

ACADEMIE DE MONTPELLIER
UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

Discipline : Biochimie et Biologie Moléculaire

Formation Doctorale : Biologie Santé

Ecole Doctorale : Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

présentée et soutenue publiquement

par

Loubna TAZI

le 10 Décembre 2002

Titre

**ANALYSE DE LA DIVERSITE GENETIQUE ET DE LA STRUCTURE
DES POPULATIONS DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* POUR
L'ETUDE DE LA TRANSMISSION DE LA TUBERCULOSE
A CASABLANCA, MAROC**

Mme Marie-Paule Lefranc, Professeur
Mme Véronique Vincent, Directeur de Recherche
M. Marc Struelens, Professeur
M. Philip Supply, Chargé de Recherche
M. Christian Carrière, Chef du Service de Bactériologie
Mme Anne-Laure Bañuls, Chargé de Recherche
M. Michel Tibayrenc, Directeur de Recherche

Université Montpellier II
Institut Pasteur, Paris
Université Libre, Bruxelles
Institut Pasteur, Lille
Hôpital Arnaud de Villeneuve
IRD
IRD

Président du jury
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse
Directeur de thèse

Remerciements

Je voudrais commencer par témoigner ma profonde gratitude au professeur Marie-Paule Lefranc, directeur du laboratoire d'ImmunoGénétique Moléculaire (LIGM) à l'Institut de Génétique Humaine, et professeur à l'Université de Montpellier II, pour avoir accepté de présider mon jury de thèse. J'ai eu la chance de préparer mon premier stage de DEA au sein de votre laboratoire, j'ai appris beaucoup de choses grâce à vous. Merci pour la confiance que vous m'avez témoignée, et merci pour votre disponibilité. Bien sûr, je profite de cette occasion pour remercier sincèrement tous les membres de l'équipe IMGT, et particulièrement les personnes formidables avec qui j'ai partagé le même bureau pendant la durée de mon stage : Géraldine, Dominique et Nathalie.

J'exprime également ma gratitude au professeur Marc Struelens et au docteur Véronique Vincent d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail. Merci pour l'intérêt que vous avez porté à la lecture de mon manuscrit. Je voudrais également remercier le docteur Véronique Vincent de m'avoir donné la chance de participer au cours « Outils moléculaires et épidémiologie de la tuberculose » organisé à l'Institut Pasteur de Paris, et je regrette profondément son absence pour des raisons professionnelles le jour de ma soutenance.

Je remercie vivement le docteur Philip Supply et le docteur Christian Carrière d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse. Philip, je tiens à te remercier profondément ainsi que toute l'équipe du laboratoire du docteur Camille Locht (Laboratoire des Mécanismes Moléculaires de la Pathogenèse Bactérienne), pour l'accueil chaleureux que j'ai reçu lors de mon passage à l'Institut Pasteur de Lille. J'ai eu un séjour inoubliable dans ce laboratoire, et j'ai été très touchée par la gentillesse et la disponibilité de l'ensemble de cette équipe formidable. Un grand merci à Sarah, c'était un plaisir de travailler avec toi, et ta présence le jour de ma soutenance me touche énormément.

L'aboutissement de ce travail je le dois à mes directeurs de thèse, le docteur Michel Tibayrenc et le docteur Anne-Laure Bañuls. Tout d'abord, je suis très reconnaissante à Michel de m'avoir accueillie dans son laboratoire et surtout de m'avoir permis de préparer ce travail dans les meilleures conditions. Michel, je vous remercie du fond du cœur pour tout ce que vous m'avez apporté et pour la confiance que vous m'avez témoignée au cours des 4 années que j'ai passées au laboratoire. Anne-Laure, je vais essayer de trouver tous les mots qui pourraient résumer ce que je te dois, ce que je pense de toi. Pourtant, ça sera difficile. Tu es tellement formidable. J'ai vraiment eu de la chance de travailler avec toi tout au long de ces années, tu m'as appris beaucoup de choses. J'espère qu'on aura de nouveau l'occasion de travailler ensemble. Anne-Laure, je te remercie profondément d'avoir été toujours disponible, je n'oublierais jamais ton soutien et tout ce que tu as fait pour moi au cours de ces derniers mois. Merci pour ton écoute et d'avoir été toujours là pour me reconforter. Merci d'avoir supporté mes pleurs, et je sais bien que ces moments étaient fréquents. Merci beaucoup, merci pour tout.

Mes plus vifs remerciements vont au docteur Jamila El Baghdadi ainsi qu'à l'ensemble de l'équipe du Service des Mycobactéries de l'Institut Pasteur de Casablanca, et particulièrement à Soumaya et Abdelmjid. Au cours de ce séjour, j'ai pu obtenir aussi bien l'ensemble de l'échantillon marocain que les données épidémiologiques et cliniques de tous les patients inclus dans cette étude. Merci une nouvelle fois à toutes les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin à la réalisation de cette tâche dans les meilleures conditions.

Je voudrais remercier également le docteur Jaouad Berrada et Melle Ouafae Bendadda pour l'accueil chaleureux que j'ai reçu lors de ma visite à l'Institut Vétérinaire et Agronomique à Rabat.

Pour toutes les données statistiques concernant la distribution de la tuberculose au Maroc, je remercie profondément le docteur Nouzha Bencheikh ainsi que tout le personnel de la Lutte Antituberculeuse du Ministère de la Santé à Rabat.

Les 4 années que j'ai passées au laboratoire sont et resteront inoubliables pour moi. J'étais entourée pendant toute cette période de gens formidables. Je reconnais que mon départ va être très dur, juste l'idée de penser que je vais bientôt partir et ne pas revoir pour si tôt tous ces visages que j'avais pris l'habitude de voir tous les jours me chagrine énormément. Je voudrais donc profiter de cette occasion pour dire à toutes les personnes du laboratoire qu'elles comptent beaucoup pour moi, je vous considère comme ma deuxième famille. J'espère qu'on gardera contact et qu'on aura l'occasion de se revoir dans de multiples circonstances. Merci pour tous les bons moments qu'on a passés ensemble, je vous remercie tous sans exception : Michel, Anne-Laure, Mallorie, Diana, Hélène, Guillaume, Christine (Sidobre), Franck, Cécile (Meunier), Stéphanie, Philippe, Marc, François (Chevenet), Christian, Patrick, François (Renaud), Jean-François, Frédéric, Phil, Yannis, Bénédicte, Christine (Chevillon), Sylvie, Thierry, Marie-Claude, Denis, David, Céline, Jenny, Laurence, Nadine, Ginette, et Cécile (Joly). J'espère que je n'ai oublié personne.

Je voudrais aussi remercier une nouvelle fois Diana et son mari Juan-Carlos pour toute l'attention et l'amitié qu'ils m'ont témoignées. Je vous souhaite tout le bonheur du monde. Tenez bon, c'est bientôt fini ! J'y suis bien arrivée moi !!!!

Mallorie, Christine (Sidobre), Franck, Cécile (Meunier), Hélène, Guillaume, Stéphanie, Marc, Anne-Laure (encore une fois), merci pour tous ces merveilleux moments. Vous occupez une grande place dans mon cœur.

Je n'oublie pas également le personnel de l'IRD, les gardiens de nuit ainsi que le personnel de la cantine. Merci à vous tous.

C'est vrai, j'y suis arrivée, mais j'y suis arrivée surtout grâce à ma famille. Je dédie donc cette thèse aux personnes qui comptent le plus pour moi : mon papa, ma maman, et mes 3 frères Soufiane, Othmane, et Mehdi. Merci pour votre amour, merci pour votre attention, merci d'être là à chaque fois que j'ai besoin de vous. Grâce à vous, j'ai pu surmonter les moments les plus difficiles, vous êtes ce que j'ai de plus cher au monde. Je vous aime énormément.

Table des matières

INTRODUCTION GÉNÉRALE	2
-CHAPITRE I-	
I RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	8
I.1 TAXONOMIE DES MYCOBACTÉRIES	8
I.1.1 <i>Le genre Mycobacterium</i>	8
I.1.2 <i>Les espèces du genre Mycobacterium</i>	9
I.1.3 <i>Les espèces du complexe Mycobacterium tuberculosis</i>	11
I.2 L'ESPÈCE <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i>	12
I.2.1 <i>Structure cellulaire et génome de M. tuberculosis</i>	12
I.2.1.1 Description de la bactérie.....	12
I.2.1.2 Génome de <i>M. tuberculosis</i>	13
I.2.2 <i>Diversité génétique chez l'espèce M. tuberculosis</i>	13
I.2.3 <i>Structure des populations</i>	13
I.2.4 <i>Typage moléculaire de M. tuberculosis</i>	15
I.2.4.1 Ribotypage	16
I.2.4.2 Typage des phages.....	16
I.2.4.3 Principaux outils de caractérisation moléculaire chez <i>M. tuberculosis</i>	17
I.2.4.3.1 RFLP-IS6110 (Restriction Fragment Length Polymorphism).....	17
I.2.4.3.2 Mixed-linker PCR	18
I.2.4.3.3 Spoligotyping.....	18
I.2.4.3.4 MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units - Variable Number of Tandem Repeats).....	18
I.2.4.3.5 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).....	19
I.3 LA TUBERCULOSE DANS LE MONDE	20
I.4 TRANSMISSION ET PATHOGENÈSE DE LA TUBERCULOSE	21
I.4.1 <i>Transmission de la bactérie M. tuberculosis</i>	21
I.4.2 <i>Pathogenèse de la maladie de tuberculose</i>	21
I.4.2.1 Stade 1 : Phagocytose des bacilles	22
I.4.2.2 Stade 2 : Multiplication intracellulaire des bacilles	22
I.4.2.3 Stade 3 : Phase stationnaire	22
I.4.2.4 Stade 4 : Forme pulmonaire de la tuberculose	23
I.5 SYMPTÔMES ET CATÉGORIES DE LA TUBERCULOSE PULMONAIRE.....	23
I.6 TRAITEMENT DE LA TUBERCULOSE	24
I.7 RÉSISTANCE AUX ANTITUBERCULEUX	25
I.8 VACCINATION AU BCG ET TEST À LA TUBERCULINE.....	26
I.8.1 <i>Vaccination au BCG</i>	26
I.8.2 <i>Test à la tuberculine</i>	27

I.9 DIAGNOSTIC DE L'ESPÈCE <i>M. TUBERCULOSIS</i>	27
<i>I.9.1 Examen microscopique</i>	27
<i>I.9.2 Culture</i>	28
I.9.2.1 Les milieux de culture	28
I.9.2.2 Identification de l'espèce <i>M. tuberculosis</i>	29
<i>I.9.3 Etude de la sensibilité aux antibiotiques</i>	30
I.10 LA TUBERCULOSE AU MAROC	31
<i>I.10.1 La lutte antituberculeuse au Maroc</i>	31
I.10.1.1 Les objectifs du programme national de lutte antituberculeuse	31
I.10.1.2 Les différentes catégories de la tuberculose	32
I.10.1.3 Les modalités de prise en charge des patients tuberculeux	33
I.10.1.4 Les structures sanitaires	34
<i>I.10.2 La tuberculose à Casablanca</i>	34
<i>I.10.3 Avancée des recherches sur la tuberculose au Maroc</i>	36

-CHAPITRE II-

II MATÉRIEL ET MÉTHODES	38
II.1 DESCRIPTION DE L'ÉCHANTILLON ÉTUDIÉ	38
<i>II.1.1 Les isolats marocains</i>	38
<i>II.1.2 Les stocks de référence</i>	43
II.2 TECHNIQUES ET MÉTHODES D'ANALYSE	44
<i>II.2.1 Culture et inactivation des isolats M. tuberculosis</i>	44
II.2.1.1 Culture des mycobactéries	44
II.2.1.2 Inactivation des isolats	45
<i>II.2.2 Extraction de l'ADN</i>	45
II.2.2.1 Protocole au Phénol-Chloroforme	46
II.2.2.1.1 Lyse des bactéries	46
II.2.2.1.2 Déprotéinisation	46
II.2.2.1.3 Précipitation de l'ADN	46
II.2.2.2 Protocole au CTAB	47
II.2.2.2.1 Lyse des cellules	47
II.2.2.2.2 Précipitation de l'ADN	47
II.2.2.3 Dosage et vérification de la qualité d'ADN	47
<i>II.2.3 Techniques de typage moléculaire</i>	48
II.2.3.1 La technique RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)	48
II.2.3.1.1 Généralités	48
II.2.3.1.2 Protocole d'amplification	49
II.2.3.1.3 Révélation des profils d'amplification	50
II.2.3.1.4 Lecture et interprétation des profils	51
II.2.3.1.5 Mise au point de la technique RAPD sur <i>M. tuberculosis</i>	51
II.2.3.2 La technique MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units – Variable Number of Tandem Repeats)	55
II.2.3.2.1 Généralités	55

II.2.3.2.2 Protocole d'amplification	56
II.2.3.2.3 Révélation et lecture des profils d'amplification.....	58
II.2.4 Méthodes d'analyse des résultats.....	60
II.2.4.1 Les indices de diversité génétique	60
II.2.4.1.1 Le taux de polymorphisme	60
II.2.4.1.2 La diversité génétique moyenne.....	60
II.2.4.1.3 La diversité génotypique	61
II.2.4.1.4 La distance génétique de Jaccard.....	61
II.2.4.2 Méthodes d'analyse de génétique des populations.....	62
II.2.4.2.1 Test <i>d1</i>	62
II.2.4.2.2 Test <i>d2</i>	62
II.2.4.2.3 Test <i>e</i>	62
II.2.4.2.4 Test <i>f</i>	63
II.2.4.2.5 Test <i>g</i>	63
II.2.4.3 Analyses phylogénétiques	64
II.2.4.3.1 Les méthodes phénétiques	64
II.2.4.3.2 Les méthodes phylogénétiques (arbres de Wagner et bootstrap).....	64
II.2.4.3.3 Le logiciel Treedyn	65

-CHAPITRE III-

III RÉSULTATS	67
III.1 TYPAGE MOLÉCULAIRE	67
III.1.1 <i>Analyse des profils obtenus par la technique RAPD</i>	67
III.1.2 <i>Analyse des profils obtenus par la technique MIRU-VNTR</i>	72
III.1.2.1 Typage par séquenceur automatique.....	72
III.1.2.2 Typage sur gel d'agarose.....	74
III.1.3 <i>La tuberculose familiale</i>	79
III.1.4 <i>Les suivis thérapeutiques</i>	80
III.2 INDICES DE DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE	81
III.2.1 <i>Données RAPDs</i>	82
III.2.1.1 Etude de la population marocaine.....	82
III.2.1.2 Données RAPDs pour d'autres micro-organismes.....	83
III.2.2 <i>Données MIRU-VNTRs</i>	85
III.2.2.1 Etude de la population marocaine.....	85
III.2.2.2 Données MIRU-VNTRs pour d'autres populations de <i>M. tuberculosis</i>	86
III.3 ANALYSE DE LA STRUCTURE DE LA POPULATION	88
III.3.1 <i>Tests de génétique des populations basés sur la technique RAPD</i>	89
III.3.2 <i>Tests de génétique des populations basés sur la technique MIRU-VNTR</i>	90
III.3.3 <i>Test de corrélation entre les 2 techniques moléculaires utilisées</i>	92
III.4 ANALYSE PHYLOGÉNÉTIQUE	93
III.4.1 <i>Arbres de Neighbor-Joining</i>	93
III.4.2 <i>Arbres de Wagner et bootstrap</i>	110

III.4.3 Comparaison avec d'autres stocks de <i>M. tuberculosis</i>	116
--	-----

-CHAPITRE IV-

IV DISCUSSION	120
IV.1 LES MARQUEURS GÉNÉTIQUES	121
IV.1.1 Les marqueurs RAPDs	121
IV.1.1.1 Reproductibilité des profils.....	121
IV.1.1.2 Marqueur généraliste	122
IV.1.1.3 Marqueur multilocus	123
IV.1.2 Les marqueurs MIRU-VNTRs.....	123
IV.1.2.1 Technique de référence.....	123
IV.1.2.2 Marqueur spécifique	124
IV.1.2.3 Marqueur multilocus	124
IV.1.3 Comparaison des marqueurs et complémentarité.....	124
IV.2 STRUCTURE DE LA POPULATION DE <i>M. TUBERCULOSIS</i> ISOLÉE AU MAROC.....	126
IV.3 DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE ET RELATIONS PHYLOGÉNÉTIQUES	127
IV.3.1 La diversité génétique.....	128
IV.3.1.1 Comparaison de la diversité génétique de notre échantillon avec d'autres micro-organismes.....	128
IV.3.1.2 Polymorphisme génomique chez l'espèce <i>M. tuberculosis</i>	129
IV.3.1.3 Comparaison de la diversité génétique de notre échantillon avec d'autres populations de <i>M. tuberculosis</i>	129
IV.3.2 Relations phylogénétiques.....	131
IV.3.2.1 Position phylogénétique de <i>M. tuberculosis</i> dans le complexe <i>M. tuberculosis</i>	131
IV.3.2.2 Relations phylogénétiques entre l'échantillon marocain et les autres stocks de <i>M. tuberculosis</i>	132
IV.3.2.3 Relations phylogénétiques entre les isolats marocains	133
IV.3.2.4 Association entre diversité phylogénétique et caractère extrinsèque	133
IV.4 ÉPIDÉMIOLOGIE MOLÉCULAIRE DE LA TUBERCULOSE À CASABLANCA	135
IV.4.1 Transmission de la tuberculose à l'échelle de Casablanca.....	135
IV.4.2 Transmission de la tuberculose à l'échelle individuelle.....	136
IV.4.2.1 Les cas des suivis thérapeutiques	136
IV.4.2.2 La tuberculose familiale	136
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	139
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	143
ANNEXES.....	156

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

La tuberculose est une maladie infectieuse bactérienne connue depuis la haute antiquité (Salo *et al.*, 1994 ; Sousa *et al.*, 1997 ; Taylor *et al.*, 1999). Au cours du temps, elle aurait évolué d'un état sporadique vers une situation épidémique suite à l'accroissement de la densité des populations, pour devenir endémique par le biais des migrations et des colonisations des pays et des continents.

Cette maladie infectieuse et contagieuse est due à des mycobactéries appartenant au complexe *Mycobacterium tuberculosis*, dont l'espèce *Mycobacterium tuberculosis*, connue également sous le nom de bacille de Koch (BK), est l'agent pathogène de la tuberculose humaine (Koch, 1882).

Alors qu'on pensait que cette maladie était en voie d'éradication, on a assisté, vers la fin des années 80, à une réémergence de la tuberculose. Les problèmes de multirésistance aux drogues et l'incidence élevée des cas VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) ont fortement contribué à ce phénomène (Harries, 1990). Toutefois, le développement de cette maladie est directement corrélé aux conditions sociales et d'hygiène des populations.

A l'heure actuelle, la tuberculose représente l'une des infections les plus répandues chez l'homme. Elle pose de nos jours un problème majeur de santé publique (Dolin, Raviglione and Kochi, 1994). Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS, rapport 2000), un tiers de la population mondiale est infecté. Chaque année, la tuberculose tue environ 3 millions de personnes, et 6 à 8 millions d'individus développent la forme active de la maladie.

La tuberculose ne concerne pas seulement les pays défavorisés, elle touche également les pays développés, bien que les conséquences de cette maladie restent plus importantes dans les pays en voie de développement, et le risque d'infection beaucoup plus élevé (Raviglione, Snider and Kochi, 1995 ; Dye *et al.*, 1999). Les

régions du monde les plus touchées sont l'Afrique, l'Asie du Sud-Est, et l'Europe de l'Est (voir annexe 1).

La recrudescence de cette maladie montre qu'il est important de pousser les recherches sur ces bactéries aussi bien dans les domaines appliqués que fondamentaux. Le développement d'outils moléculaires avec des pouvoirs de résolution de plus en plus performants a grandement contribué à la compréhension de la transmission de la tuberculose. Ainsi, l'intégration des ces approches moléculaires dans les études conventionnelles d'épidémiologie a fait naître une nouvelle discipline, appelée épidémiologie moléculaire (voir publication 1, annexe 15).

A l'heure actuelle, pour les études d'épidémiologie moléculaire de la tuberculose, la méthode de génotypage la plus largement utilisée est l'analyse de l'ADN par la technique RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) basée sur l'élément d'insertion IS6110, nommée RFLP-IS6110. Cette technique produit une importante variabilité génétique, et elle est considérée comme la méthode de référence (van Embden *et al.*, 1993 ; Cave *et al.*, 1991). Cependant, elle présente des inconvénients (Kremer *et al.*, 1999 ; McHugh and Gillespie, 1998). Cette méthode, basée sur le nombre de copies d'IS6110, requière pour les isolats présentant moins de 6 copies, l'utilisation d'un marqueur additionnel. De plus, nous verrons dans ce travail que les données RFLP-IS6110 ne peuvent être utilisées pour les analyses de génétique des populations et en particulier l'analyse du déséquilibre de liaison (association non aléatoire de génotypes d'un locus à l'autre), car elles ne révèlent pas la variabilité de locus indépendants.

D'autres marqueurs moléculaires ont également contribué à l'étude du polymorphisme de *M. tuberculosis* (Kremer *et al.*, 1999 ; Kamerbeek *et al.*, 1997 ; Frothingham and Meeker-O'Connell, 1998 ; Skuce *et al.*, 2002 ; van Soolingen *et al.*, 1993). Par exemple, des marqueurs basés sur un nombre variable de répétitions en tandem ou VNTRs (Variable Number Tandem Repeats) correspondant à des séquences minisatellites d'eucaryotes ont été caractérisés dans le génome de *M. tuberculosis*. Ces nouveaux marqueurs connus sous le nom de MIRU-VNTRs (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units – Variable Number of Tandem Repeats)

ont montré leur potentialité pour le typage moléculaire de *M. tuberculosis* (Mazars *et al.*, 2001 ; Supply *et al.*, 2001). De plus, ce sont des marqueurs multilocus, ils peuvent par conséquent être utilisés pour les analyses de déséquilibre de liaison.

Une autre approche moléculaire, la technique RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) a été utilisée pour l'étude d'isolats de *M. tuberculosis* (Linton *et al.*, 1994 ; Richner, Meiring and Kirby, 1997 ; Harn *et al.*, 1997), mais également pour des espèces variées de micro-organismes (Bazzicalupo and Fani, 1996 ; Williams *et al.*, 1990). Pour *M. tuberculosis*, cette technique a fourni des informations sur la diversité génétique de l'ensemble du génome et sur la dynamique de transmission de la maladie dans certaines populations (Richner, Meiring and Kirby, 1997 ; Harn *et al.*, 1997). Les marqueurs RAPDs peuvent être utilisés pour n'importe quel micro-organisme, aucune connaissance préalable du génome analysé n'est nécessaire. Ils sont qualifiés de marqueurs « généralistes », contrairement aux approches décrites ci-dessus et qui sont spécifiques au complexe *M. tuberculosis*. De plus, par son caractère généraliste (Tibayrenc, 1995-a), cette méthode permet la comparaison entre la diversité génétique de différents micro-organismes. Son utilisation dans le domaine de la génétique évolutive a été également décrite pour différentes espèces de parasites et de bactéries (Tibayrenc, 1995-b ; Bañuls *et al.*, 2000 ; Urdaneta *et al.*, 2001 ; Hilali *et al.*, 2000).

L'épidémiologie moléculaire de la tuberculose est largement étudiée grâce à tous ces marqueurs génétiques. Mais à l'heure actuelle, une seule étude basée sur la technique MIRU-VNTR a développé une analyse poussée et rigoureuse de génétique des populations dans la région de Cape Town en Afrique du Sud (Supply *et al.*, sous presse). Cependant, la connaissance du modèle d'évolution des micro-organismes est la base indispensable pour toute étude d'épidémiologie moléculaire afin d'élucider la dynamique de transmission de la maladie infectieuse correspondante. En effet, l'analyse de la diversité génétique associée à l'analyse phylogénétique des stocks de *M. tuberculosis* ne suffisent pas pour comprendre son mode de propagation. Il est essentiel d'analyser les résultats en termes de génétique des populations. Seule cette discipline renseigne de façon rigoureuse sur la dynamique de la population bactérienne, et sur l'importance des échanges génétiques au sein de cette population. Cette analyse est fondamentale, car la

fréquence des échanges génétiques conditionne la stabilité des génotypes dans l'espace et dans le temps, et ceci a un impact indiscutable sur leur intérêt clinique et épidémiologique (Tibayrenc, 1996 ; 1998 ; 1999). Par ailleurs, afin d'estimer la fréquence et l'impact des échanges génétiques au sein d'une population, le choix des marqueurs moléculaires est fondamental.

Au Maroc, la tuberculose pose également un important problème de santé publique. Selon les dernières statistiques réalisées par le programme national de lutte antituberculeuse (Dr Bencheikh, Ministère de la Santé, Maroc), l'incidence cumulée de la tuberculose, toute forme confondue, est de l'ordre de 104 nouveaux cas pour 100.000 habitants par an, ce qui représente environ 30.000 nouveaux cas chaque année (Ottmani *et al.*, 1998). Malgré l'adoption de la stratégie DOTS (Directly Observed Treatment Short-course) de l'OMS depuis 1991, l'incidence de cette maladie n'a pas diminué. Parmi les régions les plus touchées, la capitale économique du pays, Casablanca, compte presque le cinquième des cas enregistrés au Maroc.

D'un point de vue génétique, peu d'études ont été réalisées jusqu'à présent sur les souches marocaines (El Baghdadi *et al.*, 1997-a, 1997-b, et 1997-c ; Laraqui *et al.*, 2001 ; Aghandous *et al.*, 1999 ; Lazraq *et al.*, 1999). Malgré l'incidence élevée de la tuberculose, on connaît donc très peu de choses d'un point de vue génétique sur la propagation de *M. tuberculosis* dans ce pays.

Dans ce cadre, ce travail étudie la diversité génétique et la structure d'une population de *M. tuberculosis* isolée dans la ville de Casablanca par différentes méthodes de caractérisation. Cette analyse représente la première étude génétique répondant à de tels objectifs au Maroc. Par ailleurs, elle permet non seulement de comprendre le mode de transmission de la tuberculose à Casablanca mais, elle apporte également des informations générales sur la génétique et la structure des populations de l'espèce *M. tuberculosis*. Les objectifs spécifiques de ce travail sont :

- établir un échantillon adéquat de stocks de *M. tuberculosis* avec un descriptif épidémiologique complet ;

- déterminer la structure des populations de *M. tuberculosis* à Casablanca par des analyses rigoureuses de génétique des populations ;

- évaluer et analyser la diversité génétique de l'échantillon ;

- comparer la diversité génétique obtenue avec d'autres populations de *M. tuberculosis* et d'autres espèces de micro-organismes ;

- identifier et comprendre le mode de transmission de cette maladie infectieuse dans la ville de Casablanca ;

- étudier s'il existe une association entre les données génétiques d'une part et les différents caractères extrinsèques de chaque isolat (comme par exemple la multirésistance, la tuberculose chronique, le lieu ou la date d'isolement) ;

- et apporter des informations générales sur l'espèce *M. tuberculosis* d'un point de vue génétique et structure des populations.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

-Chapitre I-

I Rappels bibliographiques

Les rappels taxonomiques, génétiques, biologiques, et épidémiologiques relatifs à l'espèce *Mycobacterium tuberculosis* sont présentés dans ce chapitre. Seuls les éléments nécessaires pour la compréhension de ce travail sont détaillés.

I.1 Taxonomie des mycobactéries

Les mycobactéries appartiennent au genre *Mycobacterium*, genre unique de la famille des *Mycobacteriaceae* (Chester, 1897), de l'ordre des *Actinomycetales* (Buchanan, 1917), et de la classe des *Actinomycetes* (Krasil'nikov, 1949).

I.1.1 Le genre *Mycobacterium*

Le genre *Mycobacterium* a été décrit par Lehmann et Neumann en 1896. Il représente un des taxons bactériens les plus étudiés.

La classification taxonomique au sein du genre repose sur la forme des colonies, les caractéristiques de la croissance bactérienne et la réactivité biochimique. En général, une espèce appartient au genre *Mycobacterium* si elle présente les caractéristiques suivantes :

(i) une morphologie bacillaire (voir figure 1, p12). Les mycobactéries se présentent comme des bâtonnets aérobies, ils sont allongés de 1 à 10 μm , immobiles et ne forment ni capsule ni conidie ni endospore ;

(ii) l'acido-alcool-résistance (BAAR) ;

(iii) une paroi dépourvue de membrane externe, très riche en lipides, tels que les mycosides et les longues chaînes d'acides mycoliques avec 60 à 90 atomes de carbone ;

(iv) et un coefficient en Guanine-Cytosine élevé, compris entre 61 et 71%, sauf chez l'espèce *Mycobacterium leprae* où il n'est que de 56% (Vincent-Levy-Frebault and Portaels, 1992).

1.1.2 Les espèces du genre *Mycobacterium*

A l'heure actuelle, 71 espèces sont décrites dans le genre *Mycobacterium* (voir table I). Elles sont séparées en 2 divisions majeures selon leur vitesse de croissance lente ou rapide (Shinnick and Good, 1994 ; Rogall *et al.*, 1990).

On considère que la croissance est lente lorsqu'il faut plus de 7 jours d'incubation pour obtenir une croissance visible. Les espèces à croissance lente possèdent un seul opéron d'ARNr tandis que les espèces à croissance rapide en possèdent deux (Bercovier, Kafri and Sela, 1986).

Les bactéries à croissance lente sont à leur tour divisées en 3 groupes selon leur pigmentation : photochromogènes (groupe I de Runyon), scotochromogènes (groupe II de Runyon), et non photochromogènes (groupe III de Runyon).

Contrairement aux espèces à croissance lente, les espèces à croissance rapide sont des saprophytes communs des habitats naturels. Elles sont généralement considérées comme non pathogènes.

En dehors de *Mycobacterium tuberculosis* et *Mycobacterium leprae*, plusieurs autres espèces sont pathogènes pour l'homme, mais exclusivement chez les individus immunodéprimés, comme par exemple les espèces du complexe *M. avium*, *M. kansasii*, *M. malmoense* et *M. xenopi*. La majorité de ces mycobactéries potentiellement pathogènes est connue sous le nom de mycobactéries atypiques, ces espèces ont une croissance lente (Thorel, 1994).

Table I. Les espèces du genre *Mycobacterium* (Shinnick and Good, 1994).

Croissance lente	Croissance rapide
<p><u>Pathogènes</u></p> <p><i>Mycobacterium africanum</i> <i>Mycobacterium asiaticum</i> <i>Mycobacterium avium</i> <i>Mycobacterium bovis</i> <i>Mycobacterium celatum</i> <i>Mycobacterium farcinogenes*</i> <i>Mycobacterium genavense</i> <i>Mycobacterium haemophilum</i> <i>Mycobacterium interjectum</i> <i>Mycobacterium intermedium</i> <i>Mycobacterium intracellulare</i> <i>Mycobacterium kansasii</i> <i>Mycobacterium leprae</i> <i>Mycobacterium lepraemurium*</i></p> <p><i>Mycobacterium malmoense</i> <i>Mycobacterium marinum</i> <i>Mycobacterium microti*</i> <i>Mycobacterium paratuberculosis*</i> <i>Mycobacterium scrofulaceum</i> <i>Mycobacterium shimoidi</i> <i>Mycobacterium simiae</i> <i>Mycobacterium szulgai</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Mycobacterium ulcerans</i> <i>Mycobacterium xenopi</i></p> <p><u>Non pathogènes</u></p> <p><i>Mycobacterium cookii</i> <i>Mycobacterium gastri</i> <i>Mycobacterium gordonae</i> <i>Mycobacterium hiberniae</i> <i>Mycobacterium nonchromogenicum</i> <i>Mycobacterium terrae</i> <i>Mycobacterium triviale</i></p>	<p><u>Pathogènes</u></p> <p><i>Mycobacterium abscessus</i> <i>Mycobacterium chelonae</i> <i>Mycobacterium fortuitum</i> <i>Mycobacterium peregrinum</i> <i>Mycobacterium porcinum*</i> <i>Mycobacterium senegalense*</i></p> <p><u>Non pathogènes</u></p> <p><i>Mycobacterium agri</i> <i>Mycobacterium aichiense</i> <i>Mycobacterium alvei</i> <i>Mycobacterium aurum</i> <i>Mycobacterium austroafricanum</i> <i>Mycobacterium brumae</i> <i>Mycobacterium chitae</i> <i>Mycobacterium chubuense</i> <i>Mycobacterium confluentis</i> <i>Mycobacterium diernhoferi</i> <i>Mycobacterium duvalii</i> <i>Mycobacterium fallax</i> <i>Mycobacterium flavescens</i> <i>Mycobacterium gadium</i> <i>Mycobacterium gilvum</i> <i>Mycobacterium komossense</i> <i>Mycobacterium madagascariense</i> <i>Mycobacterium methylavorum</i> <i>Mycobacterium moriokaense</i> <i>Mycobacterium neoaurum</i> <i>Mycobacterium obuense</i> <i>Mycobacterium parafortuinum</i> <i>Mycobacterium phlei</i> <i>Mycobacterium poriferae</i> <i>Mycobacterium pulveris</i> <i>Mycobacterium rhodesiae</i> <i>Mycobacterium shanghaiense</i> <i>Mycobacterium smegmatis</i> <i>Mycobacterium sphagni</i> <i>Mycobacterium thermoresistibile</i> <i>Mycobacterium tokaiense</i> <i>Mycobacterium vaccae</i> <i>Mycobacterium yunnanense</i></p>

*Pathogènes pour les animaux

I.1.3 Les espèces du complexe *Mycobacterium tuberculosis*

Les bactéries appartenant au complexe *Mycobacterium tuberculosis* font partie du groupe III de Runyon, ce sont des mycobactéries à croissance lente non photochromogènes. Le complexe *M. tuberculosis* comprend les espèces suivantes : *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, et *Mycobacterium canettii*. Toutes ces espèces sont pathogènes.

Les 2 espèces majeures, *M. tuberculosis* (Koch, 1882) et *M. bovis* (Lehmann and Neumann, 1907), sont les agents respectifs de la tuberculose humaine et bovine. *M. bovis* peut être également pathogène pour l'homme. La souche atténuée de *M. bovis*, *M. bovis* BCG (Calmette and Guérin, 1921), est utilisée comme vaccin pour la tuberculose humaine.

M. africanum a été isolée en Afrique tropicale, elle est pathogène pour l'homme. Cette espèce est très proche phénotypiquement de *M. tuberculosis* (Castets *et al.*, 1968).

M. microti (Reed, 1957) est l'agent de la tuberculose des rongeurs (Kremer *et al.*, 1998). Cette espèce non pathogène pour l'homme, a parfois été utilisée, comme la souche *M. bovis* BCG (Bacille Calmette Guérin), comme vaccin pour la tuberculose humaine.

L'espèce *M. canettii* est un autre variant de *M. tuberculosis*, elle a été souvent isolée chez des patients provenant d'Afrique (van Soolingen *et al.*, 1997 ; Pfyffer *et al.*, 1998).

Les 5 espèces du complexe *M. tuberculosis* sont utilisées dans ce travail, principalement pour les analyses phylogénétiques. L'espèce *M. canettii* a été choisie comme groupe externe.

I.2 L'espèce *Mycobacterium tuberculosis*

Ce travail concerne principalement l'espèce *M. tuberculosis*, l'agent responsable de la tuberculose humaine. Le reste des rappels bibliographiques est donc focalisé sur cette bactérie et la forme pulmonaire de la tuberculose.

I.2.1 Structure cellulaire et génome de *M. tuberculosis*

I.2.1.1 Description de la bactérie

Mycobacterium tuberculosis est la première espèce décrite en 1882 par Robert Koch, elle est également connue sous le nom de « Bacille de Koch » ou « BK ». C'est l'espèce principale du complexe *M. tuberculosis*, elle est responsable de la tuberculose humaine.

Cette bactérie se présente au microscope sous forme de bâtonnets (voir figure 1). Comme les autres espèces du genre *Mycobacterium*, elle est caractérisée par la présence d'une paroi cellulaire riche en lipides, et un pourcentage élevé en Guanine-Cytosine.

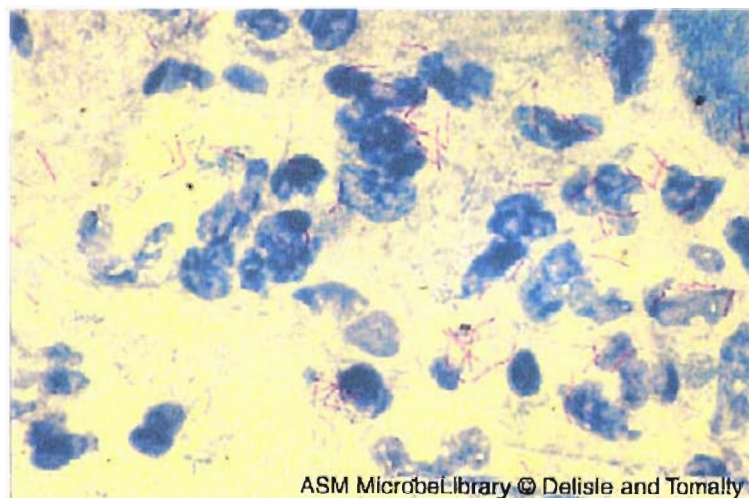


Figure 1. Identification de l'espèce *M. tuberculosis* au microscope par coloration de Ziehl-Neelsen à la fuchsine phéniquée. Les bacilles apparaissent comme de fins bâtonnets rouges.

1.2.1.2 Génome de *M. tuberculosis*

Le génome de *M. tuberculosis* fait 4×10^6 pb, il contient environ 3.500 gènes et a une composition riche en GC (65%) (Cole *et al.*, 1998). Aucun plasmide n'a été détecté chez cette espèce. Le génome est caractérisé par la présence de séquences d'ADN répétées. L'utilisation de ces éléments répétés dans l'ADN génomique a permis d'analyser la variabilité génétique entre les souches de *M. tuberculosis* (Sola *et al.*, 1998 ; Bradford *et al.*, 1998 ; Kato-Maeda *et al.*, 2001).

1.2.2 Diversité génétique chez l'espèce *M. tuberculosis*

En dehors du polymorphisme lié aux séquences répétées existantes dans le génome, différents travaux ont montré que l'espèce *M. tuberculosis* présente une faible variabilité génétique au niveau de plusieurs gènes de structure et de gènes codant pour des protéines cibles du système immunitaire de l'hôte (Sreevatsan *et al.*, 1997 ; Musser, Amin and Ramaswamy, 2000 ; Musser, 2001). Cette espèce est considérée depuis très longtemps très peu polymorphe. Toutefois, une étude récente relative à la comparaison du génome total entre différentes souches de *M. tuberculosis* a mis en évidence que le polymorphisme au sein de cette espèce est plus important que précédemment décrit (Fleischmann *et al.*, 2002). De plus, par l'analyse de certaines familles de gènes, les auteurs démontrent que la variabilité ne concerne pas uniquement les séquences répétées des régions intergéniques mais également les séquences codantes.

1.2.3 Structure des populations

Les analyses de génétique des populations ont été très peu décrites chez l'espèce *M. tuberculosis*. Jusqu'à présent, une seule étude rigoureuse de génétique des populations basée sur des données MIRU-VNTRs a été réalisée sur une population de *M. tuberculosis* provenant d'Afrique du Sud. Celle-ci a permis de mettre en évidence que cette espèce présente une structure fondamentalement clonale (Supply *et al.*, sous presse). Cependant, la détermination de la structure des

populations est indispensable pour une meilleure compréhension de l'épidémiologie d'une maladie.

L'étude de la structure de la population consiste à estimer la fréquence des échanges génétiques par des analyses de génétique des populations (Tibayrenc, 1995-a ; 1996 ; 1998 ; 1999). Dans le cas des micro-organismes, l'analyse de génétique des populations est focalisée sur le débat clonalité/panmixie (échanges génétiques libres).

L'approche de génétique des populations renseigne de façon rigoureuse sur la dynamique des populations de micro-organismes ainsi que sur l'importance des échanges génétiques au sein de ces populations. Ceci se reflète sur la stabilité des génotypes au cours du temps et par conséquent sur leur intérêt épidémiologique. En effet, si les échanges génétiques sont fréquents (structure panmictique ou proche de la panmixie), les génotypes multilocus peuvent être assimilés à des variants individuels éphémères, et dans ce cas le typage présente peu d'intérêt épidémiologique. Nous pouvons citer le cas de *Neisseria gonorrhoeae* (Maynard Smith *et al.*, 1993 ; O'Rourke and Stevens, 1993). Par contre, si les échanges génétiques sont rares ou absents, les génotypes multilocus se regroupent en lignées qui évoluent indépendamment les unes des autres et se comportent comme des clones naturels. Un micro-organisme à structure clonale peut permettre de définir des marqueurs épidémiologiques, ou des marqueurs indirects de virulence, de résistance, ou de formes cliniques. C'est le cas de *Salmonella* (Maynard Smith *et al.*, 1993), et de certaines espèces de protozoaires parasites comme *Trypanosoma cruzi* (Tibayrenc, Kjellberg and Ayala, 1990). A côté de ces cas extrêmes, il existe des cas intermédiaires, c'est-à-dire un mode de propagation clonale avec des phénomènes de recombinaison sexués relativement fréquents. Le modèle de « clonalité épidémique » décrit par Maynard Smith *et al.* (1993), correspond à une espèce sexuée présentant une propagation occasionnelle de clones éphémères, c'est le cas de l'espèce *Neisseria meningitidis*.

Les tests statistiques proposés par Tibayrenc, Kjellberg et Ayala (1990) sont basés sur les deux conséquences fondamentales d'une reproduction sexuée : la ségrégation des allèles à des locus donnés, et la recombinaison des génotypes d'un

locus à l'autre. Par conséquent, seuls les marqueurs génétiques permettant l'individualisation d'allèles ou de locus distincts peuvent être utilisés pour de telles analyses. Les tests de génétique des populations sont donc de deux types :

- les tests de ségrégation. Ils requièrent un état diploïde de l'organisme à étudier, et une interprétation allélique des marqueurs génétiques utilisés ;

- les tests de recombinaison. Ils sont basés sur l'étude du déséquilibre de liaison (association non aléatoire de génotypes d'un locus à l'autre), et peuvent être appliqués indépendamment du niveau de ploïdie et sans interprétation allélique des génotypes (Stevens and Tibayrenc, 1995 ; Tibayrenc, Kjellberg and Ayala, 1990 ; Tibayrenc *et al.*, 1991 ; Tibayrenc *et al.*, 1993 ; Tibayrenc, 1995-a ; 1995-b). Ainsi, l'analyse du déséquilibre de liaison constitue une approche robuste et parcimonieuse, elle est bien adaptée à la génétique des populations des micro-organismes (Tibayrenc, 1995-a ; 1995-b ; 1999).

Les statistiques utilisées pour les tests de génétique des populations prennent comme hypothèse nulle une situation panmictique, car c'est la seule situation dont les prédictions théoriques sont bien codifiées.

Mycobacterium tuberculosis étant un organisme haploïde, seuls les tests de recombinaison sont utilisés dans ce travail. De plus, comme l'analyse du déséquilibre de liaison requière des locus indépendants, le choix des techniques de typage portera sur des marqueurs multilocus.

1.2.4 Typage moléculaire de *M. tuberculosis*

Dans les 20 dernières années, l'épidémiologie moléculaire est devenue un champ de recherche incontournable pour toutes les études épidémiologiques des maladies infectieuses. Cette discipline permet de comprendre la transmission, la pathogenèse et l'étiologie d'une maladie dans les populations humaines (voir publication 1, annexe 15). Chez l'espèce *M. tuberculosis*, l'adoption de l'épidémiologie moléculaire a grandement amélioré la compréhension de la transmission et le contrôle de la maladie (Murray and Nardell, 2002). En effet, le

développement de différentes techniques de typage moléculaire a rendu possible la distinction entre les isolats de *M. tuberculosis* (Poulet and Cole, 1995 ; Ross *et al.*, 1992).

Chaque marqueur moléculaire et plus particulièrement chaque séquence étudiée a une vitesse d'évolution et donc un taux d'accumulation des mutations qui lui est propre. Ce phénomène est appelé horloge moléculaire. Pour chaque étude de génétique ou de phylogénie, il est important de choisir des marqueurs possédant une horloge moléculaire adaptée aux objectifs scientifiques fixés. Par exemple, pour étudier la phylogénie entre les différentes espèces du genre *Mycobacterium*, il est nécessaire d'utiliser un marqueur avec une horloge moléculaire lente comme l'ARN ribosomique 16S (Rogall *et al.*, 1990). D'autre part, pour réaliser des études d'épidémiologie moléculaire en sympatrie, il est indispensable de travailler avec des marqueurs à horloge moléculaire rapide comme par exemple les techniques RFLP-IS6110 ou MIRU-VNTR.

1.2.4.1 Ribotypage

Chez les bactéries, la différenciation des souches peut être réalisée par ribotypage, une technique utilisant une partie de la séquence codante de l'ARN_r, comme sonde (Stull, LiPuma and Edlind, 1988). Les mycobactéries sont caractérisées par la présence d'un seul ou 2 opérons d'ARN_r (Bercovier, Kafri and Sela, 1986), le polymorphisme entre les souches est donc limité. Par conséquent, cette approche n'est pas appropriée pour le typage de ces bactéries.

1.2.4.2 Typage des phages

C'est une méthode phénotypique qui permet de distinguer différentes souches de *M. tuberculosis* (Snider, Jones and Good, 1984). Cette technique a apporté les premières informations concernant l'épidémiologie de la tuberculose (Baess, 1969 ; Tokunaga, Maruyama and Murohashi, 1968). Le typage des phages est une méthode laborieuse et elle demande beaucoup de temps. Un autre inconvénient de cette méthode est qu'elle est capable d'identifier seulement un petit nombre de types de bactériophages.

I.2.4.3 Principaux outils de caractérisation moléculaire chez M. tuberculosis

I.2.4.3.1 RFLP-IS6110 (Restriction F ragment Length Polymorphism)

Cette technique est décrite dans van Soolingen *et al.* (1994). Brièvement, la technique RFLP-IS6110 est basée sur l'utilisation d'une enzyme de restriction (*PvuII*) coupant spécifiquement au niveau des séquences d'insertion IS6110. Les fragments de restriction sont ensuite révélés, après migration électrophorétique et transfert sur membrane par « Southern blot », par hybridation avec des sondes froides spécifiques des séquences IS6110. Le polymorphisme de ces profils reflète le nombre de séquences d'insertion présentes sur le génome du stock à l'étude.

La séquence d'insertion IS6110 représente le marqueur le plus couramment utilisé pour les études épidémiologiques de la tuberculose. La technique RFLP basée sur cet élément est considérée comme la technique standard (van Embden *et al.*, 1993 ; van Soolingen *et al.*, 1993), cependant elle présente quelques inconvénients. En effet, elle nécessite une grande quantité de matériel (ADN), ce qui correspond à beaucoup de temps car la culture de *Mycobacterium* est très longue (en moyenne 4 semaines), de plus cette technique comprend plusieurs étapes relativement lourdes. Par ailleurs, le pouvoir de résolution de cette approche moléculaire est diminué lorsque les isolats de *M. tuberculosis* présentent un faible nombre de copies IS6110 (1 à 6 copies), voire aucune copie IS6110. Dans ce cas, l'utilisation d'autres marqueurs génétiques pour la différenciation de ces isolats est indispensable (Kremer *et al.*, 1999).

Il est à noter également que cette technique ne peut pas être utilisée pour les analyses de génétique des populations basées sur l'étude du déséquilibre de liaison, car la variabilité détectée n'est pas liée à des locus génétiques indépendants.

I.2.4.3.2 Mixed-linker PCR

C'est une technique de PCR qui amplifie la séquence IS6110. Un profil de bandes comparable à celui trouvé par RFLP-IS6110 est obtenu (Haas *et al.*, 1993). Toutefois, la technique standard reste plus discriminante. Les avantages de cette méthode basée sur la technique PCR sont : le gain de temps et son application directe sur des prélèvements cliniques.

I.2.4.3.3 Spoligotyping

C'est une autre méthode utilisée pour distinguer les isolats de *M. tuberculosis*. Elle consiste en une amplification PCR de groupes de répétitions directes (DR) séparés par des séquences « spacer » uniques (Kamerbeek *et al.*, 1997 ; van Embden *et al.*, 2000 ; Sola *et al.*, 2001-a). 10 à 50 copies de DRs sont présentes chez *M. tuberculosis*, et les DRs comportent 1 ou 2 copies de l'élément IS6110. La variabilité dans le nombre des copies de DRs permet par conséquent de mettre en évidence le polymorphisme entre les isolats.

Même si l'analyse RFLP avec l'élément IS6110 a une forte valeur de discrimination, le spoligotyping a certains avantages (Kamerbeek *et al.*, 1997 ; van Soolingen *et al.*, 1993). La technique peut être appliquée directement sur les échantillons cliniques, elle est donc utile dans les infections nosocomiales.

I.2.4.3.4 MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units - Variable Number of Tandem Repeats)

Outre les séquences d'insertion, des marqueurs basés sur des séquences VNTRs (Variable Number of Tandem Repeats) ont été également décrits dans le génome de *M. tuberculosis* (Frothingham and Meeker-O'Connell, 1998 ; Skuce *et al.*, 2002). Les éléments MIRUs (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units) sont des séquences minisatellites-like présentes dans le complexe *M. tuberculosis*. Ces structures génétiques sont comparables à celles observées pour certains minisatellites humains (Magdalena *et al.*, 1998 ; Supply *et al.*, 1997 ; 2000).

La technique MIRU-VNTR représente la dernière technique en date utilisée pour le typage des isolats de *M. tuberculosis*. Cette technique est basée sur l'étude par PCR de ces éléments de 40 à 100 pb répétés en tandem et répartis dans les régions intergéniques du génome de *M. tuberculosis*. 12 locus ont montré du polymorphisme génétique dans le nombre de copies de l'unité de répétition, mais également des variations dans la séquence entre ces unités de répétition. L'étude des MIRUs a montré ses potentialités pour l'épidémiologie moléculaire de la tuberculose (Supply *et al.*, 2001 ; Mazars *et al.*, 2001). Contrairement aux techniques précédemment décrites, les MIRUs sont des marqueurs multilocus. Ils peuvent donc être utilisés pour l'analyse de génétique des populations.

I.2.4.3.5 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

La technique RAPD (également appelée AP-PCR, Arbitrary Primed Polymerase Chain Reaction), décrite en 1990, est une méthode simple et rapide d'empreinte d'ADN (Welsh and McClelland, 1990 ; Williams *et al.*, 1990). Cette technique est basée sur l'amplification de l'ADN (PCR ou Polymerase Chain Reaction) par des amorces décamériques de séquence aléatoire. Une des différences avec la PCR classique est que les séquences d'ADN amplifiées sont inconnues. Aucune information préalable sur le génome analysé n'est donc nécessaire. Cette méthode a été utilisée avec succès pour le typage des protozoaires parasites (Tibayrenc *et al.*, 1993 ; Hide, Bañuls and Tibayrenc, 2001 ; Brisse, Barnabé and Tibayrenc, 2000). Elle a apporté également des résultats intéressants pour le typage des souches de *M. tuberculosis* (Linton *et al.*, 1994 ; Harn *et al.*, 1997 ; Richner, Meiring and Kirby, 1997).

La méthode RAPD est un exemple de marqueur généraliste. Les marqueurs généralistes peuvent être utilisés pour caractériser n'importe quel organisme. Cette caractéristique permet la comparaison de la diversité génétique obtenue avec ces marqueurs pour différents organismes (Tibayrenc, 1995-a et 1995-b). Au contraire, les techniques précédemment décrites sont des marqueurs spécialistes, et donc ne peuvent être utilisées que sur des espèces données ou sur un groupe donné d'espèces.

I.3 La tuberculose dans le monde

La tuberculose représente un problème majeur de santé publique. Elle demeure la première cause de mortalité due à un agent infectieux unique (Dolin, Raviglione and Kochi, 1994 ; Raviglione, Snider and Kochi, 1995 ; Dye *et al.*, 1999). Elle touche principalement l'appareil respiratoire, mais elle existe également sous forme extra-pulmonaire. Une personne tuberculeuse non traitée peut infecter de 10 à 15 personnes en moyenne chaque année.

Avec près de 3 millions de décès par an, la tuberculose figure à la cinquième place des causes de mortalité après les maladies cardiovasculaires, les infections respiratoires aiguës, le cancer, et les maladies diarrhéiques. Au cours des 10 dernières années, le nombre de cas de tuberculose dans le monde a augmenté de 20%. Si les tendances actuelles se maintiennent, il devrait y avoir 10,2 millions de nouveaux cas en 2005.

Plus de 90% des cas de tuberculose surviennent dans les pays en voie de développement (voir annexe 1). Les régions les plus concernées par cette maladie sont l'Afrique, l'Asie du Sud-Est, et l'Europe de l'Est. On estime que plus de 1,5 millions de cas de tuberculose par an sont enregistrés en Afrique Sub-Saharienne.

La recrudescence de la tuberculose est fortement liée à l'augmentation des cas VIH et des problèmes de multirésistance aux drogues. Dans beaucoup de pays en voie de développement, la tuberculose s'avère la maladie opportuniste la plus importante associée à l'infection par le VIH (voir annexe 2). En effet, l'infection VIH aggrave la situation tuberculeuse par une réactivation de l'infection tuberculeuse latente, ainsi qu'en favorisant la progression rapide d'infections nouvelles chez les malades VIH positifs (Harries, 1990).

A l'heure actuelle, les programmes de lutte antituberculeuse doivent tenir compte des différents paramètres impliqués dans la maladie, dont les principaux sont les suivants (Bloom and Murray, 1992) :

- l'association avec le SIDA ;

- l'existence des souches multirésistantes ;
- l'efficacité réduite du BCG ;
- la pauvreté ;
- et le mouvement des populations.

I.4 Transmission et pathogenèse de la tuberculose

I.4.1 Transmission de la bactérie *M. tuberculosis*

Éliminés dans l'air par les malades bacillifères parlant, toussant ou éternuant, les bacilles tuberculeux peuvent être inhalés par tout sujet à proximité. L'inhalation de ces aérosols, petites particules aérodynamiques, connues sous le nom de gouttelettes de Flugge, expose à l'infection tuberculeuse, ce qui fait de la tuberculose une maladie à transmission interhumaine. Ces particules peuvent également sédimenter dans la poussière qui servira alors de réservoir.

Le nombre de gouttelettes excrétées par le malade est normalement faible, mais lors d'une toux prolongée, 3.500 particules sont émises, ce qui équivaut à 5 minutes de discussion sur un ton normal, et un éternuement peut émettre jusqu'à 1 million de particules infectieuses. L'infection orale par *M. tuberculosis* est environ 10.000 fois moins efficace que la voie respiratoire, car la plupart des bacilles ingérés sont détruits au niveau de la barrière acide de l'estomac.

I.4.2 Pathogenèse de la maladie de tuberculose

Parmi les particules infectantes inhalées, celles qui ne mobilisent pas plus de 2 ou 3 bacilles peuvent atteindre les alvéoles pulmonaires, et entamer le processus d'infection, tandis que les autres, plus volumineuses, sont arrêtées en amont, et sont éliminées (Dannenberg, 1989). La survenue d'une infection et d'une maladie tuberculeuse met en jeu 4 stades successifs aboutissant à la forme pulmonaire de la tuberculose. Toutefois, l'atteinte extra-pulmonaire peut avoir lieu également, elle est peu ou pas contagieuse.

1.4.2.1 Stade 1 : Phagocytose des bacilles

Les bacilles qui atteignent les alvéoles pulmonaires sont phagocytés par les macrophages matures. Cette étape représente le premier stade de l'infection, elle s'établit dès la première semaine suivant l'inhalation des particules. La progression de l'infection va dépendre de 2 facteurs principaux : la virulence du bacille infectant d'une part, et l'activité bactéricide du macrophage d'autre part. Le plus souvent, les bactéries sont détruites par les macrophages alvéolaires, et l'infection est arrêtée à ce stade. Dans le cas contraire, les bactéries entament un cycle de multiplication intracellulaire (McDonough, Kress and Bloom, 1993 ; Sturgill-Koszycki *et al.*, 1994).

1.4.2.2 Stade 2 : Multiplication intracellulaire des bacilles

Le deuxième stade de l'infection est l'étape de multiplication intracellulaire des bacilles, ou stade symbiotique. Cette étape s'étend du 7^{ème} au 21^{ème} jour. Les bactéries qui n'ont pas été éliminées par les macrophages alvéolaires, vont se multiplier de façon exponentielle à l'intérieur de ceux-ci, elles seront ensuite libérées dans le milieu lors de la lyse cellulaire. Par un processus de chimiotactisme, des macrophages circulants vont phagocyter à leur tour les bactéries libérées, qui continuent leur croissance exponentielle dans les cellules. Comme l'organisme n'a pas encore déclenché sa réponse immunitaire, il va donc se créer une symbiose entre les macrophages et les bactéries. Ainsi, à l'issue de ce deuxième stade, un nombre considérable de macrophages et de bacilles se trouve concentré au niveau des lésions pulmonaires précoces (Dannenberg, 1989).

1.4.2.3 Stade 3 : Phase stationnaire

Suite à l'induction de la réponse immunitaire de l'hôte, particulièrement la réaction immunitaire à médiation cellulaire, la croissance des bactéries devient stationnaire (Parrish, Dick and Bishai, 1998). C'est le troisième stade de l'infection, connu sous le nom de primo-infection. Par une réaction d'hypersensibilité retardée, les macrophages dans lesquels les bacilles se multiplient sont détruits. Les produits cellulaires et bactériens toxiques sont alors relargués dans le milieu, et cela conduit à la formation de nécroses caséuses solides (Orme, 1998).

Autour du centre caséux, se trouvent alors des macrophages inactivés, qui permettent la croissance des bactéries, et des macrophages matures, qui détruisent les bactéries libérées. Un pseudo-équilibre s'établit entre les macrophages matures et inactivés. Le centre caséux régresse si les bacilles libérés sont phagocytés par les macrophages matures, ou il s'étend si les bacilles se multiplient dans les macrophages inactivés. A ce stade, la progression de la maladie dépend donc du type de macrophage qui prédomine (Dannenberg, 1989 ; 1991).

1.4.2.4 Stade 4 : Forme pulmonaire de la tuberculose

Quand l'équilibre entre les macrophages matures et inactivés est rompu, l'infection atteint alors son dernier stade, celui de la maladie proprement dite, la tuberculose pulmonaire. Cette étape se caractérise par la liquéfaction des centres caséux, entraînant la formation de cavités détectées en radiographie pulmonaire. Le matériel liquéfié des cavités constitue un excellent milieu de croissance bactérienne, de plus les macrophages n'y survivent pas.

A ce stade de la maladie, la personne devient contagieuse par l'expectoration de bacilles dans le milieu ambiant. De plus, en l'absence de traitement, le sujet développe le plus souvent une tuberculose chronique avec une destruction progressive du tissu pulmonaire, entraînant la mort à plus ou moins long terme.

1.5 Symptômes et catégories de la tuberculose pulmonaire

La tuberculose touche toutes les tranches d'âge et elle peut impliquer différents organes, mais la forme majoritaire reste celle qui affecte les poumons. Une personne atteinte de la tuberculose pulmonaire présente les symptômes suivants :

- une toux prolongée, accompagnée souvent d'expectoration muccopurulente ;
- des douleurs thoraciques ;
- et des signes généraux à savoir l'anorexie, la perte de poids, l'asthénie, les sueurs nocturnes, et la fièvre.

Les patients atteints d'une tuberculose pulmonaire sont classés en différentes catégories. En effet, chaque catégorie nécessite un régime de traitement propre. Les principales catégories de la tuberculose pulmonaire sont les suivantes :

Nouveau cas :

C'est une tuberculose chez un patient n'ayant jamais reçu de traitement antituberculeux ou l'ayant reçu pendant moins d'un mois.

Rechute :

C'est une forme de tuberculose antérieurement traitée et déclarée guérie après une durée suffisante de traitement et qui devient à nouveau une tuberculose active.

Tuberculose chronique :

C'est un cas de rechute dont l'examen microscopique des expectorations reste toujours positif après un régime de retraitement complet.

Résistance primaire :

Elle est rencontrée chez les malades qui n'ont jamais été traités par des médicaments antituberculeux, mais qui ont été contaminés par des bacilles résistants transmis par des patients déjà traités.

Cas de multirésistance :

Il s'agit de cas de tuberculose dont les bacilles sont résistants aux 2 antibacillaires majeurs (isoniazide et rifampicine) ou plus.

I.6 Traitement de la tuberculose

Le traitement de toutes les catégories de tuberculose repose sur la prise régulière d'antibiotiques. Ce traitement est long et coûteux, ce qui explique l'augmentation des fréquences de rechute et des cas de multirésistance.

Les antituberculeux peuvent être classés en 2 groupes :

- les antibiotiques de première ligne comprenant l'isoniazide, la rifampicine, la pyrazinamide, l'éthambutol, et la streptomycine ;
- et les antibiotiques de seconde ligne comportant l'acide p-aminosalicylique, l'éthionamide, la cyclosérine, la kanamycine, la capréomycine, et l'amikacyne.

La durée minimale du traitement est de 6 mois, et elle varie selon la catégorie de tuberculose diagnostiquée. Il s'agit d'une polychimiothérapie reposant sur l'utilisation combinée de plusieurs antibiotiques. Par exemple, pour le traitement des nouveaux cas de tuberculose pulmonaire, le régime thérapeutique dure 6 mois. La première phase, à rôle bactéricide, dure 2 mois, et associe l'isoniazide, la rifampicine, la pyrazinamide, et la streptomycine. Pour les 4 mois suivants, la stérilisation définitive est assurée par les 2 antituberculeux majeurs, l'isoniazide et la rifampicine.

I.7 Résistance aux antituberculeux

Dans une situation idéale de prescription thérapeutique adéquate et de suivi correct du traitement, le taux de guérison est de plus de 90%, quel que soit l'état immunitaire général du patient. Cependant, la longueur et le coût du traitement, et le manque de programme efficace de surveillance des patients, peuvent susciter le malade à interrompre sa thérapie. De plus, une mauvaise administration des médicaments peut conduire à la sélection de germes résistants à un ou plusieurs antituberculeux.

La résistance peut être classée en 2 catégories : la résistance primaire, qui est due à l'infection par une souche préalablement résistante, et la résistance secondaire acquise, qui est la conséquence de la sélection de bacilles résistants suite à un traitement inadapté ou insuffisant. Des antituberculeux de deuxième ligne peuvent être utilisés en cas de résistance, mais ils présentent le plus souvent une toxicité secondaire, et la durée du traitement est plus longue jusqu'à 24 mois.

A l'heure actuelle, la résistance concerne principalement les personnes immunodéprimées (séropositives, sans-abri, alcooliques, toxicomanes), mais la transmission de ces bacilles résistants touche aussi les personnes immunocompétentes, ces individus constituent alors des « réservoirs » pour d'éventuelles contaminations.

Des micro-épidémies de tuberculose résistante à plusieurs antibiotiques, principalement aux 2 antituberculeux majeurs (isoniazide et rifampicine), sont recensées de plus en plus fréquemment aussi bien dans les pays en voie de développement que dans les pays développés (Small *et al.*, 1993 ; Snider and Roper, 1992 ; Frieden *et al.*, 1993).

En plus de la nécessité de développer de nouveaux médicaments antituberculeux, il est important d'élucider les mécanismes moléculaires de la résistance bactérienne. L'identification rapide des souches résistantes est également d'une grande importance.

I.8 Vaccination au BCG et test à la tuberculine

I.8.1 Vaccination au BCG

Mis au point au cours des années 20 par Calmette et Guérin, le BCG est une souche atténuée de *Mycobacterium bovis*, l'agent de la tuberculose bovine. L'immunité induite par le BCG est de type cellulaire, et la réaction d'hypersensibilité retardée de l'hôte peut être mesurée par une intradermoréaction à la tuberculine. Cependant, l'efficacité de la vaccination BCG est assez critiquée, et son activité protectrice est très controversée (Colditz *et al.*, 1994 ; Behr, 2002).

Bien que le BCG ait montré son aptitude pour la prévention des formes les plus graves de la tuberculose (méningite tuberculeuse, tuberculose miliaire), notamment chez les enfants, son efficacité de protection contre la forme pulmonaire classique serait plus contestable. En effet, les études entreprises ont révélé une grande hétérogénéité des résultats, avec des efficacités variant de 0 à 80%, selon

les pays et les populations vaccinées (Fine, 1989). Le BCG, vaccin vivant atténué, est contre-indiqué dans la prévention de la tuberculose associée au SIDA, du fait du risque potentiel d'induire une infection. La vaccination BCG est également contre-indiquée chez les personnes qui souffrent d'autres formes d'immunosuppression.

1.8.2 Test à la tuberculine

Le test à la tuberculine montre la réponse d'immunité cellulaire aux bacilles tuberculeux. C'est l'outil diagnostique utilisé partout dans le monde. Une petite quantité d'une protéine purifiée de la tuberculine (PPD : Purified Protein Derivative), est injectée au niveau de l'avant-bras. La réaction est positive si on obtient une rougeur et une induration de la peau 48 à 72 h après l'injection. Cependant, ce test n'apporte aucune information sur la présence d'une maladie active. Les personnes vaccinées au BCG vont montrer une réaction positive liée au vaccin même quand aucune infection par la tuberculose n'est présente (Cainelli and Vento, 2002). Le test à la tuberculine reste toutefois un test sûr pour vérifier la présence de bacilles tuberculeux, tout dépend du diamètre de la rougeur obtenue suite à l'administration de la tuberculine.

1.9 Diagnostic de l'espèce *M. tuberculosis*

Le diagnostic du bacille tuberculeux est basé sur les étapes suivantes :

- la mise en évidence à l'examen microscopique des bacilles acido-alcool-résistants, caractéristique de toutes les espèces du genre *Mycobacterium* ;
- la culture sur milieu solide à l'œuf de Löwenstein-Jensen pour l'identification et la distinction de l'espèce *M. tuberculosis* des autres espèces du complexe *M. tuberculosis* et des autres mycobactéries ;
- et l'antibiogramme sur milieu solide de Löwenstein-Jensen.

1.9.1 Examen microscopique

La recherche des bacilles acido-alcool-résistants (BAAR) à l'examen microscopique après coloration est la première étape du diagnostic de la

tuberculose. La méthode de coloration classique est celle de Ziehl-Neelsen, à la fuchsine phéniquée (voir figure 1, p12), elle est souvent remplacée par une méthode de coloration fluorescente, à l'auramine (Lepeuple, Vivien and Thibier, 1970). Dans ce cas, la lecture au microscope du frottis coloré est plus aisée et surtout plus rapide. L'examen microscopique n'est malheureusement pas sensible puisqu'il faut que le produit pathologique contienne au moins 10^4 bacilles/ml pour que la probabilité d'en observer au moins 1 sur le frottis atteigne 95%.

1.9.2 Culture

1.9.2.1 Les milieux de culture

La culture est un moyen très sensible pour détecter la présence de bacilles de la tuberculose dans un produit pathologique. Son inconvénient majeur est la lenteur avec laquelle elle devient positive. En raison du temps de division prolongée de l'espèce *M. tuberculosis* (de l'ordre de 20 heures), les résultats de la culture ne sont en effet disponibles qu'après 3 à 4 semaines en moyenne.

Le milieu de culture le plus utilisé est le milieu de Löwenstein-Jensen qui est un milieu solide à l'œuf (Grosset, Boisvert and Truffot-Pernot, 1990). L'ensemencement est généralement précédé par une étape d'homogénéisation-décontamination pour éliminer les micro-organismes commensaux dont la croissance rapide pourrait recouvrir celle du bacille tuberculeux (Parrot *et al.*, 1976).

Pour pallier la relative lenteur de développement des colonies de *M. tuberculosis* sur milieu de culture solide, une méthode de détection rapide de la croissance a été mise au point, il s'agit de la respirométrie radiométrique ou système BACTEC (Morgan *et al.*, 1983). Celle-ci est basée sur la mesure de la quantité de gaz carbonique (CO_2) marqué au carbone 14 (^{14}C). Le CO_2 est libéré par les bacilles au cours de leur multiplication en milieu de culture liquide où la seule source de carbone est l'acide palmitique marqué par le ^{14}C . Des quantités même minimales de CO_2 marqué pouvant être mesurées, la croissance de *M. tuberculosis* est détectée très précocement, en moyenne en 8 ou 14 jours selon que les produits pathologiques sont à examen microscopique positif ou négatif.

1.9.2.2 Identification de l'espèce *M. tuberculosis*

Lorsque la culture est positive sur milieu solide ou en milieu liquide et qu'elle est constituée de bacilles acido-alcool-résistants, il reste à identifier l'espèce de la mycobactérie isolée (Grosset, Boisvert and Truffot-Pernot, 1990 ; Grosset *et al.*, 1991). Des critères morphologiques et biochimiques permettent alors de faire la distinction formelle entre l'espèce *M. tuberculosis* des autres espèces du complexe *M. tuberculosis* et des mycobactéries atypiques (voir tables II et III).

Il est aujourd'hui possible d'identifier les cultures de *M. tuberculosis* par hybridation avec des sondes génomiques et par amplification (Middleton, Chadwick and Gaya, 1997 ; Wang and Tay, 2002 ; Nolte *et al.*, 1993). Toutefois, elles restent moins sensibles que la culture.

Table II : Tests biochimiques permettant la différenciation des bacilles de la tuberculose (complexe *M. tuberculosis*) des mycobactéries atypiques.

	Catalase		PAS	Niacine
	22°C	68°C		
Bacilles de la tuberculose	+	0	S	+
Mycobactéries atypiques	+++	+	R	-

PAS : acide para-amino-salicylique, S : sensible, R : résistant.

Table III : Tests d'identification des principales espèces du complexe *Mycobacterium tuberculosis*.

Mycobactéries	Aspect des colonies	Croissance favorisée par pyruvate	TCH 2 mg/l	PZA 200 mg/l	CS 30 mg/l	Nitrates	Niacine
<i>M. tuberculosis</i>	eugonique, rugueux	-	R	S	S	+	+
<i>M. africanum</i>	dysgonique, rugueux	+	S (v)	S	S	(v)	(v)
<i>M. bovis</i>	dysgonique, lisse	+	S	R	S	-	-
<i>M. bovis</i> , BCG	eugonique, rugueux	-	S	R	R	-	-
TCH : hydrazide de l'acide thiophène carboxylique, PZA : pyrazinamide, CS : cyclosérine, v : variable, R : résistant, S : sensible.							

I.9.3 Etude de la sensibilité aux antibiotiques

L'antibiogramme est le complément du diagnostic bactériologique de la tuberculose. La méthode employée est celle des proportions sur milieu solide, ou en milieu liquide dans le système BACTEC (Canetti, Rist and Grosset, 1963 ; Hawkins, Wallace and Brown, 1991).

La méthode des proportions, qui est la méthode de référence, est basée sur la mesure de la proportion des mutants résistants aux antibiotiques présents dans la souche *M. tuberculosis* étudiée. L'ensemencement de plusieurs dilutions de la suspension microbienne sur des tubes avec et sans antibiotique permet par conséquent de déterminer la proportion de bacilles résistants aux antibiotiques. La souche *M. tuberculosis* est déclarée sensible lorsque cette proportion est inférieure à 1% pour l'isoniazide, la rifampicine, la streptomycine, et l'éthambutol, et lorsqu'elle est inférieure à 10 % pour les autres antibiotiques antituberculeux.

I.10 La tuberculose au Maroc

En raison de sa forte incidence (104 nouveaux cas pour 100.000 habitants), la tuberculose au Maroc est un problème majeur de santé publique (voir annexe 3). Selon le dernier rapport du programme de lutte antituberculeuse (Ministère de la Santé, Rabat, Maroc), le taux de mortalité reste encore élevé : aux environs de 2,5% pour l'ensemble du pays avec des variations allant de 1 à 9% selon les différentes provinces marocaines.

Au Maroc, comme dans plusieurs autres pays, la tuberculose touche principalement les niveaux socio-économiques défavorisés. L'infection au VIH reste encore peu préoccupante avec une séroprévalence de 2/10.000 personnes pour l'année 1997 (Ottmani *et al.*, 1998). La tuberculose affecte généralement toutes les tranches d'âge, et plus particulièrement les jeunes adultes (voir annexe 4). Au Maroc, les enfants de moins de 10 ans sont également concernés, ils représentent environ 6% des cas de tuberculose. Le poumon reste le site privilégié de l'infection tuberculeuse (voir annexe 5). Pour les formes extra-pulmonaires, les atteintes pleurales sont les plus communes.

Dans cette partie, les stratégies de lutte antituberculeuse au Maroc seront détaillées et nous développerons également le cas de la tuberculose à Casablanca.

I.10.1 La lutte antituberculeuse au Maroc

I.10.1.1 Les objectifs du programme national de lutte antituberculeuse

En 1991, le programme national de lutte antituberculeuse a été restructuré suite à l'application de la stratégie DOTS (Directly Observed Treatment Short-course) développée par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé). Ainsi, pour mieux contrôler et réduire la transmission du bacille, le programme national de lutte antituberculeuse a établi des objectifs dont les principaux sont les suivants :

- appliquer la chimiothérapie standard de courte durée (6 mois) pour tous les nouveaux cas de tuberculose pulmonaire à microscopie positive. Ces nouveaux cas représentent plus de 85% des cas de tuberculose pulmonaire pris en charge ;

- traiter toutes les autres formes de tuberculose une fois le diagnostic établi ;

- et maintenir à plus de 90% la couverture vaccinale au BCG chez les nouveau-nés.

1.10.1.2 Les différentes catégories de la tuberculose

Selon les priorités thérapeutiques établies par le programme national de lutte antituberculeuse, les formes de tuberculose sont classées en 4 catégories qui imposent différents régimes de traitement :

- la catégorie I regroupe tous les nouveaux cas de tuberculose pulmonaire à microscopie positive et les formes graves de tuberculose. Elle constitue la priorité majeure pour le traitement ;

- la catégorie II comprend les cas de rechute et d'échec au traitement. Les personnes appartenant à cette catégorie ont un risque élevé de développer une tuberculose multirésistante, le régime de retraitement doit être totalement supervisé ;

- la catégorie III rassemble les formes de tuberculose pulmonaire à microscopie négative et les cas de primo-infection chez les enfants et les jeunes adolescents ;

- et la catégorie IV regroupe les cas chroniques et multirésistants. Les patients doivent être transférés dans l'un des 2 centres hospitaliers nationaux (Hôpital Avicenne à Rabat, et Hôpital Ibn Rochd à Casablanca) pour une prise en charge adéquate. Le régime de traitement est souvent difficile, et les antibiotiques utilisés sont les antituberculeux de seconde ligne.

1.10.1.3 Les modalités de prise en charge des patients tuberculeux

Avant de commencer le traitement dans la formation sanitaire la plus proche, le malade doit être pris en charge de façon effective par le médecin responsable. Cette prise en charge comporte les étapes suivantes :

- l'entretien avec le malade pour lui fournir toutes les informations nécessaires concernant sa maladie. Au Maroc, la tuberculose touche les milieux défavorisés, et les personnes atteintes de cette maladie sont généralement inconscients de l'importance d'un régime de traitement respecté compte tenu de la durée de la thérapie (au minimum 6 mois). Cet entretien servira également d'interrogatoire pour déterminer tous les facteurs de risque impliqués dans cette infection ;

- l'inscription du cas dans le registre de déclaration des malades tuberculeux ;

- l'orientation du malade vers la formation sanitaire de rattachement où il recevra son traitement. Ces formations sanitaires sont communément appelées CDST (Centre de Diagnostic Spécialisé de Tuberculose). L'observance de la chimiothérapie se fera au niveau de ces structures sanitaires, elle représente un facteur essentiel de réussite du traitement et par conséquent du programme de lutte antituberculeuse. C'est également au niveau de ces structures que le patient reçoit les informations et le matériel nécessaire pour le recueil des crachats en vue de l'analyse diagnostique et dans certains cas de la culture de l'agent responsable de son infection ;

- la culture et l'analyse diagnostique sont réalisées dans un des laboratoires nationaux.

Il est important de souligner que tous les cas déclarés n'aboutissent pas à l'obtention d'un isolat de *M. tuberculosis* pour différentes raisons : la catégorie de la tuberculose, le coût des cultures, la contamination des cultures, et l'échec de croissance de certains isolats.

1.10.1.4 Les structures sanitaires

Malgré toutes ces directives de prise en charge totale des patients tuberculeux, l'incidence de la tuberculose au Maroc est toujours élevée (voir annexe 3). Le système de soins et le suivi des patients doivent être plus rigoureux pour pouvoir mieux contrôler la maladie, d'autant plus que les structures sanitaires restent malheureusement encore insuffisantes comme le précise la table IV.

Table IV : Effectif des structures sanitaires au Maroc.

Structures sanitaires au Maroc	Total
CDST	46
Laboratoires nationaux	3
Laboratoires provinciaux	46
Laboratoires de circonscription sanitaire (Dispensaires de quartier)	108
Hôpitaux régionaux	6
Hôpitaux nationaux	2
Lits de phthisiologie	2.061

1.10.2 La tuberculose à Casablanca

Casablanca est la principale ville marocaine. C'est la plus grande ville et le premier centre économique du pays, elle compte plus de 4 millions d'habitants.

La subdivision actuelle de la ville de Casablanca comprend 7 préfectures (voir figure 2) :

- HMAS (Hay Mohammadi Aïn Sebaa) ;
- BMSO (Ben Msik Sidi Othmane) ;
- CA (Casablanca Anfa) ;
- FDS (Fida Derb Sultan) ;
- HHAC (Hay Hassani Aïn Chock) ;

- MOH (Mohammedia) ;
- BZ (Bernoussi Zenata).

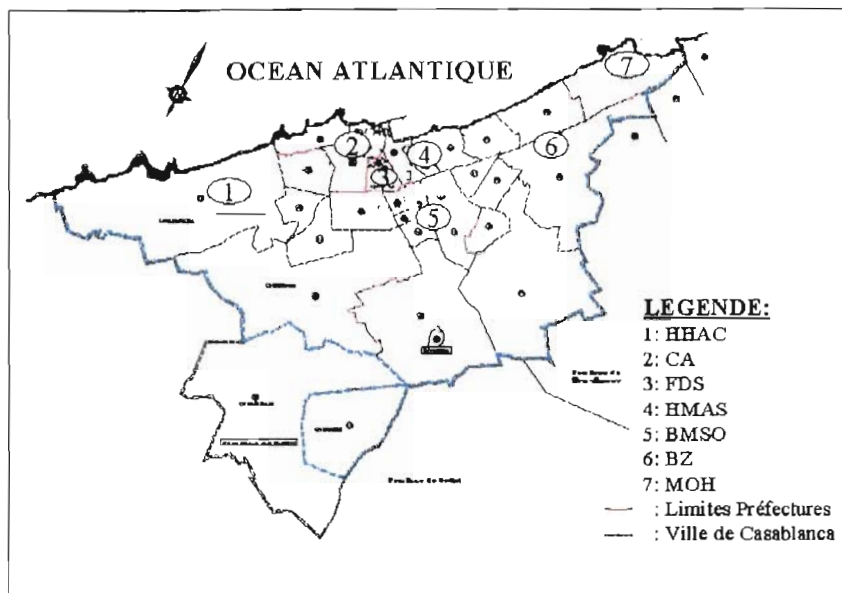


Figure 2. Carte de la ville de Casablanca.

Casablanca est la ville marocaine la plus touchée par la tuberculose, avec près du cinquième des cas totaux enregistrés dans le pays (voir annexes 6 et 7). Selon les dernières statistiques réalisées par le programme national de lutte antituberculeuse, l'incidence de la tuberculose, toute forme confondue, dans la ville de Casablanca, est de l'ordre de 160 nouveaux cas pour 100.000 habitants, alors que l'incidence de la tuberculose pulmonaire à microscopie positive est d'environ 70 nouveaux cas pour 100.000 habitants (voir annexe 8).

Jusqu'à présent, les seules statistiques disponibles quant à l'incidence de la tuberculose concernent uniquement les 6 premières préfectures décrites plus haut. Aucune étude n'a été faite au niveau de la préfecture de Bernoussi Zenata (BZ). Selon les dernières statistiques disponibles, les préfectures HMAS et BMSO sont considérées comme les zones de forte prévalence avec près de 450 et 600 nouveaux cas de tuberculose pulmonaire à microscopie positive respectivement, enregistrés chaque année (voir annexes 5 et 8). La situation socio-économique dans

ces 2 préfectures était depuis longtemps très défavorable par rapport aux autres préfectures. A l'heure actuelle, la disparition des bidonvilles contribue largement au changement de cette situation.

I.10.3 Avancée des recherches sur la tuberculose au Maroc

La tuberculose pose un problème majeur de santé publique au Maroc. Pourtant, très peu d'études ont été réalisées pour comprendre l'épidémiologie de cette maladie. En effet, les seules données disponibles concernent la distribution de la tuberculose dans plusieurs régions marocaines (El Baghdadi *et al.*, 1997-c ; Ottmani *et al.*, 1998 ; Laraqui *et al.*, 2001). Les études génétiques restent limitées, et n'apportent aucune information sur le mode de propagation de cette maladie infectieuse (El Baghdadi *et al.*, 1997-a, 1997-b ; Lazraq *et al.*, 1999).

Au Maroc, comme dans d'autres pays en voie de développement, l'incidence de la tuberculose reste élevée. Cependant, la diversité génétique et la structure des populations de *M. tuberculosis* dans ces pays restent peu connues.

MATERIEL ET METHODES

-Chapitre II-

II Matériel et méthodes

Un total de 177 stocks du complexe *Mycobacterium tuberculosis* a fait l'objet de cette étude. L'échantillon comprend 155 isolats de l'espèce *M. tuberculosis* recueillis au Maroc. Les 22 stocks supplémentaires, utilisés comme stocks de référence, comprennent d'autres stocks *M. tuberculosis* provenant d'autres pays ainsi que d'autres espèces du complexe *M. tuberculosis*. L'ensemble de l'échantillon est analysé par 2 techniques de typage moléculaire : RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) et MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units - Variable Number of Tandem Repeats).

II.1 Description de l'échantillon étudié

II.1.1 Les isolats marocains

Un total de 155 isolats de l'espèce *M. tuberculosis* recueillis au Maroc sont étudiés dans ce travail (voir table V, p41 et 42). La collecte des échantillons ainsi que l'enquête épidémiologique ont été effectuées en collaboration avec le Service des Mycobactéries à l'Institut Pasteur du Maroc à Casablanca (Dr El Baghdadi). L'identification de l'ensemble de la population étudiée comme appartenant à l'espèce *M. tuberculosis* et l'antibiogramme ont été réalisés auparavant au Service des Mycobactéries (Institut Pasteur du Maroc). Une présentation de la préparation du matériel d'étude est décrite en détail dans le paragraphe II.2.1 (p44).

Tous les isolats de *M. tuberculosis* proviennent d'expectorations de 150 patients différents atteints d'une tuberculose pulmonaire et résidant à Casablanca, à l'exception d'un seul isolat (isolat 97, voir table V, p41 et 42). Ce dernier provient d'un patient habitant la ville de Benslimane localisée à 50 kilomètres au nord de Casablanca. La plupart des isolats étudiés a été recueillie au cours des années 1997 et 1998 (voir table V, p41 et 42).

6 préfectures différentes de la ville de Casablanca sont représentées dans notre échantillon (voir table V, p41 et 42). Il s'agit des préfectures suivantes : HMAS (Hay Mohammadi Aïn Sebaa), BMSO (Ben Msik Sidi Othmane), CA (Casablanca Anfa), HHAC (Hay Hassani Aïn Chock), FDS (Fida Derb Sultan), et MOH (Mohammedia) (voir figure 2, p35). La grande majorité des échantillons (101 isolats) provient d'une seule préfecture (HMAS) sélectionnée en raison de l'incidence très élevée de la tuberculose. En effet, selon le programme de lutte antituberculeuse (Ministère de la Santé, Rabat, Maroc), environ 450 nouveaux cas de tuberculose pulmonaire sont enregistrés par an dans cette préfecture (voir annexes 5 et 8).

Pour le choix de l'échantillon, différentes catégories de cette maladie ont été également prises en compte, il s'agit de : la résistance primaire ; la tuberculose familiale ; la tuberculose chronique ; les nouveaux cas ; les suivis thérapeutiques ; et les cas de multirésistance (voir table V, p41 et 42).

Dans la population étudiée, 7 familles différentes comprenant des patients tuberculeux sont incluses dans ce travail (voir table V, p41 et 42). Les isolats de chaque famille sont présentés ci-dessous :

- famille 1 : isolats 20, 21, et 51 ;
- famille 2 : isolats 25 et 55 ;
- famille 3 : isolats 26, 56 et 153 ;
- famille 4 : isolats 34, 37 et 58 ;
- famille 5 : isolats 52 et 53 ;
- famille 6 : isolats 118, et 119 ;
- famille 7 : isolats 131, 132 et 133.

Pour les suivis thérapeutiques, les isolats de 5 patients différents sont étudiés. Pour chacun des patients, 2 isolats sont prélevés de 3 à 9 mois d'intervalle en cours de thérapie (5 et 5', 41 et 41', 56 et 56', 119 et 119', 126 et 126' ; voir table V, p41 et 42).

Au sein de l'échantillon marocain, on retrouve également 16 cas de résistance primaire et 28 cas de multirésistance. Les nouveaux cas, la tuberculose chronique et

les rechutes sont représentés respectivement par 117, 26, et 4 isolats (voir table V, p41 et 42).

Une enquête épidémiologique a été réalisée pour l'ensemble des isolats marocains de *M. tuberculosis* à l'étude. Elle a permis d'obtenir des informations très détaillées sur tous les patients concernés dans ce travail. L'enquête a été réalisée dans les 6 préfectures de la ville de Casablanca, auprès des Centres de Diagnostic Spécialisés de Tuberculose (CDST) propres à chaque préfecture. Ce travail a été fait en collaboration avec le Service des Mycobactéries à l'Institut Pasteur de Casablanca (Dr El Baghdadi).

Pour chaque isolat, les critères suivants ont été recherchés :

- identité du patient et sa date de naissance ;
- CDST auquel est rattaché le patient ;
- catégorie de la tuberculose ;
- date de diagnostic de la tuberculose ;
- antibiogramme ;

La table V (p40 et 41) présente les données épidémiologiques de l'ensemble des stocks inclus dans l'étude.

Une visite au Ministère de la Santé (Dr Bencheikh, Programme National de Lutte Antituberculeuse, Rabat) a permis d'obtenir également les différentes données statistiques sur l'incidence et la répartition de la tuberculose dans les différentes provinces marocaines ainsi qu'à l'échelle du pays (voir annexes 3 à 8).

Table V. Liste des isolats marocains de *M. tuberculosis* et descriptif épidémiologique.

Code	CDST	Sexe	Date de naissance	Date de diagnostic	Catégorie de la tuberculose	Antibiogramme
1	MOH	M	1966	1998	Chronique	R(H,S,R,E) - MDR
2	HMAS	F	1960	2000	Nouveau cas	?
3	HMAS	F	1964	1997	Chronique	R(H,S,R,E) - MDR
4	?	?	?	?	?	?
5', 5	CA	F	1965	1977	Chronique, Suivi	R(H,S,R,E) - MDR
6	HMAS	F	1960	1993	Chronique	R(H,R) - MDR
7	HMAS	M	1953	2000	Nouveau cas	R(H,S) - RI
8	HMAS	M	1970	1998	Nouveau cas	S
9	HMAS	M	1971	1997	Nouveau cas	S
10	HMAS	F	1957	1997	Nouveau cas	S
11	HMAS	M	1975	1998	Nouveau cas	R(H) - RI
12	HMAS	M	1962	1998	Nouveau cas	S
13	HMAS	M	1954	1998	Nouveau cas	S
14	HMAS	M	1980	1998	Nouveau cas	S
16	HMAS	M	1961	1997	Nouveau cas	S
17	HMAS	M	1965	1998	Nouveau cas	S
18	HMAS	F	1974	1998	Nouveau cas	S
19	HMAS	M	1965	2000	Nouveau cas	?
20	HMAS	F	1978	1995	Chronique, Famille 1	R(H,R,E) - MDR
21	HMAS	M	1982	1994	Chronique, Famille 1	R(H,R,E) - MDR
22	CA	M	1959	1977	Chronique	R(H,S,R) - MDR
23	BMSO	M	1980	1997	Chronique	R(H,S,R) - MDR
24	HHAC	F	1974	1996	Chronique	R(H,S,R,E) - MDR
25	CA	M	1964	1991	Chronique, Famille 2	S
26	HMAS	F	1978	1997	Nouveau cas, Famille 3	S
27	HMAS	M	1950	1997	Rechute	R(H,S)
28	CA	M	1956	1978	Chronique	R(S,R)
29	?	?	?	?	?	?
30	?	?	?	?	?	?
31	HMAS	M	1963	1996	Nouveau cas	S
32	HMAS	M	1976	1997	Nouveau cas	R(H,R) - MDR
33	CA	M	1962	1994	Chronique	R(S,R)
34	HMAS	F	1949	1993	Chronique, Famille 4	R(H,S,R) - MDR
35	CA	M	1967	1987	Chronique	R(H,S,R,E) - MDR
36	BMSO	M	1961	1998	Nouveau cas	R(H,R) - MDR
37	HMAS	F	1969	1995	Chronique, Famille 4	R(H,S,R) - MDR
38	HMAS	F	1994	1996	Nouveau cas	S
39	HMAS	F	1977	2000	Nouveau cas	S
40	CA	M	1972	1997	Chronique	S
41, 41'	HMAS	M	1974	2000	Nouveau cas, Suivi	S
42	CA	F	1966	1990	Chronique	R(H,S,R,E) - MDR
43	HMAS	F	1948	1997	Nouveau cas	R(S) - RI
44	BMSO	M	1958	1998	Nouveau cas	S
45	BMSO	M	1960	1998	Nouveau cas	S
46	CA	M	1971	1998	Nouveau cas	S
47	BMSO	F	1962	1998	Nouveau cas	S
48	HHAC	M	1955	1998	Nouveau cas	S
49	BMSO	M	1960	1998	Nouveau cas	S
50	BMSO	F	1961	1998	Nouveau cas	S
51	HMAS	M	1980	2000	Nouveau cas, Famille 1	S
52	CA	M	1969	1992	Nouveau cas, Famille 5	S
53	CA	M	1974	1994	Chronique, Famille 5	R(S)
54	CA	M	1957	1995	Chronique	R(H,S,R,E) - MDR
55	CA	F	1970	1992	Chronique, Famille 2	S
56, 56'	HMAS	M	1979	1995	Rechute, Famille 3, Suivi	R(R)
57	CA	M	1963	1992	Chronique	R(H,S,R,E) - MDR
58	HMAS	F	1982	2000	Nouveau cas, Famille 4	R(S,R) - RI
59	FDS	F	1965	1998	Nouveau cas	R(H,S,R) - MDR
60	BMSO	M	1978	1998	Nouveau cas	R(H) - RI
61	HHAC	F	1963	1998	Nouveau cas	R(H,S,R) - MDR
62	HMAS	M	1977	1997	Nouveau cas	S
63	HMAS	M	1955	1997	Nouveau cas	S
64	HMAS	M	1970	1997	Nouveau cas	S
65	HMAS	M	1958	1997	Nouveau cas	S
66	HMAS	F	1972	1997	Nouveau cas	S
67	HMAS	M	1979	1997	Nouveau cas	S
68	HMAS	F	1926	1997	Nouveau cas	S
69	HMAS	F	1967	1997	Nouveau cas	S
70	HMAS	M	1973	1997	Nouveau cas	S
71	HMAS	M	1982	1997	Nouveau cas	S
72	BMSO	M	1952	1997	Nouveau cas	R(H,R) - MDR
73	HMAS	F	1967	1997	Nouveau cas	S
74	HMAS	F	1979	1997	Nouveau cas	S
75	HMAS	M	1977	1997	Nouveau cas	S
76	HMAS	M	1981	1997	Nouveau cas	R(S) - RI
77	HMAS	M	1967	1997	Nouveau cas	S
78	HMAS	M	1978	1997	Nouveau cas	S
79	HMAS	F	1975	1997	Nouveau cas	S

Code	CDST	Sexe	Date de naissance	Date de diagnostic	Catégorie de la tuberculose	Antibiogramme
80	HMAS	M	1963	1997	Nouveau cas	S
81	HMAS	M	1963	1997	Nouveau cas	S
82	HMAS	M	1968	1997	Nouveau cas	S
83	HMAS	M	1964	1997	Nouveau cas	S
84	HMAS	F	1962	1997	Nouveau cas	S
85	HMAS	F	1964	1997	Nouveau cas	S
86	HMAS	M	1975	1998	Nouveau cas	S
87	BMSO	M	1972	1998	Nouveau cas	R(S) - RI
88	BMSO	F	1957	1998	Nouveau cas	R(H,S,R) - MDR
89	HMAS	M	1963	1998	Nouveau cas	S
90	BMSO	M	1979	1998	Nouveau cas	R(H,S) - RI
91	HMAS	M	1982	1998	Nouveau cas	S
92	HMAS	M	1969	1991	Nouveau cas	S
93	HMAS	M	1971	1997	Nouveau cas	S
94	BMSO	M	1923	1997	Nouveau cas	R(H,S) - RI
95	HMAS	M	1976	1998	Nouveau cas	S
97	Benslimane	M	1963	1987	Chronique	R(H,R) - MDR
98	BMSO	F	1952	1998	Nouveau cas	S
99	CA	F	1963	1998	Nouveau cas	S
100	BMSO	M	1980	1998	Nouveau cas	S
101	BMSO	F	1978	1998	Nouveau cas	S
102	FDS	M	1982	1998	Nouveau cas	S
103	HHAC	M	1965	1998	Nouveau cas	S
104	BMSO	M	1978	1998	Nouveau cas	S
105	HHAC	F	1956	1998	Nouveau cas	R(H) - RI
106	HMAS	M	1967	1998	Nouveau cas	S
107	HMAS	M	1978	1998	Nouveau cas	S
109	BMSO	M	1975	1998	Nouveau cas	S
110	HMAS	F	1964	1998	Nouveau cas	R(S) - RI
111	HMAS	M	1978	1998	Nouveau cas	S
112	HMAS	M	1958	1998	Nouveau cas	R(H) - RI
113	BMSO	M	1964	1998	Nouveau cas	R(H,S) - RI
114	BMSO	M	1974	1998	Nouveau cas	R(H,S,R) - MDR
115	BMSO	F	1962	1998	Nouveau cas	S
116	HMAS	M	1966	1998	Nouveau cas	S
117	HMAS	M	1960	1997	Nouveau cas	R(H,S) - RI
118	HMAS	M	1968	1997	Chronique, Famille 6	?
119, 119'	HMAS	M	1982	2000	Nouveau cas, Famille 6, Suivi	S
120	HMAS	M	1976	1997	Nouveau cas	S
121	HMAS	M	1958	1998	Nouveau cas	S
122	HMAS	F	1960	1998	Nouveau cas	S
123	HMAS	M	1976	1997	Nouveau cas	S
124	HMAS	M	1969	1997	Nouveau cas	S
125	HMAS	M	1954	1998	Nouveau cas	S
126, 126'	HMAS	M	1950	1976	Chronique, Suivi	R(H,R,E) - MDR
127	HMAS	M	1925	1998	Nouveau cas	S
128	HMAS	M	1966	1998	Nouveau cas	S
129	HMAS	F	1972	1998	Nouveau cas	S
130	HMAS	F	1960	1998	Nouveau cas	S
131	HMAS	M	1972	2000	Nouveau cas, Famille 7	S
132	HMAS	M	1974	2000	Nouveau cas, Famille 7	S
133	HMAS	M	1944	2000	Nouveau cas, Famille 7	S
134	HMAS	M	1926	1998	Nouveau cas	S
135	HMAS	F	1976	1997	Nouveau cas	S
136	HMAS	F	1963	1984	Chronique	R(H,S,R,E) - MDR
137	HMAS	M	1940	1997	Nouveau cas	S
138	BMSO	M	1968	1998	Nouveau cas	R(H,S) - RI
139	HMAS	M	1971	1997	Nouveau cas	S
140	HMAS	F	1980	1997	Nouveau cas	S
141	HMAS	M	1954	1998	Nouveau cas	S
142	HMAS	F	1935	1998	Nouveau cas	S
143	FDS	M	1951	1998	Nouveau cas	R(H,S,R) - MDR
144	HMAS	M	1978	1997	Nouveau cas	S
145	HMAS	M	1965	1998	Rechute	R(R)
146	HHAC	M	1970	1998	Nouveau cas	S
147	HMAS	F	1979	1998	Nouveau cas	S
148	HMAS	M	1970	1997	Nouveau cas	S
149	HMAS	F	1981	1997	Nouveau cas	R(H,S) - RI
150	CA	M	1961	1992	Chronique	R(H,S,R) - MDR
151	HMAS	F	1973	1998	Nouveau cas	S
152	MOH	M	1956	1997	Nouveau cas	R(H,S,R) - MDR
153	HMAS	F	1975	1995	Rechute, Famille 3	S

Légende : - **Sexe** : M (Mâle), F (Femelle) ; - **Antibiogramme** : MDR (Multirésistance), RI (Résistance primaire), R(H,S,R,E) (Souche résistante à l'isoniazide « H », streptomycine « S », rifampicine « R », et éthambutol « E »), S (Souche sensible).

II.1.2 Les stocks de référence

Pour réaliser cette étude, l'échantillon marocain est complété par d'autres espèces du complexe *M. tuberculosis* (*M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, et *M. canettii*), ainsi que par d'autres stocks de *M. tuberculosis* originaires d'autres pays (table VI).

22 échantillons sont donc utilisés comme stocks de référence (table VI). A l'exception de 3 stocks marocains de *M. bovis* qui nous ont été fournis par l'Institut Vétérinaire et Agronomique de Rabat au Maroc (Dr Berrada), tous les autres stocks proviennent du Laboratoire des Mécanismes Moléculaires de la Pathogénèse Bactérienne de l'Institut Pasteur de Lille (Dr Supply, Collection de référence de l'Institut National de Santé Publique et de l'Environnement de Bilthoven, Hollande) (Supply *et al.*, 2001 ; Kremer *et al.*, 1999). Tous ces stocks de référence nous ont été fournis sous forme d'ADN.

Table VI. Liste des stocks de référence avec leur origine géographique.

Stock	Code	Espèce	Pays	Caractéristiques
M24	M24	<i>Mycobacterium bovis</i>	Meknès, Maroc	Isolement de bovins
M11	M11	<i>M. bovis</i>	Meknès, Maroc	Isolement de bovins
K5	K5	<i>M. bovis</i>	Kénitra, Maroc	Isolement de bovins
P101	12*	<i>M. tuberculosis</i>	Tunisie	?
P56	62*	<i>M. microti</i>	Angleterre	?
P95	34*	<i>M. tuberculosis</i>	Malaisie	Famille Beijing
P54	92*	<i>M. africanum</i>	Hollande	?
P55	100*	<i>M. africanum</i>	Hollande	?
P62	117*	<i>M. bovis</i>	Argentine	Isolement de bovins
P112	53*	<i>M. tuberculosis</i>	Argentine	?
P118	50*	<i>M. tuberculosis</i>	République Tchèque	?
P25	10*	<i>M. tuberculosis</i>	Equateur	?
P81	11*	<i>M. tuberculosis</i>	Groeland	?
P125	74*	<i>M. tuberculosis</i>	Inde	IS6110 à faibles copies
P129	42*	<i>M. tuberculosis</i>	Tahiti	?
P131	85*	<i>M. bovis</i>	Hollande	Isolement de l'homme
P33	37*	<i>M. tuberculosis</i>	Ouganda	?
P48	116*	<i>M. canettii</i>	Somalie	?
PA1	PA1	<i>M. africanum</i>	France	?
PA2	PA2	<i>M. africanum</i>	?	?
PA3	PA3	<i>M. africanum</i>	Cameroun	?
H37Rv	H37Rv	<i>M. tuberculosis</i>	France	?

Légende : Les stocks marqués d'une (*) sont publiés sous le même code dans Kremer *et al.*, 1999 ; Supply *et al.*, 2001. A l'exception des 3 stocks marocains de *M. bovis* (M24, M11, et K5), tous les autres stocks sont de la collection de référence de l'Institut National de Santé Publique et de l'Environnement de Bilthoven en Hollande (Pr van Embden).

II.2 Techniques et méthodes d'analyse

II.2.1 Culture et inactivation des isolats *M. tuberculosis*

Les mycobactéries sont des pathogènes à transmission aérienne, elles doivent être cultivées en zone réglementée de niveau L3. Pour cette raison, les cultures et les inactivations de l'ensemble des isolats sont réalisées lors d'une mission effectuée au sein du Service des Mycobactéries de l'Institut Pasteur de Casablanca. Ce laboratoire possède le niveau de sécurité de travail nécessaire à la culture de *M. tuberculosis*.

II.2.1.1 Culture des mycobactéries

L'ensemble de la population marocaine destinée à l'étude est préparé à partir d'anciennes cultures conservées à température ambiante dans le Service des Mycobactéries de l'Institut Pasteur de Casablanca. Ces cultures ainsi que les antibiogrammes correspondants ont été réalisés dans le cadre du diagnostic courant de la tuberculose.

Les isolats inclus dans cette étude sont ensemencés dans des tubes contenant le milieu de culture classique Löwenstein-Jensen, qui est un milieu solide à l'œuf. A l'aide d'une anse de platine stérilisée par la chaleur, les colonies de *M. tuberculosis* sont prélevées avec précaution, puis étalées en stries sur le milieu de culture. Toute l'étape de repiquage est réalisée dans des conditions bactériologiques stériles et sous hotte. Les tubes sont ensuite placés dans une étuve à 37°C pour la croissance des mycobactéries. Le temps de division de ces bactéries étant très long, de l'ordre de 20 h, les premières colonies apparaissent au bout de la 3^{ème} semaine et la récolte d'un matériel d'étude suffisant n'est possible qu'au bout de 40 jours à 2 mois.

Après la croissance des bactéries, les colonies de chaque isolat sont recueillies dans un tube contenant 400 µl de TE 10/1 (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM). Cette étape se fait également sous hotte respectant le niveau de sécurité nécessaire

pour la culture de *M. tuberculosis*. 4 tubes de chaque isolat sont préparés pour obtenir une quantité suffisante de bactéries pour toutes les analyses génétiques et permettre la conservation d'une partie à l'Institut Pasteur de Casablanca pour des études ultérieures. Environ 300 isolats ont été repiqués, mais une partie n'a pas pu être récoltée. En effet, certaines cultures étaient contaminées, alors que d'autres n'ont pas poussé.

II.2.1.2 Inactivation des isolats

Compte tenu du mode de transmission de *M. tuberculosis* et pour une sécurité optimale, il est indispensable avant toute expérimentation d'inactiver par la chaleur chaque isolat cultivé. Les tubes contenant les colonies de *M. tuberculosis* en suspension dans du TE, sont placés à 80°C pendant 20 mn. Après inactivation des bactéries, les tubes sont refroidis à température ambiante puis centrifugés à 3.840 g pendant 15 mn. Les surnageants sont éliminés, et les culots bactériens sont gardés à -20°C ou -80°C pour l'extraction d'ADN.

Cette étape est fondamentale. En effet, il est important de respecter consciencieusement la température et le temps d'incubation des suspensions bactériennes. L'ADN des mycobactéries étant fragile, une exposition prolongée à 80°C ou à une température plus élevée risque de provoquer une dégradation du matériel génétique. Une autre étape importante est la conservation au froid des culots de bactéries. Celle-ci doit impérativement être respectée pour obtenir des ADNs en bon état. La qualité de l'ADN est, en effet, un facteur important pour les analyses de typage moléculaire, et particulièrement pour la standardisation de la technique RAPD.

II.2.2 Extraction de l'ADN

A partir des culots inactivés et conservés, les ADNs sont extraits pour l'ensemble de la population marocaine de *M. tuberculosis*. Compte tenu des problèmes de dégradation d'ADN que nous avons rencontrés, nous avons testé deux techniques d'extraction différentes : le protocole au Phénol-Chloroforme, et le protocole au CTAB (CetylTrimethylAmmonium Bromide).

II.2.2.1 Protocole au Phénol-Chloroforme

Le protocole d'extraction utilisé est similaire à celui décrit dans Torrea *et al.*, 1995.

II.2.2.1.1 Lyse des bactéries

Les culots bactériens inactivés sont repris dans un volume de 250 µl de solution de lyse (Saccharose 25%, Tris-HCl 50 mM, EDTA 50 mM, Lysozyme 500 µg/ml). Après incubation à 37°C sous agitation pendant 1 h, de la RNase à 5 µg/ml est ajoutée à la suspension bactérienne, et le mélange est incubé de nouveau à 37°C pendant 2 h. Une nouvelle incubation à 55°C pendant 2 h est effectuée en présence de Tris-HCl 100 mM, de SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) à 1% et de 400 µg/ml de protéinase K.

II.2.2.1.2 Déprotéinisation

Les protéines et les débris cellulaires sont éliminés par des extractions successives au phénol (deux fois) et au chloroforme-alcool isoamylique (24/1) (deux fois). Le phénol dénature et dissout les protéines. Le chloroforme dénature les lipides, et permet d'éliminer les traces de phénol. Après chaque extraction, le mélange bien homogénéisé est centrifugé à 12.000 g pendant 5 mn à 4°C. Seule la phase aqueuse supérieure contenant la solution d'ADN est récupérée.

II.2.2.1.3 Précipitation de l'ADN

L'ADN extrait est précipité par l'acétate de sodium (0,3 M final) et par 2,5 volumes d'éthanol absolu froid, pendant une nuit à -20°C. Après centrifugation à 12.000 g pendant 30 mn à 4°C, le culot d'ADN est lavé 2 fois à l'éthanol 70%, puis séché et resuspendu dans un volume minimum de TE 10/1 (10 à 20 µl). L'ADN en solution est ensuite conservé à 4°C.

II.2.2.2 Protocole au CTAB

Le protocole d'extraction que nous avons utilisé est analogue à celui décrit dans van Soolingen *et al.*(1994).

II.2.2.2.1 Lyse des cellules

Le culot bactérien inactivé est mis en suspension dans 400 µl de TE 10/1, du lysozyme à 1 mg/ml est ensuite ajouté au mélange. La solution est incubée pendant 1 h à 37°C sous agitation légère. La seconde incubation est effectuée pendant 10 mn à 65°C en présence de mélange SDS/protéinase K.

II.2.2.2.2 Précipitation de l'ADN

Les protéines et les débris cellulaires sont éliminés par la solution NaCl/CTAB préchauffée à 65°C pendant 5 mn. Le mélange est incubé pendant 10 mn à 65°C, et l'ADN est récupéré après une extraction au chloroforme-alcool isoamylique (24/1) (une fois). Il est ensuite précipité à l'isopropanol froid pendant une nuit à -20°C, puis le culot est séché et resuspendu dans un volume minimum de TE 10/1. L'ADN en solution est conservé à 4°C.

II.2.2.3 Dosage et vérification de la qualité d'ADN

La mesure de l'absorbance de l'ADN extrait permet de calculer sa concentration et de vérifier sa pureté. On établit le spectre d'absorption de la solution d'ADN à des longueurs d'onde variant de 210 à 310 nm (UV). Pour un ADN purifié, on obtient un pic d'absorption maximum autour de 257 nm. La concentration est calculée à partir de la densité optique (DO) au maximum d'absorption : une unité de DO correspond à une concentration de 50 ng/µl d'ADN. Toutes les solutions mères sont diluées à 100 ng/µl. La qualité de l'ADN est vérifiée sur gel d'agarose à 0,8%.

La comparaison des concentrations et des profils d'ADN obtenus par les deux protocoles d'extraction a permis de constater que la technique au CTAB donnait de meilleurs résultats d'un point de vue qualité de l'ADN et rendement.

La mauvaise qualité de certains ADNs nous a obligé à éliminer certains isolats de notre étude. Sur l'ensemble des mycobactéries cultivées, seulement une population marocaine de 155 isolats de *M. tuberculosis* est utilisée dans ce travail.

II.2.3 Techniques de typage moléculaire

Deux méthodes de typage sont utilisées dans cette étude, il s'agit des techniques RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) et MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units – Variable Number of Tandem Repeats).

II.2.3.1 La technique RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

II.2.3.1.1 Généralités

La méthode RAPD permet l'amplification aléatoire de séquences d'ADN génomique avec des amorces décarnériques de séquences arbitraires. C'est une variante de la technique PCR classique. Sa particularité est qu'elle ne nécessite aucune information préalable sur le génome analysé (Welsh and McClelland, 1990 ; Williams *et al.*, 1990 ; 1993). La technique RAPD est susceptible de détecter le polymorphisme engendré par différents phénomènes de mutation au niveau du site d'appariement de l'amorce comme : les substitutions nucléotidiques, les insertions ou les délétions (Williams *et al.*, 1990).

Par rapport aux autres techniques de typage moléculaire, la méthode RAPD présente les avantages suivants : elle est rapide, utilisable pour n'importe quel micro-organisme, et accessible pour tous les laboratoires (Towner and Grundmann, 2001). Elle a donc été utilisée pour l'identification et l'analyse moléculaire de divers micro-organismes, y compris pour l'espèce *M. tuberculosis* (Ruimy *et al.*, 2001 ; Bañuls *et al.*, 1999 ; Tibayrenc *et al.*, 1993 ; Prugnolle *et al.*, 2002 ; Hilali *et al.*, 2000 ; Pujol *et*

al., 1997 ; Blanc *et al.*, 2000 ; Linton *et al.*, 1994 ; Richner, Meiring and Kirby, 1997 ; Harn *et al.*, 1997).

Les amorces RAPDs s'apparient à leurs séquences complémentaires dans l'ADN dénaturé. La *Taq* polymérase synthétise alors le brin d'ADN complémentaire à partir de l'extrémité 3' de ces amorces. Les fragments amplifiés sont ensuite séparés en fonction de leur taille par électrophorèse sur gel d'agarose. La présence ou l'absence de fragments amplifiés dépend de l'existence dans le génome analysé de séquences complémentaires à l'amorce utilisée. Les bandes obtenues ne peuvent être interprétées en termes d'allèles. Les RAPDs sont des marqueurs dominants, il n'est donc pas possible de savoir si un fragment d'ADN est amplifié à partir d'un locus hétérozygote ou d'un locus homozygote (Williams *et al.*, 1990). Les mycobactéries étant des organismes haploïdes, cette caractéristique ne pose pas de problèmes d'interprétation. Par ailleurs, une amorce donnée amplifie un locus ou une série de locus, alors qu'une autre amorce amplifiera un autre locus ou une autre série de locus. Les RAPDs sont donc considérés comme des marqueurs multilocus.

Cependant, la standardisation de la technique RAPD est fondamentale pour la reproductibilité des profils d'amplification. Elle dépend de plusieurs paramètres dont les principaux sont la qualité de l'ADN analysé et l'amorce utilisée (Micheli *et al.*, 1994 ; Caetano-Anollés, 1993 ; MacPherson *et al.*, 1993). Par conséquent, des précautions rigoureuses doivent être prises en compte pour assurer la reproductibilité des profils RAPDs (Power, 1996 ; Tyler *et al.*, 1997 ; Towner and Grundmann, 2001).

II.2.3.1.2 Protocole d'amplification

Les conditions d'amplification utilisées sont similaires à celles décrites dans Williams *et al.* (1990).

20 ng d'ADN à 10 ng/ μ l sont amplifiés dans un volume total de milieu réactionnel de 60 μ l. Le milieu réactionnel est constitué de : tampon spécifique de la *Taq* DNA polymérase à une concentration finale de 1X, dNTP à 100 μ M, amorce à 200 nM, *Taq* DNA polymérase à 15 mUI/ μ l. La *Taq* polymérase est fournie par

Boehringer Mannheim. Le tampon de réaction contient du Tris-HCl 100 mM pH 8,3 ; MgCl₂ (6 H₂O) 15 mM ; KCl 500 mM ; et de la gélatine à 1 mg/ml. Les amorces choisies pour l'étude sont sélectionnées pour leur lisibilité et leur reproductibilité.

Les milieux réactionnels sont préparés dans des conditions optimales de stérilité pour éviter toute contamination par des ADNs étrangers. Pour chaque réaction RAPD, un contrôle sans ADN est utilisé pour vérifier la spécificité des bandes obtenues et l'absence de contamination.

Les échantillons préparés sont placés dans un thermocycleur automatique. Le thermocycleur utilisé est de type PTC - 100 à effet Peltier de la marque MJ Research inc.

Le programme d'amplification est constitué de 45 cycles comportant 3 étapes :

- dénaturation de l'ADN (1 mn à 94°C) ;
- hybridation de l'amorce (1 mn à 36°C) ;
- synthèse de l'ADN complémentaire (2 mn à 72°C).

Les 45 cycles sont suivis d'une étape d'élongation finale de 7 mn à 72°C. Une amplification dure en moyenne 5 h 30.

II.2.3.1.3 Révélation des profils d'amplification

Les fragments amplifiés sont séparés selon leur taille par migration sur gel d'agarose à 1,6% dans le tampon de migration TAE 0,5X (40 mM Tris-Acétate, 1 mM EDTA). 20 µl de chaque produit d'amplification sont mélangés avec du bleu de charge (0,25% du bleu de bromophénol, 0,25% de xylol cyanol FF, 15% de Ficoll type 400 « Pharmacia »), puis déposés dans un puits du gel. Le marqueur de poids moléculaire λ digéré par *EcoRI* et *HindIII* permet d'évaluer la taille des bandes obtenues, environ 8 µl de ce marqueur sont déposés de part et d'autre du gel. La migration se fait à 90 V.

En fin de migration, le gel est ensuite placé dans un bain de TAE 0,5X contenant du bromure d'éthidium dilué au 1/20.000. Les bandes d'ADN sont visualisées sous lumière ultraviolette (UV), et le gel est photographié.

II.2.3.1.4 Lecture et interprétation des profils

Dans ce travail, les profils RAPDs sont lus à l'œil nu. Chacune des bandes est codée par un chiffre. On commence par 1 pour le fragment le plus lent, c'est-à-dire correspondant au fragment d'ADN de plus haut poids moléculaire, et ainsi de suite. Chaque stock est donc caractérisé par un ensemble de profils correspondant aux différentes amorces utilisées. Cette lecture est répétée plusieurs fois (2 fois minimum) pour s'assurer du bon codage attribué aux différentes bandes. La lecture est réalisée par une seconde personne pour une vérification ultime.

Une amorce donnée est susceptible d'amplifier plusieurs locus pour un échantillon donné, et les locus amplifiés ne sont pas forcément les mêmes entre deux stocks différents pour une même amorce. Dans cette étude, les génotypes révélés par une amorce donnée sont traités comme des « génotypes unilocus », et l'ensemble des génotypes obtenus comme des « génotypes multilocus ». De plus, les chances que 2 amorces différentes amplifient les mêmes locus sont négligeables. Par conséquent, dans ces conditions d'interprétation, il est possible de réaliser les tests de génétique de populations basés sur l'analyse du déséquilibre de liaison (Tibayrenc, 1995-a et 1995-b). En effet pour ces tests, il est fondamental que deux amorces différentes amplifient des séries de locus indépendantes les unes des autres.

II.2.3.1.5 Mise au point de la technique RAPD sur *M. tuberculosis*

Avant d'entamer l'analyse par RAPD des isolats marocains, la première étape consiste à la mise au point de la technique sur un échantillon test de *M. tuberculosis*. Cette mise au point est un pré-requis pour la standardisation de cette technique.

20 extraits différents d'ADN sont utilisés pour cette étape, ils nous ont été fournis par l'Institut Pasteur de Lille (Dr Supply, Laboratoire des Mécanismes Moléculaires de la Pathogénèse Bactérienne). Cet échantillon provient de la collection de référence établie par l'Institut National de la Santé Publique et de l'Environnement de Bilthoven en Hollande (Pr van Embden).

26 amorces sont testées sur les 20 stocks. La liste des amorces est indiquée dans la table VII. Chaque expérimentation est répétée au minimum deux fois pour chaque stock et pour chaque amorce afin de tester la reproductibilité de chaque amorce. Les amorces retenues pour l'étude sont sélectionnées sur la base de la lisibilité et de la reproductibilité des profils.

Table VII. Liste des séquences des 26 amorces RAPDs.

Amorce	Séquence	Amorce	Séquence
A2	5'-TGCCGAGCTG-3'	R2	5'-CACAGCTGCC-3'
A8	5'-GTGACGTAGG-3'	R8	5'-CCCGTTGCCT-3'
B7	5'-GGTGACGCAG-3'	R13	5'-GGACGACAAG-3'
F1	5'-ACGGATCCTG-3'	U1	5'-ACGGACGTCA-3'
F3	5'-CCTGATCACC-3'	U6	5'-ACCTTTGCGG-3'
F13	5'-GGCTGCAGAA-3'	U10	5'-ACCTCGGCAC-3'
F16	5'-GGAGTACTGG-3'	U13	5'-GGCTGGTTCC-3'
N9	5'-TGCCGGCTTG-3'	U15	5'-ACGGGCCAGT-3'
N14	5'-TCGTGCGGGT-3'	U16	5'-CTGCGCTGGA-3'
N16	5'-AAGCGACCTG-3'	U17	5'-ACCTGGGGAG-3'
N18	5'-GGTGAGGTCA-3'	U18	5'-GAGGTCCACA-3'
N19	5'-GTCCGTACTG-3'	U19	5'-GTCAGTGCGG-3'
N20	5'-GGTGCTCCGT-3'	U20	5'-ACCTCGGCAC-3'

La figure 3 montre un exemple de tests de reproductibilité sur certains stocks utilisés pour la standardisation de la technique RAPD.

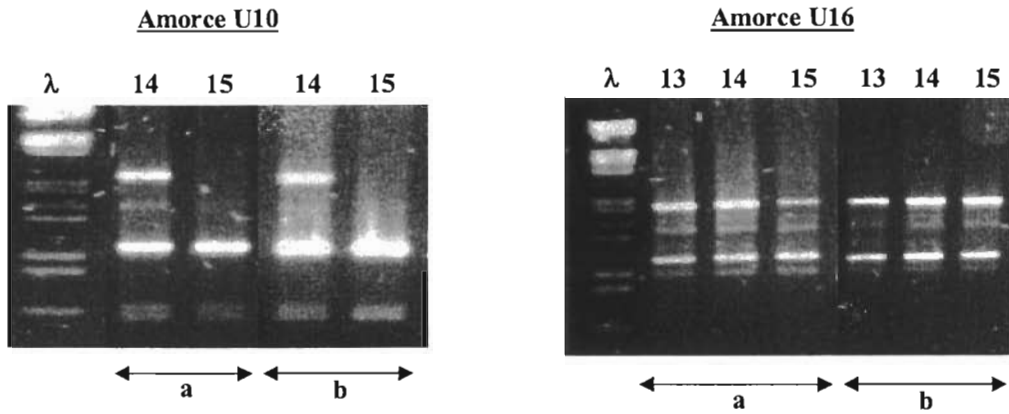


Figure 3. Exemple de tests de reproductibilité des profils RAPDs obtenus avec les amorces U10 et U16. Les chiffres 13, 14 et 15 correspondent à différents stocks de *Mycobacterium tuberculosis* et le symbole λ, au marqueur de poids moléculaire. Les lettres a et b indiquent 2 tests successifs pour la vérification de la reproductibilité des profils.

17 amorces ont donné des profils correspondants aux critères de lisibilité et de reproductibilité sur les 26 testées, il s'agit des amorces U13, U17, R13, U19, N9, U10, U16, R8, U20, A2, B7, F1, U6, A8, N16, U18, et U15. Dix sont retenues pour cette étude : U13, U17, R13, U19, N9, U16, U10, U20, A2, et R8. Les figures 4, 5 et 6 illustrent les profils RAPDs obtenus avec 8 de ces amorces.

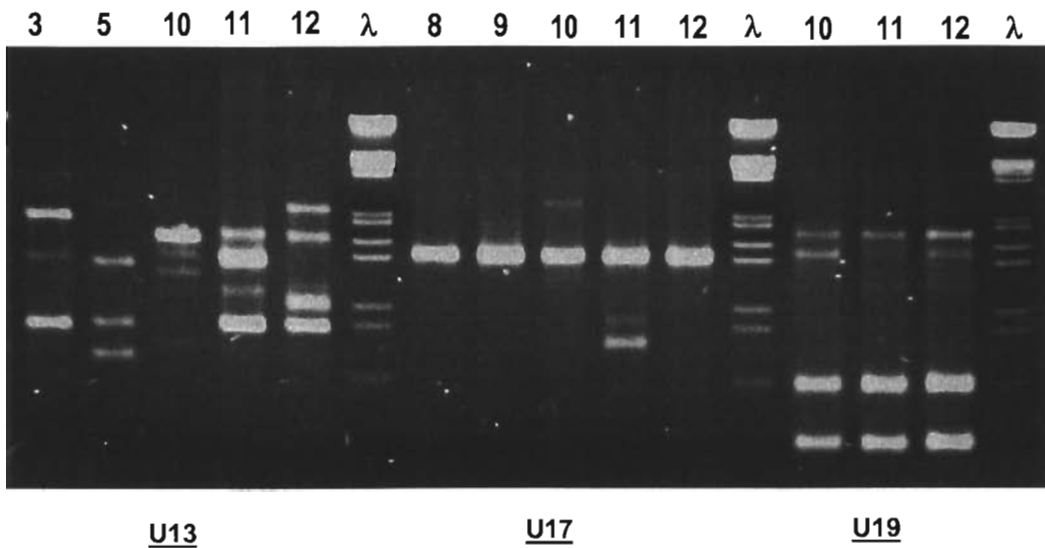


Figure 4 : Profils RAPDs obtenus avec les amorces U13, U17, et U19. Les chiffres 3, 5, 8, 9, 10, 11, et 12 correspondent à différents stocks de *Mycobacterium tuberculosis* et le symbole λ, au marqueur de poids moléculaire.

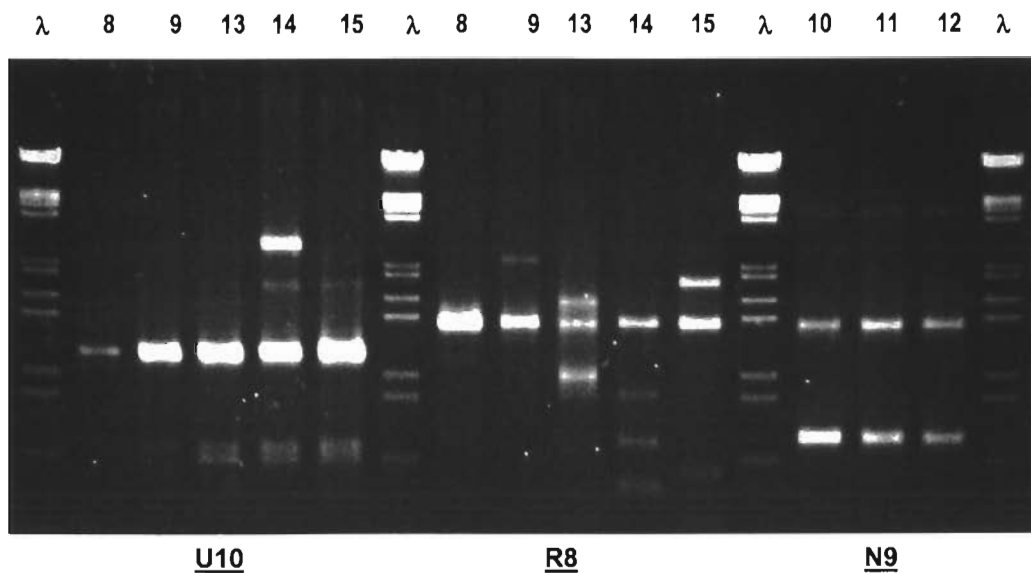


Figure 5 : Profils RAPDs obtenus avec les amorces U10, R8, et N9. Les chiffres 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, et 15 correspondent à différents stocks de *Mycobacterium tuberculosis* et le symbole λ , au marqueur de poids moléculaire.

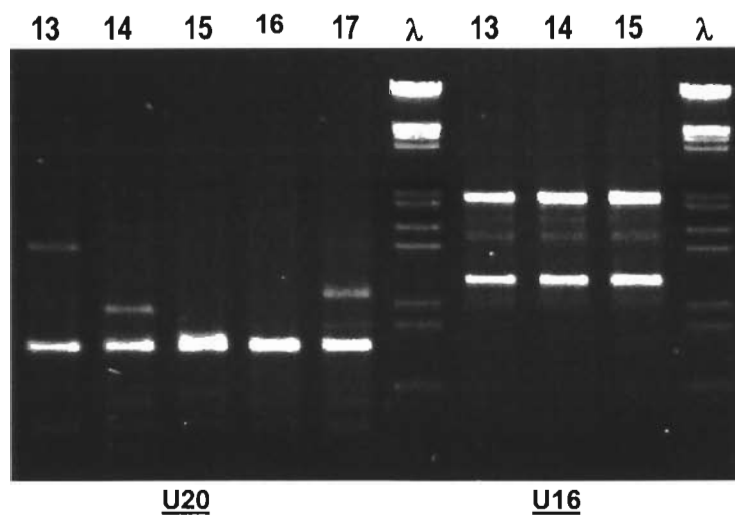


Figure 6 : Profils RAPDs obtenus avec les amorces U20, et U16. Les chiffres 13, 14, 15, 16, et 17 correspondent à différents stocks de *Mycobacterium tuberculosis* et le symbole λ , au marqueur de poids moléculaire.

La majorité des amorces choisies révèle du polymorphisme au sein des 20 stocks utilisés comme échantillon de mise au point. Cette diversité génétique est illustrée par les amorces U13 et U17 de la figure 4, U10 et R8 de la figure 5 et U20 de la figure 6. La standardisation de la technique RAPD a été réalisée très

soigneusement dans le but d'obtenir des résultats totalement reproductibles et interprétables.

II.2.3.2 La technique MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units – Variable Number of Tandem Repeats)

II.2.3.2.1 Généralités

La technique MIRU (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units) est basée sur des éléments VNTRs (Variable Number of Tandem Repeats) dispersés dans le génome des espèces du complexe *M. tuberculosis* (Supply *et al.*, 1997 ; Magdalena *et al.*, 1998). Ces éléments répétés font 40-100 pb et sont répartis sur 41 locus différents. L'analyse du génome de la souche de référence H37Rv a mis en évidence que les locus MIRUs correspondent à des régions minisatellites-like retrouvées chez les mammifères (Supply *et al.*, 2000).

Sur les 41 locus identifiés, 12 sont polymorphes (MIRU 2, 4, 10, 16, 20, 23, 24, 26, 27, 31, 39, et 40). Le polymorphisme est basé principalement sur la variabilité dans le nombre de copies des MIRUs entre les isolats de *M. tuberculosis* (Supply *et al.*, 2000). Ainsi, chaque stock est identifié par un code numérique correspondant au nombre de répétitions dans chaque locus MIRU.

Ces marqueurs moléculaires basés sur la technique PCR sont utilisés pour le typage et l'épidémiologie moléculaire des isolats de *M. tuberculosis* (Mazars *et al.*, 2001 ; Supply *et al.*, 2001). Ils sont considérés comme des marqueurs spécifiques du complexe *M. tuberculosis*. De plus, ils présentent les caractéristiques suivantes :

- ils sont assez polymorphes pour permettre la distinction entre les isolats, avec un degré de résolution similaire à celui de la technique standard basée sur la séquence d'insertion IS6110 (Supply *et al.*, 2000 ; Mazars *et al.*, 2001) ;

- ils sont suffisamment stables pour identifier les liens épidémiologiques entre les isolats (Mazars *et al.*, 2001) ;

- et ils sont reproductibles.

Par ailleurs, les éléments MIRU-VNTRs sont des marqueurs multilocus. Ils peuvent donc être utilisés pour l'analyse de la structure des populations basée sur le déséquilibre de liaison. Les techniques couramment utilisées pour le typage moléculaire de *M. tuberculosis* ne présentent cependant pas cette particularité. Ces marqueurs présentent également une autre caractéristique, ce sont des marqueurs co-dominants. Ils permettent par conséquent une interprétation allélique des locus.

La technique MIRU-VNTR est basée sur une amplification par PCR des différents locus précités. Les amorces sont spécifiques de régions conservées, flanquantes de ces éléments. Les fragments amplifiés sont séparés selon leur poids moléculaire par électrophorèse soit sur gel d'agarose soit sur séquenceur automatique.

II.2.3.2.2 Protocole d'amplification

Le protocole suivi est similaire à celui décrit dans Supply *et al.* (2000). 10 ng d'ADN sont amplifiés dans un volume total de 50 µl contenant du tampon spécifique de PCR 1X, *HotStarTaq* DNA polymérase (Qiagen) à 20 mUI/µl, de la solution Q 1X, 0,2 mM de chaque dNTP, 0,4 µM pour chaque amorce, et 1 à 3,5 mM de MgCl₂. Cette amplification est réalisée sur les 12 locus polymorphes (MIRU 2, 4, 10, 16, 20, 23, 24, 26, 27, 31, 39, et 40).

Les 12 locus sont regroupés selon leur degré de polymorphisme (Supply *et al.*, 2001). On retrouve alors 4 groupes de locus (A, B, C, et D), avec un ordre décroissant de polymorphisme :

- dans le groupe A, les locus 4, 26, et 40 ;
- dans le groupe B, les locus 10, 16, et 31 ;
- dans le groupe C, les locus 2, 23, et 39 ;
- et dans le groupe D, les locus 20, 24, et 27.

Pour l'ensemble des locus précités, le protocole d'amplification reste identique. Seule la concentration en MgCl₂ est différente pour chacun des groupes, variant de 1 à 3,5 mM (voir table VIII).

Table VIII. Protocole d'amplification des éléments MIRU-VNTRs pour les 4 groupes de locus.

	Groupe A	Groupe B	Groupe C	Groupe D
Tampon 10X (QIAGEN)	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
SolutionQ 5X	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
MgCl ₂ (25 mM)	3 µl	1 µl	2 µl	0 µl
dNTP (5 mM)	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
Amorces (20 µM)	2 x 1 µl	2 x 1 µl	2 x 1 µl	2 x 1 µl
H ₂ O qsp 50 µl	26,8 µl	28,8 µl	27,8 µl	29,8 µl
HotStarTaq DNA Polymérase (5 UI/µl)	0,2 µl	0,2 µl	0,2 µl	0,2 µl
ADN (10 ng/µl)	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl

Comme pour la technique RAPD, les milieux de réaction sont préparés sous hotte. Un contrôle négatif sans ADN est utilisé pour vérifier la spécificité de la PCR. La table IX présente la liste des séquences des amorces MIRUs utilisées.

Table IX. Liste des séquences des amorces des 12 locus MIRUs.

Locus MIRU	Séquence	Locus MIRU	Séquence
4	5'-GCGCGAGAGCCCGAACTGC-3' 5'-GCGCAGCAGAAACGTCAGC-3'	2	5'-TGGACTTGCAGCAATGGACCAACT-3' 5'-TACTCGGACGCCGGCTCAAAAT-3'
26	5'-TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC-3' 5'-CATAGGCGACCAGGCGAATAG-3'	23	5'-CTGTGATGCGCCGCAACAAAACG-3' 5'-AGCTCAACGGGTTCCCTTTTGTG-3'
40	5'-GGGTTGCTGGATGACAACGTGT-3' 5'-GGGTGATCTCGGCGAAATCAGATA-3'	39	5'-CGCATCGACAAACTGGAGCCAAAC-3' 5'-CGGAAACGTCTACGCCCCACACAT-3'
10	5'-GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC-3' 5'-GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT-3'	20	5'-TCGGAGAGATGCCCTTCGAGTTAG-3' 5'-GGAGACCGCGACCAGGTAAGTGA-3'
16	5'-TCGGTGATCGGGTCAAGTCCAAGTA-3' 5'-CCCGTCGTGCAGCCCTGGTAC-3'	24	5'-CGACCAAGATGTGCAGGAATACAT-3' 5'-GGGCGAGTTGAGCTCACAGAA-3'
31	5'-ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA-3' 5'-GTGCCGACGTGGTCTTGAT-3'	27	5'-TCGAAAGCCTCTGCGTGCCAGTAA-3' 5'-GCGATGTGAGCGTGCCACTCAA-3'

Le programme d'amplification comprend une première étape de 15 mn à 95°C nécessaire à l'activation de la *HotStarTaq* DNA polymérase, suivie de 40 cycles comportant :

- une étape de dénaturation (1 mn à 94°C) ;
- une étape d'hybridation (1 mn à 59°C) ;
- et une étape d'élongation (1 mn 30 à 72°C).

L'amplification se termine par une étape d'élongation finale de 10 mn à 72°C, et elle dure environ 3 h 30.

Comme pour les RAPDs, le thermocycleur utilisé est de type PTC - 100 à effet Peltier de la marque MJ Research inc.

II.2.3.2.3 Révélation et lecture des profils d'amplification

En fin d'amplification, l'analyse des fragments PCRs est réalisée soit sur gel d'agarose soit sur séquenceur automatique. Dans le dernier cas, les amorces sont marquées avec un colorant fluorescent différent.

Les 2 méthodes de génotypage MIRU-VNTR sont utilisées dans ce travail. Le typage par séquenceur automatique est réalisé sur 50 isolats de l'échantillon marocain, et la méthodologie manuelle est utilisée pour tout le reste de l'échantillon. Le génotypage sur séquenceur automatique a été effectué à l'Institut Pasteur de Lille (Dr Supply, Laboratoire des Mécanismes Moléculaires de la Pathogenèse Bactérienne). Les résultats obtenus par ces 2 méthodologies sont totalement compatibles et sont donc interprétés ensemble.

a- Révélation sur gel d'agarose

Il s'agit d'une PCR classique avec un seul couple d'amorces, non marquées. Les résultats de l'amplification sont analysés sur gel d'agarose de type NuSieve à 2%.

5 µl de chaque produit d'amplification dilué au 1/10 sont mélangés avec du bleu de charge, puis déposés dans un puits du gel. La taille des fragments amplifiés est estimée sur gel d'agarose en se basant sur les 2 marqueurs de poids moléculaire utilisés (20-100 pb, et 100 pb). 5 µl et 10 µl des marqueurs 100 pb et 20-100 pb sont déposés respectivement dans le gel. La migration se fait à 100 V. En fin de migration, le gel est ensuite placé dans un bain de TAE 0,5X contenant du bromure d'éthidium dilué au 1/20.000. Les bandes d'ADN sont visualisées sous lumière ultraviolette (UV), et le gel est photographié.

La taille des amplicons est convertie en nombre de répétitions de MIRU pour chaque locus considéré. Cette étape est facilitée par l'utilisation de la table du programme informatique « Genotyper », dans laquelle sont préalablement référencées toutes ces données (Supply *et al.*, 2001).

b- Révélation sur séquenceur automatique

Les produits de PCR réalisée avec des amorces marquées sont analysés sur séquenceur automatique de type ABI 377 de la marque Amersham Biosciences, par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Le protocole utilisé est identique à celui décrit dans Supply *et al.* (2001).

La technique d'amplification peut tester jusqu'à 3 locus différents, et dans ce cas, chaque couple d'amorces est marqué avec un colorant fluorescent donné. 3 couleurs différentes (bleu, vert, et jaune) sont donc utilisées, et chacune est attribuée à un locus. Les fragments PCRs marqués par les 3 colorants fluorescents sont mélangés à un standard de taille. Ce marqueur interne est coloré en rouge.

2 programmes informatiques « GeneScan » et « Genotyper » sont utilisés pour l'analyse des amplicons. Le logiciel « GeneScan » permet la révélation des profils obtenus sur le gel. On obtient par conséquent une image montrant les divers allèles de chaque isolat pour les différents couples d'amorces utilisés dans la PCR multiplex. Par ailleurs, les 2 logiciels permettent d'estimer la taille des fragments en se basant sur le standard de taille marqué en rouge. La conversion de la taille des fragments en nombre de répétitions des éléments MIRUs se fait ensuite automatiquement par le programme informatique « Genotyper ». Donc pour chaque locus et chaque isolat, les fragments sont codés par un chiffre correspondant au nombre de répétitions.

Dans le cas des PCRs multiplex, l'analyse simultanée de 3 locus différents peut créer des phénomènes de compétition entre les amorces, ce qui entraîne l'absence d'amplification pour certains locus. Il suffit donc de retester les échantillons pour les locus manquants.

II.2.4 Méthodes d'analyse des résultats

Afin de déterminer la diversité génétique et la structure de la population au sein des isolats marocains, différents tests sont utilisés. Ils regroupent :

- différents indices de diversité permettant d'étudier le polymorphisme génétique ;
- et différents tests statistiques de génétique des populations basés sur l'analyse du déséquilibre de liaison.

Par ailleurs, une analyse phylogénétique a été également effectuée sur l'ensemble de notre échantillon afin d'identifier les relations génétiques entre les différents isolats.

II.2.4.1 Les indices de diversité génétique

II.2.4.1.1 Le taux de polymorphisme

Le taux de polymorphisme représente le pourcentage de locus polymorphes sur l'ensemble des locus étudiés. Les locus dont le polymorphisme repose uniquement sur des variants très rares ne sont pas considérés comme polymorphes. Seuls ceux dont le deuxième variant le plus fréquent présente une fréquence supérieure ou égale à 1% ou 5% sont considérés comme des locus polymorphes (Pasteur *et al.*, 1987).

II.2.4.1.2 La diversité génétique moyenne

Selon Selander et Levin (1980), la diversité génétique moyenne (H) peut être mesurée en utilisant la formule suivante :

$$H = \sum h / r \quad \text{et} \quad h = 1 - \sum q_i^2$$

r = nombre de locus ou d'amorce ;

h = diversité génétique à chaque locus ;

q_i^2 = fréquence relative de l'allèle ou génotype i au locus considéré.

Cette formule est identique à celle de l'hétérozygotie théorique moyenne. Elle peut être appliquée aussi bien pour les marqueurs MIRU-VNTRs que pour l'analyse des résultats RAPDs. En effet pour les RAPDs, la condition requise est de considérer chaque amorce comme un locus bien que : (i) chaque amorce amplifie un nombre inconnu de locus ; (ii) il n'est pas certain que pour une amorce donnée, les locus amplifiés soient les mêmes d'un génotype à l'autre. Cette approche qui consiste à grouper les données de plusieurs locus n'entraîne pas de biais mais seulement une perte d'information (Tibayrenc, 1995-a ; 1995-b).

II.2.4.1.3 La diversité génotypique

Elle représente la proportion de génotypes différents sur l'ensemble des génotypes identifiés. Cet indice peut être calculé pour un locus (ou une amorce RAPD) donné (e), ou pour un ensemble de locus (ou amorces RAPDs).

II.2.4.1.4 La distance génétique de Jaccard

Elle permet d'estimer le degré de dissemblance entre deux génotypes par le calcul du pourcentage de bandes communes sur le nombre total de bandes (Jaccard, 1908). La formule de calcul utilisée est la suivante :

$$D = 1 - a / a + b + c$$

a = nombre de bandes communes entre les deux génotypes ;

b = nombre de bandes présentes dans le 1^{er} génotype et absentes dans le 2^{ème} ;

c = nombre de bandes présentes dans le 2^{ème} génotype et absentes dans le 1^{er}.

Le programme informatique (Genetics ToolBox), élaboré dans notre laboratoire par Sébastien Noël, permet de calculer automatiquement ces distances.

II.2.4.2 Méthodes d'analyse de génétique des populations

Différents tests ont été élaborés par Tibayrenc *et al.* (1990 ; 1991 ; 1993) pour explorer différentes facettes d'un même phénomène biologique, le déséquilibre de liaison. Dans ce travail, seuls les tests de recombinaison sont utilisés.

II.2.4.2.1 Test *d1*

Le test *d1* calcule la probabilité de trouver, par simple hasard, dans une population panmictique, un génotype multilocus donné avec un effectif égal ou supérieur à celui qui est observé dans la population. Ce test repose sur une analyse combinatoire en utilisant la formule suivante :

$$P = \sum_{i=m}^n \frac{n! \cdot x^i \cdot (1-x)^{n-i}}{i! \cdot (n-i)!}$$

x = probabilité attendue du génotype multilocus (produit des fréquences observées des génotypes unilocus qui le composent) ;

n = nombre d'individus dans la population ;

m = nombre d'individus qui possèdent le génotype multilocus considéré.

II.2.4.2.2 Test *d2*

Ce test calcule la probabilité d'obtenir un génotype multilocus quelconque avec un effectif égal ou supérieur à celui du génotype multilocus le plus représenté dans la population.

II.2.4.2.3 Test *e*

Le test *e* calcule la probabilité d'obtenir un nombre de génotypes multilocus inférieur ou égal à celui qui est effectivement observé dans l'échantillon étudié.

II.2.4.2.4 Test *f*

Le test *f* calcule la probabilité d'observer un niveau de déséquilibre de liaison égal ou supérieur à celui qui est effectivement observé dans la population.

Ces différents tests (*d2*, *e*, et *f*) reposent sur des simulations de Monte-Carlo avec 10.000 tirages aléatoires pour chaque test.

II.2.4.2.5 Test *g*

Le test *g* calcule la probabilité d'obtenir une corrélation égale ou supérieure à celle observée dans la population, entre deux séries de marqueurs génétiques indépendants (par exemple MIRU-VNTR et RAPD). Ce test est basé sur un test non paramétrique de Mantel (Mantel, 1967). Il consiste à comparer deux matrices de distance obtenues à partir de deux marqueurs génétiques indépendants pour les mêmes stocks. Ce test repose également sur une simulation de Monte-Carlo de 10^4 tirages, qui permute au hasard les différentes cellules d'une des matrices de distance.

Le seuil de signification de ces tests a été fixé à 1% pour le test *f*, et 5% pour les autres tests (*d1*, *d2*, *e*, et *g*). Le taux de signification positif d'un seul des tests de recombinaison cités ci-dessus, permet de rejeter l'hypothèse nulle de panmixie.

Le déséquilibre de liaison peut être statistiquement significatif dans un échantillon donné, cependant il est important de vérifier si cela n'est pas lié à la séparation géographique ou temporelle, connue sous le nom d'effet Wahlund (Tibayenc *et al.*, 1991). Pour pallier à ce biais, il suffit par conséquent de réaliser de nouveaux tests de génétique des populations en considérant seulement les échantillons provenant d'une même localité ou isolés à la même date.

Par ailleurs, comme nous l'avons vu dans les « Rappels bibliographiques », il est essentiel de distinguer une structure fondamentalement clonale d'une structure clonale épidémique (Maynard Smith *et al.*, 1993). Pour faire cette distinction, Maynard Smith *et al.* (1993) préconisent de réaliser les mêmes tests sans les

génotypes répétés. Dans ce cas, seul le test f peut être effectué, car tous les autres sont basés sur l'étude du nombre de génotypes répétés ou différents dans l'échantillon.

II.2.4.3 Analyses phylogénétiques

Les méthodes phylogénétiques sont utilisées pour pouvoir comparer les organismes entre eux et établir leur lien de parenté (c'est-à-dire reconstruire leur phylogénie). Sur la base des données obtenues avec les différents marqueurs génétiques, elles permettent par conséquent de visualiser par les arbres phylogénétiques appelées dendrogrammes, les relations génétiques existantes entre les isolats.

Pour l'ensemble des arbres phylogénétiques construits, l'espèce *M. canettii* a été choisie comme groupe externe (Stock P48, voir table VI, p43).

II.2.4.3.1 Les méthodes phénétiques

Les dendrogrammes sont construits à partir de la matrice des distances de Jaccard par la méthode NJ (Neighbor-Joining) (Saitou and Nei, 1987). Cette méthode est une méthode agglomérative, qui ne fait pas l'hypothèse d'un taux évolutif constant dans les arbres. De ce fait, elle produit un arbre non enraciné. La racine peut cependant être localisée par l'utilisation d'un groupe externe. Nous avons utilisé le programme « Neighbor » du programme PHYLIP.

II.2.4.3.2 Les méthodes phylogénétiques (arbres de Wagner et bootstrap)

La méthode de Wagner est basée sur le principe de parcimonie, qui a pour but de minimiser le nombre de changements évolutifs totaux dans l'arbre construit. Cet arbre peut être enraciné (Kluge and Farries, 1969) ou non enraciné (Farries, 1970). La méthode de parcimonie de Wagner permet également d'établir les états de caractères aux nœuds de l'arbre. Ceci est réalisé en maximisant les synapomorphies (caractères dérivés partagés par deux ou plusieurs lignées évolutives) et en minimisant les homoplasies (similitudes en identité de caractères résultant non pas d'une ancestralité commune, mais d'une évolution convergente en parallèle ou d'une

réversion). Les nœuds prennent ainsi le statut d'ancêtres ou « unités évolutives hypothétiques ».

La méthode de bootstrap est une procédure de rééchantillonnage suivie d'une analyse phénétique ou phylogénétique conduisant à l'obtention d'un arbre consensus (Efron, 1979 ; Felsenstein, 1985). La procédure est généralement répétée 100 fois. L'arbre consensus obtenu présente à chaque nœud les valeurs de bootstrap, celles-ci indiquent le nombre de fois où l'on a obtenu les mêmes associations sur l'ensemble des rééchantillonnages effectués. La méthode de bootstrap est une méthode statistique qui permet d'avoir une idée sur la robustesse des nœuds.

L'analyse phylogénétique de Wagner associée à la méthode de bootstrap a été appliquée sur la population à l'étude. On a utilisé :

- le programme informatique « Genetics ToolBox » pour la mise en forme du fichier de données pour le programme PHYLIP ;
- et les programmes « seqboot », « mix » et « consense » de PHYLIP pour l'analyse de bootstrap, la construction des arbres de Wagner et l'élaboration de l'arbre consensus non enraciné.

II.2.4.3.3 Le logiciel Treedyn

Treedyn est un éditeur interactif d'arbres phylogénétiques élaboré au laboratoire (Chevenet, Bañuls and Barnabé, 2000). Il permet tout d'abord d'éditer le fichier de sortie PHYLIP correspondant à l'arbre consensus. Il propose également de multiples fonctions permettant une analyse interactive des arbres. Sur chacun des arbres obtenus, nous avons utilisé la fonction « Identification » de ce logiciel. Cette fonction permet d'observer si, pour un groupe donné de stocks reliés entre eux par un nœud de l'arbre, il existe des caractères ou « labels » communs et/ou spécifiques à tous les stocks de ces groupes. Ces caractères peuvent correspondre à des données géographiques, des données cliniques, ou des propriétés biologiques. Pour cela, il suffit d'associer à l'arbre phylogénétique étudié un fichier de données avec tous les détails épidémiologiques ou historiques de chacun des stocks utilisés pour la construction de l'arbre.

RESULTATS

-Chapitre III-

III Résultats

Dans ce chapitre, nous présenterons en premier lieu les résultats relatifs au typage moléculaire de l'ensemble de l'échantillon comprenant les isolats marocains et les stocks de référence. Les données obtenues à partir des 2 marqueurs RAPD et MIRU-VNTR sont utilisées d'une part pour l'analyse de la diversité génétique et de la structure de la population *M. tuberculosis* dans la ville de Casablanca, et d'autre part pour l'analyse phylogénétique de l'échantillon étudié.

III.1 Typage moléculaire

III.1.1 Analyse des profils obtenus par la technique RAPD

L'ensemble de l'échantillon d'étude (177 stocks) est analysé par RAPD avec les 10 amorces sélectionnées et standardisées pour une totale reproductibilité (U13, U17, R13, U19, N9, U16, U10, U20, A2, et R8). Les figures 7 à 10 présentent les profils obtenus pour 4 amorces différentes (U13, U17, U16, et U20).

Les profils d'amplification obtenus pour chaque amorce avec l'ensemble de l'échantillon, sont étudiés indépendamment. Pour une amorce donnée, chaque niveau de bande est codé spécifiquement par comparaison avec l'échantillon total. Les détails de la lecture sont présentés dans l'annexe 9.

Toutes les amorces RAPDs se sont révélées polymorphes. Certaines amorces (U13, U16, U20, R8, et A2) révèlent une grande variabilité, alors que les autres amorces (U17, R13, U19, N9, et U10) montrent moins de polymorphisme.

λ 55 56 56' 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 λ



Figure 7-a

λ 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 M24 M11 K5 C- λ

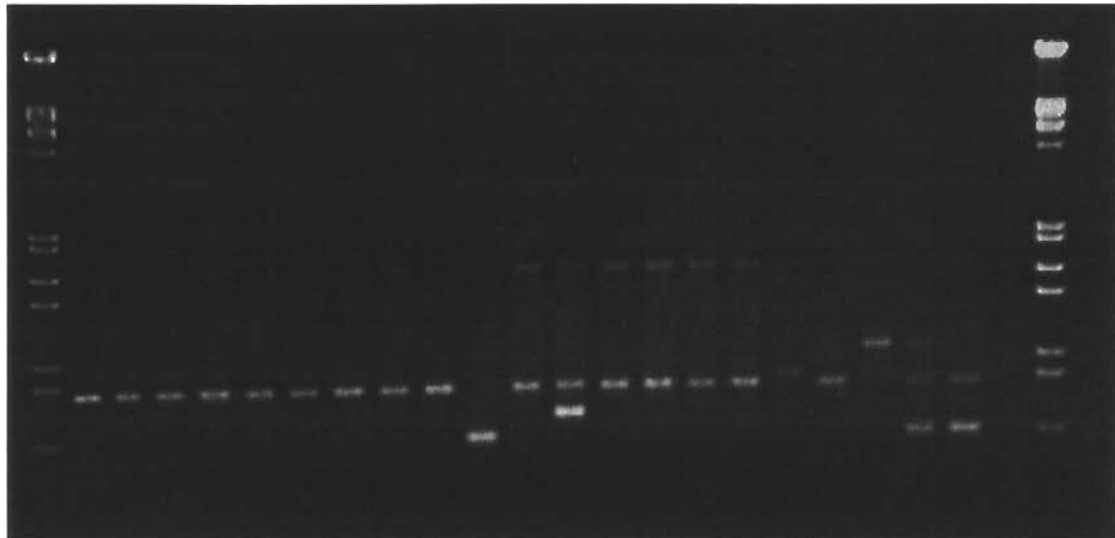


Figure 7-b

Figures 7-a et 7-b: Profils d'amplification RAPD obtenus pour une partie de l'échantillon d'étude décrit dans la table V (p41 et 42) avec l'amorce U13. Dans le gel de la figure 7-b, sont inclus également les 3 stocks marocains de *M. bovis*, M24, M11 et K5 (voir table VI, p43), ainsi que le contrôle négatif (C-). Le symbole λ correspond au marqueur de poids moléculaire.

λ 111 112 113 114 115 116 117 118 119 119' 120 121 122 123 124 125 126 126' 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 λ

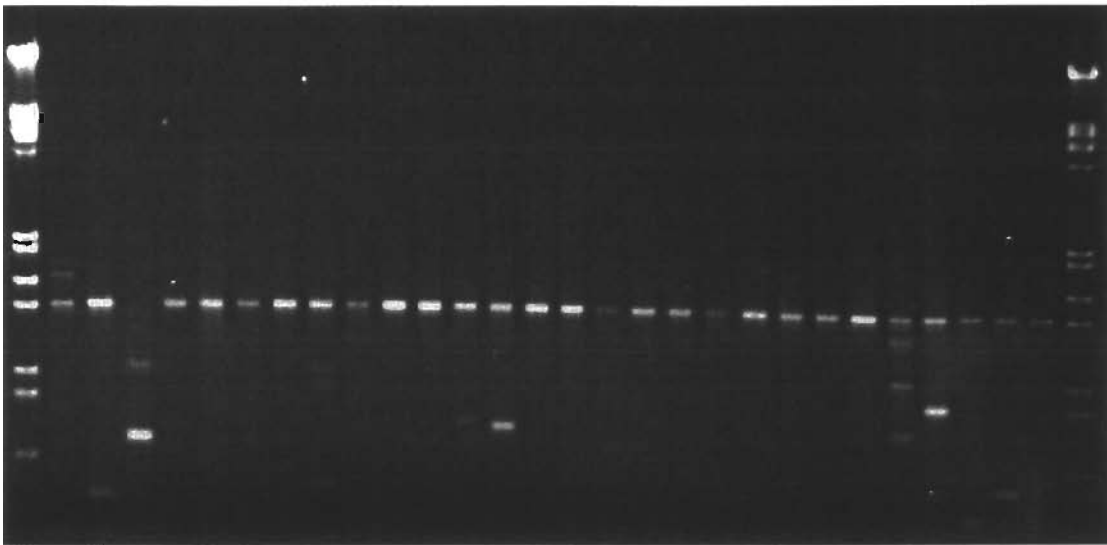


Figure 8-a

λ P101 P56 P95 P54 P55 P62 P112 P118 P25 P81 P125 P129 P131 P33 P48 PA1 PA2 PA3 C- λ

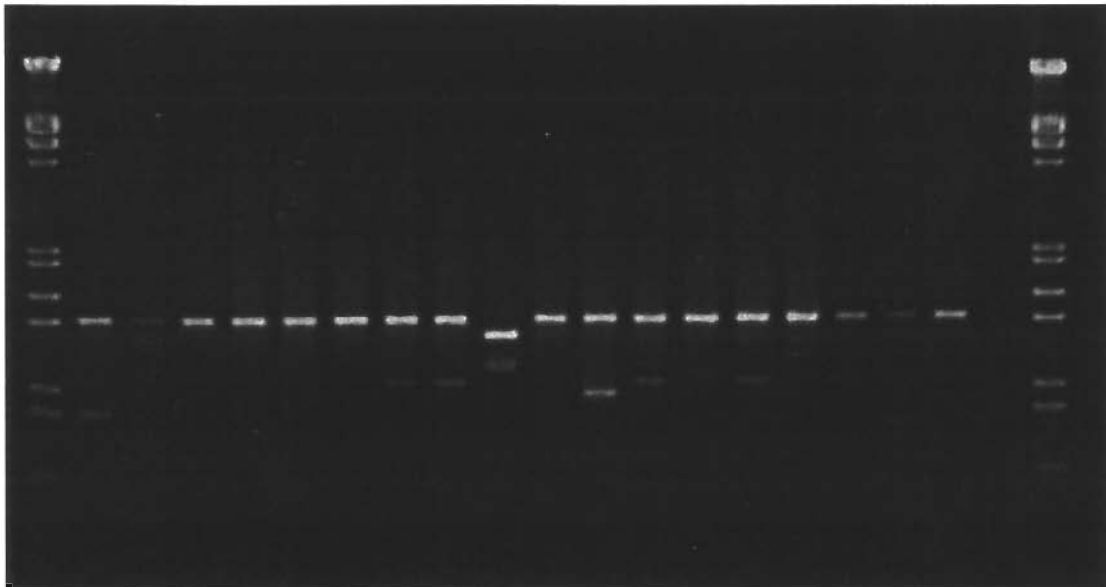


Figure 8-b

Figures 8-a et 8-b : Profils d'amplification RAPD obtenus pour une partie de l'échantillon d'étude avec l'amorce U17. Le gel de la figure 8-a montre les résultats pour certains isolats marocains de *M. tuberculosis* (voir table V, p41 et 42). Le gel de la figure 8-b présente les profils RAPDs obtenus avec les stocks de référence (voir table VI, p43). Le contrôle négatif (C-) est inclus dans le gel de la figure 8-b. Le symbole λ correspond au marqueur de poids moléculaire.

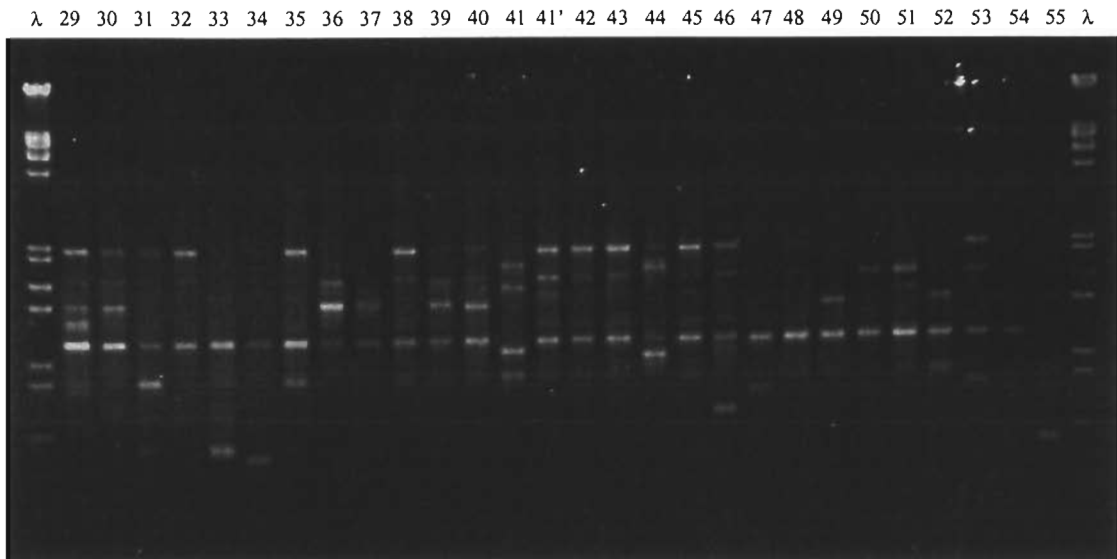


Figure 9-a

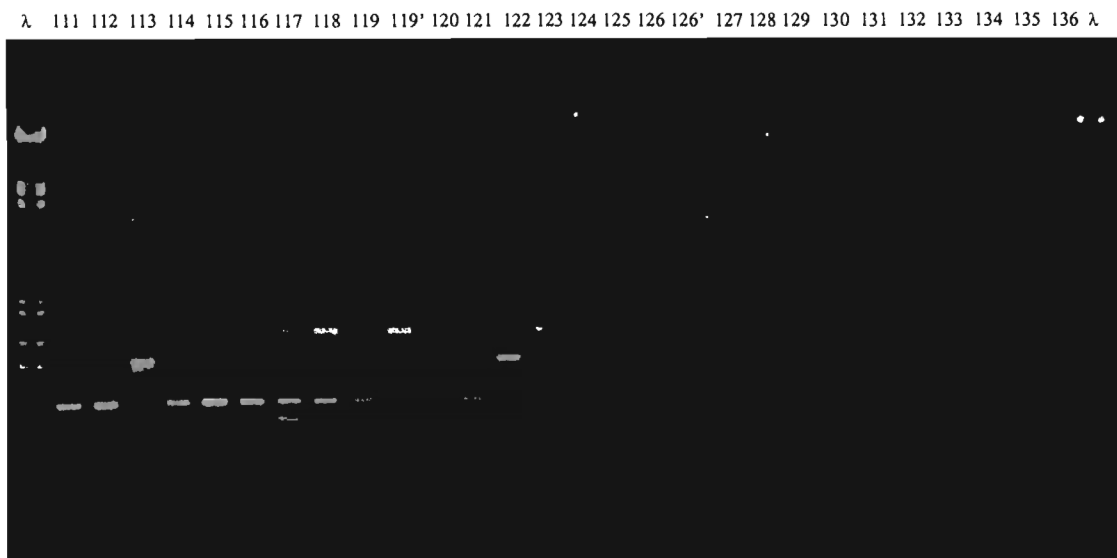


Figure 9-b

Figures 9-a et 9-b : Profils d'amplification RAPD obtenus pour une partie des isolats marocains de *M. tuberculosis* (voir table V, p41 et 42) avec l'amorce U16. Le symbole λ correspond au marqueur de poids moléculaire.

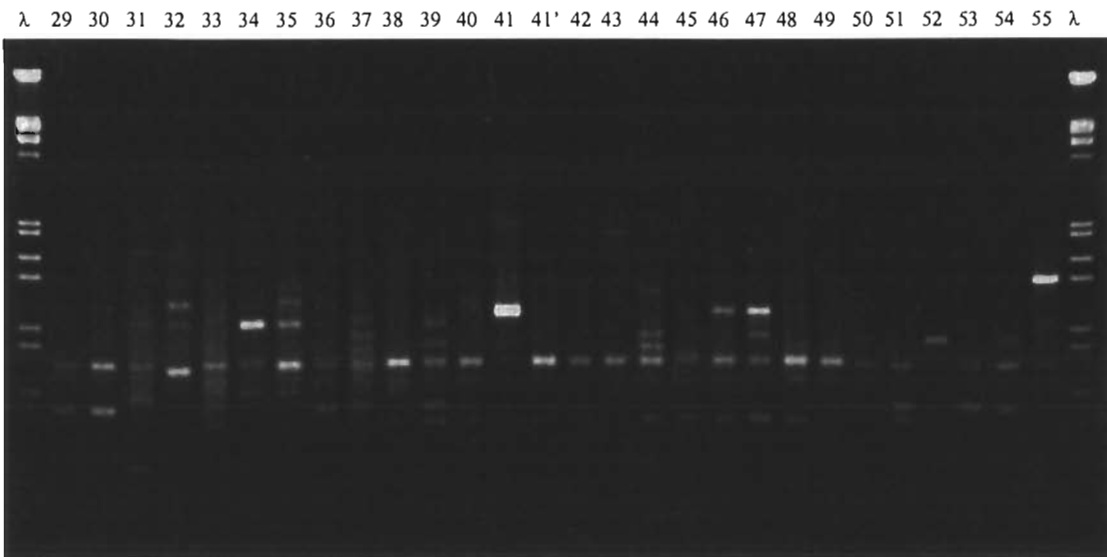


Figure 10-a

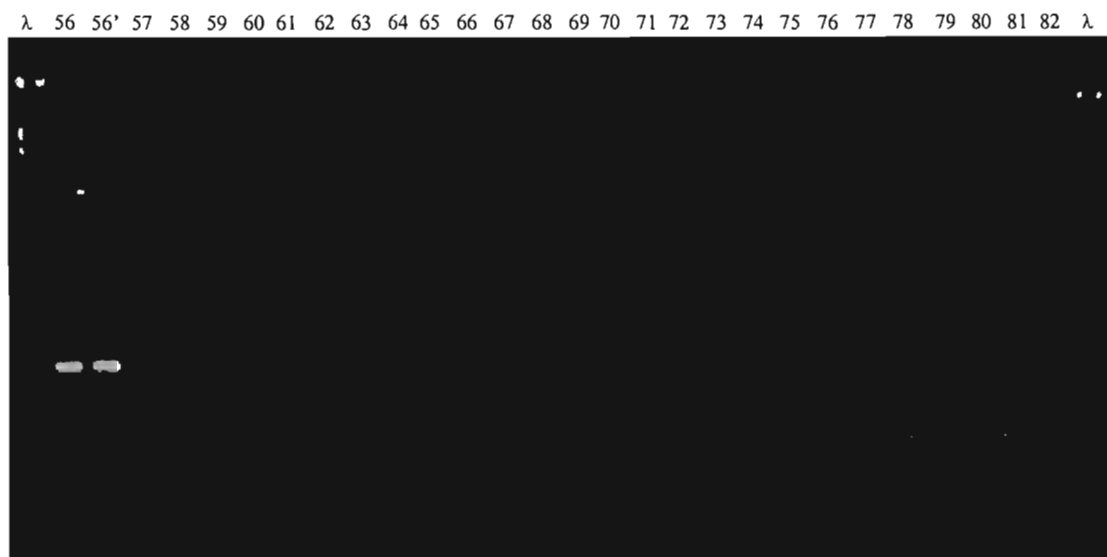


Figure 10-b

Figures 10-a et 10-b : Profils d'amplification RAPD obtenus pour une partie des isolats marocains de *M. tuberculosis* (voir table V, p41 et 42) avec l'amorce U20. Le symbole λ correspond au marqueur de poids moléculaire.

III.1.2 Analyse des profils obtenus par la technique MIRU-VNTR

Les 19 stocks, utilisés comme stocks de référence et fournis par le Dr Supply, ont déjà été analysés dans des études antérieures (Supply *et al.*, 2001). La technique MIRU-VNTR est donc appliquée à l'ensemble de l'échantillon marocain de notre étude (158 isolats), comprenant également les 3 stocks marocains de *Mycobacterium bovis*.

III.1.2.1 Typage par séquenceur automatique

Le génotypage sur séquenceur automatique a été réalisé sur un échantillon de 50 isolats marocains.

La figure 11 présente une image issue du programme « GeneScan » correspondant à la PCR multiplex obtenue avec les 2 couples d'amorces des locus 24 et 27, et à la PCR obtenue avec un seul couple d'amorces spécifique du locus 26. Les couleurs utilisées (jaune et vert) sont associées spécifiquement aux différents locus analysés. Le standard de taille est marqué en rouge.

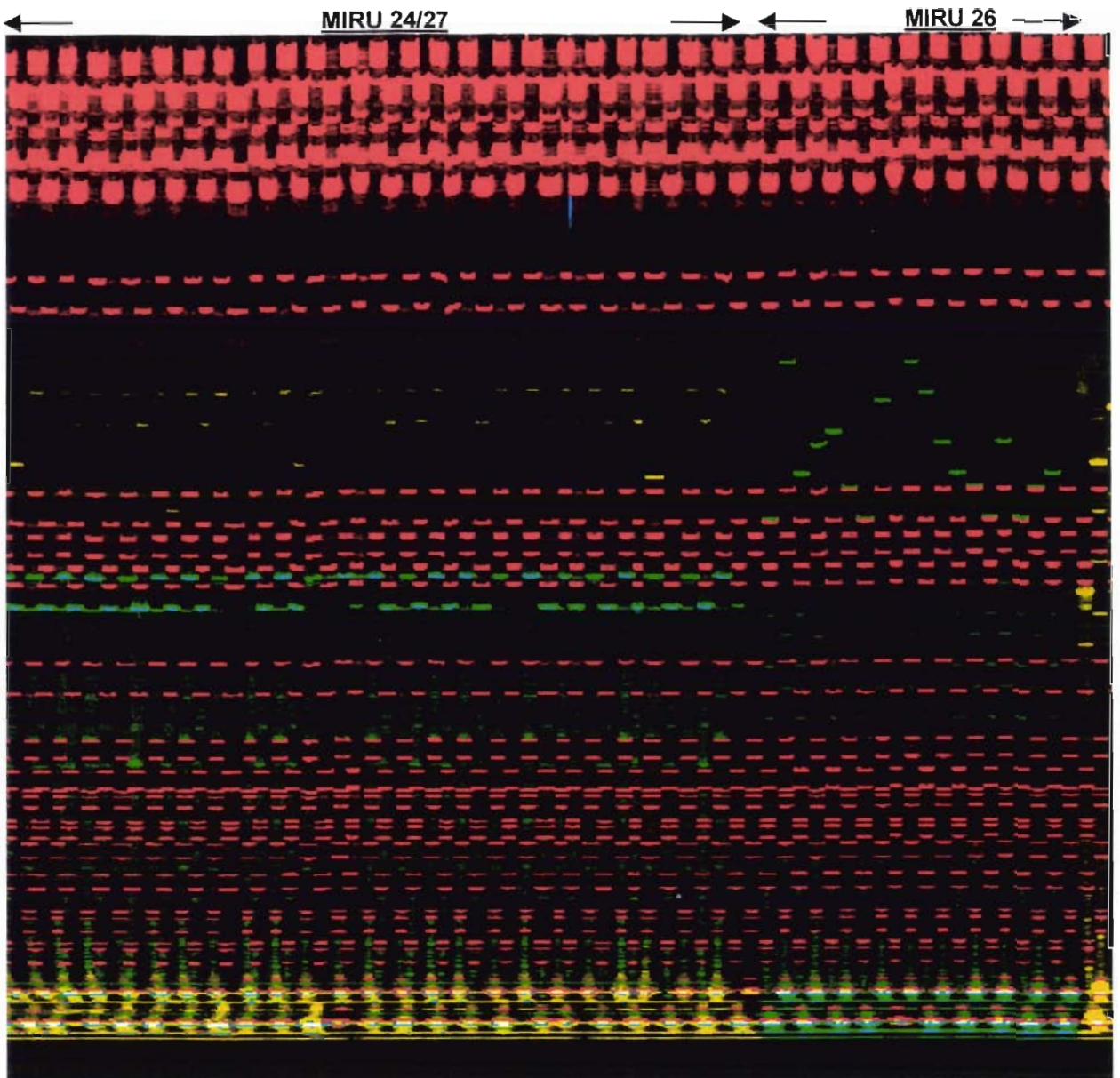


Figure 11: Profils issus du logiciel « GeneScan » après génotypage sur séquenceur automatique de PCR « multiplex » avec les 2 couples d'amorces correspondant aux locus 24 et 27, et de PCR avec le couple d'amorces correspondant au locus 26. Les fragments spécifiques des locus 24 et 26 sont marqués en vert, et ceux spécifiques du locus 27 sont marqués en jaune. Le standard de taille est marqué en rouge.

Les résultats obtenus sont détaillés dans l'annexe 10. Dans ce tableau (voir annexe 10), les isolats étudiés sur séquenceur automatique sont notés par le sigle (*) et les 19 stocks faisant l'objet d'une étude antérieure sont notés par le sigle (#).

III.1.2.2 Typage sur gel d'agarose

Les PCRs individuelles classiques utilisant des amorces non marquées sont réalisées pour le reste de l'échantillon. Les profils obtenus montrent un polymorphisme important dans 11 locus sur 12 (voir figures 12 à 15). En effet, seul le locus 24 est monomorphe pour l'ensemble de l'échantillon de *M. tuberculosis* isolé au Maroc. Tous les résultats relatifs à la lecture des profils MIRU-VNTRs sont détaillés dans l'annexe 10.

Dans certains cas, l'analyse des amplicons a mis en évidence 2 ou 3 bandes au lieu d'une. Ceci reflète généralement des « artefacts » de PCR (Supply *et al.*, 2001). Seul l'allèle majoritaire est pris en compte, il correspond à la bande de plus forte intensité (Dr Supply, communication personnelle). Par exemple, ce phénomène s'est présenté pour les isolats 57, 115 et 127 pour le locus 10.

M1 M2 51 52 53 54 55 56 56' 57 58 59 1 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 M1

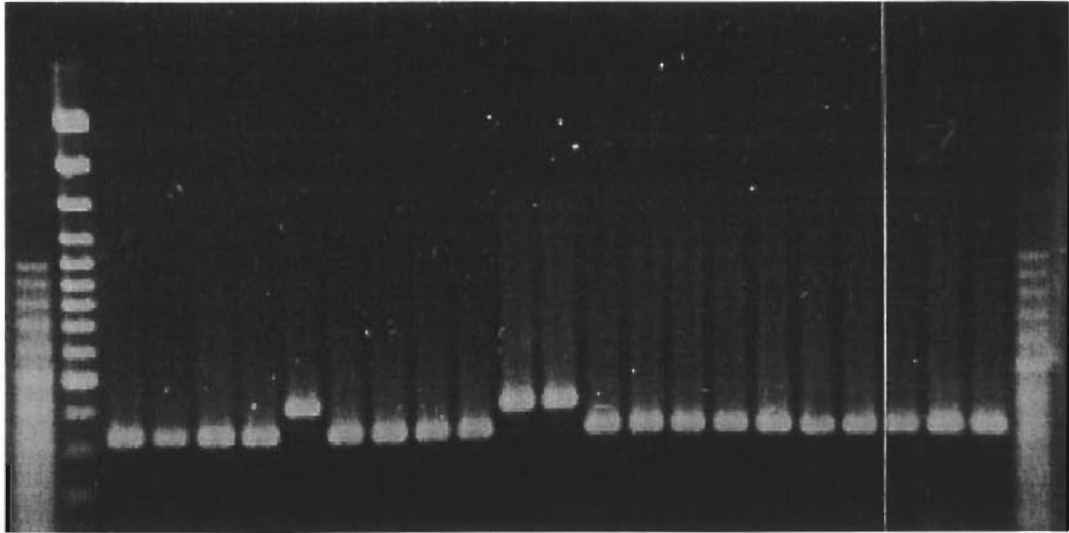


Figure 12-a

M1 M2 90 91 92 93 94 95 77 97 98 99 15 100 101 102 103 104 105 106 107 108 C- M1

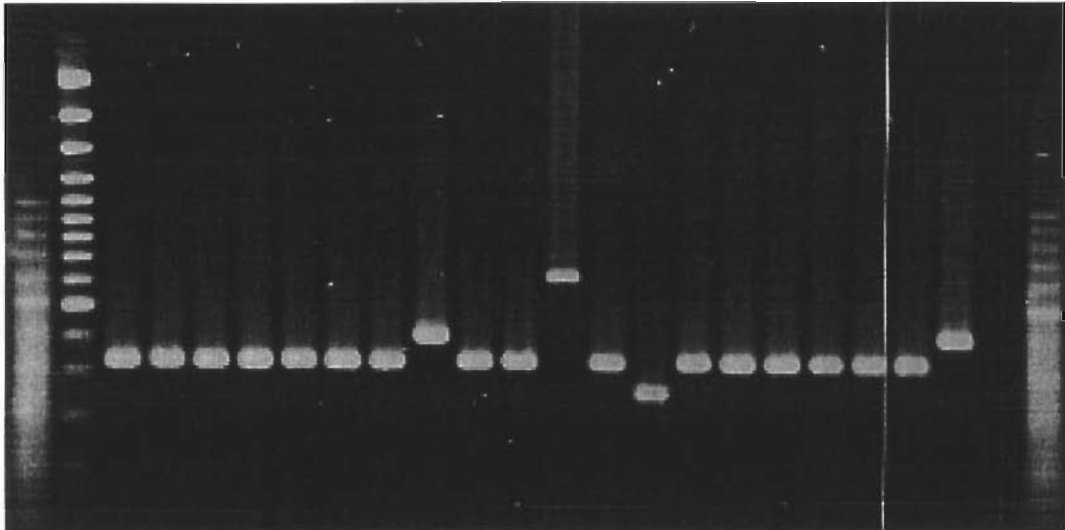


Figure 12-b

Figures 12-a et 12-b : Profils d'amplification du locus correspondant au MIRU 4, obtenus pour une partie des isolats marocains de *M. tuberculosis* (voir table V, p41 et 42). Le contrôle négatif (C-) ainsi que les marqueurs de poids moléculaire 100 pb (M2) et 20-100 pb (M1) sont également présentés sur les gels.

M1 M2 1 2 3 5' 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 6 10 16 33 41 M1



Figure 13-a

M1 M2 1 2 3 5' 95 71 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 6 10 16 33 41 M1

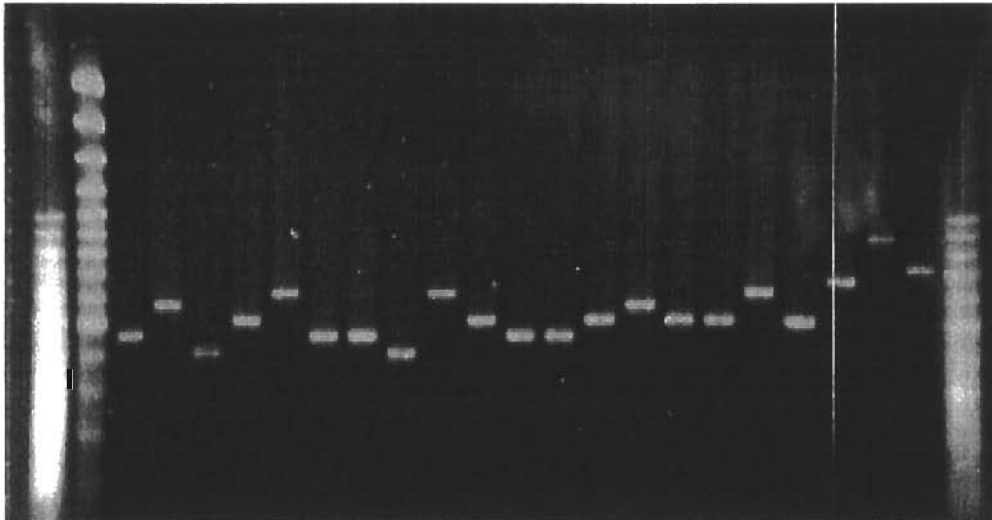


Figure 13-b

Figures 13-a et 13-b : Profils d'amplification du locus correspondant au MIRU 40, obtenus pour une partie des isolats marocains de *M. tuberculosis* (table V, p41 et 42). M1 et M2 correspondent aux marqueurs de poids moléculaire 20-100 pb et 100 pb respectivement.

M1 M2 5' 25 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 70 97 98 99 100 101 41 M1

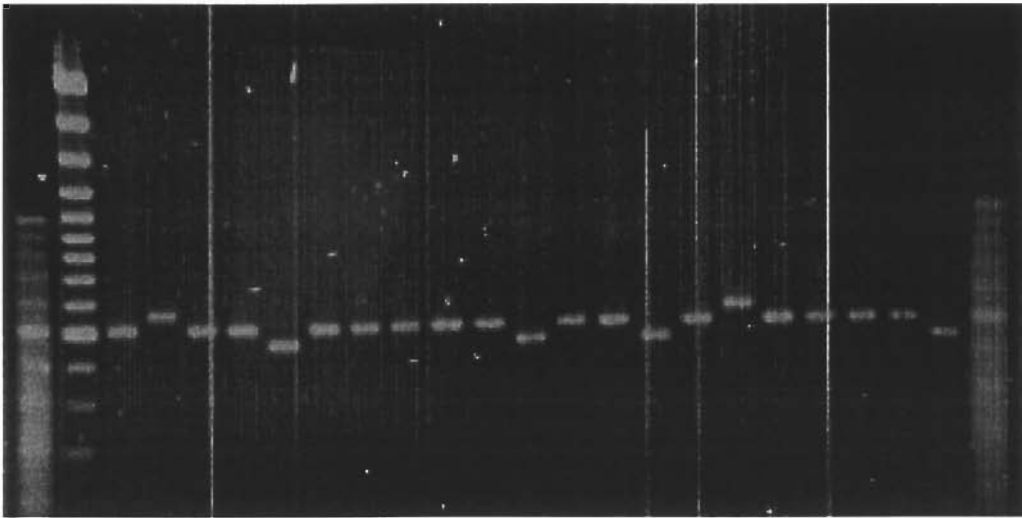


Figure 14-a

M1 M2 5' 25 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 41 M1

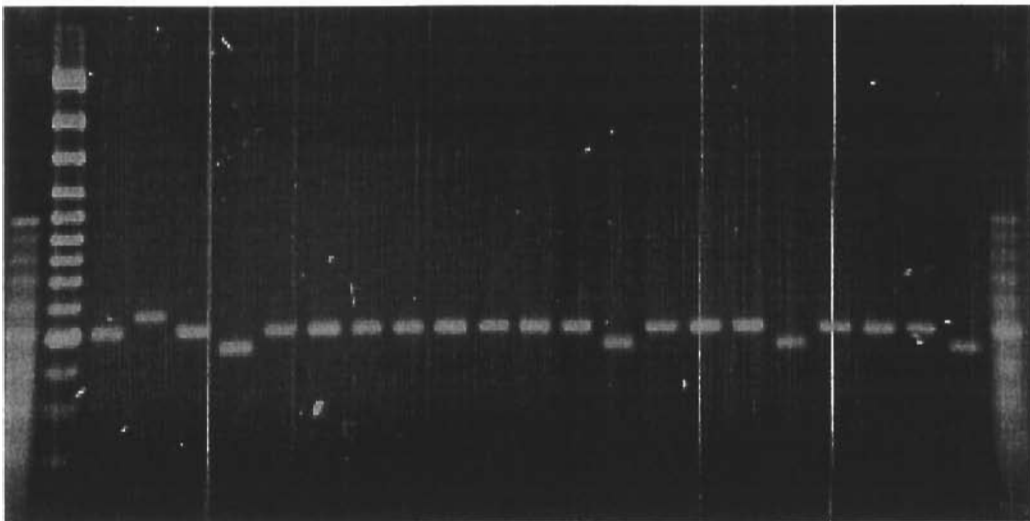


Figure 14-b

Figures 14-a et 14-b : Profils d'amplification du locus correspondant au MIRU 2, obtenus pour une partie des isolats marocains de *M. tuberculosis* (voir table V, p41 et 42). M1 et M2 correspondent aux marqueurs de poids moléculaire 20-100 pb et 100 pb respectivement.

M1 M2 5' 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 M1

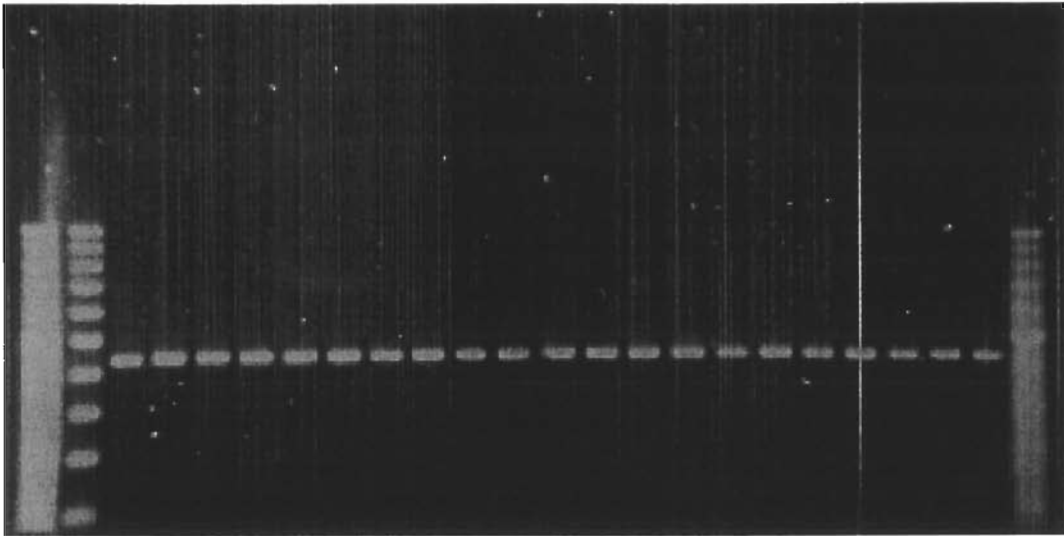


Figure 15-a

M1 M2 5' 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 119' 120 121 122 123 M1

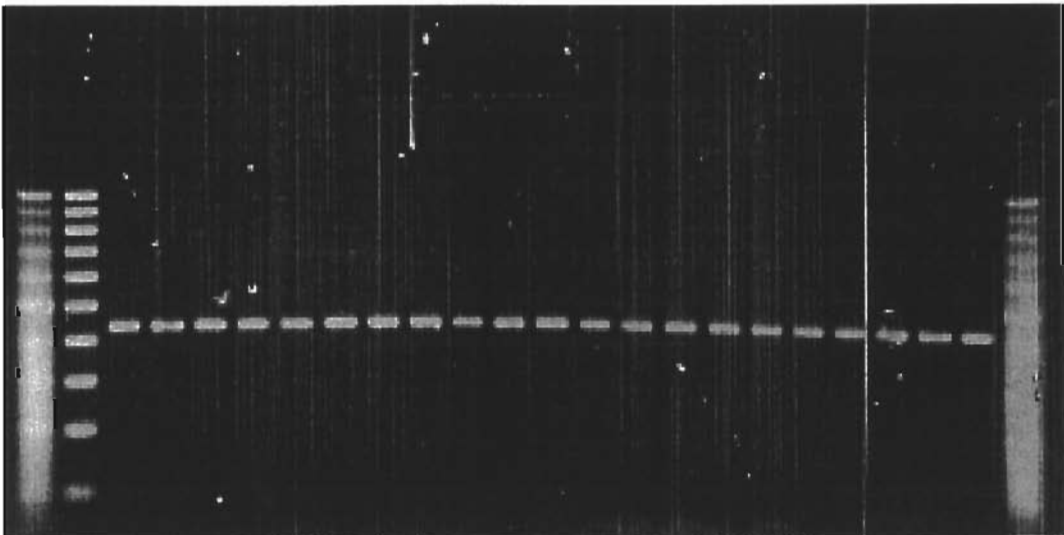


Figure 15-b

Figures 15-a et 15-b : Profils d'amplification du locus correspondant au MIRU 24, obtenus pour une partie des isolats marocains de *M. tuberculosis* (table V, p41 et 42). M1 et M2 correspondent aux marqueurs de poids moléculaire 20-100 pb et 100 pb respectivement.

III.1.3 La tuberculose familiale

Les isolats de 7 familles différentes (F1, F2, F3, F4, F5, F6, et F7) sont analysés afin d'étudier la transmission intra-familiale de la tuberculose.

Sur l'ensemble des amorces testées, les RAPDs ne révèlent pas de profils identiques pour la totalité des isolats prélevés au sein d'une même famille (voir annexe 9). Ainsi, pour les familles F1 (isolats 20, 21, 51), F3 (isolats 26, 56, 153), et F4 (isolats 34, 37, 58), 7 amorces sur 10 présentent des profils différents. Les amorces concernées sont (voir annexe 9) :

- U13, U17, R13, U16, U20, R8, et A2 pour les familles F1 et F4 ;
- U13, R13, U19, U16, U20, R8, et A2 pour la famille F3.

Pour les familles F5 (isolats 52 et 53) et F7 (isolats 131, 132, 133), le polymorphisme est détecté dans 4 amorces sur 10. Il s'agit de (voir annexe 9) :

- U13, U16, U20, et A2 pour la famille F5 ;
- U13, U17, R8, et A2 pour la famille F7.

Les isolats (118 et 119) des membres de la famille F6 montrent de la diversité seulement pour 2 amorces (U20 et R8), alors que les isolats (25 et 55) de la famille F2 sont tous différents entre eux et ceci pour l'ensemble des amorces testées.

Comme les RAPDs, le typage MIRU-VNTR a montré que certaines familles présentent des membres contaminés par des isolats différents génétiquement (voir annexe 10). Cette diversité reste toutefois plus faible comparativement aux résultats obtenus avec la technique RAPD.

Pour la famille F1, les isolats 20 et 21 sont identiques pour la totalité des locus MIRUs, alors que l'isolat 51 est différent pour 3 locus (MIRU 2, 23, et 40). Une situation similaire est retrouvée pour la famille F3 dans laquelle les isolats 26 et 153 sont identiques et l'isolat 56 est différent pour un locus (MIRU 23). Les isolats des familles F2 et F4 sont tous différents entre eux. Les isolats de la famille F4 sont polymorphes pour 5 locus (MIRU 2, 10, 20, 23, et 40), alors que ceux de la famille F2

diffèrent par un seul locus (MIRU 23). Les isolats des familles F5, F6 et F7 restent identiques pour les 12 locus analysés. Tous les résultats sont détaillés dans l'annexe 10.

III.1.4 Les suivis thérapeutiques

Parmi les 155 isolats marocains, 5 couples d'isolats (5 et 5', 41 et 41', 56 et 56', 119 et 119', 126 et 126') correspondent à des suivis thérapeutiques de 5 patients différents. Chaque couple représente par conséquent des prélèvements à des temps différents (entre 3 et 9 mois) sur un même patient.

La lecture des profils RAPDs des 5 couples d'isolats correspondants aux suivis thérapeutiques a révélé un polymorphisme plus ou moins important au sein de ces couples. Cela signifie qu'il existe une différence génétique entre l'isolat d'un premier prélèvement et l'isolat d'un second prélèvement d'un même patient.

3 couples (5 et 5', 119 et 119', 126 et 126') ont des profils RAPDs identiques pour 9 amorces. Pour une amorce, ils présentent une bande supplémentaire dans l'un des isolats de chaque couple. Les isolats 5 et 126' montrent respectivement une bande supplémentaire avec l'amorce R8, par rapport aux isolats 5' et 126 (voir annexe 9). L'isolat 119 présente également une bande supplémentaire par rapport à l'isolat 119' avec l'amorce U20 (voir annexe 9). Seul le couple (56, 56') garde un profil RAPD identique pour chacune des 10 amorces testées. Le couple (41, 41') s'avère plus différent par rapport aux autres couples. En effet, les 2 isolats montrent des profils complètement différents avec 3 amorces (U13, U16, et U20). Pour les amorces U19, R8 et A2, les profils RAPDs restent similaires avec seulement une bande supplémentaire dans l'un des isolats du couple (isolat 41) (voir annexe 9). Pour les 4 autres amorces, les 2 isolats montrent un profil identique.

Contrairement à la technique RAPD, tous les suivis thérapeutiques correspondants aux isolats (5, 5'), (41, 41'), (56, 56'), (119, 119'), (126, 126') ont donné les mêmes profils MIRU-VNTRs pour tous les locus (voir annexe 10).

Les différences obtenues pour certains couples par la méthode RAPD, permettent de mettre en évidence que cette technique est capable de détecter des phénomènes mutationnels rares. Ce résultat suggère que les marqueurs RAPDs ont une horloge moléculaire plus rapide que celle des marqueurs MIRU-VNTRs.

L'identité totale ou approximative des profils pour la plupart des isolats d'un même couple laisse suggérer que les patients concernés par les suivis thérapeutiques font une rechute ou sont infectés par la même souche. Cependant, l'hypothèse d'une réinfection par une nouvelle souche ne peut pas être exclue particulièrement pour les isolats du couple 41 et 41'.

En conséquence, afin d'éviter un biais lié à une double analyse d'un même isolat, nous avons considéré un seul isolat par couple (5', 41, 56, 119, et 126) pour les analyses de génétique des populations et de phylogénie.

III.2 Indices de diversité génétique

Afin d'estimer le degré de polymorphisme global au sein de la population de *M. tuberculosis* à Casablanca, les différents indices de diversité génétique sont calculés (diversité génotypique, taux de polymorphisme, diversité génétique moyenne « *H* », et moyenne des distances génétiques « distance de Jaccard ») uniquement sur l'échantillon marocain. De plus, comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, un isolat par patient est utilisé. Donc dans le cas des suivis thérapeutiques, seulement les isolats 5', 41, 56, 119, et 126 sont inclus dans les analyses de diversité génétique. La même chose sera appliquée pour les tests de génétique des populations et de phylogénie. L'échantillon d'étude ainsi que la population isolée dans la préfecture HMAS (Hay Mohammadi Aïn Sebaa) sont donc constitués respectivement de 150 et 97 isolats.

Dans le but de comprendre la distribution de la diversité dans l'échantillon d'étude, les sous-groupes suivants sont définis :

- l'ensemble des isolats marocains de *M. tuberculosis* ;
- les isolats de la préfecture la plus représentée, HMAS ;
- les isolats prélevés au cours de l'année 1997 ;

- les isolats prélevés au cours de l'année 1998 ;
- les isolats provenant de HMAS et prélevés au cours de l'année 1997 ;
- et les isolats provenant de HMAS et prélevés au cours de l'année 1998.

Les préfectures avec un faible échantillonnage ne sont pas étudiées. C'est le cas des préfectures BMSO (22 isolats) et CA (16 isolats).

III.2.1 Données RAPDs

III.2.1.1 Etude de la population marocaine

Tous les résultats relatifs à la lecture des profils RAPDs pour les différents groupes précités sont présentés dans l'annexe 9.

Sur l'ensemble de l'échantillon marocain, 146 bandes ont été obtenues pour la totalité des amorces RAPDs, avec une moyenne d'environ 15 bandes par amorce. L'analyse RAPD de la population marocaine de *M. tuberculosis* a également montré 136 génotypes différents sur la totalité des isolats (150 isolats). Cette diversité a été également retrouvée aussi bien dans les isolats de la préfecture HMAS (avec 86 génotypes différents sur un total de 97 isolats), que dans les isolats de l'année 1997 (avec 47 génotypes différents sur un total de 49 isolats), ou de l'année 1998 (57 génotypes différents sur un total de 60 isolats). Tous les résultats des indices de diversité calculés sur la base des données RAPDs sont présentés dans la table X. Pour le calcul de la moyenne des distances de Jaccard, une matrice générale est construite sur la base des données RAPDs présentées dans l'annexe 9.

Table X : Valeurs des différents indices de diversité pour les différents groupes considérés, sur la base des données RAPDs.

Groupe étudié	Effectif	Taux de polymorphisme ($\geq 1\%$; $\geq 5\%$)	Diversité génétique (H)	Moyenne des distances de Jaccard (Ecart type)	Diversité génotypique
<i>M. tuberculosis</i> Maroc	150	1 ; 1	0,48	0,39 (0,18)	0,91
<i>M. tuberculosis</i> HMAS	97	1 ; 0,9	0,42	0,33 (0,14)	0,89
<i>M. tuberculosis</i> Maroc - 1997	49	1 ; 0,9	0,43	0,34 (0,17)	0,96
<i>M. tuberculosis</i> Maroc - 1998	60	1 ; 1	0,44	0,37 (0,18)	0,95
<i>M. tuberculosis</i> HMAS - 1997	44	1 ; 0,9	0,4	0,31 (0,12)	0,95
<i>M. tuberculosis</i> HMAS - 1998	30	1 ; 0,9	0,36	0,27 (0,13)	0,97

Les valeurs obtenues avec les différents indices de diversité ont montré un polymorphisme important pour la population de *M. tuberculosis* isolée dans la ville de Casablanca. Ce polymorphisme existe aussi bien dans les isolats d'une même préfecture que parmi les isolats d'une même année. Toutes les amorces RAPDs sont polymorphes pour l'ensemble de l'échantillon et pour les différents sous-groupes considérés.

III.2.1.2 Données RAPDs pour d'autres micro-organismes

Cette partie expose les résultats des diversités génétiques moyennes (H) obtenues pour d'autres micro-organismes, publiées par d'autres auteurs. En se basant sur le caractère généraliste des marqueurs RAPDs, ces valeurs donnent la possibilité de comparer la diversité génétique de *M. tuberculosis* par rapport à d'autres taxons. Les taxons utilisés pour cette comparaison sont :

- des protozoaires parasites incluant l'espèce *Trypanosoma cruzi* (Brisse, Barnabé and Tibayrenc, 2000), ainsi que différentes espèces du genre *Leishmania* (*L. braziliensis*, *L. peruviana*, *L. guyanensis*, et *L. infantum*) (Bañuls, 1998) ;
- différentes levures, comme l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* (Joly, 2000), et l'espèce *Candida albicans* (Darce, 2002) ;
- et une bactérie représentée par l'espèce *Escherichia coli* (Grandhomme, 1999).

La table XI présente les valeurs de diversité génétique moyenne pour les différentes espèces considérées. Dans cette table, la valeur obtenue pour la population marocaine de *M. tuberculosis* est rajoutée pour permettre une comparaison directe.

Table XI : Valeurs de la diversité génétique (*H*) chez différents micro-organismes.

Taxon	Diversité génétique moyenne (H)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	0,48
<i>Leishmania braziliensis</i>	0,14
<i>L. peruviana</i>	0,07
<i>L. guyanensis</i>	0,19
<i>L. infantum</i>	0,14
<i>Trypanosoma cruzi</i>	0,8
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,42
<i>Candida albicans</i>	0,51
<i>Escherichia coli</i>	0,85

Par rapport à toutes les espèces de *Leishmania* utilisées, *M. tuberculosis* présente une plus grande diversité génétique. La valeur de la diversité génétique obtenue pour *M. tuberculosis* est proche de celle des 2 espèces *S. cerevisiae* et *C. albicans*. Toutefois, cette diversité reste plus faible que celle de *T. cruzi* et de *E. coli*.

III.2.2 Données MIRU-VNTRs

III.2.2.1 Etude de la population marocaine

Pour l'ensemble de l'échantillon marocain, 52 allèles sont obtenus avec les 12 locus MIRU-VNTRs, avec une moyenne d'environ 4 allèles par locus. 95 génotypes différents sont identifiés pour toute la population marocaine de *M. tuberculosis* (150 isolats). L'analyse des isolats provenant de la préfecture HMAS (97 isolats) ainsi que celle des isolats de l'année 1997 (49 isolats) et 1998 (60 isolats) ont montré respectivement 64, 36 et 47 génotypes différents.

Les différents indices de diversité sont calculés pour les MIRU-VNTRs, comme pour les RAPDs, pour l'ensemble de la population marocaine ainsi que pour les différentes subdivisions précitées. Les données MIRU-VNTRs utilisées pour le calcul des indices sont présentées dans l'annexe 10. Les résultats des différents indices de diversité basés sur les données MIRU-VNTRs sont détaillés dans la table XII. Pour le calcul de la moyenne des distances de Jaccard, une matrice générale a été construite sur la base des données MIRU-VNTRs présentées dans l'annexe 10.

Table XII : Valeurs des différents indices de diversité pour les différents groupes considérés, sur la base des données MIRU-VNTRs.

Groupe étudié	Effectif	Taux de polymorphisme ($\geq 1\%$; $\geq 5\%$)	Diversité génétique (H)	Moyenne des Distances de Jaccard (Ecart type)	Diversité génotypique
<i>M. tuberculosis</i> Maroc	150	0,92 ; 0,83	0,38	0,55 (0,13)	0,63
<i>M. tuberculosis</i> HMAS	97	0,92 ; 0,83	0,37	0,54 (0,14)	0,66
<i>M. tuberculosis</i> Maroc - 1997	49	0,92 ; 0,83	0,35	0,52 (0,15)	0,73
<i>M. tuberculosis</i> Maroc - 1998	60	0,92 ; 0,75	0,38	0,55 (0,12)	0,78
<i>M. tuberculosis</i> HMAS - 1997	44	0,92 ; 0,75	0,35	0,52 (0,15)	0,73
<i>M. tuberculosis</i> HMAS - 1998	30	0,75 ; 0,75	0,38	0,56 (0,13)	0,9

L'analyse des divers groupes a révélé également un polymorphisme important, même si les valeurs obtenues pour les différents indices de diversité sont plus faibles que celles obtenues avec la technique RAPD (voir table X, p 83). En considérant l'échantillon total de *M. tuberculosis* isolé au Maroc, tous les locus sont polymorphes à l'exception du locus 24. Ce dernier est complètement monomorphe pour l'ensemble de la population marocaine (voir annexe 10). C'est également le cas dans les différentes subdivisions, excepté pour le groupe correspondant à la préfecture HMAS et isolé en 1998. En effet, pour ce dernier groupe, 3 locus sont monomorphes, il s'agit des locus 24, 27, et 39 (voir annexe 10).

III.2.2.2 Données MIRU-VNTRs pour d'autres populations de *M. tuberculosis*

Cette partie expose les indices de diversité calculés sur la base de données obtenues pour d'autres populations de *M. tuberculosis*, analysées et publiées par d'autres auteurs (Mazars *et al.*, 2001 ; Supply *et al.*, sous presse). Ces valeurs

permettent la comparaison de la diversité génétique de la population marocaine de *M. tuberculosis* par rapport à d'autres populations issues d'autres pays.

On a utilisé pour cela, les résultats MIRU-VNTRs disponibles dans la base de données accessible sur internet (<http://www.ibl.fr/mirus/mirus.html>). Cette base de données comprend, jusqu'à présent, les résultats MIRU-VNTRs de 165 stocks différents du complexe *M. tuberculosis* provenant de plusieurs pays (Supply *et al.*, 2001). Cependant, seule la population de *M. tuberculosis* isolée en France est incluse dans cette étude, car c'est la population la plus représentée avec 53 isolats différents. Une autre population d'Afrique du Sud est également utilisée dans cette analyse. Les données MIRU-VNTRs de cette population nous ont été fournies par le Dr Supply (Laboratoire des Mécanismes Moléculaires de la Pathogenèse Bactérienne, Institut Pasteur de Lille) (Supply *et al.*, sous presse).

Les indices de diversité sont calculés pour ces deux populations. Ces deux échantillons nous permettent une comparaison de la population marocaine avec un pays en voie de développement à haute incidence (Afrique du Sud) et un pays à faible incidence (France). Les annexes 11 et 12 présentent les résultats MIRU-VNTRs obtenus respectivement pour les populations française et sud-africaine (Mazars *et al.*, 2001 ; Supply *et al.*, sous presse).

Les indices de diversité sont calculés pour l'ensemble de ces populations, et les résultats sont présentés dans la table XIII (p88). Les valeurs obtenues pour la population de *M. tuberculosis* isolée au Maroc sont rajoutées dans la table pour permettre la comparaison directe des résultats. Les moyennes des distances de Jaccard pour les populations française et sud-africaine sont calculées à partir des matrices générales construites sur la base des données MIRU-VNTRs respectives à chaque population et présentées dans les annexes 11 et 12.

Table XIII : Valeurs des indices de diversité obtenues dans les populations *M. tuberculosis* marocaine, française et sud-africaine. Elles sont basées sur les données MIRU-VNTRs.

Groupe étudié	Effectif	Taux de polymorphisme ($\geq 1\%$; $\geq 5\%$)	Diversité génétique (<i>H</i>)	Moyenne des Distances de Jaccard (Ecart type)	Diversité génotypique
<i>M. tuberculosis</i> Maroc	150	0,92 ; 0,83	0,38	0,55 (0,13)	0,63
<i>M. tuberculosis</i> France	53	1 ; 0,92	0,43	0,59 (0,17)	0,83
<i>M. tuberculosis</i> Afrique du Sud	209	0,92 ; 0,83	0,35	0,52 (0,15)	0,46

La comparaison des différents indices de diversité entre les populations marocaine, française et sud-africaine permet de constater que l'échantillon isolé en France est plus polymorphe que l'échantillon marocain et que l'échantillon isolé en Afrique du Sud moins polymorphe.

III.3 Analyse de la structure de la population

Comme nous l'avons souligné dans le chapitre « Matériel et Méthodes » (p62), seuls les tests de recombinaison sont utilisés dans ce travail. Tous étudient différentes facettes du déséquilibre de liaison, ou association non aléatoire de génotypes d'un locus à l'autre. Ces tests sont appliqués sur la population marocaine de *M. tuberculosis* et sur les différents sous-groupes décrits précédemment pour le calcul des indices de diversité (p81). L'analyse dans les différents sous-groupes permet d'éviter tout biais dû à la séparation géographique et temporelle (voir partie « Matériel et Méthodes », p63).

III.3.1 Tests de génétique des populations basés sur la technique RAPD

La table XIV présente les résultats obtenus pour les différents tests de recombinaison calculés sur la base des données RAPDs.

Table XIV : Tests de recombinaison (*d1*, *d2*, *e*, et *f*) pour l'ensemble des groupes étudiés, calculés à partir des données RAPDs. Les valeurs en gras sont significatives et donc rejettent l'hypothèse nulle de panmixie.

Groupe étudié	Effectif	Test <i>d1</i>	Test <i>d2</i>	Test <i>e</i>	Test <i>f</i>
<i>M. tuberculosis</i> Maroc	150	$P \leq 10^{-4}$	$2,6 \times 10^{-2}$	$P \leq 10^{-4}$	$P \leq 10^{-4}$
<i>M. tuberculosis</i> HMAS	97	$1,3 \times 10^{-3}$	$3,6 \times 10^{-1}$	$P \leq 10^{-4}$	$P \leq 10^{-4}$
<i>M. tuberculosis</i> Maroc - 1997	49	$4,6 \times 10^{-2}$	$4,9 \times 10^{-1}$	$1,4 \times 10^{-1}$	$3,7 \times 10^{-3}$
<i>M. tuberculosis</i> Maroc - 1998	60	$5,7 \times 10^{-3}$	$2,8 \times 10^{-2}$	$1,5 \times 10^{-2}$	$P \leq 10^{-4}$
<i>M. tuberculosis</i> HMAS - 1997	44	$8,1 \times 10^{-2}$	$6,4 \times 10^{-1}$	$2,6 \times 10^{-1}$	$4,6 \times 10^{-3}$
<i>M. tuberculosis</i> HMAS - 1998	30	$1,3 \times 10^{-1}$	$6,2 \times 10^{-1}$	$6,2 \times 10^{-1}$	$1,6 \times 10^{-1}$

Les valeurs obtenues avec les tests *d1*, *d2*, et *e* sont significatives pour la majorité des groupes analysés. Toutefois, contrairement aux autres tests, le test *d2* reste significatif seulement pour l'échantillon total de *M. tuberculosis* isolé au Maroc et pour les isolats de 1998. Les résultats obtenus avec le test *f* montrent des valeurs très significatives pour toutes les subdivisions considérées sauf pour le dernier groupe correspondant aux isolats provenant de la préfecture HMAS et isolés en 1998. Par conséquent, les valeurs obtenues pour l'ensemble des tests de génétique des populations utilisés suggèrent l'existence d'un déséquilibre de liaison significatif dans tous les groupes étudiés.

Par ailleurs, afin de distinguer une évolution clonale fondamentale d'une évolution clonale épidémique (structure panmictique basique avec « fusée clonale »)

décrite par Maynard Smith *et al.* (1993), tous les groupes précités sont analysés en éliminant tous les génotypes répétés. Par conséquent seul le test de déséquilibre de liaison (test *f*) est réalisé. Les résultats obtenus sont indiqués dans la table XV.

Table XV : Valeurs du test *f* sans les génotypes répétés. Ces résultats sont basés sur les données RAPDs. Les valeurs en gras sont significatives.

Groupe étudié	Effectif	Test <i>f</i>
<i>M. tuberculosis</i> Maroc	133	$P \leq 10^{-4}$
<i>M. tuberculosis</i> HMAS	83	$3,5 \times 10^{-3}$
<i>M. tuberculosis</i> Maroc - 1997	47	$1,7 \times 10^{-2}$
<i>M. tuberculosis</i> Maroc - 1998	57	$P \leq 10^{-4}$
<i>M. tuberculosis</i> HMAS - 1997	42	$1,5 \times 10^{-2}$
<i>M. tuberculosis</i> HMAS - 1998	29	$1,3 \times 10^{-1}$

Même sans génotype répété, les valeurs du test *f* sont restées significatives pour les groupes concernant l'ensemble des isolats marocains, les isolats provenant de la préfecture HMAS et la population marocaine isolée en 1998.

III.3.2 Tests de génétique des populations basés sur la technique MIRU-VNTR

L'analyse du déséquilibre de liaison est également réalisée sur les différentes subdivisions à partir des données MIRU-VNTRs. Les résultats obtenus pour les différents tests (*d1*, *d2*, *e*, et *f*) sont présentés dans la table XVI.

Table XVI : Tests de recombinaison (*d1*, *d2*, *e*, et *f*) pour l'ensemble des groupes étudiés. Les résultats sont basés sur les données MIRU-VNTRs. Les valeurs en gras sont significatives.

Groupe étudié	Effectif	Test <i>d1</i>	Test <i>d2</i>	Test <i>e</i>	Test <i>f</i>
<i>M. tuberculosis</i> Maroc	150	$P \leq 10^{-4}$	$P \leq 10^{-4}$	$P \leq 10^{-4}$	$P \leq 10^{-4}$
<i>M. tuberculosis</i> HMAS	97	$P \leq 10^{-4}$	$P \leq 10^{-4}$	$P \leq 10^{-4}$	$P \leq 10^{-4}$
<i>M. tuberculosis</i> Maroc - 1997	49	$P \leq 10^{-4}$	$P \leq 10^{-4}$	$P \leq 10^{-4}$	$P \leq 10^{-4}$
<i>M. tuberculosis</i> Maroc - 1998	60	$P \leq 10^{-4}$	$2,4 \times 10^{-3}$	$P \leq 10^{-4}$	$P \leq 10^{-4}$
<i>M. tuberculosis</i> HMAS - 1997	44	$P \leq 10^{-4}$	$P \leq 10^{-4}$	$P \leq 10^{-4}$	$P \leq 10^{-4}$
<i>M. tuberculosis</i> HMAS - 1998	30	$P \leq 10^{-4}$	$1,5 \times 10^{-1}$	3×10^{-4}	10^{-4}

Contrairement aux valeurs obtenues avec les données RAPDs, tous les tests effectués sur l'ensemble des groupes considérés donnent des résultats hautement significatifs à l'exception d'un test. En effet, la seule valeur non significative est obtenue pour le test *d2* sur les isolats provenant de la préfecture HMAS et isolés au cours de l'année 1998. Ces résultats suggèrent également un déséquilibre de liaison très significatif pour les échantillons étudiés.

Les tests *f* sont également réalisés sans génotype répété pour étudier la distinction entre une évolution clonale prédominante et une clonalité épidémique. La table XVII présente les résultats obtenus.

Table XVII : Valeurs du test *f* sans les génotypes répétés. Ces résultats sont basés sur les données MIRU-VNTRs. Les valeurs significatives sont indiquées en gras.

Groupe étudié	Effectif	Test <i>f</i>
<i>M. tuberculosis</i> Maroc	92	$P \leq 10^{-4}$
<i>M. tuberculosis</i> HMAS	62	$2,6 \times 10^{-3}$
<i>M. tuberculosis</i> Maroc - 1997	36	$2,6 \times 10^{-1}$
<i>M. tuberculosis</i> Maroc - 1998	47	$P \leq 10^{-4}$
<i>M. tuberculosis</i> HMAS - 1997	32	$1,1 \times 10^{-1}$
<i>M. tuberculosis</i> HMAS - 1998	27	7×10^{-4}

Dans ce cas également, les valeurs du test *f* sont significatives pour la majorité des groupes considérés sauf pour l'ensemble des isolats de 1997 et pour les isolats provenant de la préfecture HMAS et isolés également au cours de l'année 1997.

III.3.3 Test de corrélation entre les 2 techniques moléculaires utilisées

Le test *g* a été appliqué sur l'ensemble des groupes précités afin d'estimer la corrélation entre les 2 techniques moléculaires utilisées dans ce travail (RAPD et MIRU-VNTR). La table XVIII présente les résultats obtenus pour la totalité de la population marocaine mais également pour les différentes subdivisions considérées.

Table XVIII : Valeurs obtenues pour le test *g* sur la base des matrices de distances obtenues pour les deux marqueurs génétiques RAPD et MIRU-VNTR. Les valeurs notées en gras sont significatives.

Groupe étudié	Test <i>g</i>
<i>M. tuberculosis</i> (Maroc)	P = 0,0091 (r = 0,1)
<i>M. tuberculosis</i> (HMAS)	P = 0,02 (r = 0,11)
<i>M. tuberculosis</i> (Maroc – 1997)	P = 0,1 (r = 0,11)
<i>M. tuberculosis</i> (Maroc – 1998)	P = 0,04 (r = 0,12)
<i>M. tuberculosis</i> (HMAS – 1997)	P = 0,03 (r = 0,18)
<i>M. tuberculosis</i> (HMAS – 1998)	P = 0,07 (r = 0,15)

La limite de signification étant 0,05, les valeurs obtenues pour la majorité des groupes étudiés sont significatives. La corrélation trouvée entre ces 2 marqueurs génétiques indépendants suggère par conséquent un déséquilibre de liaison significatif pour la population analysée.

III.4 Analyse phylogénétique

Comme pour les analyses de génétique des populations, un seul stock par suivi (5', 41, 56, 119, et 126) est intégré dans ces analyses.

III.4.1 Arbres de Neighbor-Joining

A partir des matrices des distances de Jaccard obtenues avec les données RAPDs (voir annexe 9) et MIRU-VNTRs (voir annexe 10), des dendogrammes sont construits par la méthode du Neighbor-Joining (Saitou and Nei, 1987).

Différentes subdivisions sont réalisées pour avoir une vue globale des relations génétiques et de la structuration entre tous les stocks de l'étude, mais également dans chacun des groupes de notre échantillon. Il s'agit des subdivisions suivantes :

- la totalité de l'échantillon (voir figures 16 et 24, p96 et 103) ;
- l'échantillon total de *M. tuberculosis* comprenant les stocks de références (voir figures 17 et 25, p97 et 104) ;

- la population de *M. tuberculosis* isolée au Maroc (voir figures 18 et 26, p98 et 105) ;
- les isolats provenant de la préfecture HMAS (voir figures 19 et 27, p99 et 106) ;
- les isolats de l'année 1997 (voir figures 20 et 28, p100 et 107) ;
- les isolats de l'année 1998 (voir figures 21 et 29, p101 et 108) ;
- les isolats provenant de HMAS prélevés en 1997 (voir figures 23 et 30, p102 et 109) ;
- et les isolats provenant de HMAS prélevés en 1998 (voir figures 22 et 31, p102 et 109).

Pour tous les groupes, le stock de *M. canettii* (P48, voir table VI, p43) est utilisé comme groupe externe. Les arbres de Neighbor-Joining basés sur les données RAPDs et MIRU-VNTRs sont présentés dans les figures 16 à 23 (p96 à 102), et 24 à 31 (p103 à 109) respectivement.

Les différents arbres construits montrent que la population de *M. tuberculosis* isolée au Maroc est mélangée avec les autres stocks originaires d'autres pays (voir figures 17 et 25, p97 et 104). L'échantillon marocain ne représente donc pas un groupe distinct isolé des autres stocks. Ce résultat est obtenu aussi bien avec les données RAPDs qu'avec les données MIRU-VNTRs (voir figures 17 et 25, p97 et 104).

Cependant, l'observation des dendrogrammes construits sur la base des données de l'échantillon total montrent que la hiérarchisation et le groupement entre les stocks ne sont pas identiques avec les 2 marqueurs moléculaires (voir figures 16 et 24, p96 et 103). En effet, en se basant sur les données RAPDs (voir figure 16, p96), la population marocaine est mélangée avec d'autres stocks de *M. tuberculosis* provenant d'autres pays ainsi qu'avec d'autres espèces du complexe *M. tuberculosis*. La situation est différente avec les données MIRU-VNTRs (voir figure 24, p103). L'échantillon du Maroc est mélangé avec tous les autres stocks de *M. tuberculosis* utilisés comme stocks de référence, excepté le stock isolé en Inde (P125), qui est séparé du reste des stocks (voir figure 24, p103). De plus, à l'exception des 2 stocks marocains de *M. bovis* (M24 et M11) et d'un stock de *M.*

africanum (P55), toutes les autres espèces du complexe *M. tuberculosis* sont séparées distinctement de la population marocaine analysée (voir figure 24, p103).

A partir des arbres phylogénétiques obtenus pour la population marocaine, certains groupes se dessinent (voir figures 18 et 26, p98 et 105). Toutefois à partir de l'observation des arbres correspondants aux populations isolées dans la même préfecture (voir figures 19 et 27, p99 et 106) ou au cours de la même année (voir figures 20 à 22, et 28 à 31, p100 à 102 et p107 à 109), on ne retrouve pas d'individualisation nette de groupes majoritaires. De plus, l'utilisation de la fonction « Identification » du logiciel « Treedyn » (Chevenet, Bañuls and Barnabé, 2000) a montré qu'aucun des groupes n'est associé aux propriétés biologiques (comme la résistance aux antibiotiques), aux catégories cliniques (tuberculose chronique ou rechute), aux localisations géographiques (préfecture), ou aux années d'isolement.

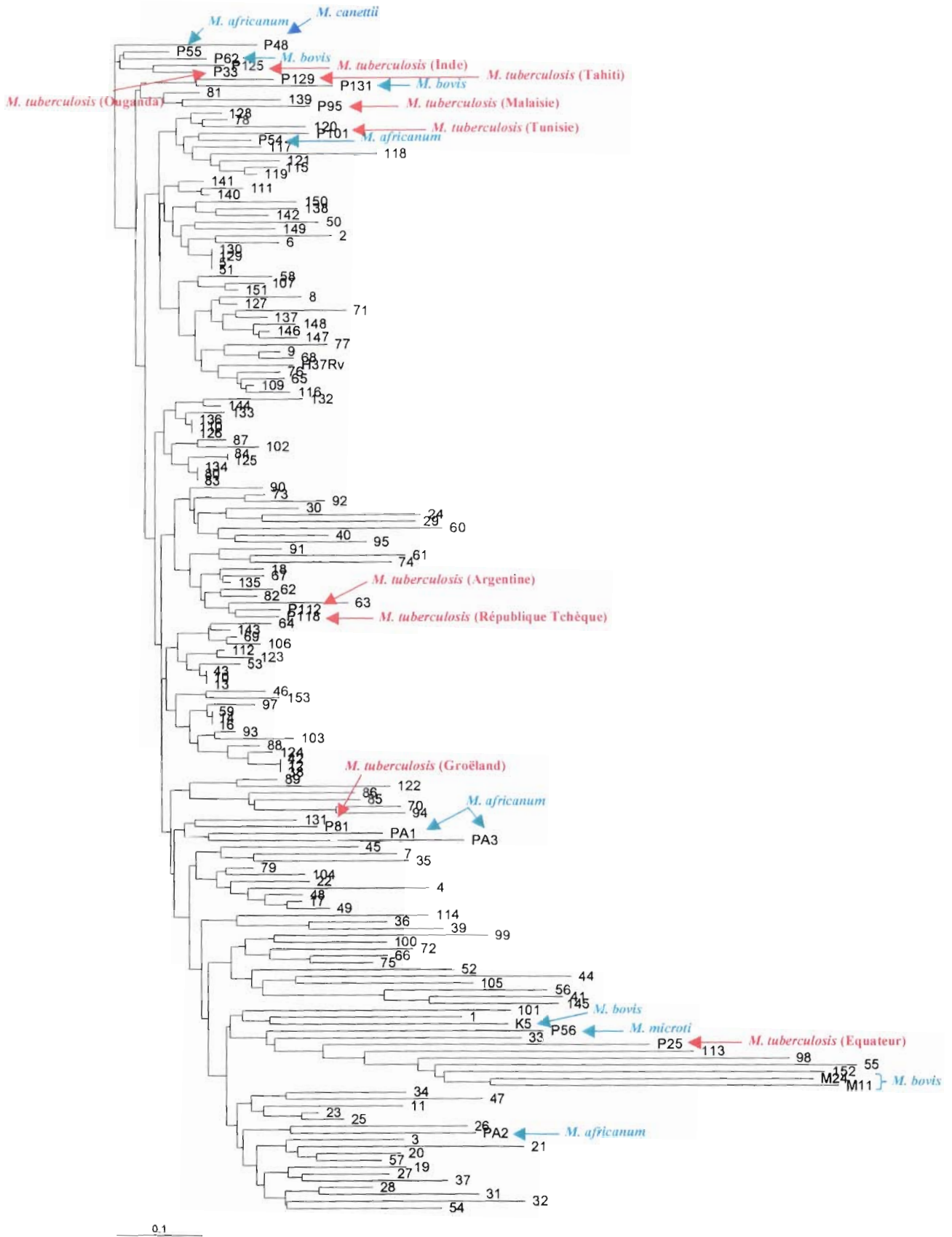


Figure 16 : Arbre de Neighbor-Joining construit à partir de la matrice des distances de Jaccard, calculée sur la base des données RAPDs de la totalité de l'échantillon d'étude. Les stocks de référence sont indiqués sur l'arbre.

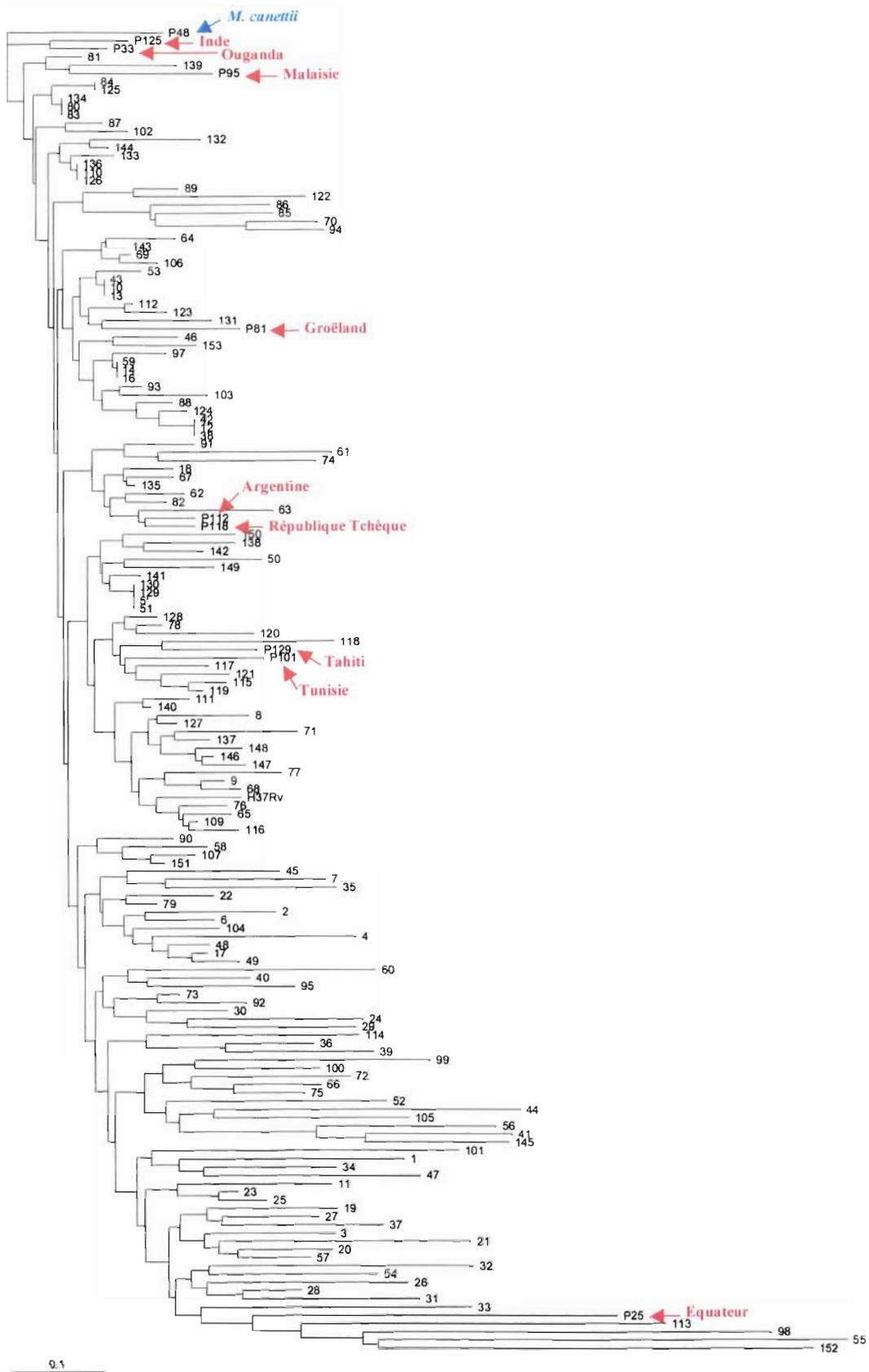


Figure 17 : Arbre de Neighbor-Joining construit à partir de la matrice des distances de Jaccard, calculée sur la base des données RAPDs de la totalité des *M. tuberculosis* de notre échantillon, marocains et références. Les pays d'origine des stocks de référence sont indiqués sur l'arbre.

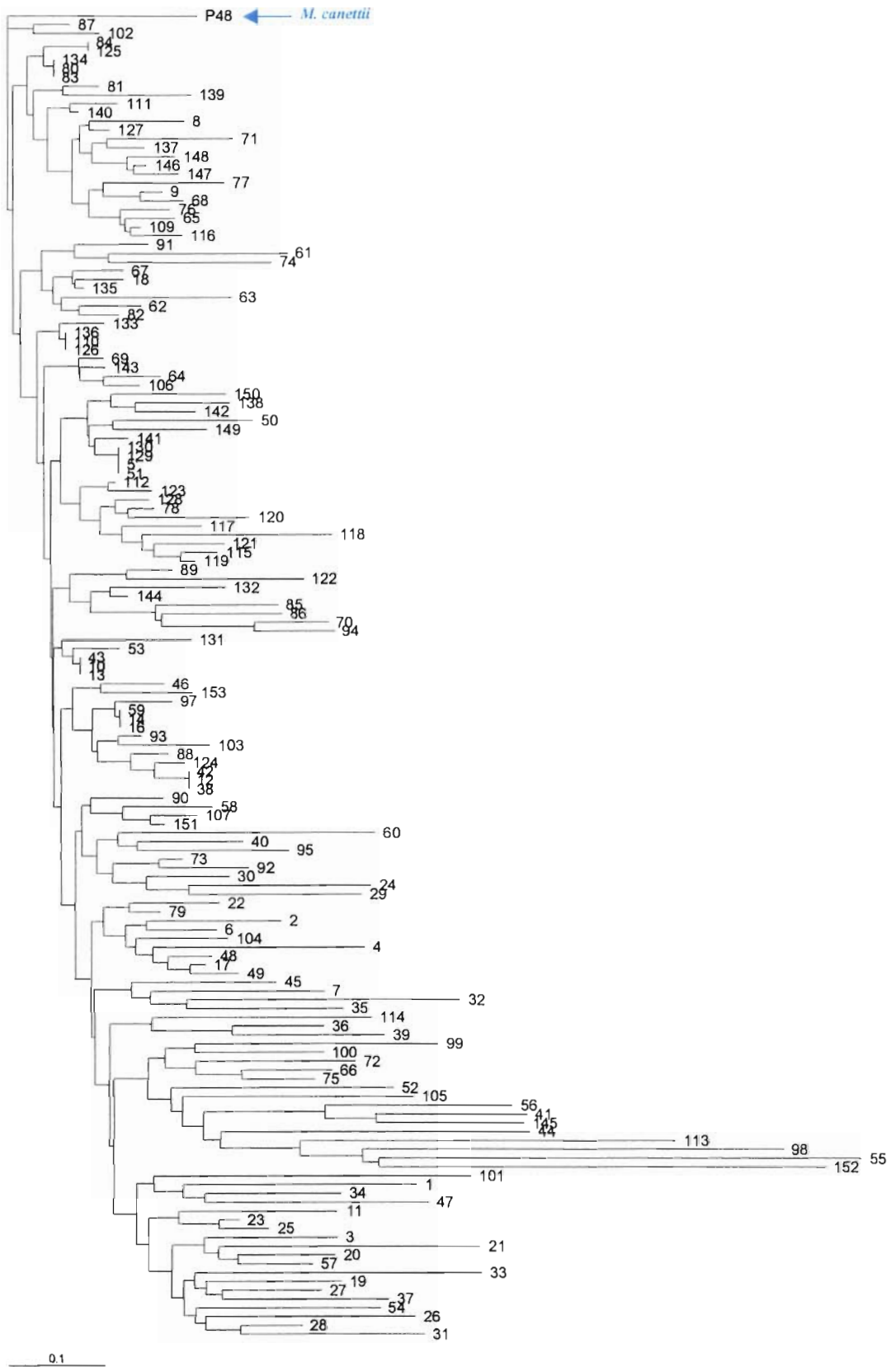


Figure 18 : Arbre de Neighbor-Joining construit à partir de la matrice des distances de Jaccard, calculée sur la base des données RAPDs de l'échantillon marocain total de *M. tuberculosis*.

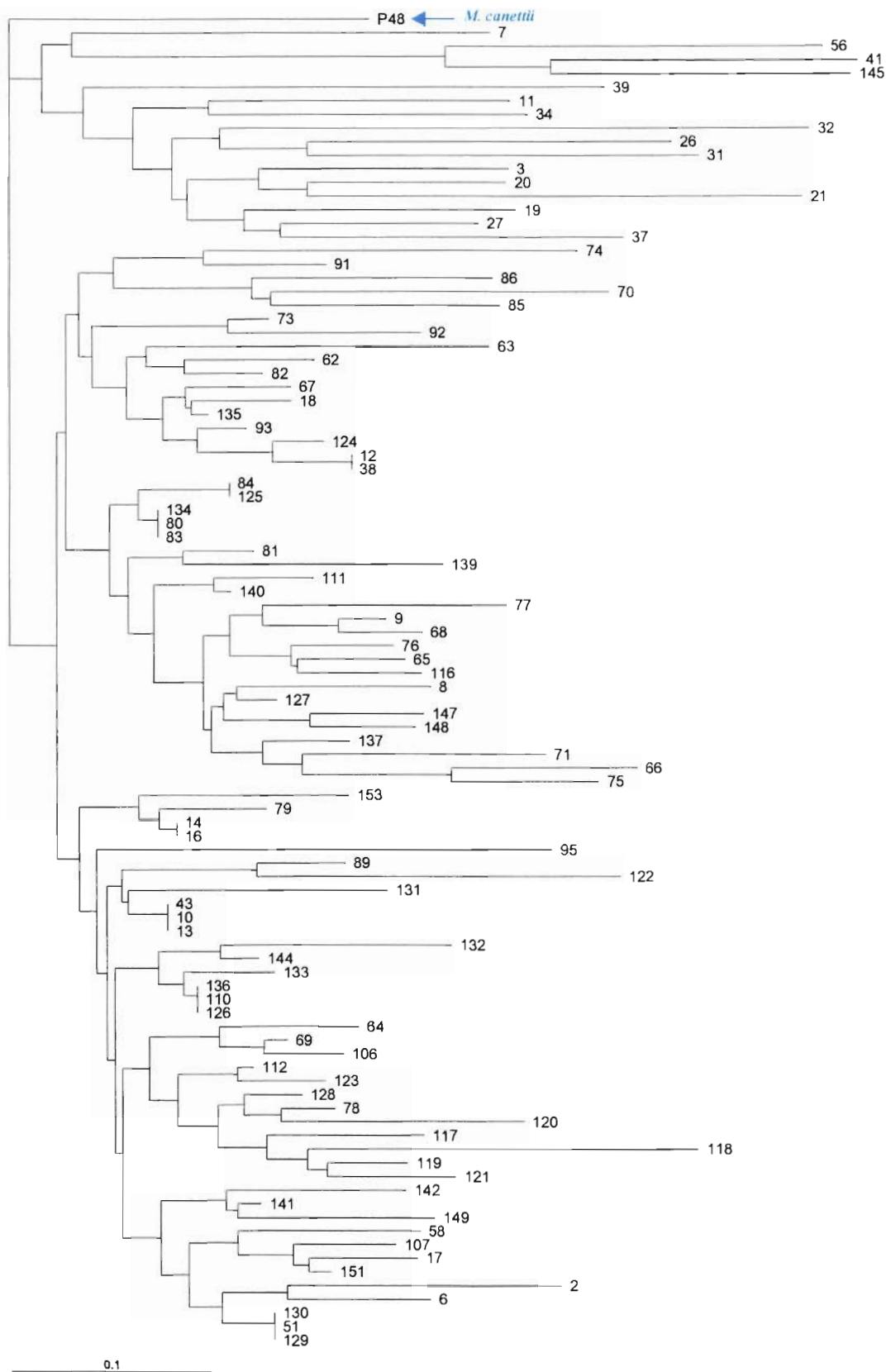


Figure 19 : Arbre de Neighbor-Joining construit à partir de la matrice des distances de Jaccard, calculée sur la base des données RAPDs des isolats de *M. tuberculosis* provenant de la préfecture HMAS.

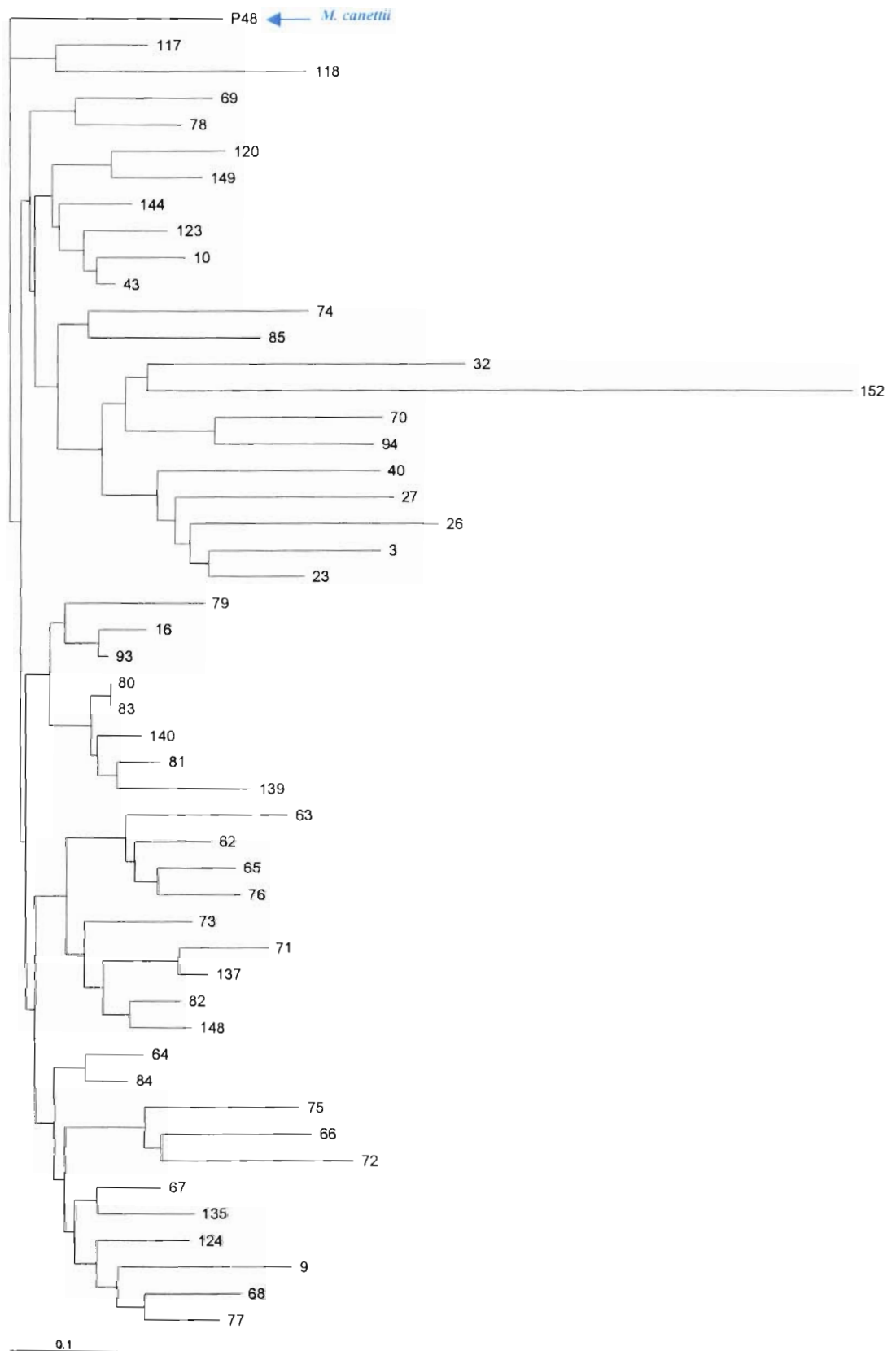


Figure 20 : Arbre de Neighbor-Joining construit à partir de la matrice des distances de Jaccard, calculée sur la base des données RAPDs des isolats marocains de *M. tuberculosis* prélevés au cours de l'année 1997.

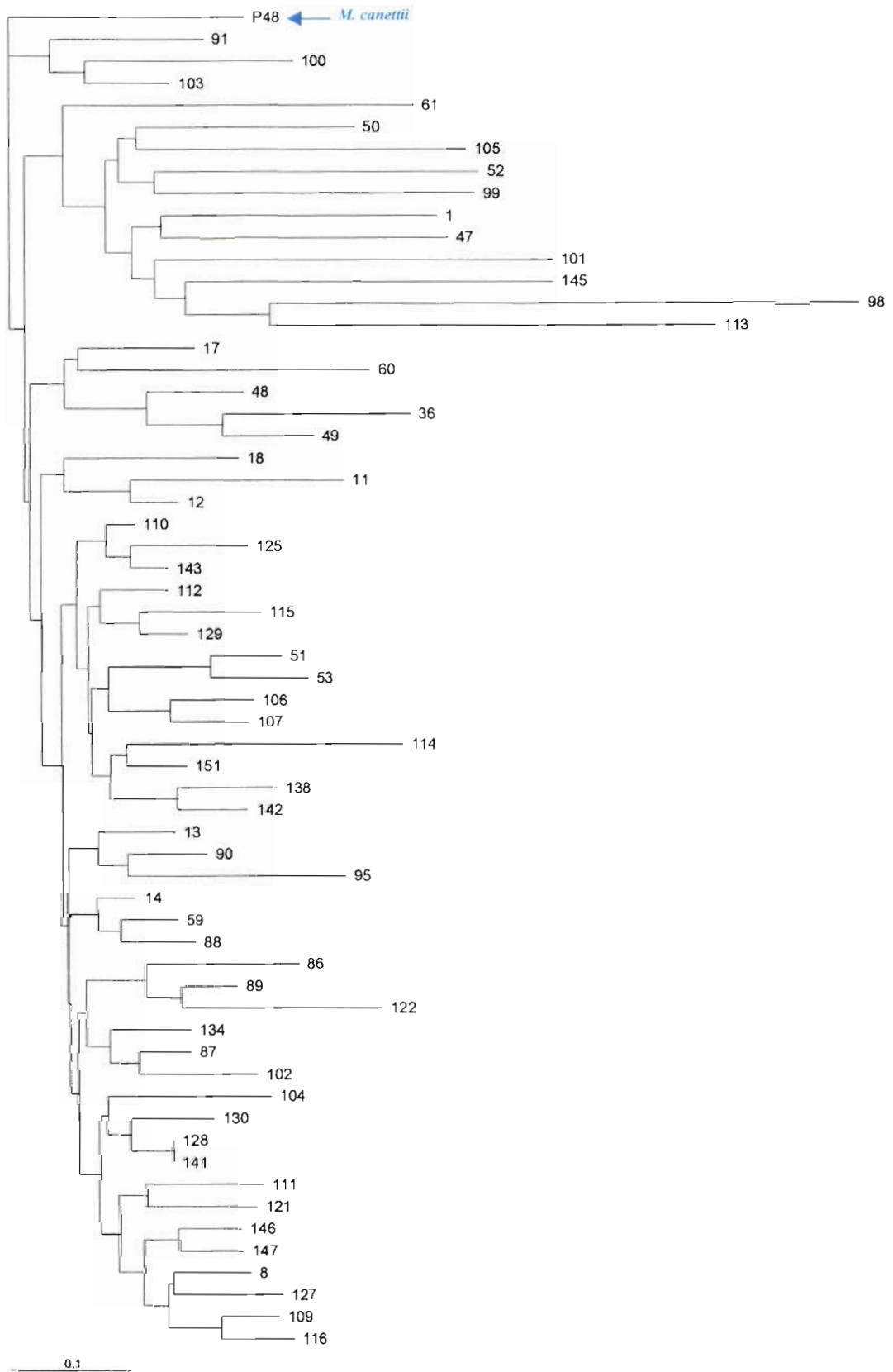


Figure 21 : Arbre de Neighbor-Joining construit à partir de la matrice des distances de Jaccard, calculée sur la base des données RAPDs des isolats marocains de *M. tuberculosis* prélevés au cours de l'année 1998.

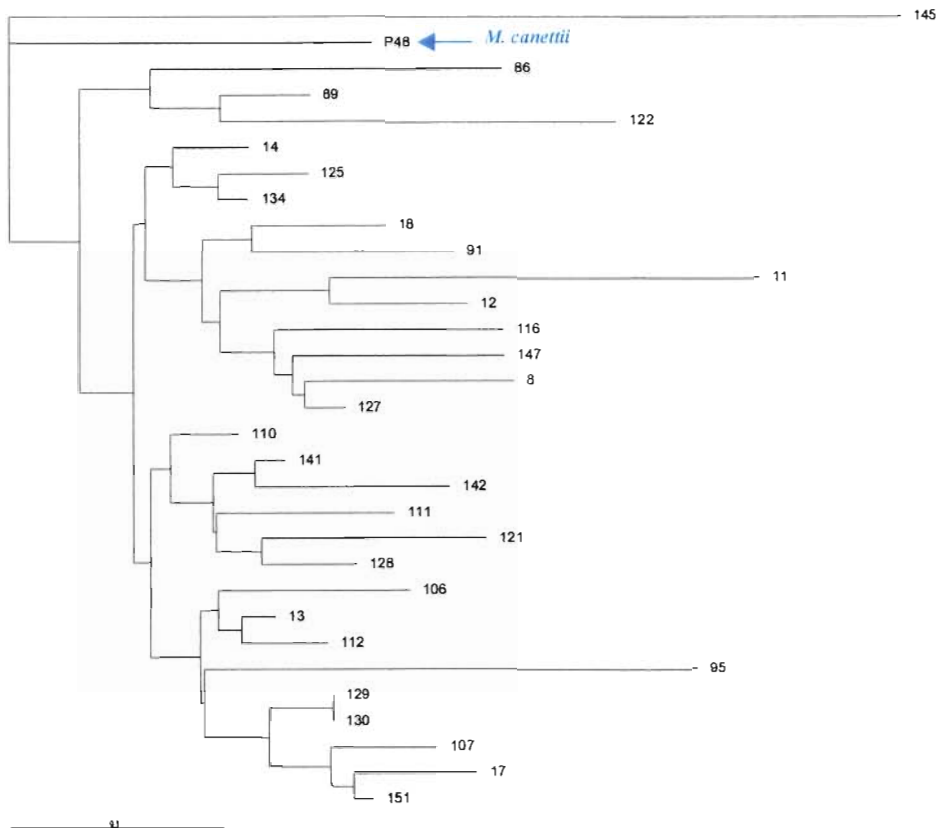


Figure 22 : Arbre de Neighbor-Joining construit à partir de la matrice des distances de Jaccard, calculée sur la base des données RAPDs des isolats de *M. tuberculosis* provenant de la préfecture HMAS et prélevés au cours de l'année 1998.

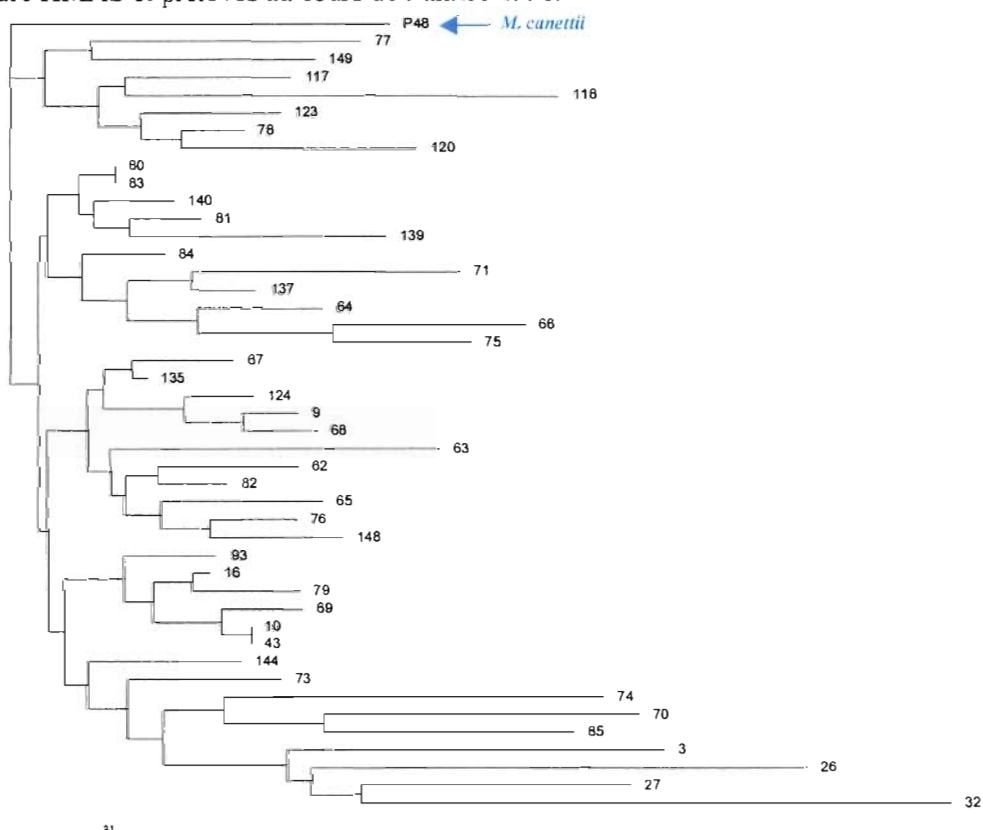


Figure 23 : Arbre de Neighbor-Joining construit à partir de la matrice des distances de Jaccard, calculée sur la base des données RAPDs des isolats de *M. tuberculosis* provenant de la préfecture HMAS et prélevés au cours de l'année 1997.

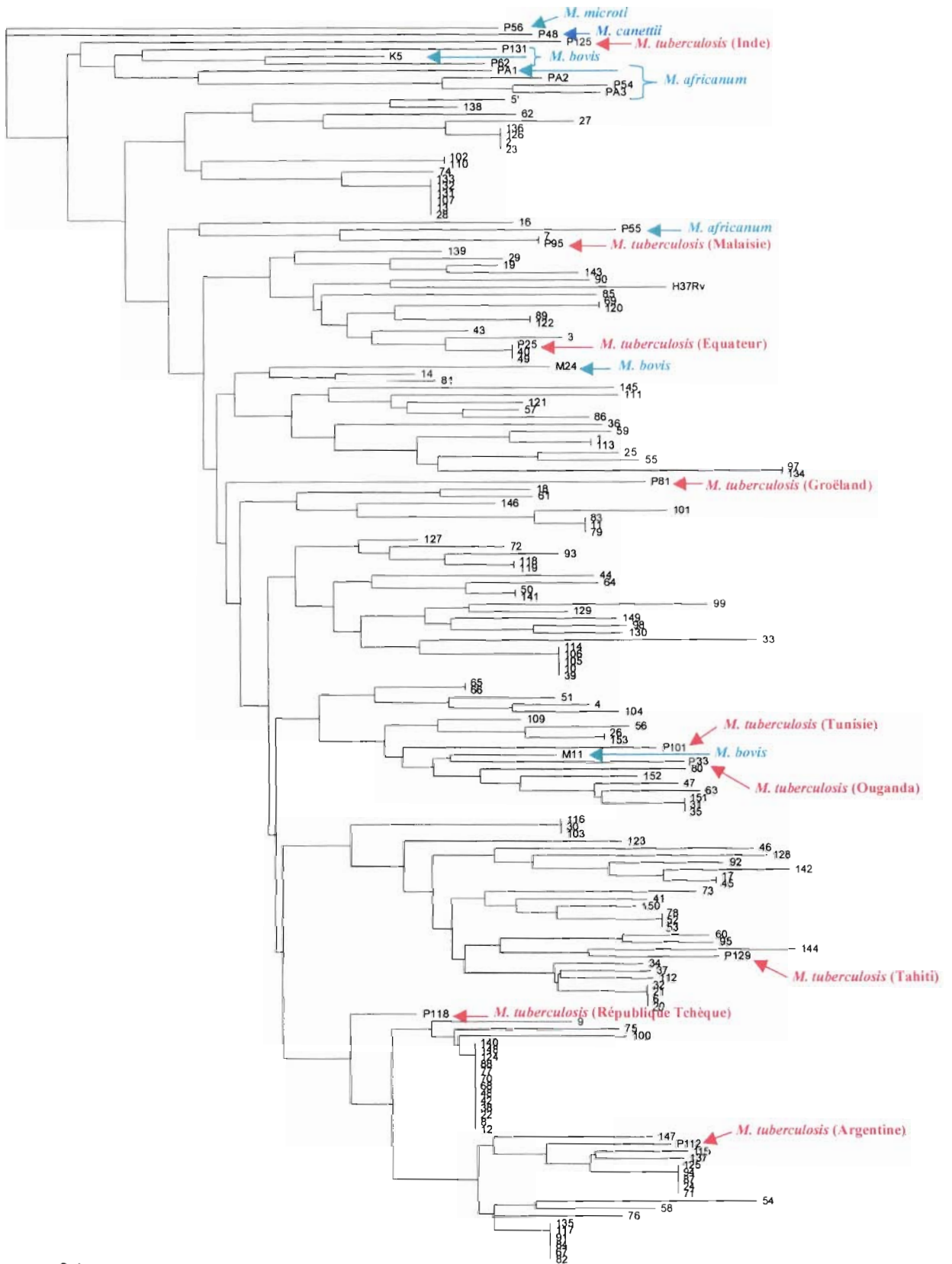


Figure 24 : Arbre de Neighbor-Joining construit à partir de la matrice des distances de Jaccard, calculée sur la base des données MIRU-VNTRs de la totalité de l'échantillon d'étude. Les stocks de référence sont indiqués sur l'arbre.

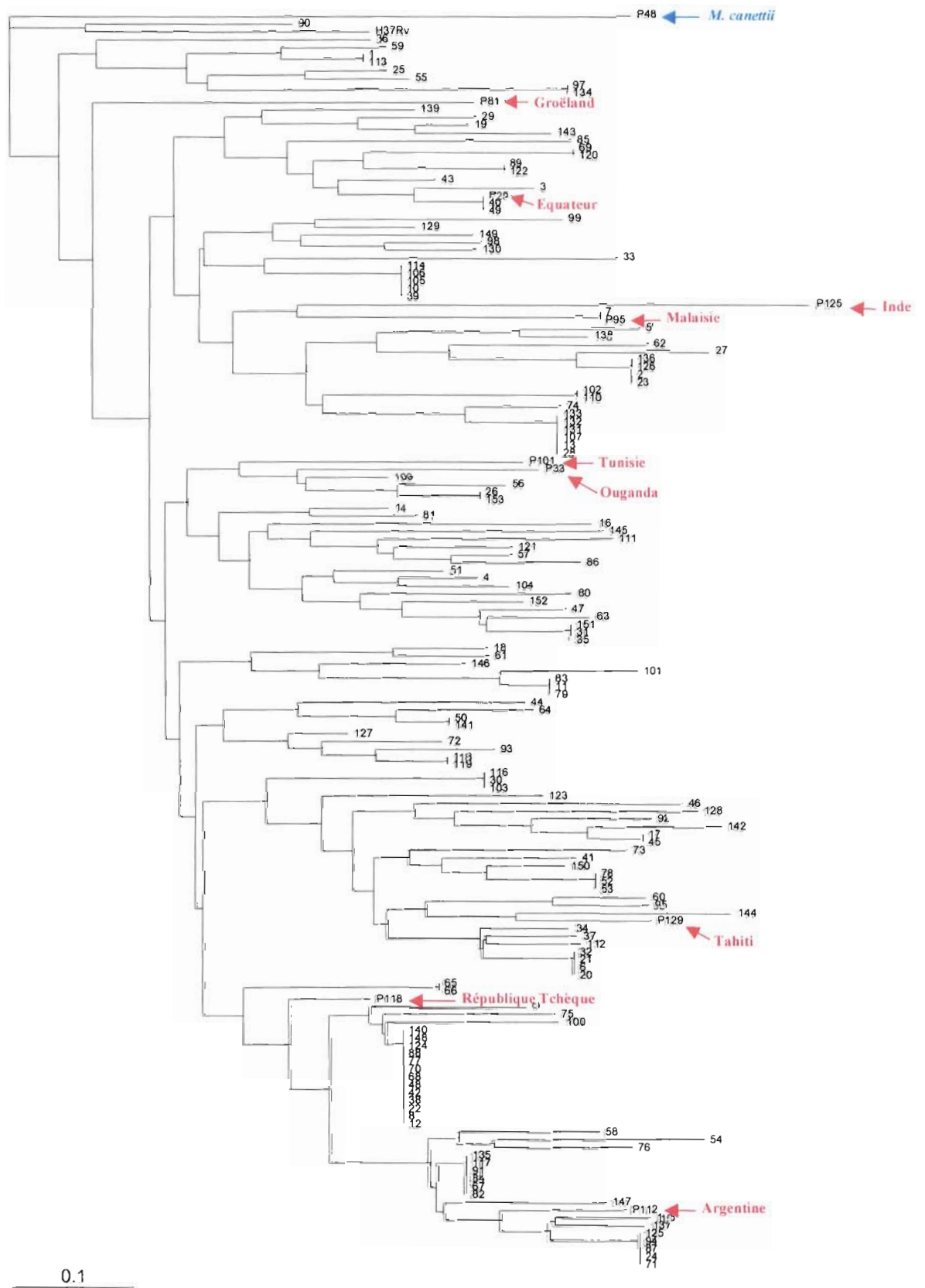


Figure 25 : Arbre de Neighbor-Joining construit à partir de la matrice des distances de Jaccard, calculée sur la base des données MIRU-VNTRs de la totalité des *M. tuberculosis* de notre échantillon, marocains et références. Les pays d'origine des stocks de référence sont indiqués sur l'arbre.



Figure 26 : Arbre de Neighbor-Joining construit à partir de la matrice des distances de Jaccard, calculée sur la base des données MIRU-VNTRs de l'échantillon marocain total de *M. tuberculosis*.

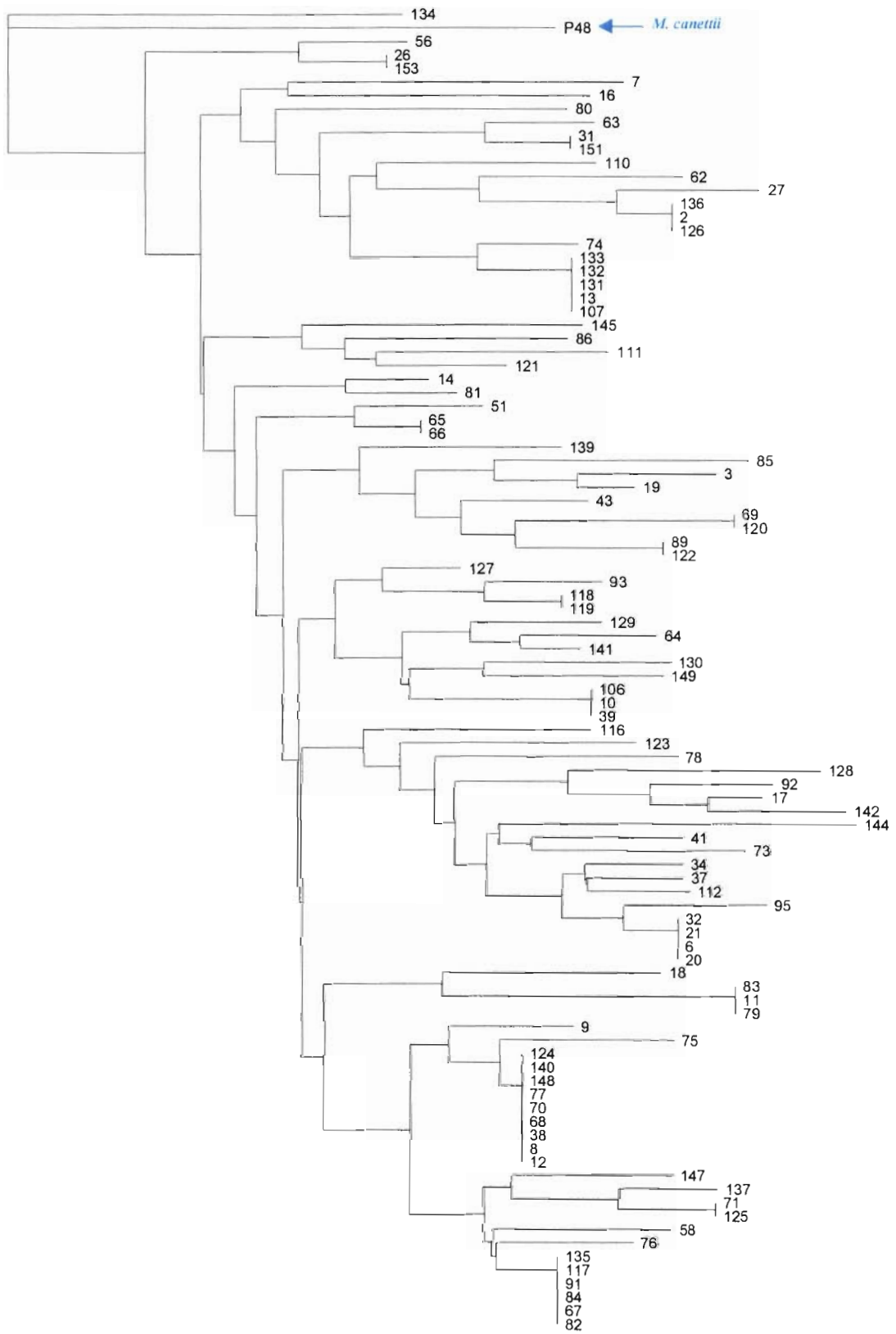


Figure 27 : Arbre de Neighbor-Joining construit à partir de la matrice des distances de Jaccard, calculée sur la base des données MIRU-VNTRs des isolats de *M. tuberculosis* provenant de la préfecture HMAS.

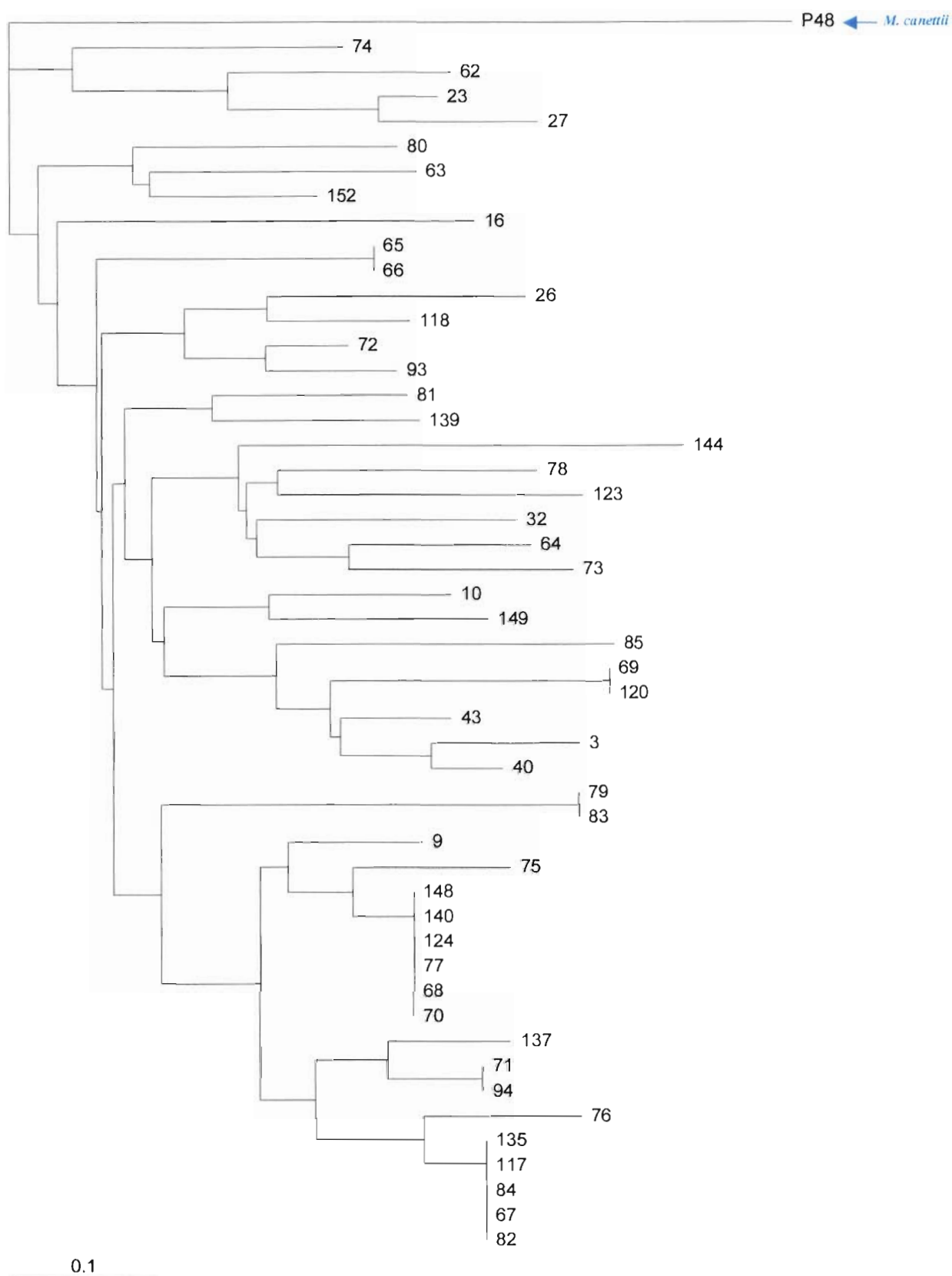


Figure 28 : Arbre de Neighbor-Joining construit à partir de la matrice des distances de Jaccard, calculée sur la base des données MIRU-VNTRs des isolats marocains de *M. tuberculosis* prélevés au cours de l'année 1997.

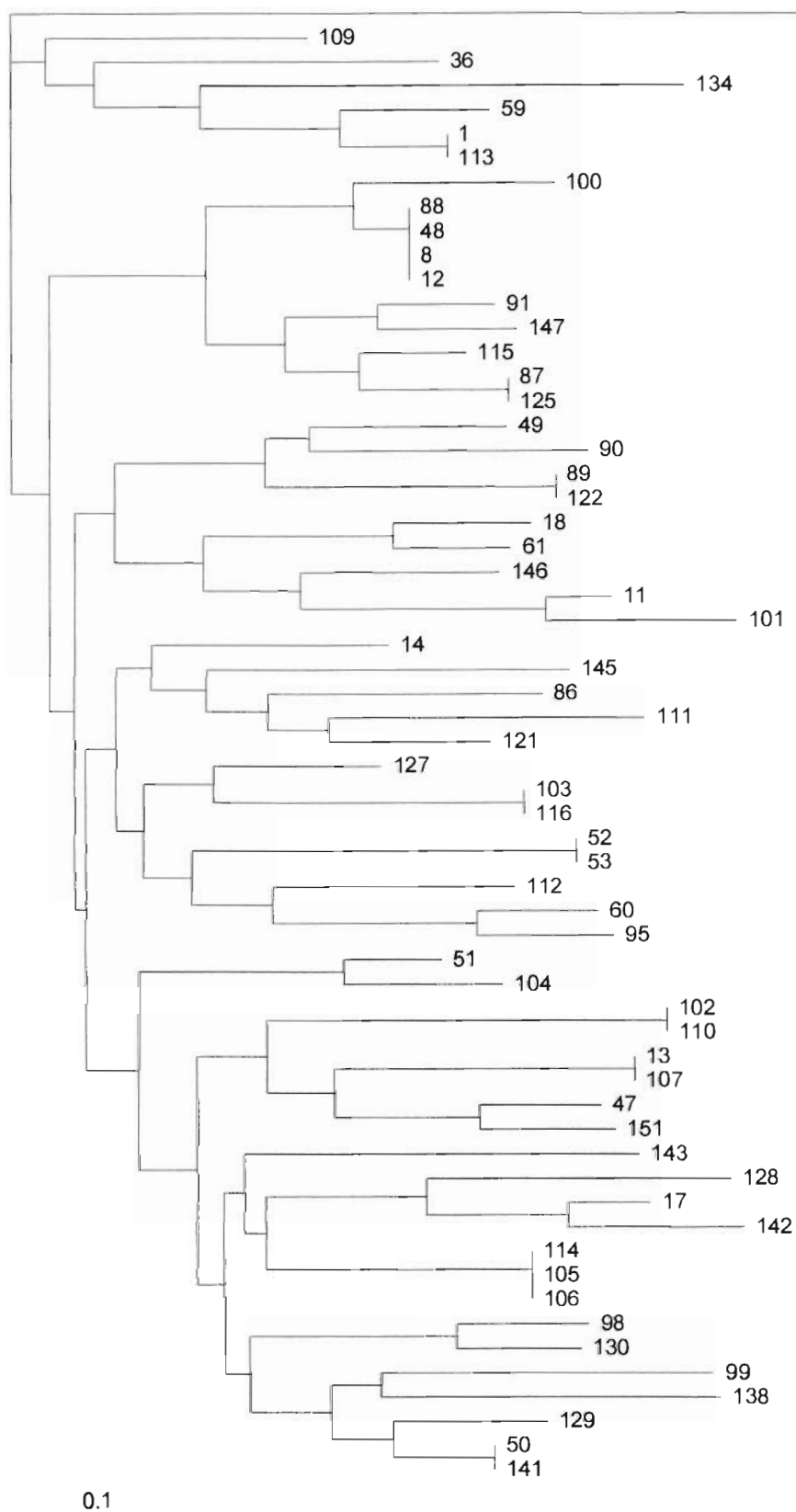


Figure 29 : Arbre de Neighbor-Joining construit à partir de la matrice des distances de Jaccard, calculée sur la base des données MIRU-VNTRs des isolats marocains de *M. tuberculosis* prélevés au cours de l'année 1998.

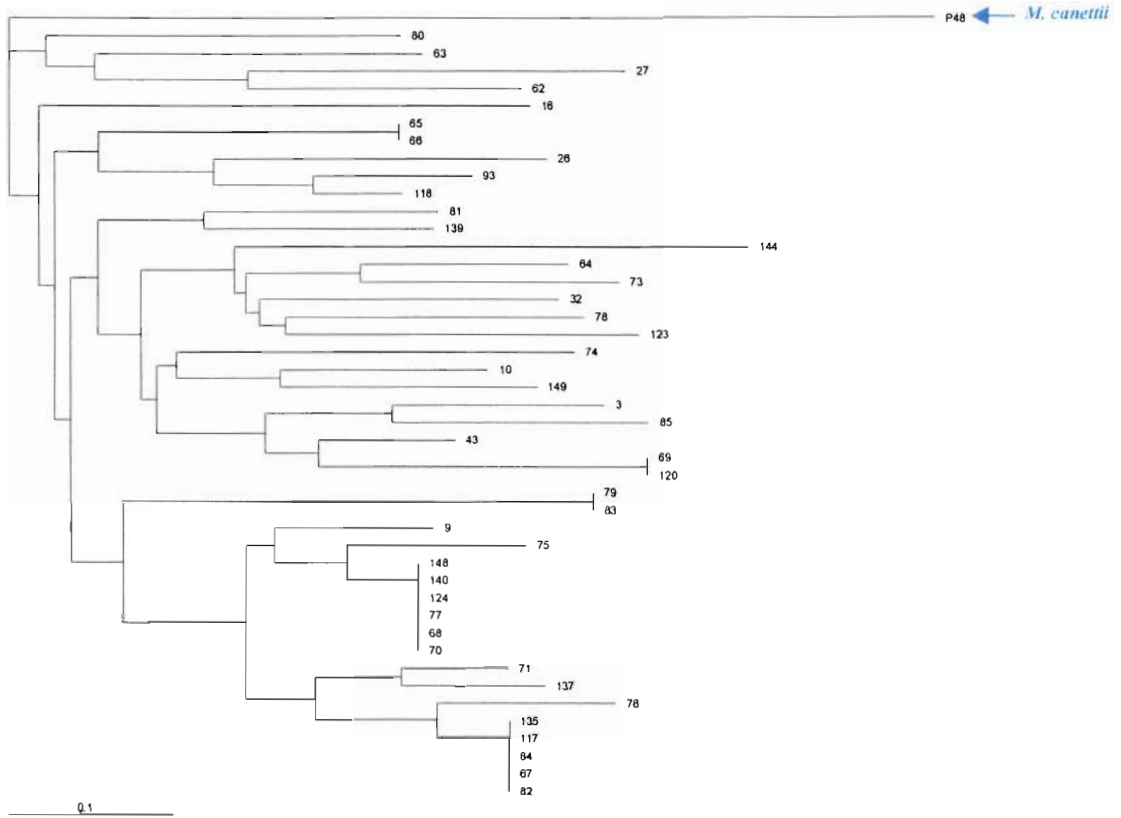


Figure 30 : Arbre de Neighbor-Joining construit à partir de la matrice des distances de Jaccard, calculée sur la base des données MIRU-VNTRs des isolats de *M. tuberculosis* provenant de la préfecture HMAS et prélevés au cours de l'année 1997.

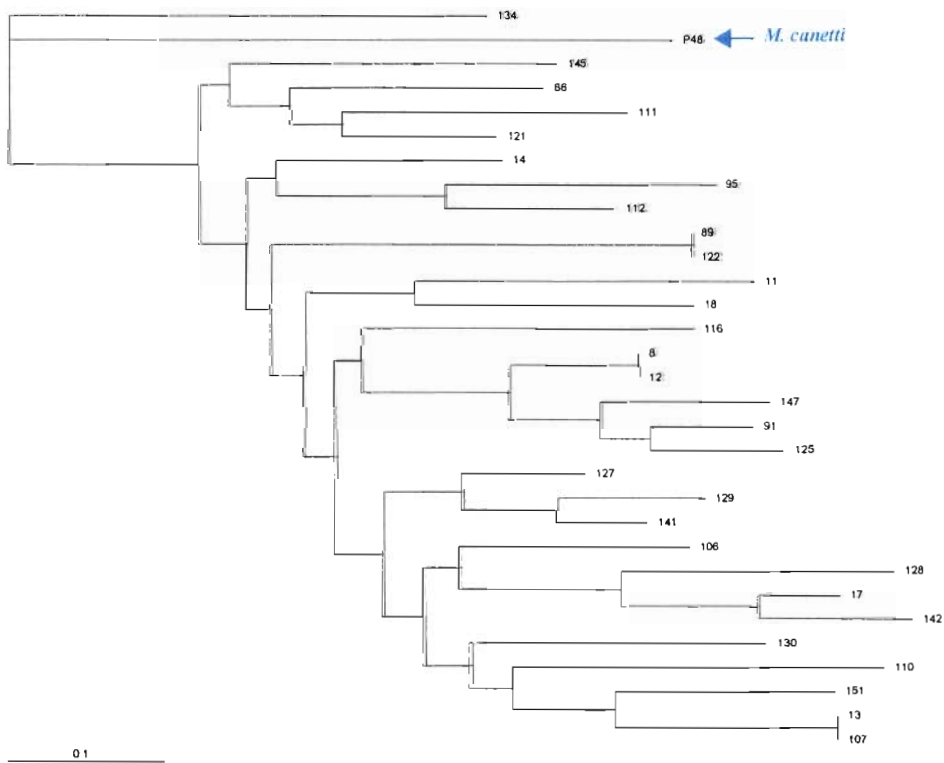


Figure 31 : Arbre de Neighbor-Joining construit à partir de la matrice des distances de Jaccard, calculée sur la base des données MIRU-VNTRs des isolats de *M. tuberculosis* provenant de la préfecture HMAS et prélevés au cours de l'année 1998.

III.4.2 Arbres de Wagner et bootstrap

Afin d'estimer la robustesse des arbres obtenus et donc de chaque nœud, nous avons construit des arbres de Wagner sur lesquels nous avons appliqué un test de ré-échantillonnage ou test de bootstrap (100 répétitions).

Les figures 32 à 35 présentent respectivement les arbres de Wagner construits à partir des données MIRU-VNTRs de l'ensemble de l'échantillon, l'échantillon total de *M. tuberculosis*, la population totale marocaine avec les 3 stocks de *M. bovis*, et les isolats provenant de la préfecture HMAS. Les valeurs de bootstrap sont indiquées pour chacune des branches des arbres analysés.

La figure 36 montre l'arbre de Wagner obtenu avec la population totale du Maroc y compris les 3 stocks de *M. bovis*. Cet arbre est construit sur la base des données RAPDs. Les valeurs de bootstrap sont indiquées pour chacune des branches des arbres analysés.

L'analyse de tous les arbres de Wagner montre de faibles valeurs de bootstrap quel que soit le marqueur génétique utilisé et quel que soit le groupe étudié (voir figures 32 à 36, p111 à 115).

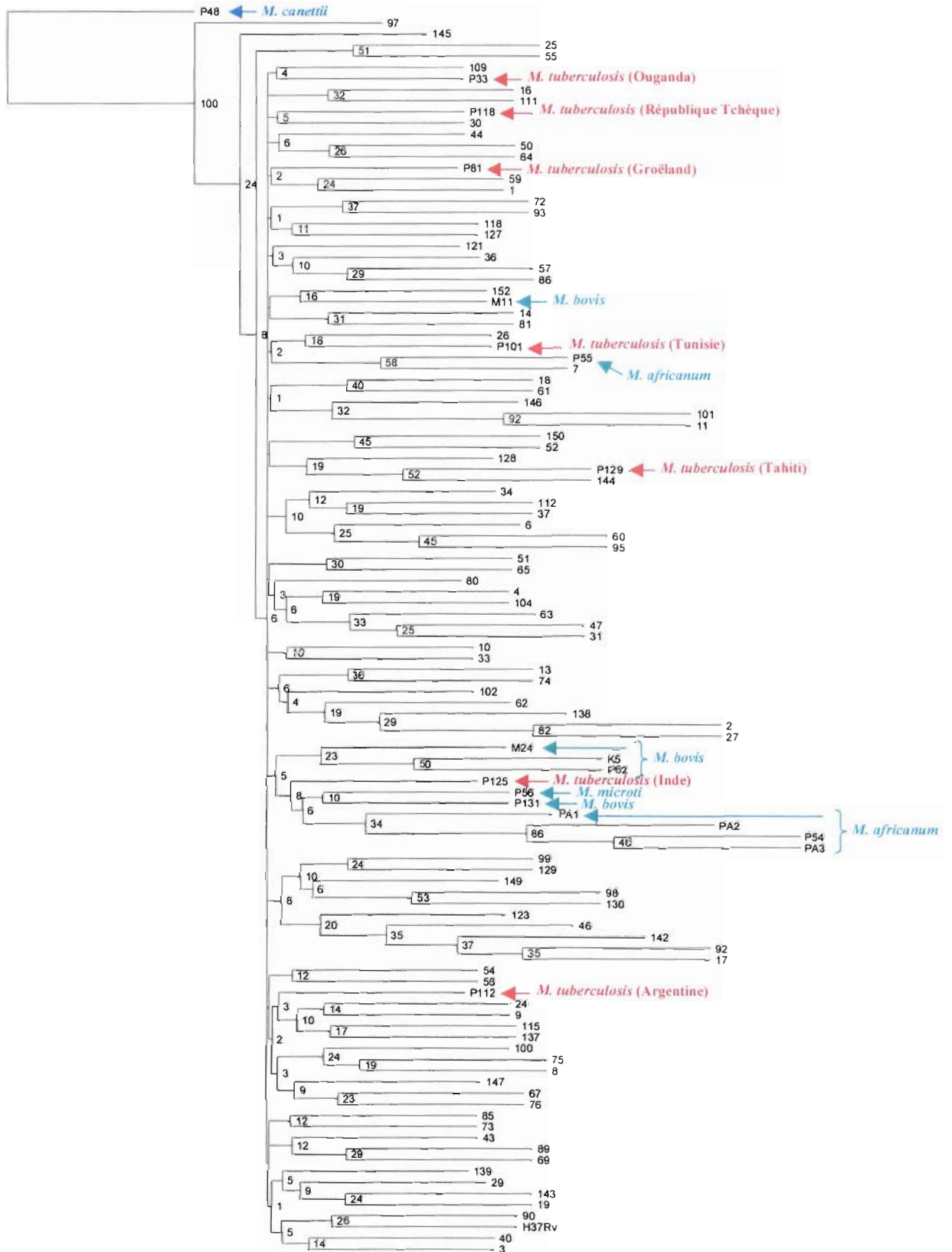
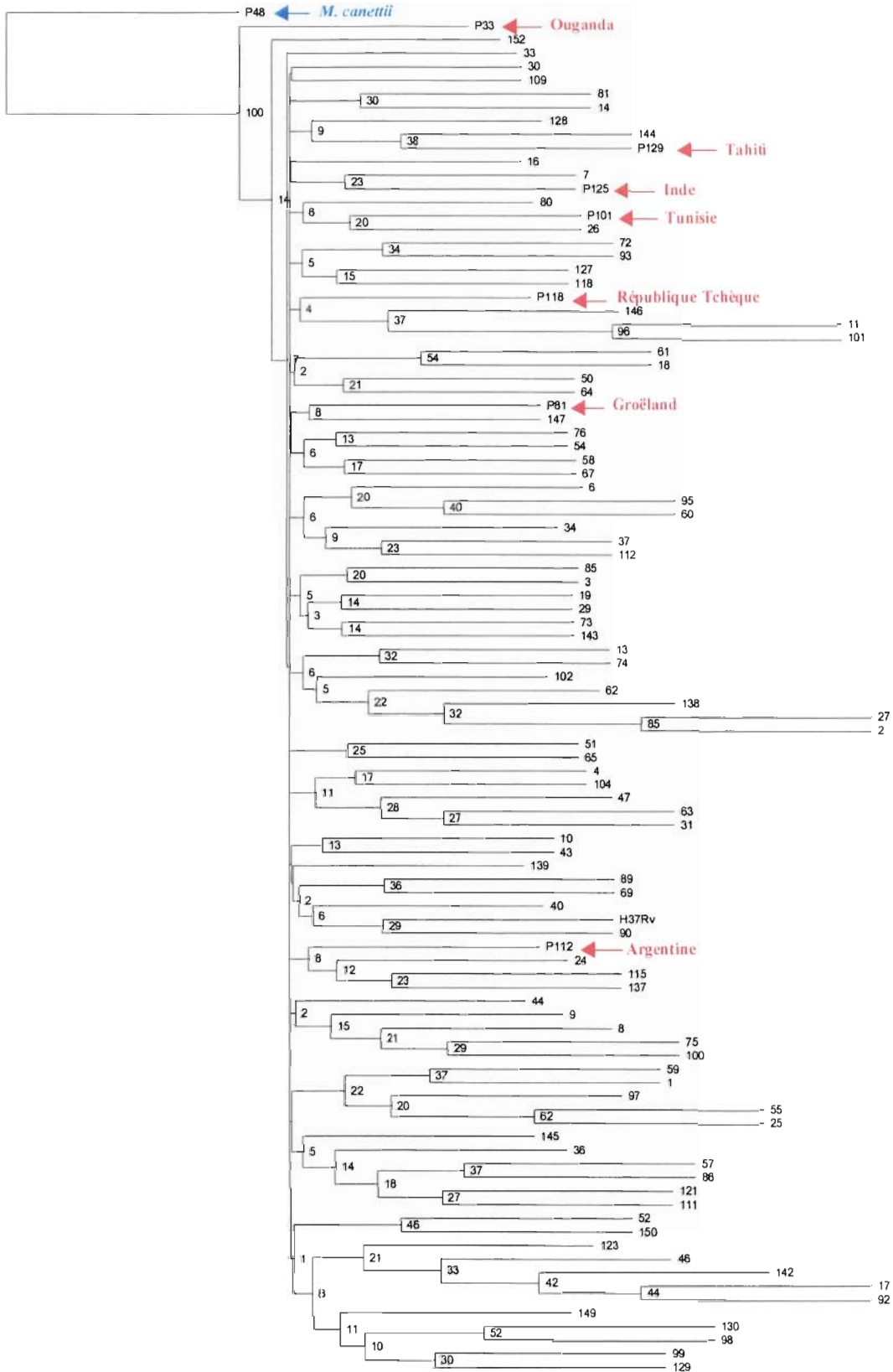
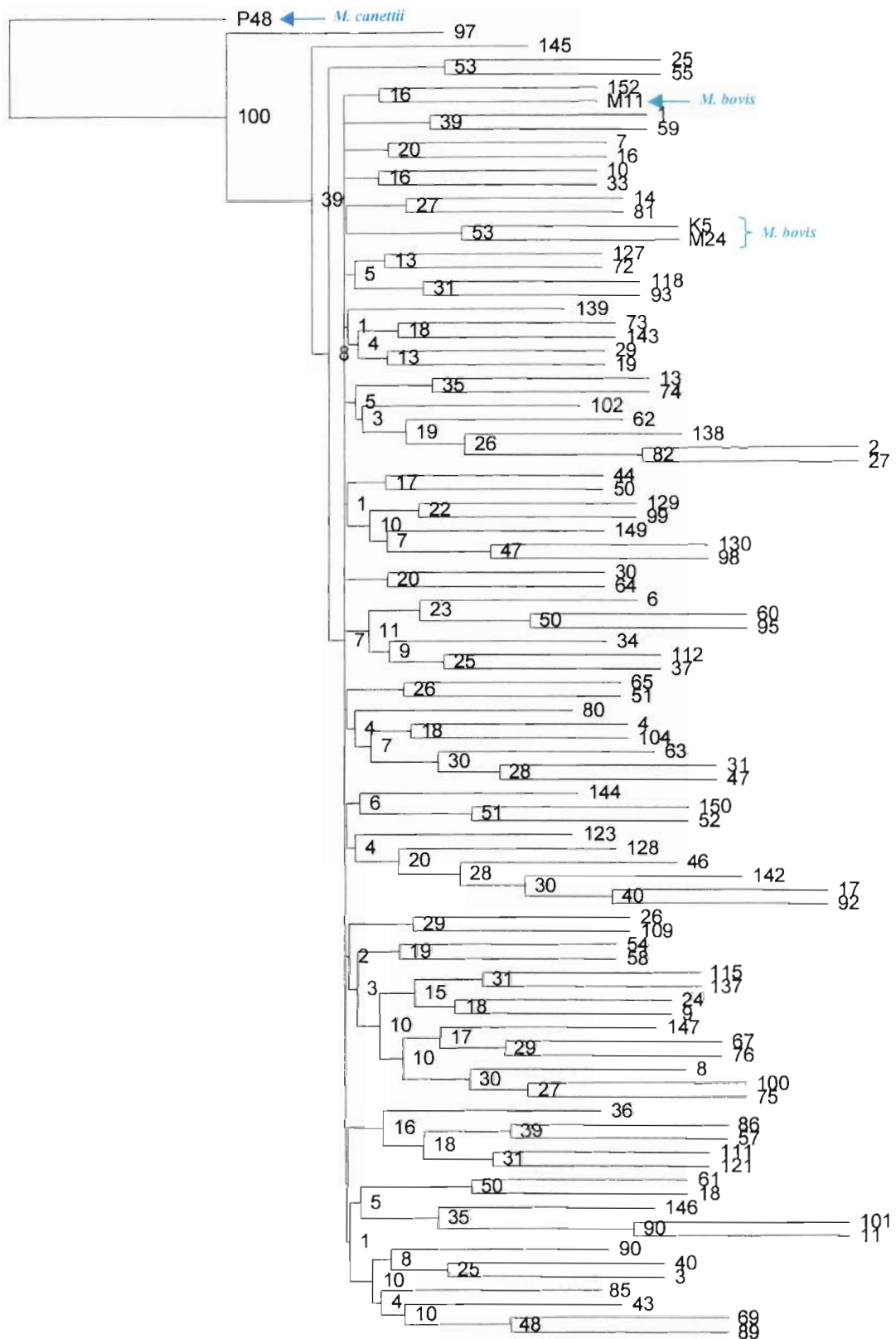


Figure 32 : Arbre de Wagner construit après un test de bootstrap (100 réplicats) sur la base des données MIRU-VNTRs de la totalité de l'échantillon d'étude. Les valeurs de bootstrap sont indiquées à chaque branche de l'arbre. Les stocks de référence sont également indiqués sur l'arbre.



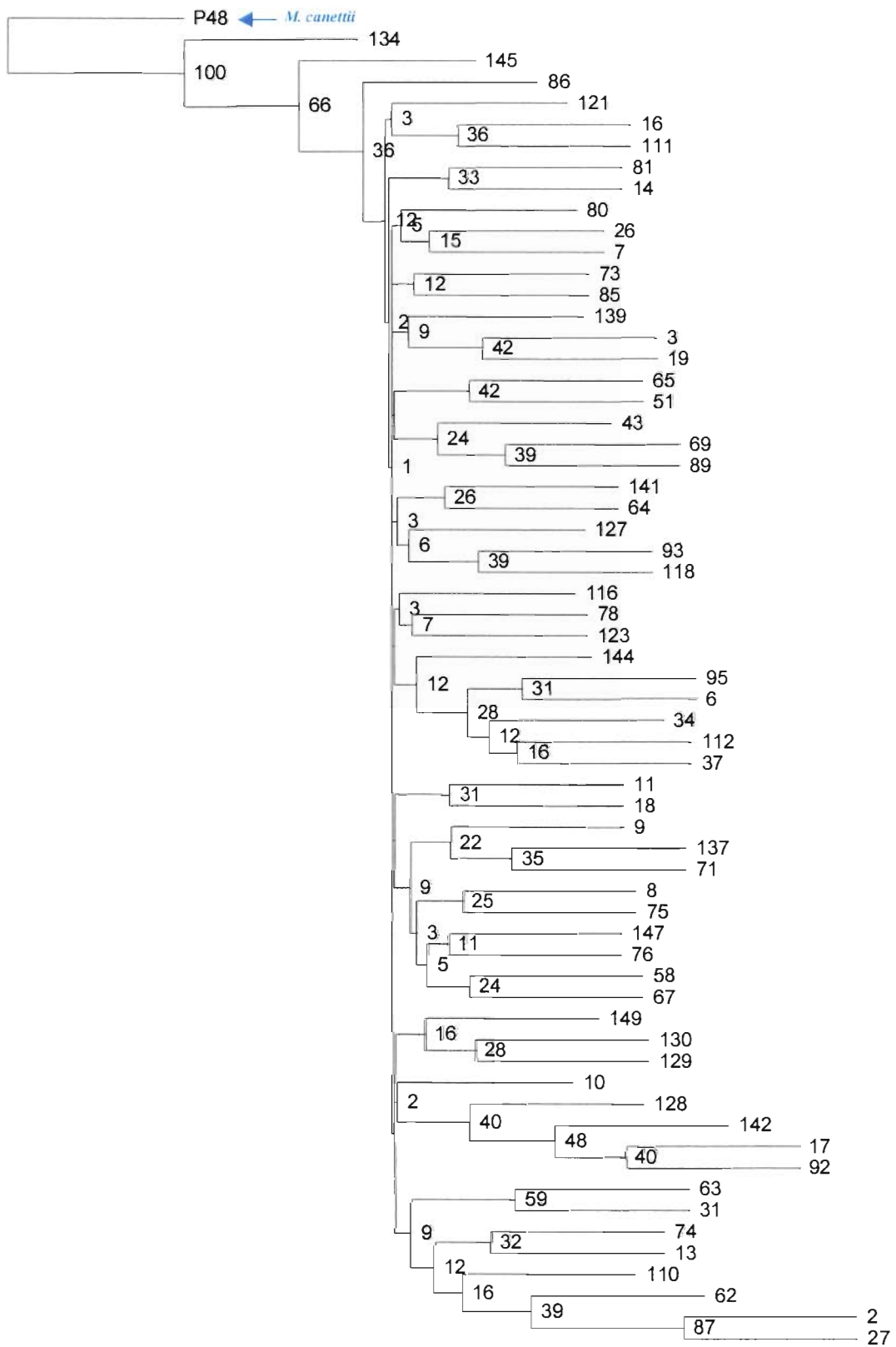
10

Figure 33: Arbre de Wagner construit après un test de bootstrap (100 répliqués) sur la base des données MIRU-VNTRs de la totalité de l'échantillon de *M. tuberculosis*, marocain et références. Les pays d'origine des stocks de référence sont indiqués sur l'arbre. Les valeurs de bootstrap sont également indiquées à chaque branche de l'arbre.



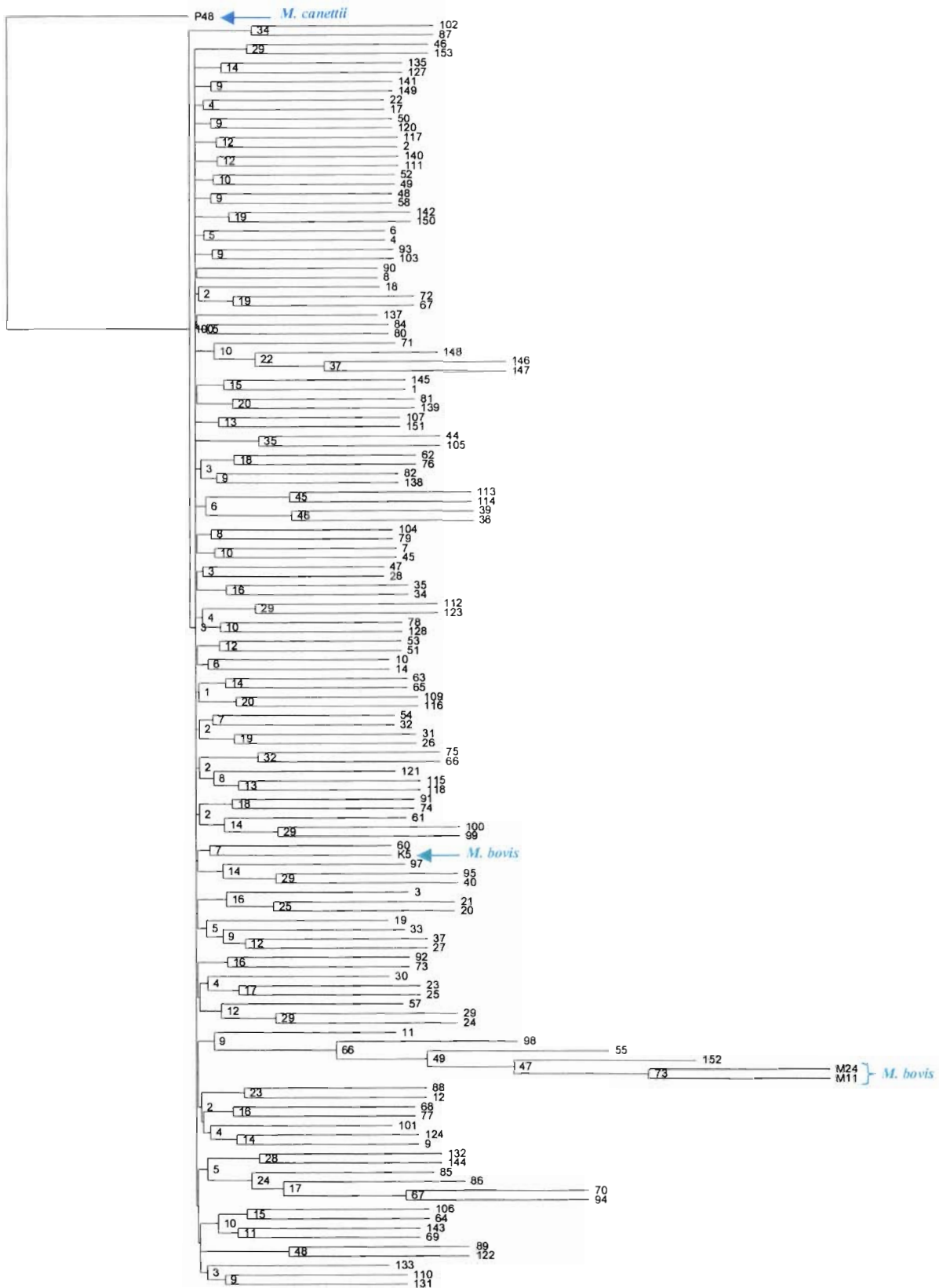
10

Figure 34 : Arbre de Wagner construit après un test de bootstrap (100 réplicats) sur la base des données MIRU-VNTRs de l'échantillon total du Maroc. Les valeurs de bootstrap sont indiquées à chaque branche de l'arbre.



10

Figure 35 : Arbre de Wagner construit après un test de bootstrap (100 répliques) sur la base des données MIRU-VNTRs des isolats de *M. tuberculosis* provenant de la préfecture HMAS. Les valeurs de bootstrap sont indiquées à chaque branche de l'arbre.



10

Figure 36 : Arbre de Wagner construit après un test de bootstrap (100 réplicats) sur la base des données RAPDs de la totalité de l'échantillon marocain. Les valeurs de bootstrap sont indiquées à chaque branche de l'arbre.

III.4.3 Comparaison avec d'autres stocks de *M. tuberculosis*

Le typage moléculaire des isolats de *M. tuberculosis* a permis de définir des familles de souches réparties dans certaines régions. Il s'agit des familles Africa, Haarlem, W-Beijing, Latin American-Mediterranean, et les isolats à faibles copies d'IS6110 (East-African-Indian) (Kremer *et al.*, 1999 ; Glynn *et al.*, 2002 ; Sola *et al.*, 2001-b). Afin de vérifier si les isolats marocains appartiennent à une de ces familles, nous avons réalisé une analyse phylogénétique (Neighbor-Joining) basée sur les données MIRU-VNTRs, en incluant avec la population marocaine d'autres stocks de *M. tuberculosis* (Kremer *et al.*, 1999). Les résultats MIRU-VNTRs de cette collection sont donnés dans l'annexe 13.

L'arbre obtenu montre que les isolats marocains sont principalement mélangés avec les familles Haarlem et Latin American-Mediterranean (voir figure 37, p117). Cependant, l'analyse de Wagner a montré, comme pour les analyses précédentes, de faibles valeurs de bootstrap (voir figure 38, p118).

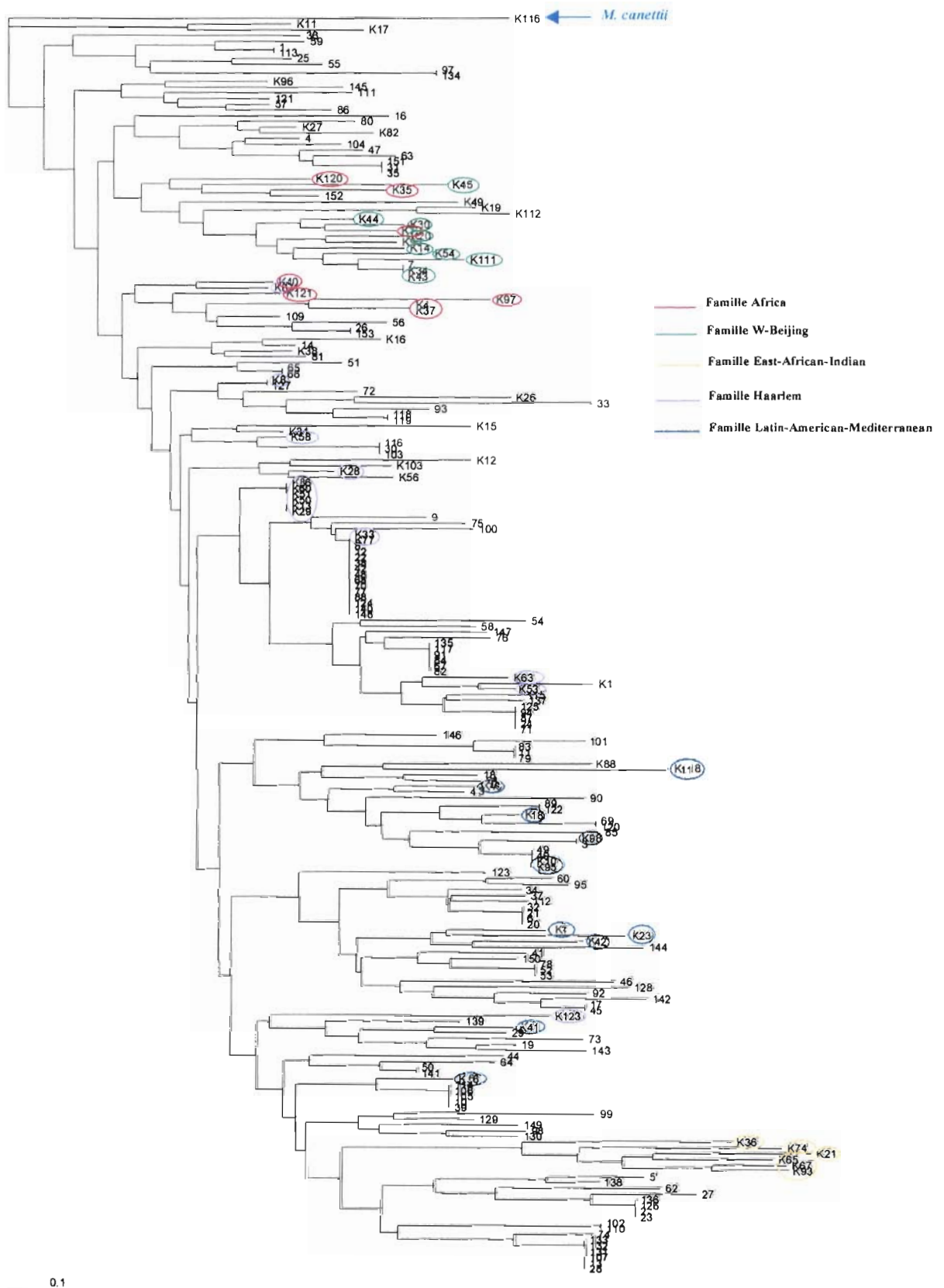
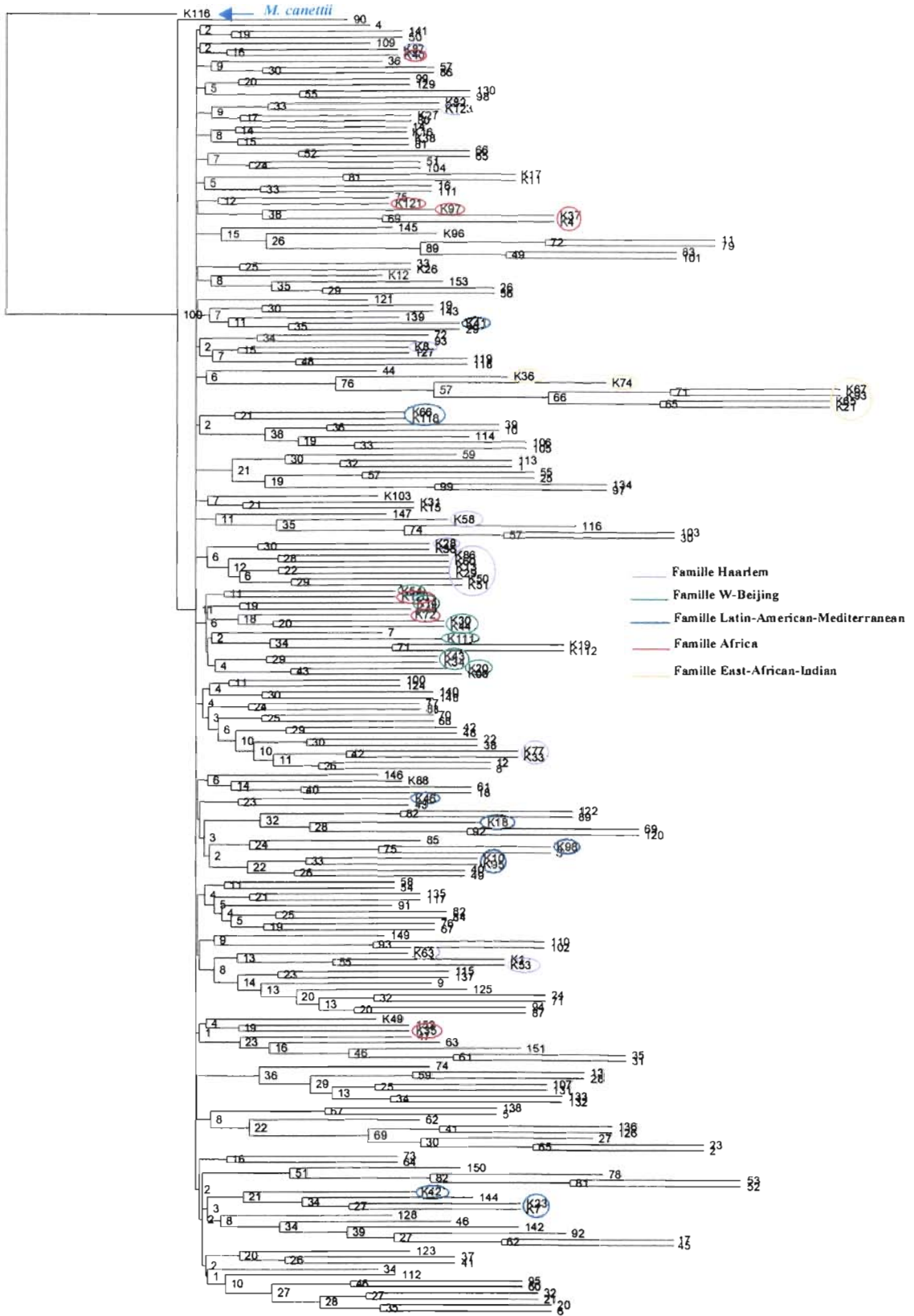


Figure 37 : Arbre de Neighbor-Joining construit à partir de la matrice des distances de Jaccard, calculée sur la base des données MIRU-VNTRs de la totalité de l'échantillon marocain de *M. tuberculosis*, additionnée de 69 stocks de *M. tuberculosis* provenant de l'Institut National de Santé Publique et de l'Environnement de Bilthoven en Hollande (Kremer *et al.*, 1999; Supply *et al.*, 2001). Les différentes familles sont indiquées sur l'arbre.



10

Figure 38 : Arbre de Wagner construit après un test de bootstrap (100 répliquats) sur la base des données MIRU-VNTRs de notre échantillon marocain de *M. tuberculosis* additionné de 69 stocks de *M. tuberculosis* provenant de l’Institut National de Santé Publique et de l’Environnement de Bilthoven en Hollande (Kremer *et al.*, 1999; Supply *et al.*, 2001). Les différentes familles sont indiquées sur l’arbre. Les valeurs de bootstrap sont également indiquées à chaque branche de l’arbre.

DISCUSSION

-Chapitre IV-

IV Discussion

Bien que les pays en voie de développement soient de loin les pays les plus touchés par la tuberculose, les connaissances de la structure des populations et de la diversité génétique de *M. tuberculosis* dans ces régions du monde restent encore presque inexistantes.

Dans ce travail, nous analysons la diversité génétique et la structure des populations de *M. tuberculosis* dans une ville d'Afrique du Nord présentant une haute incidence de la tuberculose, Casablanca. Cette ville, capitale économique du Maroc, compte plus de 4 millions d'habitants. Il s'agit également de la ville la plus touchée par la tuberculose, avec près du cinquième des cas totaux enregistrés au Maroc. Ce travail représente la première étude génétique sur la structure des populations et la transmission de l'espèce *M. tuberculosis* dans ce pays.

Au Maroc, la tuberculose est encore à l'heure actuelle un problème majeur de santé publique. Dans ce pays, la situation est d'autant plus préoccupante que malgré l'adoption de la stratégie DOTS (Directly Observed Treatment Short course) depuis 1991 et la vaccination obligatoire du BCG, comme nous l'avons décrit dans les rappels bibliographiques, l'incidence de la tuberculose n'a pas diminué (Ottmani *et al.*, 1998).

Sur les 155 isolats marocains étudiés dans ce travail, 154 ont été sélectionnés de manière aléatoire dans les différentes préfectures de la ville de Casablanca, dont 101 ont été isolés de la préfecture HMAS. Dans cette préfecture, la prévalence de la tuberculose pulmonaire est d'environ 450 nouveaux cas par an. Il s'agit d'une des préfectures les plus touchées par la tuberculose. Bien que cet échantillon ne soit pas exhaustif, il représente une base prospective pour des analyses d'épidémiologie moléculaire et de génétique des populations.

Pour cette étude, nous avons utilisé deux marqueurs génétiques qui présentent des propriétés différentes, les RAPDs et les MIRU-VNTRs. Ces deux techniques nous ont permis :

- d'étudier la structure de la population marocaine de *M. tuberculosis* ;
- d'évaluer la diversité génétique des isolats marocains par rapport à d'autres populations de *M. tuberculosis*, mais également par rapport à d'autres organismes ;
- et d'explorer par une étude d'épidémiologie moléculaire la dynamique de transmission de la tuberculose à Casablanca.

IV.1 Les marqueurs génétiques

Dans ce travail, 2 techniques de typage moléculaire sont utilisées : RAPD et MIRU-VNTR. Cette partie détaille les potentialités de chacun de ces marqueurs génétiques, et les apports spécifiques et complémentaires de chacun pour le typage des micro-organismes. Nous présentons également une comparaison de ces deux marqueurs. Une discussion sur les divers marqueurs génétiques utilisés pour l'épidémiologie moléculaire de *M. tuberculosis* est réalisée dans l'article présenté dans la publication 1 (voir annexe 15).

IV.1.1 Les marqueurs RAPDs

IV.1.1.1 Reproductibilité des profils

Cette technique est très controversée du point de vue de sa reproductibilité. En effet, Williams *et al.* (1990) comme d'autres auteurs (Carlson *et al.*, 1991 ; Klein-Lankhorst *et al.*, 1991) ont montré la sensibilité de la technique RAPD à différents paramètres comme :

- la vitesse de changement de température utilisée au cours du cycle d'amplification ;
- le type et la concentration de la *Taq* DNA polymérase utilisée ;
- et la concentration en Mg^{2+} .

Seules des conditions réactionnelles bien standardisées garantissent, par conséquent, la reproductibilité des produits amplifiés. De plus, le choix des amorces

RAPDs est également indispensable pour une amplification reproductible (Towner and Grundmann, 2001).

Dans ce travail, toutes les conditions sont standardisées et les amorces très soigneusement choisies afin d'obtenir des résultats indiscutables. De plus, nous avons précisé dans la partie « Matériel et Méthodes » que toutes les amplifications sont réalisées pour chaque stock et chaque amorce au minimum 2 fois. Cette mise au point fondamentale a été facilitée par le fait que cette technique est utilisée en routine dans notre laboratoire. Les lectures dans ce travail ne sont réalisées que sur les profils reproductibles.

IV.1.1.2 Marqueur généraliste

Comme nous l'avons vu précédemment, les RAPDs sont des marqueurs généralistes. Ils ont été utilisés pour les études génétiques de différents micro-organismes comme par exemple, des protozoaires tels que *Trypanosoma* (Brisse, Barnabé et Tibayrenc, 2000), *Leishmania* (Bañuls *et al.*, 1999 ; Hide, Bañuls and Tibayrenc, 2001), *Plasmodium* (Urdaneta *et al.*, 2001), mais également des bactéries telles que *Helicobacter pylori* (Salaün, 2001), *Escherichia coli* (Grandhomme, 1999), et des levures, telles que *Candida albicans* (Pujol *et al.*, 1997) et *Saccharomyces cerevisiae* (Joly, 2000). Certains travaux montrent que cette technique a permis également la caractérisation génétique et l'étude de la dynamique des populations de *M. tuberculosis* (Linton *et al.*, 1994 ; Richner, Meiring and Kirby, 1997 ; Harn *et al.*, 1997).

Cette propriété de marqueur généraliste nous a permis de comparer dans ce travail, la diversité génétique de *M. tuberculosis* avec celle d'autres micro-organismes. Ce point est essentiel pour avoir une idée réelle sur la diversité de cette espèce, qui est généralement considérée comme un organisme très peu polymorphe.

IV.1.1.3 Marqueur multilocus

Par l'utilisation de différentes amorces, les RAPDs explorent différents locus sur le génome de l'organisme étudié. Ainsi, ces marqueurs sont considérés comme des marqueurs multilocus. De plus l'hypothèse de base est que les locus amplifiés par chaque amorce sont indépendants les uns des autres (Brisse, communication personnelle).

Comme nous l'avons vu précédemment pour *M. tuberculosis*, les tests de génétique des populations sont basés sur les tests de recombinaison, c'est-à-dire sur l'étude du déséquilibre de liaison ou association non aléatoire de génotypes d'un locus à l'autre. Dans ce cadre, cette technique présente les propriétés requises pour ces études. Ce n'est pas le cas des marqueurs moléculaires généralement utilisés pour le typage de *M. tuberculosis*, comme la technique RFLP-IS6110 ou encore le spoligotyping, qui sont des marqueurs unilocus.

IV.1.2 Les marqueurs MIRU-VNTRs

IV.1.2.1 Technique de référence

Cette technique présente différentes propriétés fondamentales pour l'épidémiologie moléculaire : elle est hautement reproductible, les résultats MIRU-VNTRs sont stables, et ils peuvent être comparés directement d'un laboratoire à l'autre (Mazars *et al.*, 2001 ; Supply *et al.*, 2001). Cette technique a montré également ses potentialités dans l'étude de l'épidémiologie moléculaire de plusieurs populations de l'espèce *M. tuberculosis* (Supply *et al.*, 2001 ; Cowan *et al.*, 2002). Les marqueurs MIRU-VNTRs ont un pouvoir de discrimination presque équivalent à celui de la technique standard basée sur la séquence d'insertion IS6110, et supérieur à celui du spoligotyping (Mazars *et al.*, 2001). Cette technique est donc utilisée dans ce travail comme méthode de référence.

IV.1.2.2 Marqueur spécifique

Les marqueurs MIRU-VNTRs sont des marqueurs spécifiquement utilisés pour le complexe *M. tuberculosis*. De plus, la stabilité des profils permet de comparer les résultats obtenus avec d'autres populations de *M. tuberculosis* dans d'autres laboratoires.

Une base de données est actuellement disponible sur internet (<http://www.ibl.fr/mirus/mirus.html>). Celle-ci rassemble les résultats MIRU-VNTRs réalisés sur différentes populations de *M. tuberculosis* provenant de plusieurs pays. Grâce à l'existence de telles bases de données, une comparaison directe des profils de différents isolats est donc possible. Cette propriété nous a permis de comparer les données obtenues sur la population marocaine avec celles obtenues pour une population française. Une population sud-africaine est également comparée à notre échantillon, cependant les données MIRU-VNTRs ne sont pas encore disponibles dans cette base.

IV.1.2.3 Marqueur multilocus

Ce marqueur, comme les RAPDs, est également un marqueur multilocus. En effet, chaque couple d'amorces amplifie un locus différent et indépendant des autres. Dans ce travail, nous avons utilisé les 12 locus polymorphes sur les 41 identifiés au niveau du génome de *M. tuberculosis* H37Rv (Supply *et al.*, 2000). Comme la technique RAPD, les MIRU-VNTRs peuvent être utilisés pour l'analyse du déséquilibre de liaison.

IV.1.3 Comparaison des marqueurs et complémentarité

Les deux marqueurs génétiques utilisés dans ce travail sont des marqueurs indépendants, et donc, ils n'étudient pas les mêmes régions du génome de *M. tuberculosis*. De plus, ces techniques sont complémentaires, par le fait que les RAPDs ont permis d'évaluer la diversité génétique de notre population par rapport à

différents micro-organismes, alors que les MIRU-VNTRs ont permis la comparaison de la population marocaine par rapport à d'autres populations de *M. tuberculosis*.

D'autre part, il est clair que pour l'étude de la diversité génétique, l'analyse combinée de deux marqueurs supposés indépendants, montrant un polymorphisme équivalent, est une confirmation irréfutable des résultats concernant la diversité du génome. Toutefois, les RAPDs se sont révélés plus résolutifs. En effet, dans le cas des suivis thérapeutiques, alors que tous les couples d'isolats ont montré des profils MIRU-VNTRs identiques entre eux, l'analyse RAPD a permis de mettre en évidence une variabilité non suspectée par la technique MIRU-VNTR. Nous avons également constaté la même chose dans l'étude de la transmission intra-familiale de la tuberculose. Par conséquent, ces résultats suggèrent que les RAPDs ont une horloge moléculaire plus rapide et qu'ils ont la potentialité de détecter les événements mutationnels rares.

En résumé, l'étude détaillée de ces deux marqueurs met en évidence plusieurs points importants :

- les RAPDs et les MIRU-VNTRs peuvent être utilisés pour la caractérisation moléculaire et l'étude de la structure des populations au sein d'un laboratoire ;
- les profils individuels obtenus avec les RAPDs sont difficilement comparables d'un laboratoire à l'autre à moins que tous les critères de standardisation soient respectés, alors qu'avec la technique MIRU-VNTR cela est possible ;
- la technique RAPD permet de comparer la diversité génétique globale obtenue pour une population de *M. tuberculosis* avec une autre population de *M. tuberculosis* ou avec des populations d'autres micro-organismes. Les MIRU-VNTRs permettent une comparaison limitée aux populations de l'espèce *M. tuberculosis* et du complexe *M. tuberculosis* ;
- les MIRU-VNTRs ne permettent pas de réaliser une phylogénie avec des stocks extérieurs au complexe *M. tuberculosis*, alors que la technique RAPD le permet.

IV.2 Structure de la population de *M. tuberculosis* isolée au Maroc

Pour travailler dans les conditions les plus rigoureuses possibles et obtenir des résultats reflétant la structure réelle de la population marocaine de *M. tuberculosis*, certaines précautions sont prises :

- seuls les isolats marocains sont inclus dans cette étude ;
- l'échantillon de Casablanca est subdivisé en plusieurs groupes spatiaux et temporels ;
- et les tests sont réalisés avec et sans les génotypes répétés.

Ces précautions permettent de minimiser tout biais possible lié à la séparation temporelle ou géographique (Effet Wahlund) et détecter le modèle correspondant à la « clonalité épidémique » décrit par Maynard Smith *et al.* (1993).

Toutes les analyses établies dans les différentes subdivisions et avec les deux marqueurs génétiques donnent des indications convergentes de différentes manifestations du déséquilibre de liaison. En effet, chaque marqueur génétique montre statistiquement une association non aléatoire des génotypes d'un locus à l'autre. De plus, la corrélation significative entre ces deux marqueurs considérés comme indépendants est un indice supplémentaire de déséquilibre de liaison (Tibayrenc *et al.*, 1991 ; Tibayrenc, 1995-b).

Par conséquent, tous ces résultats permettent d'émettre l'hypothèse d'une structure fondamentalement clonale de la population de *M. tuberculosis* isolée au Maroc, et principalement à Casablanca. Les tests réalisés sans les génotypes répétés étant également significatifs, cela ne corrobore pas le modèle de clonalité épidémique de Maynard Smith *et al.*, (1993). Ce résultat a été également obtenu suite à l'analyse d'une autre population de *M. tuberculosis* isolée en Afrique du Sud, pays également à forte incidence de la tuberculose (Supply *et al.*, sous presse). Une population comprenant 209 isolats d'une région d'Afrique du Sud (Cape Town) a été analysée par la technique MIRU-VNTR. Cette étude montre également un déséquilibre de liaison significatif. Les résultats de notre étude et ceux obtenus par

Supply *et al.*, (sous presse) en Afrique du Sud supportent que *M. tuberculosis* suit une évolution clonale prédominante.

Malgré les valeurs très significatives obtenues pour les tests de déséquilibre de liaison, l'analyse de bootstrap sur l'arbre de Wagner a donné cependant de faibles valeurs pour les populations de *M. tuberculosis* (voir figures 34, p113 et 36, p115). Ce résultat suggère l'occurrence occasionnelle de transferts horizontaux de gènes, qui viennent brouiller l'individualisation de lignées phylogénétiques distinctes. Mais ces échanges de gènes s'ils existent, ne sont pas assez fréquents pour masquer le déséquilibre de liaison.

Les analyses génétiques réalisées dans cette étude suggèrent que *M. tuberculosis* suit une évolution fondamentalement clonale, mais n'excluant pas des transferts de gènes occasionnels. Ces résultats sont également présentés dans une publication soumise à « Journal of Infectious Diseases » (voir publication 2, annexe 16). Comme nous l'avons vu dans le chapitre I « Rappels Bibliographiques » (p14), l'hypothèse d'évolution clonale suggère la possibilité de mettre en évidence des marqueurs épidémiologiques, des marqueurs indirects de propriétés biologiques spécifiques ou de formes cliniques. Cela est discuté plus loin dans ce travail.

IV.3 Diversité génétique et relations phylogénétiques

La connaissance de la diversité génétique d'un micro-organisme est une des bases essentielles de l'épidémiologie moléculaire, mais également de la recherche fondamentale. En effet, pour comprendre le comportement biologique, clinique et épidémiologique d'un micro-organisme, il est indispensable de prendre en compte sa variabilité génétique générale. L'hypothèse est que cette diversité génétique a un impact sur les propriétés médicalement importantes de cet organisme. Ceci a été démontré pour divers micro-organismes, comme par exemple *Trypanosoma cruzi* (de Lana *et al.*, 1998 ; Laurent *et al.*, 1997 ; Revollo *et al.*, 1998).

Jusqu'à présent, aucune étude génétique détaillée n'a été réalisée sur un échantillon marocain. Afin de mieux comprendre l'épidémiologie et donc la dynamique de transmission de la tuberculose dans ce pays, il est donc important de

déterminer le niveau de diversité génétique de l'agent pathogène. Dans ce travail, nous étudions donc le cas particulier des isolats de *M. tuberculosis* circulant dans la principale ville marocaine, Casablanca.

Dans cette population, un polymorphisme notable est révélé avec les deux marqueurs génétiques. En effet, les différents indices de diversité, mesurés pour l'ensemble de la population marocaine ainsi que pour les isolats d'une même préfecture (HMAS) ou ceux prélevés au cours de la même année (1997, 1998), ont donné des valeurs traduisant une importante diversité génétique. Cette diversité est rencontrée également entre les isolats des membres d'une même famille (voir p79) et pour les isolats des suivis thérapeutiques (voir p80).

Par ailleurs, les études phylogénétiques permettent de visualiser les relations phylogénétiques et la répartition de la diversité mise en évidence dans notre échantillon. Les analyses réalisées en présence de stocks d'origines diverses et de différentes espèces du complexe *M. tuberculosis* situent l'échantillon marocain avec les isolats de *M. tuberculosis* rencontrés dans d'autres pays.

IV.3.1 La diversité génétique

IV.3.1.1 Comparaison de la diversité génétique de notre échantillon avec d'autres micro-organismes

Sur la base des données RAPDs, nous avons pu comparer le niveau de polymorphisme dans la population marocaine de *M. tuberculosis* avec celui obtenu pour d'autres espèces de bactéries, de levures ou de protozoaires, ce marqueur étant un marqueur généraliste. Les résultats obtenus ont montré que la diversité génétique de l'espèce *M. tuberculosis* apparaît très significative, et comparable à celle obtenue pour d'autres espèces clonales (voir table XI, p84). Par exemple, la diversité génétique moyenne de *Leishmania infantum* (Hide, Bañuls and Tibayrenc, 2001 ; Bañuls, 1998), agent des leishmanioses viscérales est de 0,14, celle de *Escherichia coli* est de 0,85 (Grandhomme, 1999), celles de *Candida albicans* et de *Saccharomyces cerevisiae* sont aux environs de 0,4 (Darce, 2002 ; Joly, 2000), alors que celle de la population marocaine de *M. tuberculosis* est de 0,48.

IV.3.1.2 Polymorphisme génomique chez l'espèce *M. tuberculosis*

Le polymorphisme génétique détecté dans notre échantillon est en contradiction apparente avec les résultats obtenus par le séquençage de gènes de structure (Sreevatsan *et al.*, 1997), et de gènes codant pour les protéines cibles du système immunitaire de l'hôte (Musser, Amin et Ramaswamy, 2000). Cependant, une étude récente basée sur la comparaison de génomes entiers de différents stocks cliniques et de laboratoire de *M. tuberculosis* confirme nos résultats (Fleischmann *et al.*, 2002). En effet, cette analyse a permis de mettre en évidence un polymorphisme génétique très significatif pour plusieurs familles de gènes identifiés comme structures codantes (Fleischmann *et al.*, 2002).

Cette divergence concernant le polymorphisme génomique de *M. tuberculosis* peut être expliquée par :

- une variabilité plus importante dans certaines familles de gènes par rapport au reste du génome (Fleischmann *et al.*, 2002) ;
- des événements d'insertions ou de délétions (Brosch *et al.*, 2002) ;
- une variabilité impliquant les éléments transposables comme la séquence *IS6110* (Sreevatsan *et al.*, 1997), et/ou de nombreux locus contenant des séquences répétées incluant les MIRU-VNTRs et autres VNTRs (Frothingham and Meeker-O'Connell, 1998 ; Skuce *et al.*, 2002 ; Smittipat and Palittapongarnpim, 2000 ; Supply *et al.*, 2000).

Cette étude permet par conséquent de mettre en évidence la potentialité des RAPDs à détecter ces multiples sources de polymorphisme. Ces marqueurs accèdent à la variabilité générale du génome.

IV.3.1.3 Comparaison de la diversité génétique de notre échantillon avec d'autres populations de *M. tuberculosis*

La diversité génétique est mise en évidence dans la population marocaine quelle que soit la subdivision considérée, par année ou par préfecture, et ceci pour tous les indices à l'étude (voir tables X et XII, p83 et 86). Ces résultats sont plutôt

inattendus, dans la mesure où les travaux antérieurs ont montré que l'on trouve généralement peu de diversité dans les pays à forte incidence de la tuberculose, alors que les pays développés avec une faible incidence présentent un polymorphisme plus élevé (Hermans *et al.*, 1995).

En effet, les études sur des communautés à haute incidence comme le Honduras, l'Éthiopie, la Tunisie ainsi que différents pays d'Asie Orientale, ont révélé une faible variabilité génétique au sein des échantillons de *M. tuberculosis* (Pineda-Garcia, Ferrera and Hoffner, 1997 ; Hermans *et al.*, 1995 ; van Soolingen *et al.*, 1995).

En 1996, Warren *et al.* avaient observé une situation comparable en Afrique du Sud dans la communauté de Cape Town, cette étude était basée sur les données de la technique RFLP-IS6110. Une étude MIRU-VNTR sur ce même échantillon a permis de confirmer cette diversité à Cape Town (Supply *et al.*, sous presse).

Sur la base des données MIRU-VNTRs, nous avons pu comparer la diversité génétique observée dans cette région avec celle obtenue pour la population marocaine (voir table XIII, p88). Le polymorphisme de notre échantillon s'est révélé plus élevé que celui de la population sud-africaine. Ce résultat peut être expliqué par le fait que l'incidence de la tuberculose de Cape Town est plus élevée que celle de Casablanca (>1.000 nouveaux cas pour 100.000 habitants par an à Cape Town, et 160 nouveaux cas pour 100.000 habitants à Casablanca avec environ 450 nouveaux cas déclarés par an dans la préfecture HMAS).

Les études publiées sur les pays à faible incidence, en général les pays développés, ont effectivement mis en évidence une forte diversité génétique. C'est le cas du Danemark, une étude dans ce pays a révélé un profil unique RFLP-IS6110 pour la plupart des isolats (Yang *et al.*, 1995). Une situation similaire a été également décrite aux Pays-Bas (Hermans *et al.*, 1995).

Pour évaluer la diversité génétique obtenue pour l'échantillon de Casablanca par rapport aux pays développés, nous avons comparé nos données MIRU-VNTRs avec les données d'un échantillon français disponibles sur internet dans la base de

données (<http://www.ibl.fr/mirus/mirus.html>). Les valeurs obtenues pour les différents indices sont légèrement inférieures à celles de l'échantillon marocain (voir table XIII, p88). Cela démontre que la dynamique de la population marocaine de *M. tuberculosis* est comparable à celle observée dans les pays développés.

Par ailleurs, il est intéressant de remarquer que certains travaux (Hermans *et al.*, 1995 ; Warren *et al.*, 1996) ont suggéré que la vaccination massive au BCG conduirait à une diminution de la diversité génétique. L'hypothèse est que cela entraînerait la sélection de certains variants, et par conséquent la propagation de clones majeurs. Nos résultats sont en désaccord avec cette hypothèse. En effet, au Maroc, la vaccination obligatoire au BCG est instaurée depuis 1967, et les résultats obtenus révèlent une importante diversité génétique.

Tous ces résultats concernant le polymorphisme génétique ne peuvent pas être expliqués par un faible effectif de la population étudiée, qui ne peut qu'aller dans la direction opposée d'un faible polymorphisme. Les isolats ont été choisis aléatoirement à Casablanca sans aucune connaissance préalable de la diversité génétique des isolats. De plus, la majorité des isolats (101/155) provient de la préfecture HMAS, préfecture dans laquelle environ 450 nouveaux cas sont déclarés par an. Il est important également de considérer que tous les cas déclarés ne sont pas forcément disponibles en culture, et cette situation est courante et inhérente aux pays en voie de développement. S'ajoutent également à cela les problèmes liés à la croissance des bactéries (voir partie « Matériel et Méthodes », p44). Par conséquent, il paraît très peu probable et même illogique qu'une augmentation des stocks étudiés entraînerait une diminution de la diversité génétique obtenue.

IV.3.2 Relations phylogénétiques

IV.3.2.1 Position phylogénétique de M. tuberculosis dans le complexe M. tuberculosis

Les analyses phylogénétiques n'ont pas individualisé les différentes espèces du complexe *M. tuberculosis*. En effet, les 5 stocks de référence de *M. africanum* et les 5 stocks de *M. bovis* sont intégrés dans l'échantillon de *M. tuberculosis* (voir

figures 16, 24 et 32, p96, 103 et 111). Il est difficile de conclure sur la position de *M. microti* par rapport à *M. tuberculosis* du fait que notre échantillon n'est constitué que d'un stock. Il en est de même pour *M. canettii* qui a été utilisé comme groupe externe dans toutes les analyses et donc se retrouve automatiquement en position externe, comme le nom l'indique. Au vu de nos données, on ne peut affirmer que *M. tuberculosis* est un groupe monophylétique au sein du complexe *M. tuberculosis*.

IV.3.2.2 Relations phylogénétiques entre l'échantillon marocain et les autres stocks de *M. tuberculosis*

Dans la bibliographie, le typage moléculaire des isolats de *M. tuberculosis* sur la base de la technique RFLP-IS6110 a permis de définir certaines familles de souches réparties géographiquement. Il s'agit des familles « Africa », « Haarlem », « W-Beijing », « Latin American-Mediterranean », et les stocks à faibles copies d'IS6110 « East-African-Indian » (Kremer *et al.*, 1999 ; Glynn *et al.*, 2002 ; Sola *et al.*, 2001-b).

Différents stocks des différentes familles ont été étudiés par la technique MIRU-VNTR par Supply *et al.* (2001), et certaines d'entre eux sont également étudiés dans ce travail par la technique RAPD.

La comparaison phylogénétique de ces différents stocks avec notre échantillon permet de situer les isolats provenant de la ville de Casablanca par rapport aux différentes familles distribuées dans le monde. Les arbres de Neighbor-Joining et de Wagner obtenus montrent que les isolats marocains sont principalement mélangés avec les familles « Haarlem » et « Latin American-Mediterranean » (voir figures 37 et 38, p117 et 118). Cependant, l'analyse de Wagner a montré de faibles valeurs de bootstrap (voir figure 38, p118). Par conséquent, cette hypothèse devra être confirmée par une étude incluant davantage d'isolats des différentes familles. Toutefois, ces résultats mettent en évidence l'hétérogénéité des isolats marocains.

IV.3.2.3 Relations phylogénétiques entre les isolats marocains

Les analyses phylogénétiques ne révèlent pas dans notre échantillon des groupes dominants de stocks proches génétiquement, et ceci aussi bien sur les arbres de Neighbor-Joining (voir figures 18 à 23 et 26 à 31, p98 à 102 et p105 à 110) que sur les arbres de Wagner (voir figures 34, 35 et 36, p113, 114 et 115). Ce manque de structuration en groupes majeurs est également observé pour l'échantillon isolé de la préfecture HMAS, aire présentant une haute incidence de la tuberculose (voir figures 19, 27 et 35, p99, 106 et 114).

Cette observation est également en contraste avec les régions présentant une haute incidence (van Soolingen *et al.*, 1995 ; Hermans *et al.*, 1995 ; Pineda-Garcia, Ferrera, et Hoffner, 1997). Comme exemple, nous pouvons citer les travaux de van Soolingen *et al.* (1995) dans les pays asiatiques. Les auteurs ont mis en évidence la prédominance d'un génotype dans ces régions, nommé « Beijing ».

Les différents arbres phylogénétiques montrent une structuration en un certain nombre de petits groupes, mais aucun de ces groupes n'est soutenu par de fortes valeurs de bootstrap (voir figures 32 à 36, p111 à 115). Comme nous l'avons souligné dans la partie traitant de la structure des populations (voir paragraphe IV-2, p127), ceci suggère par conséquent l'existence de transferts horizontaux de gènes entre les lignées bactériennes, malgré une évolution clonale prédominante.

IV.3.2.4 Association entre diversité phylogénétique et caractère extrinsèque

Nous avons vu dans la partie concernant la structure des populations (voir paragraphe IV-2, p127), qu'un micro-organisme à structure clonale peut permettre de définir des marqueurs épidémiologiques, des marqueurs indirects de virulence, de résistance, ou de forme clinique. C'est le cas de *Salmonella* (Maynard Smith *et al.*, 1993).

D'après les résultats obtenus dans ce travail sur l'échantillon marocain, les conditions sont requises pour trouver une association entre les génotypes multilocus et les différents caractères extrinsèques de la bactérie concernant toutes les données épidémiologiques obtenues pour chaque isolat. Nous avons regardé s'il existait de telles associations grâce à la fonction « Identification » du logiciel « Treedyn », qui est un éditeur interactif d'arbres phylogénétiques (Chevenet, Bañuls and Barnabé, 2000).

Cette étude n'a révélé aucun caractère commun partagé par tous les membres des différents groupes. Par conséquent, Il n'existe pas de regroupement significatif en rapport avec le lieu ou l'année d'isolement, le profil de résistance, ou la catégorie clinique à laquelle appartient le patient. Ceci suggère que pour étudier, par exemple, les génotypes résistants de *M. tuberculosis*, il est nécessaire de travailler directement sur les gènes impliqués dans la résistance.

Le seul caractère de regroupement est l'appartenance aux différentes familles mais encore cela n'est pas valable pour toutes les familles (voir figures 18 et 26, p98 et 105).

Les résultats négatifs obtenus sur les génotypes multilocus devront être confirmés ou infirmés par des études statistiques plus poussées comme des analyses multidimensionnelles (analyses factorielles des correspondances, analyses en composantes principales).

En considérant le faible niveau de regroupement des isolats, la diversité génétique importante et l'absence de génotypes multilocus majeurs, ces observations suggèrent que la réactivation d'infections latentes est la force principale régissant la situation endémique de la maladie à Casablanca. Cette hypothèse est consistante avec une origine ancienne de la tuberculose au Maroc. En effet, une origine récente d'une espèce clonale aurait donné un polymorphisme réduit avec seulement quelques génotypes différents.

Certains de ces résultats font l'objet d'une publication soumise à « Journal of Infectious Diseases » (voir publication 2, annexe 16).

IV.4 Epidémiologie moléculaire de la tuberculose à Casablanca

Burgos et Pym (2002) montrent les progrès réalisés dans la compréhension de la transmission et le contrôle de la tuberculose grâce à cette discipline. Mais ces auteurs mettent en évidence que malgré ces progressions, la tuberculose est toujours une maladie infectieuse dévastatrice. Le défi dans les années à venir pour l'épidémiologie moléculaire est d'apporter une meilleure compréhension de la dynamique de transmission de la tuberculose et de stimuler la mise en œuvre de mesures de contrôle à grande échelle. Dans ce cadre, il est fondamental de développer de telles études dans tous les pays où sévit la tuberculose, avec les moyens disponibles et propres à chaque pays.

Cette dernière partie tente par conséquent de donner des informations sur la dynamique de transmission de la tuberculose à Casablanca.

IV.4.1 Transmission de la tuberculose à l'échelle de Casablanca

La transmission active de la tuberculose peut être due soit à une réactivation d'infections latentes, soit à une transmission récente (Kulaga, Behr and Schwartzman, 1999 ; Geng *et al.*, 2002). La distinction entre ces 2 voies de transmission est possible par l'analyse des données génétiques. L'existence de génotypes identiques majoritaires suggère une infection récente, alors qu'un polymorphisme important sans génotype majoritaire témoigne d'une réactivation d'une infection ancienne.

D'après les données génétiques et phylogénétiques obtenues dans ce travail, l'hypothèse de base retenue est donc une origine ancienne de la tuberculose à Casablanca, et une transmission par réactivation d'infections latentes conditionnant une situation endémique de la maladie dans cette ville. Ces données sont similaires à celles obtenues à New York par Geng *et al.* (2002), et à Melbourne par Kermodé *et al.* (1999). D'autre part, elles diffèrent de celles obtenues par Supply *et al.* (sous presse) dans la communauté de Cape Town, Afrique du Sud. En effet, les hypothèses retenues par ces auteurs dans cette zone sont une transmission

principale par infection récente, et une origine récente de la tuberculose en Afrique du Sud.

Il faut également noter que les transmissions actives récentes ne sont pas exclues, mais leur impact sur le problème de la tuberculose à Casablanca semble ne pas jouer un rôle prédominant dans la propagation de la maladie.

IV.4.2 Transmission de la tuberculose à l'échelle individuelle

IV.4.2.1 Les cas des suivis thérapeutiques

Nous avons vu dans le chapitre « Résultats » (p80) que les cinq couples d'isolats correspondant aux suivis thérapeutiques donnent les mêmes profils génétiques avec la technique MIRU-VNTR contrairement à la technique RAPD. En effet, nous avons trouvé par RAPD une identité complète de profils seulement pour un seul couple d'isolats, des profils similaires pour 3 couples et des profils relativement différents pour le dernier couple.

Compte tenu du temps séparant les 2 prélèvements d'un même patient (maximum 9 mois), sachant également d'après nos résultats que les RAPDs ont montré une horloge moléculaire plus rapide que les MIRU-VNTRs, l'hypothèse la plus parcimonieuse est que les isolats prélevés sur le même patient au cours du traitement représentent la même souche. Le cas d'une réinfection exogène reste peu probable. Cependant, pour le cas du dernier couple, on ne peut exclure la mise en évidence d'un autre génotype de *M. tuberculosis*.

IV.4.2.2 La tuberculose familiale

Du fait que la tuberculose se transmet par voie aérienne, les personnes vivant sous le même toit sont par conséquent susceptibles d'être contaminées par la même souche. Cependant, cette étude a montré que dans 4 familles sur 7 étudiées, les isolats des membres d'une même famille étaient génétiquement différents. Ce résultat indique, comme cela a été montré dans d'autres études (Classen *et al.*, 1999), que la transmission active de la tuberculose dans les pays à forte incidence

est également importante en dehors du foyer familial. Ce type d'informations est d'une grande importance pour le traitement et l'identification de la source de contamination.

Dans cette étude, aucun facteur de risque n'a été associé avec la transmission active de la maladie. Au Maroc, la tuberculose semble concerner spécifiquement les personnes issues de milieux socio-économiques défavorisés. Le SIDA, l'alcool et la drogue sont peu impliqués dans la transmission de la maladie dans ce pays (Ottmani *et al.*, 1998).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion et perspectives

L'objectif de cette thèse était d'étudier la diversité génétique et la structure des populations d'un échantillon de *M. tuberculosis* isolé dans la capitale économique du Maroc, Casablanca, afin d'élucider et de comprendre la dynamique de transmission de la tuberculose dans cette ville. Ce travail représente la première étude de génétique réalisée sur un tel échantillon marocain.

L'utilisation de deux marqueurs génétiques indépendants a permis d'obtenir des informations confirmées mais également complémentaires. En effet, d'une part la concordance des résultats par les deux techniques soutient fortement chacune des hypothèses émises. D'autre part, les RAPDs étant un marqueur généraliste ont donné la possibilité d'évaluer et de comparer la diversité génétique de notre population avec celle d'autres micro-organismes ; les MIRU-VNTRs étant à l'heure actuelle considérés comme une technique de référence pour le typage de *M. tuberculosis* ont permis de comparer les données obtenues pour la population marocaine de *M. tuberculosis* avec celles d'autres populations.

Les analyses de génétique des populations basées sur les données RAPDs et MIRU-VNTRs de la population de Casablanca confirment une structure fondamentalement clonale précédemment décrite dans une population de *M. tuberculosis* d'Afrique du Sud (Supply *et al.*, sous presse). Les faibles valeurs de bootstrap obtenues sur les arbres de Wagner ont suggéré l'existence de transferts horizontaux de gènes pas assez fréquents pour faire disparaître le déséquilibre de liaison, mais assez fréquents pour perturber la distinction en lignées phylogénétiques distinctes dans la population marocaine.

La caractérisation génétique avec les deux marqueurs a mis en évidence une importante diversité génétique dans la population de *M. tuberculosis* isolée à Casablanca. Sur la base des données RAPDs, la comparaison avec la diversité génétique d'autres micro-organismes à évolution clonale a confirmé que le polymorphisme obtenu était loin d'être négligeable.

D'une part, ces résultats sont en contradiction avec les données de séquences obtenues sur des gènes de structure et des gènes codant pour les protéines cibles du système immunitaire de l'hôte, dans lesquels le polymorphisme s'est révélé restreint. D'autre part, une étude récente basée sur la comparaison de séquences de génomes entiers de plusieurs stocks de *M. tuberculosis* confirme nos résultats.

D'un point de vue populationnel, ce résultat était également inattendu. En effet, il a été établi dans des études précédentes, que les populations de *M. tuberculosis* provenant de pays à forte incidence de la tuberculose révèlent généralement une faible diversité génétique. La comparaison des données génétiques MIRU-VNTRs de différentes populations de *M. tuberculosis* avec celles de la population de Casablanca a mis en évidence un polymorphisme comparable à celui de pays développés à faible incidence de la tuberculose.

Les résultats phylogénétiques et génétiques suggèrent une origine ancienne de la tuberculose à Casablanca et une transmission par réactivation d'infections latentes, prédominante par rapport aux transmissions récentes. L'hypothèse est que ces phénomènes conditionnent la situation endémique de cette maladie dans cette ville.

Les résultats en faveur d'une structure clonale de *M. tuberculosis* soulignent la possibilité d'utiliser le typage moléculaire pour le suivi épidémiologique des souches. Mais en dépit de ce mode d'évolution, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'association entre les marqueurs génétiques multilocus et les différents caractères extrinsèques caractérisant les isolats, comme par exemple les profils de résistance de la bactérie, le lieu ou l'année d'isolement, la catégorie clinique de la tuberculose.

Ce travail ouvre de nombreuses perspectives d'un point de vue épidémiologie moléculaire mais également fondamental.

Afin de mieux comprendre la transmission globale de la tuberculose au Maroc et dans le but de mettre en place des mesures de contrôle efficaces, il paraît important de développer en routine de telles études d'épidémiologie moléculaire. En

effet, l'adoption de la stratégie DOTS (Directly Observed Treatment Short-course) de l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) ne semble pas à elle seule capable de contrôler la propagation de la tuberculose. Il serait essentiel de développer un programme d'épidémiologie moléculaire systématique sur tous les cas déclarés au Maroc et en particulier à Casablanca. Il est évident qu'un tel programme est difficile à mettre en place et coûteux sur la totalité d'un pays en voie de développement.

Il est à noter également que l'augmentation de souches multirésistantes particulièrement aux antibiotiques de première ligne pose aussi un grand problème dans le contrôle de la tuberculose au Maroc. C'est pour ces raisons qu'il est également nécessaire de pousser les recherches d'un point de vue fondamental sur ces génotypes résistants. Dans ce cadre, des marqueurs diagnostiques rapides spécifiques des génotypes résistants seraient précieux pour identifier les sources de contamination et suivre la propagation de ces génotypes. Pour le développement de tels outils, la première étape serait de déterminer les cibles potentielles pour la réalisation de ces marqueurs. Nous avons vu dans cette étude que la propagation clonale suggère la possibilité de trouver des marqueurs indirects liés aux propriétés biologiques de la bactérie. Les résultats sur cet échantillon ne nous ont pas permis d'identifier de tels marqueurs. Il est important de souligner que l'analyse phylogénétique que nous avons réalisée, est une approche globale sur l'ensemble des caractères génétiques. Nous proposons donc dans un premier temps d'utiliser des approches statistiques telles que les analyses multidimensionnelles pour identifier s'il existe des corrélations entre les données de résistance et chacune des informations génétiques obtenues.

Dans ce travail, nous avons étudié une population de *M. tuberculosis* isolée à Casablanca. Ces résultats ne reflètent pas la situation et la dynamique de transmission de la tuberculose au Maroc. Par conséquent, pour avoir une vue globale de la diversité génétique et de la structure des populations dans ce pays, il est essentiel de réaliser des études génétiques et phylogénétiques dans d'autres villes marocaines ainsi que dans les zones rurales. De telles études détermineraient si la situation décrite à Casablanca dans ce travail est spécifique à cette ville, principale ville du Maroc, ou bien si cette situation est globalement retrouvée au Maroc.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

Aghandous, R., Zouhdi, M., Zizi, M., Errami, M., and Idrissi, L. (1999). *Mycobacterium* resistance to antimycobacterial reagent. *Thérapie*. **54** : 623-625.

Baess, I. (1969). Subdivision of *M. tuberculosis* by means of bacteriophages with special reference to epidemiological studies. *Acta Pathol Microbiol Scand. (B)* **76** : 464-474.

Bañuls, A. L. (1998). Apport de la génétique évolutive à l'épidémiologie et à la taxonomie du genre *Leishmania*. *Thèse de Doctorat* : Université Montpellier II, Montpellier.

Bañuls, A. L., Jonquieres, R., Guerrini, F., Le Pont, F., Barrera, C., Espinel, I., Guderian, R., Echeverria, R., and Tibayrenc, M. (1999). Genetic analysis of *Leishmania* parasites in Ecuador : are *Leishmania (Viannia) panamensis* and *Leishmania (V.) Guyanensis* distinct taxa ? *Am J Trop Med Hyg.* **61** (5) : 838-845.

Bañuls, A. L., Dujardin, J. C., Guerrini, F., De Doncker, S., Jacquet, D., Arevalo, J., Noel, S., Le Ray, D., and Tibayrenc, M. (2000). Is *Leishmania (Viannia) peruviana* a distinct species ? A MLEE/RAPD evolutionary genetics answer. *J Eukaryot Microbiol.* **47** (3) : 197-207.

Bazzicalupo, M., and Fani, R. (1996). The use of RAPD for generating specific DNA probes for microorganisms. *Meth Mol Biol.* **50** : 155-175.

Behr, M. A. (2002). BCG--different strains, different vaccines ? *Lancet Infect Dis.* **2** (2) : 86-92.

Bercovier, H., Kafri, O., and Sela, S. (1986). Mycobacteria possess a surprisingly small number of ribosomal RNA genes in relation to the size of their genome. *Biochem Biophys Res Commun.* **136** : 1136-1141.

Blanc, D. S., Bañuls, A. L., Hauser, P. M., Moreillon, P., Francioli, P., Tibayrenc, M., and Swiss MRSA Group. (2000). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* : phylogenetic relatedness between European epidemic clones and Swiss sporadic strains. *Microb Drug Resist.* **6** (3) : 231-238.

Bloom, B. R. and Murray, C. J. L. (1992). Tuberculosis : commentary on a reemergent killer. *Science.* **257** : 1055-1064.

Bradford, W. Z., Koehler, J., El-Hajj, H., Hopewell, P. C., Reingold, A. L., Agasino, C. B., Cave, M. D., Rane, S., Yang, Z., Crane, C. M., and Small, P. M. (1998). Dissemination of *Mycobacterium tuberculosis* across the San Fransisco bay area. *J Infect Dis.* **177** : 1104-1107.

- Brisse, S., Barnabé, C., and Tibayrenc, M.** (2000). Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int J Parasitol.* **30** (1) : 35-44.
- Brosch, R., Gordon, S. V., Marmiesse, M., Brodin, P., Buchrieser, C., Eiglmeier, K., Garnier, T., Gutierrez, C., Hewinson, G., Kremer, K., Parsons, L. M., Pym, A. S., Samper, S., van Soolingen, D., and Cole S. T.** (2002). A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99** (6) : 3684-3689.
- Burgos, M. V., and Pym, A. S.** (2002). Molecular epidemiology of tuberculosis. *Eur Respir J Suppl.* **36** : 54s-65s.
- Caetano-Anollés, G.** (1993). Amplifying DNA with arbitrary oligonucleotide primers. *PCR Methods Appl.* **3** : 85-94.
- Cainelli, F. and Vento, S.** (2002). BCG efficacy and tuberculin skin testing. *Lancet.* **359** (9316) : 1521-1522.
- Canetti, G., Rist, N., and Grosset, J.** (1963). Mesure de la sensibilité du bacille tuberculeux aux drogues antibacillaires par la méthode des proportions. *Rev Tuberc Pneum.* **27** : 217-272.
- Carlson, J. E., Tulsieram, L. K., Glaubitz, J. C., Luk, V. W. K., Kauffeldt, C., and Rutledge, R.** (1991). Segregation of random amplified DNA markers in F1 progeny of conifers. *Theor Appl Genet.* **83** : 194-200.
- Castets, M., Boisvert, H., Grumbach, F., Brunel, M., and Rist, N.** (1968). Tuberculosis bacilli of the African type : preliminary note. *Rev Tuberc Pneumol (Paris).* **32** (2) : 179-184.
- Cave, M. D., Eisenach, K. D., McDermott, P. F., Bates, J. H., and Crawford, J. T.** (1991). IS6110 : conservation of sequence in the *Mycobacterium tuberculosis* complex and its utilisation in DNA fingerprinting. *Mol Cell Probes.* **5** : 73-80.
- Chevenet, F., Bañuls, A. L., and Barnabé, C.** (2000). TreeDyn : un éditeur interactif d'arbres phylogénétiques. In : **Caraux, G., O. Gascuel, M. F. Sagot** (Eds.). *Actes des Premières Journées Ouvertes Biologie, Informatique et Mathématiques, Montpellier, ENSAM/LIRMM*, pp. 87-90.
- Classen, C. N., Warren, R., Richardson, M., Hauman, J. H., Gie, R. P., Ellis, J. H., van Helden, P. D., and Beyers, N.** (1999). Impact of social interactions in the community on the transmission of tuberculosis in a high incidence area. *Thorax.* **54** (2) : 136-140.
- Colditz, G. A., Brewer, T. F., Berkey, C. S., Wilson, M. E., Burdick, E., Fineberg, H. V., and Mosteller, F.** (1994). Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature. *JAMA.* **271** (9) : 698-702.

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

Cowan, L. S., Mosher, L., Diem, L., Massey, J. P., and Crawford, J. T. (2002). Variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with low copy numbers of IS6110 by using mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol*. **40** (5) : 1592-1602.

Dannenber, A. M. Jr. (1989). Immune mechanisms in the pathogenesis of pulmonary tuberculosis. *Rev Infect*. **11** (Suppl. 2) : S369-378.

Dannenber, A. M. Jr. (1991). Delayed-type hypersensitivity and cell-mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunol Today*. **12** : 228-233.

Darce, M. (2002). Caractérisation de *Candida albicans* isolées de patients immunocompétents et de sujets immunodéprimés. *Thèse de Doctorat* : Université Toulouse III – Paul Sabatier, Toulouse.

de Lana, M., da Silveira Pinto, A., Barnabe, C., Quesney, V., Noel, S., and Tibayrenc, M. (1998). *Trypanosoma cruzi*: compared vectorial transmissibility of three major clonal genotypes by *Triatoma infestans*. *Exp Parasitol*. **90** (1) : 20-25.

Dijkshoorn, L., and Towner, K. (2001). An introduction to the generation and analysis of microbial typing data. In : *Dijkshoorn, L., Towner, K. J., and Struelens, M. New approaches for the generation and analysis of microbial typing data*. Elsevier Sciences B. V., Amsterdam, **1th ed.** : 1-30.

Dolin, P. J., Raviglione, M. C., and Kochi, A. (1994). Global tuberculosis incidence and mortality during 1990-2000. *Bull WHO*. **72** (2) : 213-220.

Dye, C., Scheele, S., Dolin, P., Pathania, V., and Raviglione, M. C. (1999). Consensus statement : global burden of tuberculosis : estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. *J Am Med Assoc*. **282** : 677-686.

Efron, B. (1979). Bootstrap methods : another look at the jackknife. *Ann Statist*. **7** : 1-26.

El Baghdadi, J., Lazraq, R., Benani, A., Naciri, M., Ibrahimy, S., and Benslimane, A. (1997-a). PCR detection of *Mycobacterium tuberculosis* lacking IS6110. *Bull Soc Pathol Exot*. **90** (5) : 303-306.

El Baghdadi, J., Lazraq, R., Ibrahimy, S., and Benslimane, A. (1997-b). Molecular typing of Moroccan strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Bull Soc Pathol Exot.* **90** (3) : 156-159.

El Baghdadi, J., Lazraq, R., Ibrahimy, S., Bouayad, Z., Guinet, R., and Benslimane, A. (1997-c). Survey of primary drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Casablanca, Morocco. *Int J Tuberc Lung Dis.* **1** : 309-313.

Farries, J. S. (1970). Methods for computing Wagner trees. *Syst Zool.* **19** : 83-92.

Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies : an approach using the bootstrap. *Evolution.* **39** : 783-791.

Fine, P. E. (1989). The BCG story : lessons from the past and implications for the future. *Rev Infect Dis.* **11** (Suppl 2) : S353-S359.

Fleischmann, R. D., Alland, D., Eisen, J. A., Carpenter, L., White, O., Peterson, J., DeBoy, R., Dodson, R., Gwinn, M., Haft, D., Hickey, E., Kolonay, J. F., Nelson, W. C., Umayam, L. A., Ermolaeva, M., Salzberg, S. L., Delcher, A., Utterback, T., Weidman, J., Khouri, H., Gill, J., Mikula, A., Bishai, W., Jacobs Jr, W. R. Jr., Venter, J. C., and Fraser, C. M. (2002). Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. *J Bacteriol.* **184** (19) : 5479-5490.

Frieden, T. R., Sterling, T., Pablos-Mendez, A., Kilburn, J. O., Cauthen, G. M., Dooley, S. W. (1993). The emergence of drug-resistant tuberculosis in New York City. *N Engl J Med.* **328** (8) : 521-526.

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

Geng, E., Kreiswirth, B., Driver, C., Li, J., Burzynski, J., DellaLatta, P., LaPaz, A., and Schluger, N. W. (2002). Changes in the transmission of tuberculosis in New York City from 1990 to 1999. *N Engl J Med.* **346** (19) : 1453-1458.

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

Grandhomme, M. (1999). Etude phylogénétique d'*Escherichia coli* par la technique RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). *Thèse de Diplôme d'Etat en Pharmacie* : Université de Montpellier, Faculté de Pharmacie, Montpellier.

Grosset, J. Boisvert, H., and Truffot-Pernot, C. (1990). Mycobactéries. In : *Le Minor, L., and Veron, M. (eds). Bactériologie médicale.* Flammarion, Paris. 965-1017.

Grosset, J., Truffot-Pernot, C., Boisvert, H., and Lalande, V. (1991). Qu'est-ce que les mycobactéries atypiques ? *Med Mal Infect.* **21** : 7-15.

Haas, W. H., Butler, W. R., Woodley, C. L., and Crawford, J. T. (1993). Mixed-linker polymerase chain reaction : a new method for rapid fingerprinting of isolates of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol.* **31** : 1293-1298.

Harn, H. J., Shen, K. L., Hon, L. I., Yu, K. W., Liu, G. C., Yueh, K. C., and Lee, J. H. (1997). Evidence of transmission of *Mycobacterium tuberculosis* by random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting in Taipei City, Taiwan. *J Clin Pathol.* **50** (6) : 505-508.

Harries, A. D. (1990). Tuberculosis and human immunodeficiency virus infection in developing countries. *Lancet.* **335** : 387-390.

Hawkins, J. E., Wallace, R. J., and Brown, B. A. (1991). *Mycobacterium*. In : *Hausler, W. J., Hermann, K. L., Isenberg, H. D., and Shadomy, H. J. Manual of clinical microbiology.* Washington DC : American Society for Microbiology, **5th ed.** : 1138-1152.

Hermans, P. W., Messadi, F., Guebrexabher, H., van Soolingen, D., de Haas, P. E. W., Heersma, H., de Neeling, H., Ayoub, A., Portaels, F., Frommel, D., Zribi, M., and van Embden, J. D. A. (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.

Hide, M., Bañuls, A. L., and Tibayrenc, M. (2001). Genetic heterogeneity and phylogenetic status of *Leishmania (Leishmania) infantum* zymodeme MON-1 : epidemiological implications. *Parasitology.* **12** : 425-432.

Hilali, F., Ruimy, R., Saulnier, P., Barnabe, C., Lebouguenec, C., Tibayrenc, M., and Andremont, A. (2000). Prevalence of virulence genes and clonality in *Escherichia coli* strains that cause bacteremia in cancer patients. *Infect Immun.* **68** (7) : 3983-3989.

Jaccard, P. (1908). Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull Soc Vaudoise Sci nat.* **44** : 223-270.

Joly, S. (2000). Etude comparative de levures pathogènes du genre *Candida*. Apport d'une approche multidisciplinaire dans la compréhension de la biologie de ces espèces. *Thèse de Doctorat* : Université Montpellier II, Montpellier.

Kamerbeek, J., Schouls, L., Kolk, A., van Agterveld, M., van Soolingen, D., Kuijper, S., Bunschoten, A., Molhuizen, H., Shaw, R., Goyal, M., and van Embden, J. D. (1997). Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol.* **35** (4) : 907-914.

Kato-Maeda, M., Bifani, P. J., Kreiswirth, B. N., and Small, P. M. (2001). The nature and consequence of genetic variability within *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Invest.* **107** (5) : 533-537.

Kermode, M., Crofts, N., Speed, B., Miller, P., Streeton, J. (1999). Tuberculosis infection and homelessness in Melbourne, Australia, 1995-1996. *Int J Tuberc Lung Dis.* **3** (10) : 901-907.

Klein-Lankhorst, R. M., Vermunt, A., Weide, R., Liharska, T., and Zabel, P. (1991). Isolation of molecular markers for tomato (*L. esculentum*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Theor Appl Genet.* **83** : 108-114.

Kluge, A. G. and Farries, J. S. (1969). Quantitative phyletics and the evolution of anurans. *Syst Zool.* **18** : 1-32.

Kremer, K., Van Soolingen, D., Van Embden, J., Hughes, S., Inwald, J., and Hewinson, G. (1998). *Mycobacterium microti* : more widespread than previously thought. *J Clin Microbiol.* **36** (9) : 2793-2794.

Kremer, K., van Soolingen, D., Frothingham, R., Haas, W. H., Hermans, P. W., Martin, C., Palittapongarnpim, P., Plikaytis, B. B., Riley, L. W., Yakrus, M. A., Musser, J. M., and 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** : (8) 2607-2618.

Kulaga, S., Behr, M. A., and Schwartzman, K. (1999). Genetic fingerprinting in the study of tuberculosis transmission. *CMAJ.* **161** (9) : 1165-1169.

Laraqui, C. H., Ottmani, S., Hammou, M. A., Bencheikh, N., and Mahjour, J. (2001). Study of tuberculosis in health care workers in the public sector of Morocco. *Int J Tuberc Lung Dis.* **5** : 939-945.

Laurent, J. P., Barnabé, C., Quesney, V., Noel, S., and Tibayrenc, M. (1997). Impact of clonal evolution on the biological diversity of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology.* **114** : 213-218.

Lazraq, R., El Baghdadi, J., Guesdon, J. L., and Benslimane, A. (1999). Evaluation of IS6110 as amplification target for direct tuberculosis diagnosis. *Pathol Biol.* **47** : 790-796.

Lepeuple, A., Vivien, J. N., and Thibier, R. (1970). Initial bacteriological research in correct ambulatory treatment. *Rev Tuberc Pneumol (Paris).* **34** (5) : 664-665.

Linton, C. J., Jalal, H., Leeming, J. P., and Millar, M.R. (1994). Rapid discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* strains by random amplified polymorphic DNA analysis. *J Clin Microbiol.* **32** (9) : 2169-2174.

MacPherson, J. M., Eckstein, P. E., Scoles, G. J., and Gajadhar, A. A. (1993). Variability of the random amplified polymorphic DNA assay among thermal cyclers, and effects of primer and DNA concentration. *Mol Cell Probes.* **7** : 293-299.

Magdalena, J., Vachee, A., Supply, P., and Locht, C. (1998). Identification of a new DNA region specific for members of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol.* **36** (4) : 937-943.

Mantel, N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* **27** : 209-220.

Maynard Smith, J., Smith, N. H., O'Rourke, M., and Spratt, B. G. (1993). How clonal are bacteria ? *Proc Natl Acad Sci USA.* **90** : 4384-4388.

Mazars, E., Lesjean, S., Banuls, A. L., Gilbert, M., Vincent, V., Gicquel, B., Tibayrenc, M., Locht, C., and Supply, P. (2001). High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proc Natl Acad Sci USA.* **98** (4) : 1901-1906.

McDonough, K. A., Kress, Y., and Bloom, B. R. (1993). Pathogenesis of tuberculosis : interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with macrophages. *Infect Immun.* **61** : 2763-2773.

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

Micheli, M. R., Bova, R., Pascale, E., and D'Ambrosio, E. (1994). Reproducible DNA fingerprinting with the random amplified polymorphic DNA (RAPD) method. *Nucleic Acids Res.* **22** : 1921-1922.

Middleton, A. M., Chadwick, M. V., and Gaya, H. (1997). Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in mixed broth cultures using DNA probes. *Clin Microbiol Infect.* **3** (6) : 668-671.

Morgan, M. A., Horstmeier, C. D., DeYoung, D. R., and Roberts, G. D. (1983). Comparison of a radiometric method (BACTEC) and conventional culture media for recovery of mycobacteria from smear-negative specimens. *J Clin Microbiol.* **18** (2) : 384-388.

Murray, M., and Nardell, E. (2002). Molecular epidemiology of tuberculosis : achievements and challenges to current knowledge. *Bull World Health Organ.* **80** (6) : 477-482.

Musser, J. M., Amin, A., and Ramaswamy, S. (2000). Negligible genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* host immune system protein targets : evidence of limited selective pressure. *Genetics.* **155** (1) : 7-16.

Musser, J. M. (2001). Single nucleotide polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* structural genes. *Emerg Infect Dis.* **7** (3) : 486-488.

Nolte, F. S., Metchock, B., McGowan, J. E. Jr., Edwards, A., Okwumabua, O., Thurmond, C., Mitchell, P. S., Plikaytis, B., and Shinnick, T. (1993). Direct

detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by polymerase chain reaction and DNA hybridization. *J Clin Microbiol.* **31** (7) : 1777-1782.

Orme, I. M. (1998). The immunopathogenesis of tuberculosis : a new working hypothesis. *Trends Microbiol.* **6** (3) :94-97.

O'Rourke, M., and Stevens, E. (1993). Genetic structure of *Neisseria gonorrhoeae* populations : a non-clonal pathogen. *J Gen Microbiol.* **139** : 2603-2611.

Ottmani, S., Laasri, L., Chaulet, P., Dolin, P., Bencheikh, N., Lahlou, A., and Mahjour, J. (1998). La tuberculose et la lutte antituberculeuse au Maroc de 1980 à 1998. *Bull Epidem.* **35** : 2-11.

Parrish, N. M., Dick, J. D., and Bishai, W. R. (1998). Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol.* **6** (3) : 107-112.

Parrot, R., Grosset, J., Augier, J., and Meyer, L. (1976). Le rôle et la place des informations bactériologiques dans l'identification des sources de contagion. *Rev Fr Mal Respir.* **4** : 289-304.

Pasteur, N., Pasteur, G., Bonhomme, F., Catalan, J., and Britton-Davidian, J. (1987). Manuel Technique de Génétique par Electrophorèse des protéines. *Lavoisier Ed Techn Doc.*, Paris, pp 232.

Pfyffer, G. E., Auckenthaler, R., van Embden, J. D., and van Soolingen, D. (1998). *Mycobacterium canettii*, the smooth variant of *M. tuberculosis*, isolated from a Swiss patient exposed in Africa. *Emerg Infect Dis.* **4** (4) : 631-634.

Pineda-Garcia, L., Ferrera, A., and Hoffner, S. E. (1997). DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* strains from patients with pulmonary tuberculosis in Honduras. *J Clin Microbiol.* **35** : 2393-2397.

Poulet, S. and Cole, S. T. (1995). Repeated DNA sequences in mycobacteria. *Arch Microbiol.* **163** : 79-86.

Power, E. G. M. (1996). RAPD typing in microbiology – a technical review. *J Hosp Infect.* **34** : 247-265.

Prugnolle, F., De Meeus, T., Durand, P., Sire, C., and Theron, A. (2002). Sex-specific genetic structure in *Schistosoma mansoni* : evolutionary and epidemiological implications. *Mol Ecol.* **11** (7) : 1231-1238.

Pujol, C., Joly, S., Lockhart, S. R., Noel, S., Tibayrenc, M., and Soll, D. R. (1997). Parity among randomly amplified polymorphic DNA method, multilocus enzyme electrophoresis, and Southern blot hybridization with the moderately repetitive DNA probe Ca3 for fingerprinting *Candida albicans*. *J Clin Microbiol.* **35** (9) : 2348-2358.

Raviglione, M. C., Snider, D. E. Jr, and Kochi, A. (1995). Global epidemiology of tuberculosis : morbidity and mortality of a worldwide epidemic. *JAMA.* **273** (3) : 220-226.

Revollo, S., Oury, B., Laurent, J. P., Barnabe, C., Quesney, V., Carriere, V., Noel, S., and Tibayrenc, M. (1998). *Trypanosoma cruzi*: impact of clonal evolution of the parasite on its biological and medical properties. *Exp Parasitol.* **89** (1) : 30-39.

Richner, S. M., Meiring, J., and Kirby, R. (1997). A study of the genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from patients in the eastern province of South Africa using random amplified polymorphic DNA profiling. *Electrophoresis.* **18** (9) : 1570-1576.

Rogall, T., Wolters, J., Flohr, T., and Böttger, E. C. (1990). Towards a phylogeny and definition of species at the molecular level within the genus *Mycobacterium*. *Int J Syst Bacteriol.* **40** : 323-330.

Ross, B. C., Raios, K., Jackson, K. M., and Dwyer, B. (1992). Molecular cloning of a highly repeated DNA element from *Mycobacterium tuberculosis* and its use as an epidemiological tool. *J Clin Microbiol.* **30** : 942-946.

Ruimy, R., Genauzeau, E., Barnabe, C., Beaulieu, A., Tibayrenc, M., and Andremont, A. (2001). Genetic diversity of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from ventilated patients with nosocomial pneumonia, cancer patients with bacteremia, and environmental water. *Infect Immun.* **69** (1) : 584-588.

Saitou, N. and Nei, M. (1987). The Neighbor-Joining Method : a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* **4** : 406-425.

Salaün, L. (2001). Etude de la structure génétique de l'espèce *Helicobacter pylori* par l'analyse comparative de plusieurs marqueurs moléculaires. *Thèse de Doctorat* : Université Claude Bernard-Lyon I, Lyon.

Salo, W. L., Aufderheide, A. C., Buikstra, J., and Holcomb, T. A. (1994). Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in a pre-Columbian Peruvian mummy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91** (6) : 2091-2094.

Selander, R. K. and Levin, B. R. (1980). Genetic diversity and structure in *Escherichia coli* populations. *Science.* **210** (4469) : 545-547.

Shinnick, T. M., and Good, R. C. (1994). Mycobacterial taxonomy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **13** (11) : 884-901.

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

Small, P. M., Shafer, R. W., Hopewell, P. C., Singh, S. P., Murphy, M. J., Desmond, E., Sierra, M. F., and Schoolnik, G. K. (1993). Exogenous reinfection with multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in patients with advanced HIV infection. *N Engl J Med.* **328** : 1137-1144.

Smittipat, N., and Palittapongarnpim, P. (2000). Identification of possible loci of variable number of tandem repeats in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuber Lung Dis.* **80** (2) : 69-74.

Snider, D. E., Jones, W. D., and Good, R. C. (1984). The usefulness of phage typing *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Am Rev Respir Dis.* **130**: 1095-1099.

Snider Jr., D. E. and Roper, W. L. (1992). The new tuberculosis. *N Engl J Med.* **326** : 703-705.

Sola, C., Horgen, L., Devallois, A. and Rastogi, N. (1998). Combined numerical analysis based on the molecular description of *Mycobacterium tuberculosis* by four repetitive sequence-based DNA typing systems. *Res Microbiol.* **149** : 349-360.

Sola, C., Ferdinand, S., Mammina, C., Nastasi, A., and Rastogi, N. (2001-a). Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Sicily based on spoligotyping and variable number of tandem DNA repeats and comparison with a spoligotyping database for population-based analysis. *J Clin Microbiol.* **39** (4) : 1559-1565.

Sola, C., Filliol, I., Legrand, E., Mokrousov, I., and Rastogi, N. (2001-b). *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** (6) : 680-689.

Sousa, A. O., Salem, J. I., Lee, F. K., Vercosa, M. C., Cruaud, P., Bloom, B. R., Lagrange, P. H., and David, H. L. (1997). An epidemic of tuberculosis with a high rate of tuberculin anergy among a population previously unexposed to tuberculosis, the Yanomami Indians of the Brazilian Amazon. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94** (24) : 13227-13232.

Sreevatsan, S., Pan, X., Stockbauer, K. E., Connell, N. D., Kreiswirth, B. N., Whittam, T. S., and Musser, J. M. (1997). Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc Natl Acad Sci. U S A.* **94** (18) : 9869-9874.

Stevens, J. R. and Tibayrenc, M. (1995). Detection of linkage disequilibrium in *Trypanosoma brucei* isolated from tsetse flies and characterized by RAPD analysis and isoenzymes. *Parasitology.* **110** (2) : 181-186.

Stull, T. L., LiPuma, J. L., and Edlind, T. D. (1988). A broad-spectrum probe for molecular epidemiology of bacteria : ribosomal RNA. *J Inf Dis.* **157** : 280-286.

Sturgill-Koszycki, S., Schlesinger, P. H., Chakraborty, P., Haddix, P. L., Collins, H. L., Fok, A. K., Allen, R. D., Gluck, S. L., Heuser, J., and Russel, D. G. (1994). Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton ATPase. *Science.* **263** : 678-681.

Supply, P., Magdalena, J., Himpens, S., and Locht, C. (1997). Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component system operon. *Mol Microbiol.* **26** (5) : 991-1003.

Supply, P., Mazars, E., Lesjean, S., Vincent, V., Gicquel, B., and Locht, C. (2000). Variable human minisatellites-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol Microbiol.* **36** : 762-771.

Supply, P., Lesjean, S., Savine, E., Kremer, K., van Soolingen, D., and Locht, C. (2001). Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol.* **39** (10) : 3563-3571.

Supply, P., Warren, R. M., Bañuls, A. L., Lesjean, S., Van der spuy, G. D., Lewis, L. A., Tibayrenc, M., van Helden, P. D., and Locht, C. (2002). Linkage disequilibrium between minisatellite loci supports clonal evolution of *Mycobacterium tuberculosis* in a high tuberculosis incidence area (*Mol Microbiol.*, sous presse).

Taylor, G. M., Goyal, M., Legge, A. J., Shaw, R. J., and Young, D. (1999). Genotypic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* from medieval human remains. *Microbiology.* **145** : 899-904.

Thorel, M. F. (1994). La tuberculose et les mycobactérioses. *Bull Soc Vet Prat de France.* **78** (6-7) : 409-422.

Tibayrenc, M., Kjellberg, F., and Ayala, F. J. (1990). A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proc Natl Acad Sci USA.* **87** (7) : 2414-2418.

Tibayrenc, M., Kjellberg, F., Arnaud, J., Oury, B., Brenière, S. F., Dardé, M. L., Ayala, F. J. (1991). Are eukaryotic microorganisms clonal or sexual ? A population genetics vantage. *Proc Natl Acad Sci USA.* **88** : 5129-5133.

Tibayrenc, M., Neubauer, K., Barnabe, C., Guerrini, F., Skarecky, D., and Ayala, F. J. (1993). Genetic characterization of six parasitic protozoa : parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA.* **90** (4) : 1335-1339.

Tibayrenc, M. (1995-a). Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. *Adv Parasitol.* **36** : 47-115.

Tibayrenc, M. (1995-b). Population genetics and strain typing of microorganisms : how to detect departures from panmixia without individualizing alleles and loci. *C R Acad Sci III.* **318** : 135-139.

Tibayrenc, M. (1996). Towards a unified evolutionary genetics of microorganisms. *Annu Rev Microbiol.* **50** : 401-429.

Tibayrenc, M. (1998). Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents : the need for an integrated approach. *Int J Parasitol.* **28** : 85-104.

Tibayrenc, M. (1999). Toward an integrated genetic epidemiology of parasitic protozoa and other pathogens. *Annu Rev Genet.* **33** : 449-477.

Tokunaga, T., Maruyama, Y, and Murohashi, T. (1968). Classification of subtypes of human tubercle bacilli by phage susceptibility. *Am Rev Respir Dis.* **97** : 469-471.

Torrea, G., Levee, G., Grimont, P., Martin, C., Chanteau, S., and Gicquel, B. (1995). Chromosomal DNA fingerprinting analysis using the insertion sequence IS6110 and the repetitive element DR as strain-specific markers for epidemiological study of tuberculosis in French Polynesia. *J Clin Microbiol.* **33** (7) : 1899-1904.

Towner, K., and Grundmann, H. (2001). Generation and analysis of RAPD fingerprinting profiles. In : *Dijkshoorn, L., Towner, K. J., and Struelens, M. New approaches for the generation and analysis of microbial typing data.* Elsevier Sciences B. V., Amsterdam, **1th ed.** : 135-157.

Tyler, K. D., Wang, G., Tyler, S. D., and Johnson, W. M. (1997). Factors affecting reliability and reproducibility of amplification-based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens. *J Clin Microbiol.* **35** : 339-346.

Urdaneta, L., Lal, A., Barnabe, C., Oury, B., Goldman, I., Ayala, F. J., and Tibayrenc, M. (2001). Evidence for clonal propagation in natural isolates of *Plasmodium falciparum* from Venezuela. *Proc Natl Acad Sci USA.* **98** (12) : 6725-6729.

van Embden, J. D., Cave, M. D., Crawford, J. T., Dale, J. W., Eisenach, K. D., Gicquel, B., Hermans, P., Martin, C., McAdam, R., Shinnick, T. M., and Small, P. M. (1993). Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting : recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol.* **31** : 406-409.

van Embden, J. D., van Gorkom, T., Kremer, K., Jansen, R., van Der Zeijst, B. A., and Schouls, L. M. (2000). Genetic variation and evolutionary origin of the direct repeat locus of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *J Bacteriol.* **182** (9) : 2393-2401.

van Soolingen, D., de Haas, P. E., Hermans, P. W., Groenen, P. M., and van Embden, J. D. (1993). Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* **31** : 1987-1995.

van Soolingen, D., de Haas, P. E., Hermans, P. W., and van Embden, J. D. (1994). DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. *Methods Enzymol.* **235** : 196-205.

van Soolingen, D., Qian, L., de Haas, P. E. W., Douglas, J. T., Traore, H., Portaels, F., Qing, H. Z., Enkhsaikan, D., Nymadawa, P., and van Embden, J. D. A. (1995). Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of east Asia. *J Clin Microbiol.* **33** : 3234-3238.

van Soolingen, D., Hoogenboezem, T, De Haas, P. E., Hermans, P. W., Koedam, M. A., Teppema, K. S., Brennan, P. J., Besra, G. S., Portaels, F., Top, J., Schouls, L. M. and van Embden, J. D. (1997). A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, *canetti*: characterization of an exceptional isolate from Africa. *Int J Syst Bacteriol.* **47** (4) : 1236-1245.

Vincent-Levy-Frebault, V., and Portaels, F. (1992). Proposed minimal standards for the genus *Mycobacterium* and for description of new slowly growing *Mycobacterium* species. *Int J Syst Bacteriol.* **42** : 315-323.

Wang, S. X. and Tay, L. (2002). Early identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex in BACTEC cultures by ligase chain reaction. *J Med Microbiol.* **51** (8) : 710-712.

Warren, R., Hauman, J., Beyers, N., Richardson, M., Schaaf, H. S., Donald, P., and van Helden, P. (1996). Unexpectedly high strain diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in a high-incidence community. *S Afr Med J.* **86** : 45-49.

Welsh, J. and McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl Acids Res.*, **18** : 7213-7218.

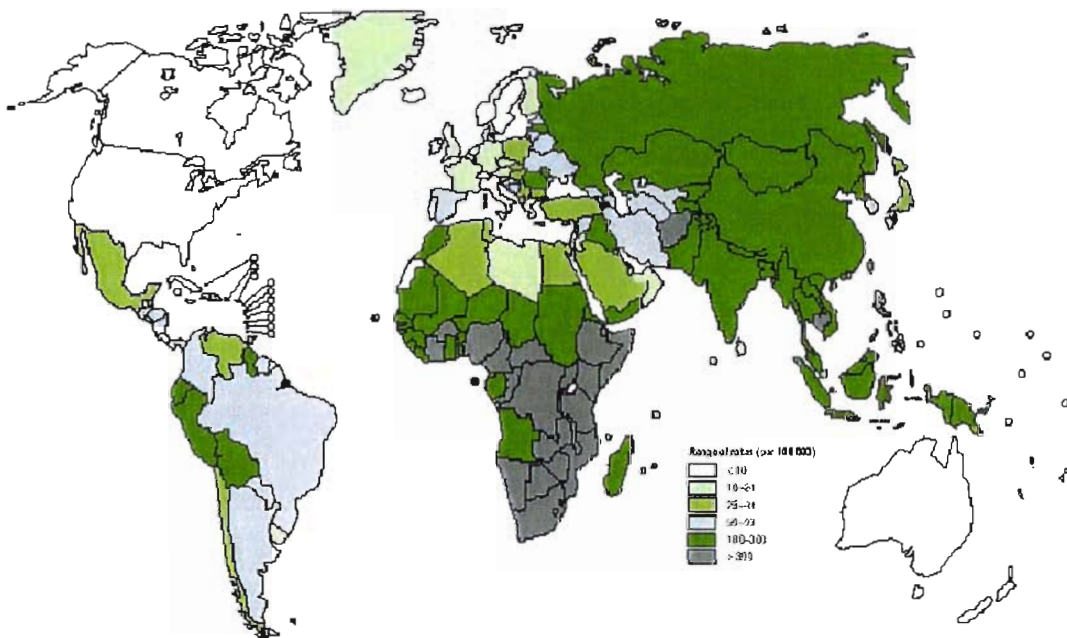
Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., and Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl Acids Res.* **18** : 6531-6535.

Williams, J. G., Hanafey, M. K., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. (1993). Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Meth Enzymol.* **218** : 704-740.

ANNEXES

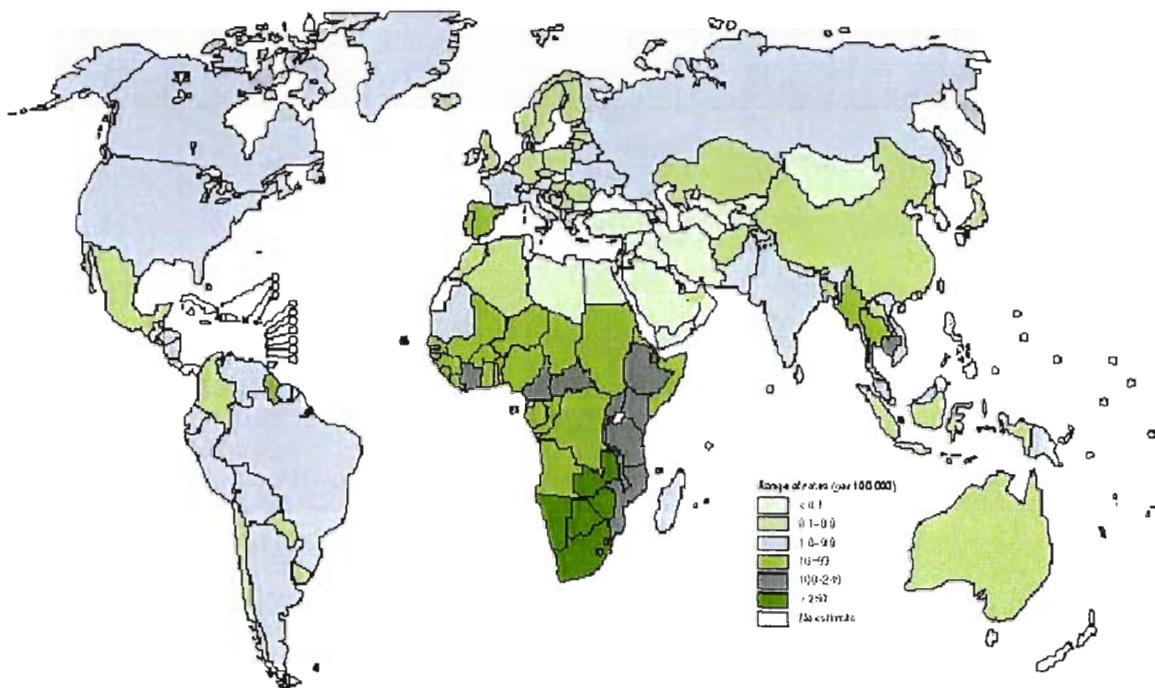
ANNEXE 1:

Incidence de la tuberculose dans le monde (OMS, 2000)



ANNEXE 2:

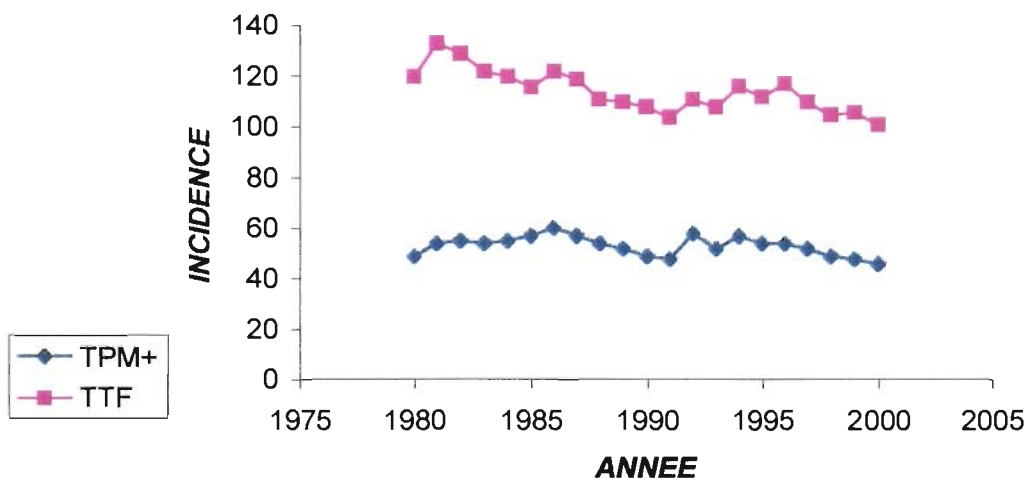
Co-infection VIH-Tuberculose dans le monde (OMS, 2000)



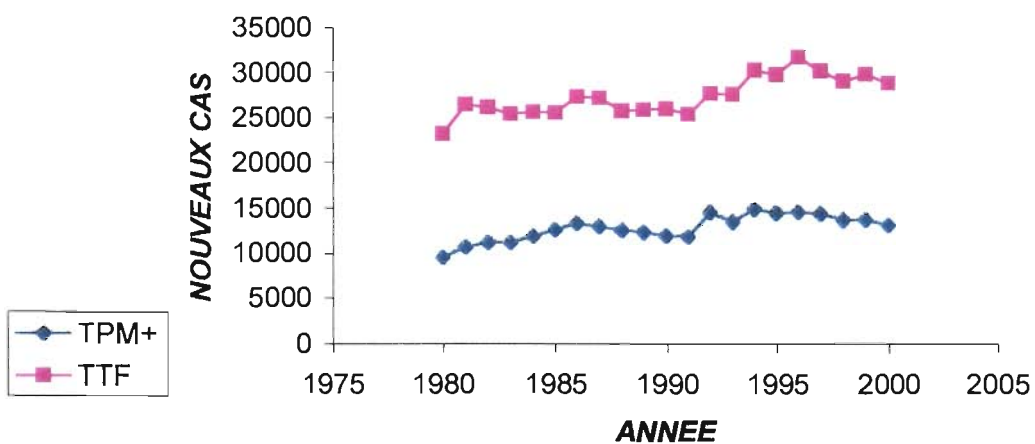
ANNEXE 3:

Evolution de la tuberculose au Maroc (Ministère de la Santé, Rabat)

Incidence de la tuberculose au Maroc (1980-2000)



Nouveaux cas déclarés de tuberculose au Maroc (1980-2000)



TPM+ : Tuberculose pulmonaire à microscopie positive

TTF : Tuberculose toute forme

ANNEXE 4:

Nouveaux cas de tuberculose par forme, sexe, et âge en 1999 (Ministère de la Santé, Rabat)

	0-4		5-9		10-14		15-24		25-34		35-44		45-54		55-64		+65		Total		Total
	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f	
TPM+	5	5	10	13	63	138	2296	1654	2696	1143	1641	691	815	446	559	351	562	332	8647	4773	13420
TPM0C+	1	1	1	2	5	5	28	25	29	22	14	12	7	12	13	12	20	14	118	105	223
TPM0C0	23	19	40	28	57	64	418	333	407	276	278	149	179	119	141	123	186	103	1729	1214	2943
TPM0	24	20	41	30	62	69	446	358	436	298	292	161	186	131	154	135	206	117	1847	1319	3166
TP	29	25	51	43	125	207	2742	2012	3132	1441	1933	852	1001	577	713	486	768	449	10494	6092	16586
PI	197	172	156	187	74	100	46	70	13	30	8	15	1	9	1	3	3	4	499	590	1089
TEP	112	83	230	207	357	363	1875	1778	1193	1605	694	1067	421	629	330	467	409	359	5621	6558	12179
TTF	338	280	437	437	556	670	4663	3860	4338	3076	2635	1934	1423	1215	1044	956	1180	812	16614	13240	29854

Légende:

TPM+ : Tuberculose pulmonaire à microscopie positive

TPM0C+ : Tuberculose pulmonaire à microscopie négative et culture positive

TPM0C0 : Tuberculose pulmonaire à microscopie et culture négatives

TPM0 : Tuberculose pulmonaire à microscopie négative

TP : Tuberculose pulmonaire ;

PI : Primo-infection

TEP : Tuberculose extra-pulmonaire ;

TTF : Tuberculose toute forme

M : sexe masculin ;

f : sexe féminin

ANNEXE 5:***Nouveaux cas déclarés de tuberculose au Maroc
en 1999 (Ministère de la Santé, Rabat)***

PROVINCES ET PREFECTURES	TUBERCULOSE PULMONAIRE			T. EXTRA-PULMONAIRE		TOTAL
	TPM+	TPM0		PI	AUTRES	
		TPM0C+	TPM0C0			
OUED EDDAHAB	20	0	3	0	6	29
BOUJDOUR	9	0	5	0	8	22
LAAYOUNE	75	0	53	1	73	202
GUELMIM	203	0	41	2	52	298
TANTAN	29	0	0	0	4	33
TATA	12	0	0	0	1	13
AGADIR	151	0	8	5	155	319
INEZGANE	386	1	73	20	315	795
OUARZAZATE	132	0	28	4	99	263
TAROUDANT	154	0	17	18	122	311
TIZNIT	89	0	9	4	89	191
KENITRA	723	16	119	15	601	1474
SIDI KACEM	420	0	29	19	312	780
BENSLIMANE	103	1	83	8	134	329
KHOURIBGA	197	1	32	10	195	435
SETTAT	381	1	134	14	334	864
EL KELAA	224	0	84	12	234	554
ESSAOUIRA	137	7	31	6	95	276
MAR-ELHAOUAZ	89	1	5	7	71	173
MAR-MEDINA	122	0	24	12	97	255
MAR-MENARA	175	0	30	28	187	420
MAR-SYBA	111	0	20	2	96	229
CHICHAOUA	90	1	1	12	63	167
BERKANE	132	0	14	11	133	290
FIGUIG	19	0	7	2	29	57
NADOR	281	5	42	5	193	526
OUJDA	215	7	43	12	357	634
CASA HHAC	347	8	126	85	353	919
CASA HMAS	444	2	75	54	400	975
CASA FDS	351	13	40	47	271	722
CASA BMSO	588	2	173	55	728	1546
CASA ANFA	319	10	85	46	273	733

ANNEXE 5 (Suite):

PROVINCES ET PREFECTURES	TUBERCULOSE PULMONAIRE			T. EXTRA-PULMONAIRE		TOTAL
	TPM+	TPM0		PI	AUTRES	
		TPM0C+	TPM0C0			
MOHAMMEDIA	162	2	33	21	89	307
KHEMISSSET	419	0	87	14	319	839
RABAT	331	19	117	61	363	891
SALE	576	11	134	148	611	1480
TEMARA	154	8	38	29	162	391
EL JADIDA	425	0	128	10	305	868
SAFI	417	0	88	12	371	888
AZILAL	103	0	44	4	108	259
BENIMELLAL	389	1	24	24	331	769
KHENIFRA	167	30	1	14	125	337
MEKNES	451	5	74	28	416	974
ERRACHIDIA	111	0	23	8	130	272
IFRANE	43	0	10	1	27	81
BOULEMANE	32	0	6	6	34	78
FES	645	21	396	44	972	2078
SEFROU	96	30	0	4	96	226
AL HOCEIMA	260	2	43	9	130	444
TAOUNATE	116	3	15	0	56	190
TAZA	286	0	33	13	207	539
CHEFCHAOUEN	201	0	18	2	111	332
LARACHE	253	0	39	11	274	577
TANGER	468	15	116	72	554	1225
TETOUAN	587	0	42	38	308	975
TOTAL	13420	223	2943	1089	12179	29854

Légende :

TPM+ : Tuberculose pulmonaire à microscopie positive ; TPM0 : Tuberculose pulmonaire à microscopie négative ; TPM0C+ : Tuberculose pulmonaire à microscopie négative et culture positive ; TPM0C0 : Tuberculose pulmonaire à microscopie et culture négatives ; PI : Primo-infection.

ANNEXE 6:***Estimation des cas de tuberculose toute forme au Maroc
en 1999 (Ministère de la Santé, Rabat)***

REGIONS	NOUVEAUX CAS	%
OUED EDDAHAB LAGOUIRA	29	0,1
LAAYOUNE-BOUJDOUR-SAKIA LHAMRA	224	0,8
GUELMIM-SMARA	344	1,2
SOUSS-MASSA-DRAA	1879	6,3
ELGHARB-CHRARDA-BENHSSINE	2254	7,6
CHAOUIA-OUARDIGHA	1628	5,5
MARRAKECH-TENSIFT-ELHAOUZ	2074	6,9
ORIENTALE	1507	5
GRAND CASABLANCA	5202	17,4
RABAT-SALE-ZEMMOUR-ZAER	3601	12,1
DOUKKALA-ABDA	1756	5,9
TADLA-AZILAL	1028	3,4
MEKNES-TAFILALET	1664	5,6
FES-BOULEMANE	2382	8
TAZA-ALHOCEIMA-TAOUNATE	1173	3,9
TANGER-TETOUAN	3109	10,4
NATIONAL	29854	100

ANNEXE 7:***Estimation des cas de tuberculose pulmonaire à microscopie positive au Maroc en 1999 (Ministère de la Santé, Rabat)***

REGIONS	NOUVEAUX CAS	%
OUED EDDAHAB LAGOUIRA	20	0,1
LAAYOUNE-BOUJDOUR-SAKIA LHAMRA	84	0,6
GUELMIM-SMARA	244	1,8
SOUSS-MASSA-DRAA	912	6,8
ELGHARB-CHRARDA-BENHSSINE	1143	8,5
CHAOUIA-OUARDIGHA	681	5,1
MARRAKECH-TENSIFT-ELHAOUZ	948	7,1
ORIENTALE	647	4,8
GRAND CASABLANCA	2211	16,5
RABAT-SALE-ZEMMOUR-ZAER	1480	11
DOUKKALA-ABDA	842	6,3
TADLA-AZILAL	492	3,7
MEKNES-TAFILALET	772	5,8
FES-BOULEMANE	773	5,8
TAZA-ALHOCEIMA-TAOUNATE	662	4,9
TANGER-TETOUAN	1509	11,2
NATIONAL	13420	100

ANNEXE 8:**Incidence de la tuberculose au Maroc en 1999
(Ministère de la Santé, Rabat)**

REGIONS	INCIDENCE CUMULEE		INCIDENCE	
	ANNEE 1999		TPM+	TTF
	TPM+	TTF		
OUED EDDAHAB	20	29	43,5	63
REGION 1	20	29	43,5	63
BOUJDOUR	9	22	29	71
LAAYOUNE	75	202	43,9	118,1
REGION 2	84	224	41,6	110,9
GUELMIM	203	298	88,3	129,6
TANTAN	29	33	46,8	53,2
TATA	12	13	9,6	10,4
REGION 3	244	344	58,5	82,5
AGADIR	151	319	35	73,8
INEZGANE	386	795	62,1	127,8
OUARZAZATE	132	263	17,5	34,8
TAROUDANT	154	311	20,8	42,1
TIZNIT	89	191	25,1	54
REGION 4	912	1879	31,4	64,7
KENITRA	723	1474	66,8	136,1
SIDI KACEM	420	780	60,8	112,9
REGION 5	1143	2254	64,4	127,1
BENSLIMANE	103	329	45,4	144,9
KHOURIBGA	197	435	40,3	89
SETTAT	381	864	42,1	95,4
REGION 6	681	1628	42	100,4
EL KELAA	224	554	31	76,6
ESSAOUIRA	137	276	31,1	62,7
MAR-ALHAOUZ	89	173	19,5	37,9
MAR-MEDINA	122	255	66,3	138,6
MAR-MENARA	175	420	34,7	83,3
MAR-SYBA	111	229	39,4	81,2
CHICHAOUA	90	167	28	51,9
REGION 7	948	2074	32,6	71,2
BERKANE	132	290	29,2	64,2
FIGUIG	19	57	15,7	47,1
NADOR	281	526	39,8	74,5
OUJDA	215	634	37	109,1
REGION 8	647	1507	34,8	81

ANNEXE 8 (Suite):

REGIONS	INCIDENCE CUMULEE		INCIDENCE	
	ANNEE 1999		TPM+	TTF
	TPM+	TTF		
CASA HHAC	347	919	57,3	151,7
CASA HMAS	444	975	77,8	170,8
CASA FDS	351	722	91,6	188,5
CASA BMSO	588	1546	75,2	197,7
CASA ANFA	319	733	60,5	139,1
MOHAMMEDIA	162	307	33,1	62,7
REGION 9	2211	5202	65,8	154,9
KHEMISSET	419	839	81,5	163,2
RABAT	331	891	50,8	136,7
SALE	576	1480	75,9	195
TEMARA	154	391	51	129,5
REGION 10	1480	3601	66,5	161,7
EL JADIDA	425	868	40,8	83,4
SAFI	417	888	48,1	102,4
REGION 11	842	1756	44,1	92
AZILAL	103	259	21,5	54,2
BENIMELLAL	389	769	41,5	82
REGION 12	492	1028	34,7	72,6
KHENIFRA	167	337	33,3	67,3
MEKNES	451	974	53,4	115,3
ERRACHIDIA	111	272	20	49
IFRANE	43	81	31,4	59,1
REGION 13	772	1664	37,9	81,6
BOULEMANE	32	78	18,7	45,6
SEFROU	96	226	38,6	90,8
FES	645	2078	60,7	195,5
REGION 14	773	2382	52,1	160,6
AL HOCEIMA	260	444	64	109,4
TAOUNATE	116	190	17,7	29,1
TAZA	286	539	38,7	72,9
REGION 15	662	1173	36,8	65,2
CHEFCHAOUEN	201	332	40,8	67,3
LARACHE	253	577	53,7	122,5
TANGER	468	1225	65,9	172,5
TETOUAN	587	975	98	162,8
REGION 16	1509	3109	66,4	136,8
TOTAL	13420	29854	47,5	105,7

Légende : TPM+ : Tuberculose pulmonaire à microscopie positive ; TTF : Tuberculose toute forme.

ANNEXE 9 :**DONNEES RAPDs OBTENUES POUR L'ENSEMBLE DE L'ECHANTILLON DE L'ETUDE (177 stocks)**

Code	U13	U17	R13	U19	N9	U10	U16	U20	R8	A2
1	13-16-20-21	8-17	6	16-19	6-17	14	11	22	12-17-21-24	3-14-25
2	9-16	8	3-6	16-19	6-17	14	11-13	22	12-20	3-11-25
3	16	8	6	16-19	6-17	14	11	22-24	12-13-23	11-25
4	2-16	8	3-6	16-19	6-17	11	11	22	12-19	25
5*	16	8	3-6	16-19	6-17	14	3-11	22	12	3-11-25
5*	16	8	3-6	16-19	6-17	14	3-11	22	12-27	3-11-25
6	16	8-9	3-6	16-19	6-17	14	11	22	12	3-11-25
7	19	8	3-6	16-19	6-17	14	1-11	22	12-13-20	3-5-25
8	16-23	8	3-6	16-19	6-17	14	3-11	22	12-13	14-25
9	16	8	3-6	19	6-17	14	3-11	22	12	14-25
10	16	8	3-6	16-19	6-17	14	1-3-11	22	12	3-11-25
11	16	8	6	19	6-17	14	8-11	22	12	25
12	16	8	3-6	19	6-17	14	1-3-11	22	12	25
13	16	8	3-6	16-19	6-17	14	1-3-11	22	12	3-11-25
14	16	8	3-6	16-19	6-17	14	1-3-11	22	12	3-25
16	16	8	3-6	16-19	6-17	14	1-3-11	22	12	3-25
17	16	8	3-6	16-19	6-17	14	11	22	12	11-25
18	6-16	8	3-6	16-19	6-17	14	1-3-11	22	12	14-25
19	16	8-17-18	6	16-19	6-17	14	4-11	22	12	11-25
20°	16	8	6	16-19	6-17	14	11	15-22	12-20-23	11-25
21°	20	9-17	6	16-19	6-17	14	11	22	12-20-21-23	11-25
22	16	8	3-6	16-19	6-17	14	1-11	19-22	12	25
23	16	8	6	16-19	6-17	14	1-11	22	12	25
24	10-12	8	6	16-19	6-17	14	1-11	22	10-12	25
25°	16	8-9	6	16-19	6-17	14	1-11	22	12	25
26°	16-18	8	6	16-19	6-17	14	16-22	22	12-20	25
27	16-19	8-18	6	16-19	6-17	14	1-11	22	12-20	11-25
28	16-18	8	6	16-19	6-17	14	1-11	22	12-24	11-25

Code	U13	U17	R13	U19	N9	U10	U16	U20	R8	A2
29	12-16	8	6	16-19	6-17	14	1-3-9-10-11	22	10-12-13-21	11-25
30	16	8	6	16-19	6-17	14	1-3-9-11	22	12	25
31	18	8-18	6	16-19	6-13-17	14	1-11-16	22	12-20-24	11-25
32	18-19	8	6	16-19	6-17	14	1-11	13-16-23	12-18-26	11-25
33	19	18	6	16-19	5-6-17	14	11-22	22	12-22	25
34°	16	8	6	16-19	6-17	14	11-23	16-22	12-24	25
35	16-19	8	3-6	16-19	6-17	14	1-11-16	13-16-22	12-20-24	25
36	10-16	8	3-6	16-19	6-17	14	6-9-11	22	12-13	25
37°	10-16-18-19	8-17-18	3-6	16-19	6-17	14	9-11	22	12-20	11-25
38	16	8	3-6	19	6-17	14	1-3-11	22	12	25
39	16	8	3-6	16-19	6-17	8-14	6-9-11	22	13-27	11-25
40	16	8	3-6	16-19	17	14	1-3-9-11	22	12-22	11-25
41*	20	8	3-6	5-6-16-19	6-17	14	2-7-12-16	15	12-24	3-11-14-17-25
41'*	16	8	3-6	5-16-19	6-17	14	1-3-8-11	22	12	3-11-14-25
42	16	8	3-6	19	6-17	14	1-3-11	22	12	25
43	16	8	3-6	16-19	6-17	14	1-3-11	22	12	3-11-25
44	3-8-10-16-20	8-11	3-6-15	16-19	6-17	14	1-2-11-13	19-20-22	2-4-10-12-17-18-20	11-16-22-25
45	14-16-18-19-21	8	3-6	16-19	6-17	14	1-11	22	12	3-11-25
46	16	8	3-6	16-19	6-17	14	1-3-11-19	15-22	12	3-11-25
47	16-20	8	6	16-19	6-17	14	11	15-19-22	12-24	24
48	16	8	3-6	16-19	6-17	14	11	22	12	25
49	16	8	3-6	16-19	6-17	14	9-11	22	12	11-25
50	16	8	3-6	16-19	6-17	14	3-11	19-22	12-20-24-25	3-11-25
51°	16	8	3-6	16-19	6-17	14	3-11	22	12	3-11-25
52°	15	8	3-6	16-19	6-17	14	9-11-16	19	12	11-14-25
53°	16	8	3-6	16-19	6-17	14	1-3-11-17	22	12	3-11-25
54	3-16-18-19	8	6	16-19	6-13-17	14	11	19-22	12	11-25
55°	6-10-12-20	9	7-8-11	9-11-18	8-16-20	9-19	16-22	11	12-18	14
56*	22	8	3-6	5-6-16-19	6-17	14	1-2-4-13	15	12-23	3-14-16-25
56'*	22	8	3-6	5-6-16-19	6-17	14	1-2-4-13	15	12-23	3-14-16-25
57	12-16	8	6	16-19	6-17	14	11	22	12-20	11-25
58°	16	8	3-6	16-19	6-17	14	3-11	22	12-14	25
59	16	8	3-6	16-19	6-17	14	1-3-11	22	12	3-25

Code	U13	U17	R13	U19	N9	U10	U16	U20	R8	A2
60	16	8	3-6-17	16-19	6-8-13-17	14	1-9	20-22-24	12	11-25
61	16	8	3-6	16-19	6-17	14	1-3-11	15-16-22	8-10	11-14
62	16	8	3-6	16-19	6-17	14	1-3-6-11	22-24	12	11-14-25
63	9-16	8	3-6	16-19	6-17	21	1-3-6-11	22	12	14-25
64	16	8	3-6	16-19	6-17	14	1-3-6-11	16-19-22	12	3-11-14-25
65	16	8	3-6	16-19	6-17	14	3-6-11	22	12-21	14-25
66	16	8	3-6	16-19	6-17	14	3-6-11	16-19	12	14
67	16	8	3-6	16-19	6-17	14	1-3-11	22-23	12	14-25
68	16	8	3-6	19	6-17	14	3-6-11	22	12	14-25
69	16	8	3-6	16-19	6-17	14	1-3-11	16-22	12	3-11-25
70	16	8	6	19	6-11-17	14	1-11	20-22	12-26	14-25
71	16	8-9	3-6	16-19	6-17	14	11	16-19-22	12	14-25
72	10-16-19	8	3-6	16-19	6-17	14	1-3-11	16-19-23	12-23	14-25
73	16	8	6	16-19	6-17	14	1-3-11	22	12	11-14-25
74	16	8	3-6	16-19	6-11-17	14	1-3-11-19	15-16-20-22-24	12-27	11-14-25
75	16	8	3-6	19	6-17	14	1-3-6-11	16-19	12	14-25
76	16	8	3-6	16-19	6-17	14	3-6-11	22-24	12	14-25
77	16	8-9	3-6	19	6-17	14	3-6-11	22	12-20	3-14-25
78	16	8	3-6	16-19	6-17	14	3-6-11	22	12	3-11-25
79	16	8	3-6	16-19	6-17	14	1-11	22	12	3-25
80	16	8	3-6	16-19	6-17	14	1-3-11	22	12	3-14-25
81	16	8	6	16-19	6-17	14	1-3-11	22	12	3-14-25
82	16	8	3-6	16-19	6-17	14	1-3-11	22-24	12	14-25
83	16	8	3-6	16-19	6-17	14	1-3-11	22	12	3-14-25
84	16	8	3-6	16-19	6-17	14	1-3-11	19-22	12	3-14-25
85	16	8-18	3-6	19	6-11-17	14	1-3-11	20-22	12-26	3-11-25
86	17	8	3-6	16-19	6-11-17	14	1-3-11	20-22	12-26	3-14-25
87	16	8	3-6	16-19	6-17	14	1-3-11	22	12-17	3-14-25
88	16	8	3-6	19	6-17	14	1-3-11	22	12	3-25
89	17	8	3-6	16-19	6-17	14	1-3-11	22	12	3-11-25
90	16	8	3-6	16-19	6-17	14	1-3-10-11	22	12	11-25
91	16	8	3-6	16-19	6-17	14	1-3-11	16-22	12-27	14-25
92	16	8	6-17	16-19	6-17	14	1-11	22	12	11-14-25

Code	U13	U17	R13	U19	N9	U10	U16	U20	R8	A2
93	16	8	3-6	16-19	6-17	14	1-3-11	22	12	25
94	16	8-11-18	6	16-19	6-11-17	14	1-11	20-22	12-26	14-25
95	16	8-9	3-6	16-19	5-17	14	1-3	22	12	11-25
97	16	8	3-6	16-19	17	14	1-3-11	22	12	3-25
98	3-21	2	6-8	7-9-19	6-15-18	15-17	9-14-19	12	12-24	13
99	8-16	8	3-6	16-19	5-6-17	14	1-3-10-11-16	12-14-15-16-19	8-12-24	11-14-25
100	16	8	3-6	16-19	6-17	14	1-11	12-16-19-22	8-12	14-21-25
101	3-11-16	8	3-6	19	6-13-14-17	14	11-15	10-15-22	12-21	14-25-26
102	16	8	3-6	16-19	6-17	14	1-11	22	12-17	3-11-14-25
103	16	8	3-6	16-19	6-17	14	1-3-11	12-16-22	12	25
104	16	8	3-6	16-19	6-17	14	11	12-22	12	3-25
105	1-16	8	3-6	16-19	6-17	14	11	15-16-19	12-17-20	11-16-25
106	16	8	3-6	16-19	6-17	14	1-3-11	16-19-22	12	3-11-25
107	16	8	3-6	16-19	6-17	14	3-11	19-22	12	11-25
109	16	8	3-6	16-19	6-17	14	3-6-11	22	12	14-25
110	16	8	3-6	16-19	6-17	14	1-3-11	22	12	3-11-14-25
111	16	8	3-6	16-19	6-17	14	3-11	13-22	12	3-14-25
112	16	8	3-6	16-19	6-17	14	1-3-6-11	22	12	3-11-25
113	13-14	12-19	3-6-17	16-19	6-17	9-14	4-6-8-10-11	2-6-12-28	9-17-18-24-28	12-13-25
114	17	8	3-6	16-19	6-17	14	3-6-11	12-22	18	11-25
115	16	8	3-6	16-19	6-17	14	3-6-11	16-19-22	12	3-25
116	16	8	6	16-19	6-17	14	3-6-11	22	12	14-25
117	16	8	3-6	16-19	6-17	14	3-6-11-13	22	12	3-25
118°	16	8	3-6	16-19	6-17	14	3-6-11	7-13-15-19-21-22	12-18	3-25
119*°	16	8	3-6	16-19	6-17	14	3-6-11	19-22	12	3-25
119'*	16	8	3-6	16-19	6-17	14	3-6-11	22	12	3-25
120	16	8	3-6	16-19	6-11-17	14	3-6-11	20-22	12-20	3-11-25
121	16	8	3-6	16-19	6-17	14	3-6-11	19-22	12-16	3-14-25
122	3-17	8-18	3-6	16-19	6-17	6-14	1-3-8-11	21-22	12	3-11-25
123	16-18	8	3-6	16-19	6-17	14	1-3-6-11	22	12	3-11-25
124	16	8	3-6	19	6-17	14	1-3-11	22	12	14-25
125	16	8	3-6	16-19	6-17	14	1-3-11	19-22	12	3-14-25
126*	16	8	3-6	16-19	6-17	14	1-3-11	22	12	3-11-14-25

Code	U13	U17	R13	U19	N9	U10	U16	U20	R8	A2
126*	16	8	3-6	16-19	6-17	14	1-3-11	22	12-24	3-11-14-25
127	16	8	3-6	16-19	6-17	14	3-11	22	12	14-25
128	16	8	3-6	16-19	6-17	14	3-6-11	22	12	3-11-14-25
129	16	8	3-6	16-19	6-17	14	3-11	22	12	3-11-25
130	16	8	3-6	16-19	6-17	14	3-11	22	12	3-11-25
131°	7-16	8	3-6	16-19	6-17	14	1-3-11	22	7-9-12	3-11-25
132°	16	8-9-12-18	3-6	16-19	6-17	14	1-3-11	22	12-26	3-11-14-25
133°	16	8-17	3-6	16-19	6-17	14	1-3-11	22	12	3-11-14-25
134	16	8	3-6	16-19	6-17	14	1-3-11	22	12	3-14-25
135	16	8	3-6	16-19	6-17	14	1-3-11	22	12	14-25
136	16	8	3-6	16-19	6-17	14	1-3-11	22	12	3-11-14-25
137	16	8	3-6	16-19	6-17	14	3-11	19-22	12	14-25
138	16	8	3-6	16-19	6-17	14	3-11	22-24	12	11-14
139	16	8	6	16-19	6-17	14	3-11	16-21-22	12	3-14-25
140	16	8	3-6	16-19	6-17	14	3-11	22	12	3-14-25
141	16	8	3-6	16-19	6-17	14	3-11	22	12	3-11-14-25
142	16	8	3-6	16-19	6-17	14	3-11	22-24	12-25	3-11-14-25
143	16	8	3-6	16-19	6-17	14	1-3-11	16-22	12	3-11-14-25
144	16	8-18	3-6	16-19	6-17	14	1-3-11	22	12	3-11-14-25
145	21	8	3-6	5-6-16-19	1-6-17	14	2-12	15	12-24	3-14-16-25
146	16	8-9	3-6	16-19	6-17	14	3-11	22	12	14-25
147	16-18	8-9	3-6	16-19	6-17	14	3-11	22	12	14-25
148	16	8-9	3-6	16-19	6-17	14	3-11	22-24	12	14-25
149	16	8	3-6	16-19	6-17	14	3-11	22	20	3-11-14-25
150	16	8-18	3-6	16-19	6-17	14	3-11	22-24	12-23	3-11-25
151	16	8	3-6	16-19	6-17	14	3-11	22	12	11-25
152	15	7	18	4-9	5-12-15	6-14	5-10-12-15	10-22	12	2-7-20-23-28
153°	16	8	3-6	16-19	6-17	14	1-3	15-22	12	3-25
M24	11	11-13	3	2-11-17	9-15-19	14	12-15-20	12-22-24	6	10-14-19
M11	11-16-21	17	9	2-11-17	13	19	12-15	16-21-22	9-24	16-27
K5	16-21	8-17	6	16-19	13-17	14	1-12	16-22	9-12	14-25
P101	4-16	8-17	3-6	16-19	6-17	14	3-6-11	22	6-12	3-14-25
P56	19	8-9	6	3-15-16-19	7	14	3-5-11	16-22	12	3-25

Code	U13	U17	R13	U19	N9	U10	U16	U20	R8	A2
P95	6	8	6	16-19	6-17	14	3-6-11	22	12	3-14-25
P54	16	8	3-6	16-19	6-17	14	3-6-11	22	12-17	3-14-25
P55	16	8	3-6	16-19	6-17	14	1-3-6-11	22	12-23	3-14-25
P62	16	8	3-6	16-19	17	14	1-3-6-11	22	12-20	3-14-25
P112	16	8	3-6	16-19	6-17	14	1-3-6-11	22	12-22	14-25
P118	13-16	8	3-6	16-19	6-17	14	1-3-6-11	22	12	14-25
P25	16-21	9-11	2-9	16-19	17	14	11	17-21-22-24	5-28	25
P81	11-13-16	8	3-6	16-19	6-17	14	1-3-6-11	22	9-12	3-25
P125	16-22	8-14	3-6	16-19	6-17	14	1-3-6-11	22	12-17	3-14-25
P129	16	8	3-6	16-19	6-17	14	3-6-11	7-15-22	1-12	3-11-14-25
P131	13-16	8	6	16-19	6-17	14	1-3-5-11	7-15-22	1-12	3-14-25
P33	16-22	8	6	16-19	6-17	14	1-3-6-11	22	12	3-14-25
P48	16-20	8	3-4-6	14-16-19	6-17	14	1-6-11	22	12	3-14-25
PA1	9-15-18	8	3-6	16-19	6-17	14	1-3-11	8-12-22	12	3-25
PA2	11-18	8	3-6	16-19	17	14	11-16	22	12-25	25
PA3	1-7-13-16	8	3-6	16-19	6-17	3-18	3	8-22	12	3-25
H37Rv	16	8-14	3-6	16-19	6-17	14	3-6-11	22	12	25

(*) : Isolats marocains destinés à l'étude de la tuberculose familiale.

(°) : Isolats marocains destinés à l'étude des suivis thérapeutiques.

ANNEXE 10 :**DONNEES MIRU - VNTRs OBTENUES POUR L'ENSEMBLE DE L'ECHANTILLON DE L'ETUDE (177 stocks)**

Code	MIRU2	MIRU4	MIRU10	MIRU16	MIRU20	MIRU23	MIRU24	MIRU26	MIRU27	MIRU31	MIRU39	MIRU40
1*	2	3	3	3	1	5	1	5	3	3	2	2
2*	2	2	4	3	2	5	1	8	2	4	2	4
3*	2	2	4	2	2	6	1	6	3	3	2	1
4*	2	2	3	3	2	5	1	6	3	3	2	4
5*	2	2	4	3	1	5	1	6	2	4	2	3
5*	2	2	4	3	1	5	1	6	2	4	2	3
6*	1	2	3	3	2	6	1	5	3	3	2	5
7*	2	2	3	3	2	5	1	7	3	5	3	3
8*	2	2	5	3	2	3	1	5	3	3	2	3
9*	2	2	5	3	2	3	1	5	3	3	2	2
10*	2	2	4	3	2	6	1	4	3	3	2	3
11*	2	2	5	1	2	5	1	1	3	3	2	2
12*	2	2	5	3	2	3	1	5	3	3	2	3
13*	2	2	4	3	2	6	1	7	3	4	2	4
14*	2	2	3	3	2	5	1	5	3	3	2	5
16*	2	6	3	3	2	5	1	7	3	3	2	6
17*	1	2	4	3	2	7	1	4	3	3	2	6
18*	2	2	5	2	2	5	1	4	3	3	2	3
19*	2	2	4	3	2	6	1	6	3	3	2	1
20°	1	2	3	3	2	6	1	5	3	3	2	5
21°	1	2	3	3	2	6	1	5	3	3	2	5
22*	2	2	5	3	2	3	1	5	3	3	2	3
23*	2	2	4	3	2	5	1	8	2	4	2	4
24*	2	2	5	3	1	3	1	5	3	3	2	2
25°	3	3	3	3	2	5	1	5	3	3	2	2
26°	2	2	3	3	1	5	1	5	3	2	2	3
27*	2	3	4	3	2	5	1	8	2	4	2	4
28*	2	2	4	3	2	6	1	7	3	4	2	4

Code	MIRU2	MIRU4	MIRU10	MIRU16	MIRU20	MIRU23	MIRU24	MIRU26	MIRU27	MIRU31	MIRU39	MIRU40
29*	2	2	3	3	2	6	1	6	3	3	2	1
30*	1	2	6	3	2	5	1	5	3	3	2	3
31*	2	2	3	3	2	6	1	6	3	4	2	4
32*	1	2	3	3	2	6	1	5	3	3	2	5
33*	2	2	4	3	1	6	1	4	3	2	2	10
34*°	1	2	3	3	2	6	1	5	3	3	2	1
35*	2	2	3	3	2	6	1	6	3	4	2	4
36*	2	2	3	4	1	6	1	5	3	3	2	2
37*°	1	2	3	3	2	6	1	5	3	3	2	7
38*	2	2	5	3	2	3	1	5	3	3	2	3
39*	2	2	4	3	2	6	1	4	3	3	2	3
40*	2	2	4	2	2	6	1	5	3	3	2	1
41*♣	1	2	4	3	2	6	1	5	3	3	2	7
41'♣	1	2	4	3	2	6	1	5	3	3	2	7
42*	2	2	5	3	2	3	1	5	3	3	2	3
43*	2	2	4	2	2	6	1	5	3	3	2	3
44*	2	3	4	3	2	3	1	6	3	3	2	3
45*	1	2	4	3	2	7	1	4	3	3	2	6
46*	1	2	4	3	2	7	1	5	1	3	2	6
47*	2	2	3	3	2	5	1	6	3	4	2	4
48*	2	2	5	3	2	3	1	5	3	3	2	3
49*	2	2	4	2	2	6	1	5	3	3	2	1
50*	2	2	4	3	2	5	1	6	3	3	2	3
51°	2	2	3	3	2	4	1	5	3	3	2	4
52°	1	2	4	3	2	10	1	5	3	3	2	2
53°	1	2	4	3	2	10	1	5	3	3	2	2
54	2	2	5	3	1	5	1	6	3	3	2	3
55°	3	3	3	3	2	4	1	5	3	3	2	2
56*°	2	2	3	3	1	4	1	5	3	2	2	3
56'♣	2	2	3	3	1	4	1	5	3	2	2	3
57	2	2	3	4	2	5	1	5	3	3	2	2
58°	2	2	5	3	1	2	1	5	3	3	2	3
59	2	3	3	3	1	4	1	5	3	3	2	2

Code	MIRU2	MIRU4	MIRU10	MIRU16	MIRU20	MIRU23	MIRU24	MIRU26	MIRU27	MIRU31	MIRU39	MIRU40
60	1	2	3	3	2	5	1	5	3	2	2	5
61	2	2	4	2	2	5	1	4	3	3	2	3
62	2	2	4	3	2	4	1	7	2	4	2	4
63	2	2	3	3	2	4	1	6	3	4	2	4
64	1	2	4	3	2	5	1	6	3	3	2	3
65	2	2	3	3	2	4	1	5	3	3	2	3
66	2	2	3	3	2	4	1	5	3	3	2	3
67	2	2	5	3	1	3	1	5	3	3	2	3
68	2	2	5	3	2	3	1	5	3	3	2	3
69	2	2	4	2	2	6	1	5	3	3	1	4
70	2	2	5	3	2	3	1	5	3	3	2	3
71	2	2	5	3	1	3	1	5	3	3	2	2
72	2	2	4	3	2	5	1	5	3	3	2	4
73	1	2	4	3	2	6	1	6	3	3	2	5
74	2	2	4	3	2	6	1	7	3	4	2	1
75	2	2	5	3	2	3	1	5	3	4	2	3
76	2	2	5	3	1	3	1	4	3	3	2	3
77	2	2	5	3	2	3	1	5	3	3	2	3
78	1	2	4	3	2	10	1	5	3	3	2	2
79	2	2	5	1	2	5	1	1	3	3	2	2
80	2	2	3	3	2	5	1	4	3	2	2	4
81	2	2	2	3	2	5	1	5	3	3	2	5
82	2	2	5	3	1	3	1	5	3	3	2	3
83	2	2	5	1	2	5	1	1	3	3	2	2
84	2	2	5	3	1	3	1	5	3	3	2	3
85	2	2	6	2	2	6	1	6	3	3	2	5
86	1	2	3	4	2	5	1	5	3	3	2	2
87	2	2	5	3	1	3	1	5	3	3	2	2
88	2	2	5	3	2	3	1	5	3	3	2	3
89	2	2	2	2	2	6	1	5	3	3	2	4
90	2	2	3	2	2	6	1	5	3	4	2	1
91	2	2	5	3	1	3	1	5	3	3	2	3
92	1	2	3	3	2	7	1	4	3	3	2	6

Code	MIRU2	MIRU4	MIRU10	MIRU16	MIRU20	MIRU23	MIRU24	MIRU26	MIRU27	MIRU31	MIRU39	MIRU40
93	2	2	4	3	1	5	1	5	3	3	2	4
94	2	2	5	3	1	3	1	5	3	3	2	2
95	1	2	3	3	2	6	1	5	3	2	2	5
97	3	3	3	2	1	5	1	5	3	2	2	2
98	2	2	4	3	2	7	1	7	3	3	2	1
99	2	2	4	3	2	7	1	6	2	3	2	5
100	2	2	5	3	2	3	1	5	3	3	1	3
101	2	1	5	1	2	5	1	1	3	3	2	2
102	2	2	4	3	2	4	1	8	3	4	2	2
103	1	2	6	3	2	5	1	5	3	3	2	3
104	2	2	3	3	2	4	1	6	3	3	2	4
105	2	2	4	3	2	6	1	4	3	3	2	3
106	2	2	4	3	2	6	1	4	3	3	2	3
107	2	2	4	3	2	6	1	7	3	4	2	4
109	2	2	3	3	1	5	1	5	3	3	2	3
110	2	2	4	3	2	4	1	8	3	4	2	2
111	2	6	3	4	2	5	1	5	3	3	2	7
112	1	2	3	3	2	6	1	5	3	3	2	8
113	2	3	3	3	1	5	1	5	3	3	2	2
114	2	2	4	3	2	6	1	4	3	3	2	3
115	2	2	3	3	1	3	1	5	3	3	2	2
116	1	2	6	3	2	5	1	5	3	3	2	3
117	2	2	5	3	1	3	1	5	3	3	2	3
118°	2	2	4	3	1	5	1	5	3	3	2	3
119*°	2	2	4	3	1	5	1	5	3	3	2	3
119*♣	2	2	4	3	1	5	1	5	3	3	2	3
120	2	2	4	2	2	6	1	5	3	3	1	4
121	2	2	3	4	2	5	1	5	3	3	2	1
122	2	2	2	2	2	6	1	5	3	3	2	4
123	1	2	5	3	2	7	1	5	3	3	2	7
124	2	2	5	3	2	3	1	5	3	3	2	3
125	2	2	5	3	1	3	1	5	3	3	2	2
126♣	2	2	4	3	2	5	1	8	2	4	2	4

Code	MIRU2	MIRU4	MIRU10	MIRU16	MIRU20	MIRU23	MIRU24	MIRU26	MIRU27	MIRU31	MIRU39	MIRU40
126*	2	2	4	3	2	5	1	8	2	4	2	4
127	2	2	4	3	2	5	1	5	3	3	2	3
128	1	2	4	3	2	6	1	4	3	4	2	6
129	2	2	4	3	2	7	1	6	3	3	2	3
130	2	2	4	3	2	7	1	7	3	3	2	4
131°	2	2	4	3	2	6	1	7	3	4	2	4
132°	2	2	4	3	2	6	1	7	3	4	2	4
133°	2	2	4	3	2	6	1	7	3	4	2	4
134	3	3	3	2	1	5	1	5	3	2	2	2
135	2	2	5	3	1	3	1	5	3	3	2	3
136	2	2	4	3	2	5	1	8	2	4	2	4
137	2	2	4	3	1	3	1	5	3	3	2	2
138	2	2	4	3	2	5	1	6	2	4	2	3
139	2	2	2	3	2	6	1	5	3	3	2	1
140	2	2	5	3	2	3	1	5	3	3	2	3
141	2	2	4	3	2	5	1	6	3	3	2	3
142	1	2	4	4	2	7	1	4	3	3	2	6
143	3	2	4	3	2	6	1	6	3	3	2	1
144	1	4	4	3	2	6	1	5	3	2	2	4
145	3	2	3	1	2	5	1	5	3	3	2	4
146	2	2	5	2	2	5	1	5	3	3	2	2
147	2	2	6	3	1	3	1	5	3	3	2	3
148	2	2	5	3	2	3	1	5	3	3	2	3
149	2	2	4	3	2	7	1	4	3	3	2	2
150	1	2	4	3	2	6	1	5	3	3	2	2
151	2	2	3	3	2	6	1	6	3	4	2	4
152	2	2	3	3	99	5	1	5	3	4	2	4
153°	2	2	3	3	1	5	1	5	3	2	2	3
M24	2	2	2	3	99	5	2	5	3	3	2	2
M11	2	2	3	3	2	5	1	5	3	4	2	3
K5	2	3	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2
P101#	2	2	3	3	2	5	1	5	2	2	2	3
P56#	2	6	7	3	1	4	2	2	2	1	2	2

Code	MIRU2	MIRU4	MIRU10	MIRU16	MIRU20	MIRU23	MIRU24	MIRU26	MIRU27	MIRU31	MIRU39	MIRU40
P95#	2	2	3	3	2	5	1	7	3	5	3	3
P54#	2	3	4	4	2	4	2	2	4	2	2	1
P55#	2	2	6	2	2	5	1	7	3	4	3	3
P62#	2	3	2	2	2	4	2	6	3	3	2	2
P112#	2	2	5	3	1	3	1	5	3	3	2	1
P118#	2	2	5	3	2	5	1	5	3	3	2	3
P25#	2	2	4	2	2	6	1	5	3	3	2	1
P81#	2	6	2	2	1	1	1	5	3	3	2	3
P125#	2	5	4	3	2	6	2	2	3	5	3	4
P129#	1	2	4	3	2	6	1	5	3	2	2	6
P131#	2	1	5	4	2	4	2	5	3	5	2	2
P33#	2	2	3	3	1	5	1	4	3	4	2	3
P48#	3	2	3	2	1	2	6	3	2	4	2	8
PA1#	2	2	6	2	2	4	2	4	3	5	2	1
PA2#	2	2	4	4	2	4	2	4	4	2	2	1
PA3#	2	3	4	4	2	4	2	4	4	2	2	1
H37Rv#	2	3	3	2	2	6	1	3	3	3	2	1

(♣) : Isolats marocains destinés à l'étude des suivis thérapeutiques.

(*) : Isolats marocains analysés sur séquenceur automatique.

(°) : Isolats marocains destinés à l'étude de la tuberculose familiale.

(#) : 19 stocks de référence préalablement analysés sur séquenceur automatique (Supply *et al.*, 2001).

(99) : Données manquantes.

ANNEXE 11 :**DONNEES MIRU – VNTRs OBTENUES POUR LA POPULATION FRANCAISE**
DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

Code	MIRU2	MIRU4	MIRU10	MIRU16	MIRU20	MIRU23	MIRU24	MIRU26	MIRU27	MIRU31	MIRU39	MIRU40
8	2	5	4	3	2	6	2	2	3	6	2	2
16	2	4	4	2	2	6	2	2	3	5	3	2
77	2	5	4	3	2	5	2	2	3	5	3	3
88	2	5	4	2	2	5	2	2	3	5	3	4
102	2	5	4	3	2	6	2	2	3	3	3	4
9	2	5	4	3	2	6	2	2	3	4	4	4
106	2	6	5	3	2	5	2	2	4	5	3	3
110	2	7	5	3	2	5	2	2	3	5	3	3
68	2	2	3	3	1	5	1	5	3	3	2	3
47	2	2	3	2	1	5	1	5	3	3	2	1
27	2	2	3	2	1	5	1	5	3	3	2	4
40	2	2	3	3	1	5	1	5	3	3	2	3
55	1	2	3	3	2	5	1	5	3	3	2	4
31	2	2	3	4	2	5	1	2	3	3	2	2
57	2	2	3	2	2	5	1	5	3	3	2	3
72	2	2	3	3	2	5	1	4	4	3	2	4
25	2	2	3	3	2	5	1	5	3	2	2	4
74	2	2	3	3	2	5	1	4	3	3	2	6
105	2	2	4	3	2	5	1	5	4	2	2	3
24	2	2	3	3	2	6	1	5	3	3	2	1
37	2	2	2	3	2	5	1	6	3	3	2	4
98	2	2	5	3	2	5	1	5	3	3	2	2
79	2	2	5	3	1	3	1	5	3	3	2	3
42	2	2	5	3	2	3	1	5	3	3	2	3
43	2	2	3	2	2	6	1	4	3	3	2	1
50	2	2	4	3	2	5	1	10	3	4	2	2
26	2	2	4	3	2	5	1	8	2	4	2	5
17	2	2	3	2	2	6	1	6	3	3	2	1

Code	MIRU2	MIRU4	MIRU10	MIRU16	MIRU20	MIRU23	MIRU24	MIRU26	MIRU27	MIRU31	MIRU39	MIRU40
58	2	2	3	2	2	5	1	5	3	3	2	1
15	2	2	5	3	1	3	1	5	3	3	2	2
87	2	2	5	3	1	3	1	5	3	3	2	3
51	2	2	3	3	2	6	1	5	3	3	2	4
30	2	3	5	3	2	3	1	5	3	3	2	3
32	2	2	5	2	2	5	1	5	3	3	2	4
34	2	2	5	3	2	5	1	5	3	3	2	3
5	2	3	4	3	2	3	1	4	3	3	2	3
4	2	2	5	3	1	3	1	5	3	2	2	1
92	2	2	3	3	2	4	1	4	3	3	2	4
69	2	2	8	2	2	5	1	1	3	3	1	2
53	2	2	8	2	2	5	1	1	3	3	1	2
71	2	2	8	2	2	5	1	1	3	3	1	2
111	2	2	8	2	2	5	1	1	3	3	1	2
11	2	2	3	2	2	2	1	5	3	3	2	3
6	2	2	3	2	2	2	1	5	3	3	2	3
950782	2	2	5	3	1	3	1	5	3	3	2	3
980875	2	1	4	1	2	5	1	1	3	3	2	2
980031	2	2	3	4	2	5	1	6	3	3	2	2
950911	2	2	3	3	2	5	1	7	3	3	2	4
971045	2	2	4	1	2	6	1	2	2	3	2	1
960288	2	2	5	3	1	3	1	5	3	3	2	3
951591	2	2	3	4	2	5	1	5	3	3	2	2
980035	2	2	3	3	2	5	1	5	2	3	2	3
971449	2	2	5	3	2	5	1	5	3	3	2	3

ANNEXE 12 :**DONNEES MIRU – VNTRs OBTENUES POUR LA POPULATION SUD-AFRICAINE**
DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

Code	MIRU2	MIRU4	MIRU10	MIRU16	MIRU20	MIRU23	MIRU24	MIRU26	MIRU27	MIRU31	MIRU39	MIRU40
1	2	3	3	3	2	5	1	5	3	3	2	4
2	2	3	3	3	2	5	1	5	3	3	2	4
4	2	2	2	3	2	5	1	7	3	5	4	3
13	2	2	3	3	2	5	1	7	3	5	4	3
30	2	2	4	3	2	6	1	5	3	3	2	3
37	2	2	3	2	2	5	1	4	3	4	2	4
51	1	2	6	3	2	6	1	5	3	3	2	4
68	2	2	4	2	2	6	1	5	3	3	2	1
82	2	2	3	3	2	5	1	4	3	3	2	3
95	2	2	8	4	2	5	1	5	3	1	3	2
97	2	2	3	3	2	5	1	5	3	3	2	3
116	2	2	4	3	2	6	1	5	3	3	2	3
129	2	0	3	3	2	5	1	7	3	5	3	3
136	3	3	3	3	2	5	1	4	3	3	2	4
141	2	2	2	3	2	5	1	7	4	5	4	3
172	2	2	4	3	2	5	1	2	3	4	2	2
181	2	2	4	3	2	5	1	2	3	4	2	2
191	2	2	2	3	2	5	1	7	3	5	4	3
196	2	2	5	3	2	3	1	5	3	3	2	3
208	2	2	4	3	2	6	1	5	3	3	2	4
210	2	2	3	3	2	5	1	5	3	3	2	3
211	3	3	3	2	2	5	1	4	3	3	2	5
238	2	0	3	3	2	5	1	7	3	5	3	3
245	2	2	5	3	2	5	1	5	3	2	2	3
252	2	0	3	3	2	5	1	7	3	5	3	3
257	2	2	5	3	1	3	1	5	3	3	2	3

Code	MIRU2	MIRU4	MIRU10	MIRU16	MIRU20	MIRU23	MIRU24	MIRU26	MIRU27	MIRU31	MIRU39	MIRU40
258	2	2	3	3	2	5	1	4	3	3	2	3
260	2	2	3	3	2	6	1	5	3	2	2	4
282	2	2	4	3	2	6	1	5	3	3	2	4
298	2	2	4	3	2	5	1	5	3	3	2	2
299	2	3	3	3	2	5	1	5	3	3	2	4
309	2	2	2	3	2	5	1	7	3	5	4	3
311	2	2	4	3	2	6	1	5	3	3	2	3
313	2	2	2	3	2	5	1	7	3	5	4	3
318	2	2	3	3	2	5	1	7	3	5	4	3
326	2	3	3	3	2	5	1	5	3	3	2	4
330	3	3	3	2	2	5	1	4	3	3	2	5
337	2	2	3	1	2	5	1	5	3	3	2	4
352	2	2	4	3	2	6	1	5	3	3	2	3
354	2	2	3	3	2	5	1	8	3	5	3	3
355	2	2	4	3	2	5	1	5	3	3	2	2
365	2	3	3	2	2	5	1	4	3	3	2	4
367	2	3	3	3	2	5	1	4	3	3	2	4
399	2	3	3	3	2	5	1	5	3	2	2	4
401	2	2	2	3	2	6	1	5	3	3	2	3
411	2	3	3	3	2	5	1	5	2	3	2	4
413	2	3	4	3	2	5	1	3	3	3	2	3
417	2	2	5	3	2	5	1	5	3	2	2	3
423	2	3	3	3	2	5	1	5	3	3	2	4
433	2	5	3	3	2	5	1	5	3	3	2	5
436	2	2	4	3	2	5	1	5	3	3	2	4
439	2	2	2	3	2	5	1	7	3	5	4	3
441	3	3	3	2	2	5	1	4	3	3	2	4
460	2	3	3	3	2	5	1	5	3	2	2	4
469	2	2	2	3	2	5	1	7	3	5	4	3
477	2	2	3	3	2	6	1	5	3	3	1	1
478	2	2	3	1	2	5	1	4	3	3	2	4
480	2	3	3	3	2	5	1	5	3	3	2	4
483	2	2	5	1	2	5	1	1	3	3	2	2

Code	MIRU2	MIRU4	MIRU10	MIRU16	MIRU20	MIRU23	MIRU24	MIRU26	MIRU27	MIRU31	MIRU39	MIRU40
484	2	2	1	3	2	6	1	5	3	3	2	3
492	2	2	3	3	2	5	1	5	3	3	2	5
524	3	3	5	3	2	5	1	4	3	3	2	4
535	2	2	4	3	2	5	1	5	3	3	2	2
539	2	2	4	3	2	6	1	7	3	3	2	3
553	2	0	3	3	2	5	1	7	3	5	3	3
554	2	3	2	3	2	5	1	6	3	4	2	3
567	2	2	5	3	2	5	1	5	3	3	2	3
589	2	2	3	3	2	5	1	4	3	5	2	3
590	2	2	2	3	2	5	1	7	3	5	4	3
591	2	2	5	1	2	5	1	1	3	3	2	2
594	2	3	4	2	2	5	1	5	3	3	2	3
595	2	2	5	3	2	5	1	5	3	2	2	3
598	2	2	4	1	2	5	1	8	3	3	3	3
601	2	2	3	2	2	6	1	5	3	4	2	1
603	2	2	8	4	2	6	1	5	2	1	1	1
630	2	2	3	3	2	5	1	5	3	3	3	2
640	2	2	4	3	2	6	1	4	3	3	3	1
651	2	2	4	3	2	5	1	4	3	3	2	5
652	2	2	3	1	2	5	1	1	3	3	2	2
656	2	2	6	3	2	5	1	5	3	3	2	4
660	2	2	4	3	2	5	1	5	3	3	2	4
672	1	2	4	3	2	6	1	5	3	2	2	4
679	1	2	3	3	2	6	1	5	3	2	2	4
680	2	2	5	3	2	3	1	5	3	3	2	4
682	2	2	5	3	2	6	1	5	3	3	2	3
698	2	0	3	3	2	5	1	7	3	5	3	3
706	2	2	3	1	2	5	1	5	3	3	2	2
712	2	2	5	3	2	3	1	4	3	4	2	2
713	2	2	4	3	2	6	1	5	3	2	2	5
722	2	2	4	3	2	6	1	5	3	3	2	4
736	2	2	4	3	2	5	1	4	3	3	2	4
738	2	2	4	3	2	6	1	5	3	3	2	3

Code	MIRU2	MIRU4	MIRU10	MIRU16	MIRU20	MIRU23	MIRU24	MIRU26	MIRU27	MIRU31	MIRU39	MIRU40
746	1	2	2	3	2	6	1	5	3	5	2	4
752	2	2	3	2	2	5	1	7	3	3	4	3
753	2	2	3	2	2	2	1	5	3	3	2	3
769	2	2	4	3	2	6	1	5	3	3	2	3
771	2	2	5	3	2	3	1	5	3	3	2	3
772	2	1	4	3	2	6	1	3	3	3	2	3
785	2	0	3	3	2	5	1	7	3	5	3	3
795	2	2	2	3	2	5	1	7	3	5	4	3
796	2	2	4	3	2	6	1	5	3	3	2	3
803	2	2	5	3	2	5	1	5	3	2	2	3
804	2	2	4	3	2	6	1	5	3	3	2	3
818	2	2	4	1	2	6	1	5	2	3	2	1
823	2	2	2	3	2	5	1	7	3	5	4	3
839	2	2	4	3	1	3	1	7	3	2	2	1
848	2	2	3	2	2	6	1	5	3	3	2	1
897	2	2	4	3	2	6	1	5	3	3	2	3
898	1	2	4	3	2	6	1	5	3	3	2	4
902	2	2	4	3	2	6	1	5	3	3	2	3
915	2	2	4	3	2	6	1	5	3	3	2	3
917	2	2	4	3	2	6	1	5	3	1	2	4
920	2	2	5	3	1	3	1	5	3	3	2	3
928	2	2	4	3	2	6	1	5	3	3	2	3
935	2	2	5	3	1	3	1	5	3	3	2	3
950	2	2	4	3	2	6	1	5	3	3	2	3
955	2	2	4	3	2	6	1	5	3	3	2	3
958	2	2	4	3	2	5	1	5	3	3	2	4
976	2	2	3	3	2	5	1	5	3	3	2	3
993	2	2	2	3	2	5	1	7	4	5	4	3
1007	2	2	4	3	2	6	1	5	2	3	2	3
1008	2	2	4	3	2	5	1	3	3	3	2	4
1010	1	2	4	3	2	6	1	5	3	2	2	4
1013	2	2	4	3	2	6	1	4	3	3	2	3
1015	2	2	2	3	2	5	1	7	3	5	4	3

Code	MIRU2	MIRU4	MIRU10	MIRU16	MIRU20	MIRU23	MIRU24	MIRU26	MIRU27	MIRU31	MIRU39	MIRU40
1016	2	2	3	4	2	5	1	5	3	3	2	2
1029	1	2	4	3	2	6	1	5	3	2	2	4
1030	2	3	3	3	2	5	1	5	3	2	2	4
1038	2	3	3	3	2	5	1	5	3	2	2	4
1039	1	2	4	3	2	6	1	5	3	2	2	2
1045	2	2	3	2	2	6	1	5	3	3	2	1
1057	2	2	4	3	2	5	1	7	3	5	3	3
1066	2	2	4	3	2	6	1	5	3	3	2	3
1079	2	2	4	3	2	6	1	5	3	3	2	3
1081	2	2	2	3	2	5	1	7	3	5	4	3
1084	2	2	4	3	2	6	1	5	3	3	2	3
1093	2	2	3	3	2	6	1	5	3	3	2	1
1103	2	2	4	3	2	5	1	2	3	4	2	2
1105	2	2	4	3	2	6	1	5	3	3	2	3
1112	2	2	8	3	2	5	1	6	3	4	2	1
1114	2	2	4	3	2	5	1	2	3	4	2	2
1127	2	2	4	3	2	5	1	4	3	3	2	5
1145	2	2	4	3	2	3	1	5	3	3	2	3
1170	2	2	2	3	2	5	1	7	3	3	4	3
1172	2	2	4	3	2	5	1	2	3	4	2	2
1189	2	2	3	3	2	5	1	7	3	5	4	4
1194	2	2	5	3	2	5	1	5	4	3	2	2
1207	2	2	4	3	2	5	1	5	3	3	2	4
1222	2	2	4	3	2	6	1	5	3	3	2	3
1236	2	2	4	3	2	5	1	5	3	3	2	4
1254	2	2	4	3	2	6	1	5	3	3	2	3
1256	2	2	4	1	2	6	1	2	2	3	2	1
1286	2	2	4	3	2	5	1	4	2	3	2	4
1295	2	2	4	3	2	6	1	5	3	3	2	3
1300	2	2	4	3	2	6	1	6	3	3	2	3
1305	2	2	3	1	2	5	1	6	3	3	2	4
1313	2	2	4	2	2	6	1	5	3	3	2	3
1314	2	2	4	3	2	6	1	5	2	3	2	3

Code	MIRU2	MIRU4	MIRU10	MIRU16	MIRU20	MIRU23	MIRU24	MIRU26	MIRU27	MIRU31	MIRU39	MIRU40
1317	2	2	4	1	2	6	1	5	2	3	2	1
1320	2	2	4	3	2	6	1	5	3	1	2	4
1324	2	2	4	3	2	6	1	5	3	3	2	3
1331	2	2	4	3	2	6	1	5	3	3	2	3
1370	2	2	4	3	2	6	1	5	3	1	2	6
1379	2	2	3	1	2	5	1	5	3	3	2	5
1382	2	2	2	3	2	5	1	7	3	5	4	3
1397	2	2	4	3	2	6	1	4	2	2	2	4
1461	2	2	4	3	2	5	1	7	3	5	3	3
1488	2	2	5	3	1	3	1	5	3	3	2	3
1509	2	2	5	3	1	3	1	5	3	3	2	3
1515	2	2	2	3	2	5	1	7	3	5	4	3
1516	2	2	3	3	2	5	1	5	3	4	2	3
1537	2	2	2	3	2	5	1	7	3	5	4	3
1555	2	2	2	3	2	5	1	7	3	5	4	3
1558	2	2	4	3	2	6	1	5	3	3	2	3
1567	2	2	4	3	2	6	1	5	3	3	2	3
1587	2	2	5	3	2	5	1	5	3	3	2	3
1588	2	2	2	3	2	5	1	7	3	5	4	3
1590	2	2	3	1	2	5	1	4	3	3	2	4
1597	2	2	3	3	2	6	1	4	3	3	2	6
1609	2	2	2	3	2	5	1	3	3	5	4	3
1658	2	2	4	3	2	5	1	2	3	4	2	2
1681	2	2	4	3	2	5	1	5	3	3	2	3
1682	2	2	4	3	2	6	1	5	3	3	2	3
1693	2	2	5	3	2	5	1	5	3	3	2	3
1733	2	2	3	2	2	6	1	3	3	3	2	1
1736	2	2	2	3	2	5	1	7	3	5	4	3
1757	1	2	4	3	2	6	1	5	3	2	2	4
1762	2	2	4	3	2	5	1	5	3	3	2	4
1774	2	2	4	3	2	6	1	5	3	3	2	3
1779	2	2	2	3	2	5	1	7	3	5	4	3
1781	2	2	3	3	2	6	1	5	3	3	2	1

Code	MIRU2	MIRU4	MIRU10	MIRU16	MIRU20	MIRU23	MIRU24	MIRU26	MIRU27	MIRU31	MIRU39	MIRU40
1789	2	3	4	3	2	5	1	5	3	3	2	5
1810	2	2	4	3	2	6	1	5	3	3	2	3
1821	2	2	2	3	2	5	1	7	3	5	4	3
1827	2	2	5	3	1	3	1	5	3	3	2	3
1830	2	2	4	3	2	6	1	5	3	3	2	4
1838	2	2	3	3	2	6	1	5	3	3	2	1
1851	1	2	4	3	2	6	1	5	3	2	2	4
1892	2	2	3	3	2	5	1	7	4	5	3	3
1902	2	2	4	3	2	5	1	5	3	3	2	3
1904	2	2	4	3	2	5	1	5	3	3	2	3
1925	2	2	4	3	2	6	1	5	3	3	2	4
1937	2	2	5	3	2	5	1	5	3	2	2	3
1949	2	2	2	3	2	5	1	7	3	5	4	3
1955	2	2	4	1	2	6	1	5	2	3	2	1
1956	2	2	5	1	2	6	1	3	2	2	2	5
1997	2	2	4	3	2	6	1	5	3	3	2	3
2000	2	2	4	1	2	6	1	5	2	3	2	1
2038	2	3	4	3	2	5	1	5	3	3	2	3

ANNEXE 13 :**DONNEES MIRU – VNTRs OBTENUES POUR LA COLLECTION DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS****DE L'INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE PUBLIQUE ET DE L'ENVIRONNEMENT DE BILTHOVEN,****HOLLANDE (Kremer et al., 1999 ; Supply et al., 2001)**

Code	MIRU4	MIRU26	MIRU40	MIRU10	MIRU16	MIRU31	MIRU2	MIRU23	MIRU39	MIRU20	MIRU24	MIRU27	N° article*	Caractéristiques
K1	2	5	1	5	3	3	2	3	1	1	1	3	1	
K4	2	4	3	3	3	4	2	5	2	1	1	3	4	Africa
K7	2	5	4	4	3	2	1	5	2	2	1	3	7	Latin-American-Mediterranean-like
K8	2	5	3	4	3	3	2	5	2	2	1	3	8	Haarlem
K10	2	5	1	4	2	3	2	6	2	2	1	3	10	Latin-American-Mediterranean
K11	6	5	3	2	2	3	2	1	2	1	1	3	11	
K12	2	5	3	3	3	2	2	5	2	2	1	2	12	
K13	2	5	3	5	3	3	2	5	2	2	1	3	13	Haarlem
K14	2	7	3	3	3	5	2	5	4	2	1	3	14	W-Beijing
K15	2	2	3	2	3	3	2	5	1	2	1	3	15	
K16	3	5	5	3	3	3	2	5	2	2	1	3	16	
K17	6	5	4	2	2	3	3	1	2	1	1	3	17	
K18	2	5	4	4	2	3	2	6	2	2	1	3	18	Latin-American-Mediterranean
K19	2	5	2	6	4	5	2	5	3	2	1	3	19	
K20	2	7	3	3	3	6	2	5	3	2	1	3	20	W-Beijing
K21	5	2	3	4	3	6	2	6	4	1	2	3	21	East-African-Indian
K23	2	5	4	4	2	2	1	3	2	2	1	3	23	Latin-American-Mediterranean-like
K26	2	5	1	4	3	2	2	5	2	1	1	3	26	
K27	2	4	4	3	3	3	2	5	2	2	1	3	27	
K28	2	5	3	5	3	2	2	5	2	2	1	3	28	Haarlem
K29	2	5	3	5	3	3	2	5	2	2	1	3	29	Haarlem-like
K30	2	8	3	3	3	5	2	5	3	2	1	3	30	W-Beijing
K31	2	5	3	2	3	3	2	5	2	2	1	3	31	
K33	2	5	3	5	3	3	2	3	2	2	1	3	33	Haarlem
K34	2	7	3	3	3	5	2	5	3	2	1	3	34	W-Beijing
K35	2	5	4	3	3	4	2	5	2	2	1	4	35	Africa

Code	MIRU4	MIRU26	MIRU40	MIRU10	MIRU16	MIRU31	MIRU2	MIRU23	MIRU39	MIRU20	MIRU24	MIRU27	N° article*	Caractéristiques
K36	4	2	2	4	3	5	2	6	2	2	2	3	36	East-African-Indian
K37	2	4	3	3	3	4	2	5	2	1	1	3	37	Africa
K38	2	5	5	4	3	3	2	5	2	2	1	3	38	
K40	2	3	3	3	3	3	2	5	2	2	1	3	40	Africa
K41	2	3	1	3	3	3	2	6	2	2	1	3	41	Latin-American-Mediterranean
K42	2	5	6	4	3	2	1	6	2	2	1	3	42	Latin-American-Mediterranean-like
K43	2	7	3	3	3	5	2	5	3	2	1	3	43	W-Beijing
K44	2	5	3	3	3	5	2	5	3	2	1	3	44	W-Beijing
K45	2	5	4	3	3	5	2	5	4	1	1	3	45	W-Beijing
K46	2	5	3	4	2	3	2	7	2	2	1	3	46	Latin-American-Mediterranean
K49	2	1	4	8	3	4	2	5	3	2	1	3	49	
K50	2	5	3	5	3	3	2	5	2	2	1	3	50	Haarlem
K51	2	5	3	5	3	3	2	5	2	2	1	3	51	Haarlem
K53	2	5	1	5	3	3	2	3	2	1	1	3	53	Haarlem
K54	2	7	2	3	3	5	2	5	3	2	1	3	54	W-Beijing
K56	2	5	4	5	3	2	2	5	2	2	1	3	56	
K58	2	5	3	6	3	3	2	5	2	2	1	3	58	Haarlem
K60	2	5	3	5	3	3	2	5	2	2	1	3	60	Haarlem
K63	2	5	4	5	3	3	2	3	2	1	1	3	63	Haarlem
K65	5	2	3	4	3	6	2	6	1	2	2	3	65	East-African-Indian
K66	2	3	3	4	3	3	2	6	2	2	1	3	66	Latin-American-Mediterranean
K67	5	2	3	4	3	6	2	10	3	2	2	3	67	East-African-Indian
K72	2	4	3	3	3	5	2	5	3	2	1	3	72	Africa
K74	5	2	4	4	3	5	2	6	3	2	2	3	74	East-African-Indian
K77	2	5	3	5	3	3	2	3	2	2	1	3	77	Haarlem-like
K82	3	4	4	3	3	3	2	5	2	2	1	3	82	
K86	2	5	3	5	3	3	2	5	2	2	1	3	86	Haarlem
K87	2	4	3	3	3	3	2	5	2	2	1	3	87	Haarlem
K88	2	1	3	7	2	2	2	5	2	2	1	3	88	
K90	2	7	3	3	3	2	2	5	3	2	1	3	90	
K93	5	2	3	4	3	6	2	11	3	2	2	3	93	East-African-Indian
K95	2	5	1	4	2	3	2	6	2	2	1	3	95	Latin-American-Mediterranean
K96	2	5	2	3	1	3	2	5	2	2	1	3	96	
K97	1	2	3	3	3	4	2	5	2	1	1	3	97	Africa
K98	2	6	1	4	2	3	2	6	2	2	1	3	98	Latin-American-Mediterranean

Code	MIRU4	MIRU26	MIRU40	MIRU10	MIRU16	MIRU31	MIRU2	MIRU23	MIRU39	MIRU20	MIRU24	MIRU27	N° article*	Caractéristiques
K103	2	5	3	2	3	2	2	5	2	2	1	3	103	
K111	2	7	3	3	4	5	2	5	3	2	1	3	111	W-Beijing-like
K112	2	7	2	6	4	5	2	5	3	2	1	3	112	
K116	2	3	8	3	2	4	3	2	2	1	6	2	116	<i>M. canettii</i>
K118	2	3	3	4	2	2	2	6	2	2	1	4	118	Latin-American-Mediterranean
K120	2	5	2	3	3	5	2	5	2	2	1	3	120	Africa
K121	2	5	3	3	3	4	2	5	2	2	1	3	121	Africa
K123	3	4	4	5	3	3	2	6	2	2	1	3	123	Haarlem

(*) : Code des stocks dans Kremer *et al.*, (1999).

ANNEXE 14 : Communication orale

Student Roundtable (MEEGID VI, 24-27 Juillet 2002, Paris)

Tuberculosis in Casablanca, Morocco : genetic typing for population genetics and molecular epidemiology

Tazi, L.¹, El Baghdadi, J.², Lesjean, S.³, Supply, P.³, Locht, C.³, Tibayrenc, M.¹, Bañuls, A. L.¹.

Centre d'Etude sur le Polymorphisme des Micro-organismes, UMR CNRS-IRD 9926, Centre IRD de Montpellier, France¹, Service des Mycobactéries, Institut Pasteur du Maroc, Casablanca, Maroc², Laboratoire des Mécanismes Moléculaires de la Pathogenèse Bactérienne, INSERM U447, Institut Pasteur de Lille, France³.

Tuberculosis represents a serious problem of public health. Its incidence is increasing all over the world, and the situation in developing countries is especially worrying. Indeed, in developing countries, tuberculosis remains the leading cause of mortality due to a single infectious agent. In Morocco, despite the use of DOTS (Directly Observed Treatment Short-course) strategy for controlling the disease, the incidence of tuberculosis is still very high. Furthermore, on a genetic point of view, little is known in this country about the transmission of *M. tuberculosis* and its population structure.

The present work focus on tuberculosis in Casablanca, the economic capital of Morocco. This city includes the fifth of the total cases found in Morocco. The main aim of this work was to understand the epidemiology and the transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in this city from a genetic point of view. In this framework, the specific objectives were : (i) to analyse the genetic diversity of the stocks, (ii) to determine the population structure of *M. tuberculosis* in Casablanca, (iii) to study the genetic relationships between the stocks by phylogenetic analysis, and (iv) to study the links between the biological properties and epidemiological data on one hand and the genetic data on the other hand.

One hundred and fifty five epidemiologically characterized stocks of *M. tuberculosis* from Casablanca were genotyped with ten RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) primers and twelve MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units – Variable Number of Tandem Repeats) loci. Twenty two additional stocks were used as outgroups for the phylogenetic studies, including *M. tuberculosis* strains from other countries and other members of the *M. tuberculosis* complex.

Phylogenetic analysis based on the different genetic markers revealed a very high genetic diversity with the two molecular techniques. These results showed that the genetic polymorphism found in the overall genome of this bacteria is not negligible, consistent with several other works. The population genetic tests indicated a high linkage disequilibrium, and a significant correlation between RAPD and MIRU. This result supports a fundamental clonal structure of this population. The clonal structure suggests the possibility to find links between genetic markers and biological or epidemiological properties. At this level of study, the analysis revealed no association between the resistance profile of the bacteria and the genetic markers. However, the genetic and phylogenetic analysis along with the epidemiological data allowed to describe genetically some chains of transmission of *M. tuberculosis* and some peculiar epidemiological situations.

ANNEXE 15 : Publication 1



Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* and its relevance to the surveillance and control of TB An e-debate

Loubna Tazi^a, Barry Kreiswirth^b, Christian Carrière^c, Michel Tibayrenc^{a,*}

^a *Genetics of Infectious Diseases, Unité mixte de Recherche Centre National de la Recherche Scientifique/Institut de Recherche pour le Développement no. 9926, IRD, BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France*

^b *Public Health Research Institute Tuberculosis Center, International Center for Public Health, 225 Warren Street, Newark, NJ 07103, USA*

^c *Laboratoire de Bactériologie, Hôpital Arnaud de Villeneuve, 371 Avenue du Doyen Giraud, 34295 Montpellier Cedex 5, France*

Accepted 19 September 2002

First question: Give in a few lines your definition of 'Molecular Epidemiology' and your opinion about what it is good for in general (not only for TB).

Response from LT

In the last 20 years, Molecular Epidemiology has become a major field of research, which corresponds to the integration of molecular approaches into the conventional epidemiologic studies. This scientific domain implies several disciplines, comprising medicine, molecular biology, epidemiology and biostatistics.

Molecular epidemiology can be defined as a science that permits to understand the transmission, the pathogenesis and the etiology of a disease in a human populations.

Based on this definition, the use of molecular epidemiology to study the infectious diseases has mainly permitted to or will permit to:

- estimate the association of risk factors with the transmission of the disease;
- detect and confirm outbreaks in institutional settings;
- screen strains of public health importance;
- distinguish between reactivation and recent infection (case of TB);
- track global spread of pathogens;
- understand the virulence and resistance mechanisms of different strains;
- improve the knowledge on transmission dynamics and dissemination pathways of infectious diseases;
- and the last but not the least, to develop strategies for the treatment and the prevention of the disease.

Response from BK

As correctly described by Loubna, molecular epidemiology has opened many pathways of investigation and in regard to tuberculosis, a number of central dogmas have been challenged. This includes the finding that exogenous infections occur in both HIV+ and HIV- tuberculosis patients, and that the percentage of recent transmission in a given population is higher than previously expected. The molecular tools have also provided precise markers to distinguish between primary and acquired drug resistance in a given population. In regard to virulence and pathogenesis studies, molecular epidemiology proves to be directive in identifying clones associated with a given phenotype—from drug resistance to toxin production.

It should be stressed that the information derived from molecular epidemiological investigations is always dependent on the sampling and that a non-bias, representative collection is critical to each study.

Response from CC

The molecular epidemiology is the application of molecular biology techniques to the study of the distribution and determinants of an infection and communicable diseases. For the clinical microbiologist the notion of epidemiologic problem is most often related to a nosocomial infection which is usually caused by bacteria. To verify the existence of a nosocomial infection it is necessary to establish that all cases are caused by the same bacteria. That is the role of the microbiologist. When epidemiologic typing of the bacterial strains is performed, phenotypic techniques are most often insufficient for discriminating among the isolates. The use of molecular techniques gives most of the time the answer about whether strains are epidemiologically related or not

* Corresponding author. Tel.: +33-4-6741-6197; fax: +33-4-6741-6299.
E-mail address: michel.tibayrenc@mpl.ird.fr (M. Tibayrenc).

77 *Comment from MT*

78 About Loubna's excellent response: please remember that
79 the interest of molecular epidemiology is not limited to
80 human infections, and includes pathogens of animals and
81 plants. This makes it possible, in the domain of human
82 medicine, to clarify the epidemiology of human diseases that
83 have an animal reservoir, such as Chagas disease (caused by
84 the parasitic protozoan *Trypanosoma cruzi*, that can infect
85 any mammal) or infections by *Mycobacterium bovis*.

86 *Second question:* In the field of tuberculosis, have you
87 heard about, or can you think about—a case where a result
88 from a molecular epidemiology survey has led, or could
89 lead, to a practical decision in terms of public health?
90

91 *Response from BK*

92 Over the last decade the genotyping of *M. tuberculosis*
93 has provided evidence based data to evaluate transmission,
94 distinguishing relapse from exogenous reinfection, and in
95 identifying cases of laboratory cross-contamination. The fact
96 that patients are subjected to incorrect medical decisions
97 based on a false laboratory result is a serious public health
98 problem. We and others have shown that the use of routine
99 monitoring of the mycobacteriology laboratory and the use
100 of rapid techniques, such as spoligotyping, has a positive
101 impact identifying these cases.
102

103 In addition to laboratory cross-contamination, there are
104 unique settings where genotyping *M. tuberculosis* has had
105 an impact on medical care. Decisions on using pyrazinamide
106 in a treatment regimen has been problematic, as pheno-
107 typic susceptibility analysis is inaccurate and provides no
108 clinical guidance. Sequence analysis of the *pncA* gene and
109 the high correlation between mutations in *pncA* and re-
110 sistance provides a laboratory basis to change treatment
111 decisions.

112 There are also rare cases where the genotype of an *M.*
113 *tuberculosis* strain impacts on the treatment regimen. As
114 an example, the New York City multidrug-resistant (MDR)
115 outbreak clone, strain W, which has caused disease in over
116 500 patients, is always resistant "first-line" therapy and its
117 identification by IS6110 analysis provides strong evidence
118 to alter therapy to second-line agents. The development
119 of a rapid PCR-based multiplex method to rapidly iden-
120 tify this primary resistant clone was developed at the CDC
121 with the aim of controlling the spread of this serious MDR
122 clone.

123 It is clear that over the last decade, the integration of
124 molecular techniques in the mycobacteriology laboratory
125 has had a major impact on the control and treatment of tu-
126 berculosis.

127 *Response from CC*

128 The case of cross-contamination of clinical samples dur-
129 ing the sampling or culture procedure is possible and more
130 and more frequently reported (Bauer et al., 1997; Bifani
131 et al., 2002; Ramose et al., 1999). Thanks to molecular epi-

132 demiology study of the *Mycobacterium tuberculosis* isolates
133 these incidents can be identify.

134 The source of cross-contamination can be the sampling
135 material (contaminated bronchoscope) or laboratory contam-
136 ination of cultures. In the first case, the material has not
137 been sterilized properly (error in the decontamination pro-
138 cedure). In the second case, patient's culture is positive
139 for *M. tuberculosis* but there is not a high clinical suspi-
140 cion for disease; the culture contamination involves posi-
141 tive clinical samples processed concurrently with negative
142 samples.
143

144 These errors can lead to unnecessary visits of falsely di-
145 agnosed patients to medical consultants and unnecessary
146 long-term antimicrobial treatment. In terms of public health,
147 mycobacteriology laboratories should institute strict proce-
148 dures to prevent and identify cross-contamination episodes.
149 Careful documentation of positive specimens, together with
150 close liaison between clinical and laboratory staff involved
151 in culturing and molecular characterization, is necessary to
152 identify such incidents effectively.
153

154 *Response from LT*

155 Besides the case of the cross-contamination raised by
156 Dr. Carrière and Dr. Kreiswirth, molecular epidemiology al-
157 lowed also to identify and to understand nosocomial infec-
158 tions, exogenous reinfection, and to distinguish recent in-
159 fection from reactivation of latent infection. The last case
160 cited seems to me very fundamental to establish decisions
161 in terms of public health.

162 Active tuberculosis may result from the reactivation of
163 latent infection or from recent infection. The molecular dis-
164 tinction between these two cases led to determine the risks
165 for TB transmission in the communities, and to strengthen
166 the control of this disease in function of the epidemic situ-
167 ation identified.

168 In spite of these advances, the situation in developing
169 countries like Morocco, my country of origin, is worrying.
170 Despite the recommendations of WHO (DOTS strategy), the
171 incidence of TB is still very high, and the problem of HIV
172 and multidrug-resistance promotes this increasing in such
173 communities. The future challenge for molecular epidemi-
174 ology is to provide better understanding of the transmission
175 dynamics of tuberculosis in these countries and to stimulate
176 the implementation of control measures on a more global
177 scale.
178

179 *Third question:* Here is a list of markers classically used in
180 molecular epidemiology. Please expose your opinion about
181 their qualities and drawbacks for MTB molecular typing
182 and their suitability for internet-operated surveillance net-
183 works: Multilocus Enzyme Electrophoresis (MLEE); Ran-
184 dom Primed Amplified Polymorphic DNA; Pulse Field Gel
185 Electrophoresis (PFGE); Spoligotyping; IS6110 Restriction
186 Fragment Length Polymorphism (RFLP) typing; Multilocus
187 Sequence Typing (MLST).
188

Response from BK

M. tuberculosis has a monomorphic genome, similar to the limited polymorphism observed in isolates of *Bacillus anthracis* or *Yersinia pestis*. The comparative analyses of the available genomes and the comparative DNA sequence studies revealed limited synonymous mutations; a finding that led to the hypothesis that *M. tuberculosis* is a “young” pathogen. As a result of the limited diversity, MLEE and MLST do not provide a high level of discrimination and are not the method of choice to differentiate *M. tuberculosis* isolates.

In considering genotyping methods to sub-speciate bacteria the IS6110 system is by far the most well accepted standardized method and performed on a global scale. Currently there are more than 60,000 isolates that have been genotyped with IS6110 and this data is comparable from laboratory to laboratory. IS6110 is clearly the present gold standard with the understanding that it has well known limitations—strains with six or less copies of IS6110 should be re-evaluated using an unrelated method such as spoligotyping, MIRUs or Southern hybridization with PGRS.

PFGE and Random Primed Amplified Polymorphic DNA does not provide any advantage to the current use of IS6110 and spoligotyping. PFGE analysis has not been well established for *M. tuberculosis*, standardization and analysis between laboratories is difficult and there are questions whether the procedure needs to be run in a biosafety cabinet. As with all PCR-based method, standardization of the Random Primed Amplified Polymorphic DNA has never been shown to be reproducible within and among laboratories and regardless, it will not provide the discrimination that is found with IS6110 and spoligotyping.

It is likely that SNP analysis will be the eventual method to genotype *M. tuberculosis* and replace IS6110 and spoligotyping. This will be an objective approach that will ultimately database arrays of genetic alterations in numerous target loci and each strain will be defined by the collective presence or absence of mutations at these sites.

Comment from MT on BK's response to the third question

Barry: (i) It is important to make clear that the monomorphism of MTB genome concerns only housekeeping genes and should be rather termed—“limited polymorphism”. (ii) About RAPD: its reputation of non-reproducibility is not justified. In experienced hands, its reproducibility is fair. I agree that it is more a research tool than a tool for routine identification. However, its power in terms of population genetics (by allowing multilocus analysis) and phylogenetic analysis (by identifying various species- and strain-specific (“synapomorphic”) characters) is much higher than of IS6110 RFLP. By its power in elucidating *M. tuberculosis* population structure and that of many other pathogens, and in reliably delimiting many species, its contribution to molecular epidemiology has been indirectly considerable.

Comment from BK on that comment

Michel: The polymorphism is not only in housekeeping genes but in most genes analyzed. The Musser lab has done extensive comparative sequencing on more than 50 genes and even third position codon changes are rare. The genome data on the clinical isolates supports this finding.

It is also clear that the SNP approach will be much more informative than RAPD analyses and provide a more objective approach for both genotyping and evolutionary studies.

MT

Barry: Musser's hypothesis has been recently challenged by Fleischmann et al. (2002), who found an extensive polymorphism in MTB based on SNP analysis. Please note that this perfectly fits RAPD results of our group (Loubna Tazi and Anne-Laure Bañuls).

Response from CC to third question

The IS6110 RFLP typing is the most widely applied molecular typing method for *M. tuberculosis*. To facilitate the interlaboratory comparability of this method, all aspects of the procedure have been standardized and it is considered to be the reference method for *M. tuberculosis* typing. However, this technique suffers from significant drawbacks, it is laborious, requiring many technical steps and several micrograms of chromosomal DNA, this implies a culture delay of a few weeks and requires viable organisms. It is an expensive method and sophisticated computer software is required to analyze the patterns in an accurate way. On the other hand, it has been possible to establish international databases of RFLP patterns from different geographical area. Thanks to that database it is possible to trace the source of infection for multidrug-resistant strains and it permitted to know that the Beijing genotype has a high impact on the tuberculosis epidemic in Asia and USSR republics.

Recently, PCR-based methods have been developed. One of them, spoligotyping is a method detecting 43 known spacer sequences which intersperse the DRs in the genomic DR region of *M. tuberculosis* complex strain. It is easy, robust, highly reproducible and rapid. Moreover the results can be read as a digital code suitable for use in a computer-assisted analysis and, therefore, for internet surveillance network. Another advantage of spoligotyping is that it can be used simultaneously for the detection and typing of the *M. tuberculosis* complex bacteria in one assay. It could be interesting to study Beijing epidemic since these strains harbour a typical spoligotype pattern (reaction with the last nine spacers in the panel of 43).

However, spoligotyping has shown a discriminatory ability lower than of IS6110 RFLP analysis with the exception of that for *M. tuberculosis* isolates with low copy numbers.

Another PCR-based method, the MIRU–VNTRs has been developed. It is based on the variability in copy numbers of tandem repeats of 40–100 bp in length at 12 different intergenic regions of the *M. tuberculosis* complex genome. The discriminatory power of the 12 MIRU–VNTR regions is

188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242

243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296

much higher than that of spoligotyping and close of IS6110 RFLP for typing of *M. tuberculosis*. The results can be read as digital code and this opens the way to the construction of databases. The simple numerical format of the data generated should allow laboratories in different parts of the world to compare their local isolates with those found elsewhere by submitting their MIRU–VNTR data to a central database that can be created on a web site.

To my knowledge, at the present time, three databases are available for internet-operated surveillance network of *M. tuberculosis*: the RFLP patterns, the spoligotype patterns and the MIRU–VNTR pattern.

Response from LT to third question

The most widely used genotyping method for MTB isolates is the Restriction Fragment Length Polymorphism-based on IS6110. This technique is considered as the gold standard method for the study of the epidemiology of tuberculosis, and its standardization has permitted to establish databases allowing the comparison of the molecular typing results between laboratories. However, this technique requires a high amount of DNA (1 µg), and its protocol comprises several steps contrary to PCR methods. It depends also on the number of IS6110 copies, and for isolates with six or less copies, the use of a secondary marker (spoligotyping, MIRU, PGRS . . .) is indispensable for a better discrimination between strains. Moreover, RFLP-IS6110 data cannot be used for population genetics study. Indeed for an haploid organism as *M. tuberculosis*, the tests for studying the population structure are mainly based on the study of linkage disequilibrium (non-random association of genotypes occurring at different loci). And this technique does not reveal the variability of independent genetic loci and then cannot be used to analyze linkage disequilibrium.

Several other genotyping methods based on PCR, have been developed. The spoligotyping, for example, has shown its potentialities to type *M. tuberculosis* strains, and to identify W-Beijing Families. Besides its use as a molecular marker for genotyping MTB isolates, the spoligotyping permits also to differentiate between members of *M. tuberculosis* complex.

This technique is rapid and highly reproducible. Moreover, like RFLP-IS6110, a database for internet-operated surveillance networks is available. Despite all these properties, the spoligotyping remains less discriminative than RFLP-IS6110, and as RFLP-IS6110, it cannot be used for population genetics study.

Few studies have used Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) for molecular typing of MTB strains. This technique seems especially laborious, but PFGE analyses provide more discrimination among isolates with fewer than five copies of IS6110 and less clustering in isolates with five or more copies. Moreover, the application of PFGE with four independent enzymes can be used for population genetics.

Concerning Random Amplified Polymorphism DNA (RAPD), its application on molecular epidemiology of *M.*

tuberculosis has been limited because of problems of standardization of this method between laboratories. RAPD is used in routine in our lab to type several microorganisms, and the selection of primers seem to be fundamental, since only the primers that give reproducible and legible patterns are used. Once the problem of reproducibility resolved, RAPD presents some properties: it is a rapid technique and it requires few ADN (20 ng). Moreover, it is a multilocus marker, and it can be used for population genetics study. RAPD is also a generalist marker, so it permits the comparison of the genetic diversity among several microorganisms.

As underlined by Dr. Kreiswirth, several studies have shown that *M. tuberculosis* genome presents a limited genetic diversity (Sreevatsan et al., 1997). As this negligible polymorphism concerns the structural genes, the use of MLEE and MLST is not informative for the differentiation between MTB isolates.

Finally, as Dr. Kreiswirth and Dr. Carrière, I would like to speak about the new molecular marker, MIRU–VNTR. These markers are specific for MTB complex and they are useful for molecular epidemiology studies of tuberculosis. A database comprising MIRU data for different MTB populations is also available. This molecular approach based on PCR is very reproducible, rapid, and shows a high power of discrimination in comparison with spoligotyping. Moreover, this technique is a multilocus marker, thus, it can be used for the study of MTB population structure.

Fourth question: In your own TB molecular epidemiology approach, what is the specific contribution of evolutionary genetics concepts (population genetics/linkage disequilibrium analysis; phylogenetic analysis), if any?

Response from LT

My Ph.D. work concerns the study of the molecular epidemiology of tuberculosis in Casablanca, the economic capital of Morocco, my country of origin. Up to now, few genetic studies have been done on Moroccan MTB isolates. Thus, this work represents the first evolutionary genetics study performed in Morocco.

Two molecular techniques (RAPD and MIRU) have been used in this study in order to analyze the population structure of the Moroccan population and to understand the dynamics of TB transmission in this country. The results obtained with the two markers have shown a significant linkage disequilibrium, which represents evidence for clonal population structure. Moreover, the population genetics tests with phylogenetic studies have permitted to better understand TB burden in Morocco, and particularly in Casablanca. As an example from these results, tuberculosis seems to have an ancient origin and an endemic situation in this country.

Response from CC

The data provided by the molecular epidemiology approach of the variability among natural population of *M. tuberculosis* contributes to understanding their evolution and

pathogenesis. The most important, but difficult to define parameter of a genotyping system is the time period over which the degree of relatedness demonstrated is informative. For example, it has been related that the evolution rate of MIRU–VNTRs could be slightly slower than that of IS6110 RFLP (Mazars et al., 2001). These observations suggested that MIRU–VNTRs typing could be more appropriate than IS6110 RFLP for long-term epidemiological studies. In terms of phylogeny, the genetic relationship among *M. tuberculosis* isolates can be analyzed on dendrograms obtained with a software-assisted analysis of patterns. This can be done with the RFLP patterns as well as with the spoligotyping and MIRU–VNTR patterns.

I would like to point out that, as we develop more and more refined molecular methods for analysis of the bacterial genome do not we risk 1 day to consider as “epidemiologically unrelated” drug-resistant bacteria which might only be variants of the same clonal type?

For that purpose the molecular epidemiologist will need to interface with clinicians, epidemiologists and computer scientists to study for example an epidemic problem and more generally to interpret the results he obtained in term of evolution and phylogeny.

Response from BK

The molecular epidemiology of tuberculosis is a young science that has grown with the advances in secondary genotyping methods and with the understanding that strain collections must be representative of a given population. Interpreting the molecular data and the clustering of strains is complicated by fact tuberculosis is predominantly a chronic reactive disease, that is most cases are reactive over a lifetime and that human migration facilitates dispersion of the pathogen (via both dormant and active infection).

Evolutionary genetic concepts have greatly enhanced and in some instances augmented molecular epidemiological approaches. Much of our molecular epidemiology is based on clonal theory, that is sister cells that share in common traits of the parent. Furthermore, population genetics would suggest that certain medically relevant traits are non-randomly distributed along clonal or phylogenetic lines. That is, some lineages of tuberculosis may possess specific traits that enable successful host colonization (by evading the host immune response), pathogenesis, and efficient transmission (given by a clone-specific reproductive number). These concepts, in conjunction with molecular biology, microbiology and epidemiology were used in an (ongoing) investigation of large phylogenetic groups of *M. tuberculosis* strains as outlined below.

In the early 1990s, my laboratory genetically characterized and monitored the spread of the highly drug-resistant W strain which caused repeated “institutional” outbreaks in both prisons and hospitals in New York. The fact that nearly 85% of the infected population were HIV positive led to the early progression of disease and the blossoming of case

clusters. More than 500 W strain cases have been identified in New York during the last decade and the isolates are commonly resistant to INH, RIF, STP, EMB, PZA. The molecular analysis of these infecting isolates revealed that the IS6110 pattern has evolved during the strains transmission pathway among a New York population, and we have now identified nine closely related hybridization patterns. Although their IS6110 pattern vary, these strains are confidently linked to the W strain outbreak on the basis of the identical array of DNA sequence mutations in the numerous drug-resistant gene targets, including *rpsL*, *katG*, *rpoB*, *embB* and *pncA*.

The development of numerous genotyping methods, including spoligotyping and IS6110 insertion site mapping has identified additional molecular markers to link the W strain to a very large phylogenetic lineage that is found in principal genetic group 1. Specifically, a deletion in the DR region and an IS6110 insertion in the origin of replication group geographically disparate isolates to this phylogenetic lineage. The current TB literature repeatedly shows that members of this lineage, called the W-Beijing strain family, successfully spread and cause disease in the human population. Strain 210, a member of the W-Beijing strain family and one that caused multiple outbreaks in western states in the US is being sequenced at TIGR and its genome will add to the data to unravel the genetic basis for the success of strains in this lineage.

The molecular epidemiology of the W-Beijing strain family in human populations indicate it has been successful, we now need to incorporate this information in other biological systems such as in making decisions about strains in animal studies and in the choice of strains for vaccine challenges. Therefore, the application or interpretation of evolutionary concepts in describing the molecular epidemiology (or disease burden) should be done with caution. Evolutionary clock-speeds at certain genetic loci and with specific genetic backgrounds are not well-understood or characterized therefore, a multidisciplinary approach is recommended.

It should be emphasized that this data has been synthesized over a decade and its growth is truly the result of a collective group of laboratories around the world that have shared their genotyping data through the internet, at meetings, and in collaborative studies. The result is that tuberculosis is the model disease to study principals in bacterial molecular epidemiology.

MT

This ends this very fruitful e-debate on a hot topic. I thank you all three very much for participating in it.

Uncited references

Bifani et al. (1996), Gascoyne-Binzi et al. (2001), Kurepina et al. (1998).

512 References

- 513 Bauer, J., Thomsen, V.O., Poulsen, S., Andersen, A.B., 1997. False-
514 positive results from cultures of *Mycobacterium tuberculosis* due
515 to laboratory cross-contamination confirmed by restriction fragment
516 length polymorphism. *J. Clin. Microbiol.* 35, 988–991.
- 517 Bifani, P.J., Plikaytis, B.B., Kapur, V., Stockbauer, K., Pan, X.,
518 Lutfey, M.L., Moghazeh, S.L., Eisner, W., Daniel, T.M., Kaplan,
519 M.H., Crawford, J.T., Musser, J.M., Kreiswirth, B.N., 1996. Origin
520 and interstate spread of a New York City multidrug-resistant
521 *Mycobacterium tuberculosis* clone family. *JAMA* 275, 452–457.
- 522 Bifani, P.J., Mathema, B., Kurepina, N.E., Kreiswirth, B.N., 2002. Global
523 dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family
524 strains. *Trends Microbiol.* 10, 45–52.
- 525 Fleischmann, R.D., Alland, D., Eisen, J.A., Carpenter, L., White, O.,
526 Peterson, J., DeBoy, R., Dodson, R., Gwinn, M., Haft, D., Hickey,
527 E., Kolonay, J.F., Nelson, W.C., Umayam, L.A., Ermolaeva, M.,
528 Salzberg, S.L., Delcher, A., Utterback, T., Weidman, J., Khouri, H.,
529 Gill, J., Mikula, A., Bishai, W., Jacobs Jr., W.R., Venter, J.C., Fraser,
530 C.M., 2002. Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis*
531 clinical and laboratory strains. *J. Bacteriol.* 184, 5479–5490.
- 532 Gascoyne-Binzi, D.M., Barlow, R.E.L., Frothingham, R., Robinson, G.,
533 Collins, T.A., Gellellie, R., Hawkey, P.M., 2001. Rapid identification
534 of laboratory contamination with *Mycobacterium tuberculosis* using
535 variable number tandem repeat analysis. *J. Clin. Microbiol.* 39, 69–74.
- 536 Kurepina, N.E., Sreevatsan, S., Plikaytis, B.B., Bifani, P.J., Connell, N.D.,
537 Donnelly, R.J., van Sooligen, D., Musser, J.M., Kreiswirth, B.N., 1998.
538 Characterization of the phylogenetic distribution and chromosomal
539 insertion sites of five IS6110 elements in *Mycobacterium tuberculosis*:
540 non-random integration in the *dnaA-dnaN* region. *Tuber. Lung Dis.*
541 79, 31–42.
- 542 Mazars, E., Lesjean, S., Bañuls, A.L., Gilbert, M., Vincent, V., Gicquel,
543 B., Tibayrenc, M., Locht, C., Supply, P., 2001. High-resolution VNTR
544 typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium*
545 *tuberculosis* molecular epidemiology. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 98,
546 1901–1906.
- 547 Ramose, M.deC., Soini, H., Roscanni, G.C., Jaques, M., Villares, M.C.,
548 Musser, J.M., 1999. Extensive cross-contamination of specimens
549 with *Mycobacterium tuberculosis* in a reference laboratory. *J. Clin.*
550 *Microbiol.* 37, 916–919.
- 551 Sreevatsan, S., Pan, X., Stockbauer, K.E., Connell, N.D., Kreiswirth,
552 B.N., Whittam, T.S., Musser, J.M., 1997. Restricted structural gene
553 polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates
554 evolutionary recent global dissemination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*
555 94, 9869–9874.

Since TB represents a major public health in her country, she is
interested in studying the genetic diversity of *M. tuberculosis* isolates
circulating in the economic capital of Morocco, Casablanca. This work
will lead to determine the population structure of *M. tuberculosis* and the
dynamics of its transmission in this high incidence community.

Loubna Tazi has participated to the students roundtable at the MEEGID
VI Congress in Paris, France (July 2002), and she has received the award
of best communication by a scientist from a developing country.



Barry Kreiswirth is American. He was trained as a molecular biologist under the direction of Dr. Richard Novick at the Public Health Research Institute. As a student, the focus of his research was the cloning and characterization of the staphylococcal toxic shock syndrome toxin-1. The use of molecular probes to identify the iatrogenic spread of TSST-1 from a neurosurgeon to four patients led to his interest in molecular epidemiology and the tracking of nosocomial infections.

The focus of his laboratory is to develop the use of objective and rapid
molecular targets to control the spread of both nosocomial infections,
especially methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, and the global
spread of *M. tuberculosis*. In this regard they have used DNA sequence
comparison of variable number tandem repeat sequences in the *S. aureus*
protein A gene as a model to rapidly identify and track this pathogen in
both the hospital and the community. Their current goal is to develop a
battery of DNA sequence targets that will provide an objective approach to
build large relational databases to control the spread of bacterial pathogens.



Christian Carrière, born in Montpellier, France, is French. He is head of the bacteriology service of the Montpellier Hospital. His lab has an activity of clinical diagnosis in bacteriology and particularly in mycobacteriology. Besides his activity of clinical microbiologist he has performed research on molecular epidemiology of nosocomial infections and has worked in the determination of antibiotic susceptibilities of *M. tuberculosis* strains by using luciferase reporter mycobacteriophages.



Loubna Tazi is a Moroccan PhD student at the Genetics of Infectious Diseases Laboratory (UMR CNRS-IRD 9926) at the "Institut de Recherche pour le Développement" (IRD), Montpellier, France. Her thesis focuses on molecular epidemiology of tuberculosis in Morocco, her country of origin. This work is under the supervision of Dr. Anne-Laure Bañuls and Dr. Michel Tibayrenc.

ANNEXE 16 : Publication 2

Running title: Genetic studies of *M. tuberculosis*

Genetic diversity and population structure of *Mycobacterium tuberculosis* in Casablanca, a high tuberculosis incidence Moroccan city

Loubna Tazi^{1*}, Jamila El Baghdadi², Sarah Lesjean³, Camille Locht³, Philip Supply³, Michel Tibayrenc¹, and Anne-Laure Baniuls¹

¹Génétique des Maladies Infectieuses, UMR CNRS-IRD 9926, IRD, 911 Avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France.

²Service des Mycobactéries, Institut Pasteur du Maroc, 1 Place Abou Kacem Ez-Zahraoui, Casablanca, Maroc.

³Laboratoire des Mécanismes Moléculaires de la Pathogenèse Bactérienne, INSERM U447, Institut Pasteur de Lille, 1 Rue du Professeur Calmette F-59019, Lille Cedex, France.

*Corresponding author. Mailing address: Génétique des Maladies Infectieuses, UMR CNRS-IRD 9926, IRD, 911 Avenue Agropolis, BP 64501, 34 394 Montpellier Cedex 5, France.

Phone: (+33) 4 67 41 62 26; Fax: (+33) 4 67 41 62 99; e-mail: tazi@mpl.ird.fr

Abstract

Although lower resource countries have by far the highest burden of tuberculosis, knowledge of the *Mycobacterium tuberculosis* population structure and genetic diversity in these regions remains almost non-existent. In this paper, 155 Moroccan *M. tuberculosis* isolates from 150 patients living mostly in the economic capital, Casablanca, were genotyped by 2 molecular markers RAPD and MIRU-VNTR. The population genetic tests revealed a high linkage disequilibrium, supporting a basically clonal structure of this population. The genetic analysis has shown a notable genetic polymorphism by comparison with other clonal micro-organism species, a relatively low degree of clustering, and an unexpected genetic diversity for this *M. tuberculosis* population. The phylogenetic analysis supported also that these *M. tuberculosis* isolates of Casablanca are genetically heterogeneous. These results suggest that reactivation of latent infections may be the driving force of the endemic situation, and are consistent with an ancient or cosmopolitan origin of tuberculosis in this region.

Introduction

Today, tuberculosis remains the leading cause of mortality due to a single infectious agent. The incidence is increasing worldwide, especially in developing countries. Moreover, it has been estimated that one third of the world's population is infected, which represents a huge reservoir for the disease [1, 2].

The understanding of the dynamics of tuberculosis transmission has been greatly enhanced by the development of molecular approaches. The most widely used genotyping method is DNA fingerprinting based on Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analysis with the insertion element *IS6110*, which produces extensive fingerprint diversity [3, 4]. Although this technique is considered as the gold standard typing method, it presents some disadvantages [5, 6]. Indeed, this method is based on the number of *IS6110* copies, and for isolates with 6 or less copies, the use of an additional marker is indispensable for a better discrimination between strains. Moreover, RFLP-*IS6110* data do not reveal the variability of independent genetic loci and then cannot be used for population genetics studies.

Various other molecular markers that contribute to the polymorphism of *M. tuberculosis* DNA have been described [5, 7-10]. Among them, markers based on Variable Number of Tandem Repeats (VNTR) in eukaryotic-like minisatellites have been characterized in the *M. tuberculosis* genome. These elements have been named Mycobacterial Interspersed Repetitive Units (MIRUs). Their potential for strain typing and for molecular epidemiology of tuberculosis has been recently shown [11, 12].

Besides these specific markers to *M. tuberculosis* typing, RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) technique has been used for various kinds of micro-organisms [13, 14] and also for the study of *M. tuberculosis* isolates [15, 16]. It permitted to provide useful information on the overall genetic diversity and transmission dynamics of *M. tuberculosis*

[15, 16]. Moreover, since it is a “generalist marker” [17], this method allows the comparison between genetic diversity of different micro-organisms.

In Morocco, the global incidence of all tuberculosis clinical forms is very high with nearly 104 new cases per 100,000 inhabitants yearly, which represents about 30,000 new cases per year. Casablanca, the biggest city and the economic capital of Morocco, includes almost the fifth of the total cases recorded in the country (National Anti-tuberculosis Fight Program, Department of Health, Rabat, Morocco). Despite the use of DOTS (Directly Observed Treatment Short-course) strategy for controlling the disease since 1991, the incidence is still increasing [18]. Several studies have permitted to evaluate the incidence and the distribution of tuberculosis in the different communities of the country [19-21], but up to now, only a few limited genetic studies have been done [22-24].

In the present work, we used RAPD and MIRU-VNTR typing to analyze the genetic diversity and the population structure of *M. tuberculosis* in Casablanca and to get insight into the dynamics of tuberculosis in this city.

Materials and Methods

1- Mycobacterial isolates and clinical data:

The study includes 155 isolates of *M. tuberculosis* mostly collected in 1997 and 1998. These isolates were obtained from sputum of 150 tuberculous patients (table 1). They come from 6 different districts of Casablanca (see figure 1): HMAS “Hay Mohammadi Aïn Sebaa”, BMSO “Ben Msik Sidi Othmane”, CA “Casablanca Anfa”, FDS “Fida Derb Sultan”, HHAC “Hay Hassani Aïn Chock”, and MOH “Mohammedia”, except one isolate (isolate 97, see in table 1) which come from Benslimane, a city distant of about 50 Km from Casablanca. Most of the isolates (101) were collected from patients living in the Casablanca district HMAS, where the

incidence of pulmonary tuberculosis is very high by comparison with the other districts. Nearly 450 new cases per year were recorded in this district, but the reported cases were not totally cultured and available for the genetic analysis.

For five patients, two isolates per individual were taken at different times corresponding to the follow-up of the disease (isolates number: 5 and 5', 41 and 41', 56 and 56', 119 and 119', 126 and 126', see in table 1). 7 families whose members were infected by *M. tuberculosis*, were also included in this study (family 1: isolates 20, 21, 51; family 2: isolates 25, 55; family 3: isolates 26, 56, 153; family 4: isolates 34, 37, 58; family 5: isolates 52, 53; family 6: isolates 118, 119; and family 7: isolates 131, 132, 133) (see in table 1).

Different clinical forms of tuberculosis were represented in our sample, including primary resistance, multi-drug resistant tuberculosis, follow-up, familial tuberculosis, relapses, new cases, and chronic tuberculosis (table 1). The collection of the epidemiological data was done in the different health centers specialized on tuberculosis in each district (CDST: Centre de Diagnostic Spécialisé de la Tuberculose).

All the isolates included in this study were recovered by culture on Löwenstein-Jensen medium. The colonies inactivated by heating were then kept at -20°C until DNA extraction. The identification of these mycobacteria as *M. tuberculosis* was performed by conventional biochemical methods. For each isolate, the resistance profile to Isoniazid "H", Rifampin "R", Streptomycin "S", and Ethambutol "E" was tested, according to the conventional proportion method [25] (see in table 1).

Three Moroccan stocks of *M. bovis* were added to this sample for comparison purposes (see in table 2). They come from the "Institut Agronomique et Vétérinaire" in Rabat, Morocco (Dr Berrada).

Nineteen additional stocks were used as reference for the phylogenetic analysis, including 10 *M. tuberculosis* stocks from other countries and other species of the *M. tuberculosis* complex

(see in table 2). These comparison stocks have been already analyzed in previous studies [5, 12].

2- Isolation of chromosomal DNA:

Extraction of DNA from all Moroccan *M. tuberculosis* isolates was performed by a standardized protocol described previously [26]. The other stocks were kindly provided to us under the form of purified DNA by Dr Kremer and Dr van Soolingen (RIVM, the Netherlands), except the three Moroccan *M. bovis* stocks kindly provided by Dr Berrada (Institut Agronomique et Vétérinaire, Rabat, Morocco) (see in table 2). The quantity of each DNA was evaluated by measuring the optic density at 260 nm, and its quality was checked on agarose gel (0.8%).

3- RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) protocol:

RAPD technique is based on the amplification of random DNA segments with single primers of arbitrary nucleotide sequence [13, 14]. This technique is used as a “generalist marker” [17], for studying the overall genetic diversity of several parasites and bacteria. Therefore, it was used to compare the diversity of *M. tuberculosis* with other pathogenic micro-organisms [17]. The RAPD method was performed according to the protocol published by Williams et al. [14].

20 ng of DNA (10 ng/μl) was amplified in a total volume of 60 μl (buffer *Taq* DNA polymerase 1X, dNTP 100 μM, primer 200 nM, *Taq* DNA polymerase 15 mUI/μl). The program of amplification consisted of 45 cycles (1 mn at 94°C, 1 mn at 36°C, 2 mn at 72°C) followed by a final extension step (7 mn at 72°C). Ten primers were selected out of 26 on the basis of their reproducibility and the legibility of the patterns. For each of the ten primers tested (table 3), a negative control was used to check the specificity of the pattern obtained.

The reproducibility of the patterns was tested for each primer and each stock. RAPD polymorphism was analyzed on ethidium bromide-stained agarose gels (1.6%).

All bands obtained on RAPD gels were numbered and scored as presence or absence data. Therefore, the band number 1 is attributed to the fragment with the highest molecular weight and so on. This technique is well standardized and used in routine in our laboratory for typing various kinds of micro-organisms (*Leishmania*, *Trypanosoma*, *Shistosoma mansoni*, *Escherichia coli*, *Plasmodium*, *Candida albicans*, *Streptococcus aureus*) [27-33].

4- PCR-MIRU (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units) protocol:

The MIRU technique is based on PCR amplification of Variable Number of Tandem Repeats (VNTRs) of genetic elements named Mycobacterial Interspersed Repetitive Units (MIRUs), in 12 loci referred to as MIRU 2, 4, 10, 16, 20, 23, 24, 26, 27, 31, 39, and 40 [34]. The amplifications were performed by using the *HotStarTaq* DNA polymerase kit (Qiagen, Hilden, Germany) and oligonucleotides corresponding to the flanking regions of the 12 MIRU-VNTR loci, as described previously with slight modifications [12, 34].

10 ng of DNA (10 ng/μl) was amplified in a total volume of 50 μl containing *HotStarTaq* DNA polymerase buffer 1X, 0.2 mM of each dNTP, primer 0.4 μM, Q solution 1X, *HotStarTaq* DNA polymerase 20 mUI/μl, and MgCl₂ 1 to 3.5 mM. The program of amplification started with a step of 15 mn at 95°C, followed by 40 cycles (1 mn at 94°C, 1 mn at 59°C, 1 mn 30 at 72°C). An extension step (7 mn at 72°C) ended this program. The amplicons were analyzed by electrophoresis by using 2% NuSieve agarose. The estimation of the size of the PCR fragments was established by comparison with 20- and 100-bp superladders-low (Eurogentec, Seraing, Belgium). The conversion of the size of the amplicons into the number of MIRUs per locus was done by using the conventions described previously [11, 34]. These data are available at <http://www.ibl.fr/mirus/mirus.html>. The

resulting numerical genotype codes correspond to the numbers of VNTR in each of the 12 loci [11].

50 stocks of our sample were also analyzed by a system combining analysis of multiplex PCRs on a fluorescence-based DNA analyzer with computerized automation of the genotyping. The protocol performed for the amplification and the computer-assisted typing were described previously [11, 12].

5- Genetic polymorphism:

A set of diversity indices was evaluated in order to get the genetic variability of the isolates.

The following indices were used:

- Genotypic diversity: $G = g / n$, where n = the total number of the studied isolates, and g = the number of different multilocus genotypes;

- Polymorphism rate, which corresponds to the percentage of polymorphic loci on the total number of loci under study. Only the loci for which the second most frequent variant presents a frequency $\geq 5\%$ are considered polymorphic [35];

- Mean genetic diversity [36], which is calculated as $H = \Sigma h / n$ with $h = 1 - \Sigma q_i^2$.

n = the number of loci, h = genetic diversity for each locus, and q_i^2 = relative frequency of the i th allele for the considered locus.

6- Population genetics analysis:

The population structure was explored by a set of complementary statistical tests ($d1$, $d2$, e , f , g) [37, 38]. All of them take panmixia (random genetic exchange) as a null hypothesis.

They all explore the presence or absence of genetic recombination among loci and are based on the analysis of linkage disequilibrium (non-random association of genotypes occurring at different loci) [37, 38]. The g test estimates the correlation between independent genetic

markers by a non-parametric Mantel test, which is based on Monte Carlo simulation with 10^4 iterations [39]. A correlation between independent genetic markers is a particularly strong evidence of linkage disequilibrium [38, 39]. Biases due to geographical or time separation (Wahlund effect) have been previously exposed [38] and were taken into account in the present study.

7- Phylogenetic analysis:

Phylogenetic relationships among the isolates were inferred from RAPD and MIRU data by using different phylogenetic methodologies. For all the analyses, a *M. canettii* stock was used as outgroup [5].

First, we used the Neighbor-Joining analysis [40] based on the Jaccard's distances matrix. Jaccard's distance is determined by the following formula [41]:

$D_{ij} = 1 - [a / (a + b + c)]$, where a = the number of bands that are common to the i and j stocks, b = the number of bands present in the first genotype and absent in the second, and c = the number of bands absent in the first genotype and present in the second.

Second, the Wagner analysis [42, 43] with bootstrapping [44] was used to test the robustness of the nodes.

The distance matrix and the phylogenetic trees were computed using the Genetics Toolbox software, designed in our laboratory, the PHYLIP software (Felsenstein, 1993, 3.5c ed. Seattle, WA. Department of Genetics, University of Washington) and Treedyn software, also designed in our laboratory [45]. This last software is an interactive phylogenetic and classification tree editor and allows to visualize the association between the phylums and properties of the stocks under study, such as the geographical origin, the clinical form of the disease, or the resistance profile of the bacteria.

Results

Reliable RAPD analysis conditions were defined as follows. Twenty-six 10-bp primers were initially tested for RAPD analysis on a subset of 20 *M. tuberculosis* stocks (unpublished data). Ten primers out of these 26 were retained on the basis of the full reproducibility and the legibility of the patterns (see in figures 2-a and 2-b). Moreover, in all subsequent analyses, the reproducibility of the patterns obtained with each primer was verified for each stock. The 177 stocks under study were analyzed in these conditions with the 10 RAPD primers and 12 MIRU-VNTR loci. Two examples, one for each genetic marker, are illustrated in the figures 3 and 4.

Genetic diversity analysis of the Moroccan isolates using RAPD and MIRU data:

For the genetic diversity analysis of *Mycobacterium tuberculosis* in Casablanca, only the 155 Moroccan isolates were considered.

The five pairs of isolates removed at different times from a same patient displayed exactly the same MIRU profiles, consistent with results indicating the stability of MIRU-VNTR profiles in serial isolates from French and South African patients [11, and Savine et al., in press]. While fully identical profiles with the 10 RAPD primers were observed for one pair of isolates (56 and 56'), three other pairs (5' and 5, 119 and 119', 126 and 126') showed identical RAPD patterns for 9 primers, and only one supplementary band for the remaining primer (data not shown). The last pair (41 and 41') displayed different RAPD patterns for 3 out of 10 primers.

The slight differences observed in the RAPD genotypes with one single primer in three pairs suggest that RAPD is able to detect rare mutation events and presents a faster evolutionary rate than MIRU-VNTR. The complete conservation of MIRU-VNTR genotypes and the conservation or close similarity of the RAPD profiles throughout the 10 primers within these

pairs suggest that these patients relapsed or were chronically infected by a same strain. However, reinfection by another strain very closely related to the one present in the first isolation can not be totally excluded especially for the last pair (41 and 41'). In order to avoid the bias of considering twice the same isolate in our study, for the phylogenetic and population genetic analysis, only one isolate by patient (5', 41, 56, 119, and 126) has been used.

Some polymorphism has been noted between members of the same family. Indeed in the seven families studied, only three have shown identical profiles with all MIRU-VNTR loci and identical or close genotypes with RAPD primers for *M. tuberculosis* isolates, suggesting intrafamilial transmission. The isolates of four others families have revealed different profiles as well for MIRU-VNTR as for RAPD. For example, the isolates of family 4 (34, 37, 58) have shown different profiles with 5 loci MIRU (MIRU 2, 10, 20, 23, and 40) and 7 primers RAPD (U13, U17, R13, U16, U20, R8, and A2) (data not shown).

In order to better understand the distribution of the diversity in the sample under study and to avoid the biases due to geographical/temporal separation (Wahlund effect), the following subgroups were defined (see in table 4): (i) the whole sample; (ii) isolates originated from HMAS; (iii) isolates collected in 1997; (iv) isolates collected in 1998; (v) isolates from HMAS collected in 1997 and (vi) isolates from HMAS collected in 1998. The districts with a weak sampling, BMSO (22 isolates) and CA (16 isolates), were not included in these analyses. The different genetic indices were calculated in each group for the RAPD and MIRU data. Table 4 indicates all the values obtained. The results obtained with the RAPD data were always higher than those obtained with the MIRU data, which again suggests that the RAPD molecular clock is faster than the MIRU one. However, for both genetic markers, the diversity was notable and almost equivalent in all the subgroups under study. For example, for the whole sample, we obtained 136 different genotypes out of 150 with RAPD

and 95 with the MIRU technique (see in table 4, genotypic diversity column). In this sample, the mean genetic diversity among the 10 RAPD primers and the 12 MIRU-VNTR loci amounted to 0.48 and 0.38, respectively. In the HMAS district, we found 86 different genotypes out of 97 with RAPD and 64 with MIRU technique. The polymorphism rate showed that all the RAPD primers gave polymorphic patterns in all the groups, and for the MIRU-VNTR loci only one out of the 12 loci (locus 24) was totally monomorphic (data not shown).

Phylogenetic analysis:

Figure 5 shows a Neighbor-Joining tree on the 155 Moroccan isolates and the 22 reference stocks based on the MIRU-VNTR data. The phylogenetic analysis showed that the Moroccan *M. tuberculosis* isolates were not separated from the other *M. tuberculosis* stocks whatever the kind of analysis used (Wagner or Neighbor-Joining analysis based on MIRU or RAPD data). Indeed, figure 5 shows that the stocks originated from other countries were interspersed among the Moroccan *M. tuberculosis* isolates, except the P56 stock which fell apart of the whole group with the *M. canettii* P48 stock used as outgroup. Two out of 3 Moroccan stocks of *M. bovis* were also mixed with the Moroccan *M. tuberculosis* isolates, except the K5 stock which is clustered apart with two other *M. bovis* reference stocks. Only a stock belonging to the species *M. africanum* (P55) was inserted into the Moroccan sample. All the other reference stocks which do not belong to the *M. tuberculosis* species were clustered apart from the Moroccan *M. tuberculosis* isolates. From the phylogenetic trees constructed, we could distinguish some groups, but no one was associated with either geographical origin, or biological properties or clinical characteristics of the patients. Moreover, the Wagner analysis with bootstrapping performed on the same data gave mainly low bootstrap values (data not shown).

Population genetics analysis:

Linkage disequilibrium (non-random association of genotypes occurring at different loci), the degree of the overrepresentation of multilocus genotypes and the absence of recombinant genotypes, were analyzed for all RAPD primers and MIRU-VNTR loci. To lower the potential occurrence of geographical and/or temporal bias within our population (Wahlund effect), the linkage disequilibrium tests were applied separately per district and per year of collection. The samples studied and the results obtained are described in table 5. The values obtained for the *f* tests were almost constantly highly significant whatever the genetic marker (see in table 5), indicating significant linkage disequilibrium in all the samples. The Mantel tests (*g* tests) performed between the two sets of data, RAPD on one hand and MIRU on the other hand, were also significant for almost of the groups studied ($P \leq 0.05$). These results are also an indication of a significant linkage disequilibrium in the population under study. This was further confirmed by globally significant results obtained with *d1*, *d2* and *e* tests (see in table 5), suggesting significant over-representation of certain multilocus genotypes (tests *d1* and *d2*) and the absence of recombinant genotypes (test *e*), which are two additional complementary criteria of clonality.

In order to distinguish the occasional spread of ephemeral clonal genotypes in a basically sexual species, referred to as epidemic clonality by Maynard Smith et al. [46], from a predominant clonal evolution, the linkage disequilibrium tests were done by processing each genotype as a single individual. Again, globally significant results were obtained for these analyses ($P \leq 0.01$ for the *f* test, data not shown).

Discussion

Knowledge on *M. tuberculosis* population structure and genetic diversity remains almost non-existent in many regions with a high incidence of tuberculosis. In this study, we analyzed the genetic diversity and the population structure of *M. tuberculosis* from a Northern Africa metropolis with a high tuberculosis incidence, using two multilocus methods with different properties, RAPD and MIRU-VNTR. This work represents the first genetic study on the tuberculosis transmission and population structure in Morocco. With appropriate quality controls, RAPD is usable for any kind of organisms. MIRU-VNTR genotyping was used as a convenient reference, as it has recently shown its potentialities for the molecular epidemiology and the population structure study of *M. tuberculosis* [11, 12]. Among the 155 Moroccan isolates, 154 have been selected randomly in different districts of Casablanca, 101 of which were isolated from a district (HMAS) with a high incidence of pulmonary tuberculosis of about 450 new cases per year (National Anti-tuberculosis Fight Program, Department of Health, Rabat, Morocco). Therefore, this sample, although not exhaustive, is a good prospective basis for molecular epidemiology and population genetics analysis.

From a population genetic point of view, the results obtained with the two genetic markers give convergent indications of different manifestations of linkage disequilibrium, which is considered as a strong circumstantial evidence for a basically clonal population structure [37-39]. Moreover, the hypothesis of epidemic clonality described by Maynard Smith et al. [46] is not corroborated by the significant results obtained when each genotype has been treated as a single individual in the linkage disequilibrium tests. These data and those obtained by Supply et al. in a South African population with MIRU-VNTR and IS6110-RFLP analysis [in press] support the hypothesis that *M. tuberculosis* undergoes predominant clonal evolution, even in such regions in which different strains have potentially ample opportunity for genetic exchanges. However, low bootstrap values recorded on this Moroccan sample lead us not to completely exclude the occurrence of occasional horizontal gene

transfers, since such transfers tend to cloud the individualization of distinct phylogenetic lines.

A notable polymorphism has been revealed with the two genetic markers in our population. This finding is consistent with other results on different pathogenic micro-organisms with clonal evolution. On the basis of RAPD, which is a generalist marker, we could compare the level of polymorphism obtained in our *M. tuberculosis* population with those obtained for other species of bacteria and for some protozoan species with a well-known population structure [17, 37]. As examples, we give below several values of mean genetic diversity obtained for micro-organisms following a clonal evolution: 0.14 for *Leishmania infantum* [27], 0.8 for *Trypanosoma cruzi* [28] and 0.85 for *Escherichia coli* (Grandhomme, unpublished data), whereas the value obtained for *M. tuberculosis* in this study is around 0.4. Therefore, the genetic diversity in *M. tuberculosis* appears to be significant by comparison with other predominantly clonal species.

The notable genomic diversity obtained in this study is in apparent contrast with those obtained by sequencing *M. tuberculosis* structural genes [47] and genes coding for targets of the host immune system [48], demonstrating an extreme reduction of silent nucleotide substitutions in *M. tuberculosis* compared to *E. coli* and other bacterial species. However, our results are supported with those obtained by a recent whole genome comparison between different *M. tuberculosis* strains [49], indicating more extensive overall genetic polymorphism. These different observations can be reconciled by the facts that (i) several specific gene families may display higher variability in the *M. tuberculosis* genome [49]; (ii) that genetic variation is also driven by insertion/deletion events [50], by some transposable elements, including IS6110 [47], and by variations at numerous loci containing repetitive

sequences, including MIRU-VNTR and other VNTRs [8, 9, 34, 51]. Such multiple sources of polymorphism interspersed in a backbone of conserved structural genes are detectable by RAPD, which samples overall genome variability.

This relatively high genetic diversity was recorded in our Moroccan population, whatever the subdivision (per year or per district) considered and for all diversity indices under study (table 4). The results obtained were rather unexpected, since studies have demonstrated lower genetic diversity in high incidence communities [52-55]. The MIRU-VNTR genotypic diversity in this sample (0.63) was higher than that observed in a sample from Cape Town suburb area (0.46) [Supply et al., in press], another setting with a very high incidence of tuberculosis. From the phylogenetic analysis, also in contrast with the latter area and other regions with high incidence [e.g. 54, note: Beijing], no obvious dominant groups of very closely related strains were apparent in this sample (see in figure 4), even when the HMAS district of Casablanca or the year of the isolation were considered alone (data not shown). Taken together with the relatively low degree of clustering observed here, these observations suggest that reactivation of old latent infections may be the main driving force for the endemic situation of the disease in Casablanca and are consistent with an ancient origin of tuberculosis in Morocco. Indeed, a recent origin of a clonal species would have given a reduced polymorphism with few different genotypes.

Despite the clonal evolution inferred for this bacteria and the notable genetic diversity found in the Moroccan *M. tuberculosis* population, the phylogenetic analyses revealed no association between the drug resistance profile of the bacteria or the clinical characteristics of the disease (chronic tuberculosis, new cases, and relapses) on one hand and the genetic markers on the other hand. Until now, no general links between genetic markers and

biological or clinical properties of *M. tuberculosis* have been evidenced. This suggests that it is necessary to analyze directly the genes implied in the resistance or clinical form.

In Morocco as well as in other Southern Mediterranean or Middle East countries, the classical risk factors, AIDS disease and alcohol and drug abuse, are not significantly implicated in the increase of the disease. In these regions, tuberculosis mainly affects much wider defective socio-economic groups. Moreover, our results indicate that members of a same family were often contaminated by different strains. The latter result is consistent with observations in other high incidence areas indicating that, within families with several diseased members, transmission of tuberculosis may originate from contacts outside the household [56]. This factor additionally complicates identification of sources of infections by classical epidemiological investigation. Therefore, it would be especially useful to develop in routine molecular epidemiology studies, in order to better understand the dynamics of the disease in these environments and to optimize current DOTS-based control programs.

Acknowledgments

We gratefully thank Dr Kristin Kremer, Dr Dick van Soelingen (National Institute of Public Health and the Environment, the Netherlands), Dr Jaouad Berrada, and Miss Ouafae Bendadda (Institut Agronomique et Vétérinaire, Morocco) for providing the stocks used for comparison purposes. We thank also Dr Nouzha Bencheikh (Department of Health, Morocco) for providing the data concerning tuberculosis distribution in Morocco, and Dr Pablo Bifani for critical reading of the manuscript.

References

1. Raviglione MC, Snider DE Jr, Kochi A. Global epidemiology of tuberculosis. Morbidity and mortality of a worldwide epidemic. *JAMA* **1995**; 273: 220-6.
2. Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione MC. Consensus statement: global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. *J Am Med Assoc* **1999**; 282: 677-86.
3. van Embden JD, Cave MD, Crawford JT et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* **1993**; 31: 406-9.
4. Cave MD, Eisenach KD, McDermott PF, Bates JH, Crawford JT. IS6110: conservation of sequence in the *Mycobacterium tuberculosis* complex and its utilisation in DNA fingerprinting. *Mol Cell Probes* **1991**; 5: 73-80.
5. Kremer K, van Soolingen D, Frothingham R et al. 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* **1999**; 37: 2607-18.
6. McHugh TD, Gillespie SH. Non random association of IS6110 and *Mycobacterium tuberculosis*: implications for molecular epidemiological studies. *J Clin Microbiol* **1998**; 36: 1410-3.
7. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *M. tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* **1997**; 35: 907-14.
8. Frothingham R, Meeker-O'Connell WA. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology* **1998**; 144: 1189-96.

9. Skuce RA, McCorry TP, McCarroll JF et al. Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria using novel VNTR-PCR targets. *Microbiology* **2002**; 148: 519-28.
10. van Soolingen D, de Haas PE, Hermans PW, Groenen PM, van Embden JD. Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* **1993**; 31: 1987-95.
11. Mazars E, Lesjean S, Bañuls AL et al. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proc Natl Acad Sci USA* **2001**; 98: 1901-6.
12. Supply P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, van Soolingen D, Locht C. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol* **2001**; 39: 3563-71.
13. Bazzicalupo M, Fani R. The use of RAPD for generating specific DNA probes for microorganisms. *Meth Mol Biol* **1996**; 50: 155-75.
14. Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl Acids Res* **1990**; 18: 6531-5.
15. Richner SM, Meiring J, Kirby R. A study of the genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from patients in the eastern province of South Africa using random amplified polymorphic DNA profiling. *Electrophoresis* **1997**; 18: 1570-6.
16. Harn HJ, Shen KL, Hon LI et al. Evidence of transmission of *Mycobacterium tuberculosis* by random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting in Taipei City, Taiwan. *J Clin Pathol* **1997**; 50: 505-8.
17. Tibayrenc M. Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. *Adv Parasitol* **1995**; 36: 47-115.

18. Ottmani S, Laasri L, Chaulet P et al. La tuberculose et la lutte antituberculeuse au Maroc de 1980 à 1998. *Bull Epidem* **1998**; 35: 2-11.
19. Laraqui CH, Ottmani S, Hammou MA, Bencheikh N, Mahjour J. Study of tuberculosis in health care workers in the public sector of Morocco. *Int J Tuberc Lung Dis* **2001**; 5: 939-45.
20. Aghandous R, Zouhdi M, Zizi M, Errami M, Idrissi L. *Mycobacterium* resistance to antimycobacterial reagent. *Therapie* **1999**; 54: 623-5.
21. El Baghdadi J, Lazraq R, Ibrahimy S, Bouayad Z, Guinet R, Benslimane A. Survey of primary drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Casablanca, Morocco. *Int J Tuberc Lung Dis* **1997**; 1: 309-13.
22. El Baghdadi J, Lazraq R, Ibrahimy S, Benslimane A. Molecular typing of Moroccan strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Bull Soc Pathol Exot* **1997**; 90: 156-9.
23. El Baghdadi J, Lazraq R, Benani A, Naciri M, Ibrahimy S, Benslimane A. PCR detection of *Mycobacterium tuberculosis* lacking IS6110. *Bull Soc Pathol Exot* **1997**; 90: 303-6.
24. Lazraq R, El Baghdadi J, Guesdon JL, Benslimane A. Evaluation of IS6110 as amplification target for direct tuberculosis diagnosis. *Pathol Biol* **1999**; 47: 790-6.
25. Canetti G, Rist N, Grosset J. Mesure de la sensibilité du bacille tuberculeux aux drogues antibacillaires par la méthode des proportions. *Rev Tuberc Pneum* **1963**; 27: 217-72.
26. van Soolingen D, de Haas PE, Hermans PW, van Embden JD. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. *Meth Enzym* **1994**; 235: 196-205.
27. Hide M, Bañuls AL, Tibayrenc M. Genetic heterogeneity and phylogenetic status of *Leishmania (Leishmania) infantum* zymodeme MON-1: epidemiological implications. *Parasitology* **2001**; 12: 425-32.

28. Brisse S, Barnabe C, Tibayrenc M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int J Parasitol* **2000**; 30: 35-44.
29. Prugnolle F, De Meeus T, Durand P, Sire C, Theron A. Sex-specific genetic structure in *Schistosoma mansoni*: evolutionary and epidemiological implications. *Mol Ecol* **2002**; 11: 1231-8.
30. Hilali F, Ruimy R, Saulnier P et al. Prevalence of virulence genes and clonality in *Escherichia coli* strains that cause bacteremia in cancer patients. *Infect Immun* **2000**; 68: 3983-9.
31. Urdaneta L, Lal A, Barnabe C et al. Evidence for clonal propagation in natural isolates of *Plasmodium falciparum* from Venezuela. *Proc Natl Acad Sci USA* **2001**; 98: 6725-9.
32. Pujol C, Joly S, Lockhart SR, Noel S, Tibayrenc M, Soll DR. Parity among randomly amplified polymorphic DNA method, multilocus enzyme electrophoresis, and Southern blot hybridization with the moderately repetitive DNA probe Ca3 for fingerprinting *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* **1997**; 35: 2348-58.
33. Blanc DS, Bañuls AL, Hauser PM et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: phylogenetic relatedness between European epidemic clones and Swiss sporadic strains. *Microb Drug Resist* **2000**; 6: 231-8.
34. Supply P, Mazars E, Lesjean S, Vincent V, Gicquel B, Locht C. Variable human minisatellites-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol Microbiol* **2000**; 36: 762-71.
35. Pasteur N, Pasteur G, Bonhomme F, Catalan J, Britton-Davidian J. Manuel Technique de Génétique par Electrophorèse des protéines. In: Lavoisier eds Techn Doc, Paris, **1987**: 232.

36. Selander RK, Levin BR. Genetic diversity and structure in *Escherichia coli* populations. *Science* **1980**; 210: 545-7.
37. Tibayrenc M, Kjellberg F, Ayala FJ. A clonal theory of parasitic protozoa: the population structure of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and its medical and taxonomical consequences. *Proc Natl Acad Sci USA* **1990**; 87: 2414-8.
38. Tibayrenc M, Kjellberg F, Arnaud J et al. Are eukaryotic microorganisms clonal or sexual? A population genetics vantage. *Proc Natl Acad Sci USA* **1991**; 88: 5129-33.
39. Tibayrenc M. Population genetics and strain typing of microorganisms: how to detect departures from panmixia without individualizing alleles and loci. *C R Acad Sci III* **1995**; 318: 135-9.
40. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **1987**; 4: 406-25.
41. Jaccard P. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull So Vaudoise Sci. Nat* **1908**; 44: 223-70.
42. Kluge AG, Farris JS. Quantitative phyletics and the evolution of anurans. *Syst Zool* **1969**; 18: 1-32.
43. Farris JS. Methods for computing Wagner trees. *Syst Zool* **1970**; 19: 83-92.
44. Efron B. Bootstrap methods: an other look at the jackknife. *Ann Statist* **1979**; 7: 1-26.
45. Chevenet F, Bañuls AL, Barnabe C. TreeDyn: un éditeur interactif d'arbres phylogénétiques. In: Caraux G, Gascuel O, Sagot MF, eds. Actes des Premières Journées Ouvertes Biologie, Informatique et Mathématiques, Montpellier, ENSAM/LIRMM, **2000**: 87-90.
46. Maynard Smith J, Smith NH, O'Rourke M, Spratt BG. How clonal are bacteria? *Proc Natl Acad Sci USA* **1993**; 90: 4384-8.

47. Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE et al. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. Proc Natl Acad Sci USA **1997**; 94: 9869-74.
48. Musser JM, Amin A, Ramaswamy S. Negligible genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* host immune system protein targets: evidence of limited selective pressure. Genetics **2000**; 155: 7-16.
49. Fleischmann RD, Alland D, Eisen JA et al. Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. J Bacteriol **2002**; 184: 5479-90.
50. Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M et al. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Proc Natl Acad Sci USA **2002**; 99: 3684-9.
51. Smittipat N, Palittapongarnpim P. Identification of possible loci of variable number of tandem repeats in *Mycobacterium tuberculosis*. Tuber Lung Dis **2000**; 80: 69-74.
52. Pineda-Garcia L, Ferrera A, Hoffner SE. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* strains from patients with pulmonary tuberculosis in Honduras. J Clin Microbiol **1997**; 35: 2393-7.
53. Hermans PW, Messadi F, Guebrexabher H et al. 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 **1995**; 171: 1504-13.
54. van Soolingen D, Qian L, de Haas PE et al. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of east Asia. J Clin Microbiol **1995**; 33: 3234-8.
55. Warren R, Hauman J, Beyers N et al. Unexpectedly high strain diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in a high-incidence community. S Afr Med J **1996**; 86: 45-9.
56. Classen CN, Warren R, Richardson M et al. Impact of social interactions in the community on the transmission of tuberculosis in a high incidence area. Thorax **1999**; 54: 136-40.

Figure legends

- Figure 1:

Map of Casablanca representing the 7 districts of this city. Each number (1 to 7) corresponds to a given district. 1: HHAC (Hay Hassani Ain Chock); 2: CA (Casablanca Anfa); 3: FDS (Fida Derb Sultan); 4: HMAS (Hay Mohammadi Ain Sebaa); 5: BMSO (Ben Msik Sidi Othmane); 6: BZ (Bernoussi Zenata); 7: MOH (Mohammedia).

- Figure 2-a, 2-b:

These gels show two examples of tests of reproducibility and legibility of RAPD patterns obtained with U10 (figure 2-a) and U16 (figure 2-b) primers. 13, 14 and 15 correspond to different stocks of *Mycobacterium tuberculosis*. The letters α and β indicate two successive amplifications. The size standard used was λ DNA digested by *EcoRI* and *HindIII*.

- Figure 3:

Electrophoretic pattern obtained by RAPD with U16 primer for some Moroccan isolates. Lane numbers correspond to codes of isolates (table 1). The size standard used was λ DNA digested by *EcoRI* and *HindIII*.

- Figure 4:

Electrophoretic pattern obtained by PCR-MIRU with the locus 4 for some Moroccan isolates. Lane numbers correspond to codes of isolates (table1). M1 and M2 correspond respectively to 20-100 pb and 100 pb superladders-low. The negative control (C-) is also illustrated.

- Figure 5:

Neighbor-Joining tree based on MIRU-VNTR data and presenting the relationships between all the stocks under study. *M. canettii* stock is used as outgroup. The species of each stock used as reference is noted. Moreover, for the reference *M. tuberculosis* stocks, the geographic origin is also shown.

Table 1:

List of the Moroccan *Mycobacterium tuberculosis* isolates under survey, the clinical characteristics of the corresponding patients and the resistance profiles of each isolate.

Code	District	Gender	Year of birth	Year of diagnosis	Clinical form	Resistance profile
1	MOH	M	1966	1998	Chronic	R(H,S,R,E) – MDR
2	HMAS	F	1960	2000	New case	Unknown
3	HMAS	F	1964	1997	Chronic	R(H,S,R,E) – MDR
4	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown
5', 5*	CA	F	1965	1977	Chronic, Follow-up	R(H,S,R,E) – MDR
6	HMAS	F	1960	1993	Chronic	R(H,R) – MDR
7	HMAS	M	1953	2000	New case	R(H,S) – RI
8	HMAS	M	1970	1998	New case	S
9	HMAS	M	1971	1997	New case	S
10	HMAS	F	1957	1997	New case	S
11	HMAS	M	1975	1998	New case	R(H) – RI
12	HMAS	M	1962	1998	New case	S
13	HMAS	M	1954	1998	New case	S
14	HMAS	M	1980	1998	New case	S
16	HMAS	M	1961	1997	New case	S
17	HMAS	M	1965	1998	New case	S
18	HMAS	F	1974	1998	New case	S
19	HMAS	M	1965	2000	New case	Unknown
20	HMAS	F	1978	1995	Chronic, Family 1	R(H,R,E) – MDR
21	HMAS	M	1982	1994	Chronic, Family 1	R(H,R,E) – MDR
22	CA	M	1959	1977	Chronic	R(H,S,R) – MDR
23	BMSO	M	1980	1997	Chronic	R(H,S,R) – MDR
24	HHAC	F	1974	1996	Chronic	R(H,S,R,E) – MDR
25	CA	M	1964	1991	Chronic, Family 2	S

26	HMAS	F	1978	1997	New case, Family 3	S
27	HMAS	M	1950	1997	Relapse	R(H,S)
28	CA	M	1956	1978	Chronic	R(S,R)
29	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown
30	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown
31	HMAS	M	1963	1996	New case	S
32	HMAS	M	1976	1997	New case	R(H,R) – MDR
33	CA	M	1962	1994	Chronic	R(S,R)
34	HMAS	F	1949	1993	Chronic, Family 4	R(H,S,R) – MDR
35	CA	M	1967	1987	Chronic	R(H,S,R,E) – MDR
36	BMSO	M	1961	1998	New case	R(H,R) – MDR
37	HMAS	F	1969	1995	Chronic, Family 4	R(H,S,R) – MDR
38	HMAS	F	1994	1996	New case	S
39	HMAS	F	1977	2000	New case	S
40	CA	M	1972	1997	Chronic	S
41, 41'*	HMAS	M	1974	2000	New case, Follow-up	S
42	CA	F	1966	1990	Chronic	R(H,S,R,E) – MDR
43	HMAS	F	1948	1997	New case	R(S) – RI
44	BMSO	M	1958	1998	New case	S
45	BMSO	M	1960	1998	New case	S
46	CA	M	1971	1998	New case	S
47	BMSO	F	1962	1998	New case	S
48	HHAC	M	1955	1998	New case	S
49	BMSO	M	1960	1998	New case	S
50	BMSO	F	1961	1998	New case	S
51	HMAS	M	1980	2000	New case, Family 1	S
52	CA	M	1969	1992	New case, Family 5	S
53	CA	M	1974	1994	Chronic, Family 5	R(S)
54	CA	M	1957	1995	Chronic	R(H,S,R,E) – MDR
55	CA	F	1970	1992	Chronic, Family 2	S

56, 56**	HMAS	M	1979	1995	Relapse, Family 3, Follow-up	R(R)
57	CA	M	1963	1992	Chronic	R(H,S,R,E) – MDR
58	HMAS	F	1982	2000	New case, Family 4	R(S,R) – RI
59	FDS	F	1965	1998	New case	R(H,S,R) – MDR
60	BMSO	M	1978	1998	New case	R(H) – RI
61	HHAC	F	1963	1998	New case	R(H,S,R) – MDR
62	HMAS	M	1977	1997	New case	S
63	HMAS	M	1955	1997	New case	S
64	HMAS	M	1970	1997	New case	S
65	HMAS	M	1958	1997	New case	S
66	HMAS	F	1972	1997	New case	S
67	HMAS	M	1979	1997	New case	S
68	HMAS	F	1926	1997	New case	S
69	HMAS	F	1967	1997	New case	S
70	HMAS	M	1973	1997	New case	S
71	HMAS	M	1982	1997	New case	S
72	BMSO	M	1952	1997	New case	R(H,R) – MDR
73	HMAS	F	1967	1997	New case	S
74	HMAS	F	1979	1997	New case	S
75	HMAS	M	1977	1997	New case	S
76	HMAS	M	1981	1997	New case	R(S) – RI
77	HMAS	M	1967	1997	New case	S
78	HMAS	M	1978	1997	New case	S
79	HMAS	F	1975	1997	New case	S
80	HMAS	M	1963	1997	New case	S
81	HMAS	M	1963	1997	New case	S
82	HMAS	M	1968	1997	New case	S
83	HMAS	M	1964	1997	New case	S
84	HMAS	F	1962	1997	New case	S
85	HMAS	F	1964	1997	New case	S

86	HMAS	M	1975	1998	New case	S
87	BMSO	M	1972	1998	New case	R(S) – RI
88	BMSO	F	1957	1998	New case	R(H,S,R) – MDR
89	HMAS	M	1963	1998	New case	S
90	BMSO	M	1979	1998	New case	R(H,S) – RI
91	HMAS	M	1982	1998	New case	S
92	HMAS	M	1969	1991	New case	S
93	HMAS	M	1971	1997	New case	S
94	BMSO	M	1923	1997	New case	R(H,S) – RI
95	HMAS	M	1976	1998	New case	S
97#	Benslimane	M	1963	1987	Chronic	R(H,R) – MDR
98	BMSO	F	1952	1998	New case	S
99	CA	F	1963	1998	New case	S
100	BMSO	M	1980	1998	New case	S
101	BMSO	F	1978	1998	New case	S
102	FDS	M	1982	1998	New case	S
103	HHAC	M	1965	1998	New case	S
104	BMSO	M	1978	1998	New case	S
105	HHAC	F	1956	1998	New case	R(H) – RI
106	HMAS	M	1967	1998	New case	S
107	HMAS	M	1978	1998	New case	S
109	BMSO	M	1975	1998	New case	S
110	HMAS	F	1964	1998	New case	R(S) – RI
111	HMAS	M	1978	1998	New case	S
112	HMAS	M	1958	1998	New case	R(H) – RI
113	BMSO	M	1964	1998	New case	R(H,S) – RI
114	BMSO	M	1974	1998	New case	R(H,S,R) – MDR
115	BMSO	F	1962	1998	New case	S
116	HMAS	M	1966	1998	New case	S
117	HMAS	M	1960	1997	New case	R(H,S) – RI

118	HMAS	M	1968	1997	Chronic, Family 6	Unknown
119, 119'*	HMAS	M	1982	2000	New case, Family 6, Follow-up	S
120	HMAS	M	1976	1997	New case	S
121	HMAS	M	1958	1998	New case	S
122	HMAS	F	1960	1998	New case	S
123	HMAS	M	1976	1997	New case	S
124	HMAS	M	1969	1997	New case	S
125	HMAS	M	1954	1998	New case	S
126, 126'*	HMAS	M	1950	1976	Chronic, Follow-up	R(H,R,E) – MDR
127	HMAS	M	1925	1998	New case	S
128	HMAS	M	1966	1998	New case	S
129	HMAS	F	1972	1998	New case	S
130	HMAS	F	1960	1998	New case	S
131	HMAS	M	1972	2000	New case, Family 7	S
132	HMAS	M	1974	2000	New case, Family 7	S
133	HMAS	M	1944	2000	New case, Family 7	S
134	HMAS	M	1926	1998	New case	S
135	HMAS	F	1976	1997	New case	S
136	HMAS	F	1963	1984	Chronic	R(H,S,R,E) – MDR
137	HMAS	M	1940	1997	New case	S
138	BMSO	M	1968	1998	New case	R(H,S) – RI
139	HMAS	M	1971	1997	New case	S
140	HMAS	F	1980	1997	New case	S
141	HMAS	M	1954	1998	New case	S
142	HMAS	F	1935	1998	New case	S
143	FDS	M	1951	1998	New case	R(H,S,R) – MDR
144	HMAS	M	1978	1997	New case	S
145	HMAS	M	1965	1998	Relapse	R(R)
146	HHAC	M	1970	1998	New case	S
147	HMAS	F	1979	1998	New case	S

148	HMAS	M	1970	1997	New case	S
149	HMAS	F	1981	1997	New case	R(H,S) – RI
150	CA	M	1961	1992	Chronic	R(H,S,R) – MDR
151	HMAS	F	1973	1998	New case	S
152	MOH	M	1956	1997	New case	R(H,S,R) – MDR
153	HMAS	F	1975	1995	Relapse, Family 3	S

- (#): The stock 97 is the only stock isolated outside Casablanca.

- (*): Each pair (5 and 5', 41 and 41', 56 and 56', 119 and 119', 126 and 126') corresponds to the follow-up of the same patient.

- Abbreviations used in table 1:

- Gender: M (Male), F (Female);

- Districts of Casablanca: HMAS (Hay Mohammadi-Aïn Sebaa), BMSO (Ben Msik-Sidi Othmane), CA (casablanca-Anfa), FDS (Fida-Derb Sultan), HHAC (Hay Hassani-Aïn Chock), and MOH (Mohammedia);

- Resistance profile: R(H, S, R, E) (Resistant to Isoniazid, Streptomycin, Rifampin, and Ethambutol respectively); S (Sensitive); MDR (Multi-Drug Resistant tuberculosis); RI (Primary resistance).

Table 2:

List of the stocks used as references.

Code	Stock ^a	Species	Geographic origin	Host
M24		<i>Mycobacterium bovis</i>	Morocco	Cattle
M11		<i>Mycobacterium bovis</i>	Morocco	Cattle
K5		<i>Mycobacterium bovis</i>	Morocco	Cattle
P101	12	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tunisia	Human
P56	62	<i>Mycobacterium microti</i>	United Kingdom	Unknown
P95	34	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Malaysia	Human
P54	92	<i>Mycobacterium africanum</i>	The Netherlands	Human
P55	100	<i>Mycobacterium africanum</i>	The Netherlands	Human
P62	117	<i>Mycobacterium bovis</i>	Argentina	Cattle
P112	53	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Argentina	Human
P118	50	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Czech Republic	Human
P25	10	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Ecuador	Human
P81	11	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Greenland	Human
P125	74	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	India	Human
P129	42	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tahiti	Human
P131	85	<i>Mycobacterium bovis</i>	The Netherlands	Human
P33	37	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Uganda	Human
P48	116	<i>Mycobacterium canettii</i>	Somalia	Human
PA1		<i>Mycobacterium africanum</i>	France	Unknown
PA2		<i>Mycobacterium africanum</i>	Unknown	Unknown
PA3		<i>Mycobacterium africanum</i>	Cameroon	Unknown
H37Rv		<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	France	-

^aStrain numbers are identical to those of Kremer et al. [5].

Table 3:

Sequences of the 10 RAPD primers used in this study.

Primer	Sequence	Primer	Sequence
A2	5'-TGCCGAGCTG-3'	U13	5'-GGCTGGTTCC-3'
N9	5'-TGCCGGCTTG-3'	U16	5'-CTGCGCTGGA-3'
R8	5'-CCCGTTGCCT-3'	U17	5'-ACCTGGGGAG-3'
R13	5'-GGACGACAAG-3'	U19	5'-GTCAGTGCGG-3'
U10	5'-ACCTCGGCAC-3'	U20	5'-ACCTCGGCAC-3'

Table 4:

Diversity indices obtained with RAPD and MIRU data.

Sample	Sample size	Genotypic diversity (RAPD/MIRU)	Polymorphism rate (RAPD/MIRU)	Genetic diversity (<i>H</i>) (RAPD/MIRU)
Moroccan MTB isolates	150	0.91/0.63	1/0.8	0.48/0.38
MTB -- HMAS	97	0.89/0.66	0.9/0.8	0.42/0.37
Year 1997	49	0.96/0.73	0.9/0.8	0.43/0.35
Year 1998	60	0.95/0.78	1/0.7	0.44/0.38
MTB – HMAS – 1997	44	0.95/0.73	0.9/0.7	0.4/0.35
MTB – HMAS – 1998	30	0.97/0.9	0.9/0.7	0.36/0.38

MTB corresponds to the species *Mycobacterium tuberculosis*.

Table 5:

Population genetics analysis for the Moroccan *M. tuberculosis* population with RAPD and MIRU data.

Sample	Sample size	Test <i>f</i> (RAPD/MIRU)	Test <i>d1</i> (RAPD/MIRU)	Test <i>d2</i> (RAPD/MIRU)	Test <i>e</i> (RAPD/MIRU)
Moroccan MTB isolates	150	$p \leq 10^{-4} / p \leq 10^{-4}$	$p \leq 10^{-4} / p \leq 10^{-4}$	$2.6 \times 10^{-2} / p \leq 10^{-4}$	$p \leq 10^{-4} / p \leq 10^{-4}$
MTB – HMAS	97	$p \leq 10^{-4} / p \leq 10^{-4}$	$1.3 \times 10^{-3} / p \leq 10^{-4}$	$3.6 \times 10^{-1} / p \leq 10^{-4}$	$p \leq 10^{-4} / p \leq 10^{-4}$
Year 1997	49	$3.7 \times 10^{-3} / p \leq 10^{-4}$	$4.6 \times 10^{-2} / p \leq 10^{-4}$	$4.9 \times 10^{-1} / p \leq 10^{-4}$	$1.4 \times 10^{-1} / p \leq 10^{-4}$
Year 1998	60	$p \leq 10^{-4} / p \leq 10^{-4}$	$5.7 \times 10^{-3} / p \leq 10^{-4}$	$2.8 \times 10^{-2} / 2.4 \times 10^{-3}$	$1.5 \times 10^{-2} / p \leq 10^{-4}$
MTB – HMAS – 1997	44	$4.6 \times 10^{-3} / p \leq 10^{-4}$	$8.1 \times 10^{-2} / p \leq 10^{-4}$	$6.4 \times 10^{-1} / p \leq 10^{-4}$	$2.6 \times 10^{-1} / p \leq 10^{-4}$
MTB – HMAS – 1998	30	$1.6 \times 10^{-1} / 10^{-4}$	$1.3 \times 10^{-1} / p \leq 10^{-4}$	$6.2 \times 10^{-1} / 1.5 \times 10^{-1}$	$6.2 \times 10^{-1} / 3 \times 10^{-4}$

MTB corresponds to the species *Mycobacterium tuberculosis*.

Figure 1

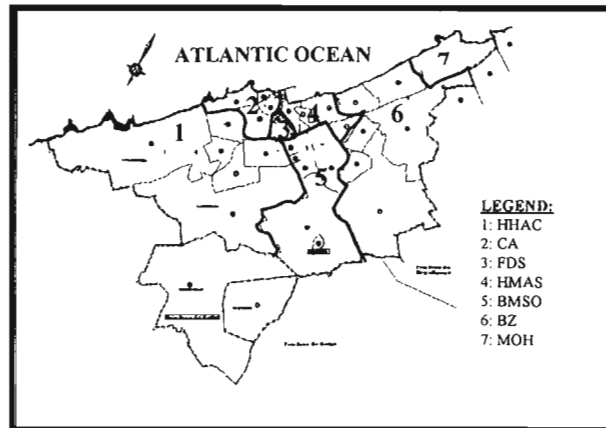


Figure 2

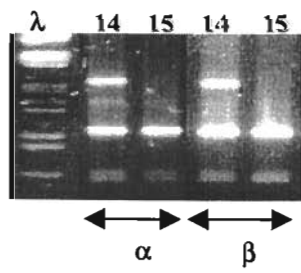


Figure 2-a

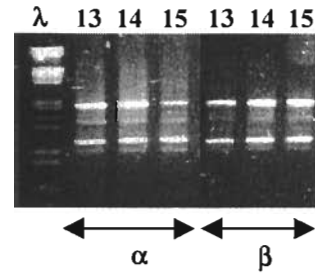


Figure 2-b

Figure 3

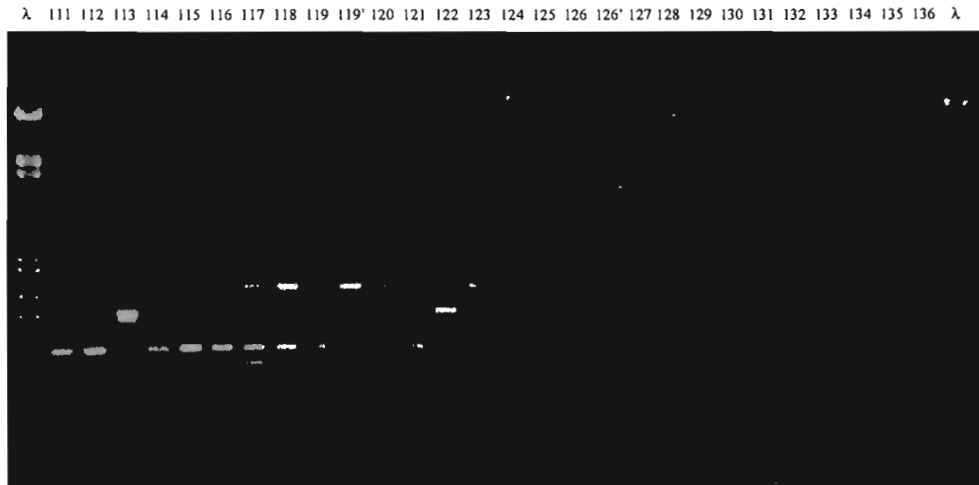


Figure 4

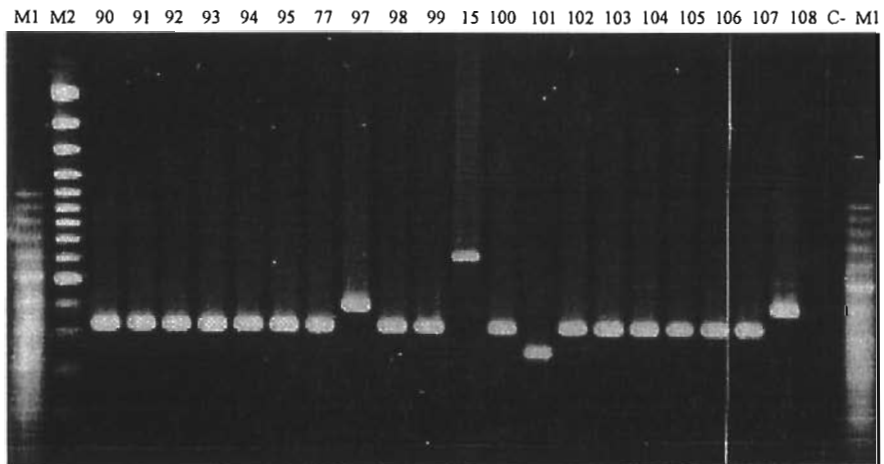
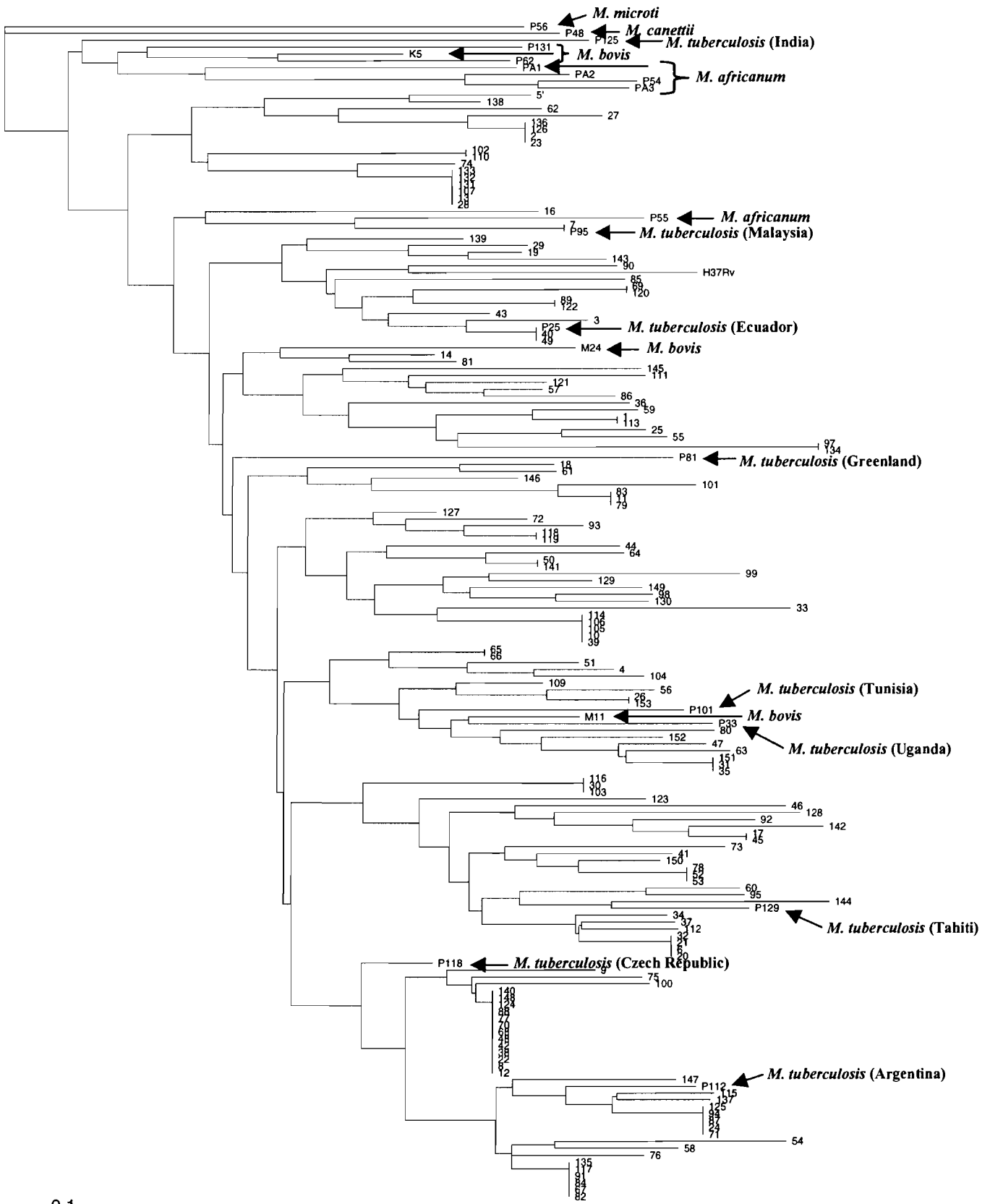


Figure 5



RESUME en français

La tuberculose est une maladie infectieuse et contagieuse, dont l'agent pathogène principal est l'espèce *Mycobacterium tuberculosis* (Koch, 1882). Au Maroc, comme d'autres pays en voie de développement, cette maladie pose encore un problème majeur de santé publique. Malgré l'application de la stratégie DOTS de l'OMS depuis 1991, l'incidence de la tuberculose au Maroc n'a pas diminué. De plus, d'un point de vue génétique, on connaît très peu de choses sur la propagation de *M. tuberculosis* dans ce pays. Ce travail a pour objectif principal d'analyser la diversité génétique et la structure d'une population de *M. tuberculosis* isolée dans la capitale économique du Maroc, Casablanca. Cette analyse permet non seulement de comprendre le mode de transmission de la tuberculose à Casablanca, mais elle apporte également des informations générales sur la génétique et la structure des populations de l'espèce *M. tuberculosis*. L'analyse de l'échantillon d'étude est réalisée par 2 marqueurs moléculaires complémentaires et indépendants : RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) et MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units – Variable Number of Tandem Repeats). Cette étude montre que la population marocaine présente une structure fondamentalement clonale, n'excluant pas l'existence d'échanges génétiques occasionnels. Par ailleurs, ce travail révèle une diversité génétique importante au sein de la population étudiée de *M. tuberculosis*. Les résultats obtenus sont inattendus non seulement d'un point de vue génomique mais également populationnel. L'analyse phylogénétique a confirmé également l'hétérogénéité obtenue dans cette population. D'un point de vue épidémiologique, l'ensemble des résultats de cette étude suggère une origine ancienne de la tuberculose. De plus, la réactivation d'infections latentes serait responsable de la situation endémique de cette maladie dans la ville de Casablanca.

TITRE en anglais

Analysis of genetic diversity and population structure of *Mycobacterium tuberculosis* for the study of tuberculosis transmission in Casablanca, Morocco.

RESUME en anglais

Tuberculosis is an infectious and contagious disease caused principally by the species *Mycobacterium tuberculosis* (Koch, 1882). In Morocco, as well as other developing countries, this disease represents already a major problem of public health. Despite the use of DOTS strategy since 1991, the incidence of tuberculosis in Morocco is still increasing. Moreover, from a genetic point of view, little is known about the transmission of *M. tuberculosis* in this country. The main purpose of this work is to analyze the genetic diversity and the structure of a *M. tuberculosis* population isolated in the economic capital of Morocco, Casablanca. This analysis permits not only to understand the transmission of tuberculosis in Casablanca, but it gives also general information about genetics and population structure of the *M. tuberculosis* species. The sample under study is analyzed by 2 independent and complementary molecular markers: RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), and MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Polymorphic – Variable Number of Tandem Repeats). This study shows that the Moroccan population presents a fundamental clonal structure, without excluding the occurrence of occasional genetic exchanges. Moreover, this work shows an important genetic diversity in the *M. tuberculosis* population under study. The results obtained are unexpected from a genomic and populational point of view. The phylogenetic analysis confirms also the heterogeneity obtained in this population. From an epidemiological point of view, all the results of the study suggest an ancient origin of tuberculosis. Moreover, the reactivation of latent infections would be responsible for the endemic situation of this disease in Casablanca.

DISCIPLINE

Biochimie et Biologie Moléculaire.

MOTS-CLES

Mycobacterium tuberculosis, tuberculose, diversité génétique, épidémiologie moléculaire, structure des populations, phylogénie, RAPD, MIRU-VNTR, Casablanca, Maroc.

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE

Génétique des Maladies Infectieuses (GMI, ex-CEPM).
Centre IRD de Montpellier, Génétique des Maladies Infectieuses, UMR CNRS-IRD 9926, 911 Avenue Agropolis, BP 64501, 34 394 Montpellier Cedex 5, France.