiques 5 ETR,

12-locus MIRU-VNTR, les données concernant l'année, le lieu d'isolement et les profils de résistance aux antituberculeux des souches, ainsi que l'origine géographique des patients donnant ainsi accès à des analyses plus fines de distribution et de transmission des bacilles tuberculeux. De plus, la base de donnée est évolutive puisque de nouveaux marqueurs peuvent désormais y être intégrés tels que les 15 et 24-locus MIRU-VNTR, ou encore les SNPs et les RD.

2.4.2. Entrée, analyse et exploitation des données

2.4.2.1. Entrée de données

Les profils de génotypage obtenus sont retranscrits dans un fichier Excel afin d'être entrés dans la base de données : les spoligotypes sont retranscrits sous forme d'un code binaire à 43 items correspondant aux 43 espaceurs, chaque item pouvant prendre l'état « présent » ou « absent » (Figure 13), les profils 5-ETR et 12-locus MIRU-VNTR sont retranscrits sous forme de codes à 5 et 12 chiffres respectivement, chaque chiffre correspondant au nombre de copies de séquences répétées observé pour chacun des locus (ETR-A, B, C, D et E pour les 5-ETR et MIRU 2, 4, 10, 16, 20, 23, 24, 26, 27, 31, 39 et 40 pour les 12-locus MIRU-VNTR).

L'entrée de nouveaux profils de génotypage dans la base de données SITVIT2 se fait par fichier Excel pré-formaté avec des données requises obligatoires pour la constitution de la clef primaire d'identification appelée dans notre base de données « ISO number ». Ce numéro unique est attribué à chaque nouvelle entrée dans la base de données et contient les informations relatives au pays d'isolement de la souche, à l'année d'isolement, à l'investigateur et à son laboratoire de rattachement, ainsi qu'au numéro de la souche.

Dans la base de données un numéro de SIT (Spoligotype International Type), de MIT (MIRU International Type) et de VIT (VNTR International Type) est attribué à tout profil de spoligotypage, 12-locus MIRU-VNTR et 5-ETR respectivement partagé par au moins deux isolats cliniques. A contrario, tout profil de génotypage unique, c'est-à-dire observé pour un seul isolat clinique dans la base de données, sera étiqueté comme « orphelin ». SITVIT2 comprend à ce jour les spoligotypes de plus de 75775 isolats, les profils 5 ETR de 8542 isolats et les profils 12-locus MIRU-VNTR de 16081 isolats, ces données ayant été collectées auprès d'investigateurs de 124 pays.

2.4.2.2. Analyse et exploitation des données

Lors de l'exploitation de la base de données SpolDB4, par l'utilisation de la bio-informatique et du datamining, les 5309 profils distincts de spoligotypage contenus dans la base ont pu être classifiés en 62 lignées intégrant les signatures spécifiques de 5 sous-espèces du complexe (*M. bovis*, *M. africanum*, *M.*

canettii, *M. microti*, *M. pinnipedii*) ainsi que de *M. tuberculosis* sensu stricto [36]. Au sein de la sous-espèce *M. tuberculosis* l'analyse a permis de distinguer les 8 lignées suivantes :

- Central-Asian (CAS),
- Beijing,
- East-African-Indian (EAI),
- Haarlem (H),
- Latin-American-Mediterranean (LAM),
- "Manu",
- X,
- T, famille mal définie ou définie par défaut.

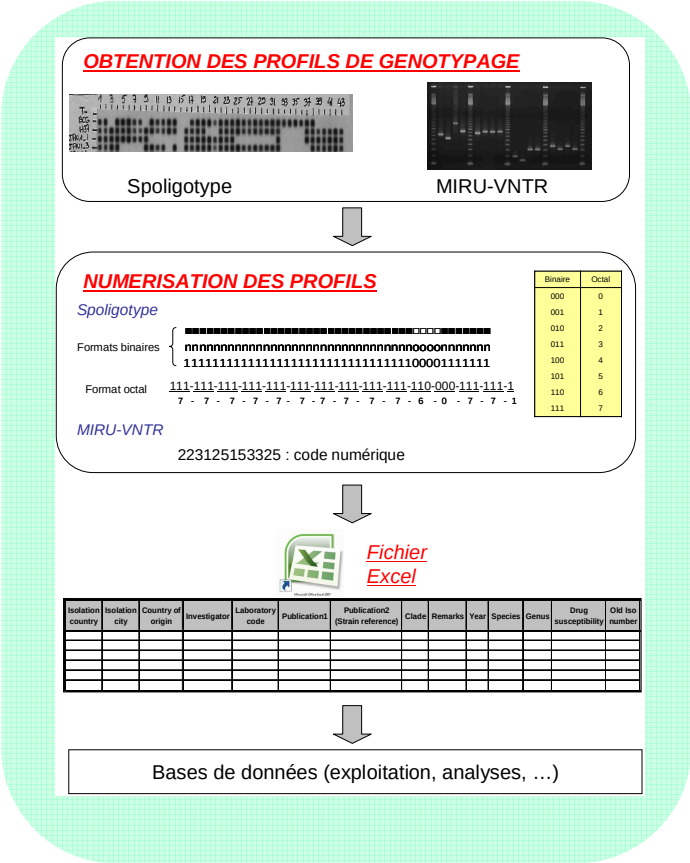


Figure 13 : Etapes d'obtention de numérisation et d'exploitation des données de génotypage

Les règles de classification des spoligotypes en lignées intègrent le fait que (i) les spoligotypes évoluent par perte d'espaceurs, cette perte étant irréversible, (ii) un évènement mutationnel unique du locus DR concerne aussi bien la perte d'un seul espaceur ou d'un bloc de plusieurs espaceurs consécutifs [272]. Dans

la base de données SITVIT2, ces règles de classification des profils de spoligotypage ont été améliorées et permettent désormais la classification semi-automatisée des profils de spoligotypage entrés dans la base de donnée tout en respectant certaines précautions comme le fait de ne pas classer les spoligotypes ambigus ou ne répondant à aucune des règles de classification prédéfinies.

2.4.3. Autres bases de données de génotypage

En dehors des bases de données de description et de comparaison de séquence génétique certaines bases de données décrivant les profils de génotypage des bacilles du complexe *M. tuberculosis* librement accessibles ont été développées. Elles peuvent contenir un nombre restreint de souches génotypées au moyen de marqueurs génétiques distincts et représentatives de l'ensemble des lignées génétiques du complexe *M. tuberculosis* (MIRU-VNTRplus database : http://www.miru-vntrplus.org) [290] ou rassembler un grand nombre de profils de spoligotypage d'une seule lignée, *M. bovis*, du MTbC (*M.bovis* database : http://www.mbovis.org). La base de données « MIRU-VNTRplus » a été consultée pour aider à la classification nouveaux clones présentant des profils de spoligotypage ambigus ou difficilement classifiables. La base de données « *M.bovis* database » a été consultée afin de comparer et connaitre la représentation mondiale de certains profils de spoligotypage identifiés comme *M. bovis* mais non répertoriés dans SITVIT.

2.5. Arbres phylogénétiques

A partir de profils de génotypage saisis sous forme d'un code de caractères binaires (spoligotypage) ou d'un nombre à 5, 12, 15, ou 24 chiffres (5-ETR et 12, 15 ou 24-locus MIRU-VNTR), nous avons, grâce à des logiciels appropriés, calculé des dendrogrammes et établi des arbres phylogénétiques afin d'étudier les liens de parentés existant entre les souches de *M. tuberculosis*.

Les dendrogrammes ont été calculés afin de mettre en évidence les isolats proches phylogénétiquement et de faire apparaître les clusters (ou grappes) au sein des échantillons de souches étudiés. La méthode retenue pour la construction de dendrogrammes est l'UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) grâce au logiciel PAUP 4.0 (Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods), Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts).

Les liens phylogénétiques existant entre les isolats cliniques de *M. tuberculosis* ont été étudiés en établissant des Minimum Spanning Tree (MST) à partir des profils de génotypage obtenus et grâce au programme d'analyse du logiciel Bionumerics (version 3.5, Applied Maths, Sint-Marteen-Latem, Belgium).

Chapitre I : épidémiologie moléculaire

1. Epidémiologie classique et épidémiologie moléculaire

L'épidémiologie a beaucoup évolué depuis les années 50, date de publication des premières études épidémiologiques à proprement parler. On distingue actuellement l'épidémiologie descriptive qui répond à la définition de l'OMS suivante « Etude de la distribution des maladies dans les populations humaines, ainsi que des influences qui déterminent cette distribution », des enquêtes étiologiques qui recherchent les causes des maladies, et des enquêtes d'évaluation des actions de santé qui évaluent les mesures de santé prises pour une population donnée. On peut aussi intégrer à l'épidémiologie descriptive l'étude des facteurs de santé car ces dernières permettent de suivre les paramètres biologiques et l'état de santé général d'une population. Quels que soient les concepts utilisés, le but de l'épidémiologie est de comprendre l'apparition d'une maladie et sa persistance afin de pouvoir soigner au mieux les populations.

1.1. Epidémiologie classique

Les études d'épidémiologie classique étudient donc « la fréquence et la répartition des paramètres de santé ou des facteurs de risque dans les populations » [30]. Ces enquêtes reposent sur l'étude des statistiques de santé au sein des populations étudiées telles que la prévalence, le taux d'incidence, la mortalité et la morbidité ainsi que de leur variations spatio-temporelles (ou selon d'autres facteurs tels que l'âge ou le sex-ratio de la population de malades).

1.1.1 Prévalence.

« La première façon de mesurer le risque de maladie dans une population est de calculer la proportion de malades présents dans la population à un instant donné » [30].

$$\text{Prévalence (P)} = \frac{M}{N}$$

M étant le nombre de malades à un instant donné

N étant le nombre de total de sujets (malades et non-malades) de la population.

1.1.2. Taux d'incidence.

« Le taux d'incidence quantifie la production de nouveaux cas de malades dans une population ». « Le taux d'incidence est la quantité de nouveaux cas produits par unité de temps dans une population » [30]. L'incidence introduit la notion de vitesse d'apparition de malades permettant de comparer des populations différentes.

$$\text{Taux d'incidence (TI)} = \frac{m}{PA}$$

m étant le nombre de malades

PA étant le nombre de personnes comprises dans la population étudiée par unité de temps.

1.1.3. Mortalité / Morbidité

Le taux de mortalité est le rapport du nombre de décès de l'année à la population totale moyenne de l'année, tandis que la morbidité correspond à la fréquence d'une maladie dans une population (http://www.insee.fr/fr/methodes/).

1.2. Epidémiologie moléculaire

1.2.1. Principe

L'épidémiologie moléculaire a évolué à partir des concepts de l'épidémiologie classique et consiste à intégrer les données de génotypage aux études épidémiologiques classique basées sur les enquêtes autour des cas. Elle repose sur la caractéristique qu'ont les bacilles tuberculeux à avoir un mode de reproduction clonal. De cette caractéristique il a été déduit que (i) les patients porteurs de souches aux profils génétiques identiques (ou souches en grappe) sont probablement épidémiologiquement liés (si les enquêtes autour des cas confirment l'existence d'un lien épidémiologique ils constitueront alors des cas de transmission récente), (ii) les patients porteurs de souches dont les profils génétiques sont uniques correspondent probablement à des cas de réactivation, à des contacts sporadiques ou à des cas d'importation.

Le but des études d'épidémiologie moléculaire est d'étudier la dynamique et les modalités de transmission de la tuberculose. Les différentes études menées visent ainsi à mettre en évidence et à caractériser les grappes ou agrégats de cas de tuberculose afin de formuler des hypothèses sur les risques de transmission de la maladie, et à identifier le plus rapidement possible une épidémie de tuberculose.

1.2.2. Définition d'une grappe

Une grappe se définit par un ensemble de souches ayant des profils de génotypage identiques ou très proches, les profils de génotypage pouvant être établis sur la base d'un seul (exemple : IS*6110*-RFLP) ou de plusieurs marqueurs moléculaires (exemple : spoligotypage couplé au typage des minisatellites MIRU-VNTR).

1.2.3. Taux de transmission récente et taux de souches en grappe

Les grappes, une fois identifiées, permettent l'estimation du taux de souches en grappe et du taux de transmission récente (cf. matériel et méthodes). L'estimation du taux de souches en grappe permet de connaître la proportion de patients inclus dans une chaîne de transmission, et celle du taux de transmission récente permet d'évaluer la proportion de cas de tuberculose correspondant à une transmission active et celle représentant les cas de réactivation [6, 195].

Les facteurs pouvant biaiser l'estimation du taux de souches en grappe et de transmission récente sont liés au choix des marqueurs moléculaires, à la fiabilité et l'exhaustivité des données épidémiologiques et à l'échantillonnage.

Le choix des marqueurs moléculaires implique que ceux-ci soient suffisamment discriminants et stables dans le temps (notion d'horloge moléculaire), et que la méthode de génotypage choisie soit standardisée, validée et reproductible [215]. Il a en effet été montré que certaines méthodes de génotypage telles que le spoligotypage, avec une horloge moléculaire plus lente que celle des minisatellites MIRU-VNTR et de l'IS*6110*-RFLP [70, 144, 251], pouvait conduire à une surestimation du taux de souches en grappe et de transmission récente, et devait par conséquent être associées à l'étude d'autres marqueurs moléculaires plus discriminants [239, 251, 270].

Concernant l'échantillonnage, il a été montré que la durée de l'étude et la taille des échantillons collectés influent sur l'estimation du taux de souches en grappe [108, 110]. En effet, un échantillonnage incomplet, en ne prenant pas en compte toutes les souches en circulation (et les profils de génotypage associés) sous-estime la proportion de souches appartenant à une grappe. Ainsi le taux de souches en grappe augmenterait avec la durée de l'étude, la durée minimale d'une étude d'épidémiologie moléculaire ayant été estimée à 2 ans [275].

1.2.4. Dynamique de transmission de la tuberculose

La dynamique de transmission de la tuberculose varie selon la zone géographique étudiée. Elle est maintenant assez bien caractérisée pour les pays développés à faible incidence de tuberculose. Dans ces pays, les profils de génotypage des bacilles tuberculeux sont polymorphes et le taux de souches appartenant à une grappe faible, reflétant ainsi une large proportion de cas de tuberculose dus à une réactivation, ainsi que l'existence de cas d'importation dont les profils de génotypage sont uniques dans la zone géographique étudiée [275]. Dans ces pays, la transmission se fait par contact avec une personne contagieuse, le risque d'infection augmentant avec la durée et la proximité du contact avec le cas source.

Pour les pays à forte incidence de tuberculose la situation est plus confuse étant donné la difficulté à déterminer la part de cas de tuberculose dus à un contact proche (au domicile par exemple), de ceux causés par contact sporadique (bar, transports publics, …). Dans ces pays, la diversité des profils observés est en général plus faible que celle des pays à faible incidence [126, 279].

Par ailleurs, le taux de souches en grappe peut varier localement en fonction du département, de la ville ou du quartier étudié. Ainsi, les foyers pour personnes sans domicile fixe, les bars ou encore les hôpitaux et autres établissements de santé ont été identifiés dans certaines études comme des lieux de haute transmission de la tuberculose [6, 19, 235, 288, 307].

1.2.5. Epidémiologie moléculaire et programmes de lutte contre la tuberculose

L'identification de grappes de souches et l'estimation du taux de transmission récente permettent d'identifier des facteurs de risque d'appartenir à une grappe et donc de correspondre à un cas de transmission récente de la maladie [275]. De telles études ont ainsi mis en évidence l'existence d'épisodes épidémiques jusqu'alors insoupçonnés au sein de sous populations très spécifiques. Des études menées sur les populations de patients tuberculeux de New York, Los Angeles ou San Francisco ont ainsi permis l'identification de la séropositivité, l'ethnicité, la résistance aux antibiotiques des souches de *M. tuberculosis*, l'âge des patients, le faible niveau de revenus et le fait de fréquenter des foyers pour personnes sans domicile fixe, comme facteurs de risque d'appartenir à une grappe et donc de transmettre activement la maladie [6, 19, 28, 31]. Ainsi, l'identification de sous populations à risque de transmettre la tuberculose permet la mise en place de programmes de lutte appropriés et la réduction du taux de transmission de la tuberculose.

Par ailleurs, l'utilisation du typage moléculaire permet d'identifier de nouveaux cas de transmission lors d'enquêtes autour des cas révélant des cas d'infection alors même que les contacts avec le cas source

n'étaient que sporadiques. L'établissement de profils génétiques des souches de *M. tuberculosis* permet de mettre en évidence l'existence d'un contact que les enquêtes épidémiologiques classiques basées sur des questionnaires adressés aux patients tuberculeux et à leur entourage n'auraient pas détectés [230, 235, 269]. Le génotypage peut aussi permettre d'identifier le cas source d'une chaîne de transmission.

Le suivi du taux de souches en grappe et de l'index de transmission récente permet de mesurer l'efficacité des programmes de lutte contre la tuberculose, une baisse du taux de souches en grappe pour une zone géographique déterminée étant un bon indicateur de l'efficacité de programmes d'éradication de la maladie.

2. Le modèle des DFA : un modèle insulaire à faible incidence vs un modèle continental à forte incidence

Le terme de « départements français d'Amérique » (DFA) regroupe deux territoires insulaires, la Guadeloupe et la Martinique, et un territoire continental, la Guyane française. Cet ensemble dispose de caractéristiques géographiques et démographiques fortement hétérogènes. En effet, La Guyane française, département continental d'Amérique du sud, avec une superficie de 84000 km², représente le plus grand département français et compte 213 029 habitants selon le dernier recensement de l'Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques (INSEE) de 2006. Tandis que la Guadeloupe et la Martinique, départements insulaires, ont des superficies de 1705 et 1080 km² respectivement et comptent cependant chacun 400 586 et 397 728 habitants (http://www.recensement.insee.fr/home.action).

Au plan démographique, au recensement de 2006, ces trois départements comptabilisaient 1,01 millions d'habitants. La Guyane française du fait de son histoire, de l'étendue de son territoire et de ses frontières communes avec des pays aux niveaux de vies inférieurs tels que le Suriname et le Brésil, abrite sur son sol une population composée de nombreuses ethnies (noirs marrons, créoles, métropolitains) et de groupes migratoires divers (Hmong, chinois, haïtiens, surinamiens, guyanais, brésiliens, etc.). En 2006, la population immigrée représentait environ 31,0% de la population totale en Guyane, originaire du Suriname, d'Haïti, du Brésil, du Guyana, de Sainte-Lucie, de Chine, et d'autres pays [136]. A l'opposé, en Guadeloupe et en Martinique, la population immigrée ne représente que 4,2% et 2,1% de la population totale respectivement. En Guadeloupe, ces populations immigrées sont majoritairement originaires d'Haïti, de Dominique et de République Dominicaine tandis qu'en Martinique elles sont originaires de l'île voisine de Sainte-Lucie, et d'Haïti [135, 137]. Enfin, ces trois départements étant français, ils disposent d'échanges permanents et continus de populations avec la France métropolitaine. De ce point de vue, la Guadeloupe est le département le plus déficitaire puisqu'au dernier recensement le déficit migratoire de la Guadeloupe avec

la France métropolitaine était estimé à 5800 personnes tandis que ce déficit est quasiment nul pour la Martinique et la Guyane française [134].

Ainsi, les DFA sont constitués d'un peuplement humain hétérogène résultant de flux migratoires continus avec la France métropolitaine, les pays limitrophes ou proches (Suriname, Brésil pour la Guyane française, Haïti, Sainte-Lucie, Dominique pour Guadeloupe et Martinique) ainsi que d'autres pays plus éloignés (Chine pour la Guyane française) et l'étude de la diversité génétique des bacilles tuberculeux circulant aujourd'hui dans ces départements pourrait refléter aussi bien des évènements historiques anciens que récents survenus dans ces régions du monde. Depuis 1994, les trois DFA disposent des activités de référence pour la tuberculose et les mycobactéries atypiques du laboratoire des Mycobactéries de l'Institut Pasteur de Guadeloupe (IPG). En effet, depuis cette date, le laboratoire réalise le diagnostic bactériologique des cas de tuberculose des trois DFA et dispose par ailleurs d'une activité d'expertise, de surveillance et d'étude des filières de transmission au bénéfice de ces trois départements. Le travail de surveillance intègre un axe de recherche puisque toutes les souches de *M. tuberculosis* sont systématiquement génotypées et les profils obtenus intégrés dans notre base de données mondiale de génotypes du bacille tuberculeux, SITVIT2.

2.1. L'étude de l'épidémie de 2004 à 2005 et apport des nouveaux marqueurs de typage (Article 1)

Article 1: A Finer Snapshot of Circulating Mycobacterium tuberculosis Genotypes in Ultra-peripheral European Regions of the Americas. Millet J, Laurent W, Zozio T, Rastogi N. (Accepté – NOTE format, Journal of Clinical Microbiology).

2.1.1. Présentation de l'étude

La précédente étude rétrospective des cas de tuberculose identifiés dans les trois DFA portait sur une période de 10 ans (janvier 1994 – décembre 2003) [37]. Cette étude montrait que plus des trois-quarts des isolats appartenaient à quatre lignées majoritaires à savoir les familles Haarlem, LAM, T et X et que le taux de transmission récente variait de 17% en Martinique à 50% en Guyane française. La présente étude a pour but de présenter des données réactualisées concernant l'épidémie de tuberculose dans les trois DFA ainsi que des génotypes de *M. tuberculosis* circulant au sein et entre les trois départements. Par ailleurs, à travers ce travail, nous avons cherché à évaluer l'apport de la méthode de génotypage basée sur 12-locus MIRU-VNTR couplée au spoligotypage en remplacement de celle basée sur les 5 ETR associée au spoligotypage

et précédemment utilisée au laboratoire. Enfin, le pouvoir discriminant de chacun des 12-locus a été estimé pour les souches des familles LAM et Haarlem, majoritairement retrouvées dans notre échantillon afin de pouvoir identifier un format de typage réduit et suffisamment discriminant comparativement au format de typage complet comportant les 12-locus pour les souches de ces deux familles. Ainsi les profils de génotypage d'un total de 176 souches en provenance des trois DFA (Guadeloupe, n=54 ; Martinique, n=32 ; Guyane française, n=90) collectées sur une période allant de janvier 2004 à décembre 2005 ont été étudiés ainsi que les données épidémiologiques relatives aux patients porteurs de ces souches.

2.1.2. Résultats

2.1.2.1. Incidence

Contrairement à la France métropolitaine où l'incidence de tuberculose a diminué entre janvier 2004 et décembre 2005, les DFA voient leur incidence augmenter sur la même période passant de 4,5 à 6,3 cas/100 000 habitants en Martinique, de 7,1 à 8,1 cas/100 000 habitants en Guadeloupe et de 32,5 à 44 cas/100 000 habitants en Guyane française [12]. Pour la Guyane française, le taux d'incidence reporté de 44 cas/100 000 habitants est non seulement le plus élevé de France mais il est de plus considéré comme en deçà de la réalité du fait de la situation démographique et géographique particulière de la Guyane française dont les pays frontaliers présentent des taux d'incidence élevés (100 cas/100 000 habitants au Suriname, de 123 cas/100 000 habitants au Guyana et de 51 cas/100 000 habitants au Brésil) [293].

2.1.2.2. Sex-ratio et âge des patients

Le sex-ratio (homme/femme) est plus faible en Guadeloupe qu'en Martinique et qu'en Guyane française (1,5 vs 2,2 et 2,2).

La comparaison des moyennes d'âge des patients montre que les patients de Martinique sont significativement plus âgés qu'en Guyane française (48,0 vs 36,6 ans ; $p<0,01$). Par ailleurs, la distribution des patients par classe d'âge varie d'un département à l'autre avec 53% des patients appartenant à la classe d'âge 25-44 ans en Guadeloupe et Guyane française contre seulement 28% en Martinique et 21,9% des patients martiniquais appartenant à la classe d'âge des plus de 65 ans rassemble contre seulement 5,6 et 7,4% des patients de Guadeloupe et de Guyane française. Enfin, si aucun patient de moins de 15 ans n'a été déclaré en Guadeloupe et en Martinique, 5,6% des patients de Guyane française (n=5/90) appartiennent à cette classe d'âge sur la période étudiée.

Ainsi les DFA présentent des situations démographiques disparates avec d'un côté la Martinique où plus de la moitié des patients ont plus de 45 ans, d'un autre côté la Guyane française où les trois-quarts des patients

ont moins de 45 ans, et la Guadeloupe dont la situation démographique est intermédiaire et se situe à mi-chemin entre celle de la Martinique et celle de la Guyane française.

2.1.2.3. Pays d'origine et taux de co-infection VIH/tuberculose

La nationalité des patients n'est précisément connue que pour 47 des 54 patients de Guadeloupe. Parmi ces 47 patients, 29 (61,7%) sont de nationalité étrangère, dont 26 (89,7%) sont originaires d'Haïti, deux sont originaires de République Dominicaine et un du Guyana.
Par comparaison aux précédentes études menées en Guadeloupe et dans les DFA, la proportion de patients tuberculeux nés à l'étranger semble être en augmentation ces dernières années puisqu'ils représentaient 42,6% des cas de tuberculose dans les DFA entre 1994 et 2003 [37] et 52,0% des patients tuberculeux en Guadeloupe (1999-2005) [90]. Ces résultats sont en adéquation avec les données démographiques de la Guadeloupe enregistrant une hausse de l'immigration entre 1999 et 2005 [135].

L'information relative à la sérologie VIH des patients n'étant pas systématiquement reportée sur la fiche de déclaration obligatoire de tuberculose, cette donnée n'est connue que pour 29/32 patients de Martinique et 46/90 patients de Guyane française. En Guadeloupe, ce paramètre est trop peu renseigné pour être exploité, néanmoins en 2004, 5/21 (23,8%) patients présentaient une co-infection VIH/TB. Pour la Martinique et la Guyane française, les taux de co-infection VIH/tuberculose sont respectivement de 10,3% et 52,2%. On observe ainsi que les taux de co-infection VIH/TB observés en Guadeloupe et Martinique en 2004-2005 sont proches de ceux reportés dans la précédente étude réalisée pour les trois DFA et publiée en 2006 (23,8% vs 28% pour la Guadeloupe et 10,3% vs 19% pour la Martinique), tandis que celui de Guyane française est très largement au-dessus du taux précédemment reporté (52,2% vs 25%) [37].

2.1.2.4. Résistances aux antibiotiques

Le profil de résistance aux antibiotiques des 176 souches de *M. tuberculosis* a été systématiquement établi. La proportion de souches résistantes est la plus faible en Martinique avec seulement 2/32 (6,25%) souches résistantes, qu'en Guadeloupe avec 6/54 (11,1%) souches résistantes et qu'en Guyane française avec 12/90 (13,3%) souches résistantes. Aucune souche XDR n'a été détectée à ce jour dans les DFA.

2.1.2.5. Profils de spoligotypage

Le spoligotypage des 176 isolats cliniques collectés nous a permis de mettre en évidence 76 profils distincts. Un total de 130/176 souches (73,9%) est regroupé en 30 grappes comprenant de 2 à 25 souches par grappes, alors que 46 souches (26,1%) présentent des profils uniques. Les profils majoritairement retrouvés dans

notre étude sont les SIT 53 (n=25), 50 (n=15), 131 (n=7), 2 (n=6), 42 (n=6) et 93 (n=6) (les numéros de SIT étant attribués par comparaison avec la base de données SITVIT).

Par ailleurs, trois familles phylogénétiques concentrent 73,3% des souches de l'étude (n=129/176) : LAM (25,0%), Haarlem (23,9%), et la famille T (24,4%) et sont quasiment également réparties au sein des trois DFA. Malgré une forte proportion de patients nés à l'étranger et contrairement à une étude récente menée en Italie, pays à faible incidence de tuberculose, les lignées génétiques des souches de *M. tuberculosis* observées sont identiques au sein du groupe de patients nés à l'étranger et de ceux nés en France soulignant, comme cela l'a été décrit dans de précédentes études, l'existence de flux migratoires entre les DFA et les pays limitrophes de la Caraïbe et d'Amérique latine où les génotypes de *M. tuberculosis*, LAM, Haarlem, T et X prédominent [1, 37, 45, 188]. Les autres lignées génotypiques retrouvées dans notre études mais en plus faibles proportions sont les suivantes : EAI (5,7%), X (4,0%), Beijing (2,3%), AFRI (1,1%) et Bovis (0,6%).

Il est intéressant de remarquer que les souches des familles ancestrales EAI et AFRI ont été principalement isolées en Guyane française (n=10/12 souches). Par comparaison avec l'étude précédente menée sur 10 ans, la proportion de souches de la famille EAI en Guyane française a significativement augmenté en 2004 et 2005 passant de 4,8% à 10% ($p<0,05$).

2.1.2.6. Profils 12-locus MIRU-VNTR

Des profils 12-locus MIRU-VNTR complets ont été obtenus pour 154/176 souches de l'étude. Sur les 154 souches, nous avons obtenus 97 profils MIRU-VNTR distincts correspondant à 24 grappes (n=81/154 souches) et 73 profils uniques. Par comparaison avec la base de données SITVIT2, des numéros de MIT ont été attribués à 39 profils tandis que 58 étaient désignés comme orphelins puisque non répertoriés dans la base de données.

Enfin, nous avons identifié un schéma de typage restrictif comprenant un nombre limité mais suffisamment discriminant de locus MIRU-VNTR pour le génotypage des souches des familles Haarlem et LAM des 3 DFA. Pour la famille Haarlem, 6 locus MIRU-VNTR (locus n° 10, 20, 23, 31, 39, et 40) et 4-locus MIRU-VNTR pour la famille LAM (locus n° 10, 26, 31 et 40) permettent d'atteindre 99,6% et 99,4% respectivement du pouvoir discriminant maximal atteint avec les schémas de typage complet basé sur 12-locus MIRU-VNTR.

2.1.2.7. Combinaison du spoligotypage et des profils 12-locus MIRU-VNTR

Par combinaison du spoligotypage avec les résultats du typage des 12-locus MIRU-VNTR, un total de 58 souches (37,7%) est regroupé en 20 grappes. La combinaison des deux marqueurs a permis l'identification de grappes spécifiques a chacun des trois DFA ainsi que des grappes interdépartementales (Tableaux 6, 7, 8, et 9).

Ainsi, parmi les cinq grappes identifiées en Guadeloupe, la grappe SIT5-MIT15, concerne deux patients de nationalité haïtienne, dont l'un est porteur d'une souche de *M. tuberculosis* multirésistante (résistance cumulée à INH, RIF, SM et EMB) tandis que l'autre est sensible. Ce profil est à surveiller du fait de la détection d'une souche multirésistante correspondant probablement à un cas d'importation en provenance d'Haïti. Les grappes SIT42-MIT25 et SIT53-MIT808 pourraient elles aussi constituer des cas d'importation en provenance d'Haïti et d'Europe respectivement (Tableau 6).

En Martinique, les données épidémiologiques trop peu nombreuses ne peuvent permettre de discuter quand à l'unique grappe observée pour ce département (Tableau 7).

En Guyane française, les données épidémiologiques limitées permettent difficilement de conclure quant aux liens supposés entre patients. Néanmoins, il est possible de noter l'implication de patients séropositifs dans sept des neuf grappes identifiées, mais une faible contribution des souches résistantes aux grappes identifiées (2/21 souches) (Tableau 8).

Année	Numéro de souche	Age	Sexe	Spoligotype	SIT	12-locus MIRU-VNTR	MIT	Nationalité*	Lieu de naissance*	VIH**	Profils de résistance***	Ville****
2005	05-056	55	F	□□□□□□□□□■■□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	5	223325153322	15	HTI	HTI		S	97118
2005	05-128	21	F	□□□□□□□□□■■□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	5	223325153322	15	HTI	HTI		INH, RIF, SM, EMB	97190
2005	05-011	40	M	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	42	224226153321	25	HTI	HTI		S	97111
2005	05-013	50	F	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	42	224226153321	25	HTI	HTI		S	97180
2005	05-147	33	F	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	42	224226153321	25				INH (>1)	
2005	05-074	34	M	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	53	223326163321	808	FXX	FXX		S	97190
2005	05-151	28	M	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	53	223326163321	808	FXX	CHE		S	97170
2004	04-097	32	M	■■■■■■■■■■■■□■■■■■■■□□□□■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	93	224226153321	25	HTI	HTI		RIF	97150
2005	05-083	41	M	■■■■■■■■■■■■□■■■■■■■□□□□■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	93	224226153321	25	FXX	GLP		S	97139
2005	05-134	44	M	■■■■■■■■■■■■□■■■■■■■□□□□■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	93	224226153321	25	FXX	GLP		S	97139
2005	05-063	43	M	■■■■□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□■□□□□■■■■■■■	99	225315153323	131	FXX	GLP		S	97116
2005	05-122	47	M	■■■■□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□■□□□□■■■■■■■	99	225315153323	131	FXX	GLP		S	97116

* Nationalité et lieu de naissance des patients : les codes ISO des pays sont indiqués (http://fr.wikipedia.org/wiki/ISO_3166-1) (CHE : Suisse, FXX : France métropolitaine, GLP : Guadeloupe, HTI : Haïti)

**VIH: résultat de la sérologie VIH du patient (vide si inconnu ; P : positif ; N : négatif) ;

***Profils de résistance : résultat des tests de sensibilité aux antibiotiques des isolats de *M. tuberculosis* (S : sensible ; INH : isoniazide, RIF : rifampicine ; SM : streptomycine ; EMB : éthambutol)

****Ville : indique le code postal de la ville de résidence du patient

Tableau 6: Grappes identifiées lors du génotypage des 54 isolats de *M. tuberculosis* collectés en Guadeloupe par combinaison du spoligotypage et des profils 12-locus MIRU-VNTR en 2004-2005

Année	Numéro de souche	Age	Sexe	Spoligotype	SIT	12-locus MIRU-VNTR	MIT	VIH*	Profils de résistance**
2004	04-021	48	M	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□□□■□□□□■■■□■■■	62	225323153323	43	N	S
2004	04-029	38	M	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□□□■□□□□■■■□■■■	62	225323153323	43		S

*VIH: résultat de la sérologie VIH du patient (vide si inconnu ; P : positif ; N : négatif) ;
**Profils de résistance : résultat des tests de sensibilité aux antibiotiques des isolats de *M. tuberculosis* (S : sensible)

Tableau 7: Grappe identifiée lors du génotypage des 32 isolats de *M. tuberculosis* collectés en Martinique par combinaison du spoligotypage et des profils 12-locus MIRU-VNTR en 2004-2005

Année	Numéro de souche	Age	Sexe	Spoligotype	SIT	12-locus MIRU-VNTR	MIT	VIH*	Profils de résistance**
2004	04-108	43	M	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■□■■■□□□□■■■■■■■	64	125326133222	812	P	S
2005	05-067	38	M	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■□■■■□□□□■■■■■■■	64	125326133222	812		S
2005	05-002	39	M	■■■■■■■■■■□■■■■■■■■■■■■■■■□□□□□□□■■■■■□■■■	72	254326223513	64	N	S
2005	05-042	22	M	■■■■■■■■■■□■■■■■■■■■■■■■■■□□□□□□□■■■■■□■■■	72	254326223513	64	P	S
2004	04-040	29	M	■■■■■■■■■■■■■■□■■■■■■■■■■■■■■□■□□□□■■■■■■■	75	225313153323	42	P	INH, RIF
2004	04-068	17	F	■■■■■■■■■■■■■■□■■■■■■■■■■■■■■□■□□□□■■■■■■■	75	225313153323	42	N	S
2004	04-043	30	F	■■■□□□□□□□□□■■■□■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	91	224325153326	692	P	S
2004	04-048	32	F	■■■□□□□□□□□□■■■□■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	91	224325153326	692	P	S
2005	05-047	32	M	■■■□□□□□□□□□■■■□■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	91	224325153326	692		S
2004	04-064	22	M	■■■■■■■■■■■■□□■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	131	232325162322	809		S
2005	05-050	27	F	■■■■■■■■■■■■□□■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	131	232325162322	809	N	S
2005	05-161	35	F	■■	131	232325162322	809		S
2004	04-080	22	M	■■■■■■■■■■■■□■■■■■■□□□■■■■■□■■■□□□□■■■■■■■	176	122316153224	801		S
2001	04-082	33	M	■■	176	122316153224	801	N	S
2005	05-008	40	F	■■■■■■■■■■■■□■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■□■■■■■□■■■	349	254326223513	64	P	S
2005	05-118	17	F	■■■■■■■■■■■■□■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■□■■■■■□■■■	349	254326223513	64	N	S
2004	04-009	40	M	■■■■■■■■■■■■■■■■■□■■■■■□■■■■■□□□□■□■■□■■■■■■	1340	244326224531	798		RIF
2001	04-083	31	M	■■■■■■■■■■■■■■■■■□■■■■■□■■■■■□□□□■□■■□■■■■■■	1340	244326224531	798	P	S
2005	05-048	38	F	■■■■■■■■■■■■■■■■■□■■■■■□■■■■■□□□□■□■■□■■■■■■	1340	244326224531	798		S
2005	05-066	35	F	■■■■■■■■■■□■■■■■■■■■□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□	2508	124326153224	140	P	S
2005	05-092	4	M	■■■■■■■■■■□■■■■■■■■■□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□	2508	124326153224	140		S

*VIH: résultat de la sérologie VIH du patient (vide si inconnu ; P : positif ; N : négatif) ;
**Profils de résistance : résultat des tests de sensibilité aux antibiotiques des isolats de *M. tuberculosis* (S : sensible ; INH : isoniazide, RIF : rifampicine)

Tableau 8: Grappe identifiée lors du génotypage des 90 isolats de *M. tuberculosis* collectés en Guyane française par combinaison du spoligotypage et des profils 12-locus MIRU-VNTR en 2004-2005

Enfin parmi les grappes interdépartementales, la grappe SIT20-MIT307 est à surveiller puisque constituée de patients jeunes (moyenne d'âge 29,2 ans) et que trois des quatre souches de cette grappe sont monorésistantes à l'isoniazide, qu'elles soient isolées chez des patients vivant en Guadeloupe ou en Guyane française (Tableau 9).

Année	Numéro de souche	Dpt de résidence*	Age	Sexe	Spoligotype	SIT	12-locus MIRU-VNTR	MIT	Nationalité**	Lieu de naissance**	VIH***	Profils de résistance****
2005	05-084	1	42	F	■■□■■■■■■■■□■■■■■■■□□□□■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	17	224226163321	26				S
2005	05-152	2	36	F	■■□■■■■■■■■□■■■■■■■□□□□■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	17	224226163321	26			N	S
2005	05-095	3	46	M	■■□■■■■■■■■□■■■■■■■□□□□■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	17	224226163321	26				S
2004	04-100	1	29	M	■■□■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	20	223226163321	307	GUY	GUY	P	INH
2005	05-101	1	42	F	■■□■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	20	223226163321	307				S
2004	04-044	3	19	F	■■□■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	20	223226163321	307				INH
2004	04-059	3	27	M	■■□■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	20	223226163321	307			P	INH
2004	04-030	1	32	F	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□■□□□□■■■■■■■	50	225313153323	42	HTI	HTI		S
2005	05-085	1	47	M	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□■□□□□■■■■■■■	50	225313153323	42	HTI	HTI		S
2004	04-001	2	38	M	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□■□□□□■■■■■■■	50	225313153323	42	FXX	GUF	N	S
2004	04-114	2	28	M	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□■□□□□■■■■■■■	50	225313153323	42			N	S
2004	04-041	3	18	F	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□■□□□□■■■■■■■	50	225313153323	42			P	S
2004	04-063	3	46	M	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□■□□□□■■■■■■■	50	225313153323	42				S
2004	04-065	3	64	F	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□■□□□□■■■■■■■	50	225313153323	42				S
2005	05-046	3	51	M	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□■□□□□■■■■■■■	50	225313153323	42				S
2005	05-068	3	45	M	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□■□□□□■■■■■■■	50	225313153323	42			P	S
2005	05-117	3	42	M	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□■□□□□■■■■■■■	50	225313153323	42			N	S
2005	05-145	3	35	M	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□■□□□□■■■■■■■	50	225313153323	42			P	S
2004	04-085	1	58	M	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	53	227325163423	802	FXX	GLP	N	SM
2004	04-115	2	69	F	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	53	227325163423	802			N	S
2005	05-025	2	24	M	■■■■■■■■■■■■□□■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	131	232325142322	811			P	S
2005	05-005	3	19	F	■■■■■■■■■■■■□□■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	131	232325142322	811				S
2005	05-045	3	22	M	■■■■■■■■■■■■□□■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	131	232325142322	811				S

* Dpt de résidence: Département où le patient habite au moment du diagnostic de tuberculose (1: Guadeloupe, 2: Martinique, 3: Guyane française)
** Nationalité et lieu de naissance des patients : les codes ISO des pays sont indiqués (http://fr.wikipedia.org/wiki/ISO_3166-1) (FXX : France métropolitaine, GLP : Guadeloupe, GUF: Guyane frnaçaise, GUY: Guyana, HTI : Haïti)
*** VIH: résultat de la sérologie VIH du patient (vide si inconnu ; P : positif ; N : négatif) ;
**** Profils de résistance : résultat des tests de sensibilité aux antibiotiques des isolats de *M. tuberculosis* (S : sensible ; INH : isoniazide, SM : streptomycine)

Tableau 9: Grappe identifiée lors du génotypage des 176 isolats de *M. tuberculosis* collectés dans les trois DFA par combinaison du spoligotypage et des profils 12-locus MIRU-VNTR en 2004-2005

Les taux de souches en grappes estimés sur la base des spoligotypes et profils 12-locus MIRU-VNTR sont similaires en Guadeloupe et Guyane française (34,8% et 40,5% respectivement) tandis qu'il est significativement moins élevé en Martinique (14,3% ; $p<0,025$). De plus, le taux de souches en grappe estimé pour les trois DFA (37,7%) n'est pas différent de celui estimé pour chacun des départements excepté la Martinique.

Par ailleurs, le taux de souches en grappe estimé dans cette étude est significativement moins important que celui estimé lors de la précédente étude menée sur 10 ans (37,7% vs 58,9% ; $p<0,0001$) [37]. Cette observation est très probablement liée au choix des 12-locus MIRU-VNTR comme outil de génotypage, qui, du fait de son pouvoir discriminant plus élevé que lui des 5-locus ETR, limiterait le phénomène de « false clustering » (souches en grappe sans lien épidémiologique véritable) et réduirait ainsi le taux de souches en grappe. La différence de taux de souches en grappe pourrait aussi venir des différences de durée existant entre les deux études puisque l'on sait qu'une étude trop courte peut sous-estimer le taux de souches en

grappe en ne détectant pas les cas de transmission à des patients n'ayant pas encore déclaré leur tuberculose [108, 110].

2.1.3. Conclusion et perspectives

A travers cette étude nous avons pu actualiser les informations relatives à l'épidémie de tuberculose dans les trois DFA et procéder à l'évaluation du format de génotypage basé sur 12-locus MIRU-VNTR en combinaison avec le spoligotypage pour les isolats de *M. tuberculosis* circulant dans cette zone géographique.

Les résultats obtenus montrent une situation épidémique sensiblement différente en Guadeloupe, Martinique et Guyane française. En effet, en Guadeloupe et Martinique, l'épidémie semble contenue avec des taux d'incidence faibles (8,1 et 6,3 cas pour 100 000 habitants respectivement en 2005 [12] et des proportions de souches résistantes aux antituberculeux en constante décroissance, tandis qu'en Guyane française la situation est plus préoccupante avec une incidence de tuberculose la plus élevée de France (44 cas pour 100 000 habitants [12] et un fort taux de co-infection VIH/TB (52,2%). Le taux de souches en grappes, estimé en se basant sur la combinaison des résultats spoligotypage et typage des 12-locus MIRU-VNTR, est significativement inférieur en Martinique (14,3%) qu'en Guadeloupe et Guyane française (34,8% et 40,5% respectivement ; $p<0,025$) et pourrait être le reflet d'un faible taux de transmission récente dans ce département. Ces résultats suggèrent l'existence de trois situations épidémiques distinctes dans les trois départements. En Martinique, la situation serait celle d'un pays à très faible incidence de la maladie, l'essentiel des cas de tuberculose survenant chez des patients âgés réactivant pour la plupart d'anciens épisodes de contamination. En Guyane française, la situation serait celle d'un pays à incidence modérée avec un fort impact des cas de tuberculose d'importation et un taux de transmission récente élevé chez des patients relativement jeunes. En Guadeloupe, la situation épidémique serait à mi-chemin entre celle de la Guyane française et de la Martinique, avec une incidence de tuberculose faible mais un taux de souches en grappe élevé et un très fort impact des cas de tuberculose d'importation.

La surveillance de l'épidémie de tuberculose dans les trois DFA, notamment la détection et la caractérisation des souches résistantes aux traitements antituberculeux, est un point crucial de la lutte contre la maladie qui devra être maintenu et renforcé. D'une part, le génotypage systématisé des isolats de *M. tuberculosis* sera poursuivie en associant au spoligotypage, le typage des 12-locus MIRU-VNTR, et d'autre part la mise au point d'un set de marqueurs pour le génotypage des souches des familles génétiques prédominantes dans cette zone géographique, i.e. les familles LAM et Haarlem, sera poursuivie en intégrant les 15 et 24-locus MIRU-VNTR.

2.2. Le suivi de l'épidémie de tuberculose en Guadeloupe (Articles 2 et 3)

Article 2 : La tuberculose en Guadeloupe : du diagnostic à la prise en charge. Ferdinand S, Theodore M, Accipe A, Levy M, Filliol I, Brudey K, Millet J, Sola C, Rastogi N, Chaud P, Blateau A, Chappert J-L, Cassadou S, Quene P. BASAG. 2008.

Article 3: Use of genotyping based clustering to quantify recent tuberculosis transmission among culture positive cases in Guadeloupe in a seven years period: analysis of risk factors and access to health care. Ferdinand S, Accipe A, Millet J, Cassadou S, Chaud P, Levy M, Theodore M, Rastogi N. (Article en préparation, Infection, Genetics and Evolution).

2.2.1. Présentation de l'étude

Ce travail est une étude prospective de caractérisation des filières de transmission de la tuberculose en Guadeloupe et porte sur une période de sept ans (1999 – 2005). Les critères suivants ont été retenus pour l'inclusion des patients dans cette étude : (i) l'existence d'un diagnostic bactériologique confirmé de tuberculose, (ii) une durée de résidence en Guadeloupe supérieure à trois mois au moment du diagnostic, (iii) l'acceptation par le patient de signer un consentement écrit et éclairé. Chaque cas a fait l'objet d'une enquête épidémiologique par les enquêteurs de l'ODESSA (Observatoire Départemental Social et Sanitaire remplacé depuis 2005 par l'ORSaG, Observatoire Régional de la Santé de Guadeloupe) lors d'un entretien individuel avec le patient permettant de recueillir les données démographiques, socio-économiques, ainsi que des informations concernant la filière de diagnostic du patient. Le diagnostic bactériologique des cas de tuberculose, effectué à l'Institut Pasteur de la Guadeloupe, a fourni le matériel génétique nécessaire au génotypage des isolats cliniques par spoligotypage et étude des 5 ETR.

2.2.2. Résultats

2.2.2.1. Sex-ratio, âge, origine et profils de résistance aux antituberculeux

Sur les 129 patients inclus dans l'étude, 77 étaient des hommes d'âge médian 42 ans, et 52 des femmes d'âge médian 36 ans (sex-ratio 1,5). En Guadeloupe, la tuberculose concerne majoritairement les hommes appartenant à la classe d'âge 40-59 ans puisqu'ils représentent 41,6% des hommes de l'étude. On dénombre 66/129 (51,2%) patients tuberculeux nés à l'étrangers vivant en moyenne depuis 10 ans en Guadeloupe au moment du diagnostic de tuberculose et majoritairement originaires d'Haïti (n=53/126 ou 42,1%) et de République Dominicaine (n=5/126 ou 4%). Ces patients nés à l'étranger, sont par ailleurs significativement

plus jeunes que la population autochtone (âge médian 36 ans vs 50 ans pour les patients autochtones, *p<0.0001*) (information connue pour 126/129 patients).

Concernant la localisation géographique des cas sur le territoire de l'archipel Guadeloupéen, sur les 34 communes répertoriées, 6 regroupent 59,5% des cas pour lesquels l'information concernant la localisation géographique est connue (n=116/129): Saint-Martin (20/116 ou 17,2%), Les Abymes (20/116 ou 17,2%), Le Gosier (10/116 ou 8,6%), Pointe-à-Pitre (8/116 ou 7,0%), Baillif (6/116 ou 5,2%) et Basse-Terre (5/116 ou 4,3%).

La sensibilité vis à vis des antituberculeux de première ligne de l'ensemble des souches de l'étude a été testée. Un total de 7,8% des souches (n=10/129) était résistant à au moins 1 antibiotique de première ligne, tandis que 2,3% des souches (n=3/129) présentaient un profil de multirésistance (MDR).

Ces chiffres montrent certaines similitudes avec ceux de la France métropolitaine où, de même qu'en Guadeloupe, l'épidémie de tuberculose concerne majoritairement les hommes de la classe d'âge 40-60 ans [12]. Cependant, en Guadeloupe, la proportion de cas d'importation est supérieure à celle observée en France métropolitaine (48% en 2005) tout en étant significativement inférieure à celle décrite en Guyane française (69% ; *p<0,0001*) [12, 37].

2.2.2.2. Caractéristiques socio-économiques

Un questionnaire concernant les caractères socio-économiques des patients a été rempli par 92/129 patients de l'étude. Une activité professionnelle régulière a été déclarée pour seulement 27/92 tandis que 65/92 d'entre eux déclaraient être sans emploi ou sans activité salariée fixe. Le revenu moyen mensuel des patients est faible et estimé à 824€ par mois tout en variant de 40 à 5000€. Ces chiffres sont en adéquation avec la structure de la population globale guadeloupéenne caractérisée par un fort taux de chômage (25,7% vs 9,5% de la population en Guadeloupe et France métropolitaine respectivement) [139] ainsi qu'une importante proportion de la population vivant sous le seuil de pauvreté de la France (50,2% en 1999) [138].

Des renseignements concernant les conduites addictives ont été transmis par 95/129 patients concernant la consommation de cigarettes, 96/129 patients concernant la consommation d'alcool et 93/129 patients concernant la consommation de drogues. Il apparaît que dans la population de patients étudié, 20,0% (n=19/95) sont fumeurs, 28,1% (n=27/96) consomment régulièrement de l'alcool et 12,9% (n=12/93) sont utilisateurs de drogues (cannabis et/ou crack).

Les lieux publics majoritairement fréquentés sont les lieux de culte pour 58,2% des patients (n=53/91) notamment par la communauté haïtienne de Guadeloupe et 11,0% des personnes interrogées (n=10/91) affirment être en contact fréquent avec le public sur leur lieu de travail. Dans les 2 ans précédant le diagnostic de tuberculose, 19,1% des patients (n=17/89) ont effectué 21 déplacements dans 14

départements français et 30,3% des patients (n=27/89) 42 déplacements à l'étranger (dans 12 pays, majoritairement de la Caraïbe).

2.2.2.3. Informations médicales et délais de prise en charge des patients tuberculeux de l'étude

La proportion de TB extrapulmonaire est significativement supérieure chez les patients nés à l'étrangers (18,2% ou 12/66 vs 4,8% ou 3/63 chez les patients nés à l'étranger et ceux nés en France respectivement ; *p=0,017*). Parmi les formes de tuberculose extrapulmonaires, on trouve des formes disséminées (3/15), extrapulmonaires exclusivement (7/15) ou des pulmonaires avec d'autres organes concernés (5/15). Les parties du corps concernées sont majoritairement les ganglions (4/15), les os (2/15), la plèvre (2/15) ainsi que d'autres organes (4/15). Des informations médicales concernant d'autres maladies que la tuberculose sont disponibles pour 92/129 patients et montrent que 30,4% (n=28/92) d'entre eux sont traités pour une autre affection en plus de leur tuberculose, telles que VIH, diabète, cancers, hypertension artérielle, ou asthme.

La sérologie VIH est connue pour 102/129 patients (55 nés à l'étranger et 47 nés en France) dont 24,5% (n=25/102) sont positifs plaçant le taux de co-infection VIH/TB au dessus de la moyenne nationale française estimée à 10% [134]. Le taux de co-infection VIH/TB est significativement plus élevé au sein de la population de patients étrangers (21/55 ou 38,2%) que pour les patients de nationalité française (4/47 ou 8,5%) (*p=0,001*). Cependant, en dépit d'un taux de co-infection VIH/TB plus élevé en Guadeloupe qu'en France métropolitaine, pouvant s'expliquer par la forte proportion de cas de TB d'importation provenant de zones géographiques à forte endémicité de tuberculose et de VIH telles que Haïti (incidence TB : 305/100 000 habitants ; prévalence du VIH parmi les patient tuberculeux : 12% en 2005) ou la République Dominicaine (incidence TB : 91 cas de TB / 100 000 habitants ; prévalence du VIH parmi les patient tuberculeux : 6,3% en 2005) [294], la proportion de souches résistantes aux antituberculeux de première ligne est identique à celle observée en France métropolitaine (7,8% vs 8,8% en Guadeloupe et France métropolitaine respectivement [146]).

Il a été possible d'estimer le délai de diagnostic de tuberculose pour 107/129 patients. Pour 64,5% (n=69/107) d'entre eux, la suspicion de tuberculose a été posée dès le premier contact médical tandis que la maladie n'a été suspectée qu'au deuxième contact médical pour 20,6% (n=22/107) d'entre eux, au troisième contact pour 9,3% (n=10/107) ou plus tard pour 5,6% (n=6/107) de ces patients. Le délai médian du premier contact médical pour des symptômes tels que la toux accompagnée de fièvre est estimé à 16

jours (Figure 14) et le délai médian de suspicion de tuberculose estimé à 26,5 jours tandis que le délai médian d'accès aux soins est de 74,5 jours. Les patients pour lesquels une suspicion de tuberculose a été posée dès le 1er contact médical correspondent à ceux ayant attendu significativement plus longtemps pour consulter un médecin après l'apparition de signes évocateurs de tuberculose (30,5 jours vs 3,5 jours ; *p<0,0001*), et sont par ailleurs ceux pour lesquels le diagnostic clinique a été le plus rapide (10,5 jour vs 74 jours ; *p=0,025*). Les patients ayant des stades avancés de la maladie d'où le diagnostic clinique plus rapide de leur tuberculose. Ces résultats suggèrent d'améliorer la détection précoce des cas de tuberculose, lorsque les manifestations évocatrices de tuberculose ne sont encore que minimes.

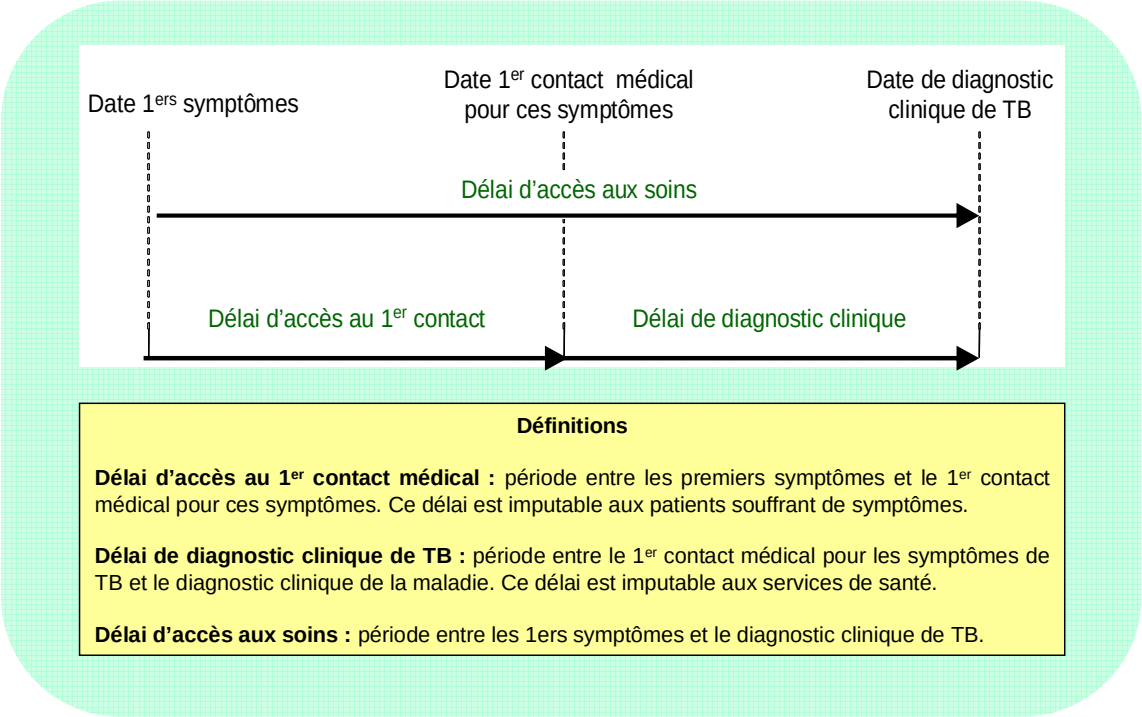


Figure 14: Définition des délais de diagnostic de la tuberculose [90]

L'information concernant le devenir des patients après le diagnostic de tuberculose est disponible pour 113/129 patients parmi lesquels 55,8% (n=63/113) ont été déclarés guéris, 29,2% (n=33/113) perdus de vue et 15,0% (n=17/113) sont décédés environ 4 mois après le diagnostic de tuberculose (information concernant le délai connue pour 16/17 patients). Les causes de décès sont connues pour 12/17 patients : 3 sont décédés de SIDA, 3 d'une altération de leur état général, 2 de cancer de la prostate, 1 de cirrhose, 1 d'hépatite, 1 de septicémie, et 1 de pneumocystose.

2.2.2.4. Génotypage

* Spoligotypage.

Des profils de spoligotypage ont été obtenus pour 129 souches et sont présentés dans le Tableau 10. Le spoligotypage a généré 57 profils distincts dont 49 figuraient déjà dans notre base de données et par conséquent disposaient donc déjà d'un numéro de SIT. Trois profils se sont associés à 3 spoligotypes orphelins de la base de données générant ainsi 3 nouveaux SITs : SIT1913, 2983 et 2689. Enfin 5 profils obtenus dans l'étude sont restés orphelins après avoir été entrés dans la base de données. Parmi les 129 isolats, 90 (69,8%) appartiennent à 18 grappes (2 à 12 souches par grappe) tandis que 34 (26,4%) profils étaient unique dans cette étude. Les principales familles génétiques observées sont les suivantes : LAM (31,8% ou 41/129), T (24,0% ou 31/129), Haarlem (21,7% ou 28/129), X (5,4% ou 7/129), et S (2,3% ou 3/129). La distribution géographique des principaux SIT permet de faire une distinction entre les profils de spoligotypage :

- ubiquitaires, retrouvés dans de nombreuses régions du monde (SIT 3, 7, 17, 20, 42, 44, 45, 50, 51, 53, 70 et 122)
- localisés, retrouvés principalement Amérique latine et du Sud (SIT 17, 93), dans la Caraïbe (SIT 5, 103 et 1087) ou en Guadeloupe (SIT 14).

Les SIT 5 et 14 devront être plus particulièrement investigués dans de futures études. En effet, le SIT 14 est un profil de spoligotypage récurrent en Guadeloupe où il est détecté depuis 1994 et le SIT 5, pour lequel aucune clade n'a pu être attribuée, est majoritairement retrouvé en Haïti et régulièrement détecté en Guadeloupe pouvant ainsi représenter une transmission interrégionale de ce clone [37, 91, 182].

* Etude des 5 ETR.

Un profil de génotypage basé sur 5 ETR a été obtenu pour 116/129 souches dont 91,4% (n=106/116) étaient en grappe (15 grappes ; 2 à 27 souches par grappe). En combinant les résultats de spoligotypage et ceux obtenus par typage des 5 ETR, 55,0% des souches (n=71/129) sont regroupées en 18 grappes (2 à 9 souches par grappe) dont 3 contiennent au moins une souche résistante à au moins 1 antibiotique de première ligne et 3 une souche MDR. Par comparaison des profils de génotypage des 6 grappes concernées par une résistance aux antituberculeux de 1ère ligne, avec la base de données SITVIT2, il apparaît que 5 ces profils sont principalement retrouvés à Haïti suggérant l'existence d'une transmission interrégionale de clone tuberculeux y compris de clone tuberculeux résistants et multirésistants entre ces territoires. Ces hypothèses demandent néanmoins de plus amples investigations du fait des limitations de la méthode de génotypage employées associant le spoligotypage au typage des 5-locus ETR. En effet, des phénomènes d'homoplasie associés aux marqueurs minisatellites et notamment aux méthodologies basées sur des

nombre restreint de marqueurs, et le pouvoir discriminant limité des 5-locus ETR, sont très probablement source d'une surestimation de grappes et donc de chaines de transmission.

2.2.2.5. Facteurs de risque de transmettre la tuberculose

Les résultats de génotypage ont permis de distinguer les cas de tuberculose récente, correspondant aux patients dont les souches sont en grappe, des cas de réactivation et de rechercher les facteurs potentiellement liés à la transmission récente d'une tuberculose tels que : le sexe, l'âge, la nationalité, le niveau de revenus, le mode de logement, la consommation d'alcool, le statut VIH, la localisation de la tuberculose, les antécédents médicaux, le retard au diagnostic. Aucun des facteurs de risque testés n'est significativement associé à la transmission récente de tuberculose, excepté celui concernant les patients âgés de moins de 60 ans (OR=2,32 [0,89-6,16] *; p=0,06*).

Le fait de n'avoir pu identifier de facteur de risque au sein de la population étudiée souligne les limites de cette étude réalisée avec un nombre restreint de patients en dépits des nombreuses années de suivi. De plus, la méthode de génotypage choisie, basée sur la combinaison du spoligotypage et du typage des 5-locus ETR, a très probablement été à l'origine d'une surestimation des taux de souches en grappe et de transmission récente du fait d'un manque de pouvoir discriminant de la méthode. Cette hypothèse est d'autant plus plausible que le phénomène de surestimation des taux de souches en grappe a déjà été décrit avec des méthodologies basées un nombre plus important de locus tels que les 12-locus MIRU-VNTR [103, 229]. Ces facteurs peuvent expliquer l'absence de facteurs de risque clairement identifiés dans cette étude et incitent à améliorer la méthodologie de typage des souches de *M. tuberculosis* circulant en Guadeloupe en évaluant de nouveaux sets de marqueurs minisatellites tels que les 15 ou 24-locus MIRU-VNTR [250].

Clade [a]	SIT	Spoligotypes	Nombre de souches (%) [b]	Pourcentage du profil dans SITVIT2 [c]	Pourcentage des souches de l'étude par rapport à SITVIT2 pour un profil donné [d]
Haarlem2	2	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■□□□□□□■□□□□■■■■■■■	9 (7,0)	10.58	0.15
Unk	3	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■■■■□■□□□□■■■■■■■	2 (1,6)	0.15	2.33
LAM	4	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■■■■■□□□□■■■■■■■	1 (0,8)	0.44	0.4
Unk	5	□□□□□□□□□■■□■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	2 (1,6)	0.05	7.14
T1 var	7	□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	3 (2,3)	0.1	5.17
EAI3-IND	11	■□□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■□■■□□□■■■■■	1 (0,8)	0.82	0.21
X3 var	14	■□■□□□□□□□□□■■■■■□■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	4 (3,1)	0.06	10.81
LAM2	17	■■□■■■■■■■■□■■■■■■■□□□□■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	8 (6,2)	0.94	1.49
LAM1	20	■■□■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	3 (2,3)	1.1	0.48
Unk	31	■■■■■■■□□□□□□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■□□□□	1 (0,8)	0.1	1.69
S Family	34	■■■■■■■■□□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	1 (0,8)	1.14	0.15
Haarlem3 var	35	■■■■■■■■■■■■■□■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□■□□□□■■■■■■■	1 (0,8)	0.17	1.02
T4	40	■■■■■■■■■■■■■■■■■■□■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	1 (0,8)	0.2	0.85
LAM9	42	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	9 (7,0)	3.74	0.42
T5	44	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	2 (1,6)	0.3	1.18
Haarlem1 var	45	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□■□□□□□□■□□□□■■■■■■■	3 (2,3)	0.14	3.85
Haarlem1	47	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□□□■□□□□■■■■■■■	1 (0,8)	1.91	0.09
Haarlem3	50	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□■□□□□■■■■■■■	8 (6,2)	4.12	0.34
T2 var	51	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■□□□□	7 (5,4)	0.36	3.4
T2	52	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■□■■■	1 (0,8)	0.98	0.18
T1	53	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	12 (9,3)	7.15	0.29
LAM11-ZWE	59	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■□□□□■■□□□□■■■■■■■	1 (0,8)	0.64	0.27
Haarlem3 var	67	■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■□■□□□□■■■■■■■	1 (0,8)	0.06	2.86
X3 var	70	■■■□□□□□□□□□■■■■■□■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■□■■■■	2 (1,6)	0.17	2
Unk	77	■■■■□□□□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	1 (0,8)	0.03	6.25
X3 var	91	■■■□□□□□□□□□■■■■■□■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	1 (0,8)	0.36	0.49
LAM5	93	■■■■■■■■■■■■□■■■■■■□□□□■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	10 (7,8)	0.51	3.42
Haarlem3 var	99	■■■■□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□■□□□□■■■■■■■	1 (0,8)	0.09	2.04
AFRI2 var	101	■■■■■■■□□□□□■■■■■■■□□□□■■□■■■■■■□■■■□□□■■■■■	1 (0,8)	0.03	5
Haarlem1 var	103	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□■■□□□□□□■□□□□■■■□■■■	2 (1,6)	0.01	66.67
T1 var	122	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□■■■■■■■□□□□■■■■■■■	2 (1,6)	0.04	9.09
Unk	124	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□□□■■■■■■■	1 (0,8)	0.08	2.27
T3 var	131	■■■■■■■■■■■■■□□■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	1 (0,8)	0.08	2.13
EAI1-SOM var	138	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■□■■■■■□□□□	1(0,8)	0.16	1.06
LAM8	290	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■□■■■■■□□□□■■■■■■■	1(0,8)	0.05	3.7
LAM5 var	333	■■■■■■■■■■■■■□■■■■■■□□□□■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	1(0,8)	0.02	9.09
T1 var	334	■□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	1(0,8)	0.11	1.61
Haarlem3 var	390	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□■□□□□■■■■■■■	1(0,8)	0.04	4.76
LAM9 var	509	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■□■■■■■■□□□□■■■■■■■	1(0,8)	0.02	11.11
LAM1 var	729	■■□■□■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	1(0,8)	0.01	16.67
Haarlem3 var	740	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□■■■■■■□■□□□□■■■■■■■	1(0,8)	0.02	11.11
LAM9 var	822	■■■■□■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	1(0,8)	0.03	5.88
S Family	831	■■■■■■■■□□■■■■□■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	1(0,8)	0.02	11.11
Unk	911	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□□□□□□□■■□□□□■■■■■■■	1(0,8)	0.05	3.33
LAM9 var	1087	□□■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□□■■■■■■■□□□□■■■■■■■	2 (1,6)	0.01	50
Unk	1233	■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	1(0,8)	0.01	14.29
Unk	1645	□■■■■■■■■■■■■□■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	1(0,8)	0.01	33.33
S Family	2053	■■■■■■■■□□■■■■■■■■■■■■■■■□■■■■■■□□□□■■■■■■■	1(0,8)	0.01	33.33
LAM1 var	2054	■■□■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■□□□□□■■■■■■	1(0,8)	0.01	33.33
T5 var	1913	■■■■■■■■■■■■■■■□■■■■■■□■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	1(0,8)	New SIT	New SIT
LAM5 var	2383	■■■■□■■■■■■■□■■■■■■■□□□□■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	1(0,8)	New SIT	New SIT
Unk	2689	■■■■■■■■■■■■■■■■■□■□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■■■■	1(0,8)	New SIT	New SIT
X1 var	orphan1	■■■■■■■■■■■■■■□■■□■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■□□■■■	1(0,8)		
undefined	orphan2	■■■■■■■■□■■■■■■□■■■■■■□□□□□■□□□□□■□□□□■■□■□■■	1(0,8)		
undefined	orphan3	■□□□□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■□□□□	1(0,8)		
undefined	orphan4	■■■■□■■■■■■■■□■■■■■■■■■■■□■■□□□□□□■■■■■■■	1(0,8)		
undefined	orphan5	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□□□□□□□□□□■□□□□■■■■■■■	1(0,8)		

[a] L'attribution de la clade à un profil de spoligotypage donné est fait conformément aux règles décrites dans Brudey et al., 2006. Unk : profil de spoligotypage pour lequel aucune clade n'a pu être attribuée.

[b] Ce pourcentage correspond au nombre de souches pour un profil donné rapporté au nombre total de souches dans la présente étude.

[c] Ce pourcentage correspond au nombre de souches avec le profil considéré dans SITVIT2 rapporté au nombre total de souches de la base de données au moment de la comparaison (juin 2010).

[d] Ce pourcentage correspond au nombre de souches de la présente étude pour un profil donné rapporté au nombre total de souches avec ce profil dans SITVIT2 au moment de la comparaison (juin 2010).

Tableau 10: Profils de spoligotypage obtenus pour les 129 isolats cliniques de *M. tuberculosis* de l'étude et comparaison avec la base de données SITVIT2

2.2.3. Conclusion et perspectives

Cette étude a permis de confirmer le faible taux d'incidence de la tuberculose en Guadeloupe (8,1 cas / 100 000 habitants) [12] ainsi que la faible proportion de souches résistantes aux antituberculeux de 1ère ligne (7,8%) en dépit d'un fort taux de co-infection TB/VIH (24,5%) [12, 146].

La caractérisation des patients, de leur devenir après leur mise sous traitement anti-tuberculeux, des filières de diagnostic et d'accès aux soins révèle une très forte proportion de patients perdus de vue (29,2%) ainsi que des délais importants d'accès aux soins soulignant la nécessité de renforcer et de coordonner les missions des acteurs de la lutte anti-tuberculeuse en Guadeloupe.

Pour le génotypage des souches nous avons remplacé la méthode de référence IS*6110*-RFLP, par le spoligotypage en association avec une 2nde méthode de génotypage basée sur les 5 ETR [239]. Le taux de transmission récente est ainsi estimé à 41,1%, par la formule N-1 basée uniquement sur les résultats de génotypage, 4,7% selon les enquêtes menées autour des cas et 18% par épidémiologie moléculaire.

Cette étude a par ailleurs permis de mettre en évidence la présence de clones récurrents en Guadeloupe (SIT 5 et SIT 14) ou associés à des profils de résistances voire de multirésistance aux antituberculeux (SIT5-VIT193 ; SIT93-VIT3 ; SIT17-VIT10 ; SIT20-VIT10 ; SIT50-VIT18) qui demanderont des investigations complémentaires.

3. Le modèle continental européen : cas d'un pays à faible endémicité (la Suède) (Article 4)

Article 4: Impact of immigration on tuberculosis epidemiology in a low-incidence country. Svensson E, Millet J, Lindqvist A, Olsson M, Ridell M, Rastogi N; The Western Sweden Tuberculosis Epidemiology Study Group. Clin Microbiol Infect. 2010. Sep 3.

3.1. Présentation de l'étude

Les pays à faible endémicité de tuberculose se caractérisent par la prédominance de cas de tuberculose d'importation, le plus souvent en provenance de pays à forte incidence de la maladie. La Suède est un bon exemple de pays à faible incidence (environ 5,5 cas pour 100 000 habitants), la population immigrante représentant 10% de la population globale et 78% des cas de tuberculose dans ce pays en 2007 (http://www.smi.se/statistik/tuberkulos). Ce travail est une première étude comparative de l'épidémie de tuberculose au sein de la population de patients nés à l'étranger et de celle de patients nés en Suède tout en

intégrant les caractéristiques génotypiques des 349 souches de *M. tuberculosis* collectées au cours des 5 années de l'étude (2001-2005).

3.2. Résultats

3.2.1. Origine des patients

Une majorité des patients de l'étude sont nés à l'étranger (n=260/349 ou 74,5%) principalement en Afrique (n=98/349 ou 28%). Au total 43 pays d'origine ont été répertoriés dans l'étude, la Somalie concentrant après la Suède la plus grande part des patients (n=89/349 vs 75/349 pour la Suède et la Somalie respectivement). Ces chiffres confirment l'importance des cas d'importation dans un pays à faible incidence de tuberculose comme la Suède. En effet, l'incidence globale de tuberculose en Suède est estimée à 5,5 cas / 100 000 habitants mais est en revanche estimée à 1,2 cas / 100 000 habitants au sein de la population née en Suède, à 37,5 cas / 100 000 habitants pour la population née à l'étranger et atteint 600 cas / 100 000 habitants chez les étrangers nés en Somalie.

3.2.2. Âge et sexe des patients

L'âge des patients pour l'ensemble des 349 patients suit une distribution bimodale (20-40 ans et 70-90 ans) laquelle n'est plus observée si les patients sont scindés en deux groupe selon leur lieu de naissance (nés en Suède ou nés à l'étranger). Une majorité des patients nés en Suède appartient à la classe d'âge 70-90 ans tandis qu'une majorité de ceux nés à l'étranger se situe dans la classe d'âge 20-40 ans, les moyennes d'âge des patients des deux groupes étant significativement différentes (66,6 vs 37,4 ans respectivement ; $p<0,001$). Ce résultat est en adéquation avec de précédentes études menées en Suède au sein de ces deux populations de patients [107, 222].

Ave un sex-ratio (homme/femme) de 0,9 les femmes semblent légèrement plus touchées par la tuberculose au sein de la population de patients nés à l'étranger tandis chez les patients nés en Suède cette tendance s'inverse complètement avec un sex-ratio de 1,6. La légère prédominance des femmes au sein de la population de patients nés à l'étranger est surprenante puisqu'elle va à l'encontre d'autres études présentant une très nette prédominance des hommes au sein de la population de patients tuberculeux [201] (Figure 15). Cette observation peut néanmoins s'expliquer par le fait que notre étude, contrairement à de nombreux autres travaux, prend en compte les cas de tuberculoses extrapulmonaires majoritairement retrouvées chez les femmes [100, 210, 222, 258].

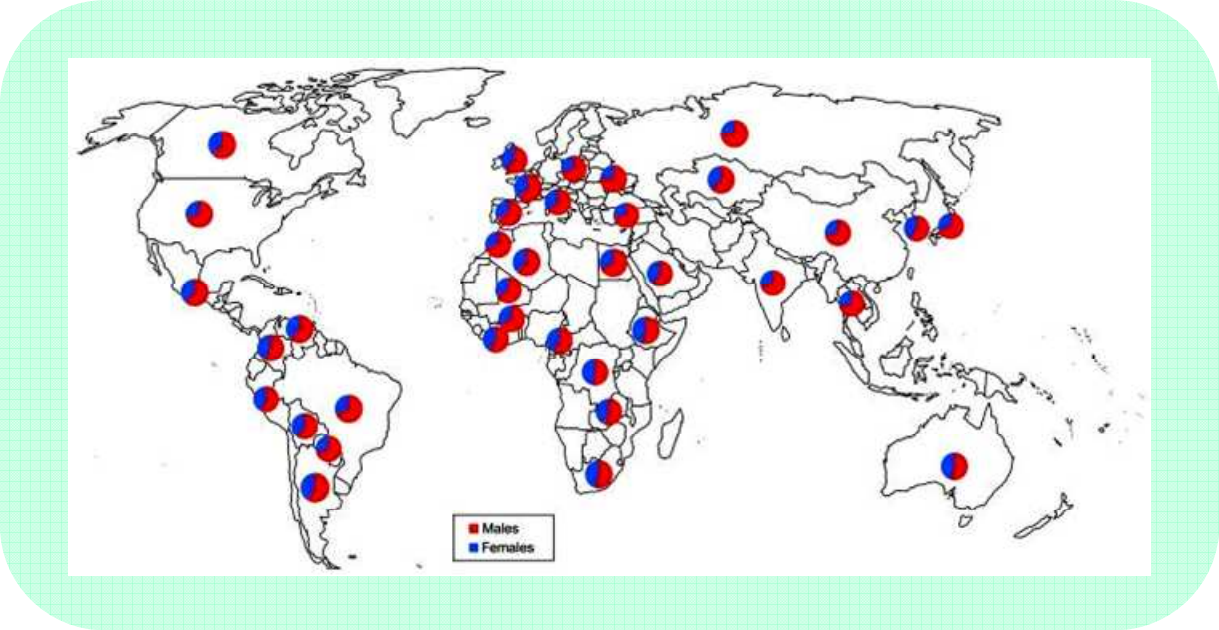


Figure 15: Sex-ratios observés à travers le monde pour tous les nouveaux cas de tuberculose à frottis positifs notifiés en 2007 d'après les chiffres publiés par l'OMS [201]

3.2.3. Manifestations cliniques de la maladie

Les tuberculoses pulmonaires s'accompagnant d'au moins une manifestation extrapulmonaire sont classées comme tuberculoses extrapulmonaires (TBE), la désignation de tuberculose pulmonaire (TBP) concerne les manifestations de la maladie sans aucun signe extrapulmonaire. Le ratio P/E (TBE/TBP) montre que les cas de tuberculoses pulmonaires concernent principalement les hommes ainsi que les patients nés en Suède. L'observation concernant les patients nés en Suède est d'autant plus marquée que les patients sont âgés de moins de 65 ans soulignant le fait que, chez ces patients, l'augmentation de l'âge pourrait s'accompagner d'une augmentation de cas de tuberculoses extrapulmonaires.

3.2.4. Origine des patients, manifestations cliniques et profils de génotypage des souches

Les résultats obtenus montrent que les patients nés en Afrique et au Moyen-Orient ont significativement plus de risque de développer une tuberculose extrapulmonaire (P/E ratio=0,7 ; OR 3,3 ; $p<0,001$ et P/E ratio=1,0 ; OR 2,9 ; $p=0,006$ pour les patients nés en Afrique et au Moyen-Orient respectivement) et que

les proportions de tuberculoses pulmonaires et extrapulmonaires sont identiques chez les patients nés en Asie et ceux au Moyen-Orient (P/E ratios de 1,2 et 1,0 respectivement) (Figures 16a et 16b).

Le spoligotypage des 349 isolats cliniques de *M. tuberculosis* collectés ont permis l'attribution d'une famille génétique pour 313 souches, 36 souches n'ayant pu être classifiées. L'étude des manifestations cliniques des cas de tuberculose montre que les patients porteurs de souches des familles génétiques EAI et CAS, présentent un risque accru de développer une tuberculose extrapulmonaire que les patients porteurs de souches d'autres familles génétiques (OR 3,0 ; *p=0,012* et OR 2,4 ; *p=0,047* pour les souches des familles EAI et CAS respectivement). En revanche, les cas de tuberculose développés par les patients porteurs des souches de la famille Beijing sont majoritairement pulmonaires (OR ajusté 4,44 ; *p=0,033*).

En raison de la faible taille des échantillons au sein de certains sous-groupes de l'étude, il ne nous a pas été possible de déterminer si le risque accru de développer une tuberculose extrapulmonaire chez les patients porteurs des souches EAI et CAS venait d'une prédisposition des patients à développer une tuberculose extrapulmonaire ou de l'existence de propriétés intrinsèques aux souches de ces famille génétiques. Cependant l'observation d'une majorité de tuberculoses pulmonaires chez les patients nés en Afrique et porteurs de souches de la famille T suggère que le génotype de la souche autant que l'origine des patients influerait sur la manifestation clinique de la maladie. Cette observation est corroborée par de récents résultats portant sur l'association entre les génotypes CAS et *M. bovis* et une manifestation extrapulmonaire de la maladie [160].

Enfin, la proportion de tuberculoses extrapulmonaire est supérieure au sein de groupe de souches ancestrales PGG1 par rapport aux souches PGG2/3, et les souches ancestrales PGG1 sont plus fréquemment retrouvées chez les patients nés à l'étranger que chez ceux nés en Suède.

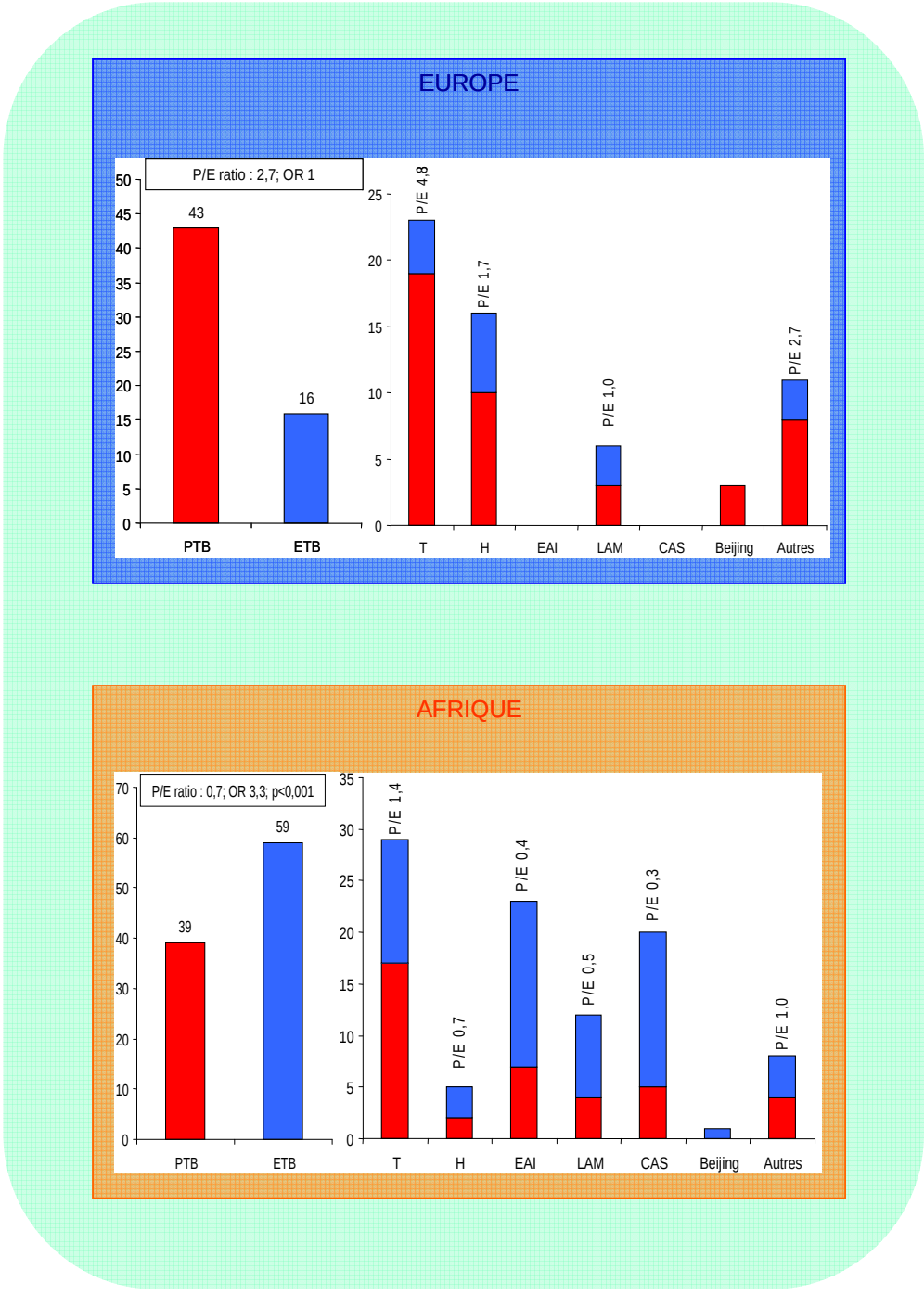


Figure 16a: Proportions de tuberculoses pulmonaires et extrapulmonaires (P/E ratio) observées par clade pour les patients originaires d'Europe et d'Afrique

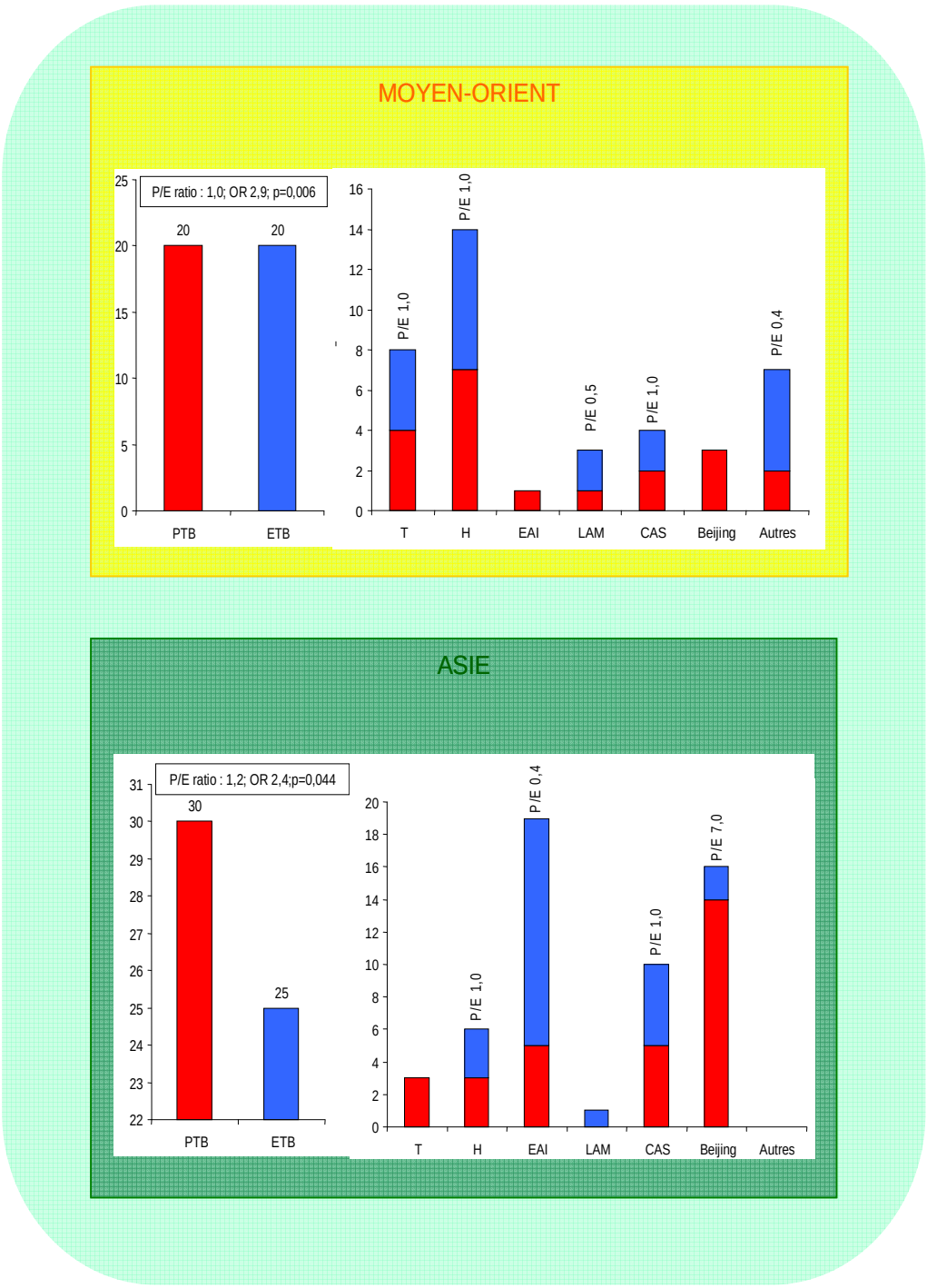


Figure 16b: Proportions de tuberculoses pulmonaires et extrapulmonaires (P/E ratio) observées par clade pour les patients originaires du Moyen orient et d'Asie

3.2.5. Résistance aux antituberculeux

La sensibilité des 349 isolats cliniques vis à vis de la streptomycine (SM), de l'isoniazide (INH), de la rifampicine (RIF) et de l'éthambutol (ETH) a été testée. Un total de 36 souches (10,3%) présentent une résistance à au moins un des quatre antibiotiques testés dont 35 ont été isolées chez les patients nés à l'étranger. Une plus grande proportion de souches résistantes est observée au sein de la famille Beijing avec 7/27 souches résistantes (26%). Six souches présentent une résistance cumulée à INH et RIF et sont classées comme MDR.

3.3. Conclusion et perspectives

Les résultats de cette étude confirment le très fort impact des cas de tuberculose d'importation dans un pays à faible incidence de la maladie comme la Suède. Les génotypes circulant dans les pays d'origine des souches d'importation pourraient être responsable de manifestations cliniques de tuberculose spécifiques (extrapulmonaires) et seraient davantage résistantes aux antituberculeux couramment employés.

Par ailleurs, en Suède, la population de patients tuberculeux nés à l'étranger serait constituée de patients jeunes (20-40 ans) et composée d'autant de femmes que d'hommes avec une légère prédominance de femmes et l'ensemble de ces observations devra désormais être pris en compte lors de l'établissement de plans de lutte contre la tuberculose dans ce pays.

Chapitre II : Marqueurs génétiques des souches de la famille Beijing

1. Présentation de la famille Beijing

Ce génotype a été découvert en 1995 dans la région de Beijing en Chine [279], bien que l'un de ses variants (souche W New York) ait été décrit pour la première fois lors de l'étude d'une flambée épidémique de tuberculose résistante aux antibiotiques survenue à New York en 1990 [23, 213]. En 1995, lors de leur découverte, les souches de la famille Beijing ont initialement été définies sur la base de leur profil d'IS*6110*-RFLP comprenant entre 15 et 20 bandes [152, 211, 279] et sur la base de leur profil de spoligotypage distinctif défini par l'absence des espaceurs n°1 à 34 et la présence des espaceurs n° 35 à 43 [279]. Le spoligotypage apparaît désormais comme la méthode de référence pour l'identification des souches de la famille Beijing [150]. Cette famille étant hautement conservée et homogène, l'utilisation de minisatellites pour le génotypage des souches de la famille Beijing, notamment les formats basés sur 15 et 24-locus MIRU-VNTR [250], a été proposé, ainsi qu'un format spécifiquement étudié pour le génotypage des souches de la famille Beijing du Japon [194, 308] avec des résultats variables selon la zone géographique et le taux de prévalence du génotype dans la zone étudiée.

Le génotype Beijing appartient au groupe phylogénétique 1 (PGG1 ; génotype *katG463/gyrA95*) selon la classification de Sreevatsan et al (1997) [242] et a plus récemment été considéré comme un génotype d'évolution moderne après étude de LSP et identification de l'absence de la séquence TbD1 dans le génome des souche de cette famille [33]. L'étude des LSP a aussi permis la caractérisation de six lignées phylogénétiques dont la lignée « Est Asiatique » définie par la délétion RD105 au sein de laquelle sont retrouvées les souches de la famille Beijing définie par la perte de RD207. Cette délétion (RD207) correspond à la perte des espaceurs n°1 à 34 au sein du locus DR à l'origine du profil de spoligotypage caractéristique de cette famille [101, 129, 264]. L'étude des LSP permet par ailleurs la distinction de quatre sous-groupes au sein de la famille Beijing définis en fonction de la présence ou de l'absence des régions de différence RD181, RD150, RD142 et de la séquence d'insertion IS*6110* dans la région NTF de leur génome [56, 168, 264]. Les délétions RD181, RD150 et RD142 ne sont retrouvées que chez certaines souches de la famille Beijing, RD150 et RD142 n'étant retrouvées que chez les souches présentant au préalable les délétions RD105 et RD181 (Figure 17). La présence ou l'absence d'IS*6110* dans la région NTF du génome

des souches de la famille Beijing permet une distinction entre les souches ancestrales (ou encore appelées atypiques, ou anciennes) définies par l'absence d'IS*6110* dans la région NTF, les souches modernes (ou typiques) caractérisées par la présence d'un IS*6110* et les souches W/Beijing définies par la présence de deux IS*6110* dans la région NTF [150, 156, 184, 187, 213] (Figures 18 et 19). L'origine supposée de la famille Beijing serait l'Asie centrale d'où il se serait répandu à travers le monde. Deux phénomènes évolutifs importants auraient jalonné l'histoire évolutive de ce génotype [184] :

- son origine dont la date est estimée au paléolithique, liée à un sous-groupe d'*Homo sapiens sapiens*,
- la propagation au néolithique des souches modernes de la famille Beijing dans les pays d'Asie de l'est.

L'expansion de la famille Beijing à partir des pays d'Asie de l'est vers le nord de l'Eurasie et l'Afrique du Sud correspondrait à un chapitre récent de l'histoire de cette famille phylogénétique dont la date, sans être connue, est estimée à moins d'un siècle [183, 184, 279]. Actuellement ce génotype est retrouvé partout à travers le monde [23, 33, 36, 111] mais prédomine en Asie de l'Est, en Afrique du Sud ainsi qu'en Eurasie [23, 111]. La proportion de souches de la famille Beijing dépasse 50% des cas de tuberculose dans la majorité des pays asiatiques et est particulièrement élevée au Vietnam, à Hong-Kong, en Indonésie, en Corée, en Thaïlande et à Taiwan [23, 36, 62, 85, 221]. De nombreuses études considèrent actuellement ce génotype comme émergent ou en expansion étant donné le nombre toujours plus important de cas causés par les souches de la cette famille [11, 41, 61, 257, 281, 285] et son taux estimé d'expansion démographique plus élevé que celui des autres familles génétiques du complexe *M. tuberculosis* [291].

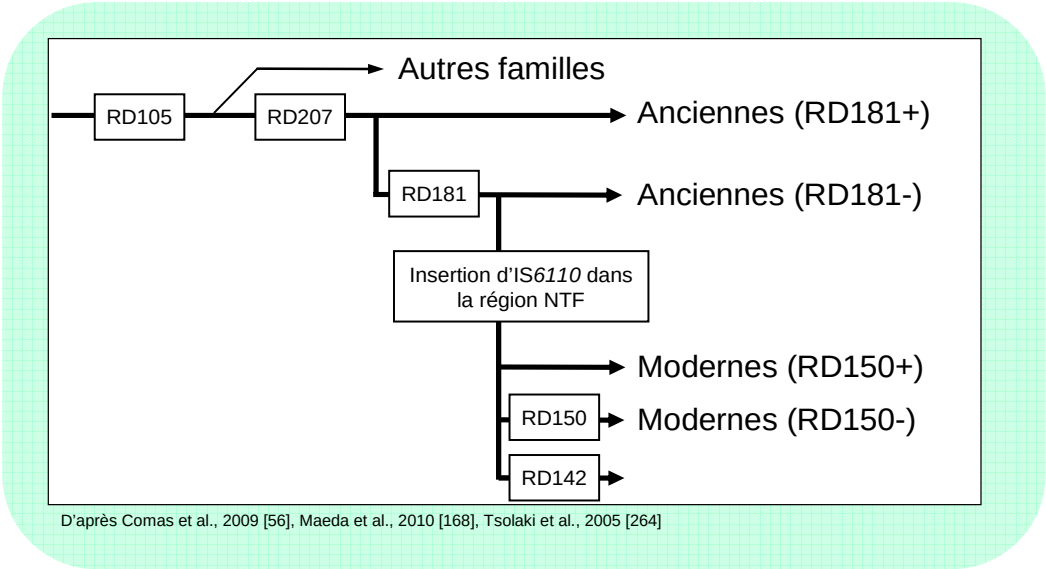


Figure 17: Phylogénie des souches de la famille Beijing. La région de délétion RD105 définit la lignée « Est-Asiatique » au sein de laquelle la famille Beijing se caractérise par la délétion RD207, correspondant à la perte des espaceurs n°1 à 34 du locus DR

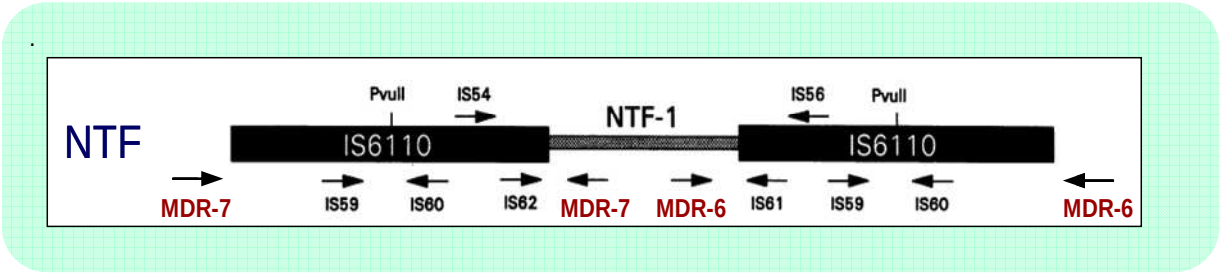
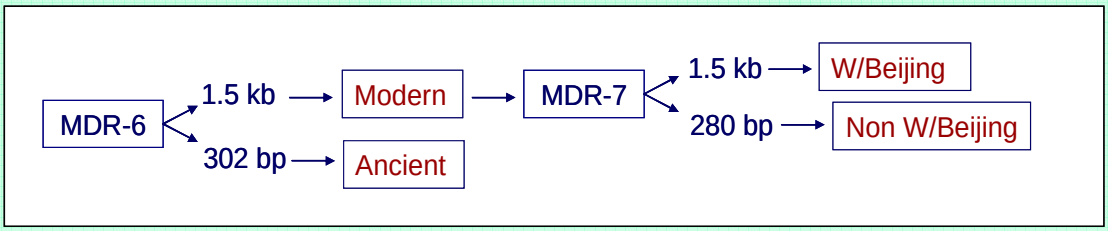


Figure 18: Schéma descriptif de la région NTF du génome de *M. tuberculosis* avec localisation des couples d'amorces utilisées (MDR-6 et MDR-7) pour l'amplification des sites potentiels d'insertion des séquences IS*6110* (d'après Plikaytis et al., 1994 [213])



Les souches de la famille Beijing pour lesquelles un fragment de 302 pb a été généré (absence d'IS6110) par amplification de la région NTF avec le couple d'amorces MDR6 sont classées comme anciennes. Celles pour lesquelles un fragment de 1,5 kb a été généré (présence d'IS*6110*) sont dites modernes. Au sein des souches Beijing modernes, il est possible de distinguer les W/Beijing pour lesquelles un fragment de 1,5 kb est généré (présence d'IS*6110*) lors de l'amplification de la région NTF avec le couple d'amorces MDR7.

Figure 19: Arbre décisionnel pour l'interprétation des résultats lors de l'amplification des sites potentiels d'insertion des séquences IS*6110* dans la région NTF du génome de *M. tuberculosis*

Les facteurs ayant favorisé l'émergence et la distribution actuelle des souches de la famille Beijing sont multiples et variables selon l'origine géographique des souches. Il a été reporté une moindre efficacité du BCG et des traitements médicamenteux envers les souches de la famille Beijing, ces facteurs ayant pu contribuer à l'émergence et à la transmission des souches de cette famille phylogénétique à travers le monde [151, 278]. Par ailleurs, les souches de la familles Beijing ont été associées, dans de nombreuses régions du monde, au développement de résistances vis-à-vis des antituberculeux couramment utilisés pour le traitement de la tuberculose, plusieurs hypothèses ayant été émises pour expliquer ce phénomène tels qu'un taux de mutation plus élevé pour les souches de cette famille, une modification de la propriété de leur paroi cellulaire entraînant une moindre concentration intracellulaire des différents antibiotiques employés ou encore leur plus grande virulence responsable de la persistance de la maladie et l'exposition prolongée des bacilles aux traitement causant l'apparition de résistances [208]. Ces hypothèses demandent néanmoins d'être confirmées par des études appropriées et/ou des expérimentations *in vitro*. Les souches de la famille Beijing ont par ailleurs montré des propriétés d'hypervirulence se manifestant chez l'homme par une plus

forte proportion de formes sévères ou extrapulmonaires de la maladie, d'échecs thérapeutiques et de rechutes, et l'induction de réponses immunitaires spécifiques chez les modèles animaux [2, 158, 205].

Pour résumer, la famille Beijing serait un génotype émergent, de plus en plus fréquemment retrouvé à travers le monde, responsable de plus de la moitié des cas de tuberculose dans la majorité des pays est-asiatiques et dont la proportion augmente de manière inquiétante en Russie, en Afrique du Sud et en Europe de l'est [61, 121, 205]. Les souches de cette famille ont par ailleurs montré des propriétés d'hypervirulence dans les modèles animaux et pourraient être responsables de formes graves de tuberculose chez l'homme. Le succès actuel des souches de la famille Beijing pourrait provenir de capacités intrinsèques, la vaccination par le BCG et les traitements antituberculeux ayant pu favoriser leur émergence.

Dans ce contexte, il nous est apparu important d'étudier la structure de la population de la famille Beijing circulant actuellement dans le monde et d'en connaître la distribution afin de mieux comprendre l'histoire évolutive de ce génotype. Nous nous sommes particulièrement intéressés à deux zones géographiques: le Japon où les souches de la famille Beijing seraient endémiques et présentes de manière ancestrale et la Russie où l'introduction des Beijing est supposée récente [184].
L'expansion de la famille Beijing étant clonale et les différentes lignées observées monophylétiques, les profils de spoligotypage obtenus pour l'ensemble des souches circulant actuellement ne présentent que peu de variabilité. De plus, afin d'éviter les inconvénients présentés par la méthode de génotypage IS*6110*-RFLP (durée, quantité d'ADN nécessaire, profils obtenus non comparables ni échangeables avec d'autres laboratoires, …), nous avons choisi d'étudier la famille Beijing par typage des minisatellites dont les 12, 15 et 24-locus MIRU-VNTR [250, 251]. La première partie de ce travail consiste en une évaluation des marqueurs minisatellites pour le génotypage des souches de la famille Beijing à Okinawa au Japon ainsi qu'en Russie, puis dans une seconde partie en une description de la structure de la population de souches de la famille Beijing actuellement en circulation au Japon sur la base de plusieurs formats de génotypage 12, 15, 21 et 24-locus MIRU-VNTR.

2. Sélection de marqueurs génétiques pour une meilleure discrimination des souches de la famille Beijing

2.1. Sélection de marqueurs génétiques pour les souches de la famille Beijing circulant au Japon (Article 5)

Article 5: Assessment of Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-QUB markers to further discriminate the Beijing genotype in a population-based study of the genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Okinawa, Ryukyu Islands, Japan. Millet J, Miyagi-Shiohira C, Yamane N, Sola C, Rastogi N. J Clin Microbiol. 2007. 45:3606-3615.

2.1.1. Présentation de l'étude

La diversité génétique des bacilles tuberculeux circulant au Japon n'est que très peu étudiée. En effet, en se référant à la base de données internationale de spoligotypes publiée en 2006, SpolDB4 décrivant les profils de spoligotypage de 39 295 souches provenant de 122 pays, nous remarquons que les souches du Japon ne représentent que 0,38% de la base de donnée [36]. Les quelques travaux publiés à ce jour sur la diversité génétique des souches de *M. tuberculosis* isolées dans un nombre limité de régions du Japon montrent une forte présence de souches de la famille Beijing dans cette région. Nous avons donc souhaité réaliser la première étude de la diversité génétique des souches de *M. tuberculosis* à Okinawa dans les îles Ryükyü, au Japon (Figure 20) et notamment étudier les souches de la famille Beijing supposées être surreprésentées dans cette région. Un total de 101 isolats cliniques a ainsi été collecté à Okinawa entre juillet 2003 et février 2005. La culture, les antibiogrammes et les extractions d'ADN ont été effectués à Okinawa, les ADN extraits ont été expédiés à l'Institut Pasteur de Guadeloupe pour génotypage.

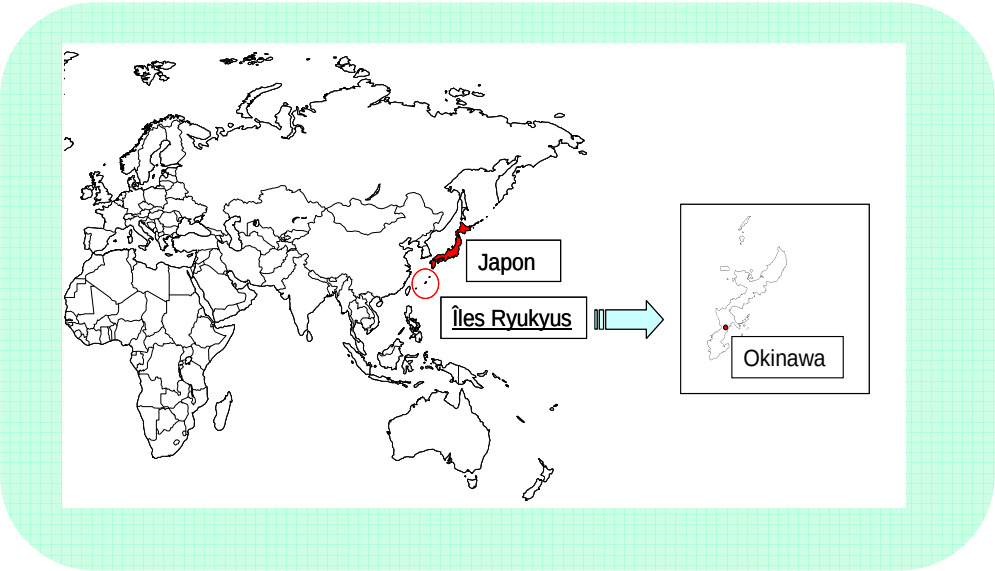


Figure 20: Localisation d'Okinawa dans l'archipel des Ryükyü au Japon

Des stratégies de génotypage distinctes ont été employées selon l'appartenance ou non des souches à la famille Beijing sur la base de leur profil de spoligotypage. Pour les souches n'appartenant pas à la famille Beijing, l'ensemble des 12-locus MIRU-VNTR [251] ont été génotypés, tandis que les 8 locus les plus discriminants parmi les 12 ont été sélectionnés pour le génotypage des souches de la famille Beijing. Pour ces souches, nous avons dans un deuxième temps complété le format de typage en sélectionnant un ensemble de 8 locus QUB [224, 233] pour lesquels un pouvoir discriminant acceptable a été préalablement reporté vis-à-vis des souches de la famille Beijing [143, 149] (Tableau 11).

2.1.2. Résultats

2.1.2.1. Données épidémiologiques et profils de résistance

Parmi les 101 patients de l'étude 55% appartiennent à la classe d'âge 60-90 ans tandis que 40% appartiennent à la classe d'âge 30-60 ans. La tuberculose à Okinawa concerne donc des patients âgés (moyenne d'âge 63,8 ans) et majoritairement des hommes (sex-ratio homme/femme de 3,6). Les profils de résistance des souches montrent que 15,8% des souches sont résistantes à au moins un antibiotique de première ligne utilisé pour le traitement de la tuberculose, et qu'aucune souche ne présente de profil de multirésistance.

2.1.2.2. Spoligotypage

Le fort taux de souches en grappe (87% ou 88/101 souches) obtenu par spoligotypage est lié à la surreprésentation de la famille Beijing qui regroupe à elle seule 71,3% (72/101) des souches de l'étude. Les autres familles observés sont les suivantes : T (12,8% ou 13/101 souches), EAI (5,9% ou 6/101 souches), Haarlem (4% ou 4/101 souches), LAM (2% ou 2/101 souches), X1 (1% ou 1/101 souches).

La proportion de souches de la famille Beijing à Okinawa bien qu'en adéquation avec le taux de 60% rapporté pour le sud-est asiatique [92], reste néanmoins l'une des plus élevées de la région [206, 207, 217]. L'absence de souches de la famille CAS reflète la quasi-absence de flux migratoire entre Okinawa et le sous-continent indien et les pays d'Asie centrale [36]. De même les faibles proportions de souches des familles européennes LAM (2% des souches) et Haarlem (4% des souches) semblent indiquer une quasi-absence d'échanges avec l'Europe et l'Amérique latine [36]. Enfin, au sein de la famille T qui, du fait de son statut mal défini, regroupe une plus grande proportion de souches (n=13/101 ou 12,8%), il est possible de distinguer la présence du clone spécifique T3-Osaka correspondant au SIT627, initialement décrit à Osaka par T. Matsumoto (données non publiées). Ce clone serait spécifique du Japon, toutes les souches de la base de données SITVIT2 (n=30) présentant ce profil ayant été isolées au Japon, à l'exception de 4 souches isolées aux Etats-Unis (n=2 dont 1 patient originaire du Japon), en Finlande (n=1), et en Inde (n=1).

2.1.2.3. Génotypage des souches n'appartenant pas à la famille Beijing

Le génotypage sur la base des 12-locus MIRU-VNTR des souches n'appartenant pas à la famille Beijing a permis de réduire le taux de souches en grappes de 65,5% (19/29) à 38% (11/29). Deux grappes initialement définies par spoligotypage ne sont pas séparées par le typage des 12-locus MIRU-VNTR, correspondant aux SIT52 (T2) et 627 (clone T3-Osaka) suggérant une probable transmission active en cours de ces profils.

De plus, certains profils MIRU (MIT310, 524 et 697) sont retrouvés chez des souches présentant des profils de spoligotypage similaires mais non identiques, et séparés par de faibles distances évolutives (variation d'un espaceur) (SIT627 et 2122, SIT53 et 172, SIT52 et 117) (Tableau 12). Ce résultat pourrait indiquer l'existence d'une évolution phylogénétique locale de ces clones et donc leur transmission active sans cependant mettre en évidence de lien épidémiologique entre les patients.

Nom du locus [a]	Position des séquences répétées sur le génome de la souche H37Rv [b]	Format 8-loci MIRU-VNTR [c]	Format 7-loci QUB [d]	Format 12-loci MIRU-VNTR "classique" [e]	Format 15-loci MIRU-VNTR [f]	Format 21-loci MIRU-VNTR [g]	Format 24-loci MIRU-VNTR [h]
MIRU-2	154111			X		X	X
MIRU-4	580546			X	X	X	X
MIRU-10	959868	X		X	X	X	X
MIRU-16	1644026	X		X	X	X	X
MIRU-20	2059429			X		X	X
MIRU-23	2531560	X		X		X	X
MIRU-24	2684427			X		X	X
MIRU-26	2996002	X		X	X	X	X
MIRU-27	3006875	X		X		X	X
MIRU-31	3192168	X		X	X	X	X
MIRU-39	4348401	X		X		X	X
MIRU-40	802194	X		X	X	X	X
ETR-A	2165223				X	X	X
ETR-B	2461279						X
ETR-C	577172				X	X	X
QUB-11a	2163607		X				
QUB-11b	2163729		X		X	X	X
QUB-18	1982873		X				
QUB-26	4052969		X		X	X	X
QUB-1451c	1451778		X				
QUB-1895	1895344		X				
QUB-4156c	4156797		X		X	X	X
Mtub04	424010				X	X	X
Mtub21	1955580				X	X	X
Mtub29	2347393						X
Mtub30	2401815				X	X	X
Mtub34	3171465						X
Mtub39	3690947				X	X	X

[a] Le nom des MIRU a été attribué par Supply et al.,2000 et Supply et al., 2001 ; celui des ETR par Frothingham et al., 1998 ; celui des QUB par Skuce et al., 2002 et Roring et al., 2002 ; celui des Mtub par Le Flèche et et al., 2002.
[b] La position des loci sur le génome de la souche de référence, H37Rv, est répertoriée par Le Flèche et al., 2002.
[c] Le format 8-loci MIRU-VNTR a été défini dans la présente étude.
[d] Le format 7-loci QUB a été défini dans la présente étude.
[e] Le format 12-loci MIRU-VNTR a été défini par Supply et al., 2000 et Supply et al., 2001.
[f] Le format 15-loci MIRU-VNTR a été défini par Supply et al., 2006.
[g] Le format 21-loci MIRU-VNTR est une combinaison des formats 12-loci et 15-loci MIRU-VNTR.
[h] le format 24-loci MIRU-VNTR a été défini par Supply et al., 2006.

Tableau 11 Présentation des différents minisatellites et des combinaisons de locus utilisés pour l'étude des souches de *M. tuberculosis* isolées à Okinawa

SIT	Spoligotype binaire	Clade	12-loci MIRU	MIT
627	■■■■□□□□■■■■□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	T3-Osaka	215125113322	310
2122	■■■■□□□□■■■■□■■■■□■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	T3-Osaka var	215125113322	310
53	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	T1	222326153311	524
172	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	T1-var	222326153311	524
52	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■□■■■	T2	242225152323	697
117	■■■■■■■■■■■■■■■□■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■□■■■	T2-var	242225152323	697

Tableau 12: Évolution phylogénétique probable de spoligotypes dont les profils MIRU sont identiques

2.1.2.4. Génotypage des souches de la famille Beijing

Les souches de la famille Beijing ont donné lieu dans un premier temps au typage de 8 des 12-locus MIRU-VNTR préalablement sélectionnés pour leur pouvoir de discrimination élevé. La sélection des 8 locus, s'est effectuée à parti d'un sous échantillon de la base de données SITVIT2 composée de souches de la famille Beijing pour lesquelles un profil 12-locus MIRU-VNTR était disponible (n=694). Une comparaison de chacun des 12 locus a permis de constater que les locus n° 10, 16, 23, 26, 27, 31, 39 et 40 présentaient les index de discrimination (HGDI) les plus élevés et variant de 0,080 à 0,385, bien que ceux-ci soient relativement faibles par comparaison aux valeurs observées pour des minisatellites définis comme hautement discriminants [239].

Le fort taux de souches en grappe de 73,6% obtenu par le format de typage basé sur 8-locus MIRU-VNTR a été réduit à 23,6% par l'utilisation d'un format de typage combinant à la fois les 8-locus MIRU-VNTR et 7-locus QUB. En comparant les pouvoirs discriminants des différents locus étudiés, on observe que 6 des 7 QUB sont les plus discriminants avec des valeurs de HGDI comprises entre 0,453 (QUB1895) et 0,680 (QUB11b), ces valeurs étant nettement supérieures à celles observées pour les 8-locus MIRU-VNTR comprises entre 0,08 (MIRU27) et 0,385 (MIRU26).
Une comparaison des profils 8-locus MIRU-VNTR obtenu pour les Beijing de notre échantillon avec la base de données SITIVTI2 a montré que 97,4% des souches de la base de données avec des profils MIRU-VNTR similaires et dont le spoligotype était disponible appartenaient à la famille Beijing ou un variant. Cette observation indique que les 8-locus MIRU-VNTR, de même que le QUB1451 invariable dans cette étude (HGDI=0), pourraient être évalués en tant que marqueurs d'identification des souches de la famille phylogénétique Beijing lors d'études prospectives.

2.1.3. Conclusion et perspectives

Les souches de la famille Beijing largement majoritaires en Asie du sud-est ainsi qu'au Japon posent un problème de santé publique dans ces pays. En effet, les souches de cette famille génétique ont montré dans certaines études une propension à développer une résistance aux antituberculeux [85], des propriétés d'hypervirulence ou encore des capacités d'échappement aux mécanismes de défense immunitaires de l'hôte [2, 208]. La faible diversité génétique observée parmi les souches de cette famille, limite la portée des investigations d'épidémiologie moléculaire dans les pays où ce clone prédomine, les grappes obtenues n'étant pas systématiquement le reflet de l'existence de liens épidémiologiques réels entre les patients. Cette étude a ainsi permis de montrer qu'à Okinawa, l'utilisation de six marqueurs minisatellites QUB (QUB11a, 11b, 18, 26, 1895 et 4156) permettait de réduire le taux de souches en grappe et présentait un

meilleur pouvoir discriminant (HGDI=0,990) vis à vis des souches de la famille Beijing que les formats de génotypage basés sur 8-locus (HGDI=0,904) ou 12-locus (HGDI=0,944) MIRU-VNTR.

2.2. Sélection de marqueurs génétiques pour les souches de la famille Beijing circulant en Russie (Article 6)

Article 6: *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype in Russia: in search of informative variable-number tandem repeat loci. Mokrousov I, Narvskaya O, Vyazovaya A, Millet J, Otten T, Vishnevsky B, Rastogi N. J Clin Microbiol, 2008. 46(11):3576-3584.

2.2.1. Présentation de l'étude

L'épidémie de tuberculose en Russie est en grande partie due à la transmission de souches de la famille phylogénétique Beijing, ces souches représentant plus de la moitié des isolats cliniques de *M. tuberculosis* identifiés dans ce pays [23, 111, 145]. Cette observation pose un réel problème de santé publique d'autant qu'un lien a été établi, en Russie, entre les souches de cette famille phylogénétique et des profils de multirésistance aux antituberculeux [78, 199].

Si le spoligotypage constitue la méthode de référence pour l'identification de cette famille phylogénétique, l'utilisation de l'IS*6110*-RFLP reste une technique de choix pour la discrimination des isolats cliniques et la mise en évidence de liens épidémiologiques éventuels entre les patients porteurs de ces souches lors d'études d'épidémiologie moléculaire. Cependant, cette méthode, longue et fastidieuse, nécessite l'utilisation de grandes quantités d'ADN, et a de ce fait été peu à peu remplacée par le génotypage des minisatellites MIRU-VNTR. Dans la présente étude, nous avons souhaité évaluer la capacité d'un format de génotypage reposant sur 24-locus MIRU-VNTR et 3-locus hypervariables (HV) (QUB3232, VNTR3820, VNTR4120) à discriminer les souches de la famille Beijing isolées en Russie par comparaison à l'IS*6110*-RFLP.

Deux échantillons de souches de la famille Beijing provenant de la collection de souches de l'Institut Pasteur de Saint-Pétersbourg ont ainsi été sélectionnés sur la base de leurs profils d'IS*6110*-RFLP. Le premier échantillon (n=48) est constitué de souches aux profils d'IS*6110*-RFLP dissemblables (plus de 30% de dissimilitudes) et dont les patients n'ont pas de liens épidémiologiques avérés entre eux. Au sein de cet échantillon, 44/48 souches ont été préalablement utilisées pour l'évaluation du format de génotypage

basé sur les 12-locus MIRU-VNTR [185] vis-à-vis des souches de la famille Beijing de Russie. Le deuxième échantillon (n=72) comprend les souches de la famille Beijing présentant les profils d'IS*6110*-RFLP étiquetés B0 (n=34) et A0 (n=38), répertoriés comme étant les plus répandus en Russie et retrouvés respectivement chez 27% et 23% des Beijing de la base de données de profils d'IS*6110*-RFLP de l'Institut Pasteur de Saint-Pétersbourg [199].

2.2.2. Résultats

2.2.2.1. Génotypage du premier échantillon de souches (n=48)

Les profils d'IS*6110*-RFLP des souches de *M. tuberculosis* de cet échantillon sont à plus de 30% dissemblables et les patients porteurs de ces souches n'ont pas de liens épidémiologiques avérés.

Les valeurs de HGDI de chacun des 27 minisatellites présentent une grande disparité et varient de 0 pour 10 locus monomorphes (MIRU2, MIRU4, MIRU23, MIRU24, MIRU27 et MIRU39, ETRB, Mtub04, Mtub34 et Mtub39) à 0,636 pour le locus QUB26 et 0,729 pour le locus HV QUB3232.

Quelque soit la combinaison de marqueurs minisatellites utilisée dans cette étude, aucune, pas même celle reposant sur les 24-locus MIRU-VNTR, n'atteint le pouvoir discriminant de l'IS*6110*-RFLP (valeur de l'HGDI égale à 0,996 vs 0,974 pour le format 24-locus MIRU-VNTR). De plus, les index de discrimination des formats de typage reposant sur 15 et 24-locus MIRU-VNTR, du fait de la présence des 10 locus monomorphes, sont quasiment égaux. Si les trois locus HV permettent d'augmenter sensiblement l'index de discrimination du format 15-locus MIRU-VNTR qui de 0,905 atteint la valeur de 0,974, il faut cependant noter que seul le locus QUB3232 peut être considéré comme hautement discriminant [239], le pouvoir discriminant des deux autres locus étant inférieur à 0,6 (0,370 pour le locus VNTR4120 et 0,542 pour le locus VNTR3820).

Enfin, nous avons défini un format de typage réduit basé sur 7 des 27 locus étudiés (3-locus HV, QUB11b et QUB26, Mtub21, MIRU26) et permettant d'atteindre un index de discrimination proche de celui obtenu par la combinaison des 15-locus MIRU-VNTR et des 3 locus HV (0,974 vs 0,963 pour le format réduit basé sur 7-locus).

2.2.2.2. Génotypage du deuxième échantillon de souches (n=72)

Au sein de ce groupe, 38 souches présentent le profil d'IS*6110*-RFLP préalablement étiqueté A0, tandis que 34 souches présentent le profil d'IS*6110*-RFLP préalablement étiqueté B0 [199].

Pour le génotypage des 72 souches, seuls les 17 locus apparaissant comme polymorphes ont été utilisés sur les 27 étudiés lors du typage du premier groupe de souches (n=48). Les cinq locus les plus discriminants

sont identiques à ceux observés précédemment tandis que cinq locus minisatellites, correspondant aux locus Mtub21, Mtub29, MIRU10, MIRU20, et ETRC, initialement polymorphes, apparaissent comme monomorphes vis-à-vis de ce groupe de souches.
Les 17 locus sélectionnés permettent de réduire la taille de la grappe A0 (n=38) et mettent en évidence 12 profils de génotypage distincts au sein de cette grappe (HGDI=0,860) tandis qu'au sein de la grappe B0 22 souches restent en grappe et ne peuvent être séparées par le génotypage des 17 locus (HGDI=0,585).

2.2.3. Conclusion et perspectives

En comparant les résultas de cette étude à ceux publiés pour les pays asiatiques, nous observons un plus faible pouvoir discriminant du format de génotypage basé sur 12-locus MIRU-VNTR vis-à-vis des souches de la famille Beijing en Russie (HGDI=0,723) qu'au Japon par exemple (HGDI=0,941 [141] ; HGDI=0,944 (cf. section précédente)). De plus, alors que la valeur de HGDI du format basé sur 15-locus MIRU-VNTR + 3-locus HV équivaut à celui obtenu par l'IS*6110*-RFLP au Japon (0,9980 vs 0,9978 pour l'IS*6110*-RFLP), ce n'est pas l'observation qui est faite dans notre étude où ce format de typage, de même que celui basé sur 24-locus MIRU-VNTR, reste moins discriminant que l'IS*6110*-RFLP (0,996 vs 0,974 pour le format 15-locus MIRU-VNTR + 3 HV et 0,996 vs 0,906 pour le format 24-locus MIRU-VNTR). Enfin, on observe que les locus HV et certains locus hautement polymorphes tels que les QUB11b, Mtub04, Mtub30 et MIRU10, sont moins discriminants en Russie et dans notre étude que dans les autres pays où ces locus ont été étudiés vis-à-vis des souches de la famille Beijing. Cette moindre diversité génétique de souches de la famille Beijing mise en évidence en Russie comparativement au Japon ou à la Chine peut être considérée comme un reflet de la diffusion récente (environ 100 ans) de cette famille phylogénétique dans ce pays [184]. En étant transmis depuis moins longtemps en Russie que dans les pays asiatiques d'où il aurait émergé, ce clone présenterait ainsi une plus faible diversité de ses profils génétiques.
Par ailleurs, la mise en place de formats de génotypage de minisatellites basés sur un nombre toujours plus important de locus MIRU-VNTR pour le génotypage et la discrimination des souches de la famille Beijing semble être une méthode concluante au vue des indices de discriminations observés avec le format 24-locus MIRU-VNTR proches de ceux obtenus avec l'IS*6110*-RFLP mais pose un problème de mise en pratique. En effet, selon la proportion de souches de la famille Beijing à génotyper et les moyens humains et matériels disponibles au laboratoire, l'étude d'un nombre de locus supérieur à 10 peut être fastidieux et demander l'automatisation de la méthode, ce qui n'est pas toujours réalisable. Ainsi, nous avons proposé un format de génotypage réduit, basé sur seulement 7-locus MIRU-VNTR, dont le pouvoir discriminant satisfaisant permet qu'il soit utilisé comme outil de génotypage de première ligne pour un premier criblage des souches de la famille Beijing. Ce format demande cependant des investigations supplémentaires afin

d'être validé vis-à-vis des souches circulant dans la région de Saint-Pétersbourg mais aussi dans toute la Russie.

Enfin, le clone Beijing B0 prédominant en Russie a pu être étudié et nous avons ainsi pu mettre en évidence une signature spécifique de ce clone reposant sur un couple de locus, MIRU26/QUB26, et permettant d'identifier 95% des souches avec le profil IS6110-RFLP « B0 ». La mise en évidence de cette signature permettra après évaluations supplémentaires de disposer dans le futur d'un outil d'identification rapide de ce clone dont l'hypervirulence, la multirésistance aux antituberculeux et la transmissibilité accrue ont été décrites en Russie [161, 199, 200].

3. Structure de la population de souches de la famille Beijing au Japon

3.1. Structure de la population de souches de la famille Beijing à Kobe basée sur 12-locus MIRU-VNTR

Les facteurs ayant favorisé la transmission des souches de *M. tuberculosis* de la famille Beijing à travers le monde et particulièrement dans les pays de l'est et du sud-est asiatique demeurent encore mal définis. Ces caractères ayant été probablement acquis au cours de l'évolution, il apparaît comme primordial d'étudier la phylogénie globale des souches de cette famille génétique redoutablement efficace et pouvant représenter jusqu'à 90% des cas de tuberculose dans certains pays d'Asie.

Dans ce contexte, nous avons souhaité étudier la structure de la population de souches de la famille Beijing circulant actuellement au Japon et la comparer à celle de souches de la famille Beijing provenant d'autres zones géographiques, afin de mettre en évidence les particularités de cette famille phylogénétique au Japon et d'identifier les relations phylogénétiques existant entre ces souches au niveau mondial.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la structure de la population de souches de *M. tuberculosis* circulant à Kobe, et avons donc étudié les profils de spoligotypage de 1325 souches collectées sur une période de sept ans (2002-2009), et les profils de génotypage basés sur 12-locus MIRU-VNTR d'un sous-échantillon de 482 souches.

Nous avons ensuite décrit la structure de la population de souches de *M. tuberculosis* circulant au Japon en analysant les profils de spoligotypage, et les familles phylogénétiques associées, des bacilles tuberculeux de 3 grandes villes de l'île : Kobe (n=1325), Okinawa (n=101), et Okayama (n=136) (Figure 21). Enfin, nous avons étudié les relations phylogénétiques liant les souches de la famille Beijing de diverses origines (Tableau 13) en établissant un MST basé sur les profils de génotypage 12-locus MIRU-VNTR.

Le spoligotypage des 1325 souches isolées à Kobe a fourni 108 profils distincts dont 32 se sont avérés être orphelins par comparaison avec la base de données SITVIT2 et pour lesquels aucun numéro de SIT n'a donc été attribué, et 76 existaient préalablement dans SITVIT et se sont vu attribuer un numéro de SIT. Parmi les 76 profils avec numéro de SIT, 15 correspondent à de nouveaux SIT créés lors de l'entrée des profils de spoligotypage des souches de Kobe dans la base de donné (SIT211, 2123, 2558, 3098, 3193, 3195, 3196, 3198 et 3199). Sur les 1325 souches isolées à Kobe, 94,7% d'entre elles (n=1255/1325) sont en grappe par spoligotypage (38 grappes, de 2 à 975 souches par grappe), la grappe correspondant au SIT 1 regroupant à elle seule 73,6% des souches de l'étude.

Pays	Nombre de souches
Albanie (ALB)	3
Bangladesh (BGD)	15
Belgique (BEL)	25
Guyane Française (GUF)	2
Japon (JPN)	451
Kirghizistan (KGZ)	37
Martinique (MTQ)	3
Pays-Bas (NLD)	10
Pologne (POL)	2
Russie (RUS)	133
Afrique du Sud (ZAF)	72
Espagne (ESP)	4
Suède (SWE)	9
Trinidad et Tobago (TTO)	6
Royaume-Unis (GBR)	4
Etats-Unis (USA)	226
Total	**1002**

Les codes à 3 lettres correspondent à la nomenclature ISO 3166-1 alpha-3 disponible sur le site Internet: http://fr.wikipedia.org/wiki/ISO_3166-1

Tableau 13: Liste des 1002 souches de la famille Beijing sélectionnées pour la réalisation du MST et leur origine géographique

La comparaison des profils de spoligotypage obtenus avec ceux disponibles pour le Japon dans la base de données SITVIT2 et provenant d'Okinawa (n=101), et d'Okayama (n=136) montre une structure de population de souches de *M. tuberculosis* relativement homogène pour l'ensemble du Japon (Figure 22). En effet, les profils de spoligotypage observés sont quasiment identiques pour chacune des villes étudiées, les SIT 1, 53 et 627 représentant entre 68,3% et 73,6%, 3,0 et 4,6%, et entre 1,9% et 5,1% des souches respectivement (Tableaux 14, 15 et 16).

Hormis la famille Beijing, prépondérante et représentant 77,5% (n=1211/1562) des souches de *M. tuberculosis* au Japon, les autres familles génétiques observées sont les suivante : la famille T (n=147/1562 ou 9,4%), T3-Osaka (n=55/1562 ou 3,5%), EAI (n=35-1562 ou 3,5%), Haarlem (n=29/1562 ou 1,9%) et LAM (n=20/1562 ou 1,3%).

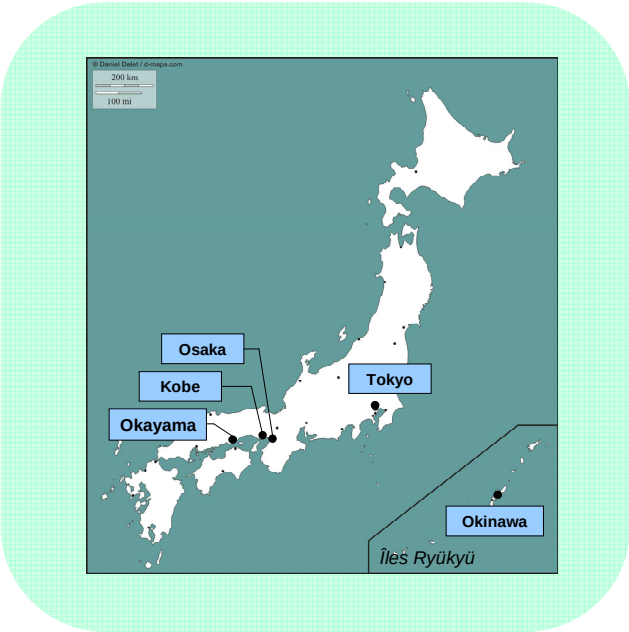


Figure 21: Carte du Japon

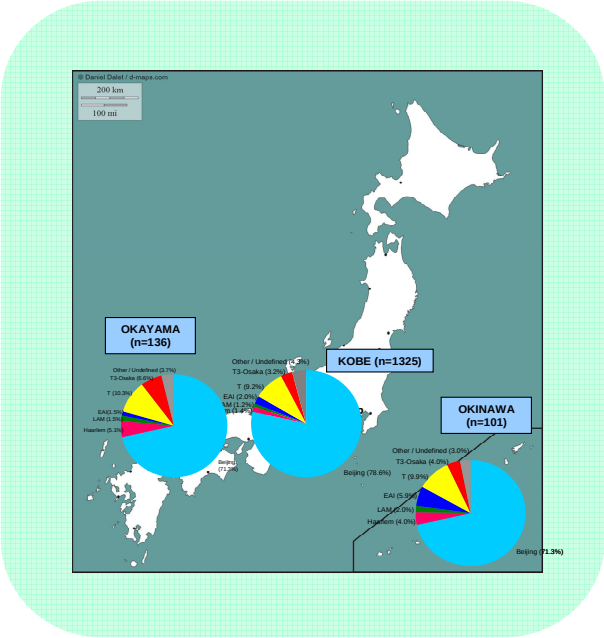


Figure 22: Distribution géographique des différents clades observés au Japon dans les villes de Kobe, d'Okayama et d'Okinawa

La distribution de ces clades dans les trois villes étudiées montre cependant quelques disparités. En effet, la proportion de souches de la famille Beijing est significativement supérieure à Kobe (78,6% vs 71,3% à Kobe et dans les deux autres villes respectivement ; $p<0,02$), tandis que celle des souches de la famille EAI est significativement supérieure à Okinawa (5,9% vs 2,2% à Okinawa et dans les deux autres villes

respectivement; *p<0,01*). De plus, les proportions de souches des familles Haarlem et T3-Osaka sont significativement supérieures à Okayama (5,1% vs 1,9% de souches de la famille Haarlem à Okayama et dans les deux autres villes respectivement; *p<0,01* et 6,6% vs 3,5% de souches de la famille T3-Osaka à Okayama et dans les deux autres villes respectivement; *p<0,05*).

Si les différences importantes de taille d'échantillon et de durées d'échantillonnage existant entre Kobe et les deux autres villes étudiées (Okinawa et Okayama) incitent à pondérer l'interprétation de ces résultats, ceux-ci peuvent néanmoins refléter des situations épidémiques variées.

Famille	SIT	Spoligotype	Nombre de souches (%) [a]
Beijing	1		975 (73,6%)
T1	53		61 (4,6%)
T3-OSA	627		25 (1,9%)
T2	52		24 (1,8%)
EAI2-Manilla	19		18 (1,4%)
Beijing-var	621		15 (1,1%)
Indéfinie	2124		15 (1,1%)
Beijing-var	190		11 (0,8%)
Beijing-var	269		9 (0,7%)
H3	50		8 (0,6%)
Beijing-var	1364		8 (0,6%)
LAM9-var	388		7 (0,5%)
T3	37		6 (0,5%)
T1-var	118		6 (0,5%)
Indéfinie	2041		6 (0,5%)
Indéfinie	4		5 (0,4%)
LAM9	42		5 (0,4%)
Beijing-var	265		4 (0,3%)
Beijing-var	632		4 (0,3%)
X3	92		3 (0,2%)
Beijing-var	255		3 (0,2%)
T1-var	291		3 (0,2%)
Indéfinie	523		3 (0,2%)
T3-OSA-var	2121		3 (0,2%)
T1-var	7		2 (0,2%)
LAM4	60		2 (0,2%)
Indéfinie	125		2 (0,2%)
Beijing-var	406		2 (0,2%)
Beijing-var	541		2 (0,2%)
Beijing-var	941		2 (0,2%)
T	956		2 (0,2%)
EAI2-Manilla-var	1189		2 (0,2%)
T	2558		2 (0,2%)
Indéfinie	2669		2 (0,2%)
Indéfinie	3096		2 (0,2%)
T3-OSA-var	3192		2 (0,2%)
T3-OSA-var	3194		2 (0,2%)
H3-var	3197		2 (0,2%)

[a] le % correspond à la proprtion de souches pour un SIT donnée par rapport au nombre total de souches de M. tuberculosis collectées à Kobe (n=1325 souches)

Tableau 14: Profils de spoligotypage obtenus pour les 1255 souches de *M. tuberculosis* en grappe de Kobe

Famille	SIT	Spoligotype	Nombre de souches (%) [a]
Beijing	1	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■■■■■■■■	97 (71,3%)
T3-OSA	627	■■■■□□□□■■■■■□■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■	7 (5,1%)
T1	53	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■	6 (4,4%)
H3	50	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□■□□□□■■■■■■■■	4 (2,9%)
T2	52	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■□■■■	4 (2,9%)
H3-var	35	■■■■■■■■■■■■■□■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□■□□□■■■■■■■■	2 (1,5%)
LAM9-var	388	■■■□■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■	2 (1,5%)
EAI1-SOM	48	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■□■■■■■□■■■	1 (0,7%)
EAI2-Manilla	19	■■□■■■■■■■■■■■■■■■■□□■■■■■■■□□□□■□■■■■■■■■■■	1 (0,7%)
H3-var	99	■■■■□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■	1 (0,7%)
T	51	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■□□□□	1 (0,7%)
T	orphan	■■■■■■■■■■■□□□□□□□□■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■	1 (0,7%)
T1-var	7	□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■	1 (0,7%)
T1-var	334	■□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■	1 (0,7%)
T3-OSA-var	orphan	■■■■□□□□■■■■□■■■■■■■■□□■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■	1 (0,7%)
T3-OSA-var	orphan	■■■■□□□□■■□□□□□■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■	1 (0,7%)
Indéfinie	523	■■■	1 (0,7%)
Indéfinie	749	■■■■■■■■■■■■■■■■■■□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■	1 (0,7%)
Indéfinie	1338	■■□■■■■	1 (0,7%)
Indéfinie	2123	■■■■■■■■■■□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■	1 (0,7%)
Indéfinie	orphan	■■□□□□□□□□□■□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■	1 (0,7%)

[a] le % correspond à la proportion de souches pour un SIT donné par rapport au nombre total de souches de *M. tuberculosis* collectées à Okayama (n=136).

Tableau 15: Profils de spoligotypage obtenus pour les 136 souches de *M. tuberculosis* collectées à Okayama.

Famille	SIT	Spoligotype	Nombre de souches (%) [a]
Beijing	1	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■■■■■■■■	69 (68,3%)
EAI2-Manilla	19	■■□■■■■■■■■■■■■■■■■□□■■■■■■■□□□□■□■■■■■■■■■■	5 (5,0%)
H3	50	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□■□□□□■■■■■■■■	3 (3,0%)
T1	53	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■	3 (3,0%)
Beijing-var	627	■■■■□□□□■■■■□■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■	2 (2,0%)
LAM9-var	388	■■■□■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■	2 (2,0%)
T1-var	172	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■	2 (2,0%)
T2	52	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■□■■■	2 (2,0%)
Beijing-var	190	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■■■□■■■	1 (1,0%)
Beijing-var	255	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■■□■■■■	1 (1,0%)
Beijing-var	1364	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■□□■■■■	1 (1,0%)
EAI5-var	256	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■□■■■■□■■■■	1 (1,0%)
H1-var	742	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□□□□■□□□□■■■■■■■■	1 (1,0%)
S-var	2367	■■■■■□■■□□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■	1 (1,0%)
T	2025	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□□□■■■■■■	1 (1,0%)
T	orphan	■■■■■■■■■■■□□□□□□■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■□■■■	1 (1,0%)
T2-var	117	■■■■■■■■■■■■■■■□■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■□■■■	1 (1,0%)
T3-OSA-var	2122	■■■■□□□□■■■■□■■■■□■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■	1 (1,0%)
T3-var	orphan	■■■■■■■■■■□□□■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□□□■■■■■■	1 (1,0%)
Indéfinie	2041	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□□□□□□□□□■■■■■■■■	1 (1,0%)
X1-var	orphan	■■■■■■■■■■■■■■■■□■□□■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■	1 (1,0%)

[a] le % correspond à la proportion de souches pour un SIT donné par rapport au nombre total de souches de *M. tuberculosis* collectées à Okinawa (n=101).

Tableau 16: Profils de spoligotypage obtenus pour les 101 souches de *M. tuberculosis* collectées à Okinawa

Ainsi, Okinawa pourrait avoir davantage de contacts avec l'Inde et les pays sud-asiatiques du fait de sa localisation géographique excentrée et distante de l'île principale d'Honshu, ce qui se traduirait par une proportion de souches de la famille EAI supérieure aux autres villes du Japon. A Okayama, la présence de souches de la famille Haarlem en plus forte proportion que dans les autres villes pourrait signifier l'existence de contacts accrus des habitants de cette ville avec certains pays européens, ce qui ne semble pas improbable de la part de cette agglomération industrielle leader dans l'industrie du textile au Japon et regroupant plus de 700 000 habitants (http://www.citypopulation.de/Japan-Okayama.html). La plus forte proportion de souches de la famille T3-Osaka observée à Okayama s'accompagne d'une faible diversité des profils de spoligotypage observés au sein de cette clade comparativement à Kobe. Trois spoligotypes correspondant à neuf souches sont classées dans la famille T3-Osaka à Okayama tandis qu'à Kobe on observe 15 profils pour 43 souches au sein de la famille T3-Osaka. Les neuf souches de la famille T3-Osaka collectées à Okayama pourraient correspondre à une micro-épidémie locale ou une chaîne de transmission, mais l'absence de données épidémiologiques concernant les patients porteurs de ces souches ne permet aucune conclusion sur ce résultat. L'observation d'une proportion significativement plus élevée de souches de la famille Beijing à Kobe n'est pas surprenante. En effet, Kobe appartient à la mégalopole d'Osaka – Kobe (11,3 millions d'habitants, environ 50 km séparant les 2 villes), et est une des villes du Japon où le taux d'incidence de la tuberculose est le plus élevé du Japon [232]. Les souches de cette famille génétique ont par ailleurs montré une transmissibilité et une virulence accrue par rapport aux souches d'autres familles phylogénétiques, d'où leur vaste distribution géographique actuelle notamment en Asie, d'où elle aurait émergé [184]. A Kobe, le plus fort taux d'incidence de tuberculose par rapport aux autres villes de l'étude résulte en un plus grand nombre de bacilles tuberculeux en circulation et une proportion significativement supérieure de souches de la famille Beijing en circulation, comparativement aux autres villes du Japon où l'incidence de tuberculose est moindre.

Un MST basé sur les profils 12-locus MIRU-VNTR disponibles pour 451 souches de la famille Beijing au Japon (Kobe, n=379 ; Okinawa, n=72) et 551 souches de la famille Beijing d'origines géographiques diverses (Tableau 13) issues de la base de données SITVIT2 a été établi afin d'étudier les liens phylogénétiques existant entre les souches de cette famille génétique (Figure 23). Si les 12-locus MIRU-VNTR ne permettent pas de caractériser avec précision les souches selon leur origine géographique, il est néanmoins possible de distinguer un sous-groupe de souches de la famille Beijing provenant du Japon d'un autre sous-groupe de souches d'origine autre que le Japon (Afrique du Sud, Russie, Australie, …).

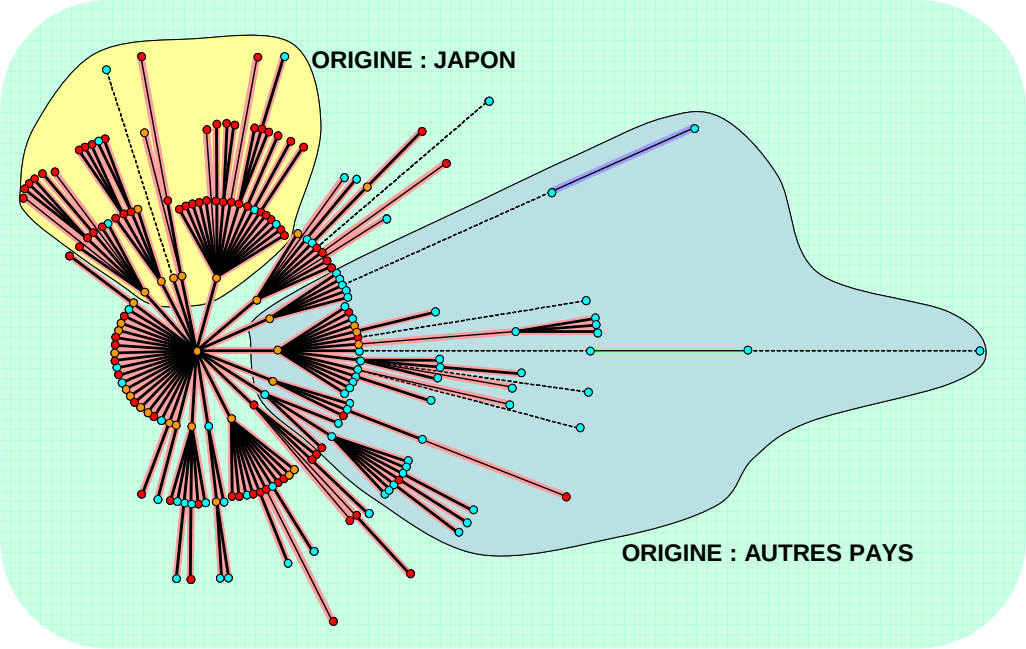


Figure 23: MST établi à partir des profils 12-locus MIRU-VNTR de 1002 souches de la famille Beijing

Une analyse des allèles observés pour chacun des 12 locus MIRU-VNTR montre que les allèles des locus 10, 16, 26, 27, 31 et 39 seraient spécifiques à chacun des deux sous-groupes observés dans le MST. Par ailleurs, sur les 195 profils 12-locus MIRU-VNTR obtenus pour les 1002 souches inclues dans la comparaison, 10 d'entre eux concentrent plus de 50% de l'échantillon (MIT 17, 16, 135, 104, 83, 93, 86, 703, 101, et 276) dont les MIT 16, 104, et 276 sont quasi totalement absents du Japon (MIT 16,: n=2/115 souches ; MIT 104, n=0/36 souches ; MIT 276, n=0/14 souches provenant du Japon) et les MIT 93, 101, 135, 703 sont principalement retrouvés au Japon (MIT 93, n=51/58 ; MIT 101, n=12/14; MIT 135, n=53/58; MIT 703, n=16/16). Le MIT 17 préalablement décrit comme un profil ancestral [165] est le principal profil MIRU-VNTR retrouvé dans SITVIT2 (21% ou n=210/1002 souches) et représente 17,5% (n=79/451) des profils MIRU-VNTR du Japon.

En conclusion, cette étude permet d'avoir une meilleure vue de l'épidémie de tuberculose à Kobe et au Japon, et une meilleure connaissance de la structure génétique de la population de bacilles tuberculeux circulant actuellement dans le monde. Les souches de la famille Beijing, prépondérantes au Japon, pourraient correspondre à l'évolution locale de clones de cette famille phylogénétique introduits très anciennement. La diversité allélique calculée pour les souches de la famille Beijing du Japon sur la base du spoligotypage (HGI=0,112 ; n=1211 souches) est identique à celle de l'ensemble des souches de la famille Beijing de SITVIT2 (HGI=0,113 ; n=7802 souches), la moitié de la diversité mondiale des profils observés dans SITVIT provenant du Japon (Tableau 17).

Localisation géographique	Nombre de souches de la famille Beijing (%) [(a)]	Nombre de profils de spoligotypage distincts	Diversité allélique (HGI)
Japon (Kobe)	1042 (78,6%)	18	0,124
Japon (Okinawa)	72 (71,3%)	4	0,082
Japon (Okayama)	97 (71,3%)	1	0
Russie (Irkoutsk)	47 (69,1%)	3	0,073
Russie (Kaliningrad)	41 (46,1%)	1	0
Russie (Moscou)	54 (85,7%)	3	0,024
Japon	1211 (77,5%)	18	0,112
Russie	255 (76,5%)	3	0,046
Bangladesh	15 (31,3%)	1	0
Kirghizistan	42 (77,8%)	1	0
SITVIT2	7802 (10,8%)	39	0,113

[(a)] % indique le pourcentage de souches de la famille Beijing par rapport au nombre total de souches de *M. tuberculosis* disponibles dans SITVIT2 pour le pays ou la ville considéré (comparaison de novembre 2010).

Tableau 17: Diversités alléliques observées pour les souches de la famille Beijing par spoligotypage

On observe par ailleurs au Japon une famille génétique de *M. tuberculosis* spécifique et probablement endémique, la famille T3-Osaka dont la distribution mondiale dans la base de données SITVIT2 se limite quasi-exclusivement au Japon (>80% des souches figurant dans SITVIT2 ; comparaison novembre 2010).
L'étude de la diversité mondiale des bacilles tuberculeux et des relations phylogénétiques liant ces populations sur la base du MST établi à partir des profils 12-locus MIRU-VNTR montre l'existence d'une grappe de souches originaires du Japon distincte d'une autre grappe de souches d'origines autre que le Japon. Ces résultats nécessitent cependant des investigations complémentaires impliquant l'utilisation de marqueurs moléculaires additionnels et plus appropriés à la phylogénie tels que les LSP, les SNP ou encore les 24-locus MIRU-VNTR.

3.2. Structure de la population de souches de la famille Beijing à Okinawa basée sur 12, 15 et 24-locus MIRU-VNTR (Article 7)

Article 7: The unique endemic nature of Beijing genotype strains in Okinawa, Ryukyu Islands of Japan revealed by high-resolution VNTR typing. Millet J, Mokrousov I, Rastogi N. (Article soumis, Infection, Genetics, and Evolution)

Nous avons souhaité comparer la diversité génétique des souches de *M. tuberculosis* circulant à Okinawa, dans l'archipel des Ryükyü à celle observée dans les villes d'Osaka et de Kobe situées sur l'île principale d'Honshu. Pour cela, les 72 souches de la famille Beijing d'Okinawa ont été génotypées en utilisant les 12,

15, 21 et 24-locus MIRU-VNTR (Tableau 11) et les profils obtenus, et leurs pouvoirs discriminants ont été comparés à ceux basés sur 12, 15 et 21-locus rapportés pour les villes d'Osaka et de Kobe [286].

De plus, nous avons estimé la proportion de souches définies comme anciennes ou modernes au sein de la famille Beijing à Okinawa relativement à la région NTF de leur génome [156, 187, 213] et les résultats obtenus comparés à ceux publiés pour le Japon et la région [286].

Si le MST établi à partir des profils basés sur 12-locus MIRU-VNTR ne permet pas de distinguer les souches d'Okinawa, d'Osaka et de Kobe, ceux construits à partir des profils basés sur 15 et 21-locus MIRU-VNTR mettent en évidence la singularité des souches d'Okinawa qui s'agrègent en 2 grappes distinctes. Il est intéressant de noter que les grappes de souches constituées par comparaison des profils basés sur 15-locus MIRU-VNTR sont conservées dans le MST établi à partir du format de typage basé sur 21-locus qui comprend à la fois des locus d'évolution rapide destinés aux études d'épidémiologie et ceux d'évolution plus lente pour des études de phylogénie [250]. Ces résultats suggèrent que les clones de la famille Beijing circulant dans les îles Ryükyü pourraient avoir évolué localement à partir d'un pool de clones de l'île principale (ou inversement) et auraient alors conservé avec ce pool de souches d'origine des liens phylogénétiques mais pas ou peu de liens épidémiologiques soulignant la rareté ou l'irrégularité des contacts entre Okinawa et l'île principale d'Honshu.

La comparaison des pouvoirs discriminants des formats de génotypage basés sur 12, 15, 21, et 24 locus MIRU-VNTR pour les souches de la famille Beijing d'Okinawa montre que le format 24-locus MIRU-VNTR est le plus discriminant avec un pouvoir discriminant (HGDI) de 0,996 (contre 0,944 avec le format 12-locus MIRU-VNTR) et un taux de souches en grappe de 20,0% (contre 68,1% avec le format 12-locus MIRU-VNTR).

Enfin, L'étude de la région NTF des souches de la famille Beijing d'Okinawa a permis de montrer que 97,0% d'entre elles étaient anciennes, une proportion significativement supérieure à celle obtenue pour les souches Beijing d'Osaka et de Kobe (78,6% ; $p<0,001$), ou encore de Chine et de Mongolie (29,2%) [286]. Cette observation suggère que l'évolution des souches de la famille Beijing se serait faite à Osaka et Kobe à partir d'un pool ancien situé dans les îles Ryükyü et non l'inverse.

Cette étude a montré la singularité des clones tuberculeux de la famille Beijing circulant dans les îles Ryükyü (Okinawa) qui pourraient résulter de l'évolution locale d'un pool de clones en provenance de l'île principale, à moins que la relation phylogéographique des souches ne soit inverse et que les souches de l'île principale aient évolué à partir d'un pool de souches circulant entre autre à Okinawa. En effet, la proportion significativement plus élevée de souches anciennes au sein de la famille Beijing à Okinawa (97,0% vs 78,6% dans les villes d'Osaka et de Kobe ; $p<0,001$) suggère que ces dernières seraient phylogénétiquement plus anciennes que les souches de la famille Beijing retrouvées dans les villes d'Osaka et de Kobe.

L’évaluation des formats de typage basés sur 15, 21 et 24-locus MIRU-VNTR a permis de montrer que le format basé sur 24-locus MIRU-VNTR était le format le plus discriminant avec un taux de souches en grappes de 20,0% et un index de discrimination égal à 0,996. Néanmoins, avec un nombre moindre de locus étudiés, le format de typage basé sur 6-locus QUB permet d’obtenir un index de discrimination proche de celui obtenu avec le format 24-locus MIRU-VNTR (0,990 vs 0,996 avec le format de typage basé sur 24-locus MIRU-VNTR) avec cependant un taux de souches en grappe significativement plus élevé (40,6% vs 20,0% de souches en grappe avec le format basé sur 24-locus MIRU-VNTR ; $p<0,01$).

Chapitre III : Une première étude de la biodiversité génotypique de la tuberculose dans la Caraïbe et les pays limitrophes.

1. La Caraïbe

1.1. Présentation de l'espace caribéen

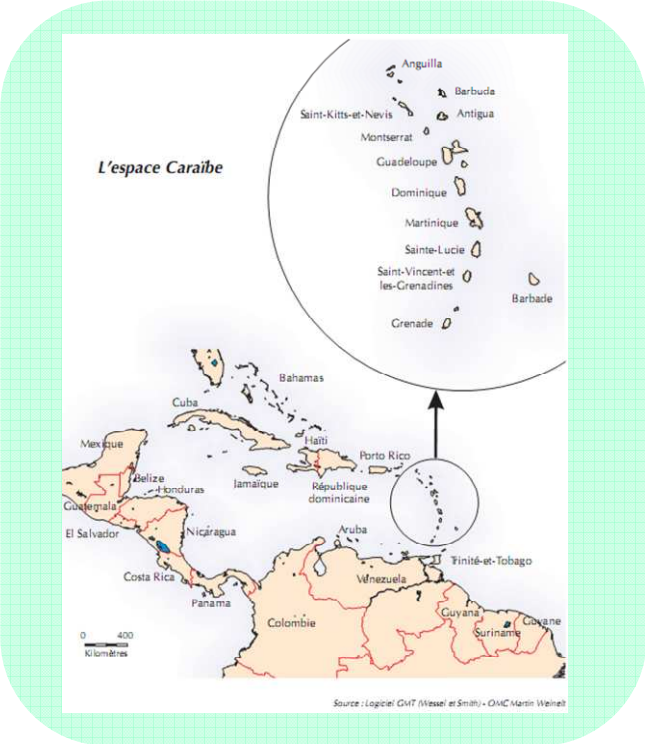


Figure 24 : Carte faisant figurer les 38 états et territoires de l'espace caribéen

La Caraïbe comprend l'ensemble des pays et territoires bordant la mer des Caraïbes, qu'ils soient continentaux ou insulaires, à la différence des Antilles qui sont un archipel d'îles s'étendant de Cuba jusqu'au large du Venezuela. On employait initialement le terme d'Indes occidentales pour désigner la Caraïbe mais ce terme est tombé en désuétude, excepté dans la langue anglaise, avec l'expression « West Indies » [131].

Actuellement, l'espace caribéen couvre une vaste zone géographique de 5,2 millions de km² et comprend 38 états ou territoires, 13 continentaux et 25 insulaires (Figure 24, Tableau 18).

Dans cet espace cohabitent plus de 256 millions d'habitants (http://esa.un.org/unpp/) y parlant quatre langues officielles : l'anglais, le français l'espagnol et le néerlandais. Les territoires de la Caraïbe ont des statuts très divers et un tiers d'entre eux ne sont pas indépendants :

- les Départements Français d'Amérique (DFA – Guadeloupe, Martinique, Guyane française) font partie intégrante de la France,
- Anguilla, les Bermudes, les îles Caïmans, les îles Turques-et-Caïques, les îles Vierges britanniques et Montserrat sont des territoires britanniques,
- les Antilles néerlandaises (Bonaire, Curaçao, Saba, Saint-Eustache et la partie méridionale de l'île de Saint-Martin) et Aruba dépendent des Pays-bas,
- les îles Vierges américaines et Porto Rico sont rattachées aux Etats-Unis.

Les pays indépendants le sont devenus au XIX^{ème} siècle pour la majorité des états sous ancienne domination espagnole, au XX^{ème} siècle pour la plupart de ceux sous ancienne domination anglaise, tandis qu'Haïti, ancienne colonie française, est devenu, le jour de son indépendance le 1er janvier 1804, le deuxième état libre d'Amérique après les Etats-Unis (le 4 juillet 1776). L'histoire coloniale passée concerne donc l'ensemble des membres de l'espace caribéen, et son empreinte se fait toujours sentir actuellement. Les 38 pays de l'espace caribéen témoignent d'une grande diversité tant au niveau des langues, des influences culturelles, que des modèles politiques, d'où la difficile existence d'une intégration régionale. Celle-ci n'est effectivement encore pas une réalité malgré les nombreuses tentatives de fédération en institutions régionales telles que la CARICOM (Caribbean Community), qui forme un marché commun caribéen, l'AEC (Association des États de la Caraïbe), qui regroupe l'ensemble des états et territoires de la Caraïbe, ou encore l'OECO (Organisation des États de la Caraïbe Orientale).

Actuellement l'essentiel des pays et territoires est en transition démographique avec des taux de mortalité et de fécondité proches de ceux des pays développés européens. Ainsi, le taux de mortalité pour la Caraïbe varie de 4‰ (Costa Rica, Guyane française, îles Caïman et Panama) à 11‰ (Haïti) et l'indice de fécondité de 1,2 (Montserrat) à 4,4 (Guatemala) enfants par femme (Tableau 18). Par comparaison, en Europe occidentale, ces taux sont de 9‰ et de 1,5 enfant par femme [212]. De plus, les populations des pays de l'espace caribéen émigrent traditionnellement soit vers les pays voisins économiquement plus prospères, soit vers l'Europe ou encore vers les Etats-Unis, ce qui contribue à atténuer les taux d'accroissement démographique de ces pays [124]. Certains d'entre eux voient ainsi l'accroissement de leur population stagner. Cela concerne le plus souvent des territoires insulaires tels que la Barbade, Trinidad-et-Tobago, Saint-Vincent-et-les-Grenadines, mais aussi des états continentaux comme le Guyana et le Suriname. Parmi

les pays à fort taux de croissance démographique, on trouve : le Venezuela, le Belize, mais aussi les îles Turques-et-Caïques et Haïti [49].

Les structures économiques présentent elles aussi une grande diversité et les richesses sont très mal réparties (Tableau 18). Quatre pays concentrent l'essentiel des richesses de la Caraïbe, soit 80% du PIB de la zone (le Mexique, la Colombie, le Venezuela, Porto Rico) tandis que six pays (Guatemala, Guyana, Haïti, Honduras, Montserrat, Nicaragua) ont un PIB/habitant inférieur ou égal à 5000 US$/habitant, en sachant que, par comparaison, le PIB moyen par habitant de l'ensemble des pays de l'Union européenne est estimé à 32900 US$/habitant (https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/index.html). Les espérances de vie des populations des pays les plus pauvres (PIB≤5000 US$/habitant) sont parmi les plus faibles de l'espace caribéen, puisque inférieures à 70 ans, excepté au Nicaragua (74 ans) et à Montserrat (73 ans). Par comparaison l'espérance de vie des populations états-unienne et européenne sont estimées à 78 et 79 ans respectivement (https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/index.html) (Tableau 18).

Dans ce contexte de fortes disparités tant économiques, qu'historiques, et culturelles, nous avons souhaité dresser une première cartographie de l'épidémie de tuberculose sévissant actuellement dans la Caraïbe.

	Etats et Territoires (codes ISO) [a]	Superficie (km²) [b]	Population (millions) [c]	Indice de fécondité (enfants/femme) [d]	Taux de mortalité (pour 1000 hab.) [e]	Espérance de vie à la naissance [f]	PIB (milliards de US$) [g]	PIB par habitant (milliers US$/hab.) [h]
Continentaux								
	Belize (BLZ)	22 966	0,31	3,3	5	72	1,4	8,1
	Colombie (COL)	1 138 914	46,20	2,4	6	75	231,3	9,2
	Costa Rica (CRI)	51 100	4,50	1,9	4	78	29,6	10,9
	El Salvador (SLV)	21 000	6,90	2,9	6	72	22,4	7,1
	Guatemala (GTM)	108 889	13,40	4,4	6	69	36,9	5,2
	Guyana (GUY)	214 969	0,76	2,7	9	65	1,2	3,8
	Guyane française (GUF)	83 534	0,21	4,0	4	79	2,7	15,8
	Honduras (HND)	112 090	7,10	3,3	6	70	14,7	4,2
	Mexique (MEX)	1 964 375	106,50	2,4	5	76	1017	13,5
	Nicaragua (NIC)	130 370	5,60	3,2	5	74	6,4	2,8
	Panama (PAN)	75 420	3,30	2,4	4	76	25	11,9
	Suriname (SUR)	163 820	0,50	2,5	7	71	3,2	9,0
	Venezuela (VEN)	912 050	27,50	2,7	5	75	357,6	13,1
Insulaires								
	Anguilla (AIA)	102	0,01	1,8	4,4	81	0,2	12,2
	Antigua-et-Barbuda (ATG)	443	0,09	2,3	6	74	1,2	18,1
	Antilles néerlandaises (ANT)	800	0,20	1,8	8	77	ND	16,0
	Aruba (ABW)	180	0,01	2,0	5	75,5	2,2	21,8
	Bahamas (BHS)	13 880	0,33	1,9	7	75	7,49	29,8
	Barbade (BRB)	430	0,28	1,9	8	74	3,6	18,5
	Bermudes (BMU)	54	0,07	2	7,4	81	ND	69,9
	Cuba (CUB)	110 860	11,2	1,5	8	77	56,5	9,7
	Dominique (DMA)	751	0,07	3,0	7	74	0,4	10,2
	Grenade (GRD)	344	0,01	2,1	7	69	0,7	10,8
	Guadeloupe (GLP)	1 700	0,47	2,2	6	81	7,8	18,1
	Haïti (HTI)	27 750	9	4,0	11	62	7	1,3
	Îles Caïmans (CYM)	264	0,05	2,1	4	81	2,2	43,8
	Îles Turques et Caïques (TCA)	430	0,02	2,9	4,2	76	ND	11,5
	Îles Vierges américaines (VIR)	352	0,11	1,8	7	79	ND	14,5
	Îles Vierges britanniques (VGB)	151	0,02	1,7	4,4	77	1,1	38,5
	Jamaïque (JAM)	10 991	2,7	2,1	6	72	12,1	8,2
	Martinique (MTQ)	1 100	0,41	2,0	7	82	7,7	20,1
	Montserrat (MSR)	102	0,005	1,2	7,6	73	ND	3,4
	Porto Rico (PRI)	13 790	3,9	1,7	7	79	87,8	17,2
	Rép. Dominicaine (DOM)	48 670	9,4	2,9	5	73	45,2	8,3
	Sainte-Lucie (LCA)	616	0,17	1,7	7	75	1,0	10,9
	Saint-Kitts-et-Nevis (KNA)	261	0,05	2,3	9	73	0,5	15,2
	St Vincent et les Grenadines (VCT)	389	0,11	2,0	7	71	0,6	18,1
	Trinité-et-Tobago (TTO)	5 128	1,4	1,6	8	70	23,3	23,1

Les 12 états et territoires concernés par la présente étude apparaissent en bleu.
[a] Codes ISO des pays disponibles sur : http://fr.wikipedia.org/wiki/ISO_3166-1
[b] source: https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/index.html
[c], [d], [e] source: http://www.ined.fr/fichier/t_publication/1318/publi_pdf1_436.pdf (Pison, 2007 [212]), sauf AIA, BMU, TCA, VIR, VGB, et MSR, source: https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/.
[f] source: WHO, 2010 [296], sauf AIA, ANT, ABW, BMU, TCA, VIR, VGB, MSR, PRI, source: https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/index.htm I (estimation 2010); GLP, MTQ, GUF, source : Huart, 2004 [131].
[g], [h] source : https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/index.html sauf pour GLP, MTQ et GUF (source : Huart, 2004 [131]).

Tableau 18 : Données géographiques, démographiques et économiques concernant les 38 états et territoires composant l'espace caribéen

1.2. Epidémiologie de la tuberculose dans la Caraïbe et en Amérique latine (Article 8)

Article 8: A first study on the genetic diversity and drug-resistance patterns of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in 12 Caribbean settings. J.Millet, S.Baboolal, N.Rastogi. (Article en préparation, Journal of Clinical Microbiology).

1.2.1. Présentation de l'étude

Cette étude est la première investigation d'épidémiologie moléculaire concernant les souches de *M. tuberculosis* circulant dans l'espace caribéen en dehors d'études conduites dans les trois DFA [37, 104] ainsi qu'à Haïti [91, 142].

Grâce à une collaboration avec le CAREC, des échantillons biologiques de patients présentant des symptômes de tuberculose ont été collectés dans 14 des 21 pays membres du CAREC sur une période de 24 mois (septembre 2006 - août 2008). Les cultures, l'identification et les antibiogrammes ont été effectués à partir des prélèvements reçus et des cultures positives obtenues au CAREC à Trinidad-et-Tobago, tandis que le génotypage par spoligotypage des souches de *M. tuberculosis* a été réalisé à l'Institut Pasteur de Guadeloupe à partir de l'ADN extrait et expédié par le CAREC. Les données épidémiologiques concernant les patients pour lesquels nous disposions d'une culture positive à *M. tuberculosis* et du profil de spoligotypage de la souche concernée (n=480) ont été obtenues via le CAREC.

1.2.2. Résultats

1.2.2.1. Echantillons, culture, identification

Un total de 1262 échantillons biologiques a été collecté entre septembre 2006 et août 2008 dont 42,9% de cultures (n=542/1262) et 57,1% d'échantillons cliniques (n=720/1262). Les principaux pays d'origine étaient Trinidad-et-Tobago, le Suriname, le Guyana et la Jamaïque, et comprenaient à eux seuls 1024 échantillons soit 81,1% des spécimens collectés. Après mise en culture des échantillons biologiques et repiquage des cultures sur BACTEC 460-TB, un total de 773 cultures positives ont été obtenues, dont 79,0% (n=611/773) étaient des cultures de *M. tuberculosis* et 21,0% (n=162/773) des cultures de bactéries non tuberculeuses. Les principales espèces non tuberculeuses identifiées par test Hain (Hain Common Mycobacteria – CM) ont été les suivantes : *M. fortuitum* 34,6% (n=56/162), *M. intracellulare* 12,3% (n=20/162), *M. gordonae* 6,8% (n=11/162), et *M. kansasii* 6,2% (n=10/162). Aucune espèce n'a pu être identifiée pour 27 souches et 12 cas d'infections mixtes ont été mis en évidence.

1.2.2.2. Données démographiques, épidémiologiques et profils de résistance des isolats de *M. tuberculosis*

Par comparaison avec les très forts taux d'incidence de tuberculose estimés dans certaines îles de la Caraïbe telles que Haïti (306/100 000) ou la République Dominicaine (69/100 000), la plupart des taux d'incidence des pays de cette étude apparaissent comme modérés et relativement stables, excepté au Suriname (108/100 000 en 2006), et au Guyana (122/100 000 en 2006) [293].

Les données épidémiologiques collectées et analysées concernent les patients dont les isolats de *M. tuberculosis* ont été génotypés, et pour lesquels un profil de spoligotypage a été obtenu (n=480). Les 480 isolats cliniques de *M. tuberculosis* proviennent des 12 pays de la Caraïbe suivants: Bahamas (n=28), Barbade (n=14), Belize (n=6), Dominique (n=1), Guyana (n=91), Jamaïque (n=85), Saint-Kitts-et-Nevis (n=1), Sainte-Lucie (n=10), Suriname (n=103), Trinidad-et-Tobago (n=132), les îles Turques-et-Caïques (n=3) et Saint-Vincent-et-les-Grenadines (n=6).

Le sex-ratio des 460 patients pour lesquels l'information est disponible est de 3,0 soit 346 hommes pour 114 femmes, ce qui est plus élevé que celui observé à Haïti (sex-ratio=2,1) ou encore dans les îles françaises avoisinantes, Guadeloupe (sex-ratio=2,1) et Martinique (sex-ratio=1,0) [37, 91].

L'âge des patients est connu pour 450 d'entre eux. La moyenne d'âge globale des patients tuberculeux de l'étude est de 39,9 ans et varie de 23,6 ans au Belize à 45,2 ans à Saint-Vincent-et-les-Grenadines. La distribution par classe d'âge n'est pas homogène : les classes d'âge 15-34 ans et 35-54 ans regroupant respectivement 37,8% (n=170/450) et 43,1% (n=194/450) des patients. Cette distribution bimodale de l'âge des patients laisse penser que deux phénomènes cohabitent dans les pays étudiés : une transmission active des bacilles tuberculeux (patients les plus jeunes) et des cas de réactivation de tuberculoses latentes (patients les plus âgés). Cette situation serait ainsi identique à celle décrite dans les pays à faible incidence de tuberculose d'Europe de l'ouest et d'Amérique du nord pour lesquels les cas de tuberculose des populations autochtone concernent principalement des patients âgés et correspondent à des cas de réactivation, tandis qu'au sein des populations immigrantes on observerait une transmission active des bacilles tuberculeux majoritairement chez de jeunes adultes [79]. On note, de plus, qu'en Jamaïque les patients sont plus jeunes que dans les autres pays étudiés avec une moyenne d'âge significativement inférieure (36,9 ans vs 40,6 ans ; $p=0,02$), et une proportion significativement supérieure de patients appartenant à la classe d'âge 15-34 ans (49,4% vs 35,3%, $p<0,02$) tandis qu'aux Bahamas et au Guyana, la proportion de patients appartenant à la classe d'âge 35-54 ans est significativement supérieure à celle des autres pays de l'étude (64,3%, $p<0,02$ et 53,9%, $p<0,05$ respectivement).

Les résultats des sérologies VIH sont disponibles pour 317/480 patients (6/12 pays de l'étude) parmi lesquels 86 (27,1%) sont positifs. Ce fort taux de co-infection TB/VIH observé est en adéquation avec les chiffres récemment publiés concernant la prévalence du VIH à travers le monde en 2008 et qui placent la Caraïbe en deuxième place derrière l'Afrique sub-saharienne avec une prévalence du VIH de 1% parmi les adultes [266] et un taux de co-infection TB/VIH estimé à 11,3% [293]. Les recommandations de l'OMS préconisent d'intensifier les programmes de lutte contre la tuberculose et le VIH dans les pays où le taux de co-infection TB/VIH dépasse 5% de la population, en proposant systématiquement aux patients tuberculeux l'établissement de leur sérologie VIH [297]. Ce programme est actuellement mis en place dans la plupart des pays de cette étude et s'accompagne, de plus, du dépistage systématique de la tuberculose pour les patients porteurs du VIH et présentant des signes évocateurs de la maladie [98]. En outre, l'augmentation du nombre de cas de co-infection TB/VIH observé entre 2005 et 2007 dans 8 des 12 pays de l'étude (information disponible pour huit pays), est un argument favorable au développement de programmes de lutte contre le VIH et la tuberculose communs dans l'ensemble des pays de la Caraïbe pour les années futures [293, 294, 295].

Concernant les profils de résistance des souches de *M. tuberculosis*, malgré l'extension des programmes de surveillance et de suivi des résistances aux antituberculeux dans le monde, on observe actuellement un déficit d'informations dans plus de 100 pays, y compris dans la Caraïbe [305]. Ainsi, les résultats que nous avons obtenus dans notre étude sont une première description de la situation dans 12 pays de la Caraïbe. Sur les 480 isolats cliniques de *M. tuberculosis*, 40 (8,3%) sont résistants à au moins un des quatre anti-tuberculeux testés. Cette proportion de souches résistantes est moins élevée que celle rapportée pour l'ensemble des pays du monde (11,1% ; [305]), ainsi que celle des DFA (12,1% ; [37]), mais varie d'un pays à l'autre au sein de notre étude. En effet, la proportion de souches résistantes est significativement plus élevée aux Bahamas (21,4% vs 7,7% ; $p=0,02$), au Belize (66,7% vs 7,6% ; $p=0,001$) et au Guyana (27,5% vs 3,9% ; $p<0,0001$) tandis qu'elle est significativement moins importante en Jamaïque (2,4% vs 9,6% ; $p=0,03$).

Etonnamment, les forts taux de co-infection TB/VIH ne sont pas corrélés aux proportions de souches résistantes par pays, excepté au Guyana où 27,5% des souches sont résistantes (dont 76,0% sont MDR) et 44,4% des patients co-infectés TB/VIH. Ces résultats confirment les résultats d'une précédente étude conduite au Guyana en 2005, qui indiquait des taux de 22,2% et 11,1% de souches résistantes et multirésistantes dans ce pays, et qui pointait le manque de moyens humains ainsi que la mauvaise gestion des programmes de lutte contre la tuberculose comme facteurs pouvant expliquer la persistance de souches résistantes dans ce pays [180]. Par ailleurs, l'observation de forts taux de co-infection TB/VIH et de faibles proportions de souches résistantes, dans certains pays de l'étude, est en apparente contradiction avec de précédents travaux identifiant la mauvaise observance des traitements médicamenteux et l'existence de cas

de co-infection TB/VIH comme facteurs de risque favorisant l'apparition et la transmission de souches résistantes aux antituberculeux [83, 102, 299]. L'absence de souches résistantes dans ces pays pourrait refléter l'excellent fonctionnement des services de prise en charge des patients tuberculeux, ainsi que l'existence d'une bonne collaboration entre les services de lutte contre la tuberculose et le VIH/sida.

1.2.2.3. Génotypage

Le spoligotypage a permis de générer 104 profils distincts et de regrouper 88,5% des souches (n=425/480) en 49 grappes (2 à 93 souches par grappe). Le fort taux de souches en grappe observé dans notre étude est très probablement lié au choix du spoligotypage comme outil de génotypage comme cela l'a été suggéré dans de précédentes études [239, 251, 270]. Il est aussi probable que les taux élevés de co-infection TB/VIH observés aient contribués à l'augmentation du taux de souches en grappe, certaines études ayant montré qu'une prévalence élevée du VIH au sein d'une population augmentait le risque de développer une tuberculose chez l'ensemble des membres de la population, et notamment les patients immuno-déficients [109, 204].

Parmi les 49 grappes définies sur la base des profils de spoligotypage, nous avons distingué 19 SIT principaux, regroupant entre 5 et 93 isolats par grappe. Sur les 19 spoligotypes majeurs, six ne sont retrouvés que dans un seul pays dont quatre à Trinidad-et-Tobago (SIT566, 2934, 2550, et 2935) et deux en Jamaïque (SIT2016 et 2406). Par ailleurs, le SIT53 constitue la plus grande grappe de souches dans six pays (Bahamas, Belize, Barbade, Guyana, Jamaïque, et Sainte Lucie), tandis que le SIT566, deuxième SIT prépondérant dans notre étude, est observé uniquement à Trinidad-et-Tobago où 56,1% des souches de ce pays (n=74/132) présentent ce profil. Les SIT131 et 1340, troisième et quatrième SIT les plus représentés dans notre étude, apparaissent comme spécifiques du Guyana et du Suriname. En effet, 96,0% des souches (n=24/25) présentant le SIT131 et 100,0% (n=24/24) des souches de présentant le SIT1340 proviennent de ces deux pays.

Les principales familles génétiques observées pour l'ensemble des 12 zones géographiques étudiées sont les familles : T (n=160/480 ou 33,3% des souches), EAI (n=90/480 ou 18,8% des souches), LAM (n=50/480 ou 10,4% des souches), X (n=36/480 ou 7,5% des souches), Haarlem (n=27/480 ou 5,6% des souches), et Beijing (n=17/480 ou 3,5% des souches). On observe une variation de représentativité des différentes familles phylogénétiques d'un pays à l'autre, probablement du fait de l'histoire de ces pays. Ainsi, l'essentiel des souches de la famille EAI isolées au Guyana et au Suriname appartiennent à la sous-clade EAI6-BGD1 décrite comme prépondérante au sein de la population du Bangladesh [218], tandis qu'à Trinidad-et-Tobago, l'essentiel des souches de la famille EAI, appartiennent aux sous-familles EAI1-SOM et EAI2-Manilla. Dans ces pays, l'arrivée massive de main d'œuvre à la suite de l'abolition de l'esclavage

se serait ainsi probablement effectuée en provenance de régions d'Asie du sud différentes, selon le pays d'Amérique latine et de la Caraïbe concerné. De plus, il semblerait que le Suriname, le Guyana, et Trinidad-et-Tobago aient conservé des liens avec l'Asie du sud puisque 37,9%, 19,8% et 12,9% respectivement des souches, appartiennent à la famille phylogénétique EAI dans ces pays, alors que cette lignée ne concerne que 4,8% des isolats dans les DFA [37].

Par ailleurs, la Jamaïque, britannique pendant près de 200 ans avant d'être indépendante puis membre du Commonwealth en 1962, n'a, après l'abolition de l'esclavage, quasiment pas fait venir de travailleurs d'Inde contrairement au Suriname. Sa population actuelle est à 91,2% d'origine africaine et à 6,2% d'origines mixtes tandis qu'au Suriname 37% de la population est d'origine hindoustani (descendants d'immigrés du nord de l'Inde arrivés à la fin du XIX^{ème} siècle), 31% créole, 15% javanais, les descendants d'européens ne représentant que 1% de la population (https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/). Ces spécificités historiques sont en corrélation avec la distribution des différentes clades dans ces 2 pays où l'on observe une surreprésentation actuelle des souches de la famille EAI au Suriname (37,9% vs 13,5% ; *p<0,0001*) et leur sous-représentation en Jamaïque (5,9% vs 21,5% ; *p=0,001*), ainsi qu'une forte présence de souches européennes anglo-saxonnes en Jamaïque (Famille X : 16,5% vs 5,6% ; *p=0,001* – LAM : 18,8% vs 8,6% ; *p=0,005*) et leur très faible représentation au Suriname (Famille X : 1,9% vs 9,0% ; *p=0,02* – LAM : 3,9% vs 12,2% ; *p=0,01*). De même aux Bahamas, sous autorité anglaise dès le XVII^{ème} siècle puis bénéficiant d'un emplacement géographique propice à de nombreux échanges touristiques et commerciaux avec les Etats-Unis, on observe une proportion de souches de la famille X significativement supérieure à celle des autres pays (32,1% vs 6,0% ; *p<0,0001*).

La famille LAM prépondérante par définition en Amérique latine est aussi retrouvée dans notre étude mais ne représente que 10,4% de notre échantillon contre 19,7% des souches isolées dans les DFA, 30,9% des souches de Cuba, 32,4% des souches d'Haïti et 73,7% des souches du Venezuela [182]. Enfin, les 17 souches de la famille Beijing identifiées dans l'étude proviennent de cinq pays distincts et ne sont pas associées à une résistance aux antituberculeux (n=1/17 souches MDR) contrairement à ce qui a été décrit ailleurs dans le monde [62, 111, 208]. La faible proportion de souches de cette famille dans notre étude est en adéquation avec les données publiées pour les DFA où les souches de la famille Beijing représentent 1,6% des isolats de Guyane française et sont totalement absentes de Guadeloupe et de Martinique [37]. Dans notre étude, les souches de cette clade correspondent donc très probablement à des cas d'importation sporadiques avec peu ou pas de transmission active dans les pays où elles ont été importées.

Les probables relations phylogénétiques existant entre les lignées des souches isolées dans la Caraïbe sont étudiées par l'établissement d'un MST. Ce réseau fait apparaître 10 groupes majeurs correspondant à 10 familles phylogénétiques : T, X1, X2, X3, LAM, LAM10, H, EAI, AFRI et CAS. Au sein du MST, la sous-famille LAM10-CAM, est située en position extérieure par rapport à la famille LAM, soulignant de ce fait

une ambiguïté quand à la classification de cette sous-clade au sein de la famille LAM (absence de la signature spécifique de la famille LAM). Enfin, l'important groupe EAI avec 91 isolats et 27 profils, ainsi que l'existence de souches de la famille CAS, souligne le lien indéniable existant entre la Caraïbe, l'Inde et l'Asie.

1.2.3. Conclusion et perspectives

Cette étude est la première réalisée concernant l'épidémie de tuberculose sévissant actuellement dans les états et territoires hispanophones et anglophones de l'espace caribéen. Les résultats obtenus montrent que l'épidémie de tuberculose dans les pays concernés est limitée, avec des taux d'incidence de tuberculose faibles (de 4 à 14 cas/100 000 habitants) à modérés (de 25 à 44 cas/100 000 habitants), excepté au Guyana et au Suriname, où l'incidence de tuberculose est estimée à 122 et 116 cas/100 000 habitants respectivement [293]. Pour ces 2 derniers pays, le suivi de l'épidémie de tuberculose devrait être maintenue et renforcée dans les années à venir, d'autant que certains facteurs de risque d'aggravation de l'épidémie y ont été identifiés, tels que la prévalence élevée du VIH au sein de la population (2,5% et 2,4% de la population au Guyana et au Suriname respectivement), un taux de co-infection TB/VIH élevé (44,4% et 21,4% respectivement ; https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/), et une population de patients tuberculeux jeune (37,5 ans et 41,0 ans respectivement). Ces pays figurent, par ailleurs, parmi les plus pauvres de l'espace caribéen avec des PIB par habitant estimés à 3800 et 9000 US$ (Guyane française : 15800 US$/habitant ; Guadeloupe : 18100 US$/habitant ; Martinique : 20000 US$/habitant) (Tableau 18). Enfin, au Guyana, l'identification de nombreuses souches résistantes (n=25/91 souches) et multirésistantes (n=19/25 souches), semble indiquer une situation épidémique critique concernant la tuberculose dans ce pays et suggère que les plans de suivi et de lutte contre la maladie y soient renforcés.

Par ailleurs, cette étude a permis d'identifier certains clones tuberculeux endémiques à cette zone géographique tels que les SIT2016 et 2406 identifiés en Jamaïque, les SIT131 et 1340 identifiés au Guyana ainsi qu'au Suriname, et les SIT566, 2550, 2934, et 2935 identifiés à Trinidad-et-Tobago. Ces clones tuberculeux du fait de la spécificité de leur distribution géographique pourront, dans le futur, permettre d'identifier les cas de tuberculose d'importation éventuels dans les îles avoisinantes. Une étude complémentaire de ces clones devra par ailleurs être conduite en intégrant des outils de génotypage plus discriminants tels que les minisatellites 15 et 24-locus MIRU-VNTR.

2. Trinidad-et-Tobago

2.1. Présentation de Trinidad-et-Tobago

D'abord conquises par les espagnols en 1498, puis sous domination française, les îles de Trinidad-et-Tobago sont officiellement anglaises depuis 1802. Elles acquièrent leur indépendance en 1962 pour devenir une république membre du Commonwealth à partir de 1976.
Trinidad a ainsi été la seule île de la Caraïbe à être peuplée aux trois-quarts par des amérindiens jusqu'en 1783. Néanmoins, dès 1789 ceux-ci ne représentaient plus que 10% de la population, remplacés, en tant que main d'œuvre par des esclaves en provenance d'Afrique. C'est en 1783 que de nombreux colons français vinrent s'installer à Trinidad, accompagnés d'esclaves, et que la langue et le créole français s'y sont ainsi développés. L'esclavage a perduré jusqu'en 1838 date de son abolition. A la fin de l'esclavage, plus de 150 000 indiens (musulmans et hindous) furent amenés à Trinidad pour remplacer la main d'œuvre manquante, y implantant leurs cultures, leurs langues et leurs religions. L'immigration indienne ne cessa qu'au début du XX^{ème} siècle. Quant à Tobago, son histoire est plus mouvementée. Elle a ainsi changé plus de 30 fois de souveraineté avant de devenir définitivement anglaise en 1802 et d'être rattachée à Trinidad en 1889.

Les îles de Trinidad et de Tobago, distantes de 32 km, sont situées à l'extrême sud de l'arc antillais à 11 km des côtes du Venezuela dans leur partie la plus méridionale (Figure 25). La superficie totale de l'état de Trinidad-et-Tobago est de 5128 km², et sa population estimée à 1,3 million d'habitants (http://www.un.int/wcm/content/site/trinidadandtobago/pid/3392) est concentrée à 41% dans l'agglomération de l' « East-West corridor » (corridor est-ouest) qui s'étend de la capitale Port of Spain à Arima, ville située dans les terres. L'île de Tobago comprend 50 000 habitants, soit autant que la capitale Port of Spain. L'espérance de vie des habitants de Trinidad-et-Tobago est estimée à 70 ans et, depuis 2010, le taux d'accroissement de la population est devenu négatif. En 2010, environ 20% de la population a moins de 15 ans et 7% plus de 65 ans pour un âge médian global estimé à 32,6 ans (https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/index.html).

Le PIB par habitant de 23 100 US$/habitants place le pays au 55ème rang mondial. Le secteur de l'énergie (pétrole, gaz naturel, asphalte) constitue l'essentiel de l'économie du pays (40% du PIB) et 80% des exportations, mais seulement 5% des emplois. Le tourisme qui tend à se développer ne représente pas à ce jour un secteur économique aussi important que dans certaines autres îles de la Caraïbe (https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/index.html).

Figure 25 : Localisation géographique de Trinidad et Tobago

2.2. Etude de l'épidémie de tuberculose à Trinidad-et-Tobago (Articles 9 et 10)

Article 9: First insight into *Mycobacterium tuberculosis* epidemiology and genetic diversity in Trinidad and Tobago. Baboolal S, Millet J, Eberechi Akpaka P, Ramoutar D, Rastogi N. J Clin Microbiol, 2009. 47:1911-1914.

Article 10: Phylogeographical and molecular characterization of an emerging *Mycobacterium tuberculosis* clone in Trinidad and Tobago. Millet J, Baboolal S, Akpaka PE, Ramoutar D, Rastogi N. 2009. Infect Genet Evol. 2009. 9:1336-1344.

2.2.1. Présentation de l'étude

L'incidence annuelle de cas de tuberculose à Trinidad-et-Tobago, en constante décroissance depuis 10 ans, a été estimée à 17 cas pour 100 000 habitants en 2006 soit au-dessus de l'incidence de la Guadeloupe et de la Martinique, évaluée à moins de 10 cas pour 100 000 habitants [37], et en-dessous de la très forte incidence de tuberculose d'Haïti estimée à 306 cas pour 100 000 habitants (http://apps.who.int/globalatlas/). La lutte contre la tuberculose reste donc une priorité du programme de santé de Trinidad-et-Tobago, d'autant plus que la prévalence du VIH atteint 1,5% de la population adulte (15-49 ans) en 2007 [301].

Alors que dans la Caraïbe francophone (DFA, Haïti), l'épidémie de tuberculose a d'ores et déjà été étudiée, ce travail constitue une première analyse de l'épidémie dans une île anglophone. La diversité génétique des

souches de *M. tuberculosis* circulant à Trinidad-et-Tobago ainsi que les caractéristiques épidémiologiques des patients tuberculeux dans cette île ont été étudiés. Pour cela, les 132 patients recrutés entre octobre 2006 et septembre 2007, pour lesquels une culture positive à *M. tuberculosis* a été obtenue, ont été inclus dans cette étude. Des données épidémiologiques concernant les patients ont été collectées par le CAREC, et les profils de génotypage basés sur le spoligotypage et le typage des 12-, 15- et 24-locus MIRU-VNTR [250, 251] ont été obtenus à l'Institut Pasteur de Guadeloupe.

2.2.2. Résultats

2.2.2.1. Caractérisation des patients tuberculeux de Trinidad-et-Tobago

Le sex-ratio homme/femme des patients tuberculeux de Trinidad-et-Tobago est de 4,0, chiffre significativement plus élevé que ceux observés en Martinique (sex-ratio=1,0 ; $p<0,001$), à Haïti (sex-ratio=1,2 ; $p<0,001$) ou encore en Guadeloupe (sex-ratio=2,1 ; $p<0,002$). L'âge médian des patients est de 43 ans (pour une moyenne d'âge de 42,8 ans) et 43,2% d'entre eux appartiennent à la classe d'âge 35-54 ans. La tuberculose à Trinidad-et-Tobago concerne donc des patients plus âgés que la population globale dont l'âge médian est de 32,6 ans. Enfin, bien qu'il ait été montré qu'une proportion élevée de patients co-infectés TB/VIH s'accompagnait souvent de l'émergence de souche multirésistantes [76, 91, 154, 248], dans notre étude aucune souche résistante n'a été détectée en dépit d'un taux de co-infection de 30,6% (n=121/132 patients). La localisation géographique des patients co-infectés TB/VIH montre qu'ils vivent pour l'essentiel (40,5%) dans le comté de Saint George (qui comprend la capitale Port of Spain) alors que seulement 17,9% des patients séronégatifs y vivent.

2.2.2.2. Génotypage des isolats cliniques de Trinidad-et-Tobago

Le spoligotypage des 132 souches de *M. tuberculosis* a fourni 25 profils distincts correspondant à 13 profils uniques et 12 grappes contenant de 2 à 74 souches par grappe. Le très fort taux de souches en grappe (90,2%) est lié à la prédominance d'un profil, le SIT566, présent chez 74/132 souches de l'étude. En dehors de ce profil surreprésenté pour lequel aucune clade n'a pu être attribuée pour le moment, les familles génétiques présentes à Trinidad-et-Tobago sont les suivantes : LAM (n=20/132), EAI (n=17/132), X (n=8/132), Beijing (n=6/132), T (n=2/132), Haarlem (n=2/132), CAS (n=1/132), AFRI (n=1/132). Aucune clade n'a pu être attribuée pour un spoligotype en plus du SIT566.

Les caractéristiques épidémiologiques des patients de la grappe correspondant au SIT566 montrent que ceux-ci sont significativement plus jeunes (39,1 contre 47,7 ans pour les autres patients ; $p<0,0005$) et

qu'ils sont principalement retrouvés dans le comté de Saint George centre (31,4% des patients de cette grappe ; $p<0,05$). De plus, 62,2% des patients dont la sérologie VIH est positive appartiennent à cette grappe.

La structure de la population de souches de *M. tuberculosis* à Trinidad-et-Tobago semble être singulière, et uniquement retrouvée dans cette île. En effet, une comparaison avec la base de données SITVIT2 montre qu'aucune île avoisinante ne présente de structure identique (n=2653 souches isolées dans la Caraïbe répertoriées dans SITIVIT2). Tout d'abord la prépondérance du clone correspondant au SIT566 est unique. En dehors de cette étude, le SIT566 n'est observé que 12 fois dans la base de données SITVIT2, pour des souches isolées aux Etats-Unis (n=11/12) chez des patients originaires de Trinidad-et-Tobago (n=6/11) (l'origine des patients étant inconnue pour les cinq autres patients). La présence de souches de la famille EAI à Trinidad-et-Tobago en proportion supérieure à celle décrite dans les DFA (12,9% vs 4,8% dans les DFA ; [37]) laisse supposer que, contrairement aux DFA, la population d'origine indienne de Trinidad-et-Tobago qui représente 40% de la population totale de ce pays (https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/index.html) a des échanges actifs en cours avec son pays d'origine, et que ceux-ci sont suffisamment importants pour être détectés. Cette hypothèse est soutenue par l'identification de profils de spoligotypage correspondant aux SIT126, 138 (famille EAI) et 288 (famille CAS) à Trinidad-et-Tobago. En effet, en se référant à la base de données SITVIT2, ces profils apparaissent comme phylogéographiquement liés au sous-continent indien (SCI : Inde, Népal, Pakistan, Bangladesh, et Sri Lanka) où ils sont majoritairement distribués (SIT126, n=90, SCI=44,5% - SIT138, n=95, SCI=50,5% - SIT288, n=86, SCI=51,2%). Il est, de plus, intéressant de souligner que la distribution de ces SIT en dehors du SCI concerne pour l'essentiel des pays où la proportion d'immigrants est-indiens est élevée tels que le Royaume-Uni, les USA, et l'Arabie saoudite. De plus, aucun des profils de spoligotypage de la famille LAM communément retrouvés dans la Caraïbe, tels que les SIT17, 20 et 93 [36, 37], ne sont observés à Trinidad-et-Tobago, tandis que la sous-famille LAM10-CAM présente à Trinidad-et-Tobago (SIT61, n=6 et un variant SIT2550, n=7), n'est retrouvée qu'exceptionnellement dans la Caraïbe (n=17 pour la Caraïbe selon SITVIT2). Enfin, les faibles proportions de souches des familles Haarlem et T observées à Trinidad-et-Tobago (1,5% chacune) contrastent avec celles reportées dans les DFA (21,7% et 30,1% respectivement ; [37]). L'origine phylogéographique européenne de la famille Haarlem et sa forte prévalence dans le nord de l'Europe [36, 93, 221] suggèrent un certain isolement de Trinidad-et-Tobago vis-à-vis du continent européen, contrairement aux DFA qui font partie intégrante de la France, et qui ont par conséquent conservé des liens étroits, constants et actifs avec ce pays. En revanche, l'existence de points communs entre les territoires francophones de la Caraïbe (Guadeloupe, Martinique, Guyane française et Haïti) et Trinidad-et-Tobago réside dans la présence de souches de la famille X en proportions

relativement proches puisque cette clade représente 6,5% des souches isolées dans les DFA [37], 10,3% de celles d'Haïti (SITVIT2) et 6,1% de celles isolées à Trinidad-et-Tobago. L'origine anglo-saxonne de cette famille souligne le passé historique similaire de ces îles qui ont toutes connu au moins un épisode de gouvernance anglaise sur leur territoire. Trinidad-et-Tobago a cependant conservé un lien avec le Royaume-Uni en étant membre du Commonwealth depuis 1962.
Les six souches de la famille Beijing identifiées à Trinidad-et-Tobago ont été isolées chez des patients âgés de moins de 45 ans. Certaines études ont émis l'hypothèse qu'une association entre les patients les plus jeunes et les souches de la famille Beijing pouvait souligner l'existence d'une transmission active en cours de ce génotype [11] et ont montré par ailleurs les propriétés d'hypervirulence [279] et de multirésistance aux antituberculeux des souches de cette clade [11, 24, 85, 111]. Dans notre étude, l'ensemble de souches est sensible aux antituberculeux ce qui peut paraître surprenant étant donné les forts taux d'abandon de traitement et de co-infection TB/VIH à Trinidad-et-Tobago (22,7% et 30,6% des cas positifs de tuberculose détectés respectivement).

Les relations phylogénétiques entre les 25 profils de spoligotypage des souches circulant à Trinidad-et-Tobago ont été analysées à travers l'élaboration d'un MST. L'arbre phylogénétique obtenu permet la distinction de quatre groupes, dont trois correspondent à des familles ou sous-familles clairement identifiées (EAI2-Manilla pour le groupe A, LAM pour le groupe B, LAM10-CAM pour le groupe C), tandis que le groupe D comprend des souches de plusieurs familles génétiques (X, T et H). Il est intéressant de souligner que SIT566, dont la clade reste encore indéterminée, est en relation avec le SIT119 (famille X1) dont il est séparé par quatre changements évolutifs.

Un sous-échantillon de 25 souches appartenant à la grappe principale observée à Trinidad-et-Tobago et correspondant au SIT566 (n=74 souches) a été étudié en se basant sur le génotypage des 12, 15 et 24-locus MIRU-VNTR [250, 251]. Les résultats obtenus montrent la prédominance d'un profil 12-locus MIRU correspondant au MIT633 dans la base de données SITVIT2. Il est intéressant de noter que seulement 12 souches de la base de données, isolées au Pérou (n=1), au Royaume-Uni (n=2) et aux Etats-Unis (n=9), présentent le MIT633 et que cinq de celles pour lesquelles le profil de spoligotypage était disponible (n=10/12) correspondaient, de plus, au SIT566. Les cinq autres souches présentaient des profils de spoligotypage en rapport avec le SIT566, pouvant être potentiellement d'évolution antérieure (SIT219) ou postérieure (SIT2474) à celui-ci. Pour les trois autres profils, les liens évolutifs sont plus hypothétiques. Malgré le typage additionnel des 15 et 24-locus MIRU, la grappe SIT566 reste remarquablement homogène. Après comparaison des profils 15 et 24-locus MIRU obtenus pour les 25 souches de la grappe SIT566 avec la base de données « MIRU-VNTRplus » (http://www.miru-vntrplus.org/MIRU/index.faces), cinq souches,

appartenant aux familles X1 et Haarlem, présentent des profils proches de ceux de notre étude. Ces résultats arguent pour la classification du SIT566 parmi la clade X1, bien que des investigations supplémentaires telles que l'utilisation de SNPs ou de LSP restent nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

2.2.3. Conclusion et perspectives

Malgré l'existence d'un programme national de lutte antituberculeuse (NTP) efficace à Trinidad-et-Tobago, on ne peut expliquer pourquoi l'incidence de tuberculose actuellement modérée (17 cas/100 000 habitants) ne poursuit pas sa décroissance et n'atteint pas les seuils observés en France (9 cas/100000 habitants en 2008) ou encore aux Etats-Unis (4,2 cas/100 000 habitants en 2008) (http://www.invs.sante.fr/surveillance/tuberculose/index.htm [49, 86].

Les forts taux de prévalence du VIH et de co-infection TB/VIH pourraient avoir maintenu l'existence d'une transmission active de tuberculose parmi la population. Notre étude a cependant permis de montrer qu'à ce jour, plus de la moitié des cas de tuberculose à Trinidad-et-Tobago étaient dus à un clone majeur, le SIT566. Nous avons par ailleurs montré que ce clone touchait une population significativement plus jeune que celle des autres génotypes, qu'il était surreprésenté dans le comté de Saint George centre et qu'il était phylogénétiquement très conservé et spécifique de Trinidad-et-Tobago. Si aucune transmission aux îles voisine n'a été détectée, ce clone a cependant été identifié aux Etats-Unis chez des patients originaires de Trinidad-et-Tobago. La prédominance de ce clone à Trinidad-et-Tobago peut aussi bien être due à la rapidité de son expansion qu'à l'existence de facteurs propres qui auraient favorisé sa transmission, tels qu'un plus haut degré de virulence. La prépondérance de ce clone à Trinidad-et-Tobago n'est pas sans rappeler celle de la famille Beijing dans le sud-est asiatique, et pour laquelle l'expression de facteurs de virulence ou de transmissibilité pourrait expliquer son omniprésence dans cette région du monde [24].

Conclusion et perspectives

Conclusion

Malgré la découverte, au milieu du XX^{ème} siècle, des principaux antibiotiques contre *M. tuberculosis*, et l'existence d'un vaccin, le BCG, la tuberculose reste encore terriblement d'actualité avec près de deux millions de morts chaque année dans le monde. Plusieurs facteurs peuvent expliquer cette situation dramatique parmi lesquels l'épidémie de VIH/sida, et l'émergence et la propagation de souches résistantes et multirésistantes aux antituberculeux, jouent un rôle principal. Ce constat a conduit l'OMS à définir un plan global de lutte contre la maladie intégrant le traitement standardisé de courte durée et sous surveillance des patients tuberculeux, l'amélioration du dépistage notamment chez les patients infectés par le VIH, et l'amélioration des connaissances pour une meilleure caractérisation de l'épidémie mondiale actuelle en favorisant les programmes de recherche dédiés.

Parmi les axes de recherche actuellement développés, l'épidémiologie moléculaire consiste, à partir d'outils de génotypage performants et en se basant sur des données épidémiologiques de patients, à identifier et à caractériser l'épidémie de tuberculose sévissant actuellement tant au niveau local, que régional, interrégional ou même international. Le génotypage des bacilles tuberculeux constitue donc un enjeu majeur dans la lutte contre la tuberculose en permettant l'identification de chaînes de transmission dans une zone géographique donnée et la caractérisation de groupes de patients à risque de développer la maladie. En effet, le génotypage des bacilles tuberculeux, dans le cadre d'études d'épidémiologie moléculaire, par les informations qu'il fournit peut permettre :

- d'identifier rapidement une épidémie de tuberculose permettant la mise en place précoce de moyens de lutte,
- de détecter les cas de contaminations croisées au laboratoire et ainsi d'améliorer le diagnostic,
- de déceler des liens entre patients qui n'auraient pu être soupçonnés par les études d'épidémiologie classiques,
- de mettre en évidence des chaînes de transmission entre patients,
- d'évaluer l'efficacité des enquêtes autour des cas,

- d'estimer la part de tuberculoses dues à des réactivations de celles correspondant à des transmissions actives et ainsi de comprendre la dynamique de transmission de la maladie dans une zone géographique donnée,
- d'identifier les clones de *M. tuberculosis* responsables d'épidémies de tuberculose, notamment s'ils sont virulents ou résistants aux antituberculeux.

Les études d'épidémiologie moléculaires conduites dans le cadre de mon travail de thèse ont permis de mieux comprendre la transmission et la circulation des bacilles tuberculeux en milieu insulaire, dans la Caraïbe, ainsi qu'en milieu continental avec des études conduites en Amérique latine (Guyane française, Suriname, Guyana) et en Europe (Suède).

Dans la Caraïbe, des situations disparates sont observées reflétant des réalités économiques, sociales et démographiques particulièrement inhomogènes en dépit d'un passé historique parfois similaire. En effet, alors que certains territoires semblent contenir la transmission de la maladie avec des taux d'incidence inférieurs à 5 cas pour 100 000 habitants par an, d'autres pays enregistrent des taux d'incidence record traduisant l'inefficacité voire l'absence de programmes de lutte contre la tuberculose dans ces pays. L'épidémie de VIH/sida qui touche de plein fouet la Caraïbe vient aggraver la situation et des taux de patients co-infectés TB/VIH dépassant 40% ont été relevés.

Ces observations sont des arguments très forts pour le développement d'un programme global de suivi et de lutte contre la tuberculose intégrant les différents pays et territoires de la Caraïbe, d'autant que des flux migratoires permanents existent entre les territoires de la Caraïbe. En devenant Laboratoire Supranational de l'OMS pour la zone Amérique le laboratoire des mycobactéries de l'Institut Pasteur de la Guadeloupe tente de contribuer au développement de ce réseau actuellement à la recherche de financements conséquents et pérennes pour son développement.

Quatre grandes familles génétiques de *M. tuberculosis* prédominent dans la Caraïbe correspondant aux familles LAM, T, Haarlem et X, et pourraient refléter l'histoire de la Caraïbe liée aux vagues successives de colonisation espagnole, anglo-saxonne, et française. De l'arrivée massive des populations africaines (esclavage) et indiennes (consécutive à l'abolition de l'esclavage), on ne retrouve que les souches est-africaines et indiennes (EAI) en proportion variable selon le pays. La caractérisation géographique et moléculaire de clones tuberculeux au sein de l'espace caribéen reste délicate étant donnée l'existence de flux migratoires ininterrompus entre les territoires qui composent la Caraïbe et le brassage de souches de *M. tuberculosis* en résultant. Nous avons néanmoins identifié certains clones spécifiques de Trinidad-et-Tobago, du Suriname et du Guyana et observé leur propagation aux pays limitrophes (Guyane française, USA).

L'évaluation des outils de génotypage actuellement disponibles et l'identification de nouveaux marqueurs apparaissent comme des voies majeures de lutte contre la tuberculose. La stratégie de génotypage des bacilles tuberculeux a, pendant de nombreuses années, reposé sur l'IS*6110*-RFLP, considérée comme « gold-standard » ou méthode de référence. Cependant, les nombreux inconvénients de la méthode demandant de grandes quantités d'ADN, et beaucoup de temps ont joués en faveurs d'autres méthodes de génotypage basées sur la PCR et significativement moins fastidieuses. A l'Institut Pasteur de la Guadeloupe, comme dans de nombreux autres laboratoires de recherche sur la tuberculose, la stratégie de génotypage basée sur l'IS*6110*-RFLP a été remplacée par le spoligotypage dès la fin des années 1990. Bien que rapide et facile à mettre en œuvre, la méthode a cependant rapidement montré ses limites du fait de son pouvoir discriminant limité incitant à surestimer le regroupement des souches en grappe et les liens probables entre patients. De ce fait, l'emploi d'une seconde méthode de génotypage, en complément du spoligotypage, tels que les 5-ETR puis les 12-locus MIRU-VNTR s'est avéré très utile pour la caractérisation des populations de bacilles tuberculeux. Plus récemment, des formats de génotypage basés uniquement sur 15 et 24 minisatellites MIRU-VNTR ont été proposés pour les études d'épidémiologie moléculaire et phylogénétiques de *M. tuberculosis.*

J'ai, au cours de ce travail, évalué le pouvoir discriminant de marqueurs minisatellites pour le génotypage des souches de la famille Beijing, prédominante dans les pays est-asiatiques ainsi que dans certaines régions de Russie et pouvant représenter plus de 50% des cas de tuberculose. Cette famille génétique pose un problème de santé publique dans ces pays du fait de sa virulence et de son aptitude à résister aux traitements antituberculeux ainsi que de la faible diversité génétique observée lors du génotypage des souches de cette famille avec des outils moléculaires autres que l'IS*6110*-RFLP. A Okinawa, au Japon, ces études ont permis d'identifier 8 marqueurs minisatellites QUB dont le pouvoir discriminant vis à vis des souches de la famille Beijing avoisine, mais sans l'égaler, celui obtenu par IS*6110*-RFLP ou le typage des 24-locus MIRU-VNTR. L'étude de la structure de la population de souches de la famille Beijing révèle, par ailleurs, l'existence à Okinawa de deux sous-populations de souches endémiques distinctes : les souches « modernes » minoritaires et les souches « ancienne » surreprésentées à Okinawa. Si les mécanismes expliquant le succès et l'efficacité de la dissémination des souches de la famille Beijing ne sont pas encore élucidés, on suppose qu'ils ont été acquis au cours de l'évolution d'où l'importance d'étudier la structure de la population actuelle ainsi que la phylogénie de ce génogroupe particulier. A Okinawa, dans les îles Ryükyü, la forte présence de souches « anciennes », distinctes de celles retrouvées à Osaka et Kobe (sur l'île principale d'Honshu), suggère la présence ancienne et persistante des souches de ce génogroupe dans cette zone géographique. Ces premiers résultats concernant la structure de la population de souches de la famille Beijing à Okinawa devront être complétés par l'étude notamment des régions de délétions afin de

déterminer l'origine phylogénétique des souches de cette région. Enfin, les marqueurs minisatellites 15 et 21-locus MIRU-VNTR ayant montré leur aptitude à distinguer les sous-populations de souches de la famille Beijing, la constitution d'une base de données dédiée aux souches de cette famille génétique intégrant l'ensemble des résultats de génotypage sur la base de ces marqueurs au niveau mondial pourrait permettre de mieux comprendre l'évolution de cette famille génétique si particulière.

Perspectives

Recherche à visée de santé publique dans les DFA

La surveillance épidémiologique de la tuberculose dans les trois départements français d'Amérique est une réalité du laboratoire Tuberculose et Mycobactéries de l'Institut Pasteur de la Guadeloupe depuis 17 ans maintenant. Dans ce cadre, le laboratoire a développé une activité de référence pour les départements d'Amérique impliquant la mise en place des derniers développements méthodologiques et outils moléculaires pour mieux caractériser l'épidémie de la tuberculose dans cette région. Il est maintenant primordial de maintenir l'excellence de cette activité de référence en mettant en place des outils de génotypage systématiques des isolats de *M. tuberculosis* performants et adaptés.

La stratégie de génotypage est actuellement basée sur le spoligotypage combiné au typage des 12-locus MIRU-VNTR comme seconde méthode de discrimination. Nous souhaitons maintenant évaluer l'apport des formats de génotypage basés sur 15 et 24 minisatellites MIRU-VNTR, dans le cadre des missions de santé publique du laboratoire. Il sera en effet question de définir des stratégies de typage différenciées permettant le génotypage rapide et systématisé de l'ensemble des souches de *M. tuberculosis* isolées au laboratoire.

Parallèlement, le réseau des laboratoires et acteurs de santé intervenants dans la lutte contre la tuberculose dans les trois DFA devra être renforcé afin d'améliorer le suivi et la caractérisation des patients tuberculeux dans cette zone géographique. Dans cette optique, un travail collaboratif avec le Centre de Lutte Antituberculeuse (CLAT) du CHU de Pointe-à-Pitre devrait permettre de mieux identifier les chaînes de transmission en Guadeloupe, grâce à la mise en commun et à l'exploitation des bases de données épidémiologiques et génotypiques des patients et bacilles tuberculeux identifiées en Guadeloupe ces cinq dernières années.

Par ailleurs, en Guyane française, une enquête de caractérisation des profils épidémiologiques, cliniques et biologiques des patients tuberculeux porteurs du VIH a déjà été entamée dans ce département où le taux de co-infection TB/VIH dépassait les 50% en 2004-2005. Nous souhaitons, à partir de ce travail, investiguer les liens potentiels existant entre les signes cliniques et biologiques de la tuberculose, et les variations

génotypiques des souches de *M. tuberculosis* au sein de la population de patients porteurs du VIH afin de mieux connaître et comprendre l'épidémie de tuberculose sévissant actuellement au sein de cette population.

Modélisation de la dynamique de transmission de la tuberculose dans la Caraïbe

L'étude des génomes et leur comparaison constitue une approche intéressante pour comprendre le succès et la transmission de certains clones tuberculeux au sein d'une population. Afin de mieux comprendre la dynamique de transmission de la maladie dans la Caraïbe, nous souhaitons procéder à une caractérisation multi-locus et multi-marqueurs associant notamment l'étude de minisatellites, de SNPs, et de régions de délétion, de génotypes prédominants et de génotypes en extinction préalablement identifiés dans cette zone géographique. L'objectif de ce travail serait de combiner des données de génotypage, en s'appuyant par exemple sur le séquençage de génomes complets, à celles d'épidémiologie ou encore aux paramètres biologiques concernant les patients, afin de comprendre les phénomènes sous-jacents à l'émergence et à l'extinction de clones tuberculeux spécifiques. L'analyse de ces données pourrait permettre la construction de modèles concernant la dynamique de transmission et d'évolution de la maladie dans cette région du monde particulière qu'est la Caraïbe.

Phylogénie globale de la famille génétique Beijing

Concernant la famille génétique Beijing, de nombreuses études ont été menées dans plusieurs régions du monde où ces souches prédominent afin d'évaluer la capacité de sets de marqueurs minisatellites à discriminer les isolats de cette lignée. Les résultats obtenus dans ce travail de thèse ainsi que les nombreux travaux publiés concernant l'évaluation de marqueurs minisatellites montrent des résultats hétéroclites selon la zone géographique étudiée, l'importance de la contribution de la famille Beijing à l'épidémie de tuberculose dans la zone géographique considérée, la dynamique de transmission des souches de cette famille et l'histoire évolutive régionale de ce génogroupe. Afin de combler le manque d'information généré par le génotypage des souches de la famille Beijing basé uniquement sur les marqueurs minisatellites, certains travaux de génotypage des souches de cette famille combinent l'utilisation de SNP, RD à celle des minisatellites définissant ainsi plusieurs sous-familles et sous-groupes. L'accumulation de phénomènes évolutifs pourrait avoir permis la mise en place des propriétés actuelles ayant favorisé l'émergence et la propagation des souches de la famille Beijing à la majorité des pays est-asiatiques, de l'ancien bloc soviétique, à certains pays d'Europe de l'Est et à l'Afrique du Sud. Il semble donc primordial de pouvoir connaître la phylogénie de la famille Beijing et nous souhaitons contribuer à l'avancée des connaissances dans ce domaine en développant un génotypage multi-marqueurs des souches de la famille Beijing intégrant notamment SNP et RD.

Références bibliographiques

1. **Abadia E., M. Sequera, D. Ortega, M.V. Mendez, A. Escalona, O. Da Mata, E. Izarra, Y. Rojas, R. Jaspe, A.S. Motiwala, D. Alland, J. de Waard, H.E. Takiff.** 2009. Mycobacterium tuberculosis ecology in Venezuela: epidemiologic correlates of common spoligotypes and a large clonal cluster defined by MIRU-VNTR-24. BMC Infect Dis 9:122.
2. **Abebe F., G. Bjune.** 2006. The emergence of Beijing family genotypes of Mycobacterium tuberculosis and low-level protection by bacille Calmette-Guérin (BCG) vaccines: is there a link? Clin Exp Immunol. 145:389-397.
3. **Ait-Khaled N., D. Enarson.** 1999. Tuberculose: Manuel pour les étudiants en médecine [en ligne]. Paris et Genève: Union Internationale Contre la Tuberculose et les Maladie Respiratoires / Organisation Mondiale de la Santé. 149 p. [consulté en janvier 2011]. http://www.tbrieder.org/publications/books_french/students_fr.pdf
4. **Alangaden G.J., E.K. Manavathu, S.B. Vakulenko, N.M. Zvonok, S.A. Lerner.** 1995. Characterization of fluoroquinolone-resistant mutant strains of Mycobacterium tuberculosis selected in the laboratory and isolated from patients. Antimicrob Agents Chemother. 39:1700-1703.
5. **Alcaide F., G.E. Pfyffer, A. Telenti.** 1997. Role of embB in natural and acquired resistance to ethambutol in mycobacteria. Antimicrob Agents Chemother. 41:2270-2273.
6. **Alland D., G.E. Kalkut, A.R. Moss, R.A. Mc Adam, J.A. Hahn, W. Bosworth, E. Drucker, B.R. Bloom.** 1994. Transmission of tuberculosis in New York City: an analysis by DNA fingerprinting and conventional epidemiologic methods. N. Eng. J. Med. 330:1710-1716.
7. **Alland D., T.S. Whittam, M.B. Murray, M.D. Cave, M.H. Hazbon, K. Dix, M. Kokoris, A. Duesterhoeft, J.A. Eisen, C.M. Fraser, R.D. Fleischmann.** 2003. Modeling Bacterial Evolution with Comparative-Genome-Based Marker Systems: Application to Mycobacterium tuberculosis Evolution and Pathogenesis. J Bacteriol. 185:3392-3399.
8. **Almeida da Silva P., J.A. Ainsa.** 2007. Drugs and Drug Interactions. In J.C. Palomino (éd.), S.C. Leao (éd.), and V. Ritacco (éd.). Tuberculosis 2007. From basic science to patient care. [Disponible sur : www.TuberculosisTextbook.com].
9. **American Thoracic Society (ATS).** 2000. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. Am J Respir Crit Care Med. 161:1376-1395.
10. **Andersen P., T.M. Doherty.** 2005 The success and failure of BCG - implications for a novel tuberculosis vaccine. Nat Rev Microbiol. 3: 656-662.

11. **Anh D.D., M.W. Borgdorff, L.N. Van, N.T. Lan, T. van Gorkom, K. Kremer, D. van Soolingen.** 2000. Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype emerging in Vietnam. Emerg Infect Dis. 6:302-305.
12. **Antoine D., D. Che.** 2007. Les cas de tuberculose déclarés en France en 2005. BEH. 11:85-89.
13. **Aranaz A., E. Liebana, E. Gomez-Mampaso, J.C. Galan, D. Cousins, A. Ortega, J. Blazquez, F. Baquero, A. Mateos, G. Suarez, L. Dominguez.** 1999. Mycobacterium tuberculosis subsp. caprae subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the Mycobacterium tuberculosis complex isolated from goats in Spain. Int J Syst Bacteriol. 49:1263-1273.
14. **Aronson N.E., M. Santosham, G.W. Comstock, R.S. Howard, L.H. Moulton, E.R. Rhoades, L.H. Harrison.** 2004. Long-term efficacy of BCG vaccine in American Indians and Alaska Natives: A 60-year follow-up study. JAMA 2004; 291:2086-2091.
15. **Ayele W.Y., S.D. Neill, J. Zinsstag, M.G. Weiss, I. Pavlik.** 2004. Bovine tuberculosis: an old disease but a new threat to Africa. Int J Tuberc Lung Dis 8:924-937.
16. **Baker L., T. Brown, M.C. Maiden, F. Drobniewski.** 2004. Silent nucleotide polymorphisms and a phylogeny for Mycobacterium tuberculosis. Emerg Infect Dis 10:1568-1577.
17. **Banerjee A., E. Dubnau, A. Quemard, V. Balasubramanian, K.S. Um, T. Wilson, D. Collins, G. de Lisle, W.R. Jacobs, Jr.** 1994. inhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in Mycobacterium tuberculosis. Science. 263:227-230.
18. **Barnes P.F., M.D. Cave.** 2003. Molecular epidemiology of tuberculosis. N Engl J Med. 349:1149-1156.
19. **Barnes P.F., Z. Yang, S. Preston-Martin, J.M. Pogoda, B.E. Jones, M. Otaya, K.D. Eisenach, L. Knowles, S. Harvey, M.D. Cave.** 1997. Patterns of tuberculosis transmission in Central Los Angeles. JAMA. 278:1159-1163.
20. **Basso L.A., R. Zheng, J.M. Musser, W.R. Jacobs Jr, J.S. Blanchard.** 1998. Mechanisms of isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis: enzymatic characterization of enoyl reductase mutants identified in isoniazid-resistant clinical isolates. J Infect Dis. 178:769-775.
21. **Baulard A.R., J.C. Betts, J. Engohang-Ndong, S. Quan, R.A. McAdam, P.J. Brennan, C. Locht, G.S. Besra.** 2000. Activation of the pro-drug ethionamide is regulated in mycobacteria. J Biol Chem. 275:28326-28331.
22. **Behr M.A., M.A. Wilson, W.P. Gill, H. Salamon, G.K. Schoolnik, S. Rane, P.M. Small.** 1999. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. Science. 284:1520-1523.

23. **Bifani P.J., B. Mathema, N.E. Kurepina, B.N. Kreiswirth.** 2002. Global dissemination of the Mycobacterium tuberculosis W-Beijing family strains. Trends Microbiol. 10:45-52.

24. **Bifani P.J., B. Mathema, Z. Liu, S. L. Moghazeh, B. Shopsin, B. Tempalski, J. Driscol, R. Frothingham, J.M. Musser, P. Alcabes, B.N. Kreiswirth.** 1999. Identification of a W-variant outbreak of Mycobacterium tuberculosis via population-based molecular epidemiology. JAMA 282:2321-2327.

25. **Blakemore R., E. Story, D. Helb, J. Kop, P. Banada, M.R. Owens, S. Chakravorty, M. Jones, D. Alland.** 2010. Evaluation of the analytical performance of the Xpert MTB/RIF assay. J Clin Microbiol. 48:2495-2501.

26. **Boehme C.C., P. Nabeta, D. Hillemann, M.P. Nicol, S. Shenai, F. Krapp, J. Allen, R. Tahirli, R. Blakemore, R. Rustomjee, A. Milovic, M. Jones, S.M. O'Brien, D.H. Persing, S. Ruesch-Gerdes, E. Gotuzzo, C. Rodrigues, D. Alland, M.D. Perkins.** 2010. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. N Engl J Med. 363:1005-1015.

27. **Bonard D., P. Msellati, L. Rigouts, P. Combe, D. Coulibaly, I.M. Coulibaly, F. Portaels**. 2000. What is the meaning of repeated isolation of Mycobacterium africanum? Int J Tuberc Lung Dis. 4:1176-1180.

28. **Borgdorff M.W., M.A. Behr, N.J. Nagelkerke, P.C. Hopewell, P.M. Small.** 2000. Transmission of tuberculosis in San Francisco and its association with immigration and ethnicity. Int J Tuberc Lung Dis. 4:287-294.

29. **Borgdorff M.W., N.J. Nagelkerke, C. Dye, P. Nunn.** 2000. Gender and tuberculosis: a comparison of prevalence surveys with notification data to explore sex differences in case detection. Int J Tuberc Lung Dis. 4:132-132.

30. **Bouyer J., D. Hemon, S. Cordier, F. Derriennic, I. Stücker, B. Stengel, J. Clavel.** 1995. Epidémiologie - Principes et méthodes quantitatives. Paris: éd. INSERM. 498 p.

31. **Braden C.R., G.L. Templeton, M.D. Cave, S. Valway, I.M. Onorato, K.G. Castro, D. Moers, Z. Yang, W.W. Stead, J.H. Bates.** 1997. Interpretation of restriction fragment length polymorphism analysis of Mycobacterium tuberculosis isolates from a state with a large rural population. J Infect Dis. 175:1446-1452.

32 **Brosch R., S.V. Gordon, T. Garnier, K. Eiglmeier, W. Frigui, P. Valenti, S. Dos Santos, S. Duthoy, C. Lacroix, C. Garcia-Pelayo, J.K. Inwald, P. Golby, J.N. Garcia, R.G. Hewinson, M.A. Behr, M.A. Quail, C. Churcher, B.G. Barrell, J. Parkhill, S.T. Cole ST.** 2007. Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. Proc Natl Acad Sci USA 104:5596-5601.

33. **Brosch R., S.V. Gordon, M. Marmiesse, P. Brodin, C. Buchrieser, K. Eiglmeier, T. Garnier, C. Gutierrez, G. Hewinson, K. Kremer, L.M. Parsons, A.S. Pym, S. Samper, D. van Soolingen, S.T. Cole.** 2002. A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex. Proc Natl Acad Sci USA. 99:3684-3689.

34. **Brosch R., S.V. Gordon, A. Pym, K. Eiglmeier, T. Garnier, S.T. Cole.** 2000. Comparative genomics of the mycobacteria. Int J Med Microbiol. 290:143-152.

35. **Brosch R., A.S. Pym, S.V. Gordon, S.T. Cole.** 2001. The evolution of mycobacterial pathogenicity: clues from comparative genomics. Trends Microbiol 9:452-458.

36. **Brudey K., J.R. Driscoll, L. Rigouts, W.M. Prodinger, A. Gori, S.A. Al-Hajoj, C. Allix, L. Aristimuno, J. Arora, V. Baumanis, L. Binder, P. Cafrune, A. Cataldi, S. Cheong, R. Diel, C. Ellermeier, J.T. Evans, M. Fauville-Dufaux, S. Ferdinand, D. Garcia de Viedma, C. Garzelli, L. Gazzola, H.M. Gomes, M.C. Gutierrez, P.M. Hawkey, P.D. van Helden, G.V. Kadival, B.N. Kreiswirth, K. Kremer, M. Kubin, S.P. Kulkarni, B. Liens, T. Lillebaek, H.M. Ly, C. Martin, I. Mokrousov, O. Narvskaia, Y.F. Ngeow, L. Naumann, S. Niemann, I. Parwati, M.Z. Rahim, V. Rasolofo-Razanamparany, T. Rasolonavalona, M.L. Rossetti, S. Rusch-Gerdes, A. Sajduda, S. Samper, I. Shemyakin, U.B. Singh, A. Somoskovi, R. Skuce, D. van Soolingen, E.M. Streicher, P.N. Suffys, E. Tortoli, T. Tracevska, V. Vincent, T.C. Victor, R. Warren, S.F. Yap, K. Zaman, F. Portaels, N. Rastogi, and C. Sola.** 2006. Mycobacterium tuberculosis complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. BMC Microbiol. 6:23.

37. **Brudey K., I. Filliol, S. Ferdinand, V. Guernier, P. Duval, B. Maubert, C. Sola, N. Rastogi.** 2006. Long-term population-based genotyping study of Mycobacterium tuberculosis complex isolates in the French departments of the Americas. J Clin Microbiol. 44:183-191.

38. **Bulletin d'épidémiologie hebdomadaire (BEH).** 1997. Tuberculose : traitement et prévention. Numéro spécial. Janvier 1997.

39. **Burman W.J., R.R. Reves.** 2000. Review of false-positive cultures for Mycobacterium tuberculosis and recommendations for avoiding unnecessary treatment. Clin Infect Dis. 31:1390-1395.

40. **Caimi K., M.I. Romano, A. Alito, M. Zumarraga, F. Bigi, A. Cataldi.** 2001. Sequence analysis of the direct repeat region in Mycobacterium bovis. J Clin Microbiol. 39:1067-1072.

41. **Caminero J.A., M.J. Pena, M.I. Campos-Herrero, J.C. Rodríguez, I. García, P. Cabrera, C. Lafoz, S. Samper, H. Takiff, O. Afonso, J.M. Pavón, M.J. Torres, D. van Soolingen, D.A. Enarson, C. Martin.** 2001. Epidemiological evidence of the spread of a Mycobacterium tuberculosis strain of the Beijing genotype on Gran Canaria Island. Am J Respir Crit Care Med. 164:1165-1170.

42. **Caminero J.A., G. Sotgiu, A. Zumla, G.B. Migliori.** 2010. Best drug treatment for multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis. Lancet Infect Dis. 10:621-629.

43. **Campbell I.A., and O. Bah-Sow.** 2006. Pulmonary tuberculosis: diagnosis and treatment. Bmj 332:1194-1197.

44. **Camus J.C., M.J. Pryor, C. Médigue, S.T. Cole.** 2002. Re-annotation of the genome sequence of Mycobacterium tuberculosis H37Rv. Microbiology. 148:2967-2973.

45. **Candia N., B. Lopez, T. Zozio, M. Carrivale, C. Diaz, G. Russomando, N.J. de Romero, J.C. Jara, L. Barrera, N. Rastogi, V. Ritacco.** 2007. First insight into Mycobacterium tuberculosis genetic diversity in Paraguay. BMC Microbiol. 7:75.

46. **Canetti G., S. Froman, J. Grosset, P. Hauduroy, M. Langerova, H.T. Mahler, G. Meissner, D.A. Mitchison, L. Sula.** 1963. Mycobacteria: laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance. Bull World Health Organ29: 565–578.

47. **Cavanagh R., M. Begon, M. Bennett, T. Ergon, I.M. Graham, P.E. De Haas, C.A. Hart, M. Koedam, K. Kremer, X. Lambin, P. Roholl, D. Soolingen.** 2002. Mycobacterium microti infection (vole tuberculosis) in wild rodent populations. J Clin Microbiol. 40:3281-3285.

48. **Caws M., F.A. Drobniewski.** 2001. Molecular techniques in the diagnosis of Mycobacterium tuberculosis and the detection of drug resistance. Ann NY Acad Sci. 953:138-145.

49. **Centers for Disease Control and Prevention.** 2009. Reported Tuberculosis in the United States, 2008 [en ligne]. Atlanta, Department of Health and Human Services, CDC. 150 p. [Consulté en juin 2010]. http://www.cdc.gov/tb/statistics/reports/2008/default.htm

50. **Cheng A.F., W.W. Yew, E.W. Chan, M.L. Chin, M.M. Hui, R.C. Chan.** 2004. Multiplex PCR amplimer conformation analysis for rapid detection of gyrA mutations in fluoroquinolone-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother. 48:596-601.

51. **Chiang C.Y. and L.W. Riley**. 2005. Exogenous reinfection in tuberculosis. Lancet Infect Dis 5:629-36.

52. **Clark-Curtiss, J.E., S.E. Haydel.** 2003. Molecular genetics of Mycobacterium tuberculosis pathogenesis. Annu Rev Microbiol. 57:517-549.

53. **Cole S.T.** 1999. Learning from the genome sequence of Mycobacterium tuberculosis H37Rv. FEBS Lett. 452:7-10.

54. **Cole S.T., R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S.V. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, C.E. BaryIII, F. Tekaia, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, S. Gentles, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, A. Krogh, J McLean, S. Moule, L. Murphy, K. Oliver, J. Osborne, M.A. Quail, M.A. Rajandream, J. Rogers, S. Rutter, K. Seeger, J. Skelton, R. Squares, S. Squares, J.E. Sulston, K. Taylor, S. Whitehead, B.G. Barrell.** 1998. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. Nature. 393:537-544.

55. **Collins D.M., Stephens D.M.** 1991. Identification of an insertion sequence, IS1081, in Mycobacterium bovis. FEMS Microbiol Lett. 67:11-15.

56. **Comas I., S. Gagneux.** 2009. The past and future of tuberculosis research. PLoS Pathog. 5:e1000600.

57. **Commission économique pour l'Amérique latine et les Caraïbes.** 2007. Anuario estadístico de América Latina y el Caribe, edición 2006 / Annuaire statistique de l'Amérique latine et des Caraïbes, édition 2006 [en ligne]. Nations Unies : Commission économique pour l'Amérique latine et les Caraïbes. 445 p. [Consulté en juin 2010]. http://websie.eclac.cl/anuario_estadistico/anuario_2006_fr/fr/index.html

58. **Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France (CSHPF).** 2004. Prévention et prise en charge de la tuberculose en France. Synthèse et recommandations du groupe de travail du Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France (2002-2003). Revue des Maladies Respiratoires. 20:7S13-7S106.

59. **Corbett E.L., C.J. Watt, N. Walker, D. Maher, B.G. Williams, M.C. Raviglione, C. Dye.** 2003. The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. Arch Intern Med 163:1009-1021.

60. **Cousins D.V., R. Bastida, A. Cataldi, V. Quse, S. Redrobe, S. Dow, P. Duignan, A. Murray, C. Dupont, N. Ahmed, D.M. Collins, W.R. Butler, D. Dawson, D. Rodriguez, J. Loureiro, M.I. Romano, A. Alito, M. Zumarraga, A. Bernardelli.** 2003. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the Mycobacterium tuberculosis complex: Mycobacterium pinnipedii sp. Nov. Int J Syst Evol Microbiol. 53:1305-1314.

61. **Cowley D., D. Govender, B. February, M. Wolfe, L. Steyn, J. Evans, R.J. Wilkinson, M.P. Nicol.** 2008. Recent and rapid emergence of W-Beijing strains of Mycobacterium tuberculosis in Cape Town, South Africa. Clin Infect Dis. 47:1252-1259.

62. **Cox H.S., T. Kubica, D. Doshetov, Y. Kebede, S. Rusch-Gerdess, S. Niemann.** 2005. The Beijing genotype and drug resistant tuberculosis in the Aral Sea region of Central Asia. Respir Res 6:134.

63. **Dale J.W., H. Al-Ghusein, S. Al-Hashmi, P. Butcher, A.L. Dickens, F. Drobniewski, K.J. Forbes, S.H. Gillespie, D. Lamprecht, T.D. McHugh, R. Pitman, N. Rastogi, A.T. Smith, C. Sola, H. Yesilkaya.** 2003. Evolutionary relationships among strains of Mycobacterium tuberculosis with few copies of IS6110. J Bacteriol. 185:2555-2562.

64. **Daley C.L., P.M. Small, G.F. Schecter, G.K. Schoolnik, R.A. McAdam, W.R. Jr Jacobs, and P.C. Hopewell.** 1992. An outbreak of tuberculosis with accelerated progression among persons infected with the human immunodeficiency virus. An analysis using restriction-fragment-length polymorphisms. N Engl J Med 326:231-235.

65. **Daniel T.M.** 2005. Robert Koch and the pathogenesis of tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis.9:1181-1182.

66. **Daniel T.M.** 2006. The history of tuberculosis. Respir Med. 100:1862-1870.

67. **David H.L.** 1970. Probability distribution of drug-resistant mutants in unselected populations of Mycobacterium tuberculosis. Appl Microbiol 20:810-814.

68. **Davies A.P., O.J. Billington, T.D. McHugh, D.A. Mitchison, S.H. Gillespie.** 2000. Comparison of phenotypic and genotypic methods for pyrazinamide susceptibility testing with Mycobacterium tuberculosis. J Clin Microbiol. 38:3686-3688.

69. **DeBarber A.E., K. Mdluli, M. Bosman, L.G. Bekker, C.E. 3rd Barry.** 2000. Ethionamide activation and sensitivity in multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis. Proc Natl Acad Sci USA. 97:9677-9682.

70. **de Boer A.S., M.W Borgdorff, P.E. de Haas, N.J. Nagelkerke, J.D. van Embden, D. van Soolingen.** 1999. Analysis of rate of change of IS6110 RFLP patterns of Mycobacterium tuberculosis based on serial patient isolates. J Infect Dis.180:1238-1244.

71. **de Jong B.C., I. Adetifa, B. Walther, P.C. Hill, M. Antonio, M. Ota, R.A. Adegbola.** 2010. Differences between tuberculosis cases infected with Mycobacterium africanum, West African type 2, relative to Euro-American Mycobacterium tuberculosis: an update. FEMS Immunol Med Microbiol. 58:102-105.

72. **de Jong B.C., M. Antonio, T. Awine, K. Ogungbemi, Y.P. de Jong, S. Gagneux, K. DeRiemer, T. Zozio, N. Rastogi, M. Borgdorff, P.C. Hill, R.A. Adegbola.** 2009. Use of spoligotyping and large sequence polymorphisms to study the population structure of the Mycobacterium tuberculosis complex in a cohort study of consecutive smear-positive tuberculosis cases in The Gambia. J Clin Microbiol. 47:994-1001.

73. **de Jong B.C., M. Antonio, S. Gagneux.** 2010. Mycobacterium africanum—Review of an Important Cause of Human Tuberculosis in West Africa. PLoS Negl Trop Dis. 4:744.

74. **de Jong B.C., P.C. Hill, R.H. Brookes, J.K. Otu, K.L. Peterson, P.M. Small, R.A. Adegbola.** 2005. Mycobacterium africanum: a new opportunistic pathogen in HIV infection? AIDS. 19:1714-1715.

75. **de la Rua-Domenech R.** 2006. Human Mycobacterium bovis infection in the United Kingdom: Incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. Tuberculosis (Edinb) 86:77-109.

76. **Diguimbaye C., M. Hilty, R. Ngandolo, H.H. Mahamat, G.E. Pfyffer, F. Baggi, M. Tanner, E. Schelling, J. Zinsstag.** 2006. Molecular characterization and drug resistance testing of Mycobacterium tuberculosis isolates from Chad. J. Clin. Microbiol. 44:1575–1577.

77. **Driscoll J.R.** 2009. Spoligotyping for molecular epidemiology of the Mycobacterium tuberculosis complex. Methods Mol Biol. 551:117-128.

78. **Drobniewski F., Y. Balabanova, V. Nikolayevsky, M. Ruddy, S. Kuznetzov, S. Zakharova, A. Melentyev, I. Fedorin.** 2005. Drug-resistant tuberculosis, clinical virulence, and the dominance of the Beijing strain family in Russia. JAMA 293:2726–2731.

79. **Dye C.** 2006. Global epidemiology of tuberculosis. Lancet. 367:938-940.

80. **Dye C., S. Shaele, P. Dolin, V. Pathani, M.C. Raviglione.** 1999. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence and mortality by country. JAMA. 282:677–686.

81. **Dye C, C.J. Watt, D.M. Bleed, S.M. Hosseini, M.C. Raviglione.** 2005. Evolution of tuberculosis control and prospects for reducing tuberculosis incidence, prevalence, and deaths globally. JAMA. 293:2767-2775.

82. **Easterbrook P.J., A. Gibson, S. Murad, D. Lamprecht, N. Ives, A. Ferguson, O. Lowe, P. Mason, A. Ndudzo, A. Taziwa, R. Makombe, L. Mbengeranwa, C. Sola, N. Rastogi, F. Drobniewski.** 2004. High rates of clustering of strains causing tuberculosis in Harare, Zimbabwe: a molecular epidemiological study. J Clin Microbiol. 42:4536-4544.

83. **Espinal M.A.** 2003. The global situation of MDR-TB. Tuberculosis (Edinb). 83:44-51.

84. **Espinal M.A., S.J. Kim, P.G. Suarez, K.M. Kam, A.G. Khomenko, G.B. Migliori, J. Baéz, A. Kochi, C. Dye, M.C. Raviglione..** 2000. Standard short-course chemotherapy for drug-resistant tuberculosis: treatment outcomes in 6 countries. JAMA 283:2537-2545.

85. **European Concerted Action on New Generation Genetic Markers and Techniques for the Epidemiology and Control of Tuberculosis.** 2006. Beijing/W genotype Mycobacterium tuberculosis and drug resistance. Emerg Infect Dis. 12:736-743.

86. **EuroTB and the national coordinators for tuberculosis surveillance in the WHO European Region.** 2007. Surveillance of Tuberculosis in Europe - Report on tuberculosis cases notified in 2005. Saint-Maurice : Institut de veille sanitaire (InVS). 113 p. [Consulté en juin 2010]. http://www.eurotb.org/

87. **Fabre M., J.L. Koeck, P. Le Fleche, F. Simon, V.V. Herve, G. Vergnaud, C. Pourcel.** 2004. High Genetic Diversity Revealed by Variable-Number Tandem Repeat Genotyping and Analysis of hsp65 Gene Polymorphism in a Large Collection of "Mycobacterium canettii" Strains Indicates that the M. tuberculosis Complex Is a Recently Emerged Clone of "M. canettii". J Clin Microbiol. 42:3248-3255.

88. **Fang Z., C. Doig, N. Morrison, B. Watt, K.J. Forbes.** 1999. Characterization of IS1547, a new member of the IS900 family in the Mycobacterium tuberculosis complex, and its association with IS6110. J Bacteriol. 181:1021-1024.

89. **Fang Z., K.J. Forbes.** 1997. A Mycobacterium tuberculosis IS6110 preferential locus (ipl) for insertion into the genome. J Clin Microbiol 35:479-481.

90. **Ferdinand S., S. Cassadou, N. Rastogi.** 2007. Transmission de la tuberculose en Guadeloupe - Etude des facteurs de risque de transmission récente et des filières de contamination et de soins. Observatoire Régional de la Santé en Guadeloupe : Rapport d'étude. 56 p.

91. **Ferdinand S., C. Sola, B. Verdol, E. Legrand, K.S. Goh, M. Berchel, A. Aubery, M. Timothee, P. Joseph, J.W. Pape, N. Rastogi.** 2003. Molecular characterization and drug resistance patterns of strains of Mycobacterium tuberculosis isolated from patients in an AIDS counseling center in Port-au-Prince, Haiti: a 1-year study. J Clin Microbiol. 41:694-702.

92. **Filliol I, J.R Driscoll, D. van Soolingen, B.N. Kreiswirth, K. Kremer, G. Valetudie, D.D. Anh, R. Barlow, D. Banerjee, P.J. Bifani, K. Brudey, A. Cataldi, R.C. Cooksey, D.V. Cousins, J.W. Dale, O.A. Dellagostin, F. Drobniewski, G. Engelmann, S. Ferdinand, D. Gascoyne-Binzi, M. Gordon, M.C. Gutierrez, W.H. Haas, H. Heersma, G. Källenius, E. Kassa-Kelembho, T. Koivula, H.M. Ly, A. Makristathis, C. Mammina, G. Martin, P. Moström, I. Mokrousov, V. Narbonne, O. Narvskaya, A. Nastasi, S.N. Niobe-Eyangoh, J.W. Pape, V. Rasolofo-Razanamparany, M. Ridell, M.L. Rossetti, F. Stauffer, P.N. Suffys, H. Takiff, J. Texier-Maugein, V. Vincent, J.H. De Waard, C. Sola, N. Rastogi.** 2002. Global distribution of Mycobacterium tuberculosis spoligotypes. Emerg Infect Dis. 8:1347-1349.

93. **Filliol I., J.R Driscoll, D. van Soolingen, B.N. Kreiswirth, K. Kremer, G. Valetudie, R. Dang, D.A. Barlow, D. Banerjee, P.J. Bifani, K. Brudey, A. Cataldi, R.C. Cooksey, D.V. Cousins, J.W. Dale, O.A. Dellagostin, F. Drobniewski, G. Engelmann, S. Ferdinand, D. Gascoyne-Binzi, M. Gordon, M.C. Gutierrez, W.H. Haas, H. Heersma, E. Kassa-Kelembho, M.L. Ho, A. Makristathis, C. Mammina, G. Martin, P. Mostrom, I. Mokrousov, V. Narbonne, O. Narvskaya, A. Nastasi, S.N. Niobe-Eyangoh, J.W. Pape, V. Rasolofo-Razanamparany, M. Ridell, M.L. Rossetti, F. Stauffer, P.N. Suffys, H. Takiff, J. Texier-Maugein, V. Vincent, J.H. de Waard, C. Sola, N. Rastogi.** 2003. Snapshot of moving and expanding clones of Mycobacterium tuberculosis and their global distribution assessed by spoligotyping in an international study. J. Clin. Microbiol. 41:1963–1970.

94. **Filliol I., S. Ferdinand, L. Negroni, C. Sola, N. Rastogi.** 2000. Molecular typing of Mycobacterium tuberculosis based on variable number of tandem DNA repeats used alone and in association with spoligotyping. J Clin Microbiol. 38: 2520-2524.

95. **Filliol I, A.S. Motiwala, M. Cavatore, W. Qi, M.H. Hazbón, M. Bobadilla del Valle, J. Fyfe, L. García-García, N. Rastogi, C. Sola, T. Zozio, M.I. Guerrero, C.I. León, J. Crabtree, S. Angiuoli, K.D. Eisenach, R. Durmaz, M.L. Joloba, A. Rendón, J. Sifuentes-Osornio, A. Ponce de León, M.D. Cave, R. Fleischmann, T.S. Whittam, D. Alland.** 2006. Global phylogeny of Mycobacterium tuberculosis based on single nucleotide polymorphism (SNP) analysis: insights into tuberculosis evolution, phylogenetic accuracy of other DNA fingerprinting systems, and recommendations for a minimal standard SNP set. J Bacteriol. 188:759-772.

96. **Finken M., P. Kirschner, A. Meier, A. Wrede, E.C. Böttger.** 1993. Molecular basis of streptomycin resistance in Mycobacterium tuberculosis: alterations of the ribosomal protein S12 gene and point mutations within a functional 16S ribosomal RNA pseudoknot. Mol Microbiol. 9:1239-1246.

97. **Fleischmann R.D., D. Alland, J.A. Eisen, L. Carpenter, O. White, J. Peterson, R. DeBoy, R. Dodson, M. Gwinn, D. Haft, E. Hickey, J.F. Kolonay, W.C. Nelson, L.A. Umayam, M. Ermolaeva, S.L. Salzberg, A. Delcher, T. Utterback, J. Weidman, H. Khouri, J. Gill, A. Mikula, W. Bishai, W.R. Jacobs Jr, J.C. Venter, C.M. Fraser.** 2002. Whole-genome comparison of Mycobacterium tuberculosis clinical and laboratory strains. J Bacteriol. 184:5479-5490.

98. **Francis M., A. Rattan.** 2006. Caribbean Epidemiology Centre (CAREC). Tuberculosis in CAREC member countries [en ligne]. October 2006, vol. 26, n. 3, p. 1-7 [Consulté en juin 2010]. http://new.paho.org/carec/index.php?option=com_content&task=view&id=138&Itemid=337

99. **Frothingham R., W.A. Meeker-O'Connell.** 1998. Genetic diversity in the Mycobacterium tuberculosis complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. Microbiology. 144:1189-1196.

100. **Forssbohm M., M. Zwahlen, R. Loddenkemper, H.L. Rieder.** 2008. Demographic characteristics of patients with extrapulmonary tuberculosis in Germany. Eur Respir J. 31:99-105.

101. **Gagneux S., K. DeRiemer, T. Van, M. Kato-Maeda, B.C. de Jong, S. Narayanan, M. Nicol, S. Niemann, K. Kremer, M.C. Gutierrez, M. Hilty, P.C. Hopewell, P.M. Small.** 2006. Variable host-pathogen compatibility in Mycobacterium tuberculosis. Proc Natl Acad Sci USA. 103:2869-2873.

102. **Gandhi N.R., P. Nunn, K. Dheda, H.S. Schaaf, M. Zignol, D. van Soolingen, P. Jensen, J. Bayona.** 2010. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis. Lancet. 375:1830-1843.

103. **García de Viedma D., N. Alonso Rodríguez, S. Andrés, M. MartínezLirola, M.J. Ruiz Serrano, E. Bouza.** 2006. Evaluation of alternatives to RFLP for the analysis of clustered cases of tuberculosis.Int J Tuberc Lung Dis10:454-459.

104. **Garnier T., K. Eiglmeier, J.C. Camus, N. Medina, H. Mansoor, M. Pryor, S. Duthoy, S. Grondin, C. Lacroix, C. Monsempe, S. Simon, B. Harris, R. Atkin, J. Doggett, R. Mayes, L. Keating, P.R. Wheeler, J. Parkhill, B.G. Barrell, S.T. Cole, S.V. Gordon, R.G. Hewinson.** 2003. The complete genome sequence of Mycobacterium bovis. Proc Natl Acad Sci USA. 100:7877-7882.

105. **Garrity G.M., J.A. Bell, T.G. Lilburn.** 2004. Taxonomic outline of the prokaryotes. Bergey's manual of systematic bacteriology, second edition. release 5.0. New-York: Springer-Verlag. 399 p.

106. **Getahun H., M. Harrington, R. O'Brien, P. Nunn.** 2007. Diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis in people with HIV infection or AIDS in resource-constrained settings: informing urgent policy changes. Lancet. 369:2042-2049.

107. **Ghebremichael S., R. Petersson, T. Koivula, A. Pennhag, V. Romanus, I. Berggren, B. Petrini, S. Hoffner, G. Källenius.** 2008. Molecular epidemiology of drug-resistant tuberculosis in Sweden. Microbes Infect. 10:699-705.

108. **Glynn J.R., J. Bauer, A.S. deBoer, M.W. Borgdorff, P.E.M. Fine, P. Godfrey-Faussett, E. Vynnycky.** 1999. Interpreting DNA fingerprinting clusters of Mycobacterium tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis. 3:1055-1060.

109. **Glynn J.R., A.C. Crampin, M.D. Yates, H. Traore, F.D. Mwaungulu, B.M. Ngwira, R. Ndlovu, F. Drobniewski, P.E. Fine.** 2005. The importance of recent infection with Mycobacterium tuberculosis in an area with high VIH prevalence: a long-term molecular epidemiological study in Northern Malawi. J Infect Dis. 192:480-487.

110. **Glynn J.R., E. Vynnycky, P.E. Fine.** 1999. Influence of sampling on estimates of clustering and recent transmission of Mycobacterium tuberculosis derived from DNA fingerprinting techniques. Am J Epidemiol. 149:366-371.

111. **Glynn J.R., J. Whiteley, P.J. Bifani, K. Kremer, D. van Soolingen.** 2002. Worldwide occurrence of Beijing/W strains of Mycobacterium tuberculosis: a systematic review. Emerg Infect Dis 8:843-849.

112. **Goguet de la Salmonière Y.O., C.C. Kim, A.G. Tsolaki, A.S. Pym, M.S. Siegrist, P.M. Small.** 2004. High-throughput method for detecting genomic-deletion polymorphisms. J Clin Microbiol 42:2913-2918.

113. **Gordon S.V., R. Brosch, A. Billault, T. Garnier, K. Eiglmeier, S.T. Cole.** 1999. Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. Mol Microbiol. 32:643-655.

114. **Goyal M., D. Young, Y. Zhang, P.A. Jenkins, R.J. Shaw.** 1994. PCR amplification of variable sequence upstream of katG gene to subdivide strains of Mycobacterium tuberculosis complex. J Clin Microbiol 32:3070-3071.

115. **Groenen P.M., A.E. Bunschoten, D. van Soolingen, J.D. van Embden.** 1993. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of Mycobacterium tuberculosis; application for strain differentiation by a novel typing method. Mol Microbiol. 10:1057-1065.

116. **Guernier V., C. Sola, K. Brudey, J.F. Guegan, N. Rastogi.** 2008. Use of cluster-graphs from spoligotyping data to study genotype similarities and a comparison of three indices to quantify recent tuberculosis transmission among culture positive cases in French Guiana during a eight year period. BMC Infect Dis 8:46.

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

118. **Gutacker M.M., J.C. Smoot, C.A. Migliaccio, S.M. Ricklefs, S. Hua, D.V. Cousins, E.A. Graviss, E. Shashkina, B.N. Kreiswirth, J.M. Musser.** 2002. Genome-wide analysis of synonymous single nucleotide polymorphisms in Mycobacterium tuberculosis complex organisms: resolution of genetic relationships among closely related microbial strains. Genetics. 162:1533-1543.

119. **Haas W.H., G. Bretzel, B. Amthor, K. Schilke, G. Krommes, S. Rüsch-Gerdes, V. Sticht-Groh, H.J. Bremer.** 1997. Comparison of DNA fingerprint patterns of isolates of Mycobacterium africanum from east and west Africa. J Clin Microbiol. 35:663-666.

120. **Haddad M.B., T.W. Wilson, K. Ijas, S.M. Marks, M. Moore.** 2005. Tuberculosis and Homelessness in the United States 1994-2003. JAMA 293:2762-2766.

121. **Hanekom M., G.D. van der Spuy, N.C. Gey van Pittius, C.R. McEvoy, S.L. Ndabambi, T.C. Victor, E.G. Hoal, P.D. van Helden, R.M. Warren.** 2007. Evidence that the spread of Mycobacterium tuberculosis strains with the Beijing genotype is human population dependent. J Clin Microbiol. 45:2263-2266.

122. **Hawkey P.M., E.G. Smith, J.T. Evans, P. Monk, G. Bryan, H.H. Mohamed, M. Bardhan, R.N. Pugh.** 2003. Mycobacterial interspersed repetitive unit typing of Mycobacterium tuberculosis compared to IS6110-based restriction fragment length polymorphism analysis for investigation of apparently clustered cases of tuberculosis. J Clin Microbiol 41:3514-3520.

123. **Hazbon M.H., M. Brimacombe, M. Bobadilla del Valle, M. Cavatore, M.I. Guerrero, M. Varma-Basil, H. Billman-Jacobe, C. Lavender, J. Fyfe, L. Garcia-Garcia, C.I. Leon, M. Bose, F. Chaves, M. Murray, K.D. Eisenach, J. Sifuentes-Osornio, M.D. Cave, A. Ponce de Leon, D. Alland.** 2006. Population genetics study of isoniazid resistance mutations and evolution of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis. Antimicrob Agents Chemother 50:2640-2649.

124. **Hecquet V.** 2005. L'espace des Caraïbes : Structures et enjeux économiques au début des années 2000 [en ligne]. Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques. 31 p. [Consulté en juin 2010].
http://www.insee.fr/fr/insee_regions/martinique/themes/cahiers/espaceCaraibe/CAG_caraibe.pdf

125. **Helb D., M. Jones, E. Story, C. Boehme, E. Wallace, K. Ho, J. Kop, M.R. Owens, R. Rodgers, P. Banada, H. Safi, R. Blakemore, N.T Lan, E.C. Jones-López, M. Levi, M. Burday, I. Ayakaka, R.D. Mugerwa, B. McMillan, E. Winn-Deen, L. Christel, P. Dailey, M.D. Perkins, D.H. Persing, D. Alland.** 2010. Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology. J Clin Microbiol. 48:229-2237.

126. **Hermans P.W.M., F. Messadi, H. Guebrexhaber, D. van Soolingen, P.E.W. de Haas, H. Heersma, H. de Neeling, A. Ayoub, F. Portaels, D. Frommel, M. Zribi, J.D.A. van Embden.** 1995. Analysis of the Population Structure of Mycobacterium tuberculosis in Ethiopia, Tunisia and the Netherlands: usefulness of DNA Typing for Global Tuberculosis Epidemiology. J. Infect. Dis. 171:1504-1513.

127. **Hermans P.W.M., D. van Soolingen, E.M. Bik, P.E.W. de Haas, J.W. Dale, J.D.A. van Embden.** 1991. Insertion element IS987 from Mycobacterium bovis BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in Mycobacterium tuberculosis complex strains. Infect. and Immun. 59:2695-2701.

128. **Hermans P.W.M., D. van Soolingen, J.W. Dale, A.R. Schuitema, R.A. McAdam, D. Catty, J.D.A. van Embden.** 1990. Insertion element IS986 from Mycobacterium tuberculosis: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. J Clin Microbiol 28:2051-8. Holmes C.B., H. Hausler, P. Nunn. 1998. A review of sex differences in the epidemiology of tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis. 2:96-104.

129. **Hirsh A.E., A.G. Tsolaki, K. DeRiemer, M.W. Feldman, P.M. Small.** 2004. Stable association between strains of Mycobacterium tuberculosis and their human host populations. Proc Natl Acad Sci USA. 101:4871-4876.

130. **Honoré N., S.T. Cole.** 1994. Streptomycin resistance in mycobacteria. Antimicrob Agents Chemother. 38:238-242.

131. **Huart D. 2004. Panorama de l'espace Caraïbe** 2004 [en ligne]. Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques. 208 p. [Consulté en juin 2010]. http://www.insee.fr/fr/themes/document.asp?reg_id=26&ref_id=14460

132. **Hudelson P.** 1996. Gender differentials in tuberculosis: the role of socio-economic and cultural factors. Tuber Lung Dis 77:391-400.

133. **Hunter P.R., M.A. Gaston.** 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. J Clin Microbiol. 26:2465-2466.

134. **Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques (Insee).** 2010. Antiane Eco n°72 [en ligne].]. Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques. 44 p. [consulté en octobre 2010]. http://www.insee.fr/fr/insee_regions/guyane/themes/antiane/AE72/AE72.pdf

135. **Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques (Insee).** 2006. Atlas des populations immigrées en Guadeloupe [en ligne]. Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques. 31 p. [consulté en octobre 2010]. http://www.insee.fr/fr/insee_regions/guadeloupe/themes/etudes_detaillees/atlasimmigres/atlas_immigres_ga.pdf

136. **Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques (Insee).** 2006. Atlas des populations immigrées en Guyane [en ligne]. Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques. 21 p. [consulté en octobre 2010]. http://www.insee.fr/fr/insee_regions/guyane/themes/etudes_detaillees/atlas_immig/atlas_immigres_gy.pdf

137. **Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques (Insee).** 2006. Atlas des populations immigrées en Martinique [en ligne]. Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques. 24 p. [consulté en octobre 2010]. http://www.insee.fr/fr/insee_regions/martinique/themes/etudes_detaillees/atlasimmigres/atlas_immigres_ma.pdf

138. **Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques (Insee).** 2009. Les inégalités aux Antilles Guyane : Dix ans d'évolution [en ligne]. Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques. 31 p. [consulté en octobre 2010]. http://www.insee.fr/fr/insee_regions/guadeloupe/themes/etudes_detaillees/inegalitesAG/inegalitesAG.pdf

139. **Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques (Insee).** 2010. Insee Guadeloupe - Présentation de la région [en ligne]. Site Internet de l'Insee [consulté en octobre 2010]. http://www.insee.fr/fr/regions/guadeloupe/default.asp?page=faitsetchiffres/faitsetchiffres.htm

140. **Institut National de Veille Sanitaire.** 2010. Tableaux Economiques Régionaux 2009-2010 [en ligne]. Institut National de Veille Sanitaire. 171 p. [Consulté en juin 2010]. http://www.insee.fr/fr/insee_regions/guadeloupe/themes/ter/ter2010/ter_2010_version_integrale.pdf

141. **Iwamoto T., S. Yoshida, K. Suzuki, M. Tomita, R. Fujiyama, N. Tanaka, Y. Kawakami, M. Ito.** 2007. Hypervariable loci that enhance the discriminatory ability of newly proposed 15-loci and 24-loci variable-number tandem repeat typing method on Mycobacterium tuberculosis strains predominated by the Beijing family. FEMS Microbiol Lett 270:67-74.

142. **Joseph P., P. Severe, S. Ferdinand, K.S. Goh, C. Sola, D.W. Haas, W.D. Johnson, N. Rastogi, J.W. Pape, D.W. Fitzgerald.** 2006. Multidrug-resistant tuberculosis at an HIV testing center in Haiti. Aids. 20:415-418.

143. **Kam K.M., C.W. Yip, L.W. Tse, K.L. Leung, K.L. Wong, W.M. Ko, W.S. Wong.** 2006. Optimization of variable number tandem repeat typing set for differentiating Mycobacterium tuberculosis strains in the Beijing family. FEMS Microbiol Lett. 256:258-265.

144. **Kamerbeek J., L. Schouls, A. Kolk, M. van Agterveld, D. van Soolingen, S. Kuijper, A. Bunschoten, H. Molhuizen, R. Shaw, M. Goyal, and J. van Embden.** 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium tuberculosis for diagnosis and epidemiology. J Clin Microbiol. 35:907-914.

145. **Kapur V., T.S. Whittam, J.M. Musser.** 1994. Is Mycobacterium tuberculosis 15000 old ? J Infect Dis 170:1349-1350.

146. **Khue P.M., C. Truffot-Pernot, J. Texier-Maugein, V. Jarlier, J. Robert.** 2007. A 10-year prospective surveillance of Mycobacterium tuberculosis drug resistance in France 1995-2004. Eur Respir J. 30:937-944.

147. **Konno K., F.M. Feldmann, W. McDermott.** 1967. Pyrazinamide susceptibility and amidase activity of tubercle bacilli. Am Rev Respir Dis. 95:461-469.

148. **Korbel, D.S., B.E. Schneider, U.E. Schaible.** 2008. Innate immunity in tuberculosis: myths and truth. Microbes Infect. 10:995-1004.

149. **Kovalev S.Y., E.Y. Kamaev, M.A. Kravchenko, N.E. Kurepina, S.N. Skorniakov.** 2005. Genetic analysis of mycobacterium tuberculosis strains isolated in Ural region, Russian Federation, by MIRU-VNTR genotyping. Int J Tuberc Lung Dis. 9:746-752.

150. **Kremer K., J.R. Glynn, T. Lillebaek, S. Niemann, N.E. Kurepina, B.N. Kreiswirth, P.J. Bifani, D. van Soolingen.** 2004. Definition of the Beijing/W lineage of Mycobacterium tuberculosis on the basis of genetic markers. J Clin Microbiol. 42:4040-4049.

151. **Kremer K, M.J. van-der-Werf, B.K. Au, D.D. Anh, K.M Kam, H.R. van-Doorn, M.W. Borgdorff, D. van-Soolingen.** 2009. Vaccine-induced immunity circumvented by typical Mycobacterium tuberculosis Beijing strains. Emerg Infect Dis. 15:335-339.

152. **Kremer K., D. van Soolingen, R. Frothingham, W.H. Haas, P.W. Hermans, C. Martin, Palittapongarnpim P, Plikaytis B.B., Riley L.W., Yakrus M.A., Musser J.M., van Embden J.D.** 1999. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of Mycobacterium tuberculosis complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. J Clin Microbiol. 37:2607-2618.

153. **Kritski A., F.A. Fiuza de Melo.** 2007. Tuberculosis in Adults. In J.C. Palomino (éd.), S.C. Leao (éd.), and V. Ritacco (éd.). Tuberculosis 2007. From basic science to patient care. [Disponible sur : www.TuberculosisTextbook.com].

154. **Kuaban C., R. Bercion, J. Noeske, P. Cunin, P. Nkamsse, N.S. Ngo.** 2000. Anti-tuberculosis drug resistance in Western province of Cameroons. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 4:356–360.

155. **Kubica T., S. Rusch-Gerdes, S. Niemann.** 2003. Mycobacterium bovis subsp. caprae caused one-third of human M. bovis-associated tuberculosis cases reported in Germany between 1999 and 2001. J Clin Microbiol. 41:3070-3077.

156. **Kurepina N.E., S. Sreevatsan, B.B. Plikaytis, P.J. Bifani, N.D. Connell, R.J. Donnelly, D. van Sooligen, J.M. Musser, B.N. Kreiswirth BN.** 1998. Characterization of the phylogenetic distribution and chromosomal insertion sites of five IS6110 elements in Mycobacterium tuberculosis: non-random integration in the dnaA-dnaN region. Tuber Lung Dis. 79:31-42.

157. **Kwara A., R. Schiro, L.S. Cowan, N.E. Hyslop, M.F. Wiser, S. Roahen Harrison, P. Kissinger, L. Diem, J.T. Crawford.** 2003. Evaluation of the epidemiologic utility of secondary typing methods for differentiation of Mycobacterium tuberculosis isolates. J Clin Microbiol 41:2683-2685.

158. **Lan N.T., H.T. Lien, B. Tung le, M.W. Borgdorff, K. Kremer, D. van Soolingen.** 2003. Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype and risk for treatment failure and relapse, Vietnam. Emerg Infect Dis. 9:1633-1635.

159. **Lantos A., S. Niemann, L. Mezosi, E. Sos, K. Erdelyi, S. David, L.M. Parsons, T. Kubica, S. Rusch-Gerdes, A. Somoskovi.** 2003. Pulmonary tuberculosis due to Mycobacterium bovis subsp. caprae in captive Siberian tiger. Emerg Infect Dis. 9:1462-1464.

160. **Lari N., L. Rindi, R. Cristofani, N. Rastogi, E. Tortoli, C. Garzelli.** 2009. Association of Mycobacterium tuberculosis complex isolates of BOVIS and Central Asian (CAS) genotypic lineages with extrapulmonary disease. Clin Microbiol Infect. 15:538-543.

161. **Lasunskaia E., S.C. Ribeiro, O. Manicheva, L.L. Gomes, P.N. Suffys, I. Mokrousov, L. Ferrazoli, M.R. Andrade, A. Kritski, T. Otten, T.L. Kipnis, W.D. da Silva, B. Vishnevsky, M.M. Oliveira, H.M. Gomes, I.F. Baptista, O. Narvskaya.** 2010. Emerging multidrug resistant Mycobacterium tuberculosis strains of the Beijing genotype circulating in Russia express a pattern of biological properties associated with enhanced virulence. Microbes Infect. 12:467-475.

162. **Le Fleche P., M. Fabre, F. Denoeud, J.L. Koeck, G. Vergnaud.** 2002. High resolution, on-line identification of strains from the Mycobacterium tuberculosis complex based on tandem repeat typing. BMC Microbiol. 2:37.

163. **Lobue P., D. Menzies.** 2010. Treatment of latent tuberculosis infection: An update. Respirology. 15:603-622.

164. **Lönnroth, K., E. Jaramillo, B.G. Williams, C. Dye, and M. Raviglione.** 2009. Drivers of tuberculosis epidemics: the role of risk factors and social determinants. Soc Sci Med. 68:2240-2246.

165. **Louw G.E., R.M. Warren, P.R. Donald, M.B. Murray, M. Bosman, P.D. Van Helden, D.B. Young, T.C. Victor.** 2006. Frequency and implications of pyrazinamide resistance in managing previously treated tuberculosis patients. Int J Tuberc Lung Dis. 10:802-807.

166. **Lukacs J., V. Tubak, J. Mester, S. David, Z. Bartfai, T. Kubica, S. Niemann, A. Somoskovi.** 2004. Conventional and Molecular Epidemiology of Tuberculosis in Homeless Patients in Budapest, Hungary. J Clin Microbiol. 42:5931-5934.

167. **Lutfey M., P. Della-Latta, V. Kapur, L.A. Palumbo, D. Gurner, G. Stotzky, K. Brudney, J. Dobkin, A. Moss, J.M. Musser, B.N. Kreiswirth.** 1996. Independent origin of mono-rifampin-resistant Mycobacterium tuberculosis in patients with AIDS. Am J Respir Crit Care Med 153:837-840.

168. **Maeda S., T. Wada, T. Iwamoto, Y. Murase, S. Mitarai, I. Sugawara, S. Kato.** 2010. Beijing family Mycobacterium tuberculosis isolated from throughout Japan: phylogeny and genetic features. Int J Tuberc Lung Dis. 14:1201-1204.

169. **Magdalena J, Supply P, Locht C.** 1998a. Specific differentiation between Mycobacterium bovis BCG and virulent strains of the Mycobacterium tuberculosis complex. J Clin Microbiol 36:2471-2476.

170. **Magdalena J, Vachée A, Supply P, Locht C.** 1998b. Identification of a new DNA region specific for members of Mycobacterium tuberculosis complex. J Clin Microbiol 36:937-943.

171. **Manabe Y. C., and W.R. Bishai**. 2000. Latent Mycobacterium tuberculosis persistence, patience, and winning by waiting. Nat. Med. 6:1327-1329

172. **Marais B.J., A. Gupta, J.R. Starke, A. El Sony.** 2010. Tuberculosis in women and children. Lancet. May 18.

173. **Mariani F., E. Piccolella, V. Colizzi, R. Rappuoli, R. Gross.** 1993. Characterization of an IS-like element from Mycobacterium tuberculosis. J Gen Microbiol; 139:1767-1772.

174. **Marttila H.J., H. Soini, E. Eerola, E. Vyshnevskaya, B.I. Vyshnevskiy, T.F. Otten, A.V. Vasilyef, M.K. Viljanen.** 1998. A Ser315Thr substitution in KatG is predominant in genetically heterogeneous multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates originating from the St. Petersburg area in Russia. Antimicrob. Agents Chemother. 42:2443-2445.

175. **Marttila H.J., H. Soini, P. Huovinen, M.K. Viljanen.** 1996. katG mutations in isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates recovered from Finnish patients. Antimicrob. Agents Chemother 40:2187-2189.

176. **Mathema B., N.E. Kurepina, P.J. Bifani, B.N. Kreiswirth.** 2006. Molecular epidemiology of tuberculosis: current insights. Clin Microbiol Rev. 19:658-685.

177. **Maus C.E., B.B. Plikaytis, T.M. Shinnick.** 2005. Mutation of tlyA confers capreomycin resistance in Mycobacterium tuberculosis. Antimicrob Agents Chemother. 49:571-577.

178. **Mazars E., S. Lesjean, A.L. Banuls, M. Gilbert, V. Vincent, B. Gicquel, M. Tibayrenc, C. Locht, P. Supply.** 2001. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of Mycobacterium tuberculosis molecular epidemiology. PNAS. 98:1901-1906.

179. **McHugh T.D., and S.H. Gillespie.** 1998. Nonrandom association of IS6110 and Mycobacterium tuberculosis: implications for molecular epidemiological studies. J Clin Microbiol 36:1410-1413.

180. **Menner N., I. Günther, H. Orawa, A. Roth, I. Rambajan, J. Wagner, H. Hahn, S. Persaud, R. Ignatius.** 2005. High frequency of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates in Georgetown, Guyana. Trop Med Int Health. 10:1215-1218.

181. **Meyer C.G., G. Scarisbrick, S. Niemann, E.N. Browne, M.A. Chinbuah, J. Gyapong, I. Osei, E. Owusu-Dabo, T. Kubica, S. Rüsch-Gerdes, T. Thye, R.D. Horstmann.** 2008. Pulmonary tuberculosis: virulence of Mycobacterium africanum and relevance in HIV co-infection. Tuberculosis. 88: 482-489.

182. **Millet J., S. Baboolal, P.E. Akpaka, D. Ramoutar, N. Rastogi.** 2009. Phylogeographical and molecular characterization of an emerging Mycobacterium tuberculosis clone in Trinidad and Tobago. Infect Genet Evol. 9:1336-1344.

183. **Mokrousov I.** 2008. Genetic geography of Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype: A multifacet mirror of human history? Infect Genet Evol 8:777-785.

184. **Mokrousov I., H.M. Ly, T. Otten, N.N. Lan, B. Vyshnevskyi, S. Hoffner, O. Narvskaya.** 2005. Origin and primary dispersal of the Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype: clues from human phylogeography. Genome Res. 15:1357-1364.

185. **Mokrousov I, O. Narvskaya, E. Limeschenko,A. Vyazovaya, T. Otten, B. Vyshnevskiy.** 2004. Analysis of the Allelic Diversity of the Mycobacterial Interspersed Repetitive Units in Mycobacterium tuberculosis Strains of the Beijing Family: Practical Implications and Evolutionary Considerations. J. Clin. Microbiol. 42:2438-2444.

186. **Mokrousov I., O. Narvskaya, T. Otten, E. Limeschenko, L. Steklova, B. Vyshnevskiy.** 2002. High prevalence of KatG Ser315Thr substitution among isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates from northwestern Russia, 1996 to 2001. Antimicrob Agents Chemother. 46:1417-1424.

187. **Mokrousov I., O. Narvskaya, T. Otten, A. Vyazovaya, E. Limeschenko, L. Steklova, B. Vyshnevskyi.** 2002. Phylogenetic reconstruction within Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype in northwestern Russia. Res Microbiol. 153:629-637.

188. **Molina-Torres C.A., E. Moreno-Torres, J. Ocampo-Candiani, A. Rendon, K. Blackwood, K. Kremer, N. Rastogi, O. Welsh, L. Vera-Cabrera.** 2010. Mycobacterium tuberculosis spoligotypes in Monterrey, Mexico. J Clin Microbiol 48:448-455.

189. **Montoro E., R Rodriguez.** 2007. Global Burden of Tuberculosis. In J.C. Palomino (éd.), S.C. Leao (éd.), and V. Ritacco (éd.). Tuberculosis 2007. From basic science to patient care. [Disponible sur : www.TuberculosisTextbook.com].

190. **Morlock G.P., B. Metchock, D. Sikes, J.T. Crawford, R.C. Cooksey.** 2003. ethA, inhA, and katG loci of ethionamide-resistant clinical Mycobacterium tuberculosis isolates. Antimicrob Agents Chemother. 47:3799-3805.

191. **Mostowy S., M.A. Behr.** 2005. The origin and evolution of Mycoabcterium tuberculosis. Clin Chest Med. 26:207-216.

192. **Mostowy S., A. Onipede, S. Gagneux, S. Niemann, K. Kremer, E.P. Desmond, M. Kato-Maeda, M. Behr.** 2004. Genomic analysis distinguishes Mycobacterium africanum. J Clin Microbiol 42:3594-3599.

193. **Moyo S., S. Verver, H. Mahomed, A. Hawkridge, M. Kibel, M. Hatherill, M. Tameris, H. Geldenhuys, W. Hanekom, G. Hussey .** 2010. Age-related tuberculosis incidence and severity in children under 5 years of age in Cape Town, South Africa. Int J Tuberc Lung Dis. 14:149-154.

194. **Murase Y., S. Mitarai, I. Sugawara, S. Kato, S. Maeda.** 2008. Promising loci of variable numbers of tandem repeats for typing Beijing family Mycobacterium tuberculosis. J Med Microbiol. 57:873-880.

195. **Murray M., D. Alland.** 2002. Methodological problems in the molecular epidemiology of tuberculosis. Am J Epidemiol. 155:565-571.

196. **Musser J.M., A. Amin, S. Ramaswamy.** 2000. Negligible genetic diversity of Mycobacterium tuberculosis host immune system protein targets: evidence of limited selective pressure. Genetics. 155: 7-16

197. **Musser J.M., V. Kapur, D.L. Williams, B.N. Kreiswirth, D. van Soolingen, J.D. van Embden.** 1996. Characterization of the catalase-peroxidase gene (katG) and inhA locus in isoniazid-resistant and -susceptible strains of Mycobacterium tuberculosis by automated DNA sequencing: restricted array of mutations associated with drug resistance. J Infect Dis. 173:196-202.

198. **Nair J., D.A. Rouse, G.H. Bai, S.L. Morris.** 1993. The rpsL gene and streptomycin resistance in single and multiple drug-resistant strains of Mycobacterium tuberculosis. Mol Microbiol. 10:521-527.

199. **Narvskaya O., I. Mokrousov, T. Otten, B. Vishnevsky.** 2005. Molecular markers: application for studies of Mycobacterium tuberculosis population in Russia. In M. M. Read (éd.). Trends in DNA fingerprinting research. New York, NY: Nova Science Publishers, Inc. p.111–125.

200. **Narvskaya O., T. Otten, E. Limeschenko, N. Sapozhnikova, O. Graschenkova, L. Steklova, A. Nikonova, M. L. Filipenko, I. Mokrousov, and B. Vyshnevskiy.** 2002. Nosocomial outbreak of multidrug-resistant tuberculosis caused by a strain of Mycobacterium tuberculosis W-Beijing family in St. Petersburg, Russia. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 21:596–602.

201. **Neyrolles O., L. Quintana-Murci.** 2009. Sexual inequality in tuberculosis. PLoS Med. 6:e1000199.

202. **Niemann S., E. Richter, H. Dalugge-Tamm, H. Schlesinger, D. Graupner, B. Konigstein, G. Gurath, U. Greinert, S. Rusch-Gerdes.** 2000. Two cases of Mycobacterium microti derived tuberculosis in HIV-negative immunocompetent patients. Emerg Infect Dis. 6:539-542.

203. **Niobe-Eyangoh S.N., C. Kuaban, P. Sorlin, J. Thonnon, V. Vincent, M.C. Gutierrez.** 2004. Molecular characteristics of strains of the Cameroon family, the major group of Mycobacterium tuberculosis in a country with a high prevalence of tuberculosis. J. Clin. Microbiol. 42:5029–5035.

204. **Odhiambo J.A., M.W. Borgdorff, F.M. Kiambih, D.K. Kibuga, D.O. Kwamanga, L. Ng'ang'a, R. Agwanda, N.A. Kalisvaart, O. Misljenovic, N.J. Nagelkerke, M. Bosman.** 1999. Tuberculosis and the HIV epidemic: increasing annual risk of tuberculous infection in Kenya, 1986-1996. Am J Public Health. 89:1078-1082.

205. **O'Reilly L.M., C.J. Daborn.** 1995. The epidemiology of Mycobacterium bovis infections in animals and man: a review. Tuber Lung Dis. 76 Suppl 1:1-46.

206. **Park Y.K., G.H. Bai, S.J. Kim.** 2000. Restriction fragment length polymorphism analysis of Mycobacterium tuberculosis isolated from countries in the Western Pacific Region. J. Clin. Microbiol. 38:191–197.

207. **Park Y.K., S. Shin, S. Ryu, S.N. Cho, W.J. Koh, O.J. Kwon, Y.S. Shim, W.J. Lew, G.H. Bai.** 2005. Comparison of drug resistance genotypes between Beijing and non-Beijing family strains of Mycobacterium tuberculosis in Korea. J. Microbiol. Methods. 63:165–172.

208. **Parwati I., R. van Crevel, D. van Soolingen.** 2010. Possible underlying mechanisms for successful emergence of the Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype strains. Lancet Infect Dis 10:103-111.

209. **Perdigao J., R. Macedo, A. Malaquias, A. Ferreira, L. Brum, I. Portugal.** 2009. Genetic analysis of extensively drug-resistant Mycobacterium tuberculosis strains in Lisbon, Portugal. J Antimicrob Chemother. 65:224-227.

210. **Peto H.M., R.H. Pratt, T.A. Harrington, P.A. LoBue, L.R. Armstrong.** 2009. Epidemiology of extrapulmonary tuberculosis in the United States, 1993-2006. Clin Infect Dis. 49:1350-1357.

211. **Pfyffer G.E., A. Strassle, T. van Gorkum, F. Portaels, L. Rigouts, C. Mathieu, F. Mirzoyev, H. Traore, J.D. van Embden.** 2001. Multidrug-resistant tuberculosis in prison inmates, Azerbaijan. Emerg Infect Dis. 7:855-861.

212. **Pison G.** 2007. Institut national d'études démographiques - Population et sociétés. Tous les pays du monde [en ligne], juillet-août 2007, n. 436. p.1-8. [Consulté en juin 2010]. http://www.ined.fr/fichier/t_publication/1318/publi_pdf1_436.pdf

213. **Plikaytis B.B., J.L. Marden, J.T. Crawford, C.L. Woodley, W.R. Butler, T.M. Shinnick.** 1994. Multiplex PCR assay specific for the multidrug-resistant strain W of Mycobacterium tuberculosis. J Clin Microbiol 32:1542-1546

214. **Portugal I., L. Barreiro, J. Moniz-Pereira, L. Brum.** 2004. pncA mutations in pyrazinamide-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates in Portugal. Antimicrob Agents Chemother. 48:2736-2738.

215. **Prodinger W.M.** 2007. Molecular epidemiology of tuberculosis: toy or tool? A review of the literature and examples from Central Europe. Wien Klin Wochenschr. 119:80-89.

216. **Prodinger W.M.,** A. Eigentler, F. Allerberger, M. Schonbauer and W. Glawischnig. 2002. Infection of red deer, cattle, and humans with Mycobacterium bovis subsp. caprae in western Austria. J Clin Microbiol 40:2270-2272.

217. **Qian L., C. Abe, T. P. Lin, M. C. Yu, S. N. Cho, S. Wang, J. T. Douglas.** 2002. rpoB genotypes of Mycobacterium tuberculosis Beijing family isolates from East Asian countries. J. Clin. Microbiol. 40:1091–1094.

218. **Rahim Z., K. Zaman, A.G. van der Zanden, M.J. Möllers, D. van Soolingen, R. Raqib, K. Zaman, V. Begum, L. Rigouts, F. Portaels, N. Rastogi, C. Sola.** 2007. Assessment of population structure and major circulating phylogeographical clades of Mycobacterium tuberculosis complex in Bangladesh suggests a high prevalence of a specific subclade of ancient M. tuberculosis genotypes. J Clin Microbiol. 45:3791-3794.

219. **Ramaswamy S., J.M. Musser.** 1998. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in Mycobacterium tuberculosis: 1998 update. Tuber Lung Dis. 79:3-29.

220. **Ramaswamy S.V., R. Reich, S.J. Dou, L. Jasperse, X. Pan, A. Wanger, T. Quitugua, E.A. Graviss.** 2003. Single nucleotide polymorphisms in genes associated with isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis. Antimicrob Agents Chemother. 47:1241-1250.

221. **Rastogi N., C. Sola.** 2007. Molecular Evolution of the Mycobacterium tuberculosis Complex. In Palomino, J.C. (éd.), Leão, S.C. (éd.), Ritacco, V. (éd.). Tuberculosis 2007 – from basic science to patient care. TuberculosisTextbook.com p.53-92.

222. **Romanus V.** 2004. The Swedish Tuberculosis Index 2001 and 2002. 1ère edition. Stockholm: Swedish Institute for Infectious Disease Control and the Swedish Heart Lung Fondation. Victoria Romanus (éd.) 53p.

223 **Romeyn J.A.** 1970. Exogenous reinfection in tuberculosis. Am. Rev. Respir. Dis. 101:923-927.

224. **Roring S., A. Scott, D. Brittain, I. Walker, G. Hewinson, S. Neill, R. Skuce.** 2002. Development of variable-number tandem repeat typing of Mycobacterium bovis: comparison of results with those obtained by using existing exact tandem repeats and spoligotyping. J. Clin. Microbiol. 40:2126–2133.

225. **Russell D.G.** 2007. Who puts the tubercle in tuberculosis? Nat Rev Microbiol.5:39-47.

226. **Saltini C.** 2006. Chemotherapy and diagnosis of tuberculosis. Respir Med 100:2085-2097.

227. **Savine E., R.M. Warren, G.D. Van Der Spuy, N. Beyers, P.D. Van Helden, C. Locht, P. Supply.** 2002. Stability of Variable-Number Tandem Repeats of Mycobacterial Interspersed Repetitive Units from 12 Loci in Serial Isolates of Mycobacterium tuberculosis. J. Clin. Microbiol. 40:4561-4566.

228. **Scorpio A., P. Lindholm-Levy, L. Heifets, R. Gilman, S. Siddiqi, M. Cynamon, Y. Zhang.** 1997. Characterization of pncA mutations in pyrazinamide-resistant Mycobacterium tuberculosis. Antimicrob Agents Chemother. 41:540-543.

229 **Scott A.N., D. Menzies, T.N. Tannenbaum, L. Thibert, R. Kozak, L. Joseph, K. Schwartzman, M.A. Behr.** 2005. Sensitivities and specificities of spoligotyping and mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing methods for studying molecular epidemiology of tuberculosis.J ClinMicrobiol 43:89-94.

230. **Sebek M.** 2000. DNA fingerprinting and contact investigation. Int J Tuberc Lung Dis. 4:S45-S48

231. **Sherman D.R., K. Mdluli, M.J. Hickey, T.M. Arain, S.L. Morris, C.E. Barry 3rd, C.K. Stover.** 1996. Compensatory ahpC gene expression in isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis. Science. 272:1641-1643.

232. **Shirai C.** 2002. Tuberculosis control in Kobe City--analyses of advisory contents and disqualified cases by integrated tuberculosis advisory committee. Kekkaku. 77:555-561.

233. **Skuce R.A., T.P. McCorry, J.F. McCarroll, S.M. Roring, A.N. Scott, D. Brittain, S.L. Hughes, R.G. Hewinson, S.D. Neill.** 2002. Discrimination of Mycobacterium tuberculosis complex bacteria using novel VNTR-PCR targets. Microbiology. 148:519–528.

234. **Slayden R.A., C.E. Barry 3rd.** 2000. The genetics and biochemistry of isoniazid resistance in mycobacterium tuberculosis. Microbes Infect. 2:659-669.

235. **Small P.M., P.C. Hopewell, S.P. Singh, A. Paz, J. Parsonnet, D.C. Ruston, G.F. Schecter, C.L. Daley, G.K. Schoolnik.** 1994. The epidemiology of tuberculosis in San Francisco. A population-based study using conventional and molecular methods. N. Eng. J. Med. 330:1703-1709.

236. **Small P.M., and J.D.A. van Embden.** 1994. Molecular epidemiology. In Bloom, B.R. (éd.). Tuberculosis: Pathogenesis, Protection, and Control. American Society for Microbiology, Washington DC. p. 569-582.

237. **Smittipat N., P. Palittapongarnpim.** 2000. Identification of possible loci of variable number of tandem repeats in Mycobacterium tuberculosis. Tuber Lung Dis 80:69-74.

238. **Sola C., I. Filliol, M.C. Gutierrez, I. Mokrousov, V. Vincent, N. Rastogi.** 2001. Spoligotype database of Mycobacterium tuberculosis: biogeographic distribution of shared types and epidemiologic and phylogenetic perspectives. Emerg Infect Dis. 7:390-396.

239. **Sola C., I. Filliol, E. Legrand, S. Lesjean, C. Locht, P. Supply, N. Rastogi.** 2003. Genotyping of the Mycobacterium tuberculosis complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics. Infect Genet Evol. 3:125-133.

240. **Sola C., I. Filliol, E. Legrand, I. Mokrousov, N. Rastogi.** 2001. Mycobacterium tuberculosis phylogeny reconstruction based on combined numerical analysis with IS1081, IS6110, VNTR, and DR-based spoligotyping suggests the existence of two new phylogeographical clades. J Mol Evol. 53:680-689.

241. **Spigelman M.K.** 2007. New tuberculosis therapeutics: a growing pipeline. J Infect Dis. 196(Supl1).

242. **Sreevatsan S., X. Pan, K.E. Stockbauer, N.D. Connell, B.N. Kreiswirth, T.S. Whittam, J.M. Musser.** 1997. Restricted structural gene polymorphism in the Mycobacterium tuberculosis complex indicates evolutionarily recent global dissemination. Proc Natl Acad Sci USA. 94:9869-9874.

243. **Sreevatsan S., X. Pan, Y. Zhang, V. Deretic, J.M. Musser.** 1997. Analysis of the oxyR-ahpC region in isoniazid-resistant and -susceptible Mycobacterium tuberculosis complex organisms recovered from diseased humans and animals in diverse localities. Antimicrob Agents Chemother. 41:600-606.

244. **Sreevatsan S., X. Pan, Y. Zhang, B.N. Kreiswirth, J.M. Musser.** 1997. Mutations associated with pyrazinamide resistance in pncA of Mycobacterium tuberculosis complex organisms. Antimicrob Agents Chemother. 41:636-640.

245. **Sreevatsan S., K.E. Stockbauer, X. Pan, B.N. Kreiswirth, S.L. Moghazeh, W.R. Jacobs, Jr., A. Telenti, J.M. Musser.** 1997. Ethambutol resistance in Mycobacterium tuberculosis: critical role of embB mutations. Antimicrob Agents Chemother. 41:1677-1681.

246. **Stead W.W.** 1967. Pathogenesis of a first episode of chronic pulmonary tuberculosis in man: recrudescence of residuals of the primary infection or exogenous reinfection? Am. Rev. Respir. Dis. 95:729-745.

247. **Streicher E.M., T.C. Victor, G. van der Spuy, C. Sola, N. Rastogi, P.D. van Helden, R.M. Warren.** 2007. Spoligotype signatures in Mycobacterium tuberculosis Complex. J Clin Microbiol 25:237-240.

248. **Streicher E.M., R.M. Warren, C. Kewlwy, J. Simpson, N. Rastogi, C. Sola, G.D. van der Spuy, P.D. van Helden, T.C. Victor.** 2004. Genotypic and phenotypic characterization of drug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from rural districts of the Western Cape Province of South Africa.J. Clin. Microbiol. 42:891–894.

249. **Sun Z., J. Zhang, X. Zhang, S. Wang, Y. Zhang, C. Li.** 2008. Comparison of gyrA gene mutations between laboratory-selected ofloxacin-resistant Mycobacterium tuberculosis strains and clinical isolates. Int J Antimicrob Agents. 31:115-121.

250. **Supply P., C. Allix, S. Lesjean, M. Cardoso-Oelemann, S. Rusch-Gerdes, E. Willery, E. Savine, P. de Haas, H. van Deutekom, S. Roring, P. Bifani, N. Kurepina, B. Kreiswirth, C. Sola, N. Rastogi, V. Vatin, M.C. Gutierrez, M. Fauville, S. Niemann, R. Skuce, K. Kremer, C. Locht, D. van Soolingen.** 2006. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit variable-number tandem repeat typing of Mycobacterium tuberculosis. J. Clin Microbiol. 44:4498–4510.

251. **Supply P., S. Lesjean, E. Savine, K. Kremer, D. van Soolingen, C. Locht.** 2001. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of Mycobacterium tuberculosis based on mycobacterial interspersed repetitive units. J. Clin. Microbiol. 39:3563–3571.

252. **Supply P., J. Magdalena, S. Himpens, C. Locht.** 1997. Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component system operon. Mol Microbiol 26:991-1003.

253. **Supply P., E. Mazars, S. Lesjean, V. Vincent, B. Gicquel, C. Locht.** 2000. Variable human minisatellite-like regions in the Mycobacterium tuberculosis genome. Mol Microbiol. 36:762-771.

254. **Supply P., R.M. Warren, A.L. Banuls, S. Lesjean, G.D. Van Der Spuy, L.A. Lewis, M. Tibayrenc, P.D. Van Helden, C. Locht.** 2003. Linkage disequilibrium between minisatellite loci supports clonal evolution of Mycobacterium tuberculosis in a high tuberculosis incidence area. Mol Microbiol. 47:529-538.

255. **Takayama K., J.O. Kilburn.** 1989. Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in Mycobacterium smegmatis. Antimicrob Agents Chemother. 33:1493.1499.

256. **Takiff H.E., L. Salazar, C. Guerrero, W. Philipp, W.M. Huang, B. Kreiswirth, S.T. Cole, W.R. Jacobs, Jr., A. Telenti.** 1994. Cloning and nucleotide sequence of Mycobacterium tuberculosis gyrA and gyrB genes and detection of quinolone resistance mutations. Antimicrob Agents Chemother. 38:773-780.

257. **Tanaka M.M., A.R. Francis.** 2006. Detecting emerging strains of tuberculosis by using spoligotypes. PNAS. 103:15266-15271.

258. **te Beek L.A., M.J. van der Werf, C. Richter, M.W. Borgdorff.** 2006. Extrapulmonary tuberculosis by nationality, The Netherlands, 1993-2001. Emerg Infect Dis. 12:1375-1382.

259. **Telenti A., P. Imboden, F. Marchesi, D. Lowrie, S. Cole, M.J. Colston, L. Matter, K. Schopfer, T. Bodmer.** 1993. Detection of rifampicin-resistance mutations in Mycobacterium tuberculosis. Lancet. 341:647-650.

260. **Telenti A., W.J. Philipp, S. Sreevatsan, C. Bernasconi, K.E. Stockbauer, B. Wieles, J.M. Musser, W.R. Jacobs, Jr.** 1997. The emb operon, a gene cluster of Mycobacterium tuberculosis involved in resistance to ethambutol. Nat Med. 3:567-570.

261. **Thierry D., A. Brisson-Noel, V. Vincent-Levy-Frebault, S. Nguyen, J.L. Guesdon, B. Gicquel.** 1990. Characterization of a Mycobacterium tuberculosis insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. J Clin Microbiol. 28:2668-2673.

262. **Thierry D., M.D. Cave, K.D. Eisenach, J.T. Crawford, J.H. Bates, B. Gicquel, J.L. Guesdon.** 1990. IS6110, an IS-like element of Mycobacterium tuberculosis complex. Nucleic Acids Res. 18:188.

263. **Tortoli E.** 2006. The new mycobacteria: an update. FEMS Immunol Med Microbiol 48:159-178.

264. **Tsolaki A.G., S. Gagneux, A.S. Pym, Y.O. Goguet de la Salmoniere, B.N. Kreiswirth, D. Van Soolingen, P.M. Small.** 2005. Genomic deletions classify the Beijing/W strains as a distinct genetic lineage of Mycobacterium tuberculosis. J Clin Microbiol. 43:3185-3191.

265. **Tsolaki A.G., A.E. Hirsh, K. DeRiemer, J.A. Enciso, M.Z. Wong, M. Hannan, Y.O. Goguet de la Salmoniere, K. Aman, M. Kato-Maeda, P.M. Small.** 2004. Functional and evolutionary genomics of Mycobacterium tuberculosis: insights from genomic deletions in 100 strains. Proc Natl Acad Sci USA. 101:4865-4870.

266. **United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS) and World Health Organization (WHO).** 2009. AIDS epidemic update [en ligne] 100 p [Consulté en juin 2010]. http://www.who.int/hiv/pub/epidemiology/epidemic/en/

267. **van der Zanden A.G., K. Kremer, L.M. Schouls, K. Caimi, A. Cataldi, A. Hulleman, N.J. Nagelkerke, D. van Soolingen.** 2002. Improvement of differentiation and interpretability of spoligotyping for Mycobacterium tuberculosis complex isolates by introduction of new spacer oligonucleotides. J Clin Microbiol. 40:4628-4639.

268. **van Deun A., A. Martin, J.C. Palomino.** 2010. Diagnosis of drug-resistant tuberculosis: reliability and rapidity of detection. Int J Tuberc Lung Dis. 14:131-140.

269. **van Deutekom H., S.P. Hoijng, P.E. de Haas, M.W. Langendam, A. Horsman, D. van Soolingen, R.A. Coutinho.** 2004. Clustered tuberculosis cases: do they represent recent transmission and can they be detected earlier? Am J Respir Crit Care Med. 169:806-810.

270. **van Deutekom H., P. Supply, P.E. de Haas, E. Willery, S.P. Hoijng, C. Locht, R.A. Coutinho, D. van Soolingen.** 2005. Molecular typing of Mycobacterium tuberculosis by mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat analysis, a more accurate method for identifying epidemiological links between patients with tuberculosis. J Clin Microbiol. 43:4473-4479.

271. **van Embden J.D.A., M.D. Cave, J.T. Crawford, J.W. Dale, K.D. Eisenach, B. Gicquel, P. Hermans, C. Martin, R. McAdam, T.M. Shinnick, P.M. Small.** 1993. Strain identification of Mycobacterium tuberculosis by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. J. Clin. Microbiol. 31:406-409.

272. **van Embden J.D.A., T. van Gorkom, K. Kremer, R. Jansen, B.A van Der Zeijst, L.M. Schouls.** 2000. Genetic variation and evolutionary origin of the direct repeat locus of Mycobacterium tuberculosis complex bacteria. J Bacteriol. 182:2393-2401.

273. **van Rie A, T.C. Victor, M. Richardson, R. Johnson, G.D. van der Spuy, E.J. Murray, N. Beyers, N.C. Gey van Pittius, P.D. van Helden, and R.M. Warren.** 2005. Reinfection and mixed infection cause changing Mycobacterium tuberculosis drug-resistance patterns. Am J Respir Crit Care Med. 172:636-642.

274. **van Rie A., R. Warren, M. Richardson, T.C. Victor, R.P. Gie, D.A. Enarson, N. Beyers, and P.D. van Helden.** 1999. Exogenous reinfection as a cause of recur-rent tuberculosis after curative treatment. N Engl J Med. 341:1174-1179.

275. **van Soolingen** D. 2001. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. J Intern Med. 249:1-26.

276. **van Soolingen D., P.E. de Haas, P.W. Hermans, J.D. van Embden.** 1994. DNA fingerprinting of Mycobacterium tuberculosis. Methods Enzymol. 235:196-205.

277. **van Soolingen D., T. Hoogenboezem, P.E. de Haas, P.W. Hermans, M.A. Koedam, K.S. Teppema, P.J. Brennan, G.S. Besra, F. Portaels, J. Top, L.M. Schouls, J.D. van Embden.** 1997. A novel pathogenic taxon of the Mycobacterium tuberculosis complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. Int J Syst Bacteriol. 47:1236-1245.

278. **van Soolingen D, K. Kremer, M. Borgdorff.** 2001. Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype, Thailand--reply to Dr. Prodinger. Emerg Infect Dis. 7:763-764.

279. **van Soolingen D., L. Qian, P.E. de Haas, J.T. Douglas, H. Traore, F. Portaels, H.Z. Qing, D. Enkhsaikan, P. Nymadawa, J.D. van Embden.** 1995. Predominance of a single genotype of Mycobacterium tuberculosis in countries of East Asia. J Clin Microbiol. 33:3234-3238.

280. **van Soolingen D., A.G. van der Zanden, P.E. de Haas, G.T. Noordhoek, A. Kiers, N.A. Foudraine, F. Portaels, A.H. Kolk, K. Kremer, J.D. van Embden.** 1998. Diagnosis of Mycobacterium microti infections among humans by using novel genetic markers J Clin Microbiol. 36:1840-1845.

281. **Victor T.C., E.M. Streicher, C. Kewley, A.M. Jordaan, G.D. van der Spuy, M. Bosman, H. Louw, M. Murray, D. Young, P.D. van Helden, R.M. Warren.** 2007. Spread of an emerging Mycobacterium tuberculosis drug-resistant strain in the western Cape of South Africa. Int J Tuberc Lung Dis. 11:195-201.

282. **Vilcheze C., W.R. Jacobs Jr.** 2007. The mechanism of isoniazid killing: clarity through the scope of genetics. Annu Rev Microbiol. 61:35-50.

283. **Vitol I., J. Driscoll, B. Kreiswirth, N. Kurepina, K.P. Bennett.** 2006. Identifying Mycobacterium tuberculosis complex strain families using spoligotypes. Infect Genet Evol. 6:491-504.

284. **Vynnycky E., and P.E. Fine.** 1997. The natural history of tuberculosis: the implications of age-dependent risks of disease and the role of reinfection. Epidemiol. Infect. 119:183-201.

285. **Vynnycky E., N. Nagelkerke, M.W. Borgdorff, D. van Soolingen, J.D. van Embden, P.E. Fine.** 2001. The effect of age and study duration on the relationship between 'clustering' of DNA fingerprint patterns and the proportion of tuberculosis disease attributable to recent transmission. Epidemiol Infect. 126:43-62.

286. **Wada T., T. Iwamoto, S. Maeda.** 2009. Genetic diversity of the Mycobacterium tuberculosis Beijing family in East Asia revealed through refined population structure analysis. FEMS Microbiol Lett 291:35-43.

287. **Wade M.M., D. Volokhov, M. Peredelchuk, V. Chizhikov, Y. Zhang.** 2004. Accurate mapping of mutations of pyrazinamide-resistant Mycobacterium tuberculosis strains with a scanning-frame oligonucleotide microarray. Diagn Microbiol Infect Dis. 49:89-97.

288. **Weis S.E., J.M. Pogoda, Z. Yang, M.D. Cave, C. Wallace, M. Kelley, P.F. Barnes.** 2002. Transmission dynamics of tuberculosis in Tarrant county, Texas. Am J Respir Crit Care Med. 166:36-42.

289. **Weiss M.G., D. Somma, F. Karim, A. Abouihia, C. Auer, J. Kemp, M.S. Jawahar.** 2008. Cultural epidemiology of TB with reference to gender in Bangladesh, India and Malawi. Int J Tuberc Lung Dis. 12:837-847.

290. **Weniger T., J. Krawczyk, P. Supply, S. Niemann, D. Harmsen.** 2010. MIRU-VNTRplus: a web tool for polyphasic genotyping of Mycobacterium tuberculosis complex bacteria. Nucleic Acids Res. 38(Web Server issue):W326-31.

291. **Wirth T., F. Hildebrand, C. Allix-Beguec, F. Wolbeling, T. Kubica, K. Kremer, D. van Soolingen, S. Rusch-Gerdes, C. Locht, S. Brisse, A. Meyer, P. Supply, S. Niemann.** 2008. Origin, spread and demography of the Mycobacterium tuberculosis complex. PLoS Pathog. 4: e1000160.

292. **World Health Organisation (WHO).** 2004. BCG vaccine. Weekly epidemiological record (WER). 4:25-40.

293. **World Health Organisation (WHO).** 2009. Global Tuberculosis Control – epidemiology, strategy, financing [en ligne]. Genève: World Health Organisation. 303 p. [Consulté en janvier 2010]. http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/en/

294. **World Health Organisation (WHO).** 2007. Global Tuberculosis Control – Surveillance, planning, financing [en ligne]. Genève: World Health Organisation. 270 p. [consulté en juin 2010]. http://www.who.int/tb/publications/global_report/2007/en/index.html

295. **World Health Organisation (WHO).** 2008. Global Tuberculosis Control – Surveillance, planning, financing [en ligne]. Genève: World Health Organisation. 294 p. [Consulté en janvier 2010]. http://www.who.int/tb/publications/global_report/2008/en/

296. **World Health Organisation (WHO).** 2010. Global Tuberculosis Control: WHO report 2010 [en ligne]. Genève: World Health Organisation. 204 p. [Consulté en janvier 2011]. http://www.who.int/tb/country/en/index.html

297. **World Health Organisation (WHO).** 2009. Guidelines for surveillance of drug-resistance in tuberculosis – Fourth Edition [en ligne]. Genève: World Health Organisation. 83 p. [Consulté en juin 2010]. http://www.who.int/tb/publications/mdr_surveillance/en/

298. **World Health Organisation (WHO).** 2003. Le traitement de la tuberculose : principes à l'information des programmes nationaux [en ligne]. Genève: World Health Organisation. 110 p. [consulté en octobre 2010]. http://www.who.int/tb/publications/tb_treatmentguidelines/en/index.html

299. **World Health Organisation (WHO).** 2010. Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): 2010 global report on surveillance and response [en ligne]. Genève: World Health Organisation. 58 p. [Consulté en juin 2010] http://www.who.int/tb/publications/mdr_surveillance/en/

300. **World Health Organisation (WHO).** 2006. Report of the meeting of the WHO global task force on XDR-TB. Genève: World Health Organisation. 28 p. [consulté en janvier 2010].

301. **World Health Organisation (WHO).** 2010. Statistiques sanitaires mondiales [en ligne]. Genève: World Health Organisation. 177 p. [Consulté en juin 2010]. http://www.who.int/whosis/whostat/2010/fr/index.html

302. **World Health Organisation (WHO).** 2001. Surveillance standards for antimicrobial resistance [en ligne]. Genève: World Health Organisation. 16 p. [consulté en janvier 2010]. http://www.who.int/drugresistance/publications/WHO_CDS_CSR_DRS_2001_5/en/

303. **World Health Organisation (WHO).** 2010. The global plan to stop TB 2011-2015 [en ligne]. Genève: World Health Organisation. 100 p. [consulté en octobre 2010]. http://stoptb.org/resources/publications/plans_strategies.asp

304. **World Health Organisation (WHO).** 2009. Treatment of Tuberculosis: guidelines for national programmes [en ligne]. 147 p. [Consulté en octobre 2010]. http://www.who.int/tb/publications/tb_treatmentguidelines/en/index.html

305. **Wright A., M. Zignol, A. Van Deun, D. Falzon, S.R. Gerdes, K. Feldman, S. Hoffner, F. Drobniewski, L. Barrera, D. van Soolingen, F. Boulabhal, C.N. Paramasivan, K.M. Kam, S. Mitarai, P. Nunn, M. Raviglione.** 2009. Epidemiology of antituberculosis drug resistance 2002-07: an updated analysis of the Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance. Lancet. 373:1861-1873.

306. **Xu C., B.N. Kreiswirth, S. Sreevatsan, J.M. Musser, K. Drlica.** 1996. Fluoroquinolone resistance associated with specific gyrase mutations in clinical isolates of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis. J Infect Dis 174:1127-1130.

307. **Yaganehdoost A., E.A. Graviss, M.W. Ross, G.J. Adams, S. Ramaswamy, A. Wanger, R. Frothingham, H. Soini, J.M. Musser.** 1999. Complex transmission dynamics of clonally related virulent Mycobacterium tuberculosis associated with barhopping by predominantly human immunodeficiency virus-positive gay men. J Infect Dis. 180:1245-1251.

308. **Yokoyama E, K. Kishida, M. Uchimura, S. Ichinohe.** 2007. Improved differentiation of Mycobacterium tuberculosis strains, including many Beijing genotype strains, using a new combination of variable number of tandem repeats loci. Infect Genet Evol. 7:499-508.

309. **Zhang Y., B. Heym, B. Allen, D. Young, S. Cole.** 1992. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of Mycobacterium tuberculosis. Nature. 358:591-593.

310. **Zhang Y., D. Mitchison D.** 2003. The curious characteristics of pyrazinamide: a review. Int J Tuberc Lung Dis. 7:6-21.

311. **Zhang Y., K. Post-Martens, S. Denkin.** 2006. New drug candidates and therapeutic targets for tuberculosis therapy. Drug Discov Today. 11:21-27.

312. **Zhang Y., A. Telenti.** 2000. Genetics of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. In G.F. Hatfull (éd.), W.R. Jacobs, Jr. (éd.). Molecular genetics of mycobacteria. Washington, D.C.: ASM Press. p. 235-253.

313. **Zhang Y., W.W. Yew.** 2009. Mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis. 13:1320-1330.

314. **Zhang Y., D. Young.** 1994. Strain variation in the katG region of Mycobacterium tuberculosis. Mol Microbiol. 14:301-308.