République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE KASDI MERBAH OUARGLA

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences Biologiques

Mémoire

MASTER ACADEMIQUE

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière: Biologie

Spécialité: Biochimie appliquée

Présenté par :

CHENINE Aziza Safaa et MOKRANI Selma

Mise en marche d'un test PCR en temps réel pour diagnostiquer la tuberculose

Soutenu publiquement

Le : 03/ 07/2019

Devant le jury:

Mme	TELLI A.	MCB	Président	UKM Ouargla
M.	BOUAL Z.	MCA	Encadreur	UKM Ouargla
M.	HADJDJ S.	Docteur	CO-encadreur	
M.	MOSBAH S.	MCB	Examinateur	UKM Ouargla

Année universitaire: 2018/2019

Remerciements

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut...

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, le

respect, la reconnaissance...

Les mots justes sont difficiles à trouver pour exprimer nos remerciements à :

Avant tout

À « Allah », le tout puissant,

Qui nous a inspiré

Qui nous a donné la force, le courage, la persistance ainsi que l'audace pour dépasser toutes les difficultés.

Qui nous a permis d'exploiter les moyens disponibles à fin d'accomplir ce modeste travail.

Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

Louanges et remerciements

Pour votre clémence et miséricorde

{ سبحانك لاعلم لنا إلا ماعلمتنا

إنك أنت العليم الحكيم }

سورة البقرة :الآية :31

Un très grand merci à

Dr. HADJDJ Sofiane

Directeur du Laboratoire d'Analyse Médicale El Amel Ouargla, titulaire d'un Diplôme d'études spécialisé de la Faculté de Médecine d'Alger et d'un Diplôme Universitaire de la Faculté de Médecine de Montpellier, France.

Notre CO-encadreur pour l'effort fournis, sa gentillesse, ses précieux conseils, son soutient, pour sa grande disponibilité et ses encouragements tout au long de la réalisation de notre mémoire.

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés au sein ***du laboratoire d'Analyse Médicale El Amel*** *dirigé par son directeur Dr. HADJDJ Sofiane.*

Nos remerciements à tous les membres de ce laboratoire en particulier ALAOUANI SalahHADJ MOUSSAAli pour leurs conseils, leurs aides et leurs soutient.

Remerciement particulier à ***REFFIS Mohamed*** *pour tous ses conseils et orientation ont grandement facilité ce travail.*

Nous tenons à remercier particulièrement

M. BOUAL Zakaria

Maître de Conférences au Département des Sciences Biologiques à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Kasdi Merbah-Ouargla

Qui a encadré ce travail minutieusement depuis les premiers instants, avec toute compétence, pédagogie, ouverture d'esprit, vision de recherche scientifique, écoute, et patience.

Qui a toujours été présent pour nous orienter. Il nous a permis d'approfondir au maximum ce travail afin de pouvoir être fiers aujourd'hui du travail réalisé.

Vous allez trouvez Monsieur, dans ce travail le fruit de votre fructueuse enseignement qui vous nous avez prodigué.

Veuillez, Monsieur, accepter l'expression de notre profond respect et notre reconnaissance.

Nous exprimons nos profondes reconnaissances à

Mme TELLi Alia

Maître de Conférences au Département des Sciences Biologiques à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Kasdi Merbah-Ouargla, qui nous fait l'honneur de présider ce jury.Nousvous remercions vivement pour l'honneur que vous faites en acceptantde juger ce travail.

Nous tenons aussi à remercier

M MOSBAH Said

Maître de Conférences au Département des Sciences Biologiques à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Kasdi Merbah-Ouargla, pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Nous sommes très honorées de vous avoir parmi ce jury de mémoire. Veuillez croire à nos sincères remerciements.

Dédicace

A Ma très chère Mère

Pour l'affection, la tendresse et l'amour que tu m'a toujours donné, Pour le sacrifice et le dévouement dont tu as toujours fait preuve, Pour l'encouragement sans limites que tu ne cesses de manifester.
Aucun mot, aucune phrase ne peut exprimer mes sentiments profonds d'amour, de respect et de reconnaissance.
Que ce modeste travail soit un début de mes récompenses envers toi. Puisse le grand puissant te donner bonne santé et longue vie…

A tous les membres de ma famille qui ont toujours été à mes côtés pendant ce mémoire et qui m'ont toujours encouragé.; Mahdi, Abdou, Hamid, Razog, Sliman, Saad, Kaltom, Fatma et ***Ismahane.***

À mes chères amies Selma MOKRANI,Ahlam BOUGALMOUNA, ***Fatima Ghanem****, Hadjer AIDON, Sannaa Ben hammada, Amira SUIGAT, Halla LAKESS, Hafsa MANAA.*

Aussi à mes collègues de Master Biochimie, Sabrina, Bouthaina, Hassiba, Fahima, Salem…et tous les autres.

Aux amis et collègues surtout qui m'ont apporté leur support moral et intellectuel tout au long de ma démarche.

Je voudrais remercier aussi toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à mes recherches et à l'élaboration de ce mémoire.

Aziza

Dédicace

Au roi de ma vie mon chère père ***: Mokrani Abd elkader***

Pour tous les sacrifices que vous faits pour moi, pour tout confiance que vous m'avez donnée et tout encouragement qui m'ont soutenue tout au long de ma vie. Pour Votre amitié. Je sais que ce simple travail n'assimilez pas Vos honoraires mais J'espère que vous trouvé le témoignage de mes connaissances durant tout ma vie scolaire.

A la femme dont le paradis est sous ses pieds ma mère ***: Oum el-khire***

Pour vos appuis et votre soutien moral. Pour Le sourire que j'ai peint sur mon visage depuis mon enfance. J'espère que Ce travail a contribué à votre joie malgré vos sacrifices Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être.

A mes chères sœurs : ***Sara*** *et son fils* ***Achraf*** *et* ***Sidret elmontaha*** *la petite fleur de notre maison pour tous les efforts qui me fournissent avant et durant ce travail.*

A mes chères frères : ***Soufian, Saif eddine*** *et* ***Safouane*** *en témoignage de mon affection fraternelle, de ma profonde tendresse et reconnaissance.*

A mon cher oncle Khaddourmon conseiller, qui m'a assisté dans les moments difficiles et m'a pris doucement par la main pour traverser ensemble des épreuves pénibles….

A toute la famille de ***MOKRANI***

A mes chères amies CHENINE Aziza, BOUKHRIS Nour el hoda, MEHDJOUBI Hana, AZRI Souad et Fatima Ghanem qui sont me partagé les plus beaux moments.

A tous mes collègues de Master Biochimie surtout : ***Achoura, Ghalia, Oum el khir*** *, Sabrina et Fahima. Une dédicace spéciale à notre frère dans la promotion* ***Salem MAHCEN.***

Aux amis et collègues surtout qui m'ont apporté leur support moral et intellectuel tout au long de ma démarche.

Aux tous mes enseignant de primaire jusqu'à l'université spicialement monsieur ***KIOUAR Boubaker,Ben BRAHIM Naziha, NESSIL Fatma, BOUAL Zakaria et BOURICHA M'hamed.***

Selma

Liste d'abréviation

ADN: Acide Désoxyribo Nucléique.

AN : Acide nucléique**.**

ARNr: Acide RiboNucléique ribosomale.

BCG : Bacille de Calmette et Guérin.

BAL : Lavage Broncho-Alvéolaires.

CD : Cluster de Différenciation.

Ct : Cycle threshold.

CTAB : Bromure de cétyltriméthyl ammonium.

DMSO : DiMéthylSulfOxide.

FAM : 6-carboxyfluorescein

FRET : Transfert d'Energie de Résonance de Fluorescence.

IDR : Intra Dermo- Réaction à la tuberculine.

dATP: désoxy-Adénosine TriPhosphate.

dCTP: désoxy-Cetosine TriPhosphate.

dGTP: désoxy-Guanosine TriPhosphate.

dTTP: désoxy-Thymidine TriPhosphate.

IFNγ: Interferon gamma.

IL 2: Interleukin 2.

IS : Séquences d'Insertion.

KCl : Chlorure de potassium.

LCR : Liquide Céphalo-Rachidien.

LTh1: Lymphocyte T helper 1.

Mg^{2+} : ion demagnésium.

Mn^{2+} : ion de manganèse.

MTBC: Complexes *Mycobactérium tuberculosis.*

***M. tb**: Mycobacterium tuberculosis.*

NaCl : Chlorure de sodium.

OMS : Organisation Mondial de la Santé.

PCR : Polymerase Chain Reaction.

pH : potentiel d'Hydrogène.

PSM : Poste de Sécurité Microbiologique.

SDS : DodécylSulfate de Sodium.

SIDA : Syndrome d'Immuno-Déficience Acquise.

TAMRA : TetraMethylRhodAmine.

TET :tetrachlorofluorescein.

TB : Tuberculose.

TBEP : Tuberculose extrapulmonaire.

TNF: Facteur de Nécrose Tumoral.

Tris-HCl : 2-amino-2-hydroxyméthylpropane-1,3-diol.

UNG : l'uracile-N-glycosylase.

UV : Ultra Violet.

VIH: Virus d'Immunodéficience Humaine.

XDR-TB : Ulta Drug Risistance à la Tuberculose.

ZN: Ziehl Neelsen.

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
01	Résumé des examens bactériologiques (Varaine et Rich, 2014)	**23**
02	Contenu du kit *artus M tuberculosis* RG PCR.	**58**
03	Cycles seuil obtenus après amplification de ponction articulaire et de prélèvement vaginal extrait par le kit EZ1 DNA Blood 350 µl avec les standards utilisés	**68**
04	Cycles seuil obtenus après amplification de l'échantillon crachat ZN+ et des standards utilisées.	**73**
05	Cycles seuil obtenus après amplification de la ponction d'ascite extrait par le kit EZ1 DSP virus 48 et des standards utilisées.	**75**
06	Cycles seuil obtenus après amplification de ponction articulaire et de prélèvement vaginal extrait par le kit EZ1 DSP virus 48 version 4 avec les standards utilisés	**76**

Liste des figures

N°	Titre	Page
01	Structure de granulome tuberculeux**(Jamet, 2015).**	14
02	Examen direct d'un frottis réalisé à partir d'une expectoration. A. Après coloration à l'auramine (grossissement × 400).Présence de bacilles colorés en jaune fluorescent.**B.** Après coloration de Ziehl-Neelsen (grossissement × 1000). Présence de bacilles colorés en rose (**Martin et Denis, 2017).**	18
03	Principe de la PCR **(Monier et Cécillon, 2015)**.	29
04	Principe de la rt-PCR. contrairement à la PCR en point final **(Monier et Cécillon, 2015).**	30
05	Marqueurs intercalations de l'ADN sont incorporés au sillon mineur de l'ADNdb. Lorsque cela se produit, une lumière fluorescente est émet **(Overbergh *et al.,* 2010)**.	32
06	Principe du TaqMan **(Navarro, 2014).**	33
07	Principe de HybProbes **(Arya, 2005).**	33
08	Principe de balises moléculaires**(Mocellin *et al.,* 2003).**	34
09	Principe d'amorces Scorpion **(poitras et Houde, 2002).**	35
10	Schéma de principe d'extraction à l'aide de kit EZ1 DNA Blood 350 µl.	46

11	procédure d'extraction automatisée d'ADN avec EZ1 Advanced XL.	48
12	Schéma de principe d'extraction à l'aide de kit EZ1 DSP virus 48.	53
13	Table de travail cas d'utilisation de kit EZ1 DSP virus 48 versions 4.	55
14	Kit *artus M tuberculosis* RG PCR.	56
15	Liste de New Run Wizard pour le choix de modèle d'amplification.	59
16	Choix de type de rotor.	59
17	Définition des paramètres généraux du test.	60
18	Conformation de profile de température et de la fluorescence.	60
19	Réglage de profile de température de réaction.	61
20	Optimisation de la fluorescence.	62
21	Résultat de la PCR de la ponction articulaire et des standards utilisé après extraction par le kit EZ1 DNA Blood 350 µl.	66
22	Résultat de la PCR de prélèvement vaginal et des standards utilisés après extraction par le kit EZ1 DNA Blood 350 µl.	67
23	Courbe d'étalonnage des standards pour l'amplification d'ADN mycobacterien extrait via le kit EZ1 DNA Blood 350 µl.	68
24	Résultat d'amplification de crachat ZN+ après extraction par le kit EZ1 DSP virus 48.	70

25 Courbe d'étalonnage de l'amplification d'échantillon 3 crachats extraits par le kit EZ1 DSP virus 48. 71

26 Résultat de la PCR de la ponction d'ascite après extraction par le kit EZ1 DSP virus 48. 73

27 Résultat de la PCR de la ponction articulaire et de prélèvement vaginal et des standards utilisé après extraction par le kit EZ1 DSP virus 48. 74

TABLE DES MATIERES

Remerciemets.....

Dédicace.....

Liste des tableaux .....

Liste des figures .....

Liste d'abréviation .....

Introduction 2

PARTIE I SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUES

Chapitre I : GENERALITES SUR LA TUBERCULOSE

I.1.Recrudescence de la tuberculose 8

I.1.1. Causes de la recrudescence de la tuberculose 8

I.1.1.1. CO-infection (virus d'immunodeficience humaine(VIH) /tuberculose) 8

I.1.1.2. Emergence de souches multi-resistantes..... 9

I.1.1.3. Impact de la vaccination 10

I.1.2.Incidences 11

I.2. Etude bacteriologique..... 11

I.2. 1. Classification et pouvoir pathogène 11

I.2. 2. Caractères bactériologiques..... 12

I.2. 3. Caractéristiques du génome..... 13

I.3. Etude clinique 13

I.3.1. Tuberculose infection 13

I.3.2. Tuberculose maladie (tuberculose active) 15

I.4.Diagnostique..... 16

I. 4. 1. Radiographie du thorax 17

I. 4. 2. Examen bactériologique..... 17

I. 4. 2. 1. Examen microscopique 17

I. 4. 2. 2. Culture..... 19

I. 4. 2. Test immunologique 21

I. 4. 2. 1. Intradermoréaction à la tuberculine (IDR)..... 21

I.4. 2. 2. Test de libération d'interferon gamma (INFΓ) 22

I.4. 2. 3. Recherche d'antigènes 22

CHAPITRE IIPCR : Principe et application dans le diagnostic de la tuberculose

II.1. Extraction des acides nucleiques 25

II.1.1. Lyse cellulaire ..... ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.

II.1.2. Purification 26

II.1.3. Automatisation 27

II.2.Techniques d'amplification génique 27

II.2.1. Réaction de polymerisation en chaine (*polymerase chain reaction* ou PCR) 27

II.2.1.1. Principe 28

II.2.1.2. Détection 29

II.2.2. Réaction de polymerisation en chaine en temps réel (rt-PCR) 29

II.2.2.1. Principe 30

II.2.2.2. Avantage de la PCR en temps réel 30

II.2.2.3.Technologies de détection 31

II.2.2.4. PCR en temps reel et tuberculose 35

PARTIE II - Etude expérimentale

CHAPITRE I: Materiel et méthodes

I. 1. Principe d'étude 42

I.2. Lieu d'étude 42

I.3. Collecte des échantillons 43

I.4. Materiel biologique 43

I.5. Extraction de l'ADN 43

I.5.1. Choix de la méthode d'extraction de l'ADN 44

I.5.1.1. Extraction automatisée EZ1 advanced XL 44

I.5.1.1.1. Extraction automatisée EZ1 advanced XL a l'aide de kit EZ1 DNA Blood 350µl 45

I.5.1.1.2. Choix de prétraitement des échantillons 50

I.5.1.1.3. Préparation d'ARN carrier et de contrôle interne 51

I.5.1.1.4. Extraction automatisée EZ1 advanced XL a l'aide de kit EZ1 DSP virus 48 ... 52

I.6. Amplification de l'ADN 55

I. 1. Principe d'étude **42**

I.2. Lieu d'étude **42**

I.3. Collecte des échantillons **43**

I.4. Materiel biologique **43**

I.5. Extraction de l'ADN **43**

I.5.1. Choix de la méthode d'extraction de l'ADN **44**

I.5.1.1. Extraction automatisée EZ1 advanced XL ..... ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.

I.5.1.1.1. Extraction automatisée EZ1 advanced XL a l'aide de kit EZ1 DNA Blood 350µl ..... ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.

I.5.1.1.2. Choix de prétraitement des échantillons ..... ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.

I.5.1.1.3. Préparation d'ARN carrier et de contrôle interne ..... ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.

I.5.1.1.4. Extraction automatisée EZ1 advanced XL a l'aide de kit EZ1 DSP virus 48 ..... ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.

I.6. Amplification de l'ADN ..... ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.

CHAPITRE II - Résultats et discussion

II.1. Résultat d'amplification D'ADN mycobacterien extrait via le kit EZ1 DNA Blood 350 µl **65**

II.1.1. Résultat de la PCR de la ponction articulaire **66**

II.1.2. Résultat de la PCR de prélèvement vaginal **67**

II.1.3. Courbe d'étalonnage **68**

II.2. Résultat d'amplification d'adn mycobacterien extrait a l'aide de kit EZ1 DSP virus 48 ..... **70**

II.2.1. Résultat de la PCR de crachat ZN+ **70**

II.2.2. Courbe d'etalonnage **71**

II.2.3. Résultat de la PCR de la ponction d'ascite **72**

II.2.4. Résultat de la PCR de la ponction articulaire et de prélèvement vaginal **73**

Conclusion etperspectives **77**

References bibliographiques

Annexes

Introduction

Depuis les années1950 avec les progrès des moyens préventives et curatives ; un vaccin et des antibiotiques et l'amélioration des conditions socioéconomique ; d'hygiènes et de l'alimentation, la tuberculose a connue une régression et l'espoir de sa disparition était possible du moins dans les pays développées. Mais depuis une décennie cette maladie a connue un fort réapparition qui ne cesse de s'étendre mais aux contraire elle continue d'être l'une des principales causes de morbidité et de mortalité d'origine infectieuse à l'échelle mondiale **(Regnault, 2002 ; L'Hadj *et al.,* 2006 ;Garnotel, 2017).** Avec des estimations alarmantes : un tiers de la population mondiale infecté, un millions de personnes qui meurent chaque année avec 10 millions de nouveaux cas estimés en 2018, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) décrète la tuberculose une urgence et une priorité de santé publique **(Locht et Rouanet, 2011 ; Sidhom *et al.,* 2011; Ketata *et al.,* 2014; Soundarya *et al.,* 2019).**

Face à un tel problème, une stratégie de la lutte contre la tuberculose décrit par l'OMS durant la période fixée entre les années 2015 et 2030 est développée afin d'arriver à une réduction de 80 % de l'incidence de la tuberculose et une diminution de nombre de décès jusqu'à 90 % et d'éradiquer la maladie d'ici 2050. Pour atteindre ces objectifs, des efforts soutenus de l'OMS et de nombreuses organisations internationales ont été investis dans le développement et la mise en place de nouveaux tests de diagnostic **(Guillet-Caruba *et al.,* 2014 ; Slim-Saidi *et al.,* 2015 ; OMS, 2017).**

La prise en charge correcte du patient et aussi l'interruption de la transmission du bacille tuberculeux au sein de la population repose prioritairement sur un diagnostic précoce, sensible et précis **(Kerleguer *et al.,* 2002 ; Amin *et al.,* 2011 ; Wouter *et al.,*2011 ; Guillet-Caruba *et al.,* 2014 ; Toujani*et al.,* 2015).**

Causé par l'un des bacilles appartenant au complexe *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC), la tuberculose est une maladie infectieuse, sa localisation pulmonaire représente la forme la plus fréquente qui est la seule forme contagieuse. Par dissémination lympho-hématogène la tuberculose peut toucher n'import qu'elle organe aboutissant à une tuberculose extrapulmonaire. Bien que les symptômes de la tuberculose pulmonaire sont peu spécifique et qui sont la plupart de temps négligés par les patients, les symptômes de la tuberculose extrapulmonaire sont non spécifiques et dépendent de l'organe touché, en plus de ça, les échantillons extrapulmonaires sont généralement pauvres en bacilles tuberculeux, à l'heure actuelle le diagnostique de cette maladie pose un problème (**Kerleguer *et al.,* 2002 ; Clive-**

Macallan et Houston, 2014 ; Guillet-Caruba *et al.,* 2014 ; Toujani*et al.,* 2015 ;Peirse et Houston, 2017; Ossale-Abacka *et al.,* 2018).

Le diagnostic de la tuberculose repose sur un faisceau d'arguments cliniques, radiologiques et biologiques **(Drouillon *et al.,* 2006).** Jusqu'à présent le test cutané l'intradermoréaction à la tuberculine (IDR) est utilisé. Cependant, ce test n'est pas spécifique car il montre une réactivité croisée avec le bacille Calmette–Guérin (BCG) et de nombreuses mycobactéries non tuberculeuses. Un résultat positif de cet examen ne confirme pas la tuberculose **(Al-Jebouri et Wahid, 2014 ; Karanis et Karanis, 2019).**

L'examen microbiologique demeure l'outil standard du diagnostic de la tuberculose. En premier lieu le diagnostic repose sur l'examen microscopique après coloration de Ziehl-Neelsen et parfois ce test est le seul possible dans nombreuse pays en voie de développement. Après la mise en culture de l'échantillon dans un milieu spècifique, les colonies isolées sont identifées et un antibiogramme est réalisé. Lorsque l'examen microscopique est négatif, il est nécessaire d'attendre les résultats de la culture pour confirmer le diagnostic. Malgré la rapidité et le coût moins cher, la coloration de Ziehl-Neelsen manque de sensibilité ; elle nécessite pour qu'il soit positive au moins 10^4 baciles /ml, de ce fait cet examen est peu contributif dans les formes extrapulmonaires (**Jarlier *et al.,* 2004 ; L'Hadj *et al.,*2006 ; Lamoril *et al.,* 2007 ; Lalande, 2012 ; Slim-Saidi *et al.,* 2015).**

La culture représente l'examen de référence pour affirmer le diagnostic,mais le faible taux de réplication des mycobactéries implique une incubation de plusieurs semaines (de 3 à 4 semaines pourles échantillons riches et 6 semaines ou plus pour les paucibacillaires). Bien que l'introduction des systèmes de cultures liquides automatisés, tel que le système BacT/ALERT™, permet de diminuerle temps de détection à une semaine voire dix jours par rapport aux cultures sur milieux solides mais l'identification dans ces systèmesconstitue encore un autre obstacle pour un diagnostic affirmé de la tuberculose (**Maugein et Bébéar, 2003 ; Jarlier *et al.,* 2004 ; L'Hadj *et al.,*2006 ; Lamoril *et al.,* 2007 ;Ninet *et al.,* 2011 ; Jabri *et al.,* 2016).**

Cela peut affecter la prise en charge des patients en la retardant ou en induisant un traitement inapproprié chez les sujets non atteints de la tuberculose**.** Afin de surmonter ces problèmes et raccourcir ce délai, de nombreux tests de biologie moléculaire ont été développés et évalués ces dernières années notamment, celles qui sont basés sur la mise en évidence de l'ADN du microorganisme par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

Ces tests peuvent accélérer considérablement la détection de *M. tuberculosis* et ainsi fournir des soins cliniques améliorés aux patients, en temps voulu **(Negi *et al.,* 2005 ; Drouillon *et al.,* 2006 ; Hur *et al.,* 2010 ; kaur *et al.,* 2017).**

Par amplification d'ADN cible, la présence d'une molécule d'acide nucléique par échantillon peut suffire pour que les pathogènes soient détectés. La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est révélés utile et très prometteuse pour diagnostiquer la tuberculose et aussi sa résistance aux médicaments dans divers échantillons cliniques ou même à partir d'isolats de culture**(Truffot-Pernot et Veziris, 2011 ; Lira *et al.,* 2013 ; Pinhata *et al.,* 2015 ; Nour-Neamatollahi *et al.,* 2018; Santos *et al.,* 2018).**

En revanche,en raison des résultats faussement positifs engendrés par amplification d'ADN contaminant et aussi des manipulations post-PCR qui prennent de temps et augmentent les risques de contaminations des échantillons ainsi que les manipulateurs, la PCR conventionnelle demeure peu efficace **(Jaton et Greub, 2007 ; Zhongquan *et al.,* 2017).**

La PCR quantitative en temps réel (rt-PCR) a récemment été proposée pour la détection des infections à mycobactéries. La sensibilité, la spécificité, la robustesse et la reproductibilité accrues associées au temps nécessaire à l'établissement du résultat d'une manière fiable en quelques heures, contre une semaine ou plus pour la culture et à la possibilité de quantification avec un faible risque de contamination, font la PCR en temps réel la technique de choix pour le diagnostic de la tuberculose en laboratoire **(Lira *et al.,* 2013 ; Al-Jebouri et Wahid, 2014 ; Rao *et al.,* 2016 ; Zhongquan *et al.,* 2017).**

L'objectif de ce travail est d'adapter, au sein du laboratoire d'analyse médical El Amel Ouargla, le diagnostic de la tuberculose par des tests PCR en temps réel afin de couvrir l'exigence des médecins de la région et dans la thématique de laboratoire de lancer des tests rapides et plus performants pour le diagnostic de la tuberculose.

Les tests PCR en temps réel effectués dans ce laboratoire sont réalisés à l'aide des appareils et des kits fourni par la société QIAGEN. Les réactions d'extraction d'ADN pour ce laboratoire s'effectuent à l'aide d'un extracteur automatisé en revanche cette société ne commercialise pas des kits destinés pour l'extraction automatisée d'ADN mycobactérien. Donc, il est nécessaire d'optimiser en maximum cette étape. L'objectif de cette étude est d'automatiser le

Protocol d'extraction d'ADN mycobactérien dans l'automate EZ 1 Advanced XL (QIAGEN, Hilden, Allemagne).

De ce fait, la première partie de ce travail est consacrée à une synthèse bibliographique, décrivant dans un premier chapitre des généralités sur la tuberculose ; recrudescence de la tuberculose et ses causes, étude bactériologique et clinique de cette maladie, et démarche diagnostique de la tuberculose et parlant dans un deuxième chapitre sur les principes puis l'application des tests PCR et rt-PCR dans le diagnostic de la tuberculose pulmonaire et extrapulmonaire.

La deuxième partie consacre l'étude expérimentale, se divise en deux chapitres. Le premier chapitre est consacré essentiellement sur l'explication des deux techniques utilisées pour l'extraction automatisé d'ADN mycobactérien et l'optimisation de cette étape à fin d'obtenir une quantité d'ADN mycobactérien de haute qualité, et aussi décrit le principe et la procédure d'amplification effectuée dans ce présent travail. Le deuxième chapitre de cette partie présente les principaux résultats obtenus, suivi de discussions comportant des réponses aux problèmes que porte ce sujet et des interprétations argumentant ces résultats.

Une conclusion générale et des perspectives qui sont un ensemble de réflexions achevant ce travail.

Partie I

Synthèse bibliographique

Chapitre I

Généralités sur la tuberculose

I.1.Recrudescence de la tuberculose

La tuberculose (TB) est l'une des maladies les plus anciennes de l'humanité. En effet, Hippocrate (V et IVe siècle avant JC) décrivit la phtisie, signifiant le dépérissement en grec, comme une maladie d'évolution lente, associée à l'amaigrissement, latoux et la présence de sang dans les crachats**(Garnotel, 2017).**

Jusqu'à la fin du 20ème siècle, avec la mise en place de vaccin et la découverte de nombreux antibiotiques efficaces, l'éradication de la tuberculose (TB) était possible **(Yoya, 2010).**

Mais malheureusement, aujourd'hui on assiste à une forte recrudescence de cette maladie avec des statistiques alarmantes et en augmentation ; en passant de 8,6 millions en 2012 à 10 millions en 2018 de nouveaux cas chaque année avec plus d'un million de décès par an (Mazza-Stalder, 2012; Ketata et al., 2014; Karanis et Karanis, 2019).L'infection touche un tiers de la population mondiale (Locht et Rouanet, 2011; Ketata et al,. 2014;Soundarya et al., 2019).La TB demeure d'actualité et représente vraiment un problème de santé publique pour une grande partie de la population mondiale. Il s'agit de la deuxième cause de décès par maladies infectieuses après l'infection par le virus d'immunodéficience humaine (VIH) **(Mjid *et al.*, 2014; Orme, 2015; Soundarya *et al.*, 2019).**

Face à cette situation, l'OMS décrit la tuberculose comme priorité de santé publique à l'échelle mondial **(Locht et Rouanet, 2011 ; Mascart et Locht, 2015).**

I.1.1. Causes de la recrudescence de la tuberculose

Actuellement, le problème de latuberculose est loin d'être maîtrisé. Il est compliqué à cause de trois principaux évènements : l'endémie du SIDA, l'inefficacité relative du BCG (bacille de Calmette et Guérin) et l'apparition de souches de *Mycobacterium tuberculosis* résistantes, voire multirésistantes aux antituberculeux **(Smaoui-Fourati *et al.,* 2015; Orme, 2015).**

I.1.1.1. Co-infection (virus d'immunodéficience humaine(VIH) /Tuberculose)

Les sujets infectés par le VIH et les immunodéprimés présentent la capacité à développer une sensibilité élevée à l'infection par le *Mucobacterium tuberculosis* (Mtb). Selon le programme des Nations Unies sur le VIH/ syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) ; la tuberculose est la principale cause de décès chez ces personnes **(Wilmott *et al.,* 2019)**. Les types de la tuberculose sont modifié par la co-infection tuberculose-SIDA; les personnes VIH séropositif présent fréquemment des tuberculoses extra-pulmonaires isolées ou associées à la

tuberculose pulmonaire et des tuberculoses milliaires tandis que les sujet VIH séronégatif généralement présentent la tuberculose pulmonaire **(Aubry et Gaüzère, 2018).**

La diminution de nombre des lymphocytes T CD4et la diminution de façon importante de la production d'interféron gamma (IFNγ) sont les caractéristiques des sujets infectés par le VIH, aboutissant au final à un risque important de réactivation ou de réinfection par le Mtb. Les caractéristiques cliniques dépendent de l'intensité de l'immunodépression et sont corrélées au déficit en lymphocytes T CD4 **(Harmouche et Ammouri, 2009 ; Toujani *et al.*, 2015)**. Le VIH peut affecter le fonctionnement des macrophages et des cellules dendritiques et facilitant la transmission et la fuite immunitaire de M. tuberculosis et du VIH. Les personnes Co-infectées VIH-TB présentent une diminution de l'expression de marqueur de dégranulation CD107 des lymphocyte T CD8 associer à la diminution de la capacité de prolifération de ces lymphocytes en réponse à la stimulation par le complexe ESAT-6/ CFP-10 sécrété par le Mycobactérium tuberculosis **(Venketaraman, 2018).**

I.1.1.2. Emergence de souches multi-résistantes

La tuberculose multirésistante (TB-MDR) étant définie comme une maladie causée par Mycobacterium tuberculosis résistant aux médicaments de première intention les plus efficaces l'isoniazide (INH) et à la rifampicine(RIF).C'est un problème émergent dans de nombreuses régions du monde **(Kidenya, 2014).** La pharmaco-résistance chez Mycobacterium tuberculosis est causée par des mutations du génome bactérien qui affectent les cibles thérapeutiques ou les enzymes activatrices **(Walzl *et al.,* 2018).**

Les mutations associées à la résistance aux agents antituberculeux de deuxième intention entraînant une tuberculose ultrarésistante (XDR-TB) sont également décrites. La majorité des résistances aux fluoroquinolones résultent de mutations dans les sous-unités A et B de l'ADN gyrase (topoisomérase II), protéine cible des fluoroquinolones, et les mutations de l'ARNr 16s provoquent la résistance aux agents injectables de deuxième intention comme l'amikacine et la kanamycine **(Jeanes et O'Grady, 2016).**

I.1.1.3. Impact de la vaccination

Pourtant que la tuberculose constitue un problème majeur de santé publique à l'échelle mondial, le BCG reste le vaccin le plus utilisé au monde. Le BCG est un vaccin bactérien qui il s'agit d'une souche atténuée de *Mycobacterium bovis* développé il y a près de 100 ans

par Calmette et Guérin**(Billyet Levy-bruhl, 2007 ; Locht et Rouanet, 2011 ; Mascart et Locht, 2015).**

La caractérisation génomique du BCG et de *Mycobacterium tuberculosis* montre une différence entre ces deux bactéries dans plus de 100 séquences codantes qui manquent au BCG, parmi ces séquences celles codant une protéine antigénique sécrétoire précoce de 6 kDa (ESAT-6) et la protéine de filtrat de culture (CFP-10). Ces dernières sont considérés comme puissants marqueurs de la virulence et activatrice des cellules T. Ces protéines jouent un rôle cruciale dans l'échappement à la phagocytose **(Ninet *et al.,* 2011 ; Mascart et Locht, 2015; Rizvi *et al.,* 2016; Soundarya *et al.,* 2019).**

Malgré les bons résultats observés lors des premiers essais cliniques de cette vaccination, son efficacité est controversé ; en vue des effets indésirables, une efficacité limitée. Sans doute que le BCG offre une protection partielle contre toutes les formes de TB (à 50%), mais son efficacité contre la tuberculose pulmonaire chez l'adulte est beaucoup plus limitée avec une durée de protection estimée à 10 ou 15 ans **(Fraisse, 2006 ; Mascart et Locht, 2015)** . Par ailleurs, une méta-analyse des différentes études cliniques montre une très forte hétérogénéité du pouvoir protecteur allant de 0 à 90 % de protection **(Billyet Lévy-Bruhl, 2007).**

En vue de la place qu'occupe la tuberculose en santé publique à l'heure actuelle, le développement de nouveaux vaccins pour lutter contre cette maladie est l'une des priorités demandée par l'OMS. Grâce aux nouvelles technologies basées sur l'ADN recombinant, des souches recombinantes de BCG capables d'offrir une protection plus efficace sont développées **(Locht et Rouanet, 2011)** mais aussi plusieurs souches vivantes, inactivés et avec des adjuvant ou des vecteurs viraux sont actuellement à différents stades de développement clinique **(Mascart et Locht, 2015; Soundarya et al., 2019).**

I.1.2.Incidences

A ce jour la TB demeure d'actualité, qu'elle ne cesse pas de se progresser, avec près de 10 million de personnes qui ont développé la maladie de la tuberculose à travers le monde selon les derniers résultats publier par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 2017 (5.8 million des hommes, 3.2 million des femmes et 1 million enfants). En même année la tuberculose a causée 1.3 million de décès chez les sujets VIH-séronégative et 0.3 million décès pour les sujets VIH-séropositif **(WHO, 2018).**

La résistance aux antituberculeux est augmentée et arrivée jusqu'à 558000 cas dans cette même année, 82% parmi eux développent la tuberculose multi-drogue résistante. La résistance à la rifampicine présente la proportion la plus élevé. La fédération de Russie, la chine et l'Inde sont les pays qui expriment le grand nombre des cas portant une résistance avec des proportions 24%, 19% et 10% respectivement **(WHO, 2018).**

En Algérie, les estimations sont aussi alarmantes en 2017, avec une incidence de 29 000 cas dont 12 000 sont des femmes et 17 000 sont des hommes, dont la tuberculose extrapulmonaire représente 67% de ces cas. Avec un nombre de mortalité en même année estimé par 3200 cas avec 36 cas de mortalité chez les sujets infectés par le VIH. L'incidence de la tuberculose multi-drogue résistante et la résistance à la rifampicine est de l'ordre de 0.78 million (**OMS, 2019).**

I.2. Etude bactériologique

Un caractère universel de la tuberculose, le faite qu'elle peut toucher de nombreuses espèces avec des manifestations physiopathologiques différentes et selon la souche causale qui appartient au complexe *M. tuberculosis***(Labie, 2003).**

I.2.1. Classification et pouvoir pathogène

La famille des Mycobacteriaceae est classée dans l'ordre des Actinomycétales ne comprend qu'un seul genre, c'est le genre Mycobacterium. Anciennement plus de 90 espèces différentes sont classées dans ce genre. Mais dans les années 80, l'étude du gène codant pour l'ARN r16S a permet de révolutionner la taxonomie du genre et la description de 67 nouvelles espèces. Aussi les acide mycolique sont considérés comme marqueur taxonomique – voire annexe 6- **(Yoya, 2010 ; De Cruz, 2017 ; Martin et Denis, 2017).**

En fonction de leur pouvoir pathogène, les mycobacteries sont divisés en mycobactéries non tuberculeuses et en mycobactéries tuberculeuses qui sont toutes à croissance lente selon la classification de Runyon en 1965 (**Chaili, 2014; De Cruz, 2017**).

Les mycobactéries tuberculeuses sont représentées par le complexe *M. tuberculosis* (MTBC) qui comprend huit espèces responsables de la tuberculose humaine et animale, dont *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis Bacillus* Calmette-Guérin (BCG), *M. africanum, M. caprae*, *M.microti*, *M. cannettii* et *M. pinnipedii*. Il s'agit d'un groupe de micro-organismes

étroitement apparentés qui se caractérisent par des séquences d'ARNr 16S identiques et une homogénéité génétique élevée, mais présentent des phénotypes divergents, provoquent différentes pathologies et présentent des spécificités d'hôte différentes. Le *M. tuberculosis* est l'agent principal de la tuberculose humaine, le *M. bovis* est un agent causal de la tuberculose bovine mais aussi de certains cas de la tuberculose humaine et le *M. africanum* responsable de la tuberculose humaine principalement en Afrique **(McEvoy, 2007 ; Chaili, 2014; Varaine et Rich, 2014 ; Caulfield et Wengenack, 2016).**

Les mycobactéries non tuberculeuses cultivable *in vitro* ou les mycobactéries atypiques sont des mycobactéries à croissance rapide, ubiquitaires et considérées comme des pathogènes opportunistes tel que le *M. avium-intracellulare, le M. marinum* ou encore le *M. abscessus* qui peuvent causer des infections localisées ou généralisé appelé mycobactériose chez des patients présentant une immunodépression **(Chaili, 2014 ; Ratovonirina, 2017).**

Les Mycobactéries non tuberculeuses non cultivables *in vitro* regroupent les mycobactéries causant la lèpre humaine *M. leprae* et animale *M. Lepraemurium* (**Chaili, 2014).**

I.2.2. Caractères bactériologiques

Les bactéries du genre *Mycobacterium* sont des bacilles droits ou légèrement incurvés aérobies strictes, immobiles, non ramifies généralement non sporulantes. Elles se caractérisent par une croissance sous forme de filaments ramifiés ressemblant à une "corde", rappelant celle des champignons. Les mycobactéries possèdent une paroi cireuse riche en lipides formée d'une couche massive de peptidoglycane-arabinogalactane proche de celle des bactéries à Gram positif. Une propriété tinctoriale essentielle qui présente les mycobactéries; l'acido-alcoolorésistance est due à la richesse de ses parois en acides mycoliques (acides gras à longue chaine de 60 à 90 atomes de carbone) conférant une haute imperméabilité de ces parois et un faible niveau de fixation de la coloration de Gram **(Yoya, 2010 ; Jamet, 2015 ; Astier *et al.*,2017 ; De Cruz, 2017; Ratovonirina, 2017 ; Martin et Denis, 2017 ; Zhongquan *et al.*, 2017).**

I.2.3. Caractéristiques du génome

Les membres du complexe MTBC montrent plus de 99,95% de similarité d'ADN.Ce qui fait qu'il s'agit d'une seule espèce bactérienne. En 1998, en collaboration avec les équipes

du *Sanger Centre* en Grande-Bretagne, le génome de la souche virulente de référence utilisée jusqu'à nos jours ; le H37Rv de *M. tuberculosis* isolée depuis 1905 a été complètement séquencé. Il s'agit d'un seul chromosome circulaire de 4411 kbavec au moins 3 924 cadres de lecture (ORF) et une teneurde 65% en guanine et en cytosine. Une fraction importante de ce génome code pour des enzymes impliquées dans la lipogenèse et la lipolyse **(Labie, 2003 ; Smith *et al.*, 2009 ; Jamet, 2015 ;Talbot et Raffa, 2015 ; Astier *et al.,* 2017 ; Ratovonirina, 2017).**

I.3. Etude clinique

La particularité de *Mycobacterium tuberculosis (M. tb)*, de survivre au sein des macrophages et des cellules dendritiques qui peut créer chez l'hôte infecté une pathologie active (tuberculose maladie) ou tuberculose infection **(Collet, 2003 ; Papa-thakis et Piwoz, 2010).**

I.3.1. Tuberculose infection

La tuberculose est une maladie infectieuse bactérienne contagieuse principalement par voie aérienne à transmission interhumaine à partir d'un malade atteint de la tuberculose pulmonaire. Lorsque le patient parle, tousse ou éternue, il émet des gouttelettes infectantes. Il s'agit des gouttelettes de Flügge **(Fauchère et Avril, 2002 ; Toujani*et al.*, 2015)** qui peuvent rester en suspension dans l'air pendant plusieurs heures. Ces dernières peuvent être inhalées par d'autre personne en contacte **(Papathakis et Piwoz, 2010 ; Pezzella, 2019).**

I.3.1.1.Primo-infection tuberculeuse (PIT)

Après inhalation, les gouttelettes sont assez fines qu'elles échappent aux défenses du tapis mucociliaire des bronches et se logent dans les alvéoles terminales des poumons. Il s'agit du foyer primaire ou chancre d'inoculation **(Donato, 2011 ; Sidhom *et al.,* 2011).** Les quelques bacilles parviennent aux alvéoles pulmonaires sont phagocytés dans des macrophages alvéolaires après leur internalisation au sein des phagosomes où ils se multiplient en inhibant leur fusion avec les lysosomes par conséquent la formation des phagolysosomes **(Defranco *et al.,* 2009 ; Mascart et Locht, 2015).**

Les macrophages et les cellules dendritiques sensibilisées migrent jusqu'aux ganglions lymphatiques où une repense immunitaire est initiée. Il s'agit d'une réponse

inflammatoire locale cellulaire à prédominance LTh1 avec libération des cytokines ; à savoir INF γ, l'IL 2 et le TNF. Les lymphocytes CD8 impliquées dans cette réaction permettent la lyse des macrophages infectés et la production de l'INF γ. Cette réaction immunitaire se traduit par la formation d'un granulome **(Toujani*et al.,* 2015 ; Barker, 2016 ;Lahlou, 2016).**

Le granulome tuberculeux est principalement constitué par un amas de macrophages, des lymphocytes et des histiocytes qui peuvent se fusionner pour former des cellules géantes multinucléées appelées cellules de Langhans disposées en couronne autour des mycobactéries. Ce qui permet de contrôler l'infection **(Regnault, 2002 ; Chaili, 2014 ; Mascart et Locht, 2015).**

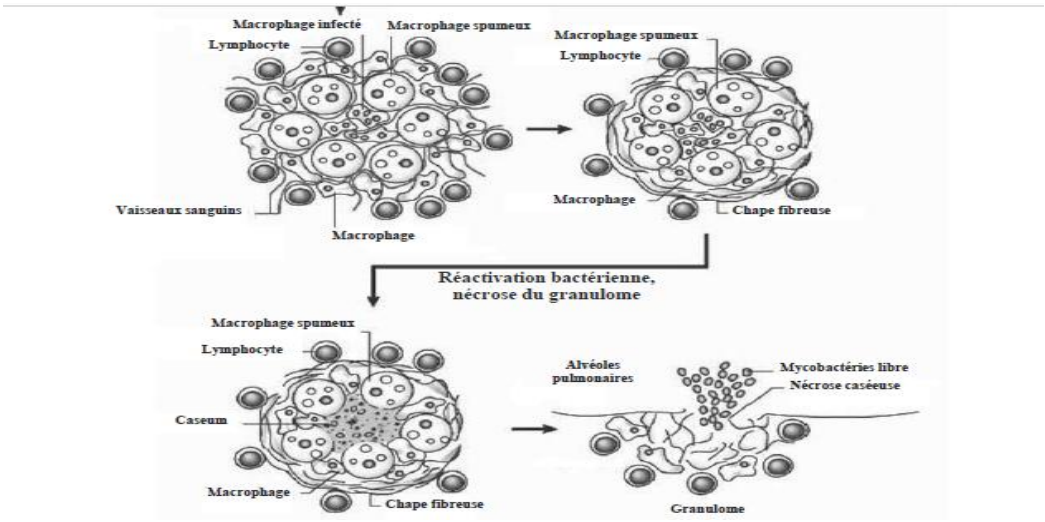


Fig. 01 -Structure de granulome tuberculeux**(Jamet, 2015).**

Après 2 à 6 semaines de l'infection, il se développe une allergie spécifique il s'agit d'une hypersensibilité retardée à la tuberculine **(Sidhom *et al.,* 2011 ; Lyon et Rossman,2017).**

I.3.1.2. Primo-infection latente ou dormante

Dans 90 % des cas le système immunitaire empêche la multiplication des bacilles tuberculeux et contrôle l'infection chez les sujets immunocompétents, c'est la primo-infection latente ou dormante. La primo-infection latente est asymptomatique seul l'intradermo-réaction à la tuberculine (IDR) permet de le détecter, elle est sans risque de transmission. Elle ne provoque pas donc de maladie, mais elle peut au contraire immuniser le sujet infecté contre

la réinfection pendant des décennies, voire une vie entière**(Locht et Rouanet 2011; Barker, 2016).**

I.3.2. Tuberculose maladie (tuberculose active)

Le système immunitaire chez les immunocompétents permet de contrôler la tuberculose, mais il n'est pas capable de l'éradiquer. Ceci parce que le *M. tb* continue d'être présentes au sein des macrophages **(Papathakis et Piwoz, 2010)**. Les personnes infectées ne développent pas la maladie dans la majorité des cas mais à cause d'affaiblissement du système immunitaire par certains nombre de facteurs (SIDA, diabète et d'autres maladies, médicaments immunosuppresseurs, malnutrition, grossesse…), les bacillesdormant peuvent se réveiller et multiplier entraînant la tuberculose maladie**(Locht et Rouanet 2011; Varaine et Rich, 2014)**.

La tuberculose active peut être causée par une infection récente, une activation de la tuberculose latente ou une rechute suite à un traitement antérieur**.** La tuberculose peut être qualifiée de pulmonaire, d'extrapulmonaire ou des deux à la fois. Avant l'apparition du VIH, environ 85% de tous les nouveaux cas de tuberculose ne touchaient que les poumons **(Papathakis et Piwoz, 2010 ; Sidhom, 2011).**

I.3.2.1. Tuberculose pulmonaire (TBP)

La TB est une maladie qui peut toucher tous les organes sauf les phanères mais la forme pulmonaire est la plus fréquente, elle représente plus de la moitié des forme de la tuberculose (**Ossale-Abacka *et al.,* 2018**). Elle se traduit par des symptômes qui sont peu spécifiques : toux chronique, expectorations parfois teintées de sang, hémoptysie franche, douleurs thoraciques, sudations nocturnes, fièvre, amaigrissement, fatigue…etc **(Wainsten, 2012; Varaine et Rich, 2014).**

La réactivation du foyer de la primo-infection latente au niveau des poumons entraine de la tuberculose pulmonaire. Après une diffusion hématogène, l'implantation des bacilles peut provoquer des lésions dans différentes zones des poumons (**Weinberger *etal*.,2018)**. Dans 95% des cas, les lésions sont présenté au niveau des régions apicales des lobes supérieurs et avec moindre degré du segment supérieur des lobes inférieurs des poumons **(Lyon et Rossman, 2017)**.

Le résultat de ces lésions c'est la formation des cavités appelée foyer ou lésion de Ghon qui peut être visible sur la radiographie pulmonaire sous forme de petite consolidation. Les ganglions lymphatiques hilaire régional impliqués dans la propagation locale des bacilles tuberculeux en se combinant avec les lésions de Ghon forment le complexe de Ghon **(Barker, 2016; Pezzella, 2019).**

I.3.2.2. Tuberculoses extrapulmonaire (TBEP)

Bien que le site d'infection à la M.tb le plus courant dans le monde entier sont les poumons, mais la dissémination lympho-hématogène des macrophages alvéolaires infectés par le M.tb vers n'importe quelle partie du corps, peut aboutir à une tuberculose extrapulmonaire pauvres en bacilles, elles sont donc peu ou pas contagieuses **(Lahlou, 2016 ; Peirse et Houston, 2017; Hadifar *et al.,*2018 ; Karanis et Karanis, 2019).**

La TBEP se réfère à la tuberculose qui se produit au niveau des organes ou des tissus extrapulmonaires **(Deng *et al.,* 2018)** ses symptômes sont souvent non spécifiques (fièvres, sueurs nocturnes et perte de poids) et dépendent de l'organe touché **(Clive-Macallan et Houston, 2014 ; Peirse et Houston, 2017).**

Plusieurs études montrent l'accroissement de l'incidence des TBEP. Le TBEP représente un groupe de pathologies très diverses, les formes ganglionnaireset pleurales étant les plus fréquentes, suivies par les formes ostéo-articulaires, péritonéales, urogénitales, et méningées **(Mazza-Stalder *et al.,* 2011 ;Ketata 2014 ; Karanis et Karanis, 2019).**

I.4.Diagnostique

Bien que les symptômes de la TBP soient peu spécifiques, il est difficile de faire un diagnostic différentiel avec d'autres pathologies en se basant uniquement sur ces symptômes. D'autres examens sont nécessaires dont, en première instant, la radiographie du thorax **(Wouter et al, 2011).**

En revanche pour la TBEP comme les symptômes sont souvent non spécifiques et dépendent de l'organe touché **(Clive-Macallan et Houston, 2014 ; Peirse et Houston, 2017)**, et du fait que les produits pathologiques non respiratoires sont, en règle générale, pauvres en bacilles tuberculeux en plus qui ils sont d'obtention difficile par des gestes invasifs (biopsie osseuse, biopsie pleurale, liquide cérébro-spinal. . .) **(Guillet-Caruba *et al.,* 2014 ; Ossale**

Abacka *et al.,* 2018) à l'heur actuelle, un diagnostic précis de la TBEP reste un problème **(Deng *et al.,* 2018).**

I. 4. 1. Radiographie du thorax

Dans la prise en charge de la TB, le rôle de la culture est non négligeable surtout pour la TBP mais en vue de lenteur d'obtenir des résultats, l'histologie (granulomes caséeuses) et l'imagerie évocatrice peuvent suffire pour prescrire un traitement en attendant les résultats de cultures. Des lésions bronchiques ou tissulaires (des opacités nodulaires (complexe de Ghon), des infiltrats et des cavernes) appelés anomalies typiques d'imagerie atténuant les rayons et induisant des opacités peuvent être observés en différents aspects.Toute anomalie indiquant une tuberculose reste une suspicion, des examens bactériologiques doit toujours être effectués pour la confirmation de la maladie **(Wouter *et al.,* 2011; Clive Macallan et Houston, 2014 ; Toujani *et al.,* 2015 ; Barker, 2016; Méchaï *et al.,* 2018 ; Pezzella, 2019).**

I. 4. 2. Examen bactériologique

Le diagnostic de la tuberculose repose sur un faisceau d'arguments cliniques, radiologiques et biologiques. Le diagnostic biologique est réalisé à partir des prélèvements pulmonaires tels que les crachats, les aspirations bronchiques et les tubages gastriques ou extrapulmonaires tels que les urines, les biopsies ou les ponctions **(Drouillon *et al.,* 2006; Jabri *et al.,* 2016).**

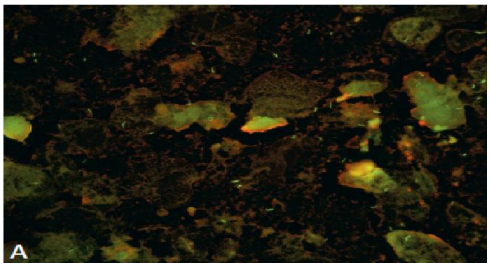
I. 4. 2. 1. Examen microscopique

L'examen microscopique représente la première étape dans le diagnostic de la TB. Il exploite la propriété d'acido-alcoolo-résistance des mycobactéries, après coloration à la fuschine ou avec un fluorochrome**(Ninet *et al.,* 2011 ; Fraisse, 2017).**

L'examen microscopique après coloration à la fushine appelé coloration de Ziehl Neelsen (ZN) est la méthode la plus utilisé surtout dans les pays en voie de développement et à forte incidence de la TB. Elle offre un diagnostic rapide et peu coûteux de la TBP. Cependant, elle manque de sensibilité elle nécessite pour qu'il soit positive au moins 10^4 baciles/ml, de ce fait cet examen est peu contributif dans les formes extrapulmonaires **(Lamoril *et al.,* 2007 ; Lalande, 2012 ; Slim-Saidi *et al.,* 2015).**

La microscopie à fluorescence après coloration à l'auramine appelé coloration de Dugommier, présente une sensibilité meilleure que la coloration de ZN avec un gain de 10 %. Depuis 2009, cette coloration entre dans les recommandations de l'OMS pour les pays à forte et à faible incidences, associée à l'utilisation de microscopes à fluorescence à light-emitting diode ou LED **(Ninet *et al.,* 2011 ; Lalande, 2012 ; Hervé *et al.,* 2015).**

L'examen microscopique qui reste une procédure rapide, peu onéreuse et la plus utilisée, joue un rôle important dans le diagnostic de la TB ; il offre, en quelques heures, un diagnostic très probable des TBP qui sont les plus contagieuses pour prendre rapidement les mesures de prévention nécessaire. Mais cet examen est peu spécifique car il met en évidence la présence des mycobactéries sans distinguer les mycobactéries tuberculeuses des celles non tuberculeuses. Il est aussi peu sensible ; sa sensibilité est d'environ 50 % pour les échantillons d'origine pulmonaire et elle est encore plus faible pour ceux extrapulmonaires. la positivité de ce test signifie une charge bacillaire élevée tandis que sa négativité ne peut être validé qu'après les résultats de la culture **(Maugein et Bébéar, 2003 ; Truffot-Pernot et Veziris, 2011 ; Slim-Saidi *et al.,* 2015; Fraisse, 2017).**



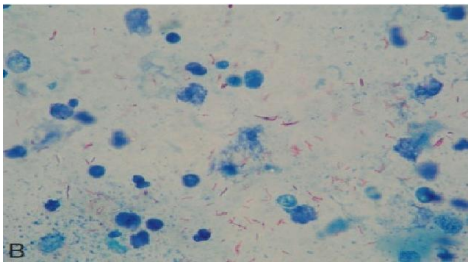


Fig. 02- Examen direct d'un frottis réalisé à partir d'une expectoration. A. Après coloration à l'auramine (grossissement × 400).Présence de bacilles colorés en jaune fluorescent.**B.** Après coloration de Ziehl-Neelsen (grossissement × 1000). Présence de bacilles colorés en rose **(Martin et Denis, 2017).**

I. 4. 2. 2. Culture

La culture par sa sensibilité absolue de l'ordre de 10 à 1000 viables mycobactéries / ml et par sa spécificité élevé reste la méthode de référence c'est le gold standard. Elle permet de confirmer les cas, valider un examen microscopique paucibacillaire négatif, tester la

sensibilité aux antibiotiques et aussi la viabilité des cellules**(Maugein et Bébéar, 2003 ; El Khéchine et Drancourtn, 2011 ; Slim-Saidi *et al.,* 2015 ; Martin et Denis, 2017).**

I.4. 2. 2.1. Milieux solides

La culture des mycobactéries nécessite le recours à des milieux spécifiques et complexes. Les milieux solides Löwenstein-Jensen et Coletsos (enrichi en pyruvate) à base d'œuf coagulé sont les milieux les plus utilisés couramment. En raison de faible taux de croissance des MTBC, les colonies des mycobactéries qui se caractérisent par des bords irréguliers en chou-fleur de couleur jaune-beige n'apparaissent qu'après plusieurs semaines en fonction de la densité microbienne de l'échantillon ; en 3 à 4 semaines lorsque les échantillons sont riches et 6 semaines ou plus lorsque sont paucibacillaires. Le résultat de la culture ne peut être considéré comme négatif qu'après 8 semaines d'incubation (**Truffot-Pernot et Veziris, 2011 ; Lalande, 2012 ; Slim-Saidi *et al.,*2015 ; Jabri *et al.,* 2016 ; Karanis et Karanis, 2019**).

I. 4. 2. 2.2. Milieux liquides

Plusieurs systèmes de cultures liquides automatisés sont développés permettent de raccourcir le délai de détection jusqu'à une semaine voire dix jours par rapport aux cultures sur milieux solides. Ces système sont associés à des systèmes de détection de multiplication bactérienne basés sur différentes principes physicochimiques (**Maugein et Bébéar, 2003 ; Ninet *et al.,* 2011; Truffot-Pernot et Veziris, 2011).**

La technique de respirométrie radiométrique ou système Bactec460 TB (Becton Dickinson) est la première technique commercialisée en milieu liquide. Elle détecte la multiplication en se basant sur la mesure du dioxyde de carbone marqué ($^{14}CO2$) produit par les mycobactéries après métabolisme de l'acide palmitique marqué par le carbone 14(^{14}C) dans un milieu Middlebrook 7H12 **(Maugein et Bébéar, 2003 ; Anochie *et al.,* 2012).**

Actuellement plusieurs techniques non radiactifs sont commercialisées tel que la méthode *Mycobacterial growth indicator tube* (MGIT) qui se base sur l'utilisation d'un sel de ruthénium qui émet une fluorescence lorsque la pression partielle en oxygène diminue dans le tube, signalant la croissance des micro-organismes, cette technique peut être utilisé manuellement ou au sein de l'automate Bactec 960. La BacT/Alert , la détection de croissance dans cette méthode repose sur le virage de couleur d'un indicateur colorimétrique contenu

dans une pastille au fond du flacon sensible à la modification du pH induit par le métabolisme bactérien. La méthode Versa TREK, ce système repose le même principe que celle de la MGIT (**Maugein et Bébéar, 2003 ; Ninet *et al.,* 2011; Truffot-Pernot et Veziris, 2011 ; jabri *et al.,* 2016 ; Martin et Denis, 2017**).

I. 4. 2. 2.3. Identification des cultures

I. 4. 2. 2.3.1. Identification biochimique

I. 4. 2. 2.3.1.1. Nitrate réductase

Le nitrate réductase est une enzyme présente chez les mycobactéries, le dosage de cette enzyme est utilisé pour la détection de leur croissance. Il repose sur la capacité des mycobactéries à réduire le nitrate présent dans le milieu de culture en nitrite. Lorsque le milieu de culture change sa couleur en rouge indique que les germes sont présents. Ce test peut être utile pour la détermination de la résistance à la rifampicine ou l'isoniazide par l'addition de l'un de ces antibiotiques au milieu de culture, le changement de couleur indique la résistance du germe à l'antibiotique ajouté **(Bwanga *et al.,* 2009; Gupta *et al.,*2011 ; Vittor *et al.,* 2011 ; García-Elorriagaet et Del Rey-Pineda, 2015).**

I. 4. 2. 2.3.1.2. Colorimétrique Redox Indicateur (CRI)

Il s'agit d'un test destiné pour la détection de l'activité métabolique des bacilles tuberculeux. Ce test repose sur l'utilisation d'un indicateur d'oxydo-réduction qui est ajouté au milieu de culture, lamodification de la couleur de milieu indique la présence de ces bacilles, il est utile dans la détermination de la résistance au certain antituberculeux. Deux Principaux indicateurs sont utilisés : le bleu d'alamar et le bromure de tétrazolium **(Van Deun *et al.,* 2010 ; García-Elorriagaet et del Rey-Pineda, 2015; Gupta et Anupurba, 2015).I. 4. 2. 2.3.2. Identification moléculaire**

Actuellement afin d'identifier le membre de complexe MTBC en quelques heures, les techniques d'hybridation moléculaire sont les plus utilisés.Elles sont basées sur l'utilisation des sondes complémentaires à des séquences génomiques spécifiques. Ces techniques peuvent être réalisées sur des colonies en milieu solide ou des cultures liquides, après ou sans amplification génique. Trois techniques sont commercialisées : Accuprobe (Gen-Probe) est une technique d'hybridation directe utilise des sondes d'ADN spécifiques marquées par un

ester d'acridinium, complementaire d'ARN ribosomal 16S mises en présence d'un lysat de culture. Les tests d'hybridation sur bandelettes ou line probe assay (LPA) qui ne peut être effectués qu'après amplification de l'espace intergénique 16S—23S, utilisent des sondes spécifiques immobilisées sur des bandelettes. Deux tests sont commercialisés : Innolipa Mycobacteria* (*Innogenetics*) et génotype *Mycobacterium*CM/AS (*Hain Lifescience*) **(Kerleguer *et al.,* 2002 ; Maugein et Bébéar, 2003 ; Caulfield et Wengenack, 2016 ; Slim-Saidi *et al.,* 2016).**

Une confirmation par séquençagede l'ADNr 16S et degène*rpoB* peut avoir lieu dans certains cas pour les souches non identifiées ou pour lesquelles il ya incertitude, mais cette technique est difficilement applicables dans un laboratoire de routine **(Maugein et Bébéar, 2003 ; Martin et Denis, 2017)**.

I. 4. 2. Test immunologique

I. 4. 2. 1. Intradermoréaction à la tuberculine (IDR)

Ce test repose sur une réaction d'hypersensibilité retardée qui peut apparaitre après une injection intradermique d'antigènes mycobactériens (un volume de 0,1 mL de la tuberculine). Le site d'injection développe un gonflement, une induration et une rougeur, évalués 48 à 72 h après l'application en cas d'infection. Le test est considéré comme positive, si le diamètre d'induration est supérieur de 5mm chez les sujets immunodéprimés et supérieur de 10 mm chez les sujets immunocompétents. Un résultat positif de cet examen indique un contact avec le Mtb. Il s'agit d'un diagnostic de l'infection tuberculeuse et non de la tuberculose active. En cas de résultat négatif ou incertain, mais suspicion de tuberculose, il faut répéter l'examen avec des concentrations plus élevées de tuberculine **(Wouter *et al.,* 2011; Jabri *et al*., 2016; Karanis et Karanis, 2019).**

I.4. 2.2. Test de libération d'interferon gamma (INFγ)

La cible antigénique sécrétoire précoce (ESAT) -6 et la protéine de filtrat de culture (CFP) -10 sont de protéines antigéniques abondamment produites et sécrétées par le *M. tb*. Elles sont également connues pour être les molécules les plus immunogènes trouvées dans le filtrat de culture. Ces protéines en formant un complexe sont capables de modulerles réponses immunitaires innées et adaptatives **(Murthy *et al.,* 2007 ; Sreejit *et al.,* 2014).**

Le test de libération d'INFγ est basé sur la détection de la réponse des lymphocytes T et la mesure de la production d'INFγ après un contact avec des antigènes spécifiques du complexe *M. tuberculosis* qui sont la protéine ESAT-6 et la CFP-10 **(Lioté et Lioté, 2011 ; Bouvry, 2012 ; Guillet-Caruba *et al.,* 2014).** Pour la quantification in vitro de l'INFγ produit, deux tests sont commercialisés actuellement ; le test QuantifFERON-TB® Gold In-Tube (QTF-G-IT) et le test le T-SPOT®.TB (**Lange *et al.,* 2011 ; Bouvry, 2012).**

Le QuantifFERON-TB repose sur la quantification *in vitro* d'INFγ libéré dans le plasma par les cellules mononuclées d'un échantillon de sang total par un test ELISA **(Nishimura *et al.,* 2008 ; Lioté et Lioté, 2011 ;Guillet-Caruba *et al.,* 2014 ;Telisinghe et al., 2017).** Le Test T-SPOT .TB est une variante de la technique ELISA, il s'agit d'un test ELISPOT. Il est basé sur la quantification de nombre des lymphocytes T productrices de l'IFNγ dans le surnageant de culture des cellules isolées en réponse à un contact avec ces différents antigènes (**Lioté et Lioté, 2011 ;Guillet-Caruba *et al.,* 2014).**

I.4. 2.3. Recherche d'antigènes

I.4. 2.3. 1. Recherche de lipoarabinomannane

C'est un test basé sur la détection d'un antigène spécifique du *Mycobacterium tuberculosis* dans un échantillon des urines par une immuno-chromatographie, l'antigène choisie est la lipoarabinomannane (LAM) un lipopolysaccharide spécifique de la paroi cellulaire des mycobactéries libérée dans les urines lors de l'activation métabolique ou la destruction de ces germes. Aujourd'hui ce test se trouve commercialement sous forme d'une bandelette urinaire facile à utiliser **(Bonnet, 2011 ; Guillet-Caruba *et al.*, 2014 ; Balcha *et al.,* 2014 ; Talbot et Raffa, 2015 ; Gupta et Kakkar, 2018).**

I.4. 2.3. 2. Recherche de la protéine MPT64

L'antigène MPT64 également connu sous les noms de Mpb64 est une protéine immunogène spécifique du complexe MTBC. Il est présent dans les cellules viables et en cours de réplication active, il est sécrété en quantité significative au début de la culture et diminue avec la culture prolongée. Cette protéine représente environ de 8% des protéines totales du filtrat de culture. C'est un antigène puissant activateur des lymphocytes T **(Kumar *et al.,* 2015 ; Bekmurzayeva *et al.,* 2013 ; Sharma *et al.,* 2019).**

Le test de l'antigène MPT64 repose sur un test immunochromatographique pour la détection de l'antigène MPT64, après culture pendant la phase de croissance. Aujourd'hui ce test est disponible sous forme d'une cassette commercial, les plus utilisé est le SD TB Ag MPT64 Rapid®, le Standard Diagnostics (Séoul, République de Corée) ou le BD MGITTM TBc Identification Test **(Truffot-Pernot et Veziris, 2011 ; Guillet-Caruba *et al.,* 2014).**

Tableau 01 - Résumé des examens bactériologiques (**Varaine et Rich, 2014).**

	Sensibilité bacilles/ml	Délai médiand'obtention
Microscopie des crachats (simple ou à fluorescence)	> 5 000	2 heures
Culture milieu solide Milieu de LJ standard, Middlebrook 7H10 et 7H11	+/- 100	16 jours (frottis+)29 jours (frottis−)
Culture milieu liquide (BACTEC®, MGIT®)	+/- 10	8 jours (frottis+)16 jours (frottis−)
LPA(Hain®,INNO-LiPA®)	Seulement surfrottis positif	1 jour (test direct)
PCR en temps réel	+/-10	2 heures

Chapitre II

PCR : Principe et application dans le diagnostic de la tuberculose

II.1. Extraction des acides nucléiques

Pour le diagnostic médical, la PCR et la PCR en temps réel sont les méthodes les plus utilisées, en raison de leur capacité à détecter des faibles quantités de pathogène à rechercher **(Barbosa *et al.,* 2016)**.Avant de toute manipulation ultérieure, l'acide nucléique (AN) doit être isolé en quantité et en qualité suffisantes en débarrassant de tous nucléases actives et de tous inhibiteurs de la PCR tel que l'hème, le diméthylsulfoxide (DMSO), l'héparine, le dodecyl sulfate de sodium (SDS), le sarcosyl, le bleu de bromophénol, le phénol...etc. Pour cela l'étape de l'extraction est un facteur crucial qui doit être soigneusement pratiqué et choisi. Le choix de méthode d'extraction dépond de la cellule d'où on veut extraire l'AN et l'échantillon de départ **(Ameziane *et al.,*2006 ;Huybens *et al.,* 2009 ; Botterel, 2017).**

II.1.1. Lyse cellulaire

À fin de libérer les AN de leurs compartiment intracellulaire, il est nécessaire de faire passer par une étape qui permet la rupture des membranes et/ou des parois des cellules cibles. En fonction de la nature d'échantillon, la rigidité d'enveloppes cellulaire et la robustesse de l'agent recherché, de nombreuses stratégies sont possibles d'être utilisées séparément ou le plus souvent combinées : la lyse chimique, enzymatique ou mécanique. La méthode optimale de lyse est celle qui donne une rupture efficace des cellules cibles tout en préservant la structure des AN **(Elkins, 2013 ; Barbosa *et al.,* 2016 ; Botterel, 2017).**

La lyse chimique consiste à employer des détergents, des agents chaotropes, des sels et/ou des chélateurs ; les détergents comme le dodécylsulfate de sodium (SDS), le bromure de cétyltriméthyl ammonium (CTAB) et Triton (X -100) déstabilisent la membrane cellulaire, des agents chaotropes tel que le chlorhydrate de guanidine, l'isothiocyanate de guanidine, l'iodure de sodium et le perchlorate de sodium déstabilisent les liaisons hydrogène et les interactions hydrophobes, tandis que les sels à savoir, Tris-HCl, KCl et NaCl créent une pression osmotique et contrôlent le pH du lysat **(Hainque, 2008 ; Butler , 2012; Thatcher, 2018 ; Tüzmen, 2018).**

La lyse mécanique par broyage, choc thermique ou sonication est souvent le meilleur choix pour de nombreux agents pathogènes difficiles à perturber. Le broyage à l'aide des billes repose sur le mouvement rapide de ces billes a collision des billes avec les cellules permet leur rupture. La sonication est une autre méthode mécanique par laquelle des ondes

sonores de haute intensité peuvent être appliquées pour lyser des cellules**(Thatcher, 2018 ; Tüzmen *et al.,* 2018).**

La lyse avec des enzymes telles que la cellulase, le lysozyme ou la protéinase K peut augmenter l'efficacité de la lyse en dégradant les protéines de la membrane ou de la capside ou en attaquant la couche de peptidoglycane. Les lysozymes digèrent la couche étendue de peptidoglycane des bactéries à Gram positif **(Hainque, 2008 ; Botterel, 2017 ; Thatcher, 2018).**

En général, divers procédés peuvent être utilisés pour isoler l'ADN de différents matériaux biologiques. Cependant l'isolement des acides nucléiques à partir des mycobactéries demeure un processus fastidieuse et plus difficile que celui d'autres microorganismes. En raison de leur parois particulières riches en acides mycoliques et en peptidoglycane ce qui les rend résistants à un certain nombre de tampons de lyse**(Jarlier *et al.,* 2004 ; Hosek *et al*., 2006 ; Chin *et al*., 2018).**

Des études antérieures ont montré quela combinaison entre un traitement thermique et un autre enzymatique par l'utilisation du lysozyme et de la protéinase K peut donner des bons résultats. Mais aussi avec l'utilisation des agents chimiques (le CTAB, le SDS et les agents chaotropes) génèrent des meilleurs résultats avec une moindre présence d'inhibiteurs de PCR **(Collet *et al.,* 2003 ; Jarlier *et al.,* 2004** ;**Ameziane *et al.,* 2006 ;Hosek *et al*., 2006 ;Chin *et al*., 2018).**

II.1.2. Purification

Après une lyse cellulaire, les AN se trouvent libérés au sein d'une solution complexe associés avec des débris cellulaires. La mise au point des étapes qui permettent de débarrasser de tout ces contaminants est très importante, il s'agit de la purification**(Tüzmen, 2018).**

Pour cette étape deux principaux types de techniques sont possibles : L'extraction en phase liquide ou l'extraction en phase solide. L'extraction par le couple phénol-chloroforme est la méthode d'extraction en phase liquide anciennement la plus utilisée. Elle se repose sur la solubilité différentielle des différentes molécules entre deux phases liquidiennes non miscibles. Le phénol dénature et précipite les protéines qui sont ensuite éliminées par le chloroforme, à l'inverse de l'ADN qui reste soluble dans le phénol. L'ajout d'alcool permet

de précipiter l'ADN et d'éliminer le phénol résiduel **(Butler, 2012 ; Botterel, 2017 ; Thatcher, 2018).**

L'extraction en phase solide implique l'utilisation des différentes méthodes chromatographiques ; la chromatographie échangeuse d'anions, la chromatographie d'exclusion ou la chromatographie d'affinité.Chacune de ces méthodes peut être incorporée dans des filtres de spin, des colonnes ou des billes.Le principe de ces systèmes repose sur l'utilisation d'une colonne chromatographique équipée d'une phase stationnaire généralement à base de silice qui peut fixer l'ADN. Cette fixation est obtenue par l'ajout des sels chaotropes à un pH particulier. Ces sels dénaturent les protéines y compris les nucléases et favorisent ainsi la liaison de l'ADN à la membrane de silice. Après lavage avec une solution contenant un détergent et un alcool, toutes les impuretés sont éliminées.L'alcool empêche la dissolution de l'ADN qui reste lié à la membrane. En utilisant un tampon à faible teneur en sel l'ADN est élué**(Tan et Yiap, 2009 ; Barbosa *et al.,* 2016 ; Thatcher, 2018).**

II.1.3. Automatisation

L'extraction en phase solide convient bien à l'automatisation **(Botterel, 2017)**. Actuellement de nombreuses automates d'extraction et de purification qui sont développées se basent sur le concept de l'utilisation des billes magnétiques. Les billes utilisées sont revêtues par un biopolymère capable de se lier réversiblement par affinité aux molécules d'AN. Un aimant est utilisé pour attirer ces billes liées à l'AN ce qui facilite leurs séparation. Plusieurs système de billes utilisent l'affinité de couple streptavidines/ biotine. Dont les billes revêtues de streptavidines sont capables de fixer des molécules d'AN marquées par la biotine, après l'ajout de lysat, les AN se fixent sur les billes. Des automates commercialisées par les sociétés Dynal, Qiagen et Roche Diagnostics reposent sur ce même principe **(Ameziane *et al.,* 2006 ; Tan et Yiap, 2009 ; Sun *et al.,* 2010).**

II.2.Techniques d'amplification génique

II.2.1. Réaction de polymérisation en chaîne (*Polymerase Chain Reaction* ou PCR)

Depuis la découverte de Kary Mullis dans les années 1980, la PCR est devenue la technique la plus utilisée en routine dans de nombreux secteurs de la biologie médicale ; de l'infectiologie, la génétique humaine, sans négligeant la cancérologie **(Mathys *et al.,* 2007; Leroy-Terquem, 2008; Overbergh *et al.,* 2010).**

Au cours de la réaction de PCR des copies multiples potentiellement illimitées d'ADN sont obtenues à l'aide d'une ADN polymérase à partir d'une simple copie d'une séquence particulière d'acides nucléiques de manière à permettre sa détection. Cette réaction s'effectue à l'intérieur d'un thermocycleur automatisé qui peut faire varier de façon très précise la température de l'échantillon (**Béné *et al*., 2014)**.

II.2.1.1. Principe

La PCR consiste à réaliser une série de réplications in vitro d'une matrice d'ADN bicaténaire par une ADN polymérase thermostable typiquement la Taq polymérase extrait à partir de *Thermus aquaticus*qui permet l'élongation des amorces qui sont des fragments d'ADN simple brin synthétiques de 20 à 30 nucléotides complémentaire aux brins sens et anti-sens de la matrice cible utilisées en excès. En présence d'un mélange équimolaire de désoxyribonucléotide triphosphates (dATP, dCTP, dGTP et dTTP), Mg^{2+}, KCl et un tampon Tris-HCl approprié **(Etienne *et al*., 2006; Béné *et al*., 2014; Bluth et Bluth, 2018)**.

La PCR comprend 3 étapes: dénaturation, hybridation et extension (élongation), qui sont considérées ensemble comme un cycle résultat de variation de la température de milieu réactionnel **(Etienne *et al*., 2006; Béné *et al*., 2014; Bluth et Bluth, 2018)**.

Tout d'abord, l'échantillon est chauffé à des températures élevées variés entre 91 et 96°C, conduisant à la dénaturation des deux brins matrices, puis une diminution brusque de la température (50-65°C) permet à chaque amorce de s'hybrider à un brin opposé de la matrice et border la séquence à amplifier constituant l'étape d'hybridation. Lorsque la température est élevée à 72 ° C l'ADN polymérase se lie et initie la polymérisation, entraînant l'extension de chaque amorce à son extrémité 3 ' **(Etienne *et al*., 2006; Murray *et al.,* 2013; Bluth et Bluth,2018)**.Les amplicons générés à la fin de chaque cycle constituent des matrices pour les cycles suivantes, la succession des cycles 30 à 40 fois permet la duplication de nombre des copies d'ADN de départ (**Jaton et Greub, 2007; Béné *et al*., 2014)**.

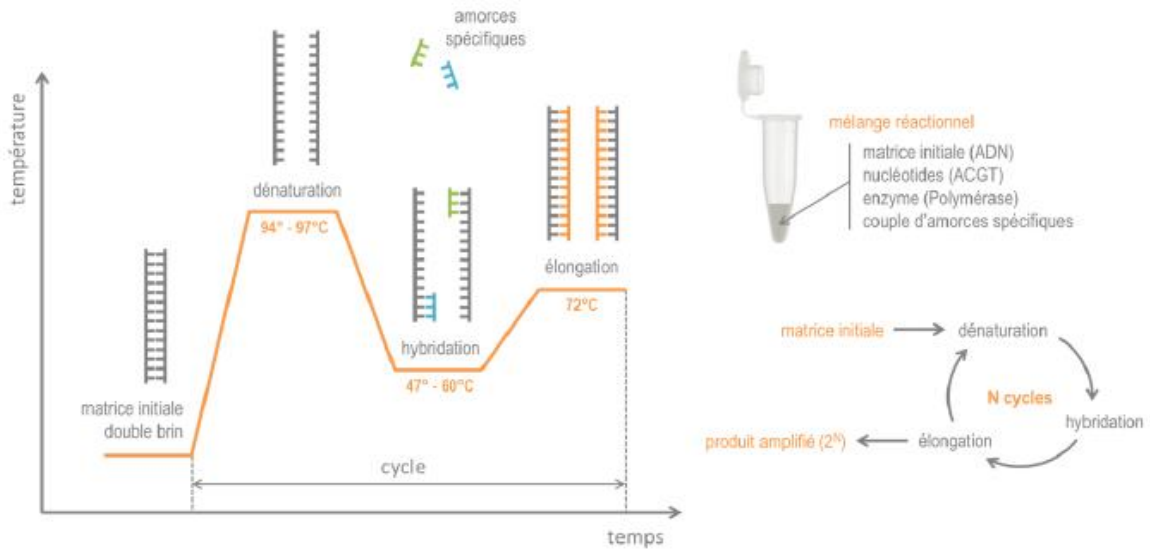


Fig.03- Principe de la PCR **(Monier et Cécillon, 2015)**.

II.2.1.2. Détection

La visualisation de produit de la PCR classique exige des manipulations post-amplification ce qui prend de temps, augmente les risques de contamination d'échantillon, sans négligeant l'effet toxique des marqueurs utilisé pour la détection. Le marquage fluorescent avec le bromure d'éthidium ou le SYBR Green après migration électrophorétique sur gel d'agarose est la technique la plus utilisée **(Jaton et Greub, 2007; Overbergh *et al.*, 2010; Béné *et al*., 2014)**.

II.2.2. Réaction de polymérisation en chaîne en temps réel (rt-PCR)

Pour arriver à une analyse quantitative précise des produits d'amplification, il faut quantifier constamment la production des amplicons générés durant chaque cycle pendant la phase exponentielle de la réaction. La PCR en temps réel à l'inverse de la PCR classique avec laquelle la détection des produits d'amplification ne peut être réalisé qu'a la fin de la réaction (PCR en point final), permet de suivi la cinétique de la réaction durant chaque cycle **(Poitras et Houde, 2002 ; Leroy-Terquem , 2008 ; Monier et Cécillon, 2015).**

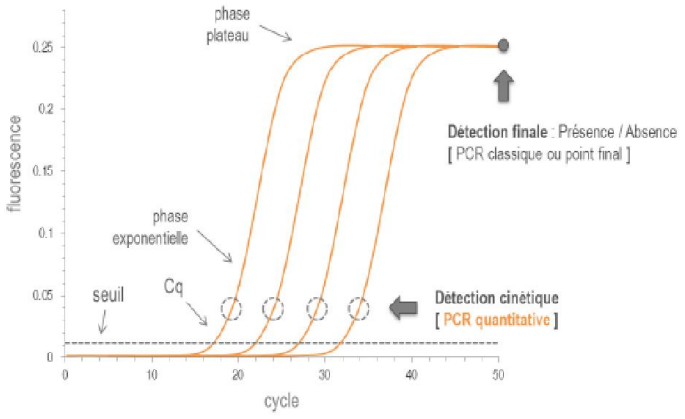


Fig.04- Principe de la rt-PCR. contrairement à la PCR en point final **(Monier et Cécillon, 2015).**

II.2.2.1. Principe

La PCR en temps réel est une technique d'amplification fondée sur le même principe que la PCR classique. La différence demeure dans le fait que la détection et la quantification de la production d'amplicons se fait pendant la réaction d'amplification qui se déroule dans un système fermé en se basant sur la mesure quantitative de l'émission fluorescent d'un marqueur fluorescent. La fluorescence est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés, ce qui permet la détermination de la quantité d'ADN initiale dans un échantillon biologique grâce à une gamme d'étalonnage préalablement établie (**Poitras et Houde, 2002 ; Bourgeois-Nicolaos et Doucet-Populaire, 2006 ; Maubon *et al*., 2007 ; Leroy-Terquem, 2008 ; Monier et Cécillon, 2015 ; Bluth et Bluth, 2018 ; Saravanan *et al*., 2018**).

II.2.2.2. Avantage de la PCR en temps réel

En plus de sa propriété de quantification de la charge en ADN, la PCR en temps réel offre plusieurs avantages, par l'utilisation des systèmes en tubes fermés elle ne nécessite pas d'autre technique pour la mise en évidence des amplicons à la fin de processus ce qui minimise le risque de contamination en comparaison avec la PCR qualitative, ainsi les sondes utilisés diminuent les risques des faux positives de l'amplification et améliorent la spécificité de la technique. La vitesse, la reproductibilité et la robustesse sont les propriétés majeur de cette technique **(Bourgeois-Nicolaos et Doucet-Populaire, 2006 ; Maubon *et al.,* 2007 ; Béné *et al*., 2014 ; jabari, 2016).**

II.2.2.3.Technologies de détection

La Technologies de détection de la PCR en temps réel repose sur le suivi de la fluorescence émise par un indicateur fluorescent dont l'intensité est directement proportionnelle à la quantité des copies d'ADN obtenues durant chaque cyclependant la réaction d'amplification. Ce qui permet d'estimer la concentration de gène amplifiée en se référant à un standard et par conséquent la charge bactérienne en connaissant le nombre de copies rencontrées dans le génome bactérien, ça dépend le gène choisi pour l'amplification une famille, un genre ou une espèce bactérienne peut être détecter et quantifier**(Bourgeois-Nicolaos et Doucet-Populaire, 2006 ;Huybens *et al.,* 2009)**.

La détection de signal de la fluorescence se base sur deux principes généraux actuellement utilisés ; les agents se liant à l'ADN double brin et les sondes fluorescentes. Pour cette dernière, 4 technologies principales peuvent être employer : hydrolyse de sonde (Taqman® assay), hybridation de 2 sondes (HybProbes), balises moléculaires (Molecular Beacons) et amorces scorpions (Scorpion primers) **(Poitras et Houde, 2002 ; Bourgeois-Nicolaos et Doucet-Populaire, 2006 ; Mathys *et al.,* 2007 ; Leroy-Terquem, 2008 ; Overbergh *et al.,* 2010)**.

II.2.2.3.1. Agents se liant à l'ADN double brin (Double-stranded DNA binding dyes: Lightcycler assay)

L'évaluation quantitative de produits de la PCR par l'utilisation des molécules intercalant à l'ADN double brin (ADNdb) est le principe des techniques de rt-PCR la plus simple et anciennement utilisées. L'incorporation de ces agents et leurs émissions fluorescentes augmente d'une manière exponentielle à chaque cycle parallèlement à l'augmentation de la quantité de l'ADN double brin cible au cours de la réaction PCR et elle sera faible ou absente pendant la phase de dénaturation. Plus récemment, le SYBR Green I est très utilisés, il s'agit d'un fluorochrome lorsqu'il est excité par un rayonnement de longueur d'onde de 494 nm a un rendement quantique de fluorescence de l'ordre de 0.0004 à l'état libre et de l'ordre de 0.69 lorsque se lie à l'ADN double brin avec une émission fluorescente de longueur d'onde de 521nm **(Soheili et Samiei, 2005 ; Hainque *et al.,* 2008 ; Overbergh *et al.,* 2010).**

L'inconvénient majeur de cette méthode de détection quelle n'est pas spécifique, car ces agent peuvent se lier à n'importe qu'elle ADNdb (produit non spécifique de la PCR ou dimère d'amorce) formé au cour de l'amplification **(Soheili et Samiei, 2005).**

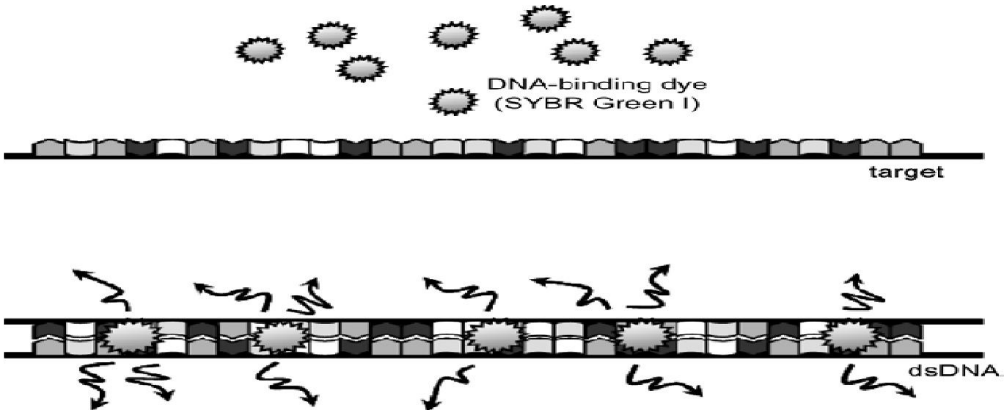


Fig. 5- Marqueurs intercalations de l'ADN sont incorporés au sillon mineur de l'ADNdb. Lorsque cela se produit, une lumière fluorescente est émet **(Overbergh *et al.,* 2010)**.

II.2.2.3.2. Hydrolyse de sondes (Hydrolysis probes: Taqman assay)

La technologie de détection avec des sondes d'hydrolyse exploite l'activité 5' exonucléasique de la Taq polymérase qui permet l'hydrolyse d'une sonde appelées sonde TaqMan hybridé avec le produit de la PCR dans un site de fixation différent au site de fixation des amorces lors de l'amplification. La sonde utilisée est un oligonucléotides marquée sur leur deux extrémités par deux groupements fluorescents ; l'un est un fluorochrome émetteur appelé rapporteur fixé à l'extrémité 5' habituellement le FAM, le TET ou le VIC et à l'extrémité 3' se trouve un autre marqueur accepteur appelée extincteur (quencher) qui a un maximum d'absorption à une longueur d'onde correspond à celle d'émission du rapporteur tel que le TAMRA **(poitras et Houde, 2002 ; Bisco, 2011 ; Farrell, 2017 ; Budiarto, 2018).**

Dans une sonde intacte, par transfert d'énergie de résonance de fluorescence (FRET) la fluorescence du rapporteur est annulé par le quencher spatialement proche qui dissipe cette énergie sous forme de chaleur **(Farrell, 2017 ; Budiarto, 2018).**

Après l'hybridation de la sonde et les amorces à leurs séquences complémentaires correspondantes, la taq polymérase commence à constituer le nouveau brin par l'extension de l'amorce hybridée, lorsqu'elle atteint la sonde, l'activité 5' exonucléasique associée à cette enzyme clive la sonde qui est hybridée au brin cible, libérant le rapporteur qui commence à

émettre une fluorescence lors de l'excitation du laser, sans plus d'être sous l'influence de l'extincteur **(poitras et Houde, 2002 ; Farrell, 2017).**

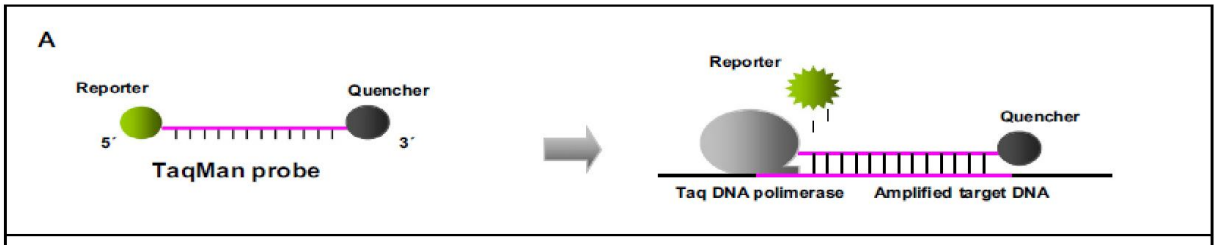


Fig.06-Principe du TaqMan **(Navarro, 2014).**

II.2.2.3.3. Hybridation de 2 sondes (Hybridization probes)

L'hybridation d'une paire de sondes fluorescentes nommée également HybProbes est un autre système de détection. Les sondes utilisées dans ce système sont marquées d'une manière que la première porte un fluorochrome émetteur sur son extrémité 3'et la deuxième fixe un autre chromophore accepteur sur son extrémité 5'. Pendant l'étape d'hybridation ces sondes sont capables de s'hybrider de façon tête-queue à des séquences cibles étroitement juxtaposées sur le fragment d'ADN d'intérêt menant aux deux fluorochromes de rester adjacent à moins de 1 à 5 nucléotides permettant le phénomène de FRET dont l'émission de fluorochrome émetteur lorsque excité entraine l'excitation de fluorochrome accepteur qui émet une fluorescence proportionnelle à l'intensité d'hybridation juxtaposée des sondes **(velden *et al.*, 2003 ; Arya, 2005 ; Hainque *et al.*, 2008).**

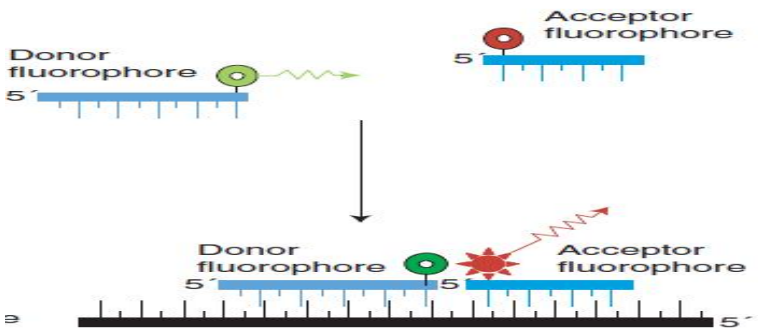


Fig. 07- Principe de HybProbes **(Arya, 2005).**

II.2.2.3.4. Balises moléculaires (sonde d'hybridation en épingle à cheveux: Molecular Beacons)

Cette technologie repose sur l'utilisation des oligonucléotides appelées balises moléculaires leurs deux extrémités 5' et 3' portent un fluorochrome rapporteur et un quencher respectivement. Chaque balise moléculaire renferme trois parties ; deux séquences courtes complémentaires qui après leur hybridation, la balise prend un forme en épingle à cheveux et une séquence complémentaire du produit de la PCR à détecter exposée au sommet de la boucle, dans cette conformation le rapporteur est assez proche au quencher, par conséquent par l'effet FRET aucune fluorescence ne peut être émet **(Mocellin *et al.,* 2003 ; Morvan *et al.,* 2005 ; Mathys*et al.,* 2007; Overbergh *et al.,* 2010).**

Mais en présence de fragment de l'ADN à amplifier, la sonde par complémentarité s'hybride avec ce fragment et à ce moment la balise se déplie ce qui permet d'éloigner le rapporteur du quencher de sorte que le FRET ne se produise plus, alors une fluorescence peut être produit **(Mocellin *et al.,* 2003 ; Morvan *et al.,* 2005 ; Mathys*et al.,*2007 ; Overbergh *et al.,* 2010).**

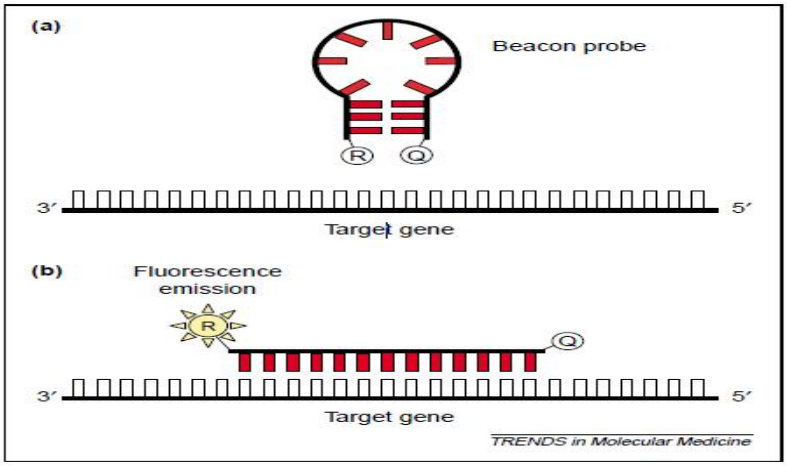


Fig.08-Principe de balises moléculaires**(Mocellin *et al.,* 2003).**

II.2.2.3.5. Amorces Scorpion (Scorpion primer: self-fluorescing amplicon)

Dans une seule molécule, la combinaison d'une sonde marquée avec une amorce spécifique forme une amorce Scorpion qui est une variante de balises moléculaires. L'amorce Scorpion possède une structure en épingle à cheveux (boucle-tige) fixe un rapporteur à l'extrémité 5' et un extincteur à l'extrémité 3', La tige sert à garder ces deux fluorochromes à proximité, inhibant la production du signal. Un bloqueur tels que l'hexathylène glycol (HEG)

sépare la partie sonde du partie amorce, empêchant l'extension à partir de la sonde, ce qui entraînerait le repliement de celle-ci en épingle à cheveux en l'absence d'une cible spécifique **(Bates et Taylor, 2001 ; Velden, 2003 ; Hainque *et al.,* 2008; Navarro, 2014).**

Au cours de la PCR, l'extension se produit normalement à partir de l'amorce. Dans l'étape d'hybridation du cycle suivant, si le gène cible a été amplifié, la boucle en épingle à cheveux se déplie et la partie sonde s'hybride à sa séquence cible en aval de l'amorce sur le brin néosynthétisé permettant d'éloigner le rapporteur de l'extincteur générant un signal fluorescent **(Bates et Taylor, 2001; Velden, 2003;Hainque *et al.,* 2008; Navarro, 2014).**

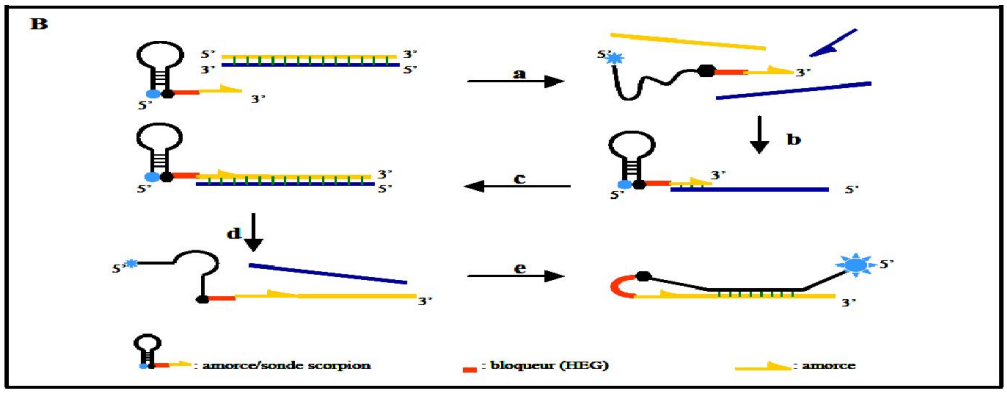


Fig. 09- Principe d'amorces Scorpion **(poitras et Houde, 2002).**

II.2.2.4. PCR en temps réel et tuberculose

Grâce à leur spécificité, sensibilité, rapidité et fiabilité, les techniques d'amplification génique sont de plus en plus utilisées. Ces techniques permettent d'augmenter le nombre de copies d'acide nucléique donc la présence d'une molécule d'ADN ou d'ARN par échantillon peut suffire pour que les bacilles du complexe MTBC soient détectés. Théoriquement, ces techniques peuvent être efficaces même dans la confirmation d'examens microscopiques négatifs. La spécificité de ces méthodes est excellente elle est, en moyenne, de l'ordre de 97% ; aucun acide nucléique autre que celui ciblé ne peut être amplifié(**L'Hadj *et al.,* 2006 ; Truffot-Pernot et Veziris, 2011 ; Vincent, 2013 ;Slim-Saidi *et al.,* 2015 ; Jabri *et al.,* 2016 ; Gupta et Kakkar, 2018).**

En revanche, la performance de ces techniques peut être compromise par nombreux facteurs ; la méthode d'extraction des acides nucléiques, les conditions de la PCR et de type d'échantillons cliniques (**Hur *et al.,* 2010 ; Slim-Saidi *et al.,* 2015**).

Bien que, le seuil théorique de détection de la PCR soit une copies d'ADN ; la sensibilité de cette technique peut être affecté par la nature des échantillons biologiques utilisés. Tant que les mycobactéries colonisent les poumons, pour le diagnostic, les échantillons respiratoires sont les plus couramment utilisés. Plusieurs études ont montré que les meilleurs résultats de ces techniques sont obtenus sur des prélèvements pulmonaires d'une sensibilité d'ordre de 100%. Cette sensibilité est beaucoup plus inferieur pour les tuberculoses extra-pulmonaires Mais ce test reste recommandé afin de confirmer une tuberculose extrapulmonaire même dans les cas paucibacillaires (**Wouter *et al.,* 2011 ; Vincent, 2013 ; Jabri *et al.,* 2016 ; Chin *et al.,* 2018).**

Même en utilisant des prélèvements pulmonaires la sensibilité de la PCR est variable. En cas d'examen microscopique positif la PCR conventionnelle a une sensibilité supérieure à 90% et une spécificité proche de 100%, alors qu'en cas d'examen microscopique négatif, la sensibilité est varie entre50 %à 95,9 %. Actuellement cette technique représente un test idéal recommandé pour les échantillons à microscopie positive, afin de confirmer la présence de MTBC et de différencier les bacilles tuberculeux de non tuberculeux **(L'Hadj *et al.,* 2006 ; Lalande, 2012 ; Vincent, 2013 ; Nour-Neamatollahi *et al.,* 2018).**

Comparée à la PCR conventionnelle, la rt-PCR par l'utilisation des sondes marquées facilitant la quantification des acides nucléiques, ainsi que l'automatisation et l'informatisation des données offre une sensibilité et une spécificité accrues avec des échantillons pulmonaires et extrapulmonaires **(Kaur *et al.,* 2016).**

Les gènes à amplifier et les amorces utilisés peuvent affecter la fiabilité, la sensibilité et la spécificité de la PCR. Pour le diagnostic moléculaire de la tuberculose, de nombreuses régions du génome mycobactérien peuvent être utilisées, telles que la séquence d'insertion IS6110, l'ARNr16S, le gène rpoB et le gène MPT64 **(Pinhata *et al.,* 2015 ; Kabir *et al.,* 2018)**

II.2.2.4.1. Gène codant l'ARNr16S

C'est un gène conservé et universel chez les procaryotes pour cela ce gène est utile pour identifier les espèces difficiles à caractériser à l'aide de méthodes conventionnelles. Ce gène est utilisé pour l'identification rapide de Mycobacterium par PCR conventionnelle ou PCR en temps réel en utilisant des amorces spécifiques. Cependant, l'analyse de ce gène seul

est insuffisant pour distinguer avec précision les membres de MTBC de mycobactéries non tuberculeuses **(Jarlier *et al.,* 2004 ;Chin *et al.,* 2018).**

La trousse commercialisée Amplicor Roche Diagnostic (Roche Diagnostics), afin de détecter le MTBC réalise une amplification génique en utilisant des amorces spécifiques pour un fragment du gène codant pour l'ARNr 16s de Mycobacterium. Cette technique utilise d'éviter touts contaminations elle utilise l'uracile-N-glycosylase (UNG). Elle peut être utilisé de façon PCR conventionnelle : Amplicor Roche Diagnostic (Roche Diagnostics) ou en PCR en temps réel : COBAS® TaqMan® MTB (Roche Diagnostics) **(Kerleguer *et al.,* 2002 ; Maugein et Bébéar ,2003 ; L'Hadj *et al.,*2006 ; Hur *et al.,* 2010).**

II.2.2.4.2. Gène MPT64 (MPB64)

Ce gène spécifique se trouve en copie unique dans le génome de MTBC, il est spécifique et il a été utilisé comme un gène cible pour le diagnostic à la fois de la tuberculose pulmonaire et extrapulmonaire. La PCR utilisant le gène MPT64 montre une sensibilité et une spécificité de 88% et 100%, respectivement **(Hasegawa *et al.,* 2002; Arora *et al.,*2015 ; Watanabe-Pinhata*et al.,* 2015 ;SINGH*et al.,* 2017 ; Chin *et al.,* 2018).**

Introduit en 2011, ce test est approuvé par l'OMS comme un test de première ligne pour le dépistage à grande échelle de tuberculoses pulmonaires, extrapulmonaires, le test Xpert MTB / RIF est une analyse PCR en temps réel, il Co-amplifie une partie du gène MPT64 et du gène rpoB lorsque muté cause une résistance à la rifampicine. Par conséquent, ce test peut détecter simultanément la TB et sa résistance à la rifampicine. Le test Xpert MTB / RIF a montré une sensibilité et une spécificité élevées pour diagnostiquer la tuberculose pulmonaire et aussi extrapulmonaire. Les évaluations publiées sur le test Xpert MTB / RIF ont montré une excellentes performances, avec une sensibilité de détection des cas similaire à celle d'une culture conventionnelle et une excellente spécificité **(Talbot et Raffa, 2015 ;García-Basteiro*et al.,* 2018).**

II.2.2.4.3. Gènes rpoB

Le gène rpoB est le gène le plus valable pour détecter la résistance à la rifampicine, ce gène code pour la sous-unité b de l'ARN polymérase qui est la cible de la rifampicine. Une mutation touche la base 81au niveau de ce gène est la cause principale de la résistance à la

rifampicine, cette mutation représentent environ 96% de la résistance phénotypique à la rifampicine (**Caulfield 2016 ;Jeanes et O'Grady, 2016 ; Raj *et al.,* 2016).**

II.2.2.4.4. Gène kat G

Comme plus de 90% des souches résistantes à la rifampicine sont également résistantes à l'isoniazide, la résistance à l'isoniazide provient de mutations dans les gènes codant pour la catalase peroxydase (katG) ; enzyme intervenant dans l'activation de l'isoniazide entraînant une résistance de haut niveau ou de mutations dans le gène inhA codant pour une enzyme enoyl-ACP réductase NADH-dépendante, enzyme impliquée dans la biosynthèse des acides mycoliques de la paroi mycobactériènne qui est la cible de la forme active d'isoniazide c'est une résistance de bas niveau**(Brossier, 2011 ; Jeanes et O'Grady, 2016).**

II.2.2.4.5. Séquence d'insertion IS6110

Par le biais de polymorphismes, d'insertions, de délétions et d'autres réarrangements génétique les membres du complexe MTBC avaient évolué. Dans le génome de MTBC comme chez la plupart des procaryotes, divers éléments génétiques mobiles ont été détectés. Ces éléments appelés séquences d'insertion (IS) sont capables grâce à un processus appelé transposition de se déplacer d'un locus à un autre **(Mcevoy *et al.,* 2007 ; Alonso *et al.,* 2011).** En fonction des similitudes structurelles ces séquences sont classées en différentes familles. Le génome des membres du MTBC peut inclus plusieurs types de ces séquences et qui sont impliquées dans sa plasticité du génome de MTBC: IS3, IS5, IS21, IS30, IS110, IS256; IS1535, ISL3…etc **(Menéndez *et al.,* 2012 ; Chin *et al.,* 2018).**

La séquence d'insertion IS6110 appartient à la famille IS3 est une séquence de 1361 paires de base (Pb) caractérisé par des répétitions inversées terminales imparfaites (IR) de 28 Pb, lors de leur intégration une duplication de 3 à 4 pb à proximité du site d'insertion est nécessaire, elle contient deux cadres de lecture qui se chevauchent partiellement ; l'orfA et l'orfB codant pour une transposase appelé la protéine OrfAB **(McEvoy *et al.,* 2007 ; Menéndez *et al.,* 2012).**

Cette séquence présente un polymorphisme numérique et de positions étendues et grâce à ce polymorphisme la séquence d'insertion (IS) 6110 a été largement utilisée comme marqueur génotypique dans les études épidémiologiques. Des études épidémiologiques

montrent que le taux de transposition d'IS6110 a été estimé à environ 18% sur une période de 5 à 6 ans. Mis à part son rôle épidémiologique moléculaire inestimable, il est devenu claire ces dernières années, que la séquence IS6110 par sa mobilité, est capable de modifier l'expression des gènes et pouvait ainsi contribuer à la diversité phénotypique entre différents gènes souches de tuberculose **(McEvoy *et al.,* 2007 ; Menéndez *et al.,* 2012)**.

En raison de la nature répétitive de la séquence d'insertion IS6110, elle est couramment utilisée comme cible dans la détection du MTBC dans des échantillons pulmonaires ou extra-pulmonaires avec des délais de détection considérablement réduits. La sensibilité et la spécificité dans la détection du MTB à l'aide de la PCR basée sur la séquence IS6110 diffèrent selon les laboratoires, allant de 50 à 90% et de 60 à 100% respectivement. Pour le diagnostic de tuberculose pédiatrique et pulmonaire chez l'adulteles analyses PCR IS6110 et PCR en temps réel ont montré une sensibilité élevée variée entre 71 et 87,9% et une spécificité aussi accrue de 95 à 98% (**Lahlou, 2016 ; Kaur *et al.,* 2016 ; Kabir *et al.,* 2018).**

Une étude réalisé à Mumbai par Rathore *et al.,* dans 2011 et par l'utilisation des sondes d'hydrolyse ont observé une sensibilité de 100% pour la détection de *M. tuberculosis* à l'aide de gène IS6110 et une autre étude réalisée au Brésil par Lira et al., en 2013 a montré une sensibilité de 79,7% et de 94,8% de spécificité avec l'utilisation du test IS 6110 Taqman. Kaur et al.2014 ont trouvé une sensibilité de 87,2% et une spécificité de 98,3% pour la PCR en temps réel dans la détection du MTB directement à partir d'échantillons d'expectorations**(Rao *et al*.,2016).**

Partie II

Etude expérimentale

Chapitre I

Matériel et méthodes

I. 1. Principe d'étude

Ce présent travail est effectué dans le contexte de la mise en marche d'un test PCR en temps réel pour le diagnostic de routine de la tuberculose dans le laboratoire d'analyse médical El Amel, donc il s'agit du premier lancement de ce test dans ce laboratoire. Sachant que ce laboratoire n'effectue des tests rt-PCR que seulement pour la quantification de la charge virale par l'utilisation de l'automate EZ 1 Advanced XL (QIAGEN, Hilden, Allemagne) pour l'extraction automatisée d'ADN et le Rotor-Gene Q MDx (QIAGEN, Hilden, Allemagne) pour l'amplification de ces molécule par PCR en temps réel en utilisant des réactifs fournit par la société QIAGEN.

Pour rependre à l'exigence des médecins de la région et dans la thématique de laboratoire de lancer le diagnostic de la tuberculose par utilisation des techniques plus performantes et plus rapide cette étude est réalisée. En revanche, la société QIAGEN ne fournit pas des kits destinée pour l'extraction automatisée d'ADN mycobactérien. L'objectif de cette étude est d'automatiser le Protocol d'extraction d'ADN mycobactérien dans l'automate EZ 1 Advanced XL (QIAGEN, Hilden, Allemagne).

Pour atteindre cet objectif Les étapes citées ci-dessous sont suivies :

- Choix de la méthode d'extraction de l'ADN.
- Choix des kits et des cartes d'extraction.
- Prétraitement des échantillons.
- Extraction de l'ADN mycobactérien et son amplification.

I.2. Lieu d'étude

Nous avons réalisé notre travail au niveau du laboratoire d'analyse médicale El Amel, qui est situé au centre-ville de la wilaya d'Ouargla dans la Cité Bahmid Avenu Si El-haoues à proximité de l'Hôpital Mohamed BOUDHIAF. Agrée par décision n° 090/DSP Ouargla. Ce laboratoire est sous la direction de Dr. HADJADJ Sofiane titulaire d'un Diplôme d'études spécialisé de la Faculté de Médecine d'Alger et d'un Diplôme Universitaire de la Faculté de Médecine de Montpellier, France, qui est notre Co-promoteur dans ce travail.

Les analyses médicales effectuées dans ce laboratoire sont exécutées à l'aide des techniques récentes et performantes pour garantir des résultats fiables, répondant aux normes

internationales et aux nouvelles orientations de la Société Algérienne de Biologie Clinique à laquelle il y adhère. Ces analyses regroupent différents domaines: la biochimie, l'hormonologie, l'immunologie, la sérologie, l'hématologie, l'hémostase, la bactériologie, la parasitologie, la mycologie, la fertilité et plus récemment la biologie moléculaire.

À l'heure actuelle, ce laboratoire n'effectue pour le diagnostic moléculaire que des tests de PCR en temps réel en utilisant pour l'extraction et l'amplification des automates spécialisés. Avec toute cette automatisation, les risques de contamination sont bien maitrisés. Aucune contrainte particulière n'a affecté l'organisation des locaux, sauf pour la préparation des réactifs de PCR. Une salle est occupée spécialement pour la préparation et l'aliquotage des réactifs équipée par un congélateur pour stocker les réactifs et les échantillons. L'extracteur EZ 1 Advanced XL et le thermocycleur Rotor Gene Q sont installés sans particularité dans une autre salle mais dans deux zones séparées. La position de ces deux salles qui sont très voisines l'une de l'autre permet d'assurer une circulation cohérente et unidirectionnelle (voire annexe 1 et annexe 2).

I.3. Collecte des échantillons

Les prélèvements sont effectués dans des écouvillons et des tubes secs stériles. Après la collecte, les échantillons qui sont traitées durant les 24 heures suivant la collecte sont conservés à une température de 4 °C tandis que la conservation à long terme des échantillons est effectué à -20 °C.

I.4. Matériel biologique

La recherche de MTBC est effectuée sur 6 essaies de PCR, dont 4 échantillons sont testés,avec répétions des 2 premiers essais. Les trois premiers spécimens sont des échantillons extra-pulmonaires des patients suspectés et le quatrième est un échantillon pulmonaire, crachat positive après coloration Ziehl-Neelsen utilisé comme témoin positif.

I.5. Extraction de l'ADN

La qualité d'extraction de l'ADN est une étape cruciale qui peut affecter l'amplification soit par la perte d'ADN cible soit par la présence des inhibiteurs de la PCR. La contamination peut engendrer des résultats faussement positifs. Pour surmonter ces problèmes le concept d'automatisation est développé. Mais comme était déjà mentionné

l'indisponibilité de kit d'extraction automatisée d'ADN mycobactérien en utilisant l'automate EZ 1 Advanced XL nous a imposé à essayer d'optimiser au maximum cette étape.

I.5.1. Choix de la méthode d'extraction de l'ADN

Selon la littérature, le protocole d'extraction manuelle décrit dans le manuel de kit *artus M. tuberculosis* RG PCR recommandé par la société QIAGEN (voire annexe 3) et qui peut être réalisé à l'aide de kit QIAamp DNA Mini (QIAGEN, Hilden, Allemagne) référence 51304 est considéré comme le protocole le plus validé pour l'extraction d'ADN mycobactérien à partir des échantillons humains d'expectorations, de lavage broncho-alvéolaires (BAL), de sécrétions bronchiques, de liquide céphalo-rachidien (LCR), de fluide gastrique ou de ponction péritonéale pour l'utilisation avec le kit *artus M. tuberculosis* RG PCR. **Santos *et al.* (2010); El-Sharif *et al.* (2012) ; Ajantha *et al.* (2013) ; Kohlmorgen *et al. (*2017) et Fulco Santos (2018)** ont suivi le même protocole d'extraction.

En vue de la contagiosité de la maladie ce protocole ne peut être réalisé que sous un poste de sécurité microbiologique (PSM) et que le laboratoire d'analyse médical El Amel est bien équipé d'un extracteur d'ADN automatisé EZ1 Advanced XL, donc il faut bien d'exploiter cet extracteur. Avec cette automate qui inclus un système automatisé de lampe UV (voire annexe2), les étapes d'extraction et de la purification sont totalement automatisées et effectués dans un système fermé minimisant les durées et les étapes de manipulations ainsi que les risques de contamination des échantillons et aussi de manipulateurs. Pour bénéficier de ces avantages et bien exploiter cet appareil, l'extraction d'ADN mycobactérien est effectuée en utilisant cet extracteur.

I.5.1.1. Extraction automatisée EZ1 Advanced XL

Pour utiliser cet automate dans l'extraction d'ADN mycobactérien, il faut bien choisir la carte d'extraction et son kit convenable car jusqu'à maintenant il n'existe plus une carte destiné pour l'extraction automatisé d'ADN mycobactérien par cet automate. Pour cela dans ce travail en premier temps, la carte EZ1 DNA Blood et son kit EZ1 DNA Blood 350 µl sont utilisés pour l'extraction d'ADN mycobactérien de deux premiers échantillons puis l'extraction des restes des échantillons est effectuée par l'utilisation de la carte EZ1 DSP virus et son kit EZ1 DSP virus 48 version 4.

I.5.1.1.1. Extraction automatisée EZ1 Advanced XL à l'aide de kit EZ1 DNA Blood 350µl

Après concertation de technicien de la société, fournisseur de kits et d'automates de la société QIAGEN, la carte EZ1 DNA Blood et son kit EZ1 DNA Blood 350 µl sont utilisés pour l'extraction d'ADN mycobactérien de deux échantillons des patients suspectés ; le premier il s'agit d'une ponction articulaire d'un homme et le deuxième est un prélèvement vaginal d'une femme enceinte.

I.5.1.1.1.1. Principe

Des cartouches de réactifs (RCB) fournies avec le kit EZ1 DNA Blood 350 µl sont pré-remplies avec tous les réactifs nécessaires à la lyse, à l'inactivation des nucléases, à l'extraction et à la purification d'ADN. La carte EZ1 DNA Blood est préprogrammée avec des protocoles d'extraction et de purification convenables avec ce kit.

La technologie de billes magnétiques offre une purification efficace et rapide d'ADN. En présence d'un sel chaotropique ; le thiocyanate de guanidine, l'ADN est isolé des lysats en s'adsorbant à la surface de silice de ces billes, alors que les autres contaminants sont lavées. Les particules magnétiques sont séparées des lysats à l'aide d'un aimant. L'ADN est ensuite efficacement lavé et élué dans du tampon d'élution**(manuel du kit EZ1 DNA Blood 350 µl, 2015).**

L'extraction est effectuée en utilisant 350 µl d'échantillon et le volume d'élution choisi est de 50µl selon les instructions mentionnés dans le manuel du kit.

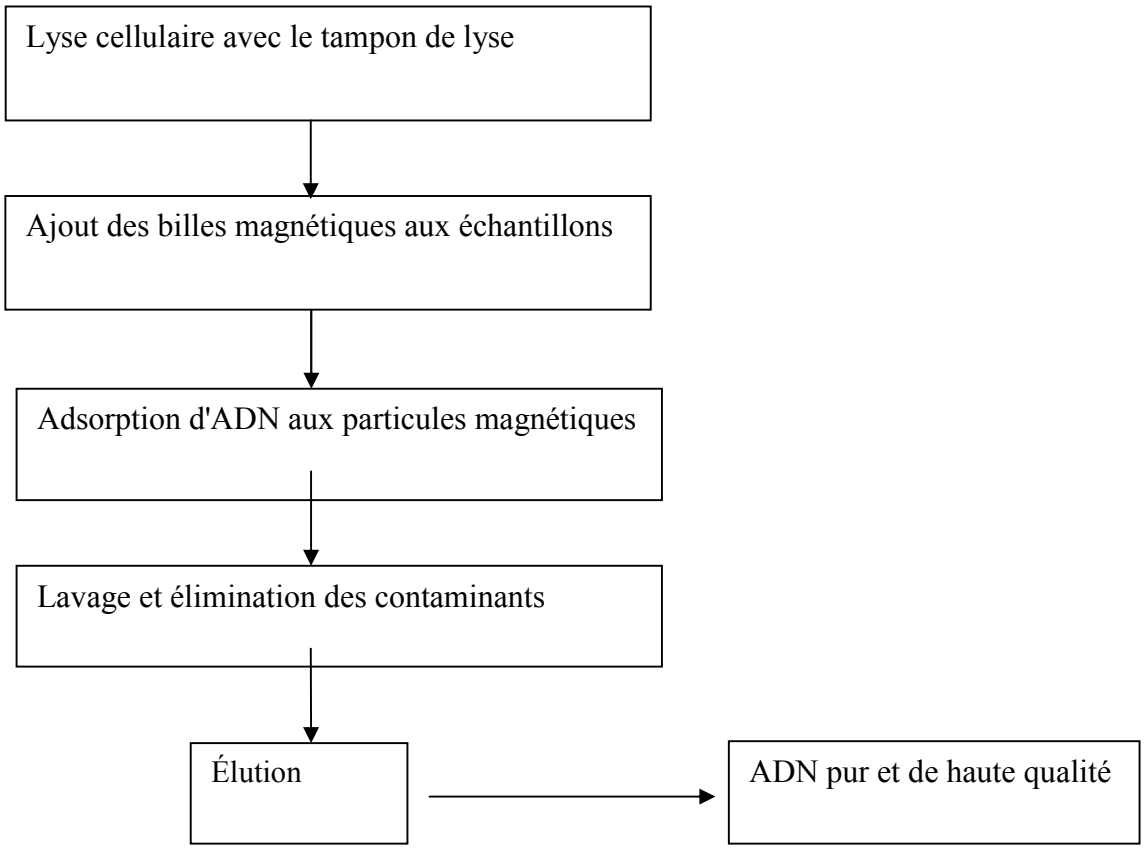


Fig.10- Schéma de principe d'extraction à l'aide de kit EZ1 DNA Blood 350 µl.

I.5.1.1.1.2. Mode opératoire

1. centrifuger l'échantillon à 5000 pendant 10 minutes.
2. Récupérer le culot et le remettre en suspension par 300 µl d'eau physiologie.
3. Transférer 350 µl d'échantillon dans des tubes ST de 2 ml ;
4. Insérer la carte EZ1 DNA Blood dans la fente correspondante ;
5. Allumer l'appareil EZ1 ;
6. Appuyer sur « START » pour lancer la configuration de la table de travail pour le protocole EZ1 DSP Blood ;
7. Ouvrir la porte de l'appareil ;
8. homogénéiser les cartouches de réactifs (RCB) à trois reprises afin de mélanger les particules magnétiques ;
9. Insérer les cartouches de réactif dans le support de cartouches ;
10. Ramener le support de cartouches sur la table de travail ;
11. Suivre les instructions à l'écran pour la configuration de la table de travail ;
12. Charger les tubes d'élution tubes d'élution (1) dans la première rangée, les supports de cônes jetables (2) contenant des cônes munis de filtre jetables dans la deuxième rangée, des tubes de 2 ml (3) contenant 1800 µl d'éthanol à 80% dans la troisième rangée, les tubes d'échantillon (ST) (2 ml) dans la quatrième rangée et les cartouches de réactifs (RCB) dans leur portoir comme indiqué dans la figure 11(g) ;
13. Fermer la porte de l'appareil ;
14. Choisir 50µl pour le volume d'élution ;
15. Appuyer sur « START » afin de lancer le protocole ;
16. À la fin du protocole, l'écran affiche « Protocol finished » (Protocole terminé). Appuyer sur « ENT » pour commencer l'extraction;
17. Après 22 minutes, ouvrir la porte de l'appareil et retirer les tubes d'élution (ET) contenant l'ADN mycobatérien purifiés prête à l'emploi.

Fig.a- Insertion de la carte EZ1 DNA Blood

Fig.b- Ouverture de la porte de l'appareil

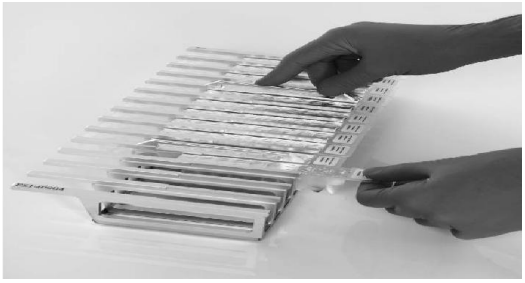


Fig.c-Insertion des cartouches de réactif dans le support de cartouches

Fig.d- Ramène de support de cartouches sur la table de travail

Fig.e- Charge des tubes, des supports de cônes et des cônes.

Fig.f- Ramène de support des tubes et des cônes sur la table de travail

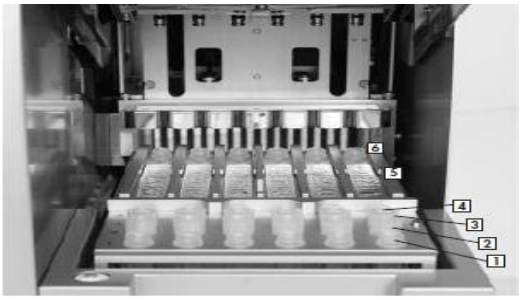


Fig.g - Table de travail cas d'utilisation de kit EZ1 DNA Blood 350 µl.

Fig.h- Fermeture de la porte de l'appareil

Fig.11- procédure d'extraction automatisée d'ADN avec EZ1 Advanced XL.

L'analyse des résultats d'amplification des ADN extraits en utilisant le kit EZ1 DNA Blood 350 µl de deux premiers échantillons et qui sont ininterprétables a permet de poser la question concernant la fiabilité de la méthode d'extraction et tant que l'extraction est automatisé on a suggéré que le problème est dans le choix de la carte et son kit d'extraction.

Ceci nous a amenée à comparer les trois protocoles d'extraction décrit dans les manuels des trois kits : de kit QIAamp DNA Mini kit pour l'extraction manuelle, de kit EZ1 DNA Blood 350 µl et de kit EZ1 DSP virus 48 pour l'extraction automatisée disponibles au sein de laboratoire. Il apparue que selon les instructions mentionnées dans le manuel de kit *artus M. tuberculosis* RG PCR et aussi les données bibliographiques**,** la lyse des mycobactéries est le résultat d'une combinaison entre un traitement enzymatique, chimique et thermique et que les deux kits QIAamp DNA Mini et EZ1 DSP virus 48 contiennent la protéinase K et aussi les lysozymes qui sont absents dans le kit EZ1 DNA Blood 350 µl.

En fonction de la composition biochimique d'enveloppe cellulaire, les procédures de la lyse se diffèrent ; la cellule leucocytaire est entouré d'une simple membrane phospholipidique, donc un simple ajout d'un détergent peut conduire à la dissociation de ses phospholipides membranaire permettant sa lyse, tandis que la cellule bactérienne qui se trouve entouré d'une membrane phospholipidique qui est elle même entourée d'une paroi peptidoglycane, sa lyse nécessite en plus de détergents, la dégradation de ses peptidoglycanes par un traitement enzymatique par les lysozymes et les protéinases ; un traitement qui n'est pas assuré par les cartouches de kit EZ1 DNA Blood 350 µl mais assuré par le protocole d'extraction manuelle et celui de kit EZ1 DSP virus 48 version 4 qui est destiné pour l'extraction d'acide nucléique viral et d'ADN bactérienne des bactéries Gram négatif.

Pour résoudre ce problème on a proposé de remplacer la carte EZ1 DNA Blood et son kit EZ1 DNA Blood 350 µl par la carte EZ1 DSP virus et son kit EZ1 DSP virus 48 version 4 pour l'extraction mais après la réalisation d'un prétraitement des échantillons à tester et aussi d'introduire un carier et des contrôles internes dès le début de l'étape d'extraction afin de contrôler la fiabilité d'extraction et d'amplification.

I.5.1.1. 2. Choix de prétraitement des échantillons

I.5.1.1. 2.1. Principe

Les donnés bibliographiques signalent que l'extraction d'ADN mycobactérien exige la combinaison entre trois traitements ; enzymatiques, chimiques et thermiques **(Watana-bepinhata *et al.,* 2015 ; Rahman *et al.,* 2017).** Le kit EZ1 DSP virus assure un traitement enzymatique par les lysozymes et la protéinase K et un autre chimique par un tampon de lyse ; ce qui permet la dégradation des parois peptidoglycanes des mycobactéries et aussi leurs membranes phospholipidique. Mais la dissociation des acides mycoliques des mycobactéries nécessite l'incubation ces bactéries avec un tampon de lyse à des températures très élevés.

L'EZ1 Advanced XL est équipé d'un système de chauffage permettent l'activation de la protéinase K inclus dans les cartouches de réactifs (RCV) fournies avec le kit EZ1 DSP virus à 56°C et sa dénaturation à une autre température plus élevé, mais la lyse et l'inactivation des mycobactéries nécessite des températures plus élevés arrivent jusqu' à 95 °C et 100°C pendant 15à 30 minute qui sont non inclus dans la programmation de la carteEZ1 DSP virus. Dans ce travaille nous avons choisi comme un prétraitement ; l'incubation des échantillons dans le tampon de lyse AL (20 mM de Tris-HCl (pH 8,0) ; 2 mM d'EDTA; 1,2 % de Triton™) fournit dans le kit QIAampDNA Mini (QIAGEN) (référence 51304) fournit par la société Qiagen à 95º c pendant 15 min.

I.5.1.1.2.2. Mode opératoire

1. Concerter les échantillons par une centrifugation à 5000g pendant 6 minutes ;
2. Récupérer le culot et le remettre en suspension par l'ajout de 200 µl de tampon de lyse AL 20 mM de Tris-HCl (pH 8,0) ; 2 mM d'EDTA; 1,2 % de Triton™) fournit dans le kit QIAampDNA Mini (QIAGEN) (référence 51304) ;
3. Homogénéiser le mélange par vortexage puis l'incuber à 95°C pendant 10 minutes.

I.5.1.1.3. Préparation d'ARN carrier et de contrôle interne

I.5.1.1.3.1. Principe

Afin d'augmenter la spécificité et de contrôler la qualité d'extraction, l'ARN carrier et le contrôle interne sont ajoutés ; L'ajout d'un ARN carrier appelé entraîneur (homopolymère d'ARN Poly A) dans l'étape d'extraction est nécessaire et surtout pour extraire des acides nucléiques à partir des échantillons à faible teneur en molécules cibles, car les ARN carriers en se fixant par affinité sur les billes à la surface de silice des billes magnétiques favorisent l'adsorption des acides nucléiques à la surface de silice de ces billes (manuel de kit EZ1 DSP virus 48, 2015) .

L'addition d'un contrôle interne qui il s'agit d'une séquence d'ADN capable d'être Co-amplifier par l'utilisation de mêmes amorces destinée pour l'amplification d'ADN cible, permettant de contrôler la qualité de purification d'ADN et de vérifier l'éventuelle survenue d'une inhibition de la PCR. Le contrôle interne utilisé dans ce travail est le contrôle interne *M. tuberculosis* RG IC inclut dans le kit d'amplification *artus M. tuberculosis* RG PCR (manuel de kit EZ1 DSP virus 48, 2015). .

I.5.1.1.3.2. Mode opératoire

1. Dissoudre l'ARN entraîneur lyophilisé dans 310 µl de tampon d'élution (AVE), cette solution est considérée comme étant la solution mère ;
2. Aliquoter cette solution et la conserver à –20 °C ± 5 °C. Cette derrière ne doit pas être subir plus de 2 cycles de congélation/décongélation ;
3. Diluer 3,6 µl de la solution-mère d'ARN entraîneur par l'ajout de tampon d'élution (AVE) contenant 7.9 d'une solution de contrôle interne pour obtenir un volume final de 60 µl.

I.5.1.1.4. Extraction automatisé EZ1 Advanced XL à l'aide de kit EZ1 DSP virus 48

Pour la validation de protocole d'extraction, un échantillon pulmonaire crachat positive après coloration Ziehl-Neelsen est utilisé. L'extraction d'ADN mycobactérien des restes des échantillons est effectuée à l'aide du kit EZ1 DSP virus 48 version 4 qui est valable pour l'extraction d'acide nucléique viral et d'ADN bactérienne des bactéries Gram négatif. La carte EZ1 DSP virus est préprogrammée avec des protocoles d'extraction et de purification convenables avec ce kit.

I.5.1.1.4.1. Principe

Des cartouches de réactifs (RCV) fournies avec le kit EZ1 DSP virus 48 version 4 sont pré-remplies avec tous les réactifs nécessaires à la lyse, à l'inactivation des nucléases, à l'extraction et à la purification des acides nucléiques. La purification d'ADN s'effectue à l'aide des billes magnétiques revêtues de silice et cette extraction automatisée fournit un éluât d'ADN pure prêt à être utilisé dans des applications de diagnostic moléculaire.

La lyse s'effectue dans des conditions hautement dénaturantes ; la protéinase K et le tampon de lyse permettent à des températures élevées la protéolyse des protéines d'enveloppe virale et l'inactivation des nucléases.

Afin d'ajuster les conditions d'adsorption un tampon, le thiocyanate de guanidine, est ajouté aux échantillons. Les billes magnétiques ajoutées aux lysats permettent une adsorption optimale des acides nucléiques viraux et de l'ADN bactérien à la surface de la silice.

Les conditions salines et de pH permettent l'adsorption d'acides nucléiques viraux et d'ADN bactérien alors que les protéines et d'autres contaminants, ne se lient pas aux billes magnétiques. Une succession d'étapes de lavage par le tampon de lavage 1, le tampon de lavage 2 et l'éthanol permette l'élimination de ces contaminants. Ensuit, dans le tampon d'élution (AVE) les acides nucléiques viraux et l'ADN bactérien de haute pureté sont élués) (Manuel de kit EZ1 DSP virus 48, 2015).

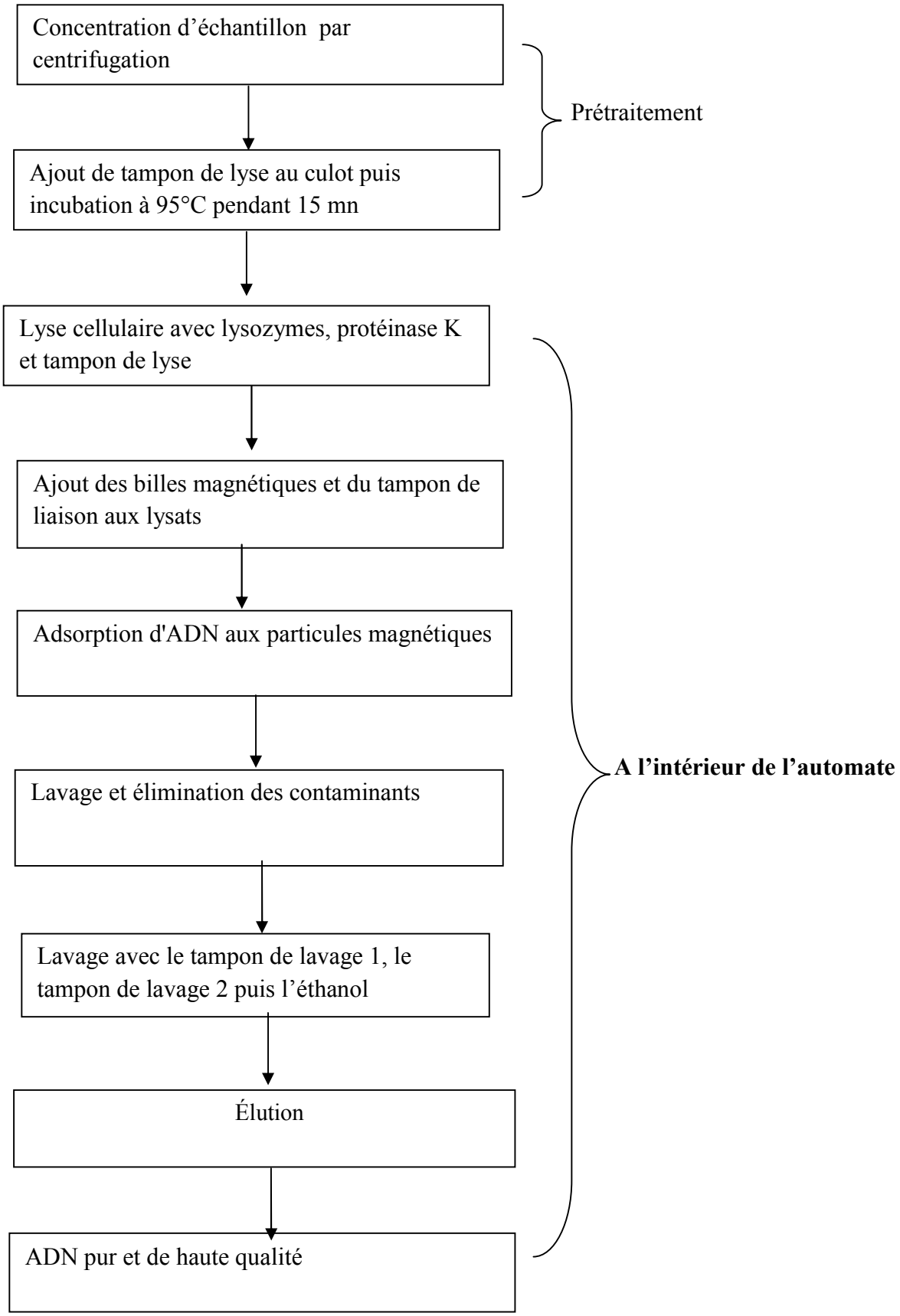


Fig.12- Schéma de principe d'extraction à l'aide de kit EZ1 DSP virus 48.

I.5.1.1.4.2. Mode opératoire

Une quantité de 400 µl d'échantillons est transférée dans des tubes de 2 ml pour l'extraction en utilisant l'extracteur automatisé EZ1 Advanced XL et à l'aide du kit EZ1 virus 48 version 4après l'insertion de la carte EZ1 DSP virus préprogrammée avec des protocoles d'extraction et de purification convenables avec ce kit et le volume d'élution choisi est de 60µl.

1. Transférer 400 µl d'échantillon dans des tubes ST de 2 ml ;
2. Insérer la carte EZ1 DSP virus dans la fente correspondante ;
3. Allumer l'appareil EZ1 ;
4. Appuyer sur « START » pour lancer la configuration de la table de travail pour le protocole EZ1 DSP Virus ;
5. Ouvrir la porte de l'appareil ;
6. homogénéiser les cartouches de réactifs (RCB) à trois reprises afin de mélanger les particules magnétiques ;
7. Insérer les cartouches de réactif dans le support de cartouches ;
8. Ramener le support de cartouches sur la table de travail ;
9. Suivre les instructions à l'écran pour la configuration de la table de travail ;
10. Charger les tubes d'élution (1) dans la première rangée, les supports de cônes jetables (2) contenant des cônes munis de filtre jetables dans la deuxième rangée, des tubes (ET) (1,5 ml) contenant de l'ARN entraîneur (CARRIER) et un témoin interne (IC) dans le tampon d'élution (AVE)dans la troisième rangée, les tubes d'échantillon (ST) (2 ml) dans la quatrième rangée et les cartouches de réactifs (RCB) dans leur portoir comme indiqué dans la figure 13 ci-dessous ;
11. Fermer la porte de l'appareil ;
12. Choisir 50µl pour le volume d'élution ;
13. Appuyer sur « START » afin de lancer le protocole ;
14. À la fin du protocole, l'écran affiche « Protocol finished » (Protocole terminé). Appuyer sur « ENT » pour commencer l'extraction;
15. Après 43 minutes, ouvrir la porte de l'appareil et retirer les tubes d'élution (ET) contenant l'ADN mycobatérien purifiés prête à l'emploi.

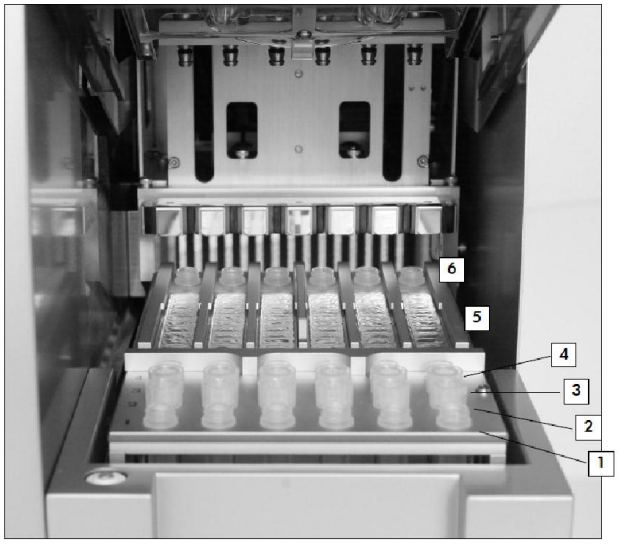


Fig.13-Table de travail cas d'utilisation de kit EZ1 DSP virus 48 version 4.

I.6. Amplification de l'ADN

La détection moléculaire de complexe de *M. tuberculosis* (MTBC) par amplification génique est réalisée à l'aide de kit *artus M. tuberculosis* RG PCR par l'utilisation de thermocycleur Rotor Gene QMD x. L'analyse et le traitement des données sont effectués sur le logiciel Rotor-Gene Q MDx/Rotor-Gene Q software version 1.7.94.

I.6.1.Principe

Le kit *artus M tuberculosis* RG PCR comprend tous les éléments nécessaires à l'amplification : des amorces, des cations Mg^{++}, des dNTPs, des Taq polymérases, des sondes marquées, des tampons Tris, des contrôles internes, des standards (*M. tuberculosis* RG QS 1–4) et de l'eau de grade PCR utilisé comme un contrôle négatif. L'ajout d'un contrôle négatif (eau de grade PCR) lors de la réaction d'amplification permet de bien différencier le résultat positif de celui négatif (manuel de kit *artus M. tuberculosis* RG PCR, 2015).

Fig.14-kit *artus M tuberculosis* RG PCR.

Tableau 02-Contenu du kit *artus M tuberculosis* RG PCR.

Couleur de bouchon	**Nom du réactif**	**Contenu**
Bleu	*M. tuberculosis* RG Master	Taq polymérases, amorces, sondes marqués dNTPs
Jaune	*M. tuberculosis* RG Mg-Sol*	cations Mg^{++}, tampons Tris
Rouge	*M. tuberculosis* RG/TM QS† 1	Standard 1 (3 x 10^4 copies/µl)
Rouge	*M. tuberculosis* RG/TM QS 2	Standard 2(3 x 10^3 copies/µl)
Rouge	*M. tuberculosis* RG/TM QS 3	Standard 3 (3 x 10^2 copies/µl)
Rouge	*M. tuberculosis* RG/TM QS 4	Standard 4 (3 x 10^1 copies/µl)
Vert	*M. tuberculosis* RG IC‡	contrôle interne
Blanc	Eau (grade PCR)	contrôle négatif

La réaction de la PCR est réalisée à l'intérieur d'un thermocycleur Rotor Gene QMDx automatisé qui peut faire varier de façon très précise la température de l'échantillon en fonction de temps programmé constituant des cycles , chaque cycle constitue de succession de trois étapes ; premièrement , la dénaturation des deux brins matrices qui est effectué en chauffant l'échantillon à une température de 95°C pendant 15 secondes, puis pour l'hybridation des amorces avec la matrice une diminution de la température à 64°C pendant 30 secondes est nécessaire. Une température de 72 ° C pendant 20 secondes permet à l'ADN polymérase l'élongation de chaque amorce hybridée à son extrémité 3'. Les amplicons générés à la fin de chaque cycle constituent des matrices pour les cycles suivantes, la succession des cycles 45 fois permet la duplication de nombre des copies d'ADN de départ.

Le kit *artus M. tuberculosis* RG PCR utilise pour la quantification des sondes Taqman marqués par le FAM pour la détection directe des amplicons spécifique du canal de fluorescence Cycling Green de l'appareil Rotor-Gene Q MD x. En outre, le kit contient un deuxième système d'amplification permettant d'identifier une éventuelle inhibition de la PCR. Celui-ci est détecté en se basant sur la fluorescence émet par le 2,7-dimethoxy-4,5-dichloro-6-carboxy-fluoroscein (JOE) en tant que contrôle interne (IC) dans le canal de fluorescence Cycling Yellow de l'appareil Rotor-Gene Q MD x (voire annexe 5).

Le kit *artus M. tuberculosis* RG PCR permet de réaliser des tests d'amplification en temps réel pour la détection des membres du complexe *M. tuberculosis*(*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. bovis*BCG, *M. microti*, *M. pinnipedii*).

Le test repose sur l'amplification d'une région spécifique du génome de l'agent pathogène. Il s'agit d'une séquence répétitive de 159 Pb du génome mycobactérien, c'est la séquence d'insertion IS6110 en utilisant des amorces oligonucléotidiques IS1 et IS2. Ces oligonucléotides sont synthétisés après séquençage de chromosome de la souche de référence H37Rv **(Balamurugan *et al.,* 2006 ; Al-Jebouri et Wahid, 2014 ; Osman *et al.,* 2014 ; Pai *et al.,* 2015 ; Kazdaglis *et al.,* 2016 ; Kaur *et al.,* 2016; Kaur *et al.,* 2017 ; Nour-Neamatollahi *et al.,* 2018).**

IS1 amorce sens: 5´- CCTGCGAGCGTAGGCGTCGG.

IS2 amorce antisens: 5´ - CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG.

I.6.2. Mode opératoire

1. Placer le nombre souhaité de tubes réactionnels dans le rotor convenable selon le nombre d'échantillons ;

2. Préparer un master mix comme indiqué ci-dessous :

M. tuberculosis RG Master	13 µl
M. tuberculosis RG Mg-Sol	2 µl
Volume total	**15 µl**

3. Distribuer 15 µl de master mix dans chaque tube de PCR ;

4. Ajouter ensuite 10 µl de l'échantillon d'ADN élué dans le tube correspondent ;

De manière correspondante, 10 µl de la norme de quantification doivent être utilisé. Il s'agit de *M. tuberculosis* RG QS 1–4 standards utilisés comme contrôles positifs et 10 µl d'eau (eau de grade PCR) comme contrôle négatif.

Mélange principal	15 µl
Échantillon	10 µl
Volume total	**25 µl**

5. Fermer les tubes de PCR ;

6. S'assurer que l'anneau de blocage (accessoire de Rotor-Gene) soit placé en haut du rotor pour éviter que les tubes ne s'ouvrent accidentellement au cours du cycle ;

7. Pour réaliser la réaction PCR, créer un profil de température en suivant les étapes mentionnées dans le manuel de kit *artus* M tuberculosis RG PCR.

Pour traiter directement le signal en temps réel et facilitant l'interprétation des résultats le Rotor Gene doit être branché d'un ordinateur dans lequel le logiciel Rotor-Gene Q MDx/Rotor-Gene Q software version 1.7.94 est installé. Après l'emplacement des tubes, la configuration de profil de l'amplification est faite à l'aide de logiciel Rotor-Gene Q MDx/Rotor-Gene Q software version 1.7.94 en suivant les étapes suivant :

1. sélectionner le modèle souhaité pour l'exécution en double-cliquant sur le modèle dans la liste du «New Run Wizard » ;

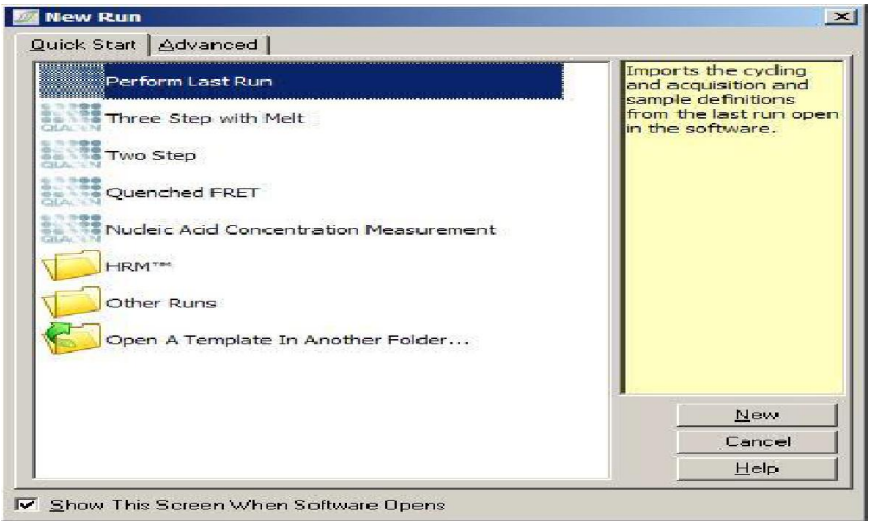


Fig.15- Listede New Run Wizard pour le choix de modèle d'amplification.

2. Choisir le rotor : Sélectionner le type de rotor et cocher la case Locking Ring Attached puis cliquer sur Next ;

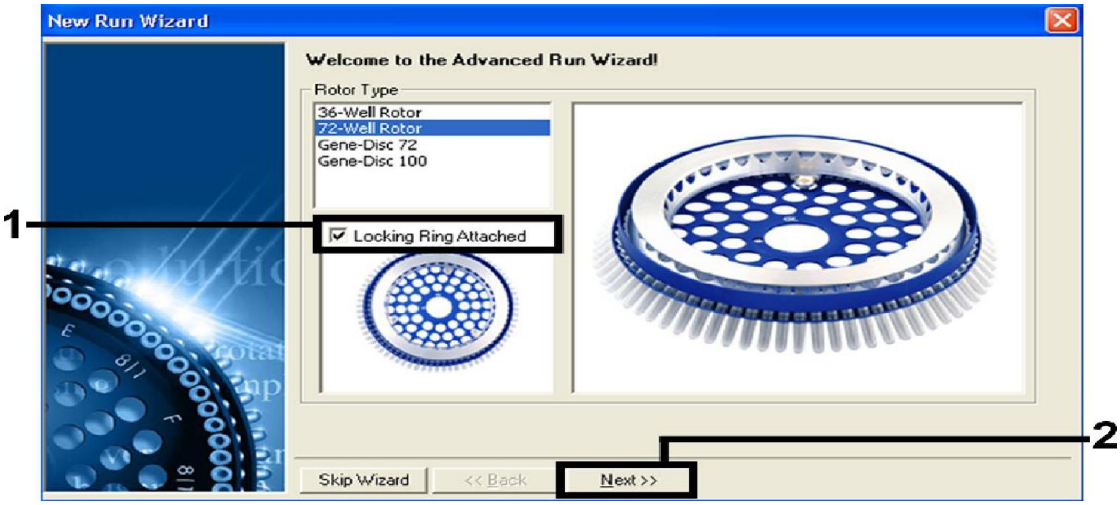


Fig.16- Choix de type de rotor.

3. Sélectionner 25 pour le volume de réaction PCR et cliquer sur Next ;

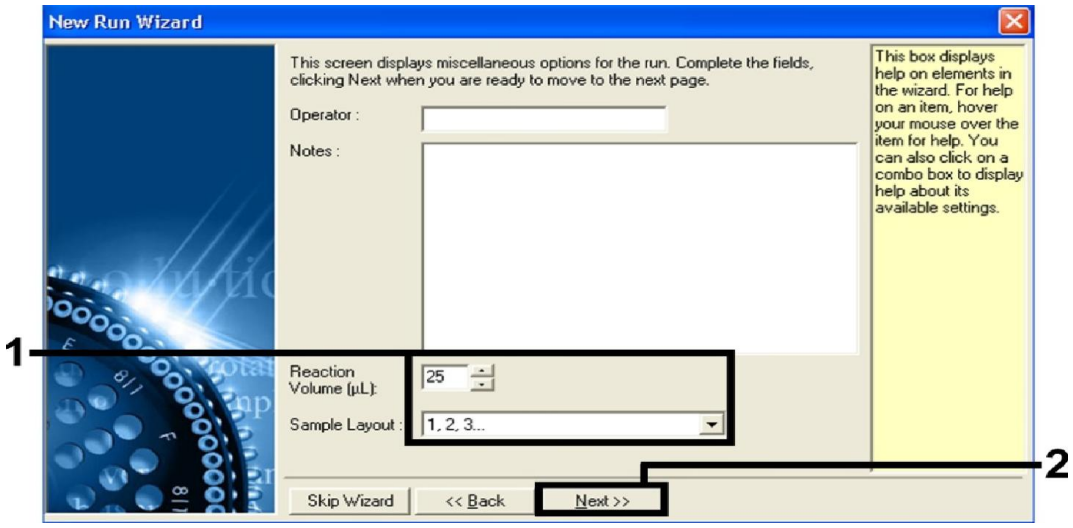


Fig.17-Définition des paramètres généraux du test.

4. Confirmer le profil :

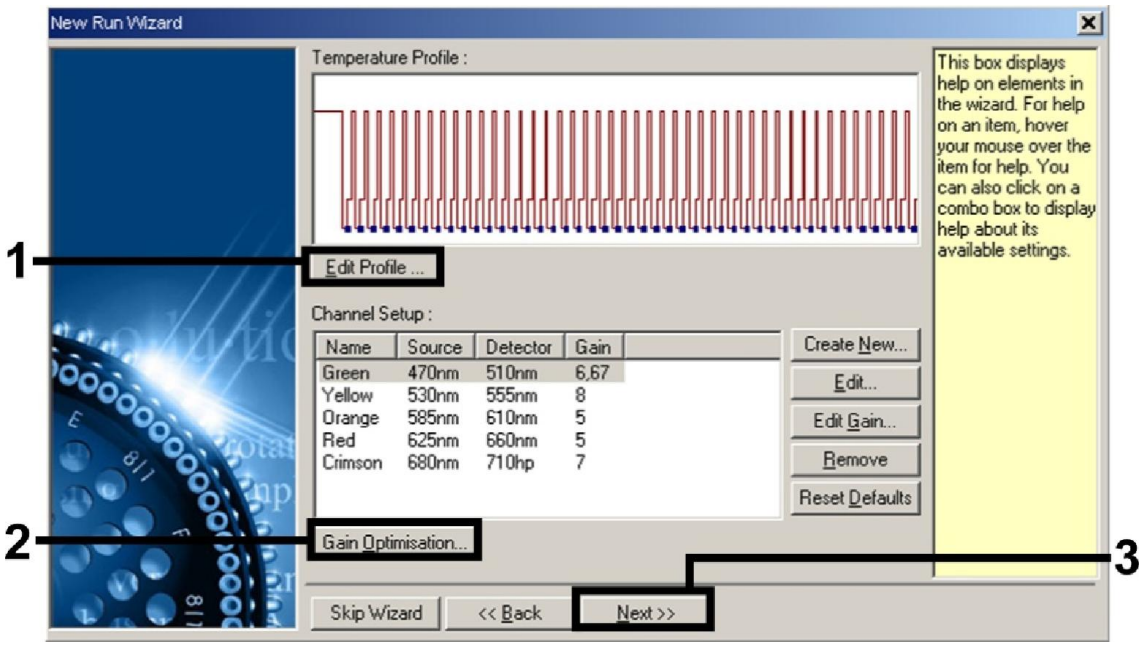


Fig.18- Conformation de profile de température et de la fluorescence.

4.1. Profile de température : Cliquer sur le bouton Edit profil dans la boîte de dialogue indiquée dans la figure au-dessus et programmer le profil de température comme il est indiqué aux deux Figures ci-dessous ;

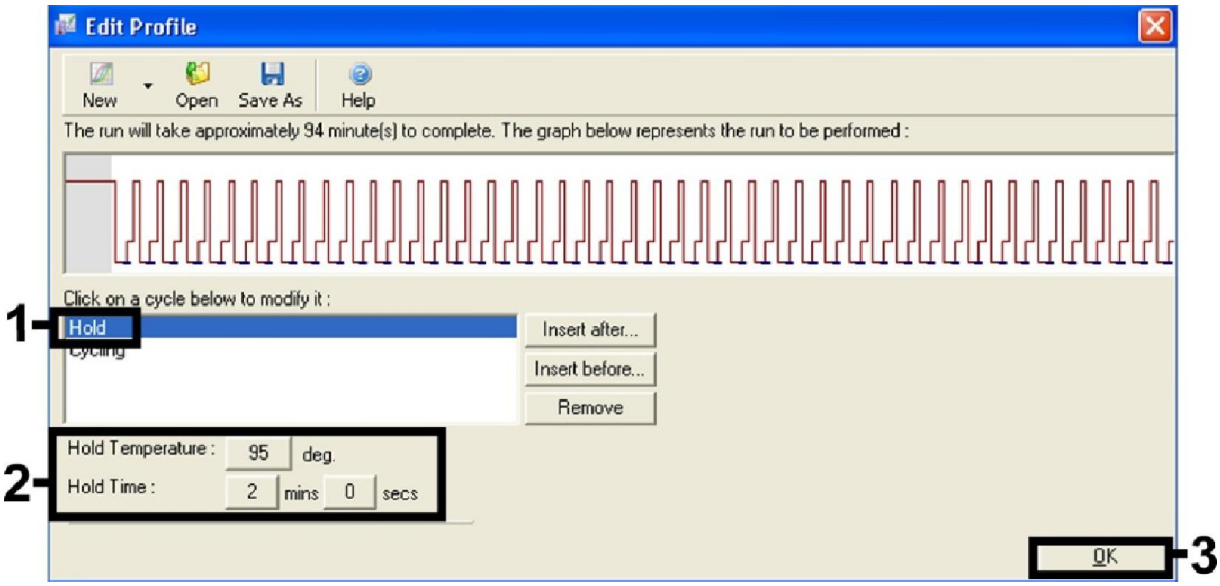


Fig.19 a- Boîte de dialogue de profile générale de température.

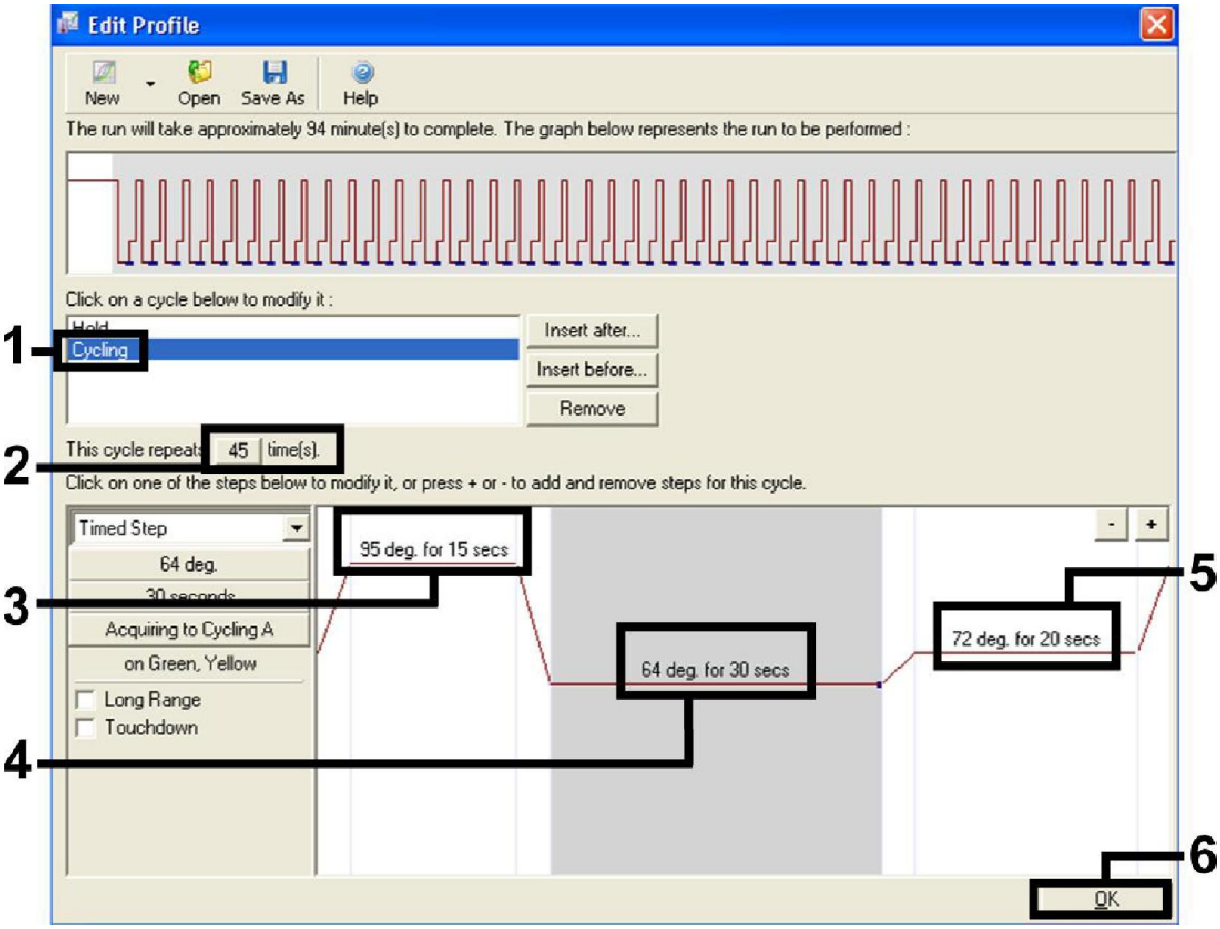


Fig.19 b- Réglage de température de chaque étape de cycle et le nombre des cycles.

Fig.19 : réglage de profile de température de réaction.

4.2.Profile de la fluorescence :

- Cliquer sur Gain Optimisation dans la boîte de dialogue **(voir la figure 18)** pour ouvrir la boîte de dialogue Configuration de l'optimisation automatique du gain.

- Régler la température de calibration sur 64 pour qu'elle corresponde à la température d'hybridation du programme d'amplification.
- Ajuster le canal de la fluorescence Green pour l'échantillon et le Yellow pour le contrôle interne.

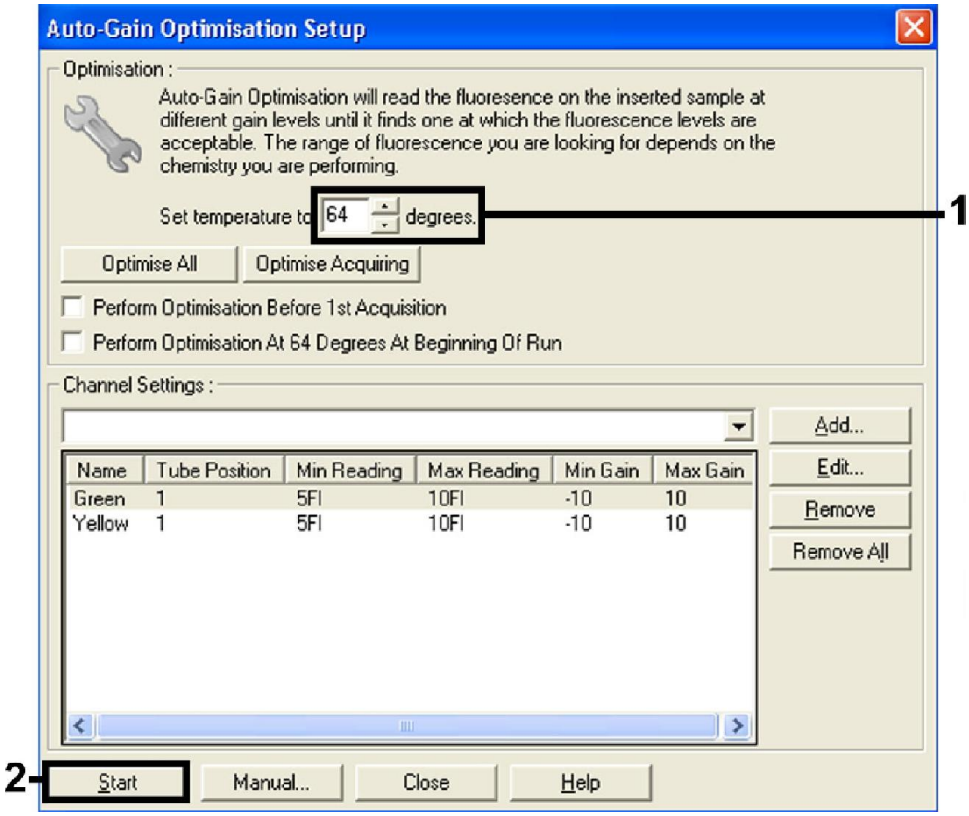


Fig.20- Optimisation de la fluorescence.

Les valeurs de gain déterminées par le calibrage de canal sont automatiquement enregistrées et répertoriées dans la dernière fenêtre de menu de la procédure de programmation. Cliquez sur **Start Run** afin de démarrer la réaction d'amplification.

I.6.3. Quantification

I.6.3.1. Détermination de cycle seuil

Le résultat positif d'une PCR en temps réel se représente graphiquement sous forme des courbes sigmoïdes.

Pour déterminer la positivité d'une PCR en temps réel, on détermine le nombre de cycles à partir duquel le produit PCR est détectable, c'est le point de départ de la phase exponentielle, phase au cours de laquelle l'efficacité d'amplification est supposée rester constante où la fluorescence émise dépasse une valeur seuil de détection de la fluorescence significativement différente du bruit de fond appelé threshold. Le moment d'apparition de ce signal seuil dénommé cycle seuil ou Ct (Cycle threshold) est dépendant de la quantité de matrice initialement présente dans l'échantillon amplifié. Le Ct calculé par le logiciel est inversement proportionnel au logarithme décimal du nombre de copies initiales d'ADN avant amplification par PCR **(Ameziane *et al.,* 2006 ; Jia, 2012)**.

La quantification de la concentration initiale d'ADN est basée sur l'exploitation des données d'une courbe d'étalonnage **créé** par l'utilisation des Ct des standards.

I.6.3.2. Courbe d'étalonnage

Pour créer une courbe d'étalonnage, les 4 standards (contrôle positifs) fournies par le kit (*M. tuberculosis* RG/TM QS 1–4) sont utilisés pour chaque cycle de PCR. Les *M. tuberculosis* RG QS de 1 à 4 sont utilisés comme contrôles positifs et l'eau de grade PCR comme contrôle négatif.

M. tuberculosis RG/TM QS 1	3×10^4 copies/µl
M. tuberculosis RG/TM QS2	3×10^3 copies/µl
M. tuberculosis RG/TM QS 3	3×10^2 copies/µl
M. tuberculosis RG/TM QS 4	3×10^1 copies/µl
Eau (grade PCR)	0 copies/µl

Selon les instructions de la société QIAGEN la valeur de threshold dans ce travail est fixée entre 0.06 et 0.07.

Chapitre II

Résultats et discussion

Dans ce travail, pour extraire l'ADN mycobacterien deux kits sont utilisés ; le premier est le kit EZ1 DNA Blood 350 µl avec sa carte EZ1 DNA Blood et le deuxième est le kit EZ1 DSP virus 48 version 4 avec sa carte EZ1 DSP virus. L'amplification de l'ADN est effectuée à l'aide de kit *artus M .tuberculosis* à l'intérieur de thermocycleur Rotor Gene Q MDx en utilisant une séquence cible de 159 pb du gène IS6110.

Parmi les quatre échantillons, un témoin positif est utilisé pour la validation de test. Les résultats obtenus sont décrits ci-dessous.

II.1. Résultat d'amplification d'ADN mycobacterien extrait via le kit EZ1 DNA Blood 350 µl

Les amplifications d'ADN mycobacterien de deux échantillons extrapulmonaires ; ponction articulaire et prélèvement vaginal sont réalisées simultanément, les mêmes standards sont utilisés pour la réalisation de la courbe d'étalonnage.

Tableau 03-Cycles seuil obtenus après amplification de ponction articulaire et de prélèvement vaginal extrait par le kit EZ1 DNA Blood 350 µl avec les standards utilisés.

Couleur	Nom	Type	Ct	Concentration (copies/µl)
	ponction articulaire	Echantillon	0	
	prélèvement vaginal	Echantillon	16.28	23 179
	Eau de grade PCR	Contrôle négatif	0	
	QS1	Standard 1	18.79	8 683
	QS2	Standard 2	21.66	1 190
	QS3	Standard 3	25.11	108
	QS4	Standard 4	28.66	9

II.1.1. Résultat de la PCR de la ponction articulaire

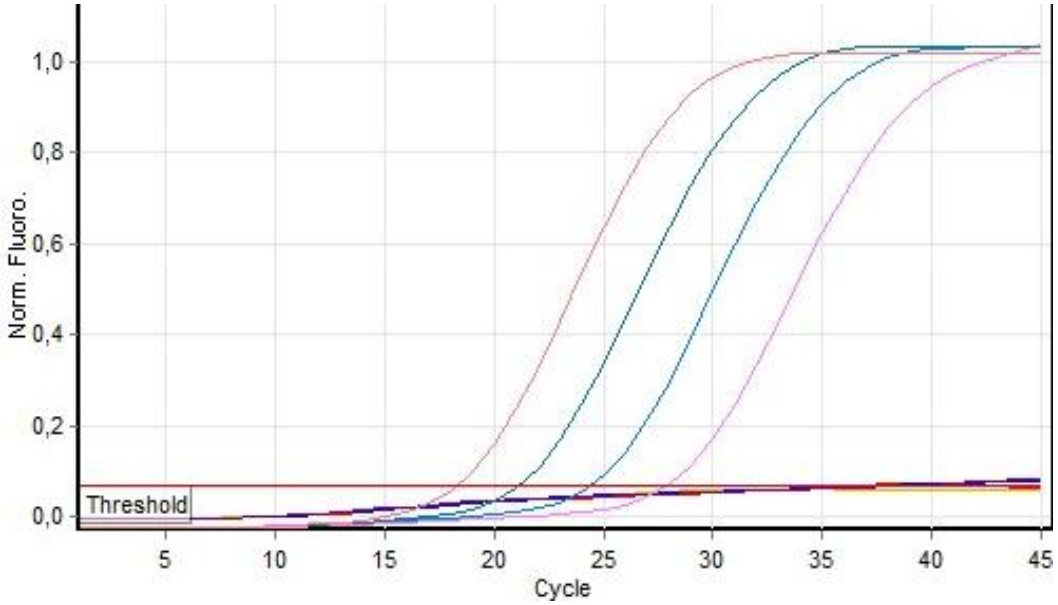


Fig. 21- Résultat de la PCR de la ponction articulaire et des standards utilisés.

Les courbes de cette représentation graphique, représentent la variation de l'intensité de la fluorescence en fonction de nombre de cycles d'amplification, les quatres courbes répresentatives d'amplification des standards ont une forme sigmoide typique d'un résultat positif à la PCR en temps réel, indiquant une bonne amplification d'ADN de Ceux-ci.Au contraire à celle de la ponction articulaire de couleur rouge qui montre un résultat d'aspect négatif ; le signale de la fluorescence ne déppasse pas le bruit de fond avec absence de cycle seuil. Donc aucun bacille de complexe MTBC n'est détecté.

II.1.2. Résultat de la PCR de prélèvement vaginal

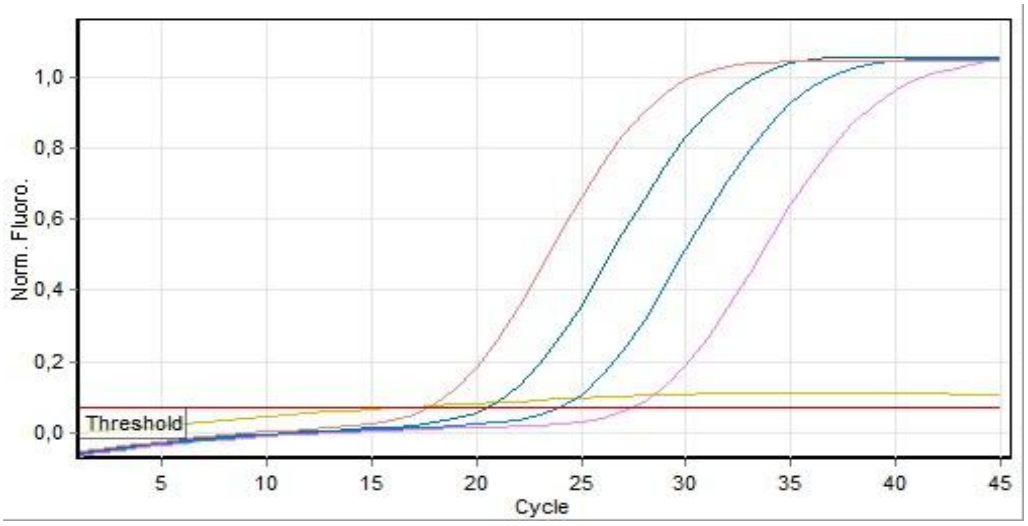


Fig. 22- Résultat de la PCR de prélèvement vaginal et des standards utilisés.

La courbe d'amplification d'ADN de prélèvement vaginal de couleur jaune présente une valeur de cycle seuil très basse égale à 16.28, cette valeur est inférieure de celle de standard le plus concentré qui a un Ct égale à 18.79signifiant qu'il existe initialement une très grande quantité d'ADN cible dans l'échantillon (23 179 copies/ µl calculé par le logiciel)et par conséquent une grande concentration d'un ou plusieurs bacilles de complexe MTBC. En revanche la courbe sigmoïde caractéristique de l'amplification par PCR en temps réel est absente, avec une faible intensité de la fluorescence signifiant que l'amplification d'ADN de cet échantillon est mal réalisée ou qu'elle est interrompue. Cette contradiction laisse suggérer que le résultat est ininterprétable.

II.1.3. Courbe d'étalonnage

Selon **Jia, 2012** ;les réactions d'amplification par PCR en temps réel qui présentent une courbe des standards avec une pente proche de la valeur -3.32, possèdent une sensibilité la plus proche que possible de 100%.

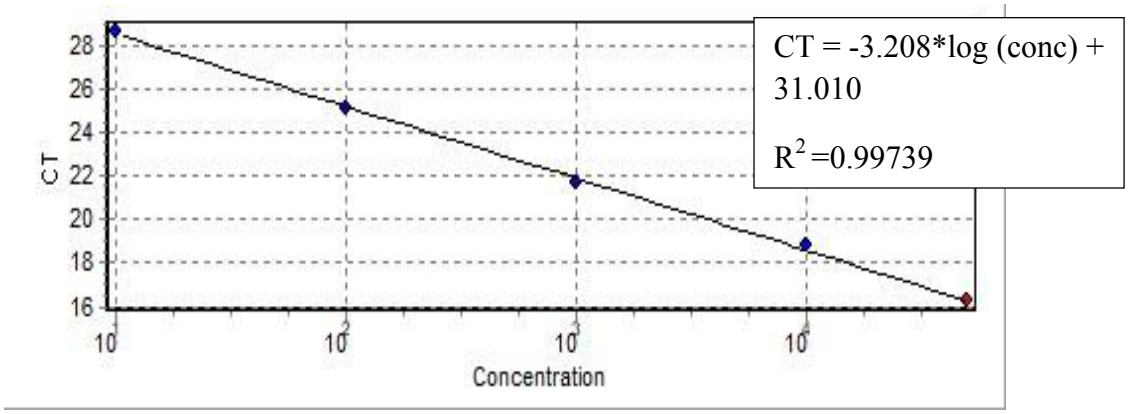


Fig.23- Courbe d'étalonnage des standards pour l'amplification d'ADN mycobacterien extrait via le kit EZ1 DNA Blood 350 µl.

La courbe d'étalonnage dans ce cas montre une forte corrélation entre les concentrations d'ADN des standards et leurs cycles seuils correspondants avec un facteur de corrélation égale à 0.99739. Une pente de -3.20 indique que la sensibilité d'amplification est proche de 100%.

Dans les cas d'amplification d'ADN extrait manuellement, les résultats faussement négatifs observés peuvent être expliqués par plusieurs facteurs ; la présence d'inhibiteurs de la PCR dont ces inhibiteurs sont très abondant dans les échantillons extrapulmonaires, la difficulté d'extraction de l'ADN mycobactérien due à la résistance relative de la paroi mycobactérienne aux protocoles de lyse cellulaire habituels à savoir l'application du choc thermique ainsi l'utilisation d'un tampon de lyse de différentes compositions, contiennent le plus souvent un surfactant ionique et parfois de la protéinase K et la lyse mécanique qui peuvent engendrer un faible rendement d'extraction. Le manque de sensibilité de la PCR peut être due aussi à la répartition inhomogène des bacilles tuberculeux dans le produit pathologique, dont les quelques microlitres utilisés pour le test risquent d'être dépourvus de bacilles **(Jarlier *et al.,* 2004).**

Bien que les échantillons extrapulmonaires soient d'une manière générale pauvres en mycobactéries et que ces échantillons sont riches en inhibiteurs de la PCR, grâce à la technologie des billes magnétiques et l'addition d'ARN carrier qui ne permette que les AN de s'attacher à ces billes, l'extraction automatisée avec l'appareil EZ1 Advanced XL utilisé dans ce travail permette de débarrasser en maximum de ces inhibiteurs.

Pour cela, la négativité des résultats d'amplification d'ADN des échantillons extraits à l'aide de la carte EZ1 DNA Blood et son kit EZ1 DNA Blood 350 µl ne peut être pas expliquée par la présence des inhibiteurs. Mais on suggère que dans ce cas la négativité de ces résultat peut être due à un mauvais choix de la carte d'extraction et son kit ; le kit EZ1 DNA Blood 350 µl contient des cartouches préremplies des réactifs destinés pour l'extraction d'ADN leucocytaire, et c'est évidant que la structure des cellules leucocytaire est totalement différente de celle bactérienne et plus particulièrement de celle des mycobactéries, et comme précédemment mentionné la lyse des mycobactéries nécessite l'association de trois traitements ; thermique en premier temps pour la dissociation des acides mycoliques et l'inactivation de ces bacilles facilitant l'action de traitement enzymatique pour la digestion des peptidoglycane et un traitement chimique pour la dissociation des phospholipides membranaire.

Donc on suggère que la négativité de résultats d'amplification d'ADN des échantillons extraits à l'aide de kit EZ1 DNA Blood 350 µl peut être due à unelyse incomplète des mycobactéries et donc l'ADN mycobactérien dans ces cas est n'été pas extrait.

Tant que le kit *artus M. tuberculosis* RG PCR utilise pour la quantification des sondes Taqman, la probabilité d'avoir un défaut de signal de la fluorescence est normalement impossible car par cette technologie de détection, l'émission de la fluorescence ne peut avoir lieu qu'après que la Taq polymérase commence la synthèse d'un nouveau brin d'ADN ce qui permet la libération de rapporteur et qui devient loin de l'extincteur permettant l'émission de la fluorescence, donc la faible fluorescence observé dans le résultat ininterprétable de prélèvement vaginal n'est pas un bruit de fond ou un défaut de signal, mais il peut être expliquer par la présence d'une faible complémentarité nucléotidique entre une séquence d'ADN leucocytaire extrait au lieu d'ADN mycobactérien à l'aide de kit EZ1 DNA Blood 350 µl et les amorces et les sondes utilisés lors de la réaction PCR, et il est possible que la Taq polymérase commence à synthétiser un nouveau brin d'ADN mais grâce à la formulation de réactifs qu'utilise la société QIAGEN (voire annexe 3), cette amplification est interrompue.

II.2. Résultat d'amplification d'ADN mycobacterien extrait à l'aide de kit EZ1 DSP virus 48

II.2.1. Résultat de la PCR de crachat ZN+

Tableau 04 - Cycles seuil obtenus après amplification de l'échantillon crachat ZN+ et des standards utilisées.

Couleur	Nom	Type	Ct	Concentration (copies/µl)
	Crachat ZN+	Echantillon	41.88	3.51
	QS1	Standard	19.05	28892.46
	QS2	Standard	22.32	2948.55
	QS3	Standard	25.39	347.66
	QS4	Standard	29.04	27.34
	Eau (grade PCR)	contrôle négatif		

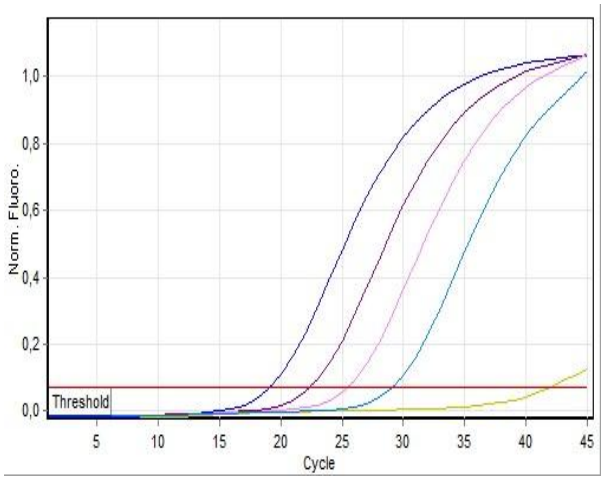


Fig.24 a- Résultat de la PCR de crachat ZN+ et des standards utilisés.

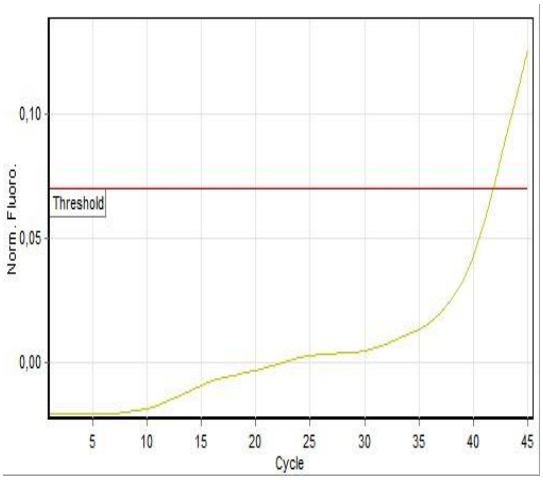


Fig.24b- Résultat de la PCR de crachatZN+

Fig.24- Résultat d'amplification de crachat ZN+.

Les quatres courbes d'amplification des standards ont une forme sigmoide typique avec des cycles seuil varient entre 19.05 et 29.04 selon la concentration d'ADN de départ. La courbe d'amplification d'ADN de crachat de couleur jaune montre un résultat d'aspect positif ; l'intensité de fluorescence augmente en fonction de nombre de cycles avec un cycle seuil élevé égale à 41.88 indiquant une faible concentration d'ADN mycobactérien. Un ou plusieurs membres de complexe MTBC sont détectés en faible quantité.

II.2.2. Courbe d'étalonnage

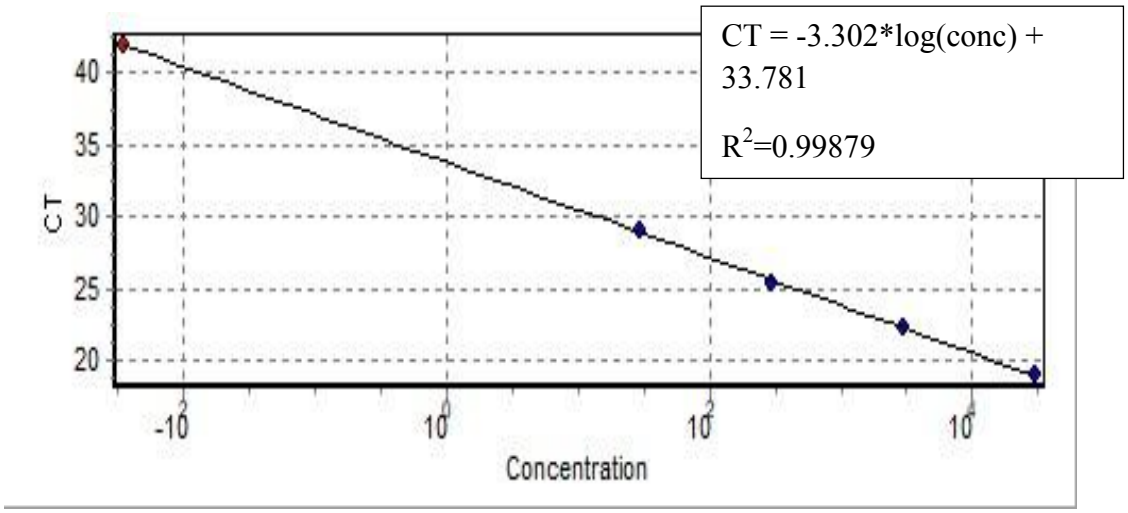


Fig.25- Courbe d'étalonnage de l'amplification d'échantillon 3 crachats extraits par le kit EZ1 DSP virus 48.

La courbe montre une très bonne corrélation entre le logarithme décimal de concentration et les valeurs de Ct, exprimé par le facteur de corrélation R^2 qui est égale à 0.99879 très proche à 1, signifiant une forte corrélation entre chaque concentration d'ADN présente dans les standards et l'échantillon et son amplification. Une pente égale à -3.302 indiquant que la sensibilité de l'amplification est la plus proche à 100%.

La positivité de test PCR pour l'échantillon crachat signifie que l'ADN est extrait, mais le cycle seuil de détection élevé d'une valeur de 41.88 signifiant qui il ya une faible quantité d'ADN et tant que cet échantillon est ZN+ et l'examen microscopique nécessite pour qu'il soit positive au moins 10^4 bacilles /ml ceux-ci signale une forte concentration des mycobactéries. L'examen microscopique détecte les mycobactéries tuberculeux et celles non tuberculeux alors que le test PCR en temps réel de la séquence IS6110 ne peut amplifier que l'ADN des mycobactéries tuberculeuses donc cette contradiction dans la concentration peut

être expliqué par la présence d'une faible quantité d'ADN amplifié par conséquent une faible concentration des mycobactéries tuberculeux, ce qui rond la PCR comme une technique de différenciation entre les mycobactéries tuberculeux et celle non tuberculeux en cas d'examen microscopique positive.

En outre, l'échantillon utilisé dans ce test qui est riche en mycobacteriés, elle est très visqueuse et nécessite une liquifiation par le tampon phosphate salin PBS. l'utilisation de l'eau physiologique ne permet pas une liquifiation complète de l'échatillon donc il est possible que seulement une petite fraction des mycobacteriés qui est libirée.

II.2.3. Résultat de la PCR de la ponction d'ascite

Tableau 05- Cycles seuil obtenus après amplification de la ponction d'ascite extrait par le kit EZ1 DSP virus 48 et des standards utilisés.

Couleur	Nom	Type	Ct	Concentration (copies/µl)
	Ponction d'ascite	Echantillon		
	QS1	Standard	19.05	28892.46
	QS2	Standard	22.32	2948.55
	QS3	Standard	25.39	347.66
	QS4	Standard	29.04	27.34
	Eau (grade PCR)	contrôle négatif		

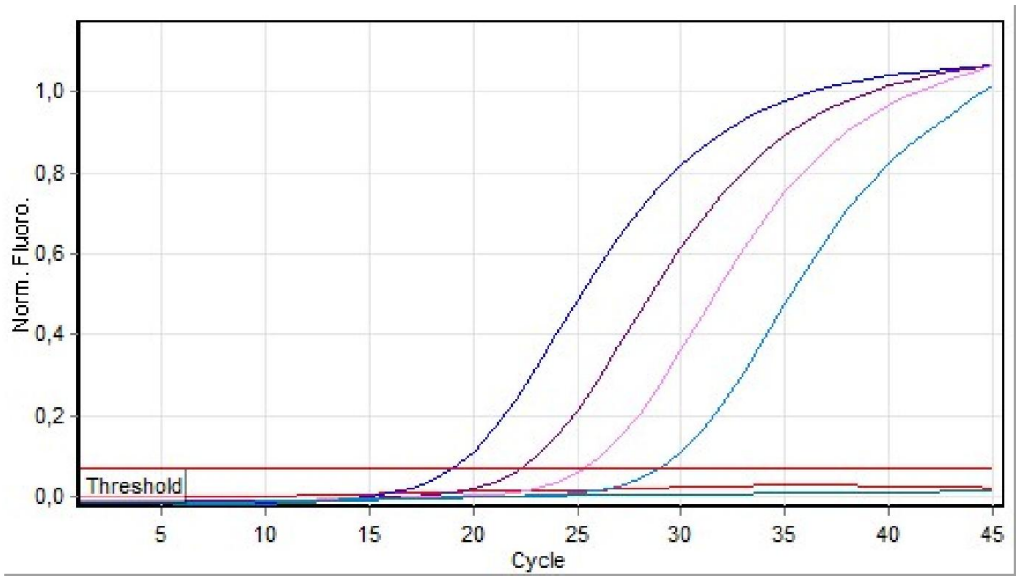


Fig.26- Résultat de la PCR de la ponction d'ascite.

Les courbes d'amplification des standards ont une forme sigmoide typique, indiquant une bonne amplification d'ADN.Au contraire à celle de la ponction d'ascite de couleur rouge qui montre un résultat d'aspect négatif avec un cycle seuil absent et une intensité de fluorescence qui reste basse et ne dépasse pas la ligne de base Threshold, donc aucun bacille de complexe MTBC n'est détecté.

II.2.4. Résultat de la PCR de la ponction articulaire et de prélèvement vaginal

Tant que les tests PCR effectués dans ce présent travail sont considérés comme des tests de diagnostic médical, L'extraction d'ADN mycobactérien des deux échantillons extapulmonaires qui est précédemment effectuée à l'aide du kit EZ1 DNA Blood 350 µl est répété à l'aide du kit EZ1 DSP virus 48 version 4 une fois que l'échantillon crachat ZN+ est trouvé positif même à la réaction de la PCR.

Tableau 06- Cycles seuilobtenus après amplification de ponction articulaire et de prélèvement vaginal extrait par le kit EZ1 DSP virus 48 version 4 avec les standards utilisés.

Couleur	Nom	Type	Ct	Concentration (copies/µl)
	ponction articulaire	Echantillon		
	Prélèvement vaginal	Echantillon		
	QS1	Standard	18,26	29800,96
	QS2	Standard	21,22	3304,22
	QS3	Standard	24,67	252,28
	QS4	Standard	27,42	32,60

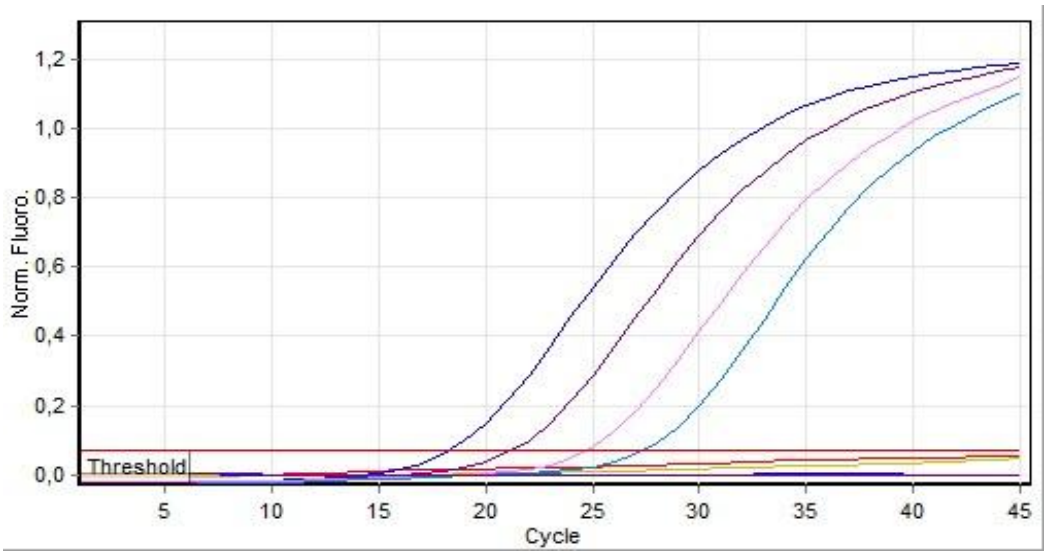


Fig.27-Résultat de la PCR de la ponction articulaire et de prélèvement vaginal et des standards utilisés.

Les quatres courbes répresentatives d'amplification des standards ont une forme sigmoide typique d'un résultat positif à la PCR en temps réel, indiquant une bonne amplification d'ADN.Au contraire à celle de la ponction articulaire de couleur rouge et à

celle de prélèvement vaginal de couleur jaune qui montrent un résultat d'aspect négatif ; le signale de la fluorescence ne déppasse pas le bruit de fond avec absence de cycle seuil. Donc aucun bacille de complexe MTBC n'est détecté pour les deux échantillons.

La négativité des résultats de la PCR des ADN des échantillons extrapulmonaires (ponction articulaire, prélèvement vaginal, ponction d'ascite) extraits à l'aide du kit EZ1 DSP virus 48 version 4 peut être due à l'absence des bacilles de complexe MTBC dans ces échantillons.

Kaur *et al.* (2016) en utilisant pour l'extraction le kit mini QIAamp® DNA (Qiagen, en Allemagne) 51304) avec une simple étape de prétraitement il s'agit d'un chauffage à 80 ° C pendant 10 minutes et pour l'amplification par PCR en temps réel la séquence IS6110, ils montrent que la technique PCR a la même sensibilité que celle de la culture pour le diagnostique de la tuberculose.

Dans une autre étude Kaur *et al.* (2017) en effectuant des tests microbiologiques et des réaction PCR de la séquence IS6110 pour la recherche de MTBC et par l'utilisation de kit QIAampDNA Mini (QIAGEN, Hilden, Allemagne) référence 51304 pour l'extraction d'ADN mycobactérien pour des échantillons pulmonaire et même extrapulmonaire (ponction d'ascite, LCR, biopsie de l'endomètre, liquide synovial et urine) signalent que la technique PCR est plus sensible (83.3%) que les tests microbiologiques (64.3%).

Yagmur *et al.* (2017) ont réalisé des cultures et des tests rt-PCR pour 85 échantillons. En utilisant le kit QIAsymphony DSP Virus pour l'extraction d'ADN mycobactérien à partir des tissus inclus dans la paraffine après incubation des échantillons dans 20 µl de protéinase K et 600 µl de tampon de lyse ATL pour le prétraitement, et pour les réactions PCR en temps réel le kit Artus *M. tuberculosis* RG-PCR il a été utilisé. Les résultats de PCR obtenus concordent à ceux de cultures, signalant que la méthode d'extraction est convenable à notre proposition d'utiliser le kit EZ1 DSP virus 48 version 4 pour l'extraction d'ADN mycobactérien.

La séquence IS6110 est une séquence consensus connue et spécifique qui se trouve exclusivement dans tous les membres du complexe MTBC, elle est généralement présent en multiples copies dans une grande variété de sites chromosomiques ce qui offre de multiples cibles pour l'amplification; jusqu'à 25 copies par cellule chez le chez *M. tuberculosis* et un seul copie chez le M. bovis ce qui en fait une cible idéale pour l'amplification et la différenciation de MTBC des autres mycobactéries dans des échantillons pulmonaires et

même extra-pulmonaires**(Negi *et al.,* 2005 ; Kheawon *et al.,* 2012 ; Kaur *et al.,* 2016 ; Kabir *et al.,* 2018).**

Plusieurs études consacrés dans l'évaluation de l'efficacité et de l'utilité de la séquence IS6110 à savoir celle de Lira *et al.* (2013) ; Osman *et al.* (2014) montrent que cette séquence possède une sensibilité très élevé. Miller *et al.* (2011) signalent que cette séquence d'insertion a une sensibilité identique que celle de gène MPT64. L'étude de Raveendran et Wattal (2016) indique que la séquence IS6110 est le cible de choix pour l'amplification d'ADN pour le diagnostic de la tuberculose extrapulmonaire avec une sensibilité de l'ordre de 90.3% beaucoup plus élevé que celle de gène MPT64 (64.5%). Kaur *et al.* (2017) montrent que la séquence IS6110 possède une sensibilité plus élevé (82.1%) en comparaison avec le gène MPT64 (81%).

En revanche des études récentes montrent que certaines souches de *M. tuberculosis* surtout dans l'Inde ne possèdent aucune copie de la séquence IS6110 **(Kaur *et al,* 2017 ; Kabir *et al,* 2018)** donc est il possible que certaines souches dans notre région n'ont pas une copie de cette séquence ?

Donc d'utiliser la séquence d'insertion IS6110 seule comme une cible d'amplification, peut constituer un risque de rater quelques souches qui ne possèdent aucune copie de cette séquence par conséquent d'avoir des résultats faussement négatifs pour les patients atteints de la tuberculose causé par l'une de ces souches.

Un PCR multiplex en temps réel en utilisant la séquence d'insertion IS6110 et le gène MPT64 peut constitue un nouvel espoir pour le diagnostic en fiabilité de la tuberculose pulmonaire et aussi extrapulmonaire.

Conclusion

Un diagnostic précoce, sensible et spécifique est l'outil de choix pour luter contre la tuberculose ; une maladie qui reste toujours d'actualité, et malgré les innovations dans ce domaine, la culture reste l'étalon d'or dans la détection de cette maladie notamment dans sa forme pulmonaire, mais à cause de faible taux de multiplication des mycobactéries tuberculeuses, la culture constitue un obstacle dans la prise en charge rapide de patient et son isolement par conséquent dans la rupture de la chaine de transmission de cette infection au sein de la population.

La réaction de polymérisation en chaine (PCR) est un outil extrêmement sensible, spécifique et rapide dans la détection de membre de complexe MTBC dans n'importe quelstype d'échantillons chez des patients présentant une suspicion clinique de la tuberculose, qu'elle soit pulmonaire ou extra-pulmonaire, et son addition est considérée comme une technique nécessaire pour l'identification directe des bacilles détectés par microscopie, culture et histopathologie. Elle peut être particulièrement utile pour le diagnostic précoce en cas d'affection paucibacillaire lorsque d'autres méthodes de diagnostic conventionnelles échouent malgré une forte suspicion clinique.

L'extraction automatisée d'ADN mycobactérien qui peut améliorer la sensibilité de la PCR en se débarrassant en maximum des inhibiteurs et des contaminants est possible par l'utilisation de l'automate EZ 1 Advanced XL (QIAGEN, Hilden, Allemagne) via le kit EZ1 DSP virus en se précédant à l'incubation de l'échantillon à traiter à 95°C pendant 15 minute dans un tampon de lyse AL comme un prétraitement.

Au défi des difficultés rencontrées dans ce travail l'automatisation de l'extraction d'ADN mycobactérien est devenue réalisable. Par notre étude et avec nos résultats, nous espérons d'avoir participé à l'automatisation d'extraction d'ADN mycobactérien par conséquent contribué au diagnostique moléculaire de la tuberculose.

Perspectives

Pour arriver à automatiser totalement l'extraction d'ADN mycobactérien, la proposition d'une nouvelle version de la carte DSP virus peut constituer une solution pour éviter toute manipulation des germes infectieux. Pour cela on propose l'ajout au sein des cartouches original de kit EZ1 DSP virus une solution de lysozyme / tampon AL et

reprogrammer la carte pour commencer le traitement des échantillons par cette solution puis par la protéinase K suivi d'un chauffage à 95°C pendant 15 minute-sachant que l' EZ 1 Advanced XL est équipé d'un système de chauffage qui peut arriver à cette température - en permettant à la fois l'inactivation des protéinase K et les mycobactéries toute en dégradant les acides mycoliques. La procédure de purification reste la même que celle de la carte original. Comme cette carte peut être destinée à la fois pour l'extraction d'ADN viral, bactérienne et mycobactériènne.

Un PCR multiplex en temps réel en utilisant la séquence d'insertion IS6110 et le gène MPT64 peut constitue un nouvel espoir pour le diagnostic en fiabilité de la tuberculose pulmonaire et aussi extrapulmonaire. Et aussi l'étude de polymorphisme de la séquence la séquence d'insertion IS6110 présente dans les souches de notre région peut améliorer l'amorçage de cette séquence par conséquent sa ciblage.

Références bibliographiques

1. Ajantha G. S., Shetty P. C., Kulkarni R. D., Biradar U, 2013. PCR as a Diagnostic Tool for Extra-Pulmonary Tuberculosis, Journal of Clinical and Diagnostic Research. Vol.7, Issue .6: 1012-1015.
2. Al-jebouri M. et Wahid N., 2014.The interactions between polymerase chain reaction (PCR) and other diagnostic tests among tuberculosis patients of various blood groups, World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences, Vol. 3, Issue. 7: 217-230.
3. Alonso H., Aguilo J. I., Samper S., Caminero J. A., Campos-Herrero M. I., Gicquel B., Brosch R., Martín C., Otal I., 2011. Deciphering the role of IS6110 in a highly transmissible Mycobacterium tuberculosis Beijing strain, GC1237. Tuberculosis, Vol. 91: 117-126.
4. Ameziane N., Bogard M., Lamoril J., 2006. Principes de biologie moléculaire en biologie clinique. Ed Elsevier: 251-277/ 467-471.
5. Amin I., Idrees M., Awan Z., Shahid M., Afzal S. et Hussain A., 2011. PCR could be a method of choice for identification of both pulmonary and extrapulmonary tuberculosis, BMC Research Notes, Vol. 4, N°.332:1-5.
6. Anochie PI., Onyeneke E. C., Ogu A. C., Onyeozirila A. C., Aluru S., Nneka Onyejepu S., Zhang J., Efere L., Adetunji M. A. et Sánchez J. G. B., 2012. Recent advances in the diagnosis of Mycobacterium tuberculosis. GERMS, Vol. 2, N°. 3: 110-120.
7. Arya M, Shergill I S, Williamson M , Gommersall L, Arya N et Patel H RH, 2005. Basic principles of real-time quantitative PCR. Expert Rev. Mol. Diagn. Vol. 5, Issue. 2 :209-219
8. Astier H., Briquet A. et Garnotel E., 2017. *Mycobacterium canettii,* une mycobactérie du complexe tuberculosis.REVUE FRANCOPHONE DES LABORATOIRES, Vol. 2017, N° 496 : 47-59.
9. Aubry. P, Gaüzère. B-A, 2018. Tuberculose. Centre René Labusquière, Institut de Médecine Tropicale, Université de Bordeaux, 33076 Bordeaux (France*)*.
10. Balamurugan R., Venkataraman S., John K. R. et Ramakrishna B. S., 2006. PCR Amplification of the IS*6110* Insertion Element of *Mycobacterium tuberculosis* in Fecal Samples from Patients with Intestinal Tuberculosis. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY Vol. 44, No. 5: 1884–1886.

11. Balcha T. T., Winqvist N., Sturegård E., Skogmar S., Reepalu A., Jemal Z. H., Björkman P., 2014. Detection of lipoarabinomannan in urine for identification of active tuberculosis among HIV-positive adults in Ethiopian health centres. Tropical Medicine & International Health, Vol. 19, Issue 6: 734–742.

12. Barbosa C., Nogueira S., Gadanho M. et Chaves S., 2016. Molecular Microbial Diagnostic Methods: Pathways to Implementation for the Food and Water Industries. Ed. Elsevier : 135-154.

13. Barker R. D., 2016. Clinical tuberculosis. Medicine, Vol. 44, Issue 6: 384–389.

14. Barua R. et Hossain, M., 2014. Adenosine Deaminase in Diagnosis of Tuberculosis: A Review. Anwer Khan Modern Medical College Journal, Vol. 5, Issue 2: 43-48.

15. Bates J. A. et Taylor E. J. A., 2001. Scorpion arms primers for SNP real-time PCR detection and quantification of pyrenophora teres. Molecular Plant Pathology Vol. **2**, Issue 5: 275–280.

16. Bekmurzayeva A., Sypabekova M. et Kanayeva D., 2013. Tuberculosis diagnosis using immunodominant, secreted antigens of Mycobacterium tuberculosis. Tuberculosis Vol. 93 : 381-388.

17. Béné M. C., Drouet C., Fisson S. et Seillès E., 2014. Méthodes en immunologie Des principes aux bonnes applications, Ed. Elsevier Masson SAS : 75-76.

18. Billy C. et Lévy-Bruhl D., 2007. Vaccin BCG et place de l'intradermoréaction en 2006, La Revue de médecine interne, Vol. 28, n° 3:151-160.

19. Bisco V., 2011. Evaluation de la PCR pour *Streptococcus pneumoniae, Neisseria meningitidis* et *Haemophilus influenzae.* ICHV, Laboratoire de Bactériologie, Sion.

20. Bluth M. J. et Bluth M. H., 2018. Molecular Pathology Techniques: Advances in 2018. Clinics in Laboratory Medicine, Vol.33, Issue 2: 215-236.

21. Bonnet M., 2011. Les nouveaux tests diagnostiques de la tuberculose maladie : de la théorie à la pratique dans les pays du Sud. Revue des Maladies Respiratoires, Vol 28, Issue 10 : 1310-1321.

22. Botterel. F, 2017. Parasitologie et mycologie médicales Guide des analyses et pratiques diagnostiques. Ed. Elsevier Masson : 201-202.

23. Bourgeois-Nicolaos N. et Doucet-Populaire F., 2006.Intérêt de la PCR en temps réel dans le diagnostic biologique de la coqueluche. SPECTRA BIOLOGIE, N°. 150 :28-32.

24. Bouvry D., 2012.Tuberculose. Revue des Maladies Respiratoires Actualités Vol. 4 : 34-37.

25. Budiarto B. R., Pimpin Utama P. b. et Desriani, 2018. Nucleic acid amplification-based HER2I655V molecular detection for breast cancer. Journal of Oncological Sciences, Vol. 5, Issue 1: 31-41.
26. Butler J. M., 2012. Advanced topics in forensic DNA typing .Ed. Academic PressElsevier: 31-33.
27. Bwanga F., Hoffner S., Haile et Joloba M. L., 2009. Direct susceptibility testing for multi drug resistant tuberculosis: A meta-analysis. BMC Infectious Diseases , Vol. 9:67.
28. Chaili A., 2014. Apport de la réaction de polymérisation en chaine (PCR) dans le diagnostic de la tuberculose cutanée. Thèse de doctorat. Université d'Oran : 22-23.
29. Chiaradia L., 2018. Isolement et caractérisation de la mycomembrane des mycobactéries. Thèse de doctorat université Toulouse : 52.
30. Chin K. L., Sarmiento M. E., Norazmi M. N. et Acosta A., 2018. DNA markers for tuberculosis diagnosis, *Tuberculosis,* Vol. 113: 139-152.
31. Caulfield A J. et Wengenack NL., 2016. Diagnosis of active tuberculosis disease: from microscopy to molecular techniques. *Journal of Clinical Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases*, Vol.4: 33-43.
32. Claustres M., 2001. Médecine prédictive, mythe et réalité : Le contrôle de qualité en biologie moléculaire, adsp, N° 34 : 30-32.
33. Clive-Macallan D. et Houston A., 2014. Extrapulmonary tuberculosis. Medicine, vol. 42, Issue 1 :18-22.
34. Collet C., Simonney N., Honoré-Bouakline S., Wargnier A., Lagrange P-H. et Herrmann J.-L., 2003. Tuberculose et diagnostic rapide : avancées ou échecs ? Immuno-analyse & Biologie spécialisée, Vol. 18, N°. 5 : 283–288.
35. De Assunção T. M., Eraldo L., Batista Jr., Deves C., Villela A. D., Pagnussatti V. E., de Oliveira Dias A. C., Kritski A., Rodrigues-Junior V., Basso L. A. et Santos D. S., 2014.Real time PCR quantification of viable Mycobacterium tuberculosisfrom sputum samples treated with propidium monoazide. Tuberculosis, Vol. 94, Issue 4 : 421-427.
36. De Cruz K., 2017. Développement et mise en place d'un système de détection moléculaire pour la tuberculose bovine. Mémoire du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études. Paris : 9-10.
37. De franco A. L., Robertson M. et Lochsley R. M., 2009. Immunité, La réponse immunitarire dans les maladies infectieuses et inflammatoires. Ed, de Boeck : 240-241.

38. Delacour H., Ficko C., Bousquet A., Bugier S., Fontan É., CeppaF., 2013. Activité adénosine désaminase pleurale : un outil de choix pour le diagnostic des pleurésies tuberculeuses dans les pays à haute prévalence. Immuno-analyse et biologie spécialisée, Vol. 28 : 353—357.
39. Deng Y., Li X., Xiang Y., Li H., Lu P. et Yu W., 2018. Application of 18F-FDG PET/CT in the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. Radiology of Infectious Diseases, Vol. 5, Issue 4: 165-170.
40. Dennis Lo Y. M., Chiu R. W. K., Allen Chan K. C., 2006. Clinical Applications of PCR, 2ème edition. Ed, HUMAN PRESS: 11-19.
41. Donato L., 2011. Pneumologie pédiatrique; Tuberculose. Elsevier: 105-136.
42. Drouillon V., Houriez F., Buze M., Lagrange P. et Herrmann J.-L., 2006. Identification rapide de Mycobacterium tuberculosis complex dans les échantillons respiratoires par amplification d'ARN en temps réel. Pathologie Biologie, vol. 54, Issue 8-9 : 518–522.
43. El Khéchine A. et Drancourtn M., 2011 ; Diagnosis of pulmonary tuberculosis in a microbiological laboratory. Médecine et maladies infectieuses, Vol. 41, Issue 10 : 509-517.
44. Elkins. K. M, 2013. Forensic DNA biology: a laboratory manual. Ed. Academic Press Elsevier: 42-43.
45. El-Sharif A., Afifi S., El-Dahshan R., Rafeh N. et Eissa S. Characterization of Mycobacterium tuberculosis isolated from cancer patients with suspected tuberculosis infection in Egypt: identification, prevalence, risk factors and resistance pattern. Clinical Microbiology and Infection, Vol. 18, Issue 11:438–445.
46. Etienne J., Clauser E., Housset C. et Roingeard P., 2006. Biochimie génétique – Biologie moléculaire 9éme edition. Éd. Elsevier: 200-201.
47. Farrell R. E. Jr., 2017. RNA Methodologies: Laboratory Guide for Isolation and Characterization, 5thEdition. Éd. ACADEMIC PRESS: 283-328.
48. Fauchère J-L. et Avril J.-L., 2002. Bactériologie générale et médicale. Éd. *Ellipses :* 312.
49. Fraisse P., 2006, Evaluation de la prise en charge en pneumologie : tuberculose. Mal Respir, Vol. 23, N° 6 : 643-65.
50. Fraisse P., 2017. Place du diagnostic précoce dans la lutte contre la tuberculose. Actualités pharmaceutiques, Vol. 56, N°. 568 :18-20.

51. García-Basteiro A.L., Di Nardod A., Saavedra B., Silva D.R., Palmero D., Gegiag M., Migliorih G.B., Duartei R., Mambuque E., Centish R., Cuevask L.E., Izcoa S. et Theron G., 2018. Point of care diagnostics for tuberculosis. Pulmonol, Vol. 24, Issue 2:73-85.
52. Garnotel É., 2017.Mycobactéries. Revue francophone des laboratoires, N°. 496:39.
53. Gauthier P., 2006. Organisation et fonctionnement d'un laboratoire de biologie moléculaire. Formation biologie moléculaire, Dakar: 3.
54. Guillet-Caruba C., Martinez V. et Doucet-Populaire F., 2014. Les nouveaux outils de diagnostic microbiologique de la tuberculose maladie. La Revue de médecine interne, vol.35, Issue 12 : 794–800.
55. Gupta A, Sen M. R, Mohapatra T. M., et Anupurba S., 2011. Evaluation of the Performance of Nitrate Reductase Assay for Rapid Drug-susceptibility Testing of Mycobacterium tuberculosis in North India. J HEALTH POPUL NUTR, Vol. 29, Issue 1: 20-25.
56. Gupta A. et Anupurba S**., 2015.** Detection of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: Methods, principles and applications. Indian Journal of Tuberculosis, Vol. 62, Issue 1: 13-22.
57. Gupta S., Kakkar V., 2018. Recent Technological Advancements in Tuberculosis Diagnostics- A Review. Biosensors and Bioelectronic, vol. 115: 14-29.
58. Hadifar S., Shamkhali L., Kargarpour Kamakoli M., Mostafaei S., Khanipour S., Mansoori N., Fateh A., Davar Siadat S. et Vaziri F., 2018. Genetic Diversity of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates Causing Pulmonary and Extrapulmonary Tuberculosis in the Capital of Iran. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, Vol. 132: 46-52.
59. Hainque B., Baudin B. et Leferbvre P., 2008. Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire. Éd. Flammarion Médecine-Science : 346-348.
60. Harmouche H., Ammouri W., 2009. La Co-infection VIH – Tuberculose. La Revue de Médecine Interne, Vol. 30, Sup 4 : s273-s276.
61. Hervé C., Bergot E., Veziris N., Blanc F.-X., 2015. La tuberculose en 2015: du diagnostic à la détection des formes résistantes. Revue des Maladies Respiratoires, Vol. 32, N°.8 : 784-790.
62. J. HosekJ., P. SvastovaP., MoravkovaM., PavlikI., BartosM., 2006. Methods of Mycobacterial DNA Isolation from Different Biological Material: A Review**.** Veterinarni Medicina, Vol. 51, Issue 5: 180–192.

63. Hur M., Moon H-W., Yun Y-M., Kang T. Y., Kim H-S., Kim H. S., Lee K. M., Kang S-H. et Lee E-H., 2010. Detection of tuberculosis using artus® *M. tuberculosis* PCR Kit and COBAS® AMPLICORTM *Mycobacterium tuberculosis* Test. INT J TUBERC LUNG DIS, Vol. 15, Issue 6: 795–798.
64. Huybens N., Mainil J. et Marlier D., 2009. Les techniques de biologie moléculaire d'analyse des populations bactériennes complexes. *Ann. Méd. Vét.,* Vol. 153 :112-128.
65. Jabri H., Lakhdar N., El Khattabi W., Afif H., 2016. Les moyens diagnostiques de la tuberculose. Revue de Pneumologie Clinique, Vol. 72, N° 5 : 320-325.
66. Jamet S., 2015. Fonction et régulation des gènes de biosynthèse des acides mycoliques chez les mycobactéries. Thèse de doctorat, Université Paul Sabatier - Toulouse III. France : 20-21.
67. Jarlier V., Cambau E. et Sougakoff W., 2004. Quels sont les nouveaux outils diagnostiques d la tuberculose ? Quel est leur intérêt pour la prise en charge du malade et quelles sont leurs indications ?. Rev Mal Respir, Vol. 21, N°. 3-c2: 36-43.
68. Jaton K. et Greub G., 2007. PCR en microbiologie : de l'amplification de l'ADN à l'interprétation du résultat. Rev Med Suisse; vol. 3.
69. Jeanes C., Justin O'Grady J., 2016. Diagnosing tuberculosis in the 21st century – Dawn of a genomics revolution. International Journal of Mycobacteriology, Vol. 5, Issue 4: 384-391.
70. Kabir S., Uddin M. K. M., Chisti M. J., Fannana T., Haque M .E., Uddin M. R., Banu S. et Ahmed T., 2018. Role of PCR method using IS*6110* primer in detecting *Mycobacterium tuberculosis* among the clinically diagnosed childhood tuberculosis patients at an urban hospital in Dhaka, Bangladesh.International Journal of Infectious Diseases, Vol. 68: 108-114.
71. Karanis G. et Karanis P., 2019. Tuberculosis: Epidemiology and Global Impact, Including Extrapulmonary Tuberculosis Manifestation with Emphasis on Skeletal Tuberculosis and a Rare Example of Shoulder Tuberculosis From Tibetan Plateau Area. Encyclopedia of Environmental Health, 2nd Edition. Éd. Elsevier: 1-28.
72. Kaur J., Singh J. et Mishra P., 2016. Comparative evaluation of CFX96TM Real Time PCR with conventional PCR for rapid diagnosis of Mycobacterium tuberculosis Complex in clinical isolate. Archives of Clinical Microbiology, Vol. 7, No.4:1-9.
73. Kaur R. I., Kashyap B., Goela N., Avasthi R., Vaid N., Arora V. et Singh N.P., 2017. Utility of PCR targeting IS6110 and MPT64 genes in the diagnosis of

extrapulmonary tuberculosis, Indian Journal of Medical Specialities, Vol. 131, Issue 3: 139-145.

74. Kazdaglis G., Manika K., Ioannidis P., Papaventsis D., Vogiatzakis E., Papakala E., Panopoulou M., Galatas A., Melidou A., Kioumis I., Malisiovas N., Gioula G., 2016. Drug Susceptibility Pattern from Tuberculosis Patients in Region of Macedonia Greece. Journal of Tuberculosis Research, Vol. 4, N°. 3: 92-97.
75. Kerleguer A., Koeck J.L., Fabre M., Foissaud V., Teyssou R. et Hervé V., 2002. Apport de la biologie moléculaire au diagnostic de la tuberculose. Revue Française des Laboratoires, vol. 2002, N° 343 : 67-70.
76. Ketata W., Rekik W.K., Ayadi H. et Kammoun S., 2014. Les tuberculoses extrapulmonaires. Revue de Pneumologie clinique, vol. 71, N°.2-3 : 83-92.
77. Kheawon N., Chuang-ngam S., Mitsoongneun S., Peam-am J. et Visalsawadi J., 2012. Sensitivity and Specificity of Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) in Bronchial Washing for Diagnostic Pulmonary Tuberculosis at Maharat Nakhorn Ratchasima Hospital. J Med Assoc Thai, Vol. 95, No. 11: 1396-1403.
78. Kidenya B. R., Webster L. E., Behan S., Kabangila R., Peck R. N., Mshana S. E., Ocheretina O., Fitzgerald D. W., 2014. Epidemiology and genetic diversity of multidrug-resistant tuberculosis in East Africa. Tuberculosis, vol. 94, Issue 1: 1-7.
79. Kohlmorgen B., Elias J. et Schoen C., 2017. Improved performance of the artus *Mycobacterium tuberculosis* RG PCR kit in a low incidence setting: a retrospective monocentric study. Scientific Reports, vol.7: 1-12.
80. Kumar N., Agarwal A., Dhole T.N., Sharma Y.K., 2015. Rapid identification of Mycobacterium tuberculosis complex in clinical isolates by combining presumptive cord formation and MPT64 Antigen Immunochromatographic Assay. Indian journal of tuberculosis, Vol. 62: 86-90.
81. Labie D., 2003. Le génome des mycobactéries: étude biologique et interprétation évolutive. Médecine Sciences, Vol. 19, N°. 3 : 275–277.
82. Lahlou O., 2016. Diagnostic moléculaire de la tuberculose et structure génotypique de la population du Complexe *Mycobacterium tuberculosis*au Maroc. Thèse de doctorat, Université de Mohamed V ,Rabat-Maroc : 14-18-86.
83. Lalande V., 2012. Nouveaux outils microbiologiques et tuberculose : quelles perspectives ?. La Lettre de l'Infectiologue, N°.1 : 14-19.

84. Lamoril J., Bogard M., Ameziane N., Deybach J-C. et Bouizegarène P., 2007. Biologie moléculaire et microbiologie clinique en 2007. Les applications et leur avenir–Partie 2. Immuno-analyse et biologie spécialisée, Vol. 22, Issue 2 :73-94.
85. Lange B., Vavra M., Kern W. V., Wagner D., 2012. Development of tuberculosis in immunocompromised patients with a positive tuberculosis-specific IGRA. INT J TUBERC LUNG DIS Vol.16, Issue 4: 492–495.
86. Leroy-Terquem É., 2008. La PCR ou réaction en chaîne par polymérase, une révolution en biologie médicale. OptionBio Vol. 9, N°. 407 : 9-13.
87. L'Hadj M., Fissah A. et Nafti S., 2006. Les nouveaux tests de diagnostic de la tuberculose. Rev Mal Respir, vol. 23, N°4-C2 : 85-87.
88. Lioté H. et Lioté F., 2011.Place des tests à l'interféron (IGRAs) dans le dépistage de la tuberculose latente (TBL) avant prescription d'agents anti-TNF : le point. Revue du rhumatisme, Vol. 78 :116–121.
89. Lira L.A.S., Santos F.C.F., Carvalho M.S.Z., Montenegro R.A., Lima J.F.C., Schindler H.C. et Montenegro L.M.L., 2013. Evaluation of a IS6110-Taqman real-time PCR assay to detect Mycobacterium tuberculosis in sputum samples of patients with pulmonary TB. Journal of Applied Microbiology, Vol. 114, Issue 4: 1-6.
90. Locht C. et Rouanet C., 2011. Nouveaux vaccins antituberculeux Archives de pédiatrie, Vol. 18, N°.9 :1023–1027.
91. Lyon SM. et Rossman MD., 2017. Pulmonary tuberculosis. Microbiol Spectrum, Vol. 5, Issue 1:1-12.
92. Machado D., Couto I., Viveiros M., 2018. Advances in the molecular diagnosis of tuberculosis: From probes to genomes. Infection, Genetics and Evolution, In press, corrected proof: 1-59.
93. Mackay I. M, 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin Microbiol Infect Vol. 10: 190–212.
94. Manuel de kit artus *M. tuberculosis* RG PCR, 2015, Qiagen.
95. manuel de kit EZ1 DSP virus 48, 2015, Qiagen.
96. Manuel de kit EZ1 DNA Blood 350 µl, 2015, Qiagen.
97. Manuel de kit Rotor Gene Q- Pure détection, 2010, Qiagen.
98. Martin C. et Denis F., 2017.Bactériologie Médicale Techniques Usuelles 3ème édition. Éd. Elsevier : 463-487.

99. Mascart F. et Locht C., 2015. Integrating knowledge of Mycobacterium tuberculosis pathogenesis for the design of better vaccines. Expert Review of Vaccines, Vol. 14, N° 12: 1573-1585.

100. Mathys V., Lefèvre P., Fontaine V., Dehem M., Donnio P.Y., Février F., Le Coustoumier A. et Bifani P., 2007. La PCR en temps réel : principe et application en infectiologie. ANTIBIOTIQUES, Vol. 9 - N°. 3 : 205-211.

101. Maubon D., Brenier-Pinchart M-P., Fricker-Hidalgo H. et Pelloux H., 2007. Apport de la PCR quantitative dans le diagnostic de la toxoplasmose : la voie de la standardisation ?. Pathologie Biologie, Vol.55, Issue 6 : 304–311.

102. Maugein J. et Bébéar C., 2003. Diagnostic microbiologique de la tuberculose et intérêt de la PCR. Médecine et maladies infectieuses, Vol. 33, N°. S3 :153-158.

103. Mazza-Stalder J., Nicod L. et Janssens J.-P., 2012. La tuberculose extrapulmonaire. Revue des Maladies Respiratoires, Vol. 29, N° 4: 566-578.

104. McEvoy C. R.E., Falmer A., Gey van Pittius N. C., Victor T C., Van Helden P D. et Warren R M., 2007. The role of IS6110 in the evolution of Mycobacterium tuberculosis. Tuberculosis, Vol. 87, Issue. 5 : 393-404.

105. Méchaïa F., Fock-Yeec C., Bouvryd D., Raffetina A., Bouchauda O., Braunerc M. et Brillet P.Y., 2018. Tuberculose pulmonaire : évolution radiologique des lésions broncho-pulmonaires en fin de traitement. Revue des Maladies Respiratoires, Vol. 36, N°. 1 : 22-30.

106. Mifflin T. E, 2007. Setting up a PCR laboratory, CSH protocols, vol.2007:5-13.

107. Miller M.B., Popowitch E. B., Backlund M. G. et Ager E. P. C., 2011. Performance of Xpert MTB/RIF RUO Assay and IS*6110* Real-Time PCR for *Mycobacterium tuberculosis* detection in Clinical Samples. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Vol. 49, N°. 10: 3458-3462.

108. Mjid M., Cherif J., Ben Salahb N., Toujania S., Ouahchi Y., Zakhama H., Louzir B., Mehiri-Ben Rhouma N. et Bejia M., 2014. Épidémiologie de la tuberculose. Revue de Pneumologie clinique Vol. 71, N° 2-3 : 67-72.

109. Monier J-M. et Cécillon S., 2015. les outils de biologie moleculaire et leur utilisation dans le domaine de la gestion des sites pollues- synthèse. **ADEME.**: 21 22.

110. Morvan V. L., Formento J-L., Milano G., Bonnet J. et Robert J., 2005. Techniques de recherche des polymorphismes génétiques. Oncologie Vol. 7. Issue. 1: 7-16.

111. Mocellin S., Rossi C. R., Pilati P., Nitti D. et Marincola F.M., 2003. Quantitative real-time PCR: a powerful ally in cancer research. TRENDS in Molecular Medicine, Vol.9 No.5 : 189-195.

112. Murray R. K., Bender D.A., Botham k. m., kennelly p.j., rodwell v. w. et weil P. A., 2013. Biochimie De Harper 5éme Edition , *Éd* De Boeck :454.

113. Murthy M. K., Parasa R. R V., Deenadayalan A., Sharma P., Raja A., 2007. Evaluation of the ,diagnostic potential of region of deletion-1–encodedantigen culture filtrate protein-10 in pulmonary tuberculosis. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease Vol.59: 295–302.

114. Navarro E., Serrano-Heras G., Casta M.J. et Solera J., 2015. Real-time PCR detection chemistry.Clinica Chimica Acta, Vol. 439: 231–250.

115. Negi S. S., Khan. S. F. B., Gupta S, Pasha S. T., Khare S., et Lal S., 2005. COMPARISON OF THE conventional diagnostic modalities, Bactec culture and polymerase chain reaction test for diagnosis of tuberculosis. Indian Journal of Medical Microbiology, vol. 23, Issue 1: 29-33.

116. Ninet B., Roux-Lombard P., Shrenzel J. et Janssens J-P., 2011. Nouveaux tests pour diagnostic de la tuberculose. Revue des Maladies Resperatoire, Vol. 28, N°. 6 : 823-833.

117. Nishimura T., Hasegawa N., Mori M., Takebayashi T., Harada N., Higuchi K., Tasaka S. et Ishizaka A., 2008. Accuracy of an interferon-γ release assay to detect active pulmonary and extra-pulmonary tuberculosis. INT J TUBERC LUNG DIS Vol.12, Issue 3:269–274.

118. Nour-Neamatollahi A., Siadat S.D., Yari S., Tasbiti A.H., Ebrahimzadeh N., Vaziri F., Fateh A., Ghazanfari M., Abdolrahimi F., Pourazar S. et Bahrmand A., 2018. A new diagnostic tool for rapid and accurate detection of Mycobacterium tuberculosis. Saudi Journal of Biological Sciences, Vol. 25, Issue. 3: 418–425.

119. Orme I. M., 2015.Tuberculosis Vaccine Types and Timings. Clin Vaccine Immunol, vol. 22, N°.3 : 249 –257.

120. Osman A. L., Saeed N. S., Elhassan M. M., 2014. Polymerase Chain Reaction targeting insertion sequence IS6110 for the diagnosis of pulmonary tuberculosis among Sudanese children and young adults. International Journal of Mycobacteriology Vol.3, Issue 4: 252 -258.

121. Ossalé-Abacka K.B., Koné A., Akoli-Ekoya O., Bopaka R.G., Lankoandé-Siri H. et Horo K., 2018. Tuberculose extrapulmonaire versus tuberculose pulmonaire: aspects épidémiologiques, diagnostiques et évolutifs. Revue de Pneumologie clinique, Vol. 74, N°. 6 :452-457.

122. OMS, 2017. Rapport sur la lutte contre la tuberculose dans le monde. Organisation Mondiale de la Santé : 1.

123. OMS, 2019: rapport des estimations de la charge de TB et de TB-MR en Algérie dans l'année 2017, 2019. Organisation Mondiale de la Santé.

124. Overbergh L., Giulietti A-P., Valckx D. et Mathieu C., 2010. Molecular Diagnostics 2eme édition. Éd. Academic Press: 87-105.

125. Papathakis P. et Piwoz E., 2010.Nutrition et tuberculose: Revue de littérature et considérations pour les programmes de lutte contre la tuberculose.L'Agence des États-Unis pour le développement international (USAID) : 6.

126. Peirse M. et Houston A., 2017. Extrapulmonary tuberculosis. Medicine, Vol. 45, Issue 12: 747–752.

127. Pezzella A. T., 2019. History of Pulmonary Tuberculosis. Thorac Surg Clin, Vol. 29: 1–17.

128. Poitras E. et Houde A., 2002. La PCR en temps réel: principes et applications *Rev. Biol. Biotech,* Vol.2, N°. 2: *2-11.*

129. Rao P., Chawla K., Shenoy V. P., Mukhopadhyay C., 2016. Role of real-time PCR for detection of tuberculosis and drug resistance directly from clinical samples. Indian Journal of Tuberculosis, Vol.63, Issue 3 : 149-153.

130. Rahman *M M.,* Rahim M. R., Khaled A., Nasir T. A., Nasrin F., Hasan M.A.,2017.) molecular detection and differentiation of mycobacterium tuberculosis complex and non-tuberculous in clinical specimens by Real time PCR. Mymensingh Med J, Vol. 26, Issue 3: 614-620.

131. Ratovonirina N H, 2017. Etudes descriptive, épidémiologique, moléculaire et spatiale des souches Mycobacterium tuberculosis circulant à Antananarivo, Madagascar. Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay et de l'Université d'Antananarivo, préparée à l'Université Paris Sud 11 : 8.

132. Raveendran R. et Wattal C*., 2016.* Utility of multiplex real-time PCR in the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. braz j infect dis, Vol.20, Issue 3:235–241.

133. Regnault J-P., 2002. Éléments de microbiologie et d'immunologie. Éd. DECARIE: 307-308.

134. Rizvi N., Singh A., Yadav M., Rizwan Hussain S., Siddiqui S, Kumar V., Ali S. et Agarwal A. , 2016. Role of alpha-crystallin, early-secreted antigenic target 6-kDa protein and culture filtrate protein 10 as novel diagnostic markers in osteoarticular tuberculosis Journal of Orthopaedic Translation, Vol.6:18-26.

135. Salmanzadeh S., Soleimani M, Mohammadi M. J., Alavi S. M., 2018. Diagnostic Value of Serum Adenosine Deaminase Level in Extrapulmonary Tuberculosis. Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection, Vol.5, Issue 3:1-5.

136. Santos A., Cremades R., Rodri´Guez J. C., Garci´A-Pacho´N E., Ruiz M. Et Royo G., 2010. Comparison of methods of DNA extraction for real-time PCR in a model of pleural tuberculosis. APMIS, Vol. 118: 60–65.

137. Santos FCF., Lira LAS., Montenegro RA., Lima JFDC., Lima AS., Schindler HC., Montenegro LML., 2018.Performance of the IS6110-TaqMan® assay in the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis from different biological samples.Rev Soc Bras Med Trop, Vol.51, Issue.3 : 331-337**.**

138. Saravanana M., Niguse S., Abdulkader M., Tsegay E., Hailekiros H., Gebrekidan A., Araya T., Pugazhendhi A., 2018. Review on emergence of drug-resistant tuberculosis (MDR & XDR-TB) and its molecular diagnosis in Ethiopia. Microbial Pathogenesis, vol.117: 237–242.

139. Sharma. S, Sheoran Gupta A. B., Yadav A., Varma-Basil M., Sreenivas V., Chaudhary D. et Mehta P. K., 2019. Quantitative detection of a cocktail of mycobacterial MPT64 and PstS1 in tuberculosis patients by real-time immuno-PCR. *Future Microbiol* (Epub ahead of print), Vol. 14, Issue 3.

140. Sidhom M., Ben Kheder A., Beji M., Bouacha H., Bouzouaïa N., Gamara D., Haltiti R., Hamzaoui A., Tritar F., Slim L., Zarrouk M., Hili K., Fourati R., Chouchene R., Blanco I., Ben Mansour S. et Mejti A., 2011.Guide de prise en charge de la tuberculose PNLT 2011, Ministère TUNISIENNE de la Santé Publique : 12.

141. Slim-Saidi L., Mehiri-Zeghala E., Ghariani A. et Tritar F., 2015. Nouvelles méthodes de diagnostic de la tuberculose, Revue de Pneumologie Clinique, Vol. 71, N°. 2-3 :110-121.

142. Smaoui-Fourati S., Mzida H., Marouanea C., Kammoun S. et Messadi-Akrout F., 2015. Tuberculose multirésistante: épidémiologie et facteurs de risque, Rev Pneumol Clin, vol. 7, N°. 4 : 233-241.

143. Smith Noel H., Glyn Hewinson R., KremerK., Brosch R. et Gordon S. V., 2009. Myths and misconceptions:the origin and evolution of *Mycobacterium tuberculosis,* Nature reviews Microbiology, vol.7, Issue7:537-44.

144. Soheili Z. et Samiei S., 2005. Real Time PCR: Principles and Application. *Hepatitis Monthly 2005;* Vol. 5, Issue. 3: 83-87.

145. Soundarya J.S.V., Ranganathan U.D. et Tripathy S.P., 2019. Current trends in tuberculosis vaccine, Medical journal armed forces India, vol.75, Issue 1: 18-2 4.

146. Sreejit G., Ahmed A., Parveen N., Jha V., Valluri V. L., Ghosh S. et Mukhopadhyay S., 2014. The ESAT-6 Protein of Mycobacterium tuberculosis Interacts with Beta-2-Microglobulin (b2M) Affecting Antigen Presentation Function of Macrophage. PLOS Pathogens, Vol.10, Issue. 10 : 1-19.

147. Sun W., Ph.D., ABMG, CGMB, CLSP (MB), 2010. Molecular Diagnostics: Techniques and Applications for the Clinical Laboratory, Éd.Academic Press: 35-47.

148. Talbot E. A. et Raffa B. J., 2015. Mycobacterium tuberculosis, Molecular Medical Microbiology, Vol. 3:1637-1653.

149. Tan S. C. et Yiap B. C., 2009. DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present, Journal of Biomedicine and Biotechnology, Vol. 2009: 1-10.

150. Telisinghe L., Amofa-Sekyi M., Maluzi K., Kaluba-Milimo D., Cheeba-Lengwe M., Chiwele K., Kosloff B., Floyd S., Bailey S-L., Ayles H., 2017. The sensitivity of the QuantiFERONW-TB Gold Plus assay in Zambian adults with active tuberculosis. INT J TUBERC LUNG DIS, Vol. 21, Issue 6: 690–696.

151. Thatcher S. A., 2018. Principles and Applications of Molecular Diagnostics éd Elsevier: 35-46.

152. Toujani S., Ben Salah N., Cherif J., Mjid M., Ouahchya Y., Zakhama H., Daghfousa J., Bejia M., Mehiri-Ben Rhouma N. et Louzi B., 2015.La primo-infection et la tuberculose pulmonaire. Revue de Pneumologie Clinique, vol.71, N°.2-3 : 73-82.

153. Truffot-Pernot C., Véziris N., Sougakoff W., 2006. Diagnostic moderne de la tuberculose. Presse Med, Vol. 35: 1739-1746.

154. Truffot-Pernota C. et Veziris N. 2011, Les tests bactériologiques de la tuberculose maladie : standards et perspectives. Revue des Maladies Respiratoires, Vol. 28, N°. 8 :1034-1047.

155. Tüzmen Ş., Baskın Y., Nursal A. F., Eraslan S., Esemen Y., Çalıbaşı G., Demir A., Abbasoğlu D. et Hızel C., 2018. Engineering, Towards Improving Quality of Life. Éd.Academic Press: 247-315.

156. Van der Velden VHJ., Hochhaus A., Cazzaniga G., Szczepanski T., Gabert J. et van Dongen JJM., (2003). Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. Leukemia Vol.17: 1013–1034.

157. Van Deun. A, Martin. A, Palomino. J. C, 2010. Diagnostic de la tuberculose à germes résistants aux médicaments : fiabilité et rapidité de détection. INT J TUBERC LUNG DIS Vol.14, Issue 2:131–140.

158. Varaine F.et Rich M., 2014. La tuberculose guide pratique à l'usage des médecins des infirmiers et techniciens de laboratoire et auxiliaire de la santé, édition 2014. Ed. Médecins sans frontières et Partner in health : 15-21-.

159. Velden V. v. d., Hochhaus A., Cazzaniga G., Szczepanski T., Gabert J. et Donge. J. v., 2003. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects, Leukemia, Vol. 17: 1013-1034.

160. Venketaraman V., 2018. Understanding the Host Immune Response Against *Mycobacterium tuberculosis* Infection. Éd.springer: 133-136.

161. Viana. R. V. et Wallis. C. L., 2011.Wide Spectra of Quality Control. Ed. InTech: 29-52.

162. Vincent V., 2013.Diagnostic bactériologique de la tuberculose, Revue francophone des laboratoires, Vol. 43, N° 449 : 38-43.

163. Vittor A. Y., Garland J. M., et Schlossbe D., 2011. Improving the Diagnosis of Tuberculosis: From QuantiFERON to New Techniques to Diagnose Tuberculosis Infections. Curr HIV/AIDS Rep, Vol. 8: 153–163.

164. Wainsten J.P., 2012. Larouss MEDICAL. Éd. Larouss: 985.

165. Walzl G., Nerney R., du Plessis N., Bates M., Zumla A., 2018. Tuberculosis: advances and challenges in development of new diagnostics and biomarkers. The Lancet Infectious Diseases, Vol. 18, Issue 7: 199-210.

166. Watanabe Pinhata J. M., Cergole-Novella M. C., Santos-Carmo A. M. d., Silva R. R. F., Ferrazoli L., Sacchi C. T. et de Oliveira R. S., 2015. Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis complex by real-time PCR in sputum samples and its use

in the routine diagnosis in a reference laboratory. Journal of Medical Microbiology, vol.64, N°.9: 1040–1045.

167. Weinberger S. E., Cockrill B. A. et Mandel J., 2019. Principles of Pulmonary Medicine, 7th Edition. Éd. Elsevier: 314-322.
168. Wilmott R. W., Li A., Deterding R., Sly P., Zar H. J., Bush A. et Ratjen F., 2019. Kendig's Disorders of the Respiratory Tract in Children 9éme edition. Éd. Elsivier: 477.
169. World Health Organization, 2016. Establishment of PCR laboratory in developing countries 2emeedition.
170. World Health Organization; 2018. Global tuberculosis report.
171. Wouter A. D. O, Pierre B., Robert C., Maryse F-D., Guido G., Francoise M., Renaat P., Leen R., Wouter S., Roger S., Pascal V. P., Andre V. D. E., Bernard V., Paul V. V. J., Maryse M., 2011. Diagnostic et traitement de la tuberculose, manuel pratique, recommandations destinées au corps médical. Ed. FARES asbl : 13-16.
172. Yagmur G., Elgormus N., Ziyade N., Das T., Ozgun A., Gurler A. S., Yildirim M., Akcay A., Karayel F. et Koc S., 2017. Investigation of tuberculosis prevalence by acidfast stain, culture and real-time PCR method in forensic autopsies, Australian Journal of Forensic Sciences, Vol. 50, Issue. 4: 1-9.
173. Yoya G.K, 2010. Synthese d'analogues cinnamiques : Inhibiteurs potentiels contre *Mycobacterium tuberculosis.* Thèse de Doctorat de l'université de Toulouse :7, 21.
174. Zhongquan Lv., Zhang M., Zhang H., and Lu X.; Utility of Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction in Detecting Mycobacterium tuberculosis. Bio Med Research International, Vol. 2017: 5.

Annexes

Annexe 1

Bonnes pratiques dans un laboratoire de diagnostic utilisant des tests d'amplification génique

La réalisation d'un test génétique est un processus complexe fait de multiples étapes, depuis le recueil et le traitement de l'échantillon d'ADN ou d'ARN jusqu'à l'interprétation et la rédaction du résultat. Les principales recommandations émises pour les aspects pré-analytiques et analytiques des tests génétiques concernent essentiellement l'amplification des acides nucléiques par PCR**(Claustres, 2001).**

Un certain nombre de précautions doivent être adoptées lors de la conception d'un laboratoire de PCR afin que celui-ci soit exploité d'une manière à empêcher la contamination des réactions avec les produits amplifiés provenant d'essais précédents et la contamination croisée entre échantillons, qui peuvent conduire à des résultats faussement positifs **(OMS, 2016)**.

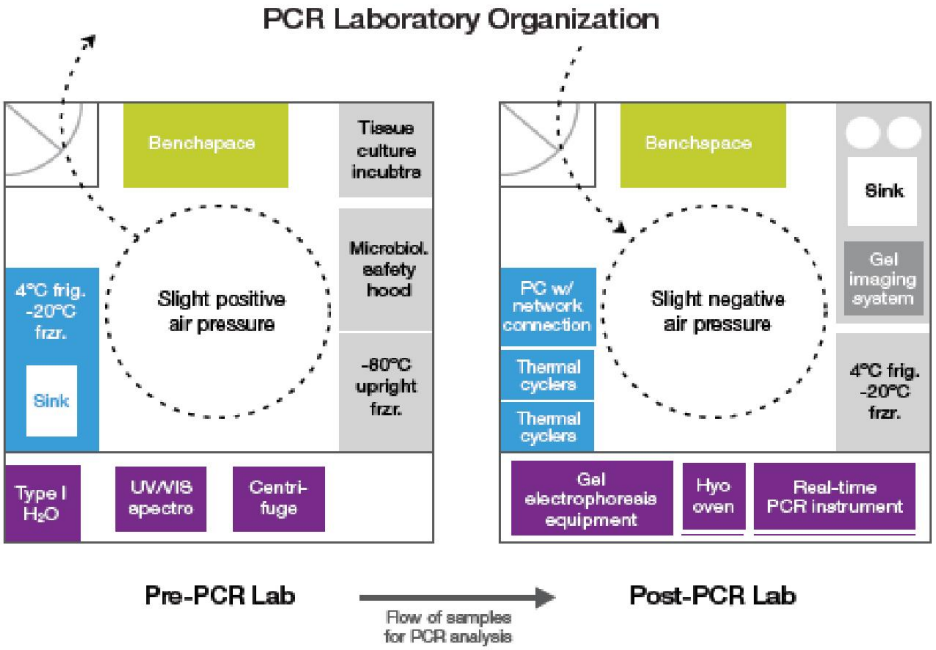
1.1.Organisation du laboratoire utilisant la PCR classique

Au cours de la réalisation des tests d'amplification génique deux types d'activités sont possibles ; l'extraction, la purification d'ADN et la préparation des réactifs PCR tout ces activités sont inclues dans une phase appelée phase pré-PCR. La phase post-PCR regroupe en plus de l'amplification les activités de manipulation de l'ADN amplifié comme la purification des produits PCR, le séquençage, clonage…etc **(Gauthier, 2006).**

Le minimum requis pour éviter le risque de contamination dans un laboratoire de diagnostic effectuant des analyses de PCR classique est de séparer physiquement les phases de pré-PCR et les phases post-PCR en des zones différentes ; au moins en trois salles. Chaque salle doit équiper par son propre matériel (pipettes, blouses, gants…etc). Tout échange de matériel entre ces zones doit être strictement évité, surtout les micropipettes qui sont une source importante de contamination du fait des aérosols. Ces salles doivent être distribuées d'une façon à assurer une circulation cohérente et unidirectionnelle **(Jarlie *et al.,* 2004 ; Claustres, 2011 ; OMS, 2016).**

Une salle avec une pression positive, pour empêcher l'introduction de contamination est désignée pour la préparation des réactifs. D'autre salle utilisée pour la préparation des échantillons avec une pression négative pour conserver les acides nucléiques modèles dans la

pièce. Pour l'amplification et la détection de produit d'autre salle avec pression négative doit être occupée **(Jarlie *et al.*, 2004 ; Claustres, 2011 ; OMS, 2016).**



Organisation du laboratoire utilisant la PCR classique **(Van-Pell *et al.*, 2008).**

1.2. Recommandations à suivre dans un laboratoire effectuant des tests PCR

Pour réaliser des tests de PCR avec toute précision et reproductibilité, un mode de travail vigilant et prudent est nécessaire. Pour éviter la contamination, ainsi que savoir à quoi sert cette contamination dans les résultats finaux de PCR il est primordiale que chaque travailleur de laboratoire devrait comprendre les étapes et les précautions à prendre et doit toujours respecter quelques mesures **(Meffline, 2007).**

1.2.1. Pendant la collecte des échantillons :

Les échantillons qui seront utilisés pour effectuer des tests PCR doivent provenir directement de la réception à la zone d'extraction; les échantillons ne doivent jamais pénétrer dans des pièces contenant des produits de PCR **(Van-Pell *et al.*, 2008).**

1.2.1.1. Prélèvements

La collecte des échantillons qui seront subit un test moléculaire est un facteur non négligeable ; en premier temps il convient de bien choisir l'échantillon à manipuler, le choix est avant tout dépend de l'abondance de pathogène recherché dans l'échantillon, mais aussi sa richesse en inhibiteurs de PCR tout en gardant la structure d'acides nucléique préservée surtout pour les tissu fixé au formol et inclus en paraffine **(Botterel, 2017).**

Le type de dispositif de collecte utilisé peut influencer aussi sur la sensibilité de test ; certains dispositifs de collecte sont recouverts d'une substance pouvant entraîner une inhibition du dosage moléculaire. L'exemple de certains anticoagulants tels que l'héparine qui peut entraîner une inhibition de l'analyse moléculaire. Par conséquent, la méthode de collecte préférée consiste à utiliser des tubes revêtus d'EDTA, des écouvillons et des tubes secs stériles. Cependant, des écouvillons à base de formol doivent être utilisés avec prudence. Il est également essentiel de noter correctement les informations de chaque échantillon collecté en la donnant un numéro unique **(Viana et Wallis, 2011).**

1.2.1.2. Stockage

La nature d'acides nucléiques utilisés pour le test (ARN/ ADN) cela aura également un impact sur le temps écoulé entre l'échantillonnage, le stockage et l'analyse de l'échantillon. Si l'échantillon (sang) requis sera utiliser pour un test moléculaire à base d'ARN, le plasma prélevé doit être stocké à -70 ° C jusqu'à ce qu'il puisse être testé. Mais pour un test à base d'ADN, le sang total ou le plasma peuvent être conservés à une température de 4 °C pendant 24 heures et la conservation à long terme devrait être à -20 ° C **(Viana et Wallis, 2011).**

1.2.2. Pendant l'analyse

Les exigences minimales pour contrôler la contamination pendant la manipulation incluent le port obligatoire des blouses dédiés au laboratoire PCR et des gants en latex ou en néoprène de telle sorte que les blouses de laboratoire soient retirées et les gants enlevés lors du déplacement. Ce qui permet d'éviter la contamination des échantillons cliniques ou les réactifs de PCR par les nucléases DNases et / ou RNases présentes sur la peau humaine et dans la sueur **(Van-Pell *et al.,* 2008).**

Afin d'éviter la contamination par d'autre acides nucléiques, plusieurs méthodes chimiques permettant de dégrader les amplicons, la plus utilisée est système uracile –N glycosylase (UNG)/dUTP. Il est aussi recommandé de nettoyer les surfaces par l'acide chlorhydrique 1 N et d'utiliser des lampes à UV. Le système de verrouillage de ces lampes est de préférence situé sur la porte de sortie afin qu'elles ne s'allument que lorsque le dernier personne du laboratoire sort et ferme la porte externe du laboratoire **(Meffline, 2007).**

Il est aussi important de garder la pièce ou la zone de préparation des réactifs libre de tout matériel biologique cela inclut les extraits d'ADN / ARN, les échantillons, les matériaux clonés et les produits de PCR **(Van-Pell *et al.,* 2008).**

1.2.2.1. Pendant l'extraction :

Pour des résultats fiables d'amplification il convient d'extraire un ADN de bonne qualité pour cela, voilà quelques recommandations à suivre :

-Utiliser des embouts de pipette stériles avec filtre pour empêcher la réintroduction de petites quantités d'un échantillon contaminant en aérosol dans le prochain échantillon pipeté **(Meffline, 2007 ; Manuel de kit *artus M. tuberculosis* RG PCR, 2015).**

-L'utilisation d'une hotte à flux laminaire ou d'un poste de sécurité microbiologique pour faciliter la préparation des échantillons et des réactifs de PCR **(Meffline, 2007 ; Manuel de kit *artus M. tuberculosis* RG PCR, 2015 ; OMS, 2016).**

-Avant tout ouverture, les tubes contenant les échantillons ou les réactifs stockés doivent être centrifugés brièvement pour s'assurer que tous les liquides se trouvent au fond des tubes séparé des aérosols ce qui diminue le risque de contamination **(Dennis, 2006 ; Manuel de kit *artus M. tuberculosis* RG PCR, 2015).**

-Décongeler complètement tous les composants avant le début du test tout en les gardant à une température qui ne provoque pas leur désactivation. Des glacières ou de la glace peuvent être utilisées pour maintenir les enzymes au froid, lorsqu'elles sont utilisées sur la paillasse **(Meffline, 2007).**

-L'extraction de l'acide nucléique à partir d'échantillons cliniques doit être effectuée dans des zones où les produits de PCR et les stocks de matériel cloné n'ont pas été manipulés **(Meffline, 2007).**

1.2.2.2. Pendant l'amplification :

En termes de recommandation, pour une amplification avec un minimum de contamination, il faut bien adopter ces conseils :

-Conserver et purifier les éléments positifs (échantillons, contrôles, amplicons) séparément des autres réactifs et les ajouter au mélange réactionnel dans une autre pièce **(Manuel de kit *artus M. tuberculosis* RG PCR, 2015).**

-Utiliser des cônes de pipette stériles avec filtre et centrifuger brièvement les composants à utilisés **(Meffline, 2007).**

-Travailler rapidement et laisser les composants dans la glace ou dans un bloc réfrigérant **(Meffline, 2007 ; Manuel de kit *artus M. tuberculosis* RG PCR, 2015).**

-Il est généralement recommandé d'aliquoter les réactifs en aliquotes à des petits volumes à usage unique (à savoir jetables) pour éviter les phénomènes de congélation/décongélation qui peuvent causer des contaminations ou l'inactivation des réactifs surtout concernant les enzymes **(Van-Pell *et al.,* 2008).**

1.3. Matériels nécessaires pour un laboratoire effectuant des tests PCR

Selon l'OMS le matériel nécessaire pour un laboratoire effectuant des tests PCR est :

1.3.1. Centrifugeuses

Dans les deux procédures pré et post-PCR des centrifugeuses sont nécessaires, avant les utilisé pour minimiser les vibrations et augmenter la durée de vie des roulements de ces machines il faut les équilibrer tout en respectant les instructions du fabricant.

1.3.2. Agitateurs vortex

Afin de faciliter la préparation des réactifs d'extraction de l'ADN et de PCR, il nécessaire d'utiliser un vortex.

1.3.3. Cuve d'électrophorèse sur gel

L'utilisation d'électrophorèse sur gel dans la PCR classique est pour détecter les produits de PCR après amplification donc tout équipement utilisé dans cette technique est nécessaire. Ces équipement doivent être contrôlé avant chaque utilisation et rincer plusieurs fois après utilisation.

1.3.4. Hottes à flux laminaire / poste de sécurité biologique (PSM)

Ce matériel doit être utilisé lors de manipulation des échantillons ou des réactifs de PCR en particulier. Un PSM équipé d'un filtre permet d'éviter toute contamination possible de l'environnement, des personnelles ou des réactifs selon sa classe I, II ou III.

1.3.5. Réfrigérateur/ Congélateur

Un réfrigérateur peut être utilisé pour le stockage temporaire des échantillons, les acides nucléiques extraits et les produits d'amplification. Pour le stockage à long terme, il est recommandé d'utiliser un congélateur à température -80 °C. Concernant les réactifs, leur conservation doit être à une température de -20 ° C.

1.3.6. Pipettes

Des pipettes et / ou micropipettes automatiques, à volume fixe, à déplacement positif et ajustables sont utilisées dans le laboratoire de PCR. Pour minimise la contamination croisée des échantillons lors du pipetage pendant l'analyse PCR, stériliser régulièrement les pipettes selon les recommandations du fabricant et à chaque fois qu'on suspecte une contamination (il existe des pipettes autoclavable) . Utiliser des embouts à filtre et pour limiter les risques d'aérosols.

1.3.7. Tubes PCR

Les tubes en polypropylène à bouchons à vis ne génèrent pas d'aérosols, certifiés sans DNase, RNase et apyrogène sont les meilleurs recommandés pour les laboratoires de PCR. La taille et le style des tubes de PCR ou des plaques de réaction doivent être compatibles avec la hauteur du bloc et du couvercle de thermocycleur. Les tubes à paroi mince fournissent le meilleur transfert de chaleur, garantissant que le mélange réactionnel atteigne la température spécifiée dans les meilleurs délais, améliorant ainsi la spécificité et la reproductibilité.

1.3.8. thermocycleurs

Un soin particulier doit être apporté au thermocycleurs pour leur maintenance et leur fiabilité. La température du bloc d'un thermocycleur doit être testée au moins deux fois par an pour assurer un chauffage uniforme dans tout le bloc.

Les thermocycleurs de PCR en temps réel afin de mesurer les produits d'amplification tout au long des cycles de PCR, sont équipés des détecteurs et des fluormètre et des

détecteurs. La température, les performances du laser, les dispositifs de sécurité et les systèmes optiques doivent être vérifiés annuellement.

1.4. Gestion de déchet

Les déchets contenant des amplicons PCR ne devraient pas être autorisés à s'accumuler dans une zone également fréquentée par d'autres personnes susceptibles de participer éventuellement à l'isolement et à la purification de matrices **(Meffline, 2007).**

L'autoclavage ou l'incinération d'ustensiles de laboratoire contaminés, notamment de verrerie de laboratoire, de tubes Eppendorf à usage unique, d'embouts de pipettes, de tampons et d'autres solutions, est également recommandée **(Verkuil, 2008).**

1.5. Organisation du laboratoire utilisant la rt-PCR

Pendant la réaction rt-PCR, les produits d'amplification sont détectés au fur et à mesure de leur production dans des tubes fermés sans besoin d'ouvrir ces tubes, le risque de contamination est quasiment nul. Donc il est possible de ce limiter en une seul salle pour effectuer tout les étapes de PCR mais avec une condition de ne réaliser que des tests des rt-PCR et les règles concernant les différentes zones de travail reste présentes **(Ameziane *et al*,. 2006).**

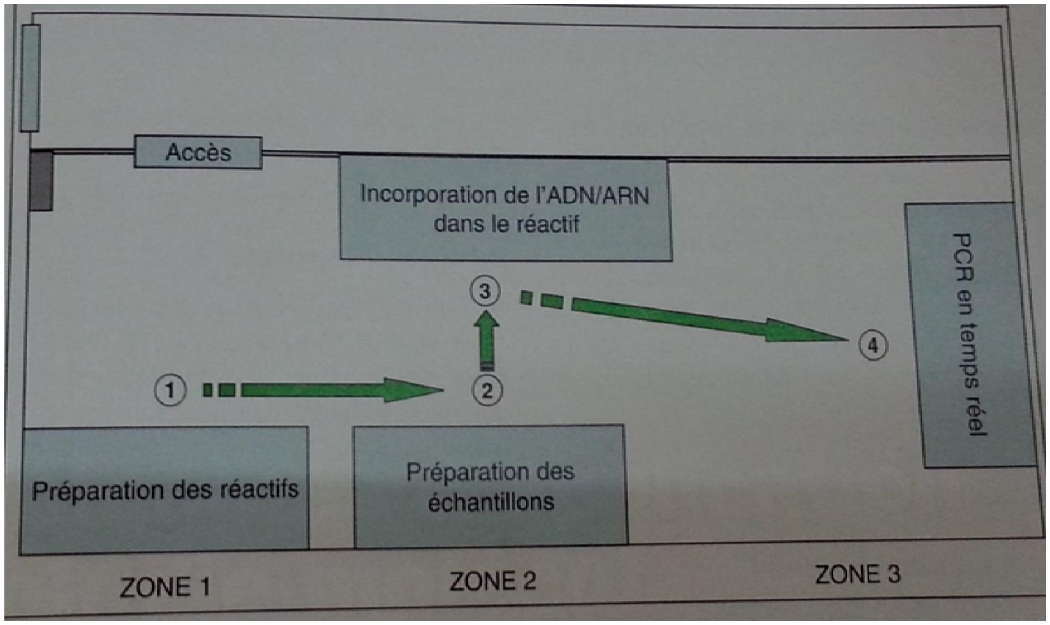


Figure : Organisation du laboratoire utilisant la rt-PCR **(Ameziane *et al*,. 2006).**

Annexe 2

Prévention des risques de contamination au sein de laboratoire d'analyse médical El Amel

En absence des préventions nécessaires pour contrôler la contamination, les tests PCR peuvent générer des résultats faussement positifs et conduire ainsi à un mauvais diagnostic. Ce genre des résultats sans doute est inacceptable car ils sont capables de conduire à la mise en place d'un traitement, son arrêt ou même une hospitalisation de patient. De ce fait la gestion de contamination est un facteur clé pour la fiabilité des résultats.

Pour bien maitriser le contrôle de contamination, le laboratoire d'analyse médical El Amel prend en considération l'organisation des locaux de la biologie moléculaire, Les performances des manipulations, des automates et de la société commerciale fourniture des automates et des réactifs.

2.1. Choix d'automate

À l'heur actuel, le laboratoire d'analyse médical El Amel n'effectue pour le diagnostic moléculaire que des tests de PCR en temps réel. Grâce à sa fiabilité et de sa polyvalence, le thermocycleur Rotor-Gene Q MDx (QIAGEN, Hilden, Allemagne) est choisi. Il est utilisé avec des réactifs adaptés à chaque application et fournis par de la société QIAGEN, Hilden, Allemagne. Cet automate réalise des réactions de PCR en temps réel donc la quantification des produits des réactions sont effectuées durant chaque cycle sans besoin d'ouvrir les tubes. Le Rotor-Gene Q MDx peut traiter 36, 72 ou 100échantillons simultanément en fonction de type de rotor utilisé incluant des contrôles négatifs, des contrôles positifs et aussi des contrôles internes.

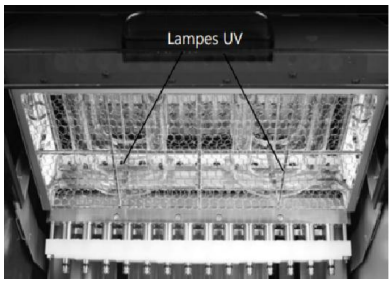
Thermocycleur Rotor-Gene Q MDx

L'automate EZ 1 Advanced XL est utilisé pour l'extraction d'ADN. Cet extracteur automatisé réalise en système fermé la lyse cellulaire, l'extraction et la purification d'AN par l'utilisation des cartes préprogrammées avec des protocoles d'extraction et de purification. L'AN est purifiée par l'utilisation de billes magnétiques revêtues de silice. Il traite jusqu'à 14 échantillons simultanément. Les tubes d'échantillon recommandés ont un volume de 2 ml, fabriqués en polypropylènee fournis dans les kits EZ1.

Extracteur EZ 1 Advanced XL

Pour la décontamination cet extracteur inclus un système de lampe UV automatisé. L'EZ1 Advanced XL est équipé de 2 lampes UV, situées sous la porte bleue de l'EZ1 Advanced XL. La porte de l'EZ1 Advanced XL sera verrouillée durant un cycle de lumière UV afin de protéger l'opérateur du rayonnement UV, en plus de ça par des cartouches de

réactif préalablement scellées et le verrouillage automatique de la porte de l'automate permettent de réduire les risques de contamination.



Emplacement des lampes UV sous la porte de l'EZ1 Advanced XL.

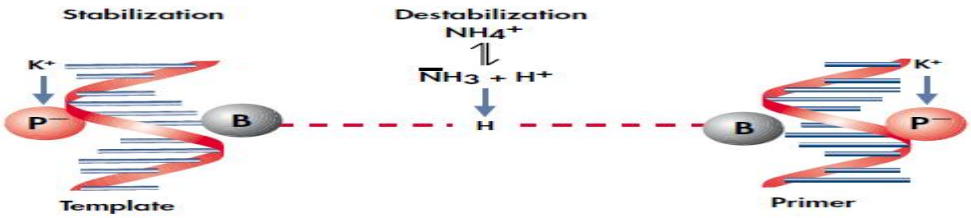
2.2. Organisation du local

Avec toute cette automatisation, les risques de contamination sont bien maitrisés, peu de contraintes sont impliquées ; aucune contrainte particulière n'a affecté l'organisation des locaux, sauf pour la préparation des réactifs de PCR.

Une salle estoccupée spécialement pour la préparation et l'aliquotage des réactifs équipée par un congélateur pour stocker les réactifs et les échantillons. L'extracteur EZ 1 Advanced XL et le thermocycleur Rotor Gene Q sont installés sans particularité dans une autre salle mais dans deux zones séparées. La position de ces deux salles qui sont voisin l'une de l'autre permet d'assurer une circulation cohérente et unidirectionnelle.

2.3. Réactifs optimisés pour toutes les applications

La société QIAGEN offre une gamme de kits pour le Rotor-Gene Q permet une quantification fiable pour toutes les applications de PCR en temps réel, sans qu'il soit nécessaire d'optimiser les conditions de réaction et de cycle. L'amplification hautement spécifique est assurée par une combinaison équilibrée d'ions qui minimise l'hybridation non spécifique des amorces. Dont les cations K + en se liant aux groupent phosphates de l'ADN double brin, stabilisant l'hybridation des amorces et les NH4 + déstabilisent les liaisons hydrogène faibles entre des bases mal appariées (Manuel de kit Rotor Gene Q- Pure détection, 2010).



Cations NH4 + et K + dans les tampons QIAGEN PCR augmentent l'hybridation spécifique des amorces.

2.4. Manipulation

Pour les prélèvements des tubes revêtus d'EDTA, des écouvillons ou des tubes secs stériles, ceux qui sont utilisés. Les réactifs sont aliquotés et chaque aliquote ne peut être utilisée qu'une seule fois. Des tubes à centrifuger et des tubes de PCR stériles sont utilisés pour l'amplification. Pour s'assurer que la purification et l'amplification sont bien effectuées des contrôles internes sont toujours utilisés. Pour éviter la contamination post PCR l'uracil-N-glycosylase (UNG) est inclus dans les kits d'amplification.

Annexe 3

Protocole d'extraction manuelle d'ADN mycobactérien recommandé par la société QIAGEN

Selon les instructions mentionnées dans le manuel de kit *artusM. tuberculosis* RG PCR**,** la lyse cellulaire est le résultat d'une combinaison entre un traitement enzymatique, chimique et thermique en utilisant le kit QIAampDNA Mini (QIAGEN, Hilden, Allemagne) référence 51304 qui est destiné pourl'extraction manuel d'ADN mycobactérien et en suivant ces étapes:

1. Transférer 250 µl à 500 µl de l'échantillon décontaminé par la méthode N-acétyl-L-cystéine (NALC-NaOH) dans un tube de 1,5 ml muni d'un capuchon à vis.
2. Centrifuger pendant 10 minutes à 17.000 x *g* (13.000 tr/min), le culot.
3. Ajouter 180 µl de mélange de lysozyme (20 mg/ml de lysozyme; 20 mM de Tris-HCl (pH 8,0) ; 2 mM d'EDTA; 1,2 % de Triton™) à l'échantillon et remettre le culot en suspension par pipetage répété
4. Incuber pendant au moins 1 heure à 37 °C dans un bloc chauffant ou un thermomixer.
5. Centrifuger brièvement.
6. Ajouter 20 µl de protéinase K et 200 µl de tampon AL contenant l'ARN entraîneur et l'IC.
7. Mélanger soigneusement par vortexage.
8. Incuber pendant 30 minutes à 56 °C dans un bloc chauffant ou un thermomixer.
9. Centrifuger brièvement.
10. Incuber pendant 15 minutes à 95 °C.

Important : Toutes les étapes de pipetage précédant l'incubation à 95 °C doivent être effectuées sous une hotte biologique de classe II, car les échantillons sont potentiellement infectieux.

La purification d'ADN s'effectue à l'aide des colonnes de spin QIAamp Mini, en suivant les instructions mentionnées dans le manuel de kit QIAampDNA Mini (QIAGEN) (référence 51304). Le principe de purification repose sur une séparation chromatographique échangeuse d'anion à base de silice.

Les conditions de sel et de pH dans le lysat permettent l'adsorption d'ADN sur la membrane de silice QIAamp au cours des étapes de centrifugation alors que les protéines, les cations et les autres contaminants qui peuvent inhiber la PCR et d'autres réactions enzymatiques en aval sont lavées par l'utilisation de deux tampons de lavage différents ; le tampon AW1 et le tampon AW2. L'ADN purifié est ensuit élué de la colonne de centrifugation QIAamp Mini sous une forme concentrée dans 100 µl de tampon AE (Tris -H Cl 10 mM; EDTA 0,5 mM; pH 9,0) ou de l'eau.

Annexe 4

Système de chauffage et de refroidissement

Pour atteindre les conditions optimales de réaction, le Rotor-Gene Q MDx utilise un système de chauffage et conception de refroidissement sophistiqué où les échantillons sont chauffés et refroidis dans un four à faible masse d'air ; le chauffage est assuré par un élément nickel-chrome dans le couvercle et le refroidissement de la chambre est effectuée en évacuant l'air par le haut de la chambre tandis que l'air ambiant est soufflé par la base.

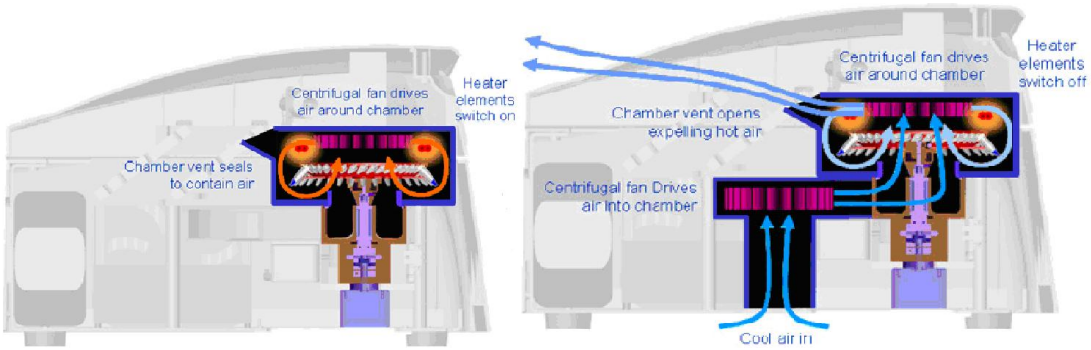


Illustration de système de chauffage et de refroidissement.

Grace à leur format rotatif unique ce thermocycleur garantit des performances thermiques et optiques optimales et uniforme entre tous les échantillons ce qui permet d'avoir des analyses fiables et des résultats précis. Pendant l'analyse les échantillons tournent continuellement à 400 tr / min cette centrifugation empêche la condensation et élimine les bulles d'air, mais ne culotte pas l'ADN.

Annexe 5
Système optique du Rotor-Gene Q MD x.

Avec la PCR en temps réel, la quantité des amplicons est mesuré durant chaque cycle en se référant à l'intensité de la fluorescence émet par des fluorochromes fixés sur les sondes utilisés. Le Rotor-Gene Q MD x utilise pour l'excitation des fluorochromes, une diode électroluminescente (a light-emitting diode LED), l'énergie émet est transmise à travers les fines parois à la base du tube pour exciter les fluorochromes fixés sur les sondes présentes dans chaque tube. La fluorescence émise passe à travers les filtres d'émission et elle est ensuite collectée par un photomultiplicateur. Lorsque chaque tube est aligné avec le détecteur, l'échantillon est éclairé et le signal fluorescent est rapidement collecté à partir d'un seul et unique chemin optique. Cette uniformité optique permet une analyse PCR en temps réel sensible, précise et rapide.

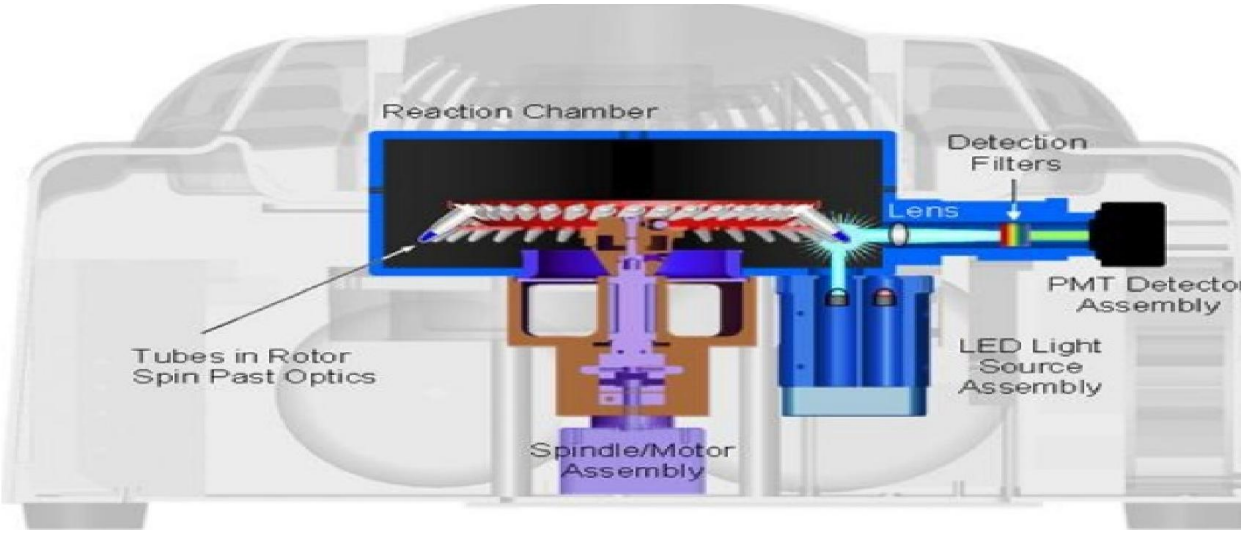


Illustration du système optique du Rotor-Gene Q MD x.

Pour couvrir tout les technolgies de détection actuellement utilisés ; les agents intercalant tels que le SYBR® Green ou les sondes marquées telles queles sondes d'hydrolyse (TaqMan®), d'hybridation (FRET) ou des sondes Scorpion, le Rotor-Gene Q MDx renferme 6 sources d'excitation et 6 filtres de détection couvrant les longueurs d'ondes ultra violet et infrarouge des fluorochromes les plus actuellement disponibles.

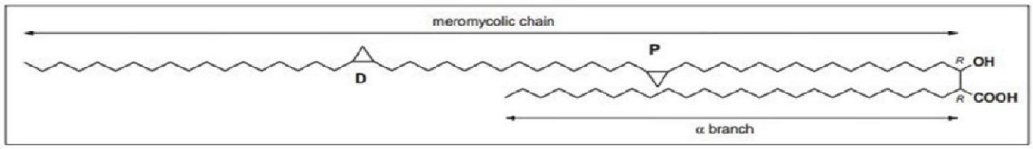
Canaux disponibles dans le Rotor-Gene Q MDx.

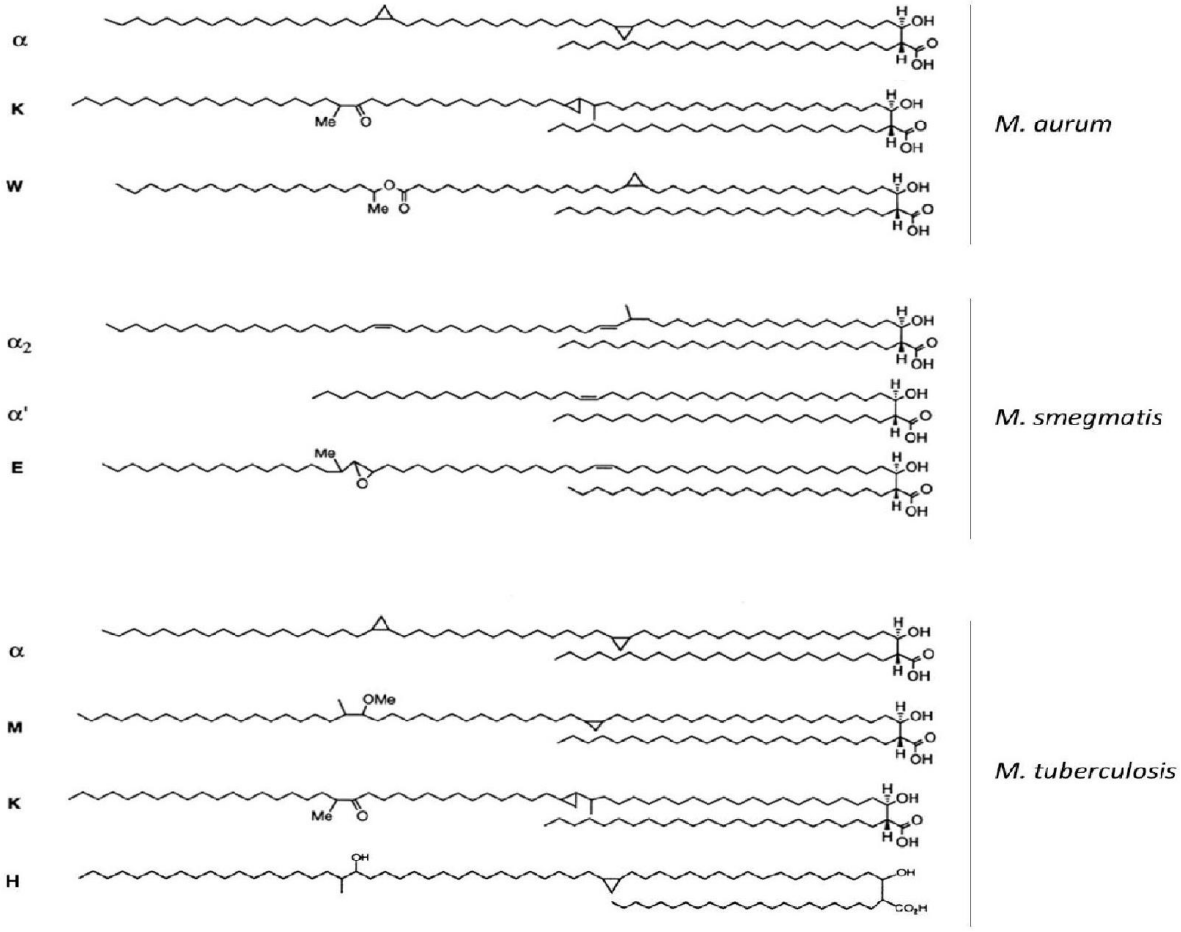
Channel	Excitation (nm)	Detection (nm)	Examples of fluorophores detected
Blue	365±20	460±20	Marina Blue®, Edans Bothell Blue, Alexa Fluor® 350, AMCA-X, ATTO 390
Green	470±10	510±5	FAM®, SYBR® Green I, Fluorescein, EvaGreen®, Alexa Fluor 488
Yellow	530±5	557±5	JOE™, VIC®, HEX™, TET™, CAL Fluor® Gold 540, Yakima Yellow®
Orange	585±5	610±5	ROX, CAL Fluor Red 610, Cy®3.5, Texas Red®, Alexa Fluor 568
Red	625±10	660±10	Cy5, Quasar® 670, LightCycler® Red640, Alexa Fluor 633
Crimson	680±5	712 high pass	Quasar 705, LightCycler Red705, Alexa Fluor 680
High resolution melt (HRM)	460±20	510±5	SYBR Green I, SYTO®9, LC Green®, LC Green Plus+, EvaGreen

Annexe 6

Structure biochimique de quelque type d'acide mycolique

Les acides mycoliques varient d'une espèce à l'autre selon leur longueur de chaîne mais aussi selon la nature des fonctions chimiques présentes en positions distale (D) et proximale (P) de la chaîne méromycolique.





Différents type d'acides mycoliques retrouvés chez *M. aurum*, *M. smegmatis* et *M. tuberculosis* (**Chiaradia, 2018) .**

Résumé

Les tests d'amplifications géniques y compris la PCR en temps réel ont révolutionné le diagnostic de la tuberculose. L'extraction automatisée d'ADN mycobactérien peut améliorer la sensibilité de ces tests. Ce travail est effectué dans le contexte d'automatiser cette extraction dans l'appareil EZ 1 Advanced XL (QIAGEN, Hilden, Allemagne). Trois échantillons extra-pulmonaires et un échantillon pulmonaire ZN+ sont traités au sein de laboratoire d'analyse médical El Amel. L'ADN mycobactérien est extrait, puis amplifié par PCR en temps réel. Deux méthodes d'extraction automatisée sont utilisées la première à l'aide de kit EZ1 DNA Blood 350 µl et la deuxième via le kit EZ1 DSP virus 48. Après comparaison de protocole d'extraction manuelle qui est le plus validé pour les mycobactéries avec celles automatisées; il apparue que l'extraction à l'aide de kit EZ1 DSP virus 48 est la plus proche de celle de manuelle mais exige seulement l'application d'un simple prétraitement des échantillons par leur incubation à 95°C pendant 15 minute dans un tampon de lyse AL. Les résultats de la première méthode ont été ininterprétables tandis que les résultats de la deuxième méthode confirment la positivité de l'échantillon pulmonaire ZN+ et la négativité des autres résultats.

Nous concluons que la PCR en temps réel est un outil sensible et très prometteur pour un diagnostic précoce de la tuberculose dans divers types des échantillons cliniques. L'automatisation d'extraction d'ADN mycobactérien peut être réalisée à l'aide de kit EZ1 DSP virus 48 version 4 en se précédant à un prétraitement.

Mots clés : Tuberculose, PCR en temps réel, extraction automatisé EZ 1 Advanced XL.

Abstract

Nucleic acid amplification assays including PCR have revolutionized the diagnosis of tuberculosis. Automated extraction of mycobacterial DNA can improve the sensitivity of these tests. This work is done in the El Amel medical analysis laboratory in the context of automating this extraction in the EZ 1 Advanced XL (QIAGEN, Hilden, Germany). Three extra-pulmonary specimens and one ZN + pulmonary specimen are used. Mycobacterial DNA is extracted than amplified by real-time PCR. Two automated extraction methods are used. The first one was by using the EZ1 DNA Blood 350 µl kit and the second was by the use of EZ1 DSP virus 48 kit. After comparing the protocol of manual extraction which is the most valid protocol for mycobacterium with automated protocols EZ1 DNA Blood 350 µl kit and EZ1 DSP virus 48 kit; it appear that the closest method to the manual extraction it is which use the EZ1 DSP virus 48 kit but only requires the application of simple pretreatment of the samples by their incubation at 95 ° C for 15 minutes in a buffer lysis (AL). The results of the first method were uninterpretables while the results of the second method can confirm the positivity of the ZN + pulmonary specimen and the negativity of the other results.

We conclude that real-time PCR is a sensitive and very promising tool for early diagnosis of tuberculosis in various types of clinical specimens. Automation of mycobacterial DNA extraction can be feasible by using of the EZ1 DSP virus 48 version 4 kit after the use of a pre-treatment.

Key words: Tuberculosis, real-time PCR, automated extraction EZ 1 Advanced XL.

ملخص

لقد أحدثت اختبارات التضخيم الجيني ، بما في ذلكتفاعل البلمرة المتسلسلاللحظي ثورة في تشخيص مرض السل. يمكن للاستخلاص الآلي للحمض النوويلبكتيريا السل الرفع من دقة هذه الاختبارات. يهدف هذا العمل لدراسة إمكانية مكننة هذا الاستخلاص باستعمال جهاز (EZ 1 Advanced XL (QIAGEN).حيث تمت معالجة ثلاث عينات غير رئوية وعينةرئوية واحدة + ZN في مخبر التحاليل الطبية الأمل ورقلة. و ذلك باستخلاص الحمض النووي لكل عينة وتضخيمه عن طريق تقنية تفاعل البلمرة المتسلسلاللحظي لأجل ذلك تم تجريب طريقتين للاستخلاص الآلي ، الأولى باستخدام مجموعة EZ1 DNA Blood 350 µl والثانية عبر مجموعة EZ1 DSP virus 48 kit. بعد مقارنة بروتوكول الاستخلاص اليدوي والذي يعتبر الأنسب بالنسبة لبكتيريا السل مع بروتوكولي الاستخلاص الآلي المذكورين سابقا. تبين أن الاستخلاص باستخدام بروتوكول المجموعة EZ1 DSP virus هو الأقرب إلى اليدوي ولكنه يتطلب فقط تطبيق معالجة مسبقة للعينات من خلال تسخينها في سائل تحللي عند درجة حرارة 95 درجة مئوية مدة 15 دقيقة. نتائج الطريقة الأولى كانت غير قابلة للتفسير في حين تؤكد نتائج الطريقة الثانية على إيجابية العينة الرئوية ZN وسلبية النتائج الأخرى.

نستنتج أنتفاعل البلمرة المتسلسلاللحظيهو أداة حساسة واعدة للغاية للتشخيص المبكر لمرض السل في أنواع مختلفة من العينات. مكننة استخلاص الحمض النووي لبكتيريا السل يمكن تنفيذها باستخدام مجموعة EZ1 DSP virus بعد معالجة مسبقة للعينات .

الكلمات المفتاحية: السل ، تفاعل البلمرة المتسلسلاللحظي ، الاستخلاص الآلي EZ 1 Advanced XL.

Résumé

Les tests d'amplifications géniques y compris la PCR en temps réel ont révolutionné le diagnostic de la tuberculose. L'extraction automatisée d'ADN mycobactérien peut améliorer la sensibilité de ces tests. Ce travail est effectué dans le contexte d'automatiser cette extraction dans l'appareil EZ 1 Advanced XL (QIAGEN, Hilden, Allemagne). Trois échantillons extra-pulmonaires et un échantillon pulmonaire ZN+ sont traités au sein de laboratoire d'analyse médical El Amel. L'ADN mycobactérien est extrait, puis amplifié par PCR en temps réel. Deux méthodes d'extraction automatisée sont utilisées la première à l'aide de kit EZ1 DNA Blood 350 µl et la deuxième via le kit EZ1 DSP virus 48. Après comparaison de protocole d'extraction manuelle qui est le plus validé pour les mycobactériesavec celles automatisées; il apparue que l'extraction à l'aide de kit EZ1 DSP virus 48 est la plus proche de celle de manuelle mais exige seulement l'application d'un simple prétraitement des échantillons par leur incubation à 95°C pendant 15 minute dans un tampon de lyse AL. Les résultats de la première méthode ont été ininterprétables tandis que les résultats de la deuxième méthode confirment la positivité de l'échantillon pulmonaire ZN+ et la négativité des autres résultats.

Nous concluons que la PCR en temps réel est un outil sensible et très prometteur pour un diagnostic précoce de la tuberculose dans divers types des échantillons cliniques. L'automatisation d'extraction d'ADN mycobactérien peut être réalisée à l'aide de kit EZ1 DSP virus 48 version 4 en se précédant à un prétraitement.

Mots clés : Tuberculose, PCR en temps réel, extraction automatisé EZ 1 Advanced XL.

ملخص

لقد أحدثت اختبارات التضخيم الجيني ، بما في ذلكتفاعل البلمرة المتسلسلاللحظي ثورة في تشخيص مرض السل. يمكن للاستخلاص الآلي للحمض النوويلبكتيريا السل الرفع من دقة هذه الاختبارات. يهدف هذا العمل لدراسة إمكانية مكننة هذا الاستخلاص باستعمال جهاز EZ 1 Advanced XL (QIAGEN)).حيث تمت معالجة ثلاث عينات غير رئوية وعينةرئوية واحدة + ZN في مخبر التحاليل الطبية الأمل ورقلة. و ذلك باستخلاص الحمض النووي لكل عينة وتضخيمه عن طريق تقنية تفاعل البلمرة المتسلسلاللحظي لأجل ذلك تم تجريب طريقتين للاستخلاص الآلي ، الأولى باستخدام مجموعة EZ1 DNA Blood 350 µlوالثانية عبر مجموعة EZ1 DSP virus 48 kit. بعد مقارنة بروتوكول الاستخلاص اليدوي والذي يعتبر الأنسب بالنسبة لبكتيريا السل مع بروتوكولي الاستخلاص الآلي المذكورين سابقا. تبين أن الاستخلاص باستخدام بروتوكول المجموعة EZ1 DSP virus هو الأقرب إلى اليدوي ولكنه يتطلب فقط تطبيق معالجة مسبقة للعينات من خلال تسخينها في سائل تحللي عند درجة حرارة 95 درجة مئوية مدة 15 دقيقة. نتائج الطريقة الأولى كانت غير قابلة للتفسير في حين تؤكد نتائج الطريقة الثانية على إيجابية العينة الرئوية ZN وسلبية النتائج الأخرى.

نستنتج أنتفاعل البلمرة المتسلسلاللحظيهو أداة حساسة واعدة للغاية للتشخيص المبكر لمرض السل في أنواع مختلفة من العينات. مكننة استخلاص الحمض النووي لبكتيريا السل يمكن تنفيذها باستخدام مجموعة EZ1 DSP virus بعد معالجة مسبقة للعينات .

الكلمات المفتاحية: السل ، تفاعل البلمرة المتسلسلاللحظي ، الاستخلاص الآلي EZ 1 Advanced XL.

Abstract

Nucleic acid amplification assays including PCR have revolutionized the diagnosis of tuberculosis. Automated extraction of mycobacterial DNA can improve the sensitivity of these tests. This work is done in the El Amel medical analysis laboratory in the context of automating this extraction in the EZ 1 Advanced XL (QIAGEN, Hilden, Germany). Three extra-pulmonary specimens and one ZN + pulmonary specimen are used. Mycobacterial DNA is extracted than amplified by real-time PCR. Two automated extraction methods are used. The first one was by using the EZ1 DNA Blood 350 µl kit and the second was by the use of EZ1 DSP virus 48 kit. After comparing the protocol of manual extraction which is the most valid protocol for mycobacterium with automated protocols EZ1 DNA Blood 350 µl kit and EZ1 DSP virus 48 kit; it appear that the closest method to the manual extraction it is which use the EZ1 DSP virus 48 kit but only requires the application of simple pretreatment of the samples by their incubation at 95 ° C for 15 minutes in a buffer lysis (AL). The results of the first method were uninterpretables while the results of the second method can confirm the positivity of the ZN + pulmonary specimen and the negativity of the other results.

We conclude that real-time PCR is a sensitive and very promising tool for early diagnosis of tuberculosis in various types of clinical specimens. Automation of mycobacterial DNA extraction can be feasible by using of the EZ1 DSP virus 48 version 4 kit after the use of a pre-treatment.

Key words: Tuberculosis, real-time PCR, automated extraction EZ 1 Advanced XL.