
DEVELOPPEMENT ET OPTIMISATION D'UNE METHODE DE DIAGNOSTIC POUR DETERMINER LA SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES DE MYCOBACTERIUM TUBERCUL

Auteur : Sury, Amandine

Promoteur(s) : Sindic, Marianne; 2963

Faculté : Gembloux Agro-Bio Tech (GxABT)

Diplôme : Master en bioingénieur : chimie et bioindustries, à finalité spécialisée

Année académique : 2016-2017

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/3031>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.

**DEVELOPPEMENT ET OPTIMISATION D'UNE
METHODE DE DIAGNOSTIC POUR DETERMINER
LA SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES DE
*MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS***

AMANDINE SURY

TRAVAIL DE FIN D'ETUDES PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE
MASTER BIOINGENIEUR EN CHIMIE ET BIOINDUSTRIES

ANNEE ACADEMIQUE 2016-2017

CO-PROMOTEURS: MARIANNE SINDIC ET VANESSA MATHYS

© *Toute reproduction du présent document, par quelque procédé que ce soit, ne peut être réalisée qu'avec l'autorisation de l'auteur et de l'autorité académique de Gembloux Agro-Bio Tech.*

**DEVELOPPEMENT ET OPTIMISATION D'UNE
METHODE DE DIAGNOSTIC POUR DETERMINER
LA SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES DE
*MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS***

AMANDINE SURY

**TRAVAIL DE FIN D'ETUDES PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE
MASTER BIOINGENIEUR EN CHIMIE ET BIOINDUSTRIES**

ANNEE ACADEMIQUE 2016-2017

CO-PROMOTEURS: MARIANNE SINDIC ET VANESSA MATHYS

Remerciements

Je souhaiterais tout d'abord remercier mes co-promotrices, Marianne Sindic, pour m'avoir donné la possibilité d'effectuer ce travail de fin d'études, et Vanessa Mathys, pour son accueil et l'aide précieuse qu'elle m'a apportée.

Ensuite, je tiens à remercier tout particulièrement An Van den Bossche pour son encadrement et ses conseils indispensables à la réalisation de ce TFE et également Pieter-Jan Ceysens pour m'avoir permis d'intégrer ce projet.

J'aimerais également remercier tous les membres de l'ISP-WIV que j'ai eu la chance de rencontrer au cours de ces cinq mois de stage et plus particulièrement Kristien, Karine, Medhi, Brigitte, Laetitia et Eugenia pour leurs conseils mais principalement pour leur gentillesse

Je tiens à remercier ma famille pour son soutien pendant ces quelques années d'université et qui m'ont permis de faire ces études.

Je remercie Louis qui m'a encouragée tous au long de mes études et sur qui j'ai toujours pu compter.

Un tout grand merci/poum à Clementine, Chloé et Sophie pour leurs commentaires et leur aide dans la rédaction de ce travail mais également pour ces années d'études trop vites passées.

Je remercie/poume la CDG d'être le meilleur des kots, où tout n'est que gentillesse non sarcastique.

Je tiens également à saluer/poumer la Clique¹ des Brailleurs² pour toutes ces années de franchises camaraderies. Finalement, je remercie/poume Cyril que j'ai rencontré sur un malentendu et avec qui j'ai partagé ces quelques incroyables années gembloutoises, VTFF.

¹ « Ensemble de personnes ayant des relations de connivence, des affinités, des intérêts communs, et formant en général groupe contre les autres » <http://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/cliq/16581>

² « Personne qui a tendance à crier ou à parler très fort. »
<http://www.linternaute.com/dictionnaire/fr/definition/brailleur/>

Résumé

La tuberculose reste, malgré la baisse de son incidence, un problème de santé majeur et l'émergence de résistance aux antibiotiques représente une menace croissante pour le contrôle de cette maladie. Il est donc essentiel de développer des outils performants et rapides pour le diagnostic des formes résistantes de cette infection afin d'éviter leur développement et propagation. Ce travail consiste à étudier différents paramètres impliqués dans l'élaboration d'une méthode de diagnostic des formes résistantes de ces bactéries. Cette méthode est basée sur la différence de réponse transcriptionnelle entre des souches stressées par la présence d'un antibiotique et des souches non-stressées et donc résistantes. Cette technique a pour avantage majeur d'informer rapidement sur la sensibilité des mycobactéries aux antituberculeux, liée à la rapidité de la réponse transcriptionnelle, tout en étant totalement indépendante du mécanisme de résistance des souches, contrairement aux méthodes de détection de mutations qui confèrent la résistance.

Cette étude, qui fait partie d'un plus important projet pris en charge par l'ISP-WIV, a pour objectif, d'une part, d'optimiser des paramètres pour réduire le temps et les manipulations requises par la méthode de référence, développée avec l'isoniazide, tout en investiguant les paramètres capables de permettre la distinction entre souches sensibles et résistantes. D'autres parts, le développement de méthodes équivalentes avec d'autres antibiotiques nécessite la détermination de gènes dont la transcription est influencée par la présence de l'antibiotique en question. Cette étude a donc également permis de définir les paramètres permettant la purification d'ARN tout en limitant sa dégradation.

Abstract

Despite a decrease of its incidence, tuberculosis remains a major issue for health. Moreover, its drug resistance represents a growing threat in terms of disease control. It is therefore essential to develop some fast and performing tools to diagnose resistant forms of this infection in order to prevent their development and spreading. This work aims to study several parameters implied in the elaboration of a method that will diagnose resistant forms of this bacteria. This method is based on the difference in the transcriptional response between stressed (sensitive) and non-stressed (resistant) strains in antibiotic presence. The benefits of this process is to quickly deliver the information about the resistance of the mycobacteria to antituberculosis medicines (based on the response time of the transcription), but also by the fact that this method is completely independent from the resistance mechanism of the strains (in opposite to the detection methods of mutation endowing resistance).

This study aims, on one hand, to optimize the method parameters to reduce the manipulations and the time required for the reference method (developed with isoniazide) while determining the parameters making the distinction between resistant and sensitive strains. On the other hand, the development of comparable methods with other antibiotics needs to determine the genes whose the transcription is altered by the presence of the antibiotic. This study has therefore brought out the parameters that allow a compromise between RNA purification while limiting its degradation.

Table des matières

I.	Introduction	1
II.	Revue bibliographique	2
1.	Caractérisation de la tuberculose.....	2
1.1.	Epidémiologie	2
1.2.	Caractérisation de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	4
1.3.	Transmission et infection	5
1.4.	Diagnostic.....	6
1.5.	Traitements et vaccins	7
1.5.1.	Vaccins	7
1.5.2.	Traitements.....	8
2.	Mécanisme de résistances.....	12
2.1.	Acquisition de résistance et généralités.....	12
2.2.	Description des mutations	13
2.3.	Techniques de détermination des résistances	16
III.	Description du projet TRIDACE.....	17
1.	Concepts et objectif général	17
2.	Essais préalables.....	19
3.	Objectifs spécifiques	21
IV.	Matériels et méthodes.....	22
1.	Cultures et Milieux.....	22
1.1.	Milieux	22
1.2.	Choix des souches	23
1.3.	Antibiogramme.....	24
1.4.	Inactivation des cultures et lyse bactérienne	26
2.	Manipulation d'ADNs et ARNs	27
2.1.	PCR et électrophorèse	27
2.2.	Extraction d'ARN et purification	28
2.3.	Contrôle de la qualité des échantillons d'ARN ou d'ADN	30
3.	Analyses Luminex.....	30
V.	Résultats et discussions spécifiques	33
1.	Préparation des échantillons pour la détermination des ARNs cibles	33
1.1.	Contrôle de l'efficacité de l'antibiotique suite à l'extraction de l'ARN	33
1.2.	Optimisation de la concentration en delamanid	35
1.3.	Optimisation des conditions de purification des ARNs.....	37
2.	Optimisation de l'analyse Luminex.....	46
2.1.	Optimisation de la lyse bactérienne.....	46
2.2.	Optimisation au niveau de la croissance bactérienne	55
2.3.	Optimisation du temps d'incubation suite à l'ajout de INH	58

3.	Pré-validation de la méthode et optimisation de la concentration d'INH	62
4.	Antibiogrammes	68
VI.	Conclusions et perspectives.....	69
1.	Préparation des échantillons pour la détermination des ARNs cibles	69
2.	Optimisation et pré-validation de l'analyse Luminex	70

Liste des figures

Figure 1. Aperçu des vaccins antituberculeux en cours de développement - Source de la figure: OMS, 2016.....	7
Figure 2. Aperçu des médicaments antituberculeux en cours de développement - Source de la figure: Lessem, 2016.....	11
Figure 3. Aperçu de mutations fréquentes générant une résistance à certains antituberculeux - Source de la figure: Nguyen et al., 2016	15
Figure 4. Réponses transcriptionnelles de souches <i>M. tuberculosis</i> suite à l'exposition à l'isoniazide (INH), à la streptomycine (SM) ou à la ciprofloxacine – Source de la figure : Barczak et al., 2016....	18
Figure 5. Schéma du procédé du «QuantGene Plex 2.0 »	19
Figure 6. Résultats disponibles au début du TFE.	20
Figure 7. Courbe de croissance de 041195 (A) et H37Rv (B) suite à l'ajout de 0.8 µg/ml de delamanid (DLM) ou de DMSO	34
Figure 8. Courbe de croissance de 041195 (A) et H37Rv (B) suite à l'ajout de 250 µg/ml de PZA ou d'eau (mQ)	34
Figure 9. Courbe de croissance de cultures de la souche H37Rv incubées avec trois différentes densités optiques à 600 nm de départ et sous différentes concentrations de delamanid.).....	36
Figure 10. Courbe de croissance d'une culture de H37Rv avec six concentrations de delamanid: 0, 1, 2, 3, 4 et 5 µg/ml.	37
Figure 11. Intensité fluorescente des ARNs séparés par migration obtenue par un Bioanalyzer.....	39
Figure 12. Intensité fluorescente des ARNs séparés par migration obtenue par un Bioanalyzer.....	41
Figure 13. Résultats d'une PCR CSB et BB.	43
Figure 14. Intensité fluorescente des ARNs séparés par migration obtenue par un bioanalyzer.	45
Figure 15. Résultats SPD (sans unité) de quatre souches (respectivement, de gauche à droite, (1) S16BD03137 (sensible à INH), (2) S16BD04256 (avec un bas niveau de résistance à INH), (3) S16BD03197 (avec un haut niveau de résistance à INH) et (4) S16BD04768 avec un bas niveau de résistance à INH) suite à l'essai, pour chacune des souches, de trois méthodes de lyse bactérienne....	48
Figure 16. Résultats SPD (sans unité) de trois souches sensibles suite à l'essai, pour chacune des souches, de trois méthodes de lyse bactérienne.....	52
Figure 17. Résultats SPD (sans unité) de quatre souches sensibles, S16BD03273 (A), S16BD03166 (B), S16BD03124 (C) et S16BD03137 (D), testées avec douze combinaisons de deux paramètres de croissance bactérienne.....	56
Figure 18. Résultats SPD (sans unité) de cinq souches sensibles (de gauche à droite sur l'abscisse, (1) S16BD03273, (2) S16BD03137, (3) S16BD03270, (4) S16BD03166 et (5) S16BD03124 et positives selon le BACTEC™ depuis 2 à 4 jours). Les cultures ont été séparées en deux pour que l'une des parties soit incubée 1 jour avec une dilution de cinq fois tandis que l'autre a directement été traitée après la dilution.	57
Figure 19. Résultats SPD (sans unité) de quatre souches sensibles et quatre souches résistantes à INH (de gauche à droite sur l'abscisse, (1) S16B03273, (2) S16B03270, (3) S16B03166 et (4) S16B03124 et (5) S16B01774, (6) S16B02068, (7) S16B03197 et (8) S16B01808) positives selon le BACTEC™ depuis 2 à 4 jours.....	58
Figure 20. Résultats SPD (sans unité) de quatre souches avec un bas niveau de résistance à INH et une souche qui en est sensible (de gauche à droite sur l'abscisse, (1) S16BD00924, (2) S16BD04256, (3) S16BD03288 et (4) S16BD02654 et (5) S16BD03137) positives selon le BACTEC™ depuis 2 à 4 jours.....	59
Figure 21. Résultats SPD (sans unité) de quatorze souches avec un bas niveau de résistance à INH (de gauche à droite sur l'abscisse, (1) S15BD10500, (2) S15BD08902, (3) S15BD05142, (4) S15BD05110, (5) S15BD09584, (6) S15BD09808, (7) S16BD00823, (8) S17BD00631, (9) S16BD06129, (10) S17BD01584, (11) S17BD00744, (12) S16BD08755, (13) S16BD07601 et (14) S16BD06161) positives selon le BACTEC™ depuis 2 à 4 jours.	60
Figure 22. Evolution du SPD moyen de quatorze souches à bas niveau de résistance à INH en fonction du temps d'incubation sous INH.....	61

Figure 23. Différence moyenne de la réponse transcriptionnelle liée à l'ajout de 0.4 µg/ml d'INH (barres plus foncées) ou de 0.1 µg/ml d'INH (barres plus claires) pour 27 souches sensibles à INH et 26 souches résistantes à INH.....	64
Figure 24. Résultats SPD (sans unité) de 73 souches.....	65
Figure 25. Boxplot des SPD de 27 souches sensibles à INH sous 0.1 µg/ml (S 0.1 µg/ml) ou 0.4 µg/ml (S 0.4 µg/ml) d'INH, 26 souches avec un haut niveau de résistance à INH sous 0.1 µg/ml (R 0.1 µg/ml) et sous 0.4 µg/ml (R 0.4 µg/ml) d'INH et des dix-huit souches avec un bas niveau de résistance à INH sous 0.1 µg/ml (IR 0.1 µg/ml) et 0.4 µg/ml (IR 0.4 µg/ml) d'INH.	66
Figure 26. Boxplot des SPD de 27 souches sensibles à INH sous 0.1 µg/ml (S 0.1 µg/ml) ou 0.4 µg/ml (S 0.4 µg/ml) d'INH, 26 souches avec un haut niveau de résistance à INH sous 0.1 µg/ml (R 0.1 µg/ml) et sous 0.4 µg/ml (R 0.4 µg/ml) d'INH et des dix-huit souches avec un bas niveau de résistance à INH sous 0.1 µg/ml (IR 0.1 µg/ml) et 0.4 µg/ml (IR 0.4 µg/ml) d'INH. Les SPD ont été calculés avec, comme valeurs de référence, les moyennes des log2FoldChange pour chaque gène des 27 souches sensibles et des 26 souches avec un haut niveau de résistance.	67

Liste des tableaux

Tableau 1. Liste des médicaments antituberculeux recommandés par le FARES (FARES asbl, 2010) 10	
Tableau 2. Souches manipulées pour les analyses Luminex : Optimisation	24
Tableau 3. Souches manipulées pour les analyses Luminex : Validation	24
Tableau 4. Préparation des antibiotiques pour les antibiogrammes	25
Tableau 5. Composition des mix PCR CSB, IS et BB	27
Tableau 6. Liste des primers des PCRs	27
Tableau 7. Programme de températures des PCRs.....	28
Tableau 8. Composition du Working Bead Mix	31
Tableau 9. Différence de DO _{600 nm} entre les cultures sous DLM et celles équivalentes sans l'antibiotique.	36
Tableau 10. Différence de DO _{600 nm} entre les cultures sous DLM et celles équivalentes sans l'antibiotique.	37
Tableau 11. Résultats obtenus par analyse Bioanalyzer d'échantillons traités avec le kit Direct-zol™ RNA MiniPrep. n.	39
Tableau 12. Résultats obtenus par analyse Bioanalyzer d'échantillons traités avec trois méthodes: le kit Direct-zol™ RNA MiniPrep, une précipitation à l'éthanol et une précipitation à l'isopropanol.....	41
Tableau 13. Résultats obtenus par analyse Bioanalyzer des échantillons pour l'analyse RNAseq avec PZA.	44
Tableau 14. Capacité en échantillons de trois techniques de lyse, le bead-beating, le shaking et le traitement thermique (à l'aide d'un four), ainsi que le traitement correspondant testé sur quatre souches et analysé par analyse Luminex.....	48
Tableau 15. MFI des neuf ARNs cibles et leur LOD de quatre souches lysées avec trois traitements différents.....	49
Tableau 16. Paramètres des traitements de lyse testés et analyses par versafluor et la concentration moyenne en ADN obtenue.	50
Tableau 17. Paramètres des traitements de lyse testés et analyses par versafluor et la concentration moyenne en ADN obtenue.	51
Tableau 18. MFI des neuf ARNs cibles et leur LOD de trois souches lysées avec trois traitements différents.....	52
Tableau 19. Paramètres des traitements de lyse testés et analyses par versafluor et la concentration moyenne en ADN obtenue.	53
Tableau 20. Paramètres des traitements de lyse testés et analyses par versafluor et la concentration moyenne en ADN obtenue.	54

I. Introduction

La tuberculose est une maladie infectieuse qui affecte généralement les poumons et qui est causée par une mycobactérie du complexe *Mycobacterium tuberculosis*. Cette infection est l'une des dix premières causes de mortalité dans le monde et représente un véritable fléau. En effet, l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) estime qu'un tiers de la population mondiale est infecté par ces mycobactéries et elle dénombreait, en 2015, le décès de 1.8 millions de personnes atteintes par cette maladie.

Bien que des traitements existent, le développement de résistance aux antituberculeux menace fortement le contrôle de cette infection. Pour faire face à cette maladie, l'OMS a publié en 2014 le document intitulé "the END TB strategy". L'objectif fixé est de réduire de 90 % l'incidence de la tuberculose et de 95% le nombre de décès causés par cette maladie pour 2035.

Dans cette optique, de plus en plus d'études ont pour but de caractériser les mécanismes de résistance aux antibiotiques et les mutations qui confèrent cette propriété. Les techniques de diagnostic des formes résistantes de la maladie basées sur la détection de ces mutations ont pour avantage d'être rapide en comparaison à l'antibiogramme, méthode conventionnelle pour les tests de sensibilité aux antituberculeux. Néanmoins, leur efficacité nécessite une connaissance approfondie des caractéristiques génomiques liées aux mécanismes de résistance. De nouvelles pistes de diagnostics des résistances aux antibiotiques doivent donc être examinées. L'objectif de ce travail consiste à développer l'une d'elles.

II. Revue bibliographique

1. Caractérisation de la tuberculose

1.1. Epidémiologie

Bien que la Belgique soit classée dans les pays dits “à faible incidence³” avec 8.8 cas déclarés par 100000 habitants⁴, la tuberculose est néanmoins un véritable fléau au niveau mondial avec, selon l’Organisation mondiale de la santé (OMS), un tiers de la population infecté par le bacille de Koch, responsable de cette maladie. En 2015, 10.4 millions de nouveaux cas ont été diagnostiqués et l’OMS dénombrait le décès de 1.8 millions de personnes atteintes par la maladie. Les pays enregistrant les prévalences les plus élevées sont l’Inde suivie de l’Indonésie, de la Chine, du Nigéria, du Pakistan et de l’Afrique du Sud, totalisant ensemble 60% des cas de tuberculose (OMS, 2016). Chaque année, le Fonds des affections respiratoires asbl (FARES) et la Vlaamse Vereniging voor Respiratoire Gezondheidszorg en Tuberculosebestrijding vzw (VRGT) font état de la situation épidémiologique de la tuberculose en Belgique et donnent une idée de l’étendue du problème. En 2015, 988 cas de tuberculose ont été enregistrés. Leur registre confirme que la tuberculose a tendance à se concentrer dans les grandes villes où l’on rencontre, en général, une proportion plus importante de populations à risque ou vivant dans des conditions socio-économiques plus précaires (FARES asbl, 2017). C’est, en effet, Bruxelles suivie de Liège et Anvers qui ont les incidences les plus élevées en Belgique, s’élevant respectivement à 25.9, 22.5 et 19.1 cas par 100000 habitants². De plus, le FARES fait également état des facteurs qui favorisent les risques d’infections tels que l’immunosuppression, le cancer, l’alcoolisme chronique, le tabagisme ou encore la malnutrition. Parmi les patients présentant une immunosuppression, ceux combinant la co-infection tuberculose-VIH (Virus de l’Immunodéficience Humaine) représentent une part importante de la problématique au niveau mondial car ces patients sont plus susceptibles de développer la maladie et sont également plus difficiles à traiter (FARES asbl, 2010, Lienhardt et al., 2016). En 2015, l’OMS dénombrait, sur 1.8 décès, le décès de 0.4 millions de patients porteurs de cette co-infection.

³ Seuil fixé à 10 cas par 100000 habitants selon l’Organisation mondiale de la santé

⁴ Chiffres donnés par le FARES (<http://www.fares.be/fr/tbc-la-tbc-en-belgique-et-dans-le-monde/>), organisme qui se consacre à la prévention d’affections respiratoires dont la lutte contre la tuberculose avec, pour pendant néerlandophone, le VRGT.

Ces dernières décennies, de nombreux progrès ont été réalisés concernant la prévention, le diagnostic et le traitement de la tuberculose, ce qui permet de faire baisser l'incidence de 1,5% en moyenne par an depuis 2000 (OMS, 2016). Cependant, malgré ce progrès, la tuberculose reste l'une des 10 premières causes de mortalité à l'échelle mondiale. Etant donné la situation, l'OMS a publié en 2014 le document intitulé "the END TB strategy" qui a pour objectif de décrire les actions nécessaires pour arriver à réduire l'incidence de la tuberculose et le nombre de décès causés par cette maladie de respectivement 90 et 95% pour 2035. Pour atteindre cet objectif, de nouveaux moyens doivent être implémentés en poursuivant l'amélioration des outils de diagnostic, traitement et prévention. En effet, une forte accélération de la baisse annuelle de l'incidence de la tuberculose au niveau mondial, d'une moyenne de 2% par an en 2015 à 10% par année d'ici 2025, est nécessaire pour atteindre l'objectif de l'OMS. Une meilleure compréhension et caractérisation de la bactérie, de sa pathogénicité, de son interaction avec l'hôte et de la progression de la maladie sont donc essentielles pour le développement de tels outils (Lienhardt et al., 2016).

En plus de la lenteur du déclin de la tuberculose, la résistance aux médicaments antituberculeux représente une préoccupation supplémentaire à ce problème de santé publique. En effet, en 2015, l'OMS a estimé que 480000 personnes ont développé une tuberculose multirésistante (MDR-TB)⁵ (OMS, 2016). La tuberculose multirésistante est également présente en Belgique avec en moyenne 15 nouveaux cas notifiés chaque année depuis 2000² (soit environ 2%) et 7% des cas de tuberculose en Belgique présentent une résistance à un seul antibiotique (FARES asbl, 2017).

⁵ Résistance de *Mycobacterium tuberculosis* à l'isoniazide et à la rifampicine

1.2. Caractérisation de *Mycobacterium tuberculosis*

Bien que la tuberculose sévisse depuis des milliers d'années, ce n'est qu'en 1882 que Robert Koch identifie le bacille responsable de cette maladie et qui prendra son nom (Lawn et al., 2011). Les espèces regroupées dans le complexe *Mycobacterium tuberculosis* sont caractérisées par une homologie génomique de 99,9%, des séquences d'ARNr 16S identiques et la capacité de provoquer la tuberculose chez l'homme (Issa et al, 2011). Les infections humaines les plus fréquentes sont cependant causées par les 3 espèces suivantes: *Mycobacterium tuberculosis* ou *hominis*, la plus fréquente en Belgique, *Mycobacterium bovis*, affectant généralement le bétail, et *Mycobacterium africanum*, plus fréquemment retrouvée en Afrique de l'Ouest. La souche de référence pour *M. tuberculosis* est H37Rv dont le génome a été entièrement séquencé en 1998 (Cole et al., 1998). Les bactéries adaptées à l'homme, *M. tuberculosis* et *M. africanum*, sont divisées en sept lignées phylogénétiques associées à des régions géographiques distinctes et présentant différentes virulences. En effet, les lignées les plus répandues et virulentes sont la lignée 2 ou Beijing et la 4, la lignée euro-américaine (Coscolla & Gagneux, 2014). L'étude de la lignée Beijing suscite à l'heure actuelle un intérêt particulier car elle est associée à la propagation des souches résistantes aux antibiotiques (Merker et al., 2015, Stucki et al., 2016).

M. tuberculosis a un temps de doublement de 15 à 20 h, ce qui est extrêmement lent comparé à d'autres bactéries. Cette caractéristique combinée à sa capacité à persister dans un stade de latence implique des traitements particulièrement longs (Lawn et al., 2011). Etant donné la richesse de leur paroi en lipides, les mycobactéries sont difficilement colorables par la coloration Gram mais peuvent être observées au microscope suite à une coloration spécifique, de Ziehl-Neelsen, dont le principe repose sur l'acido-alcool-résistance de ces bactéries. Leur résistance à l'acide mais également aux antibiotiques classiques est due aux acides mycoliques, composants majeurs de leur paroi (Lawn et al., 2011, Mathys, 2010).

Les bactéries du complexe *M. tuberculosis* sont des pathogènes intracellulaires facultatifs qui infectent les cellules phagocytaires de l'hôte et se retrouvent alors dans un environnement riche en composés oxydants. Pour faire face au stress oxydant, des catalases et peroxydases dont essentiellement KatG, une enzyme avec la double fonction catalase-peroxydase, protègent ces bactéries contre les dérivés toxiques de l'oxygène et jouent donc un rôle essentiel dans la virulence du bacille (Lawn et al., 2011, Unissa et al., 2016).

1.3. Transmission et infection

Il existe deux grandes formes d'infection tuberculeuse ; pulmonaire et extrapulmonaire représentant respectivement 56% et 30% des cas. 14% des patients présentent une combinaison de ces deux formes d'infection. Les cas de tuberculose pulmonaire sont ceux présentant généralement un risque de contagion car cette maladie se transmet principalement par inhalation d'aérosols porteurs du bacille (FARES asbl, 2010).

Lors d'une contamination des voies respiratoires par *Mycobacterium tuberculosis*, l'organisme parvient à éliminer le pathogène dans 30 à 50% des cas (FARES asbl, 2010). Dans le cas contraire, les bacilles sont phagocytés par les macrophages alvéolaires et parviennent à y survivre et s'y développer. C'est notamment le cas lors d'une défense immunitaire innée réduite, d'une infection par une charge bactérienne importante ou si la bactérie est fortement virulente. Les macrophages infectés vont ensuite éclater et libérer d'autres bacilles capables de coloniser à leur tour d'autres macrophages et d'ainsi développer un foyer infectieux qui provoquera la formation d'une lésion ou chancre d'inoculation. Cette étape est appelée la « primo-infection » et est suivie par une réponse immunitaire de l'hôte qui forme un granulome constitué des macrophages infectés et de cellules T. Dans le cas d'une infection tuberculeuse latente (ITL), le granulome se calcifie et emprisonne les bacilles. Ces patients ne sont pas contagieux et aucun symptôme ni lésion radiologique n'est généralement observé. Lorsqu'un individu est infecté, il est tout au long de sa vie susceptible de développer la forme active de la maladie. 10% des cas d'infection évoluent vers la tuberculose active (OMS, 2016); soit directement suite à la primo-infection, soit après plusieurs années suite à la réactivation d'une ITL. La tuberculose active est contagieuse et généralement symptomatique, provoquant à des degrés variables des lésions tissulaires liées à la réaction inflammatoire engendrée (Mathys, 2010, Pai et al., 2016).

D'un point de vue clinique, la maladie se manifeste par de la fièvre, des sueurs nocturnes, une perte de poids et d'autres symptômes en fonction des organes affectés (FARES asbl, 2010).

1.4. Diagnostic

Tuberculose latente

De manière générale, 2 principaux moyens de diagnostic sont couramment utilisés pour mettre en évidence une infection latente par un membre du complexe *M. tuberculosis*. Le plus connu et préconisé en Belgique est le test de Mantoux ou intradermoreaction (IDR) qui consiste à observer le développement éventuel d'une réaction immunitaire locale (au niveau de la face antérieure de l'avant-bras) suite à l'injection par voie intradermique de tuberculine (mélange de protéines tuberculeuses purifiées). Le second, le test IGRA (Interferon Gamma Release Assay), est un test immunologique *in vitro*, effectué sur le sang du patient et mesurant la production d'interferon γ après mise en contact des lymphocytes du sang avec des antigènes tuberculeux. Il faut cependant noter que la sensibilité de ces deux méthodes est inférieure à 80% et qu'aucune d'entre elles ne peut distinguer la forme active et latente de l'infection (FARES asbl, 2010). De plus, à l'heure actuelle, des études cherchent à définir des biomarqueurs spécifiques capables de prévoir la progression de l'infection vers la forme active de la tuberculose pour distinguer les individus à risque élevé et leur fournir un traitement adapté. Un tel diagnostic serait un outil important et ce, particulièrement dans les régions où les moyens sont limités (Frick, 2016).

Tuberculose active

L'état actif de l'infection est généralement mis en évidence par un examen radiologique du thorax pour la forme pulmonaire et par des analyses bactériologiques comprenant la détection du pathogène par examen microscopique des échantillons, mise en culture et tests moléculaires dont le Xpert MTB/RIF® qui sera développé au « 2.3. Techniques de détermination des résistances ». Après l'obtention d'une culture et identification de *M. tuberculosis*, un antibiogramme est réalisé afin de valider la sensibilité du bacille aux antibiotiques du traitement de première ligne (FARES asbl, 2010).

1.5. Traitements et vaccins

Vers le 18ème et 19ème siècle, cette maladie causa de nombreux décès en Belgique jusqu'à ce que des traitements médicamenteux additionnés à l'amélioration des conditions de vie ne fassent régresser l'incidence de cette maladie (FARES asbl, 2017). Parmi les progrès dans le contrôle de l'épidémie, Calmette et Guérin développèrent en 1924 un vaccin par l'injection de bacilles tuberculeux vivants mais de virulence atténuée, le Bacille de Calmette et Guérin (BCG), et en 1944, Waksman découvrit le premier antibiotique antituberculeux, la streptomycine, puis d'autres suivirent peu après même si leurs mécanismes d'action ne sont, à ce jour, pas complètement élucidés (Islam et al., 2016).

1.5.1. Vaccins

Malgré l'utilisation importante du BCG pendant de nombreuses années, son efficacité est actuellement controversée. Il a, en effet, été montré que son action est limitée ne protégeant que les enfants atteints des formes graves de tuberculose telles que les méningites (OMS, 2016). De plus, ce vaccin peut provoquer divers effets indésirables. La vaccination par le BCG n'est donc plus obligatoire en Belgique et est seulement recommandée dans des situations spécifiques (FARES asbl, 2010). Néanmoins, elle reste indispensable pour certains pays endémiques qui ont dès lors instauré des programmes de vaccination des enfants (OMS, 2016). Bien que ce vaccin se soit souvent montré efficace, la variabilité des résultats démontre l'importance de développer de nouveaux outils (Pai et al., 2016). À l'heure actuelle, l'OMS annonce que treize vaccins, repris dans la figure 1, sont en essais cliniques, dans le but soit de prévenir l'infection, soit d'éviter la réactivation d'une ITL, et que la majorité ont été conçus pour provoquer une immunité à médiation cellulaire (Frick, 2016).

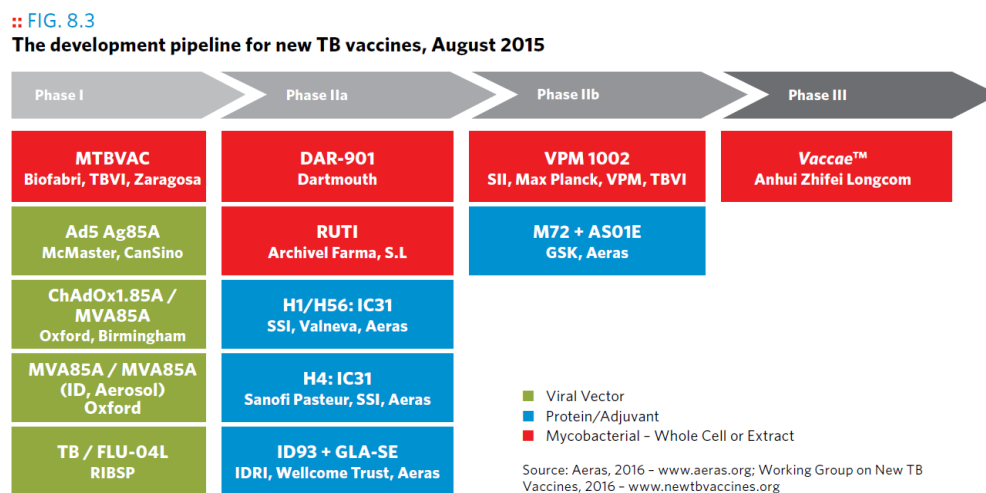


Figure 1. Aperçu des vaccins antituberculeux en cours de développement - Source de la figure: OMS, 2016.

1.5.2. Traitements

En cas d'absence de traitement, 50% des personnes atteintes de la maladie en succomberont, ce qui démontre l'intérêt de développer des thérapies efficaces (Pai et al., 2016). Comme expliqué précédemment, un antibiogramme de base est systématiquement réalisé quand la tuberculose active est diagnostiquée et permet d'adapter le traitement à la sensibilité de la souche en question. En cas d'absence de résistance aux médicaments antituberculeux de première ligne, un traitement standard de 6 mois est administré.

Le traitement standard actuel a été mis en place dans les années 80 et se compose en général d'une phase intensive de 2 mois comprenant 4 médicaments, l'isoniazide, la rifampicine, l'éthambutol et la pyrazinamide, suivie d'une phase de continuation de 4 mois avec 2 de ces médicaments, l'isoniazide et la rifampicine. Cette thérapie combinée permet, d'une part, d'éviter la sélection de mutants résistants à l'un de ces antibiotiques mais également de cibler l'ensemble des bactéries quel que soit leur état métabolique. Ce traitement se montre en général très efficace mais a pour inconvénient sa durée qui entraîne parfois un mauvais suivi. De plus, bien que cette thérapie soit généralement bien tolérée, ces médicaments peuvent entraîner divers effets indésirables (FARES asbl, 2010 et Ma et al., 2010).

L'antibiogramme de base évalue la sensibilité de la souche à ces quatre antibiotiques mais les résultats de l'antibiogramme pour la pyrazinamide ne correspondent pas toujours à l'efficacité *in vivo*. Ce résultat de laboratoire doit donc être interprété avec précaution. En cas de résistance à un ou plusieurs de ces antibiotiques, un antibiogramme élargi, testant la sensibilité de la souche aux antibiotiques de deuxième ligne, est réalisé. (FARES asbl 2010)

À l'heure actuelle, en Belgique, le suivi d'un traitement adéquat permet de soigner 84% des patients. Le taux de décès est de 7,4% mais peut être liés à d'autres pathologies et concernent principalement les personnes âgées. 0,2% d'échec du traitement ont été dénombrés en 2015 et les 8,2% restant représentent les cas de traitement interrompus (FARES asbl, 2017). Concernant la tuberculose au stade latent (primo-infection), un traitement prophylactique peut être proposé en cas d'intradermoréaction positive, particulièrement si le patient présente des facteurs favorisant les risques de développer la maladie. Ce traitement préventif consiste généralement en une monothérapie d'isoniazide pendant au moins 6 mois. Ce traitement n'est appliqué qu'après confirmation de l'absence d'une tuberculose active. En effet, si un patient malade est traité par monothérapie, le risque de sélectionner des mutants sera important (Mathys, 2010).

Antibiotiques de première ligne

1) L'isoniazide (INH)

L'INH, ou hydrazide d'acide isonicotinique, est utilisé comme antituberculeux depuis 1952 de par son activité bactéricide sélective et spécifique aux mycobactéries, dont principalement celles du complexe *M. tuberculosis*. L'INH est un promédicament qui entre dans la bactérie sous une forme inactive par diffusion passive et est ensuite activé par l'enzyme bactérienne KatG (cfr. 1.2. Caractérisation de *Mycobacterium tuberculosis*), codée par le gène *Rv1908c*, par oxydation. L'antituberculeux activé se fixe alors au NADH et forme un complexe dont la principale cible est la protéine InhA (codée par le gène *Rv1484*), une enoyl ACP⁶ réductase NADH-dépendante impliquée dans l'élongation des acides gras du système FAS⁷-II. En bloquant le site actif de la protéine, le complexe parvient à inhiber la synthèse de l'acide mycolique, composant majoritaire de la paroi mycobactérienne qui contribue à l'imperméabilité et à la résistance acide du bacille, entraînant l'accumulation d'acides gras et la mort de la bactérie (Cohen et al., 2014, Islam et al., 2016). De plus, l'activation de INH produit un ensemble de radicaux libres capables de perturber certains processus cellulaires et une série de cibles ont été proposées mais tous les mécanismes d'action n'ont pas encore été clairement identifiés (Unissa et al., 2016).

2) La rifampicine (RMP)

Découvert en 1966 (Nguyen, 2016), la rifampicine appartient à la classe des rifamycines avec, entre autres, la rifabutine. Ces antibiotiques partagent donc le même mode d'action qui consiste à bloquer l'initiation de la transcription en se fixant sur la sous-unité β de l'ARN polymérase (Islam et al., 2016).

3) La pyrazinamide (PZA)

La PZA, découverte en 1952, est, comme beaucoup d'antituberculeux, un promédicament et nécessite une activation enzymatique par une pyrazinamidase, enzyme mycobactérienne codée par le gène *pncA*, pour obtenir l'acide pyrazinoïque dont le mode d'action sur la bactérie est encore mal compris (Nguyen, 2016 et Islam et al., 2016).

4) Ethambutol (EMB)

Cet antibiotique date de 1961 (Nguyen, 2016) et, tout comme l'INH, cible la paroi mycobactérienne par son action sur l'arabinosyl transférase, une enzyme intervenant dans la formation d'un composant de la paroi mycobactérienne, l'arabinogalactane (Islam et al., 2016).

⁶ Acyl carrier protein

⁷ Fatty acid synthase : système d'enzymes qui réalise la biosynthèse des acides gras

Antibiotiques de seconde ligne

Une tuberculose multirésistante nécessite l'administration d'un traitement plus long, allant jusqu'à 2 ans, et constitué d'antibiotiques plus chers et plus toxiques dits « de deuxième ligne » (Pai, 2016, OMS, 2016). Dans son manuel pratique destiné au corps médical (FARES asbl, 2010), le FARES recommande l'utilisation de l'amikacine (AMK) et/ou d'une fluoroquinolone (FQ) selon la situation. Avec le prothioamide (PTA), ces médicaments sont les antibiotiques de deuxième ligne de premier choix en Belgique. L'ensemble des antibiotiques utilisés en Belgique sont repris dans le tableau 1 ci-dessous même si, pour certains, leur activité antituberculeuse n'est pas complètement démontrée (FARES asbl, 2010).

Tableau 1. Liste des médicaments antituberculeux recommandés par le FARES (FARES asbl, 2010)

Classe d'antibiotique	Nom	Année de découverte
Aminoglycosides	Amikacine (AMK)	1972 ¹
Polypeptide	Capréomycine (CAP)	1963 ¹
Fluoroquinolones	Moxifloxacin (MXF)	1996 ¹
	Lévofoxacin	1986 ¹
	Ofloxacin (OFX)	1982 ²
Rifamycines	Rifabutine (RIF)	1980 ³
Thioamides	Prothionamide (PTA)	1971 ⁴
	Ethionamide (ETH)	1956 ¹
Cyclosérine	Cyclosérine (CYC)	1952 ¹
Acide paraaminosalicylique	PAS	1946 ¹
Oxazolidinones	Linézolide (LIN)	1996 ⁵
Phénazines	Clofazimine (CFZ)	1956 ⁵
Néomacrolides	Clarithromycine	1984 ⁶
Beta-lactames	Amoxicilline + acide clavulanique	1964 ⁷

¹ Source : Nguyen et al., 2016

³ Source : Schraufnagel D. E., 1999

⁵ Source : Islam et al., 2016

² Source : Ma et al., 2010

⁴ Source : Gupta DK, 1977

⁶ Source : Kumazawa et Yagisawa, 2002

⁷ Source : Chast 1995

La rifabutine (RIF) appartient à la même classe que la RMP et peut la remplacer en cas de résistance non-croisée entre ces deux antibiotiques tandis que l'amikacine appartient à la même classe que la streptomycine, premier antituberculeux découvert (FARES asbl, 2010).

Antibiotiques en cours de développement

De nouvelles molécules ouvrent de nouvelles perspectives de traitement pour les cas de résistance aux antibiotiques actuels mais également en vue d'améliorer le traitement standard et d'en diminuer la durée. En effet, le traitement de la tuberculose MDR n'est pas suffisamment efficace avec moins de 10% des personnes malades traitées avec succès. Cinq nouveaux antituberculeux de quatre classes différentes, repris dans la figure 2 ci-dessous, sont en cours de développement et incluent la bedaquiline (TMC207) et la delamanid (DLM, OPC-67683), qui s'annoncent très efficaces (Frick, 2016 et Lessem, 2016), tous deux déjà avec une approbation de commercialisation conditionnelle dans certains pays. De plus, de nombreuses études sont axées sur les antituberculeux déjà développés en vue de tester la combinaison de médicaments la plus adéquate et optimiser leur consommation (Lessem, 2016).

Table 1. Drugs in Development for Tuberculosis

Drug	Class	Sponsor(s)	Phase
bedaquiline	diarylquinoline	Janssen (Johnson & Johnson), TB Alliance, NIAID, SAMRC, the Union, UNITAID, USAID	III
delamanid	nitroimidazole	Otsuka, NIAID, UNITAID	III
pretomanid	nitroimidazole	TB Alliance	III
sutezolid	oxazolidinone	Sequella, NIAID	Ila
Q203	imidazopyridine	Qurient, Infectex	I

NIAID: National Institute of Allergy and Infectious Diseases (United States)

SAMRC: South African Medical Research Council

The Union: International Union Against Tuberculosis and Lung Disease

USAID: The U.S. Agency for International Development

Figure 2. Aperçu des médicaments antituberculeux en cours de développement - Source de la figure: Lessem, 2016

2. Mécanisme de résistances

2.1. Acquisition de résistance et généralités

L'utilisation prolongée de mêmes médicaments a entraîné l'émergence de souches de plus en plus résistantes par pression sélective grâce à une accumulation de mutations (Nguyen, 2016). En effet, les antituberculeux fréquemment utilisés ont été développés il y a plusieurs dizaines d'années (OMS, 2016) mais très vite, dès 1948, des phénomènes de résistances ont été décrits (Pai et al., 2016). Les souches appelées MDR-TB (Multidrug resistant tuberculosis) sont des souches de *M. tuberculosis* présentant une résistance *in vitro* aux deux médicaments majeurs de première ligne, c'est-à-dire l'INH et la RMP. Si une souche MDR présente également une résistance à une quinolone, classe d'antibiotiques importants dans le traitement de la tuberculose, et l'un des médicaments injectables de deuxième ligne (tels que amikacine ou capréomycine), la souche sera définie comme XDR-TB (eXtensively drug resistant). Les souches dites totalement résistantes ou TDR-TB se réfèrent aux souches résistantes à l'ensemble des médicaments antituberculeux disponibles. Néanmoins, dans ces appellations, le degré de résistance n'est pas spécifié (Cohen et al, 2013). Les mécanismes de résistance aux antibiotiques développés par *M. tuberculosis*, et connus jusqu'à présent, passe par la sélection de mutants géniques (présentant une mutation dans un gène spécifique conférant la résistance à un antibiotique donné). Deux types de mécanismes principaux ont été décrits au travers de ces mutations : une modification de la cible de l'antibiotique (comme, par exemple, des mutations dans le gène *inhA* pour isoniazide et éthionamide, *embB* pour éthambutol) ou la modification d'une enzyme bactérienne nécessaire à la conversion d'un promédicament en un antituberculeux actif avec, par exemple, des mutations du gène *katG* pour l'isoniazide ou *pncA* pour la pyrazinamide (Pai et al., 2016). Un troisième type de mécanisme, moins fréquent, est également rencontré : Il s'agit de la surexpression de la cible de l'antibiotique *via* une mutation dans la région promotrice du gène de cette cible, comme décrit ci-dessous pour l'enzyme InhA dans le cas d'une résistance à l'isoniazide (cfr. 2.2. Description des mutations). Selon l'OMS, chaque année, 20% des personnes atteintes d'une tuberculose active présentent un phénomène de résistance à un ou plusieurs antituberculeux : 13,3% seraient infectés par une souche mono-résistante à l'isoniazide et 5,3% par une souche MDR-TB (OMS, 2016).

2.2. Description des mutations

Résistance aux antibiotiques de premières ligne

1) L'isoniazide (INH)

Les mécanismes de résistance à l'INH sont complexes car plusieurs gènes peuvent être impliqués. Des mutations au niveau du gène *katG* sont connues comme étant fréquemment impliquées dans la résistance des souches à INH. En effet, comme expliqué au point « 1.5.2. Traitements », cette enzyme permet l'activation de l'antibiotique et une mutation du gène et donc de l'enzyme KatG entraîne systématiquement un niveau de résistance élevé à cet antibiotique. L'étude génétique de souches résistantes à INH a montré des mutations ponctuelles au sein de ce gène, allant des acides aminés 1 à 735, et particulièrement la mutation Ser315Thr. Un autre gène impliqué dans la résistance à INH est *inhA*, dont l'enzyme encodée est active dans la synthèse d'acides gras à longue chaîne. Les principales mutations se situent au niveau de la région promotrices (majoritairement en C-15T), provoquant une surproduction de l'enzyme InhA et donc la capacité de résister à l'action de l'INH. Des mutations peuvent également être détectées au niveau de la séquence codante du gène *inhA* dont la mutation Ser94Ala qui provoque une diminution de l'affinité de la protéine pour le complexe INH-NADH. Le niveau de résistance que ce type de mutations engendre est faible et concerne également l'éthionamide, un antibiotique de deuxième ligne qui a la même cible (Unissa et al., 2016).

Certaines souches résistantes à l'INH présentent d'autres mutations connues au sein de gènes tels que *ndh* et *ahpC*, avec des mécanismes qui ne sont pas complètement élucidés, mais seuls celles impliquant les gènes *inhA* et *katG* confèrent une résistance à l'INH clairement reconnue (Islam et al., 2016). Les mécanismes de résistance à l'INH ne sont donc, à l'heure actuelle, toujours pas complètement définis. En effet, des mutations et délétions au niveau d'autres gènes pourraient être liées à une résistance des souches à l'isoniazide bien que ce lien ne soit pas encore établi (Unissa et al., 2016).

2) La rifampicine (RMP)

La résistance à la rifampicine peut, selon la mutation, être croisée avec celle des antibiotiques appartenant à la même classe d'antibiotiques, les rifamycines, et est liée aux mutations au niveau du gène *rpoB* qui code la sous-unité β de l'ARN polymérase. Ces mutations entraînent généralement des modifications de la structure primaire de la sous-unité β et diminuent la fixation et donc l'effet de l'antibiotique sur la transcription (Islam et al., 2016).

3) La pyrazinamide (PZA)

Les mutations associées à la résistance des souches à la PZA sont généralement situées au niveau du gène *pncA* (cfr. 1.5.2. Traitements) avec une grande variété de mutations possibles au sein de ce gène. Un autre gène associé à la résistance à la PZA est *rpsA* mais les études sont contradictoires à ce sujet (Islam et al., 2016). Il a également été observé que certaines souches résistantes à la PZA ne présentent aucune de ces mutations, ce qui suggère que d'autres gènes, non identifiés à ce jour, pourraient être impliqués dans un mécanisme de résistance à la PZA (Nguyen 2016). De plus, il est à noter qu'un résultat de résistance à la PZA observé *in vitro* n'est pas toujours transposable aux résultats *in vivo* (FARES asbl, 2010), ce qui complique les analyses de corrélation entre mutations géniques et résistance à la pyrazinamide.

4) Ethambutol (EMB)

La majorité des souches résistantes à EMB présentent des mutations au niveau du gène *embB* qui code l'enzyme cible de cet antibiotique mais des mutations ont également été reportées au niveau des gènes *embA* et *embC* appartenant au même opéron (Islam et al., 2016).

Résistance aux antibiotiques de secondes lignes

Tout comme pour les antibiotiques de première ligne, différents gènes ont été identifiés comme étant associés à des mécanismes de résistance bien que nombre d'entre eux ne soit pas complètement élucidés (Islam et al., 2016). La figure 3 ci-dessous donne un aperçu des mutations fréquemment observées générant une résistance à certains antituberculeux.

Table 2 Genes involved in acquired drug resistance in *M. tuberculosis*

Gene	Encoded protein	Protein function	Affected drug	Drug's mode of action
<i>katG</i>	Catalase–peroxidase	Prodrug activation	Isoniazid	Inhibiting mycolic acid biosynthesis and other metabolic processes
<i>inhA</i>	Enoyl ACP reductase	Drug target		
<i>ndh</i>	NADH dehydrogenase II	Modulation of NADH/NAD ratio		
<i>ahpC</i>	Alkyl hydroperoxidase	Oxidative stress resistance		
<i>rpoB</i>	β-Subunit of RNA polymerase	Drug target	Rifampicin	Inhibiting transcription
<i>pncA</i>	Pyrazinamidase	Prodrug activation	Pyrazinamide	Inhibiting trans-translation
<i>rspA</i>	S1 ribosomal protein	Drug target		
<i>embCAB</i>	Arabinosyltransferases	Drug target	Ethambutol	Inhibiting arabinogalactan synthesis
<i>embR</i>	<i>embCAB</i> transcription regulator	Regulation of <i>embCAB</i> expression		
<i>rpsL</i>	S12 ribosomal protein	Drug target	Streptomycin	Inhibiting protein synthesis
<i>rrs</i>	16S rRNA	Drug target		
<i>gidB</i>	16S rRNA methyltransferase	Modification of drug target		
<i>whiB7</i>	MDR transcription regulator	Regulation of drug resistance genes		
<i>rrs</i>	16S ribosomal RNA	Drug target	Amikacin/kanamycin	Inhibiting protein synthesis
<i>eis</i>	Aminoglycoside acetyltransferase	Drug inactivation		
<i>whiB7</i>	MDR transcription regulator	Regulation of <i>eis</i> expression		
<i>ethA</i>	Flavin monooxygenase	Prodrug activation	Ethionamide	Inhibiting mycolate biosynthesis
<i>ethR</i>	<i>ethA</i> transcription repressor	Regulation of <i>ethA</i> expression		
<i>inhA</i>	Enoyl ACP reductase	Drug target		
<i>ndh</i>	NADH dehydrogenase II	Modulation of NADH/NAD ratio		
<i>mshA</i>	Glycosyltransferase	Prodrug activation		
<i>gyrA</i>	DNA gyrase subunit A	Drug target	Fluoroquinolones	Inhibiting DNA gyrase
<i>gyrB</i>	DNA gyrase subunit B	Drug binding		
<i>alrA</i>	D-Alanine racemase	Drug target	D-Cycloserine	Inhibiting peptidoglycan synthesis
<i>cycA</i>	D-Alanine-D-alanine ligase	Drug target		
<i>ddl</i>	Amino acid transporter	Drug uptake		
<i>thyA</i>	Thymidylate synthase A	dTTP synthesis	p-Aminosalicylic acid (PAS)	Inhibiting folate biosynthesis
<i>dfrA</i>	Dihydrofolate reductase	Drug target		
<i>folC</i>	Dihydrofolate synthase	Prodrug activation		
<i>ribD</i>	Dihydrofolate reductase analog	Replacement of drug target activity		
<i>tlyA</i>	rRNA methyltransferase	Ribosome protection	Capreomycin	Inhibiting protein synthesis
<i>rrs</i>	16S ribosomal RNA	Drug target		

Figure 3. Aperçu de mutations fréquentes générant une résistance à certains antituberculeux - Source de la figure: Nguyen et al., 2016

Résistance aux nouveaux antituberculeux

Bien que les essais sur ces antibiotiques ne soient pas complètement aboutis, des mécanismes de résistance ont déjà pu être observés (Islam et al., 2016).

2.3. Techniques de détermination des résistances

Une infection par des bacilles résistants se développe à la suite d'un traitement inadéquat (résistance acquise) ou peut résulter aussi d'une contamination directe par des germes résistants (résistance primaire) (FARES asbl, 2010). Pour limiter le développement de résistances acquises, il est essentiel de rapidement déterminer le traitement adapté. La sensibilité d'une souche aux antibiotiques peut être déterminée de deux façons différentes: à l'aide de tests phénotypiques basés sur la capacité de la bactérie à se multiplier dans un milieu de culture en présence d'un antibiotique donné à une concentration critique (c'est-à-dire une concentration inhibant normalement la croissance des mycobactéries qui lui sont sensibles) ou *via* des tests génotypiques (Pai et al., 2016). Ces derniers permettent une détermination rapide de la sensibilité ou de la résistance de la souche à divers antibiotiques. Le test le plus largement utilisé et recommandé par l'OMS est le test rapide Xpert MTB/RIF® qui permet de détecter simultanément la présence de *Mycobacterium tuberculosis* dans un échantillon respiratoire et son éventuelle résistance à la rifampicine, *via* la détection de mutations dans le gène *rpoB*, en 2 heures. D'autres tests tels le test d'amplification isotherme induite par boucle (TB-LAMP⁸) et deux tests d'hybridation inverse sur bandelette (sondes moléculaires en ligne ou LPA⁹); l'un permettant la détection des mutations les plus fréquentes pour l'INH et la RMP et le second pour les antituberculeux de seconde ligne, ainsi que les technologies de séquençages sont également recommandés. Les tests moléculaires de détermination de la sensibilité d'une souche se fait par la détection des mutations impliquées dans les mécanismes de résistance. Comme mentionné plus haut, ceux-ci n'étant pas complètement élucidés à l'heure actuelle, ces tests ne permettent de détecter que les mutations de résistance les plus habituelles, et sont susceptibles d'être adaptés en fonction de nouvelles découvertes. Il faut également noter qu'une mutation génique n'induit pas systématiquement une résistance. Plusieurs études, basées sur le séquençage complet de génomes, sont en cours afin de déterminer de nouvelles mutations associées à des résistances et celles (phylogénétiques) non-impliquées dans ces processus de résistance. Le but étant par la suite de développer des tests rapides capables de détecter un maximum de mutations afin de remplacer/complémenter les antibiogrammes (Pai 2016). Les méthodes phénotypiques, basées sur des cultures, prennent, en effet, beaucoup plus de temps mais restent la référence pour les tests de sensibilité aux médicaments et sont, à l'heure actuelle, le seul moyen, avec les examens microscopiques, d'avoir un suivi de l'efficacité du traitement (OMS, 2016). Néanmoins, ces tests ne peuvent être réalisés que sous de strictes conditions de sécurité, nécessitant une infrastructure BSL3 (Biosafety level 3).

⁸ loop-mediated isothermal amplification

⁹ line probe assays

III. Description du projet TRIDACE

1. Concepts et objectif général

Comme développé au cours de la revue bibliographique, la tuberculose reste, malgré la baisse de son incidence, un problème de santé majeur et la résistance aux médicaments représente une menace croissante pour le contrôle de cette maladie. Il est donc essentiel de développer des outils performants pour le diagnostic des formes résistantes de cette infection afin d'éviter leur développement et propagation. Compte tenu que l'antibiogramme, méthode conventionnelle pour les tests de sensibilité aux antituberculeux, peut prendre des semaines, de plus en plus d'études ont pour but de caractériser les mécanismes de résistance aux antibiotiques. Ces études, essentiellement focalisées sur les origines génétiques des résistances, permettent de développer de nouvelles pistes de diagnostic. Bien que ces méthodes basées sur l'ADN soient très rapides, celles-ci nécessitent une connaissance approfondie des caractéristiques génomiques qui confèrent cette propriété. En effet, actuellement, certains mécanismes n'ont toujours pas été élucidés et de nouveaux mécanismes vont progressivement se développer (Islam 2016, Barczak et al., 2012).

L'objectif de ce travail de fin d'études (TFE) est donc **d'optimiser et de pré-valider une nouvelle méthode pour déterminer rapidement la résistance aux antibiotiques de souches de tuberculose**, en vue de donner le plus rapidement possible le traitement adéquat aux patients. Ce travail fait partie d'un plus important projet initié en mai 2015 et pris en charge par Dr. An Van den Bossche au sein du WIV-ISP (Scientific Institute of Public Health) qui héberge le Centre National de Référence pour le diagnostic de la tuberculose et des mycobactérioses humaines. Ce centre national est également le seul responsable de l'analyse de la résistance des souches aux antibiotiques de deuxième ligne disponibles.

Le principe du projet repose sur une publication intitulée « *RNA signatures allow rapid identification of pathogens and antibiotic susceptibilities* » (Barczak et al., 2012) dans laquelle les auteurs présentent une méthode pour diagnostiquer la présence et la sensibilité aux médicaments de divers maladies infectieuses. Cette méthode est basée sur la détection et la quantification d'ARNs signatures spécifiques. Ils y démontrent que le comportement transcriptionnel de bactéries sous une brève présence d'un antibiotique est spécifique et permet de déterminer leur sensibilité à ce médicament (Figure 4). La différence majeure avec les techniques de détection des résistances aux médicaments par analyse génomique est que la réponse transcriptionnelle induite par un antibiotique est uniquement mesurée chez les souches sensibles, c'est-à-dire uniquement chez les bactéries stressées par le médicament. Cela implique que cette méthode est totalement indépendante du mécanisme de résistance de la souche, contrairement aux méthodes basées

sur la détection d'ADNs spécifiques aux résistances. De plus, ce procédé a pour avantage la rapidité d'obtention des résultats, liée à la rapidité de la réponse transcriptionnelle, en comparaison avec les antibiogrammes, méthode conventionnelle.

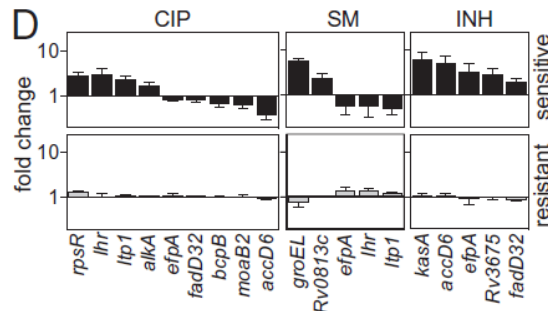


Figure 4. Réponses transcriptionnelles de souches *M. tuberculosis* suite à l'exposition à l'isoniazide (INH), à la streptomycine (SM) ou à la ciprofloxacine – Source de la figure : Barczak et al., 2012

L'objectif de ce projet nommé TRIDACE (Tuberculosis Identification and Drug Resistance by AbsenCe of Expression) est donc de développer une méthode rapide et fiable pour caractériser la sensibilité de souches de tuberculose à dix antibiotiques (INH, RMP, EMB, PZA, AMK, BDQ, CAP, MXF, LIN et DLM) grâce à une analyse de certains gènes dont la transcription est influencée par l'action d'un antibiotique donné en cas de sensibilité de la souche à ce médicament.

Cette analyse nécessite deux étapes. Dans la première, les bactéries sont tout d'abord exposées à un médicament spécifique de sorte qu'il induise une réponse transcriptionnelle. Après l'arrêt de la transcription et la lyse des cellules bactériennes, les ARNs spécifiques sont détectés et quantifiés à l'aide d'un MagPix™ (Luminex Corporation, Texas, USA). Sa technologie xMAP permet une multianalyse (allant jusqu'à 50 cibles en un cycle d'analyse) à l'aide de microsphères magnétiques comportant une combinaison unique de deux colorants fluorescents. Le kit « QuantiGene Plex assay » ou QGP (Thermo Fisher, Massachusetts, USA) couple ces microsphères aux ARNs cibles par l'intermédiaire de sondes spécifiques à ceux-ci (Figure 5).

Dans la deuxième étape de cette analyse, un arbre amplificateur est construit pour augmenter le signal et le colorant fluorescent SAPE s'y lie par l'action de la streptavidine-biotine. Après la détection du code unique d'une microsphère (chaque code correspondant à l'un des ARNs cibles), le MagPix™ mesure le signal fluorescent du colorant SAPE qui correspond à l'abondance de l'ARN en question dans l'échantillon. Cette méthode a pour avantage qu'elle nécessite ni conversion en ADNc pour amplifier le signal, ni purification de l'ARN. En effet, la détection peut être réalisée directement à partir des lysats bruts des cellules bactériennes

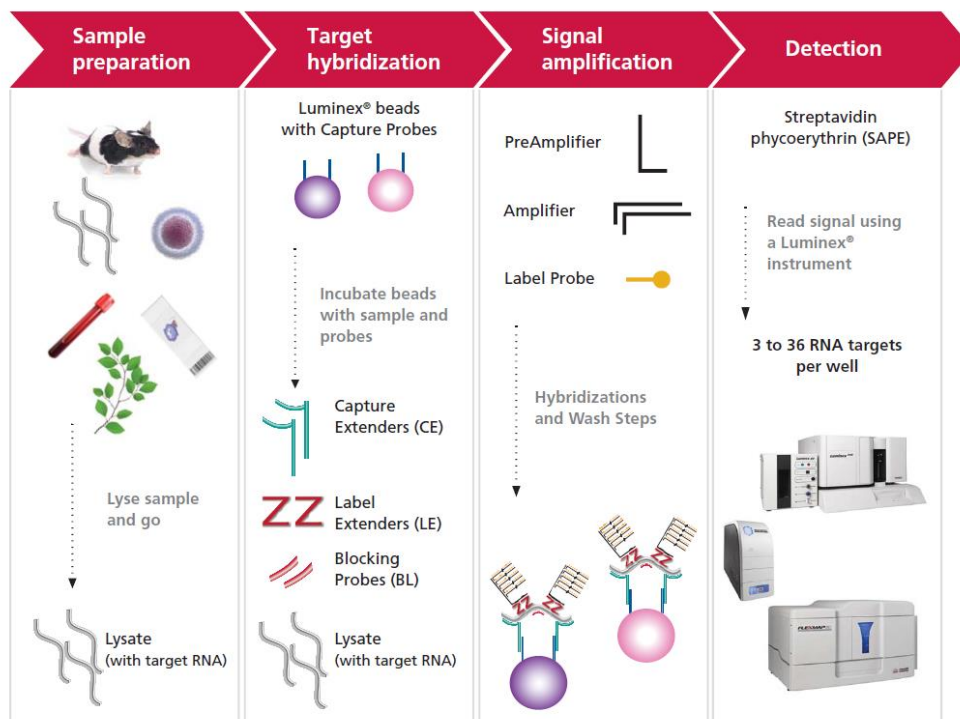


Figure 5. Schéma du procédé du «Quantigene Plex 2.0». Après la lyse des échantillons, trois sondes hybrident et couvrent des séquences contiguës de chaque ARN cible. Etant donné que le dsDNA n'est pas accessible aux sondes, aucune étape spécifique de purification de l'ARN n'est requise. L'arbre d'amplification du signal est ensuite construit par des hybridations consécutives avec des sondes biotinylées, apportant une amplification du signal de, en moyenne, 2,400 fois par ARN. Le signal est détecté grâce à l'ajout d'un substrat SAPE et à l'aide d'un instrument Luminex pour obtenir la médiane de l'intensité fluorescente (Median fluorescence intensity ou MFI).

2. Essais préalables

Pour mettre en place cette méthode, il faut donc tout d'abord caractériser et sélectionner les ARNs exprimés différemment en présence de l'antibiotique en question (sur- ou sous-exprimés) et les modéliser. Cette étape est réalisée à l'aide de l'analyse d'un séquençage des ARNs globaux extraits d'une culture bactérienne suite à l'ajout de l'antibiotique. Les paramètres de la méthode de diagnostic (à l'aide du MagPix™) peuvent ensuite être définis. L'élaboration de la méthode est en cours avec, comme antibiotique de référence, l'INH pour lequel les paramètres d'expression des ARNs cibles au début du TFE sont repris dans l'encadré 1.

La culture bactérienne est incubée à 37°C jusqu'à une $DO_{600\text{ nm}}$ de 0.3 puis séparée en deux parties. Dans l'une des parties, de l'eau est ajoutée et, dans l'autre, les bactéries sont soumises à la présence de 0.4 µg/ml d'INH. Ces cultures sont ensuite incubées 6 h puis tuées. L'ARN est alors récupéré suite à une lyse des cellules bactériennes par bead-beating et aux différentes étapes d'un QGP kit (Figure 5) permettant une quantification des ARNs cibles à l'aide du MagPix™.

Encadré 1. Paramètres de la méthode TRIDACE en février 2017

Ces conditions ont permis d'obtenir la réponse transcriptionnelle reprise dans la figure 6A qui montre la différence d'expression en présence et en absence d'INH (exprimée en \log_2 FoldChange – cfr. « 3. Analyse Luminex » de la partie « Matériels et méthodes ») pour une collection de seize souches. Six gènes réactifs à la présence d'INH ont été sélectionnés pour détecter la sensibilité des souches à cet antibiotique (« Responsive » dans la figure 6A) et trois gènes, non-réactifs lors de l'ajout d'INH ont été choisis pour normaliser les données (et correspondent aux « non-responsive genes ou NR » dans la figure). Dans les souches sensibles à INH, les gènes réactifs à l'ajout d'INH sont clairement sous ou sur-régulés en présence de l'antibiotique, tandis que les souches résistantes ne montrent aucune différence dans l'expression de ces gènes sous les mêmes conditions. Les valeurs de l'ensemble des gènes réactifs, après normalisation par ceux non-réactifs, sont combinées en une valeur « SPD ou squared projected distance » par souche (cfr. « 3. Analyse Luminex » de la partie « Matériels et méthodes »). Dans la figure 6B, il est démontré que cette valeur SPD permet de séparer les souches de la collection utilisée en deux groupes, l'un reprenant les souches sensibles à INH et l'autre celles résistantes, avec respectivement un SPD autour de 0 et 1.

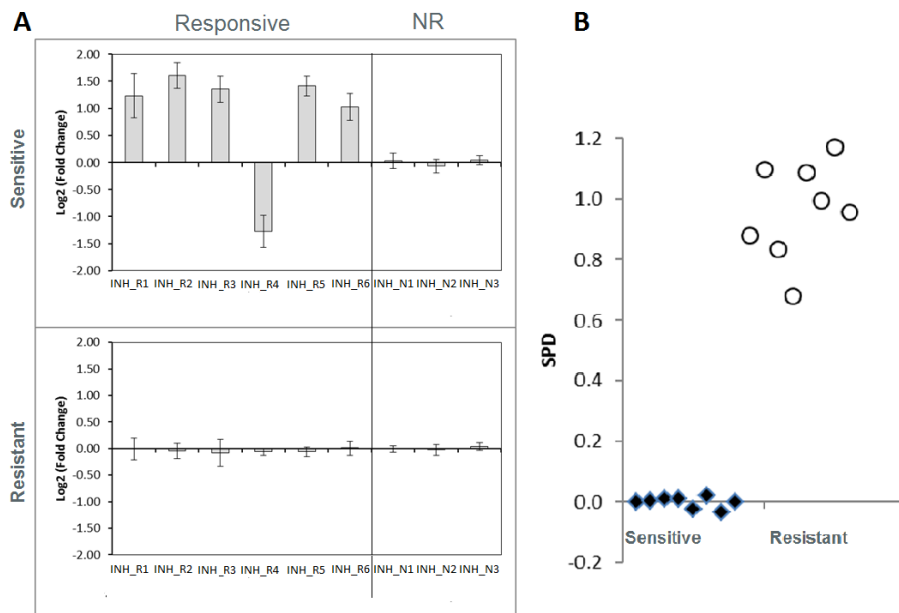


Figure 6. Résultats disponibles au début du TFE. (A) La différence de réponse transcriptionnelle (\log_2 Fold Change) de chaque gène cible (noté INH_R1 à INH_R6 pour les six gènes réactifs à la présence d'INH et INH_N1 à INH_N3 pour les 3 gènes choisis dont l'expression ne change pas en présence d'INH) entre avant et après l'ajout d'INH pour des souches sensibles (haut de la figure) et résistantes (bas de la figure) à INH. (B) Les SPDs correspondants aux seize souches (huit sensibles et huit résistantes à INH).

Six gènes cibles ont donc été sélectionnés sur base de leur différence de réponse transcriptionnelle lors de l'ajout d'INH ou non. Une partie de ces gènes fait partie du système FAS II, cible de l'antibiotique INH (cfr. « 1.5.2. Traitements » de « II. Revue bibliographique ») tandis que d'autre n'ont pas de lien établi avec le mécanisme de l'isoniazide (Wilson et al, 1999). Trois gènes dont la transcription n'évolue pas en présence de l'antibiotique ont également été choisis en vue de normaliser les résultats obtenus.

3. Objectifs spécifiques

Un premier objectif de ce TFE est d'approfondir l'optimisation de la méthode de référence avec INH. Différents paramètres doivent donc être testés :

- le temps de croissance bactérienne avant l'analyse
- le temps d'incubation suite à l'ajout de l'antibiotique
- la concentration de l'antibiotique au sein de la culture
- la méthode de lyse

Par la suite, l'analyse de « référence » optimisée doit être validée en testant les paramètres définis sur une collection de souches.

De plus, bien que la méthode soit initialement développée avec l'INH, des essais peuvent être réalisés en parallèle pour la préparation d'échantillons destinés à un séquençage d'ARNs en vue de définir les gènes cibles pour d'autres classes d'antibiotiques. Dans ce TFE, les échantillons seront préparés pour les analyses RNAseq de deux antibiotiques : PZA et delamanid.

Finalement, des antibiogrammes doivent être réalisés en vue de caractériser les souches afin de tester la méthode et de comparer ses résultats avec ceux de l'antibiogramme, méthode conventionnelle pour le diagnostic de résistance.

IV. Matériels et méthodes

1. Cultures et Milieux

1.1. Milieux

Les cultures ont été réalisées soit dans le BACTEC™ MGIT™ 960 Mycobacterial Detection (BD, Becton Dickinson, Sparks, USA) soit dans un incubateur à 37°C. Dans le premier cas, les souches ont été inoculées dans un tube spécifique à la croissance des mycobactéries (BBL™ MGIT™ Mycobacteria Growth Indicator Tube, BD), dit tube MGIT™ ci-dessous. Ces tubes peuvent être enrichis de deux façons différentes selon leur finalité: avec 800 µl de BBL™ MGIT™ PANTA™ (BD) qui permet d'inhiber la croissance des contaminants et de favoriser la croissance des mycobactéries pour obtenir une préculture ou avec 800 µl de supplément BBL™ MGIT™ OADC¹⁰ (BD) pour l'inoculation d'une seconde culture. Ensuite, 500 µl de culture bactérienne sont ajoutés provenant soit d'un tube MGIT™ positif, soit d'un stock du congélateur -80°C avec 25 % de glycérol (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US) ou de bactéries prélevées d'un milieu solide. Après ensemencement et homogénéisation de la nouvelle culture, le tube MGIT™ est étiqueté et inséré dans le BACTEC™ MGIT™ 960 Mycobacterial Detection (dit BACTEC™ ci-dessous) qui assure une incubation à 37°C et un enregistrement de la croissance bactérienne chaque heure par le programme EpiCenter™ microbiology data management system (BD). Cette détection de croissance est possible grâce à la mesure d'un indicateur fluorescent dans le tube qui s'exprime lorsque la pression en oxygène chute, c'est-à-dire lorsque des bactéries en croissance le consomment. Les mesures sont exprimées en unités de croissance (GU) au cours du temps et un tube est défini positif lorsque le GU atteint 75. Pour les antibiogrammes de PZA, des tubes MGIT™ spécifiques avec un pH plus acide (BACTEC™ MGIT™ 960 PZA Susceptibility Test medium, BD) sont utilisés et enrichis avec 800 µl d'un supplément spécifique (cfr. 1.3. Antibiogramme).

¹⁰ OADC pour « Oleic Albumin Dextrose Catalase » qui sont les composants de ce supplément pour les milieux de culture

Comme mentionné plus haut, les cultures peuvent aussi être réalisées hors BACTEC™. Dans ce cas, les cultures mises à l'incubateur sont préparées par inoculation de milieu liquide Middlebrook 7H9 (0.47 % (w/v) de Difco™ Middlebrook 7H9 Broth (BD), 0.2 % de glycérol enrichi avec 10 % d'OADC (0.85% (w/v) de NaCl (Merck Millipore, Billerica, MA, US), 5 % (w/v) de BSA (Bovine Serum Albumin Fraction V, Roche, Bâle, Suisse), 2 % (w/v) de dextrose (D(+)-Glucose-Monohydrate, Merck Millipore), 0.002 % (w/v) de catalase (from bovine liver, Sigma Aldrich) et 0.03 % (v/v) d'acide oléique (Merck Millipore)). Le développement bactérien est contrôlé par mesures régulières de la densité optique à 600nm (DO_{600nm}) à l'aide d'un WPA CO8000 Cell Density Meter (Biochrom, Cambridge, UK) et de cuvettes semi-micro de Greiner Bio-one (Vilvoorde, Belgium). Dans le cadre du séquençage de l'ARN (RNA sequencing ou RNAseq) extrait à partir d'une culture bactérienne en présence de PZA (cfr. 2.2. Extraction d'ARN et purification), la culture bactérienne est réalisée dans ce même milieu acidifié par ajout de KH₂PO₄ 1M jusqu'à l'obtention d'un pH de 5.9.

1.2. Choix des souches

Le RNA sequencing pour l'étude de la résistance des souches de *M. tuberculosis* à l'INH (ARN extrait à partir d'une culture bactérienne en présence de INH) a été réalisé antérieurement par le laboratoire de Deborah Hung du Harvard Medical School/Broad Institute (Massachusetts) avec la souche de référence de *M.tuberculosis* : H37Rv. Cette même souche a été utilisée pour les essais de lyse cellulaire (cfr. 1.4 Inactivation des cultures et lyse cellulaire). Concernant les RNAseq pour les antibiotiques delamanid et PZA (ARN extrait à partir de cultures bactériennes en présence de respectivement delamanid et PZA: cfr. 2.2 Extraction d'ARN et purification), une souche a été sélectionnée en plus de H37Rv à partir de la collection de l'Institut de Médecine Tropicale d'Anvers : La souche pan-sensible 041195 de la lignée Beijing, provenant d'un patient de Corée du Sud en 2004.

Pour les analyses avec le MagPix™ (appelées par après « analyses Luminex ») différentes souches provenant de la collection du WIV-ISP ont été manipulées au cours de deux phases : quinze souches lors d'essais de différents paramètres, puis 73 souches en vue de valider les paramètres optimisés (Tableau 2 et 3). Les souches dites « sensible à INH », « avec un bas niveau de résistance à INH » et « avec un haut niveau de résistance à INH » ou « résistantes à INH » ont été caractérisées antérieurement comme telles par antibiogramme, la méthode standard (cfr. 1.3 Antibiogrammes). Certaines ont également été caractérisées par une détection de mutations impliquées dans le mécanisme de résistance à INH (Tableau 3).

Tableau 2. Souches manipulées pour les analyses Luminex : Optimisation

Phase d'optimisation					
Souches sensibles à INH		Souches avec un bas niveau de résistance à INH (0.1µg/ml)		Souches avec un haut niveau de résistance à INH (0.4 µg/ml)	
S16BD03137	S16BD03124	S16BD04256	S16BD03288	S16BD03197	S16BD01808
S16BD03270	S16BD03273	S16BD04768	S16BD02654	S16BD01774	S16BD02670
S16BD03166		S16BD00924		S16BD02068	

Tableau 3. Souches manipulées pour les analyses Luminex : Validation

Phase de validation					
Souches sensibles à INH		Souches avec un bas niveau de résistance à INH (0.1µg/ml)		Souches avec un haut niveau de résistance à INH (0.4 µg/ml)	
S16BD02813	S16BD00531	11MY0210 ¹	S17BD00631 ¹	07MY0066 ³	14MY2137 ²
S16BD05456	S16BD00835	13MY0376 ¹	S17BD00744	07MY1004 ²	14MY2188 ³
S16BD05457	S16BD01396	13MY1473 ¹	S17BD01584 ¹	07MY1281 ³	15MY0479 ³
S16BD05915	S16BD01413	13MY2475 ¹	S16BD06129 ¹	08MY0057 ³	S16BD03198 ¹
S16BD06448	S16BD01475	S15BD05110 ¹		08MY0593 ²	S17BD00461 ³
S16BD08108	S16BD02310	S15BD05142		08MY0891 ²	S17BD00812 ³
S17BD00453	S16BD02667	S15BD08902 ¹		08MY1602 ²	S15BD10623 ³
S17BD00456	S16BD02700	S15BD09584 ¹		09MY0391 ³	S16BD04867
S17BD00530	S16BD03143	S15BD09808 ¹		10MY0981 ²	S16BD00479 ²
S17BD01179	S16BD04931	S15BD10500 ¹		13MY0292 ³	S16BD04731 ²
S16BD05505	S16BD05259	S16BD00823 ¹		13MY0498 ³	S16BD00329 ³
S15BD05003	S16BD02650	S16BD06161		14MY0227	S16BD04395 ³
S15BD05282	S17BD00811	S16BD07601 ¹		14MY0792 ³	S15BD09542 ³
S15BD05898		S16BD08755 ¹		14MY1571 ³	S16BD01391 ³

¹Mutation au niveau de *inhA* détectée

²Mutations au niveau de *inhA* et *katG* détectées

³Mutation au niveau de *katG* détectée

1.3. Antibiogramme

Les antibiogrammes de l'ensemble des antibiotiques repris dans le tableau 4 excepté PZA sont réalisés en tubes MGIT™ enrichis avec 800 µl de supplément du BACTEC™ MGIT™ 960 SIRE Kit (BD), BBL™ MGIT™ OADC. Pour ceux de PZA, 800 µl du supplément du BACTEC™ MGIT™ 960 PZA Kit (BD) sont ajoutés dans des tubes MGIT™ spécifiques (cfr. 1.1. Milieux). Les antibiotiques de première ligne proviennent également de leur kit respectif. Après réhydratation de ceux-ci pour obtenir les solutions stocks (ISP-WIV, SOP 12/MY/36/F), 100 µl sont ajoutés dans les tubes MGIT™ correspondants, de manière à obtenir dans les tubes de culture les concentrations critiques recommandées spécifiques à chaque antibiotique, définies dans le tableau 4. Il est en de même pour les antibiotiques de seconde ligne (tableau 4) dont les solutions stock ont été préparées selon la SOP 12/MY/27/F (ISP-WIV). Pour tester la sensibilité d'une souche à une concentration d'INH supérieure (0.4µg/ml), l'antibiotique utilisé provient

du BACTECT™ MGIT™ 960 INH 0.4 Kit (BD) dont la concentration de la solution stock est de 33.2 µg/ml après réhydratation.

Tableau 4. Préparation des antibiotiques pour les antibiogrammes

Antibiotiques	Solvant/Diluant	Concentration de la solution stock	Concentration finale/critique
Antibiotiques de première ligne			
INH ¹	Eau	8.3µg/ml	0.1µg/ml
RMP ¹	Eau	83µg/ml	1.0µg/ml
EMB ¹	Eau	415µg/ml	5.0µg/ml
PZA ²	Eau	8000µg/ml	100µg/ml
Antibiotiques de seconde ligne			
AMK (Amikacin hydrate) ³	Eau	84µg/ml	1.0µg/ml
BDQ (Bedaquiline fumarate) ⁴	DMSO	84µg/ml	1.0µg/ml
CAP (Capreomycin sulfate from Streptomyces capreolus) ³	Eau	210 µg/ml	2.5µg/ml
CFZ (clofazimine) ³	DMSO/Eau	84 µg/ml	1.0µg/ml
MXF (Moxifloxacin hydrochloride) ³	NaOH 0.1N/Eau	21 µg/ml	2.0µg/ml
OFX (ofloxacin) ³	NaOH 0.1N/Eau	168 µg/ml	0.25µg/ml
RIF (Rifabutine) ³	DMSO/Eau	8.4 µg/ml	1.0µg/ml
ETH (Ethionamide) ³	DMSO/Eau	1 mg/ml	5.0µg/ml
PAS (Sodium 4-aminosalicylate dihydrate) ³	Eau	336 µg/ml	4.0µg/ml
LIN (Linezolid) ³	Eau	84 µg/ml	1.0µg/ml

¹ Becton Dickinson (960 SIRE kit)

² Becton Dickinson (960 PZA kit)

³ Sigma Aldrich

⁴ JANSSEN, Beerse, Belgium

Par la suite, 500 µl de culture d'un tube MGIT™ positif (préculture) sont ajoutés dans chaque tube dédié à la réalisation de l'antibiogramme. Un tube de contrôle, sans antibiotique, est également inoculé mais avec 500 µl de la préculture diluée 100 fois dans de l'eau physiologique (0.75 % (w/v) de NaCl (Merck Millipore) selon la SOP12/MY/39/F de l'ISP-WIV) ou 10 fois dans le cas d'un antibiogramme de PZA. Une souche est déterminée comme résistante à un antibiotique si la culture dans le tube correspondant atteint un GU de 100 avant que le tube contrôle n'atteigne un GU de 400. Si la culture atteint un GU de 100 dans les 7 jours après que le contrôle arrive à un GU de 400, la souche est dite à résistance intermédiaire à l'antibiotique en question. Dans tout autre cas, elle est définie comme sensible à l'antibiotique.

1.4. Inactivation des cultures et lyse bactérienne

Dans le cadre des préparations pour les analyses Luminex ou leur optimisation, l'inactivation des mycobactéries se fait en prélevant 1 ml de culture et en le centrifugeant (5 min, 18000 g). Le culot de bactéries obtenu est alors resuspendu dans 200 µl d'éthanol à 70 % (EMSURE®, Merck Millipore,) et incubé pendant 10 minutes à température ambiante. Après avoir été à nouveau centrifugé et collecté, le culot est conservé à -80°C. Après l'inactivation de la culture bactérienne, une étape de lyse cellulaire du culot, resuspendu dans 200 µl de lysis mixture (Quantigene sample processing kit d'Affymetrix, Californie, USA), est réalisé à l'aide de l'une des cinq techniques différentes définies ci-dessous:

- 1) Trois traitements successifs de 1 minute sous beads-beating à l'aide d'un Mini-Beadbeater-16 (BIOSPEC, Bartlesville, US) et d'une spatule de billes de 0.5 mm en silice et zircone (BIOSPEC), avec 1 minute sous glace entre chaque minute de beating.
- 2) Un traitement thermique à 95°C dans un four (Heraeus instruments, Hanau, Allemagne) pendant 5, 10, 15 ou 30 minutes.
- 3) Un shaking avec le *Compact Digital MicroPlate Shaker* (Thermo Scientific, Massachusetts, USA) pendant 1h30 à 1000, 1200 ou 1400 rpm ou 1h à 1200 rpm avec une spatule de billes de 0.5 mm en silice et zircone.
- 4) Un traitement avec le M220 sonicateur (Covaris, Massachusetts, USA) pendant 1 ou 2 minutes à 18°C à 40 W avec un facteur d'utilisation de 50% et 200 cycles par bursts selon le protocole du truXTRAC™ MALDI-TOF Mycobacteria Kit (Covaris) à l'aide de microTUBE Acoustical cuvettes (Covaris).
- 5) Un traitement à l'aide d'un tissue lyser (TissueLyser II, Qiagen, Hilden, Allemagne) à 30 Hz avec 3 types de billes (une spatule de billes de 0.5 mm en silice et zircone ou dans des Pathogen Lysis Tube L de Qiagen ou des PowerBead Tubes, Glass 0.5 mm, également de chez Qiagen), pendant 1, 2 ou 3 fois 5 minutes.

Les produits de la lyse sont ensuite récupérés par centrifugation (5 min, 18000 g) et collecte du surnageant.

Pour les RNAseq, l'inactivation est réalisée par l'action de 900 µl de TRIzol Reagent (Ambion®, Thermo Fisher Scientific) qui resuspendent la culture. L'échantillon est alors incubé pendant 5 minutes à température ambiante avant d'être conservé à -80°C. Puis, cinq traitements successifs de beads-beating de 1 minute avec 0.4 ml de billes de 0.5 mm en silice et zircone, avec 1 minute sous glace entre chaque traitement, permettent de lyser les bactéries.

2. Manipulation d'ADNs et ARNs

2.1. PCR et électrophorèse

Trois types de PCR (Polymerase Chain Reaction) ont été réalisées: CSB et IS, spécifiques au complexe *M. tuberculosis*, et BB, spécifique au genre *Mycobacterium*, et dont la composition des mix est reprise ci-dessous (Tableau 5). Les mix contiennent également 5 µl de chacun des primers spécifiques à la PCR correspondante.

Tableau 5. Composition des mix PCR CSB, IS et BB

	PCR :	CSB	IS	BB
	Région amplifiée:	CSB	IS6110	Ag85A
	Taille du fragment:	168 pb pour <i>M. bovis</i> et 337 pb pour les autres	559 pb	162 pb
Réactifs		Pour 20µl (un tube):		
1) PCR buffer x10 ¹		2.5µl	2.5µl	2.5µl
2) MgCl ₂ 25mM ¹		0µl	0.5µl	0µl
3) H ₂ O		11.875µl	10.875 µl	11.375µl
4) dNTPs U 1.25mM ²		4µl	5µl	5µl
5) HotStarTaq DNA Polymerase 5 u/µl ¹		0.125µl	0.125µl	0.125µl

¹ Qiagen

² Thermo Scientific

Pour CSB, trois primers sont à ajouter (Tableau 6): CSB1 (commun au complexe de *M. tuberculosis*), CSB2 (chez *M. bovis* ou *M. BCG*) et CSB3 (commun au complexe de *M. tuberculosis* excepté les souches bovines). La PCR IS compte deux amorces (IS1A et IS2A) tout comme la PCR BB (BB1 et BB3). Tous ont une concentration de 100 pmol/µl et proviennent de chez Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgium.

Tableau 6. Liste des primers des PCRs

PCR :	Amorces	Séquences des amorces (5'→ 3')
CSB	CSB1	TTCCGAATCCCTTGTGA
	CSB2	GGAGAGCGCCGTTGTA
	CSB3	ATGTTCTGCTGAAATCGTTGG
IS	IS1A	AATTGCGAAGGGCGAACGCG
	IS2A	GTGACAAAGGCCACGTAGGCCGAACC
BB	BB1	ATCAACACCCGCGTTCGAG
	BB3	CGGCAGCTCGCTGGTCAGGA

Finalement, 5 µl d'échantillon sont ajoutés dans les 20 µl de mix. En vue de réaliser un contrôle positif et négatif, respectivement 5 µl d'une culture de H37Rv inactivée (27293 de la collection ATCC, Virginie, USA) par la chaleur et 5 µl d'eau sont également ajoutés dans 20 µl de mix. Les amplifications se font

ensuite dans un Thermal cycler (Bio-Rad, Californie, USA). Les conditions d'amplification sont reprises dans le tableau 7 et sont identiques pour les PCRs BB et IS.

Tableau 7. Programme de températures des PCRs

		PCR BB et IS		PCR CSB	
		T (°C)	temps	T (°C)	temps
Dénaturation initiale	1	95	15 min	95	10 min
Dénaturation	40x	94	30 sec	94	1 min
Hybridation des amorces		60	2 min	52	1.5 min
Elongation		72	2 min	72	1 min
Elongation finale	1	72	10 min	72	10 min
Stockage	∞	4°C	-	4	-

2 µl de bleu de bromophénol (10 % (v/v) de Tris-EDTA [100-10] mM de pH 8 (Merck Millipore) et 66,6 % (v/v) glycérol et une pointe de spatule de bleu de bromophénol (Merck Millipore), SOP12/MY/15/F de l'ISP-WIV) sont ajoutés à 10 µl de produits d'amplification pour permettre la visualisation de la migration par électrophorèse en gel d'agarose contenant du SYBR® Safe (10 µl de SYBR® Safe, (Invitrogen) ajouté à 1.6 g d'agarose (Invitrogen) dans 80 ml de tampon TAE (10% (v/v) de Tampon TAE [400-10] mM de pH 8,3 (Invitrogen) SOP 12/MY/12/F de l'ISP-WIV), selon la SOP 12/MY/13/F de l'ISP-WIV). Une échelle ADN de 100 pb (Invitrogen, 1 µl dans 9 µl d'eau et 2 µl de bleu de bromophénol) est également ajoutée lors de l'électrophorèse et la migration s'effectue sous une différence de potentiel de 130 V pendant 50 minutes (SOP 12/MY/11/F, ISP-WIV). Après migration, grâce au SYBR® Safe (agent intercalant de l'ADN incorporé dans le gel d'agarose), le matériel amplifié est détecté par transillumination sous lumière ultra-violette (UV) à l'aide d'un Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ de Bio-Rad.

2.2. Extraction d'ARN et purification

Pour réaliser les RNAseqs, l'ARN est extrait à partir de culture avec un DO_{600nm} de 0.3, séparée en deux. Dans l'une des parties de la culture, un antibiotique est ajouté (PZA (Pyrazinocarboxamide sulfoxide de chez Sigma Aldrich) avec une concentration finale de 250 µg/ml ou delamanid avec la concentration de 0.8 µg/ml (Otsuka pharmaceutical, Tokyo, Japon)). Dans l'autre partie de la culture, le même volume du solvant correspondant (l'eau pour PZA et le DMSO (Dimethyl sulfoxide de chez Sigma Aldrich) pour delamanid) est ajouté. Les deux cultures sont alors laissées pendant 0, 6 et 24 h à 37°C avant inactivation des bactéries. Pour ce faire, 10 ml de culture sont prélevés et centrifugés pendant 10 minutes à 4000 g et le culot obtenu est inactivé par l'action du TRIzol et du bead-beating (cfr. 1.4 Inactivation des cultures et lyse cellulaire). Après lyse des bactéries, 200 µl de chloroforme (EMSURE®, Merck Millipore) sont ajoutés. Les tubes sont ensuite mélangés puis incubés pendant 5 minutes à température ambiante avant

d'être centrifugés (15 min, 12000 g, 4°C). Par après, 400 µl de la phase aqueuse sont purifiés selon quatre techniques différentes décrites ci-dessous :

- 1) Utilisation du kit Direct-zol™ RNA MiniPrep (Zymo research, Californie, USA) selon le protocole fourni par la firme et qui comprend une étape de traitement DNase à partir de DNase I lyophilisée à reconstituer dans l'eau puis à mélanger avec le DNA Digestion Buffer du kit avant son utilisation.
- 2) Précipitation à l'éthanol : 2.5 V d'éthanol 100% glacé et 0.1 V d'acétate de sodium 3 M (Sigma Aldrich, à pH 4.6 par ajout d'acide acétique (Sigma Aldrich)), sont mélangés à la phase aqueuse prélevée qui est ensuite laissée à -20°C pendant plus de 2 h. Les échantillons sont alors centrifugés (20 min, 14000 g, 4°C) puis lavés avec 250 µl d'éthanol 75 % glacé. Le culot est récupéré après une nouvelle centrifugation pendant 5 minutes et laissé à l'air libre pendant 5 à 10 minutes pour être séché. Ensuite, 80 µl du mix DNase provenant du kit de Zymo research resuspendent le culot et agissent sur l'échantillon pendant 15, 30, 45 et 60 minutes à température ambiante avant que 320 µl d'eau sans RNase ne soient ajoutés, suivis par une nouvelle précipitation à l'éthanol comme décrit ci-dessus. Après avoir été séché à l'air libre comme précédemment, le culot est resuspendu dans 35 µl d'eau sans RNase et conservé à -80°C (Sambrook & Russel, 2001).
- 3) Précipitation à l'isopropanol : 1 V d'isopropanol 100% (AnalaR NORMAPUR®, VWR, Leuven, Belgium) est mélangé à la phase aqueuse prélevée. Le tout est incubé à température ambiante pendant 15 minutes avant d'être centrifugé (15 min, 14000 g, 4°C). Ensuite, 250 µl d'éthanol 75 % glacé sont ajoutés au culot qui est récupéré après une nouvelle centrifugation pendant 5 minutes et laissé à l'air libre pendant 5 à 10 minutes. Comme décrit précédemment, 80 µl du mix DNase provenant du kit de Zymo research sont utilisés pour resuspendre ensuite le culot et agissent sur l'échantillon pendant 15, 30, 45 et 60 minutes à température ambiante avant que 320 µl d'eau sans RNase ne soient ajoutés, suivis à nouveau d'une étape de précipitation. Après séchage, le culot est resuspendu dans 35 µl d'eau sans RNase et conservé à -80°C (Sambrook & Green, 2012).
- 4) Un traitement DNase est réalisé avec le kit TURBO DNA-free™ de Invitrogen. Pour cela, 0.2 V de DNase buffer et 1 µl de TURBO DNase sont ajoutés à l'échantillon (après une possible dilution avec de l'eau sans RNase pour obtenir un volume plus important). L'échantillon est ensuite incubé à 37°C pendant 30 minutes avec mélange régulier. L'ajout de DNase peut être réitéré par la suite avec à nouveau 30 minutes d'incubation à 37°C. Le traitement se termine par l'ajout de 0.1 V de DNase inactivation reagent qui agit pendant 5 minutes à température ambiante avec mélange régulier pour finalement récupérer l'ARN et le stocker à -80°C.

Après un contrôle satisfaisant de la qualité des échantillons d'ARN (cfr. 2.3 Contrôle de la qualité des échantillons), ceux-ci seront envoyés à l'Institut Pasteur de Paris, au « Transcriptome and EpiGenome, BioMics, Center for Innovation and Technological » où la suite du traitement des échantillons et le séquençage de l'ARNm par son ADNc seront réalisés.

2.3. Contrôle de la qualité des échantillons d'ARN ou d'ADN

Après extraction et purification de l'ARN, la qualité des échantillons peut être testée à l'aide de l'Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies, Californie, USA). Avec le RNA 6000 Nano Kit, cette analyse combine séparation par électrophorèse et quantification par analyse des paramètres de fluorescence selon son protocole qui comporte l'ajout d'une échelle pour quantifier la concentration des échantillons et estimer la taille des ARNs présents.

L'efficacité des traitements de lyse bactérienne peut quant à elle être estimée en utilisant un versafluor (Bio-Rad) qui mesure la fluorescence du marqueur PicoGreen® ajouté aux échantillons. La quantification de l'ADN présent dans les échantillons, libéré par la lyse des cellules bactériennes, est donc possible grâce à une courbe de calibration de phage Lambda DNA où le marqueur fluorescent a également été ajouté (Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA kit, BioRad) selon le protocole de l'instrument (SOP 44/A-08/E, ISP-WIV). Trois réplicats sont réalisés par technique de lyse essayée.

3. Analyses Luminex

À partir soit d'une culture en milieu Middlebrook 7H9 soit d'un tube MGIT™ positif, une dilution de l'échantillon est réalisée suivie de l'ajout de l'antibiotique à tester, INH (Fluka® Analytical, Sigma Aldrich), de manière à obtenir, au sein de l'échantillon, l'une des concentrations critiques de 0.1 ou 0.4 µg/ml. L'échantillon est ensuite incubé pendant 1, 2, 3, 4 ou 6 h à 37°C puis inactivé et lysé (cfr 1.4 Inactivation des cultures et lyse cellulaire). L'échantillon est alors traité selon le protocole du QuantiGene Plex assay d'Affymetrix décrit ci-dessous et qui comprend tout d'abord une phase de stabilisation et de liaison des ARNs cibles libérés avec des sondes par hybridation (jour 1) suivie d'une phase d'amplification du signal à l'aide d'autres sondes qui vont finalement se fixer à un marqueur fluorescent (Jour 2) (cfr. Figure 5).

Plus concrètement, la phase de stabilisation et de liaison (Day 1 Assay Procedure – for Cell Lysates and Whole Blood Lysates » du protocole, QuantiGene Plex assay) est réalisée directement après la lyse cellulaire. Selon le nombre d'échantillons, un « Working Bead Mix » est préparé comme décrit dans le tableau 8. Dans le cas où 80 µl de lysat cellulaire est utilisé, un mélange de 20 µl par puits est préparé, tandis que 80 µl de mélange sont réalisés pour l'utilisation de 20 µl de lysat. Le mélange est ajouté dans

chaque puits d'une « Hybridization plate » suivi par l'ajout de l'échantillon pour un volume final de 100 µl par puits. Pour chacune de ces analyses Luminex, deux blancs réactifs sont réalisés à partir de l'étape de resuspension dans 200 µl de lysis mixture (cfr 1.4 Inactivation des cultures et lyse cellulaire). Après avoir scellé hermétiquement les puits, la plaque d'hybridation est incubée à 54°C dans un THERMOstar (BMG LABTECH, Champigny sur marne, France) réglé à 600 rpm pendant 18 à 22 h. L'ensemble des réactifs ainsi que les plaques multipuits et les joints de scellage correspondants nécessaires à la réalisation de cette analyse sont fournis dans le QuantiGene Plex Assay kit (Affymetrix).

Tableau 8. Composition du Working Bead Mix

Réactifs	Volume pour un puits (20µl)	Volume pour 96 puits (20µl) ¹	Volume pour un puits (80µl)	Volume pour 96 puits (80µl) ¹
Nuclease-free Water	5.2	697	20.8	2788
Lysis Mixture	6.6	884	26.4	3536
Blocking Reagent	2	268	8	1072
Proteinase K	0.2	27	0.8	108
Capture Beads	1	134	4	536
Probe Set	5	670	20	2680

¹ qui comprend un excès de 40 % liés à l'utilisation de la micropipette à multicanaux.

Une fois cette période d'incubation achevée, le protocole se poursuit par l'étape appelée « Day 2 Assay Procedure » qui implique tout d'abord de transférer le contenu des puits dans ceux d'une « Magnetic Separation Plate », où vont se succéder des étapes de lavages entre chaque incubation en présence d'un réactif différent. En effet, après chaque incubation, les échantillons sont lavés trois fois par 100 µl de « Wash Buffer » (pour 1 ml, 3 µl du réactif « Wash Buffer Component 1 », 50 µl de « Wash Buffer Component 2 » et 947 µl d'eau sans RNase) à l'aide d'un Hand-Held Magnetic Plate Washer (Affymetrix) fixé à la plaque de séparation magnétique puis ce dernier va être retiré pour ajouter 100 µl d'un réactif dans chaque puits. La plaque est ensuite scellée et mise à incuber dans le THERMOstar à 50°C à 600 rpm pendant 1 h. Les réactifs ajoutés à chacune de ces étapes sont respectivement le « Pre-Amplifier Solution », le « Amplifier Solution », le « Label Probe Solution » et le « SAPE Working Reagent » (pour 1 ml, 1ml de « SAPE Diluent » auquel est mélangé 3 µl de « SAPE »). Après l'ajout des 100 µl de « SAPE Working Reagent », la plaque est scellée et emballée pour être protégée de la lumière puis placée à température ambiante dans le *Compact Digital MicroPlate Shaker* réglé à 600 rpm pendant 30 minutes. Trois lavages successifs sont ensuite effectués avec le « SAPE Wash Buffer », toujours à l'aide du Hand-Held Magnetic Plate Washer. 130 µl du « SAPE Wash Buffer » sont finalement ajoutés dans chaque puits et la plaque, qui est scellée et emballée, est à nouveau placée sur le *Compact Digital MicroPlate Shaker* pendant 3 minutes à 800 rpm. Après ces différentes étapes d'hybridation et lavage, le signal fluorescent associé à des sondes spécifiques par ARN (Luminex® beads with Capture probes) est mesuré par le Bio-

Plex® MAGPIX™ Multiplex Reader (Biorad) et enregistré par le programme xPONENT® (Luminex Corporation).

Les résultats obtenus sont exprimés en MFI (Median Fluorescence Intensity). Les valeurs des blancs réactifs vont permettre de soustraire du signal le bruit de fond. Les résultats sont ensuite normalisés à l'aide de la moyenne géométrique des signaux de gènes dont la transcription n'est pas influencée par la présence de l'antibiotique. La variation de transcription, appelée « fold change » est ensuite déterminée pour chaque gène en calculant le ratio des résultats normalisés de l'échantillon en présence de l'antibiotique sur ceux de l'échantillon équivalent sans l'ajout de l'antibiotique. Par la suite, le fold change est converti en « log₂foldchange » où une valeur positive correspond à un gène surexprimé en présence de l'antibiotique tandis qu'une valeur négative est associée à la régulation négative de ce gène en présence de l'antibiotique testé. Finalement, les résultats de tous ces gènes sont combinés en une seule valeur par échantillon appelé SPD (squared projected distance) selon le procédé utilisé dans la publication intitulée « *RNA signatures allow rapid identification of pathogens and antibiotic susceptibilities* » (Barczak et al., 2016) qui compare la valeur de chaque gène à une référence obtenues à partir de souches sensibles bien caractérisées. Un SPD autour de 0 correspond à une souche sensible tandis que les souches résistantes ont un SPD autour de 1.

V. Résultats et discussions spécifiques

1. Préparation des échantillons pour la détermination des ARNs cibles

L'objectif de ce point est de préparer les échantillons destinés à être envoyés pour une analyse RNAseq pour déterminer les gènes de la signature ARN pour deux antibiotiques, PZA et delamanid. Par conséquent, deux souches pan-sensibles, la souche de référence H37Rv et 041195 (cfr. « 1.2. Choix des souches » de « III. Matériels et méthodes »), ont été cultivées puis incubées avec les antibiotiques et leur solvant respectif (comme contrôle). Après avoir laissé les cultures sous antibiotique/solvant pendant différents temps (cfr. « 2.2. Extraction d'ARN et purification » de « III. Matériels et méthodes »), l'ARN est extrait et un contrôle qualité (QC) par bioanalyser est réalisé sur l'ARN purifié (« 2.3. Contrôle qualité des échantillons d'ARN ou d'ADN » de « III. Matériels et méthodes »). Si ce contrôle est bon, les échantillons peuvent être envoyés à l'Institut Pasteur de Paris pour une analyse RNAseq.

1.1. Contrôle de l'efficacité de l'antibiotique suite à l'extraction de l'ARN

Trois cultures (A, B et C) séparées chacune en deux réplicats (1 et 2) ont été incubées à 37°C jusqu'à obtenir une $DO_{600\text{ nm}}$ d'environ 0.3 pour réaliser la préparation des échantillons pour des analyses RNAseq. Après avoir incubé la moitié de chacune des six cultures avec l'un des deux antibiotiques et l'autre moitié avec le solvant correspondant, des échantillons sont prélevés après 0, 6 et 24 h (cfr. 2.2. Extraction d'ARN et purification). Le volume restant, après prélèvement des échantillons, des deux versions (avec antibiotique ou avec le solvant correspondant) de chaque culture est incubé. La densité optique (sans unité ou s.u.) est mesurée régulièrement pour contrôler l'efficacité de l'antituberculeux. Cette opération a été réalisée deux fois pour chacune des souches: l'une pour l'antibiotique PZA avec l'eau comme solvant (dit « mQ » ci-dessous) et l'autre pour le delamanid (DLM) avec son solvant, le DMSO. Les résultats sont représentés dans la figure 7 pour l'ajout de delamanid (Figure 7A et 7B pour les cultures de respectivement 041195 et H37Rv) et dans la figure 8A et 8B pour PZA (également pour les cultures de 041195 et H37Rv).

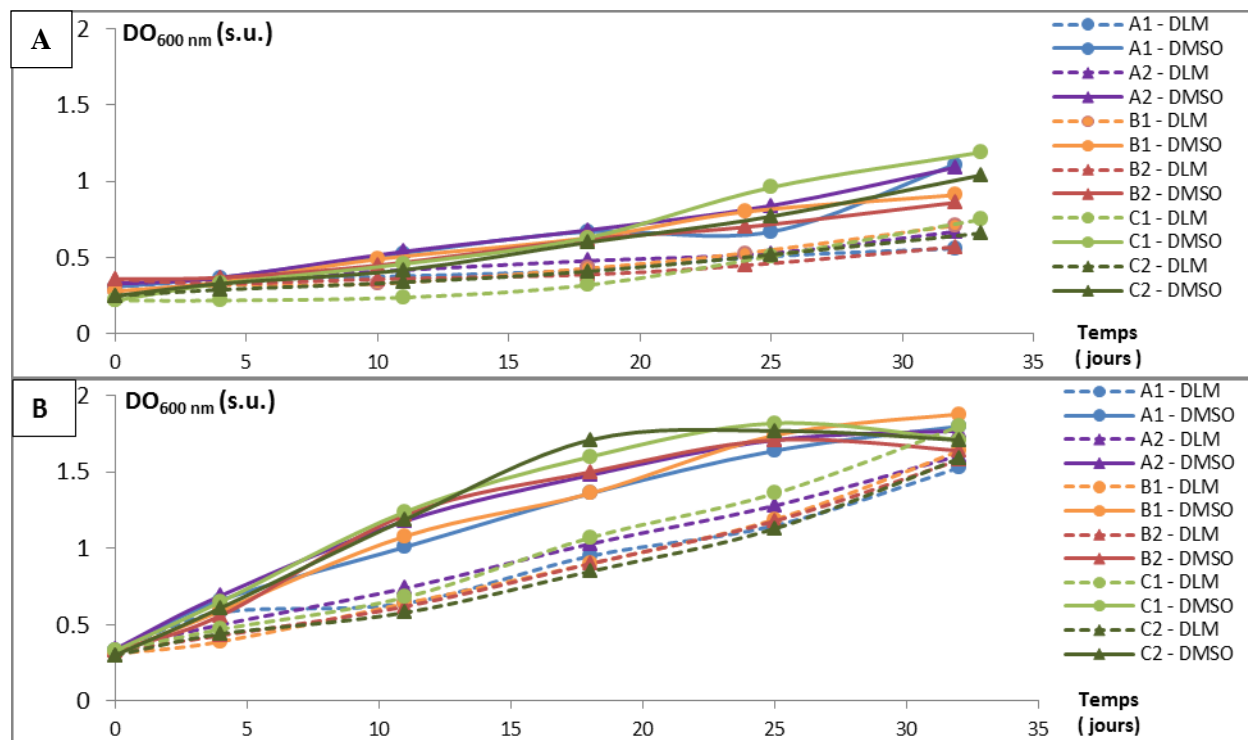


Figure 7. Courbe de croissance de 041195 (A) et H37Rv (B) suite à l'ajout de 0.8 µg/ml de delamanid (DLM) ou de DMSO. Mesure de la densité optique à 600 nm ou DO_{600 nm} (sans unité ou s.u.) au cours du temps, de cultures avec une DO_{600 nm} de départ d'environ 0.3

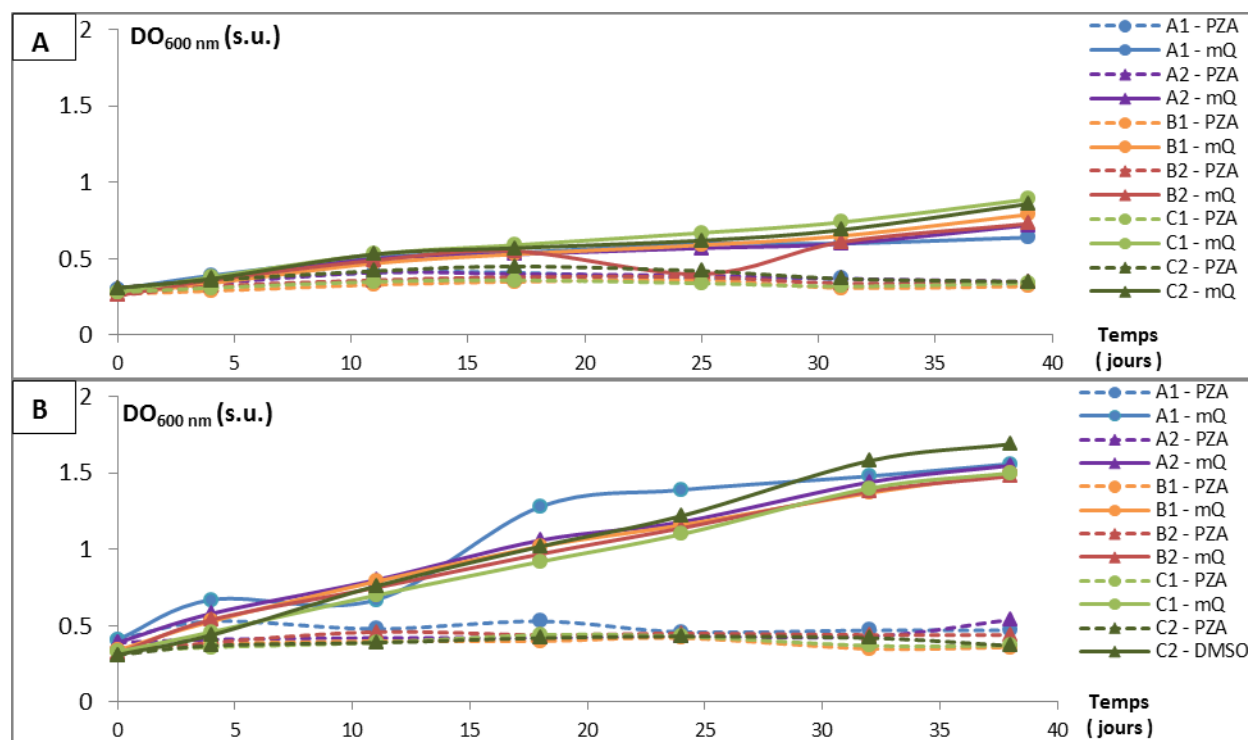


Figure 8. Courbe de croissance de 041195 (A) et H37Rv (B) suite à l'ajout de 250 µg/ml de PZA ou d'eau (mQ). Mesure de la densité optique à 600 nm ou DO_{600 nm} (sans unité ou s.u.) au cours du temps, de cultures avec une DO_{600 nm} de départ de 0.3

Une première observation de la figure 7 permet de constater que, quelle que soit la souche, la croissance bactérienne des cultures sous delamanid se maintient. En effet, les DO_{600 nm} après 32 jours sont environ

deux fois plus importantes que celles de départ pour la souche 041195 et plus ou moins cinq fois plus importantes pour la souche H37Rv. Donc, bien qu'il y ait un ralentissement du développement bactérien comparé à celui des cultures sans l'antibiotique, les courbes des cultures sous DLM montrent clairement une croissance bactérienne. Le delamanid à 0.8 µg/ml ne semble donc pas suffisamment efficace pour permettre ni une action bactériostatique, ni bactéricide.

A l'opposé, il est possible d'observer que les cultures sous 250 µg/ml de PZA, représentées dans la figure 8, ne suivent pas les courbes de contrôle des cultures sans l'antibiotique. De plus, leurs densités optiques à 600 nm n'ont presque pas évoluées après 32 jours, tandis que celles des contrôles ont à peu près doublé pour la souche 041195 (Figure 8A) et quadruplé pour H37Rv (Figure 8B). Il est donc possible de considérer que l'antibiotique PZA a effectivement eu une action bactériostatique sur la culture bactérienne. Il faut, en effet, noter que l'activité de PZA est définie comme bactériostatique tandis que celle du delamanid comme bactéricide. Au vu des résultats de ces contrôles, il a été décidé d'utiliser les échantillons réalisés à partir des cultures avec PZA/mQ pour étudier leur transcriptome car cet antibiotique semble bien actif. En revanche, ceux réalisés avec les cultures sous delamanid ne vont pas être utilisés pour étudier leur transcriptome: les contrôles ont permis de mettre en évidence le manque d'efficacité du delamanid à une concentration de 0.8 µg/ml pour inhiber la croissance bactérienne. De nouvelles cultures doivent donc être réalisées avec une concentration en delamanid supérieure.

1.2. Optimisation de la concentration en delamanid

Compte tenu du manque d'efficacité du delamanid à 0.8 µg/ml pour inhiber la croissance bactérienne des cultures testées précédemment (figure 7), différentes concentrations de cet antibiotique ont été testées pour déterminer la concentration seuil à laquelle l'effet bactéricide est efficace. En effet, l'action de l'antibiotique doit être suffisante pour observer une différence d'expression d'ARNs entre une souche soumise au stress provoqué par l'action de l'antibiotique et une non-stressée. Deux paramètres ont donc été testés: la $DO_{600\text{ nm}}$ de départ et la concentration de l'antibiotique. Par conséquent, trois cultures de la souche H37Rv ont été incubées jusqu'à l'obtention d'une $DO_{600\text{ nm}}$ de, respectivement, 0.1, 0.2 et 0.3 avant de séparer chaque culture en trois parties. Pour chaque densité, les trois parties des cultures ont été incubées à 37°C avec du DMSO pour l'une de ces parties, 0.8 µg/ml de delamanid pour une autre et 1.6 µg/ml de delamanid pour la dernière. Des mesures régulières de leur $DO_{600\text{ nm}}$ sont alors réalisées pour définir la combinaison $DO_{600\text{ nm}}$ de départ/concentration de delamanid suffisamment efficace pour observer une claire action de l'antibiotique sur la croissance bactérienne (Figure 9).

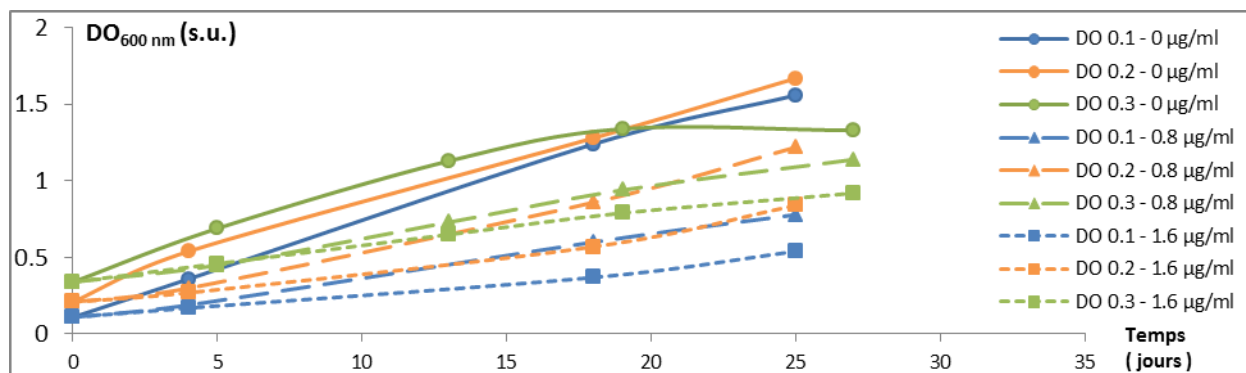


Figure 9. Courbe de croissance de cultures de la souche H37Rv incubées avec trois différentes densités optiques à 600 nm de départ et sous différentes concentrations de delamanid. Mesure de la densité optique en fonction du temps : la combinaison de trois DO_{600nm} de départ différentes (0.1, 0.2 et 0.3, cultures appelées respectivement DO 0.1, DO 0.2 et DO 0.3) sous deux concentrations de DLM (0.8 et 1.6 µg/ml) a été testée avec, pour chaque densité, un contrôle avec du DMSO (0 µl/ml de DLM).

Pour faciliter la comparaison de l'action de l'antibiotique dans ces différentes conditions, la différence de DO_{600 nm} entre la culture sous delamanid et celle équivalente sans l'antibiotique a été reprise pour chaque condition dans le tableau 9. Cette différence a été calculée après 27 jours pour les cultures avec une densité optique de départ de 0.3 et 25 jours pour les deux autres.

Tableau 9. Différence de DO_{600 nm} entre les cultures sous DLM et celles équivalentes sans l'antibiotique. Les densités optiques mesurées sont celles de cultures de H37Rv après 25 jours d'incubation sous 0.8 µg/ml et 1.6 µg/ml de delamanid et avec une densité optique à 600 nm (DO_{600 nm}) de départ de 0.1 et 0.2 ainsi qu'après 27 jours sous ces mêmes concentration d'antibiotique avec une densité de départ de 0.3*.

DO _{600 nm} de départ	Différence de DO _{600 nm} des cultures sous 0.8 µg/ml de DLM (%)	Différence de DO _{600 nm} des cultures sous 1.6 µg/ml de DLM (%)
DO 0.1	50.00	65.38
DO 0.2	26.95	49.70
DO 0.3	14.29	30.83

*Calcul réalisé : $100 - \frac{DO(600\text{ nm}) \text{ de la culture avec l'antibiotique}}{DO(600\text{ nm}) \text{ de la culture avec le solvant}} \times 100$.

Une première observation de ce tableau montre qu'une DO_{600 nm} de 0.1 avant l'ajout de l'antibiotique permet d'obtenir une différence de la croissance bactérienne plus importante par rapport aux cultures avec une DO_{600 nm} de départ supérieure (0.2 ou 0.3). De plus, il est également possible d'observer qu'une concentration plus importante de delamanid semble augmenter cette différence de croissance entre les cultures inhibées par l'antibiotique et celles de contrôle. La combinaison qui semble la plus efficace correspond donc à une DO_{600 nm} de départ de 0.1 avec 1.6 µg/ml de delamanid. Cependant, malgré ces paramètres, un développement bactérien se maintient. En effet, la densité optique de la culture avec cette combinaison était près de cinq fois supérieure à la densité initiale après 25 jours.

Suite aux résultats précédents, un nouveau test de concentration a été réalisé avec une culture de la souche H37Rv et une DO_{600 nm} de départ de 0.1. Les concentrations de delamanid testées sont 1, 2, 3, 4 et 5 µg/ml avec, également, une sixième partie de la culture sans delamanid servant de contrôle. Les courbes de

croissance obtenues sont présentées dans la figure 10 et les différences de densités après 28 jours sont reprises dans le tableau 10.

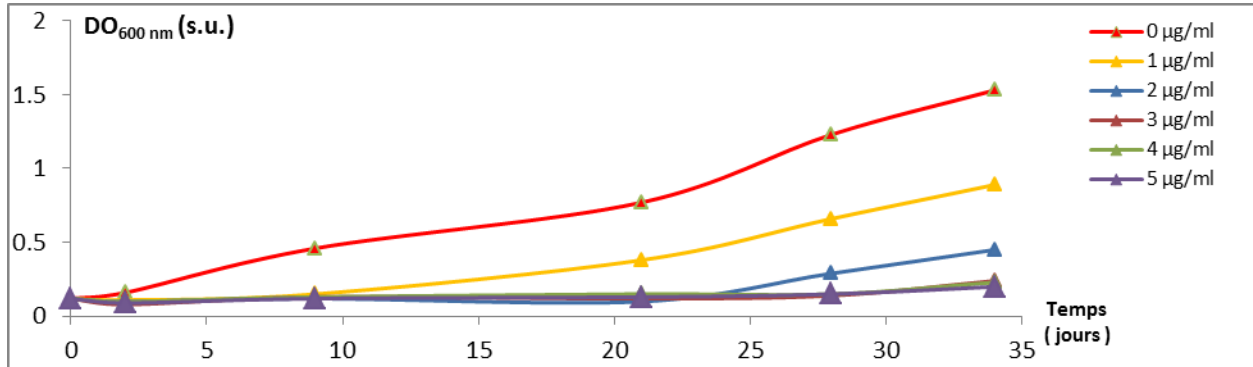


Figure 10. Courbe de croissance d'une culture de H37Rv avec six concentrations de delamanid: 0, 1, 2, 3, 4 et 5 µg/ml.

Tableau 10. Différence de $DO_{600\text{ nm}}$ entre les cultures sous DLM et celles équivalentes sans l'antibiotique. Les densités optiques mesurées sont celles de cultures de H37Rv après 28 jours d'incubation sous cinq concentrations de delamanid.

Concentration en delamanid	Différence de $DO_{600\text{ nm}}$ (%)
1 µg/ml	46.34
2 µg/ml	76.42
3 µg/ml	88.62
4 µg/ml	87.80
5 µg/ml	87.80

Ces résultats montrent une amélioration de l'effet de l'antibiotique en augmentant sa concentration mais cette tendance semble saturer à partir de 3 µg/ml de delamanid. En effet, pour 3, 4 et 5 µg/ml de delamanid, la $DO_{600\text{ nm}}$ ne varie à peu près pas après 28 jours et laisse supposer que le delamanid a un effet bactériostatique sur ces cultures.

Au vu de ces résultats, il a été décidé que de nouveaux échantillons devaient être préparés pour des analyses RNAseq à partir de cultures avec une $DO_{600\text{ nm}}$ de 0.1 avant d'y ajouter une concentration de 3 µg/ml de delamanid. Ces paramètres sont ceux choisis pour obtenir une action de l'antibiotique suffisamment efficace afin d'observer une différence d'expression d'ARNs entre une souche soumise au stress provoqué par l'action de l'antibiotique et une non-stressée. Néanmoins, comme pour les cultures précédentes (cfr. 1.1. Contrôle de l'efficacité de l'antibiotique suite à l'extraction de l'ARN), un suivi de la croissance bactérienne de ces nouvelles cultures devra être réalisé pour s'assurer de l'efficacité de l'activité de l'antibiotique.

1.3. Optimisation des conditions de purification des ARNs

Une fois les échantillons pour les analyses RNAseq prélevés à partir des cultures sous PZA/mQ (cfr. 1.1. Contrôle de l'efficacité de l'antibiotique suite à l'extraction de l'ARN), l'ARN doit être extrait et purifié. Pour ce faire, différentes techniques ont été envisagées (cfr. « 2.2. Extraction d'ARN et purification » de « III. Matériels et méthodes »). La qualité des échantillons traités par chacune des techniques a ensuite pu être estimée à l'aide d'un Bioanalyzer (cfr. « 2.3. Contrôle de la qualité des échantillons d'ARN ou

d'ADN » de « III. Matériels et méthodes »). Son utilisation permet de déterminer la concentration ainsi que la pureté/intégrité de l'ARN total et a pour avantage de ne demander qu'une faible quantité d'échantillon. La qualité de l'échantillon est, d'une part, évaluée par la valeur de l'intégrité de l'ARN (RNA Integrity Number ou RIN) qui se situe entre 0 (faible intégrité) et 10 (très bonne intégrité). D'autre part, une haute qualité d'ARN est également caractérisée visuellement par des pics des ARNr 16S et 23S distincts, avec peu de bruit de fond. De plus, l'efficacité du traitement DNase lié à chaque technique peut être déterminée en vérifiant l'absence d'amplification de séquences ADN lors de PCRs (cfr. « 2.1. PCR et électrophorèse » de « III. Matériels et méthodes »). En effet, les étapes avant l'analyse RNAseq et suivant la purification de l'ARN nécessitent une élimination de l'ADN présent au sein des échantillons. Les photos réalisées lors de la visualisation des produits PCR sont disponibles en annexe.

Essais avec le kit Direct-zol™ RNA MiniPrep

Dans un premier temps, la technique utilisant le kit Direct-zol™ RNA MiniPrep (dit kit Direct-zol™ ci-dessous) a été testée avec quatre échantillons supplémentaires (prélevés en plus des échantillons destinés à l'analyse RNAseq, à partir des cultures de H37Rv). Ce protocole contient une étape de traitement DNase qui consiste à ajouter par échantillon 80 µl d'un mélange avec 5 µl de DNase I (6 U/µl) et à ensuite incuber l'échantillon pendant 15 minutes à température ambiante avant différentes étapes de lavage. Néanmoins, une PCR de type IS (cfr. « 2.1. PCR et électrophorèse » de « III. Matériels et méthodes ») d'essais antérieurs a mis en évidence la présence d'ADN dans les échantillons malgré le traitement DNase du protocole. Quatre différentes versions de cette étape ont donc été testées en modifiant, d'une part, la concentration en DNase I du mélange ajouté (5 µl de DNase I (30 U) dans les 80µl du mélange pour les échantillons appelés « A » et 10 µl pour ceux dits « B » (60 U)) et d'autre part, le temps d'incubation qui suit cet ajout (30 ou 60 minutes). Les résultats du Bioanalyzer sont repris dans le tableau 11 et la figure 11.

Les électrophorégrammes de la figure 11 présentent des profils contenant quatre pics majeurs qui correspondent respectivement au témoin de migration (pic entre 20 et 25 secondes) suivi d'une région contenant les ARNr 5S mais également une partie des produits de dégradation des ARNs (ceux-ci engendrent également un bruit de fond plus conséquent) et les petits ARNs (au niveau de 25 secondes) puis les pics des ARNr 16S (vers 40 secondes) et 23S (peu après 45 secondes). L'observation de cette figure permet donc de constater que les deux pics d'intérêt pour évaluer la qualité de l'ARN total, 16S et 23S, sont distinguables.

Tableau 11. Résultats obtenus par analyse Bioanalyzer d'échantillons traités avec le kit Direct-zol™ RNA MiniPrep. Les échantillons ont été traités avec quatre étapes DNase différentes en combinant deux concentrations de DNase I différentes avec deux temps de traitement différents: celles nommées A et B ont respectivement été réalisées avec un mélange contenant 30 U et 60 U de DNase I pendant soit 30 («30 min») soit 60 minutes («60 min»). Le RIN correspond à l'intégrité de l'ARN et est un indicateur de la qualité de l'échantillon.

Etape DNase :	RIN	Concentration en ARN
A – 30 min	6.5	128 ng/μl
A – 60 min	6.9	176 ng/μl
B – 30 min	/	109 ng/μl
B – 60 min	6.6	104 ng/μl

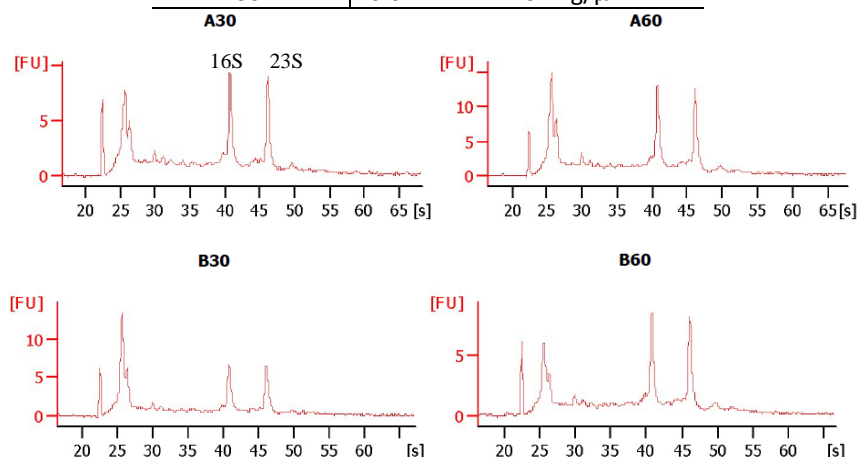


Figure 11. Intensité fluorescente des ARNs séparés par migration obtenue par un Bioanalyzer. Ces électrophorégrammes correspondent aux échantillons traités par le kit Direct-zol™ RNA MiniPrep avec, chacun, une étape de DNase différente : (A30) 30 minutes à l'aide d'un mélange avec 30 U de DNase I, (A60) 60 minutes avec ce même mélange, (B30) 30 minutes avec un mélange de 60 U de DNase I et (B60) 60 minutes avec 60 U de DNase I.

Au vu des résultats repris dans le tableau 11, il ne semble pas qu'un traitement DNase plus long ou plus concentré ait un impact majeur sur la qualité de l'ARN. Pourtant une étape DNase plus longue et plus concentrée en DNase ne peut que dégrader l'ARN présent dans les échantillons. En ce qui concerne la qualité de l'échantillon B30 (60 U de DNase I pendant 30 minutes), bien que celle-ci ne soit pas estimée par le RIN (Tableau 11), cela n'implique pas forcément que l'ARN était trop dégradé. Pour toute anomalie dans l'électrophorégramme, cette valeur n'est pas donnée. Il est important de préciser que le protocole de l'algorithme utilisé n'est pas parfaitement adapté aux procaryotes, mais également que la méthode d'extraction à l'aide du Trizol™ semble favoriser l'extraction d'ARN 5S. Lors de l'analyse par le Bioanalyzer, un haut pic d'ARN 5 S est considéré comme lié à une trop forte dégradation de l'ARN total et aucune valeur RIN n'est alors donnée. Il est donc nécessaire de considérer ces résultats avec prudence.

Une PCR de type CSB a également été réalisée avec ces quatre échantillons et aucune amplification d'ADN n'a pu être observée, excepté au niveau du témoin positif (Annexe 1A). Ce résultat suggère que les quatre différentes étapes DNase testées sont suffisamment efficaces pour dégrader l'ADN présent au sein des échantillons. Il serait, par conséquent, plus intéressant de conserver une étape DNase de plus courte durée et de moindre concentration pour limiter toute dégradation supplémentaire de l'ARN au cours de celle-ci.

Comparaison de trois méthodes : avec kit Direct-zol™ RNA MiniPrep, par précipitation à l'éthanol et par précipitation à l'isopropanol

Par après, trois techniques ont été testées: par précipitation à l'éthanol, par précipitation à l'isopropanol et, à nouveau, avec le kit Direct-zol™ pour comparer ses résultats à ceux des deux autres méthodes. L'objectif est de déterminer s'il est possible d'augmenter le rendement en ARN extrait/purifié. Les techniques de précipitation à l'éthanol et de précipitation à l'isopropanol (cfr. « 2.2. Extraction d'ARN et purification » de « III. Matériels et méthodes ») comportent toutes deux également une étape DNase réalisée avec le même mélange contenant 30 U de DNase I et provenant du kit Direct-zol™. Pour chaque technique, quatre durées d'étape DNase différentes ont été testées. Quatre échantillons ont donc été traités par méthode avec une étape DNase de 15 minutes pour l'un, 30 minutes pour un second, 45 minutes pour un autre et 60 minutes pour le dernier. Les échantillons utilisés proviennent d'échantillons supplémentaires à ceux pour l'analyse RNAseq.

Une PCR CSB a été réalisée sur ces échantillons mais aucune amplification n'a été visualisée, excepté pour le témoin positif (Annexe 1B). Ce résultat suggère que l'ensemble de ces traitements permet une dégradation de l'ADN suffisante, ce qui, pour le kit Direct-zol™, correspond aux résultats précédents. Deux autres PCR, l'une de type IS et l'autre BB (Annexe2), ont ensuite été réalisées avec les échantillons traités par le kit Direct-zol™ pour confirmer l'absence d'amplification de fragments d'ADN, même de plus petites tailles avec la PCR BB. Et, comme pour la première PCR, aucune amplification n'a été visualisée. Cela suppose une étape DNase efficace. Une analyse avec le Bioanalyzer a ensuite été effectuée sur ces douze échantillons dont les résultats sont repris dans le tableau 12 et la figure 12.

Tout d'abord, la figure 12 montre clairement que la précipitation à l'isopropanol ne permet pas d'obtenir des échantillons d'ARN de qualité car les pics 16S et 23S ne peuvent être définis sur les profils obtenus. Une explication possible est la perte des ARN lors de la procédure. En effet, au cours de celle-ci, aucune précipitation n'avait pu être observée.

En ce qui concerne la précipitation à l'éthanol, les concentrations obtenues (tableau 12) sont inférieures à celles obtenues par le kit Direct-zol™ et les profils semblent présenter une moins bonne qualité d'ARN avec des pics 16S et 23S moins distinguables, et ce particulièrement pour des traitements DNase plus longs (pic 23 S non détecté pour les traitements DNase de 45 et 60 minutes). Les deux nouvelles méthodes testées ne semblent donc pas remplir l'objectif d'augmenter le rendement d'ARN purifié.

En conclusion, les résultats de la méthode du kit Direct-zol™ présentent la meilleure qualité d'échantillon ainsi que des concentrations en ARN plus élevées. Cette méthode a donc été sélectionnée pour le traitement des échantillons destinés à l'analyse RNAseq. L'échantillon traité par cette méthode avec une étape DNase de 15 minutes est caractérisé par une qualité d'ARN relativement bonne, avec un RIN de 7.1 et des pics 16S et 23S distincts, mais sa concentration est plus faible que celle des autres échantillons de

cette méthode. Il a toutefois été décidé de conserver une durée de traitement DNase de 15 minutes avec la méthode du kit Direct-zol™. En effet, aucune présence d'ADN n'a été détectée après 15 minutes de traitement et un traitement plus long ne peut que nuire à la qualité de l'ARN. De ce fait, la différence de concentration provient vraisemblablement d'une plus faible quantité de matériel bactérien dans l'échantillon, plutôt que du traitement qui lui a été administré.

Tableau 12. Résultats obtenus par analyse Bioanalyzer d'échantillons traités avec trois méthodes: le kit Direct-zol™ RNA MiniPrep, une précipitation à l'éthanol et une précipitation à l'isopropanol. Pour chaque méthode, quatre temps d'incubation lors de leur étape de DNase ont été testés : 15, 30, 45 et 60 minutes. Le RIN correspond à l'intégrité de l'ARN et est un indicateur de la qualité de l'échantillon.

Etape DNase :	kit Direct-zol™ RNA MiniPrep		Précipitation à l'éthanol		Précipitation à l'isopropanol	
	RIN	Concentration en ARN	RIN	Concentration en ARN	RIN	Concentration en ARN
15 min	7.1	150 ng/μl	/	97 ng/μl	/	31 ng/μl
30 min	/	452 ng/μl	/	109 ng/μl	2.4	114 ng/μl
45 min	/	364 ng/μl	6.7	48 ng/μl	/	76 ng/μl
60 min	6.5	411 ng/μl	/	1 ng/μl	/	19 ng/μl

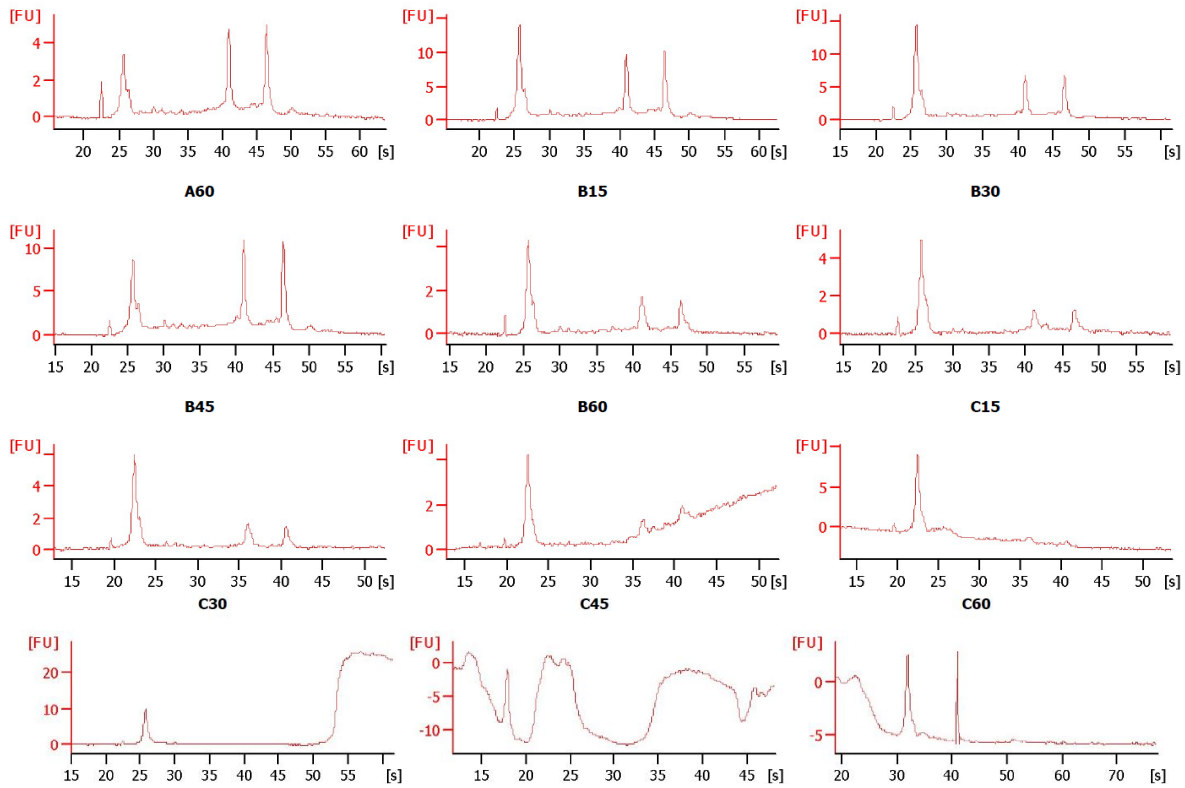


Figure 12. Intensité fluorescente des ARNs séparés par migration obtenue par un Bioanalyzer. Ces électrophorégrammes correspondent aux échantillons traités par le kit Direct-zol™ RNA MiniPrep avec une étape DNase de 15 (A15), 30 (A30), 45 (A45) et 60 minutes (A60) ainsi que ceux traités par précipitation à l'éthanol, également avec des étapes DNase de 15 (B15), 30 (B30), 45 (B45) et 60 (B60) minutes. Les électrophorégrammes C15, C30 et C45 correspondent respectivement aux échantillons obtenus suite à la précipitation à l'isopropanol avec un traitement DNase de 15, 30, 45 et 60 minutes.

Extraction et purification des ARNs pour la préparation des échantillons destinés à l'analyse RNAseq

Compte tenu des essais précédents, il a été décidé de réaliser l'étape d'extraction et de purification avec le kit Direct-zol™, avec l'étape DNase de 15 minutes, des ARNs des échantillons réalisés pour la

préparation des échantillons pour des analyses RNAseq avec les souches H37Rv et 041195 soumises à PZA.

Une PCR BB a tout d'abord été réalisée dont la visualisation des résultats a permis de mettre en évidence des amplifications d'ADN pour une majorité des échantillons (Annexe 3A). L'une des explications est la possible dégradation de la DNase utilisée lors de la préparation du mélange et qui n'aurait donc pas permis une dégradation complète de l'ADN. Il semble, dès lors, nécessaire d'ajouter une étape de dégradation de l'ADN supplémentaire pour l'élimination de l'ADN dans les échantillons.

Réalisation d'une étape DNase supplémentaire

Comme expliqué précédemment, il a été décidé d'ajouter une étape de dégradation de l'ADN supplémentaire aux échantillons destinés au RNAseq avec les souches H37Rv et 041195 soumises à PZA. Un kit TURBO DNA-free™ a donc été utilisé sur les échantillons de la souche H37Rv à cette fin. La manipulation comprend l'ajout de 0.2 V de DNase buffer et d'1 µl de TURBO DNase (2 U/µl) dans l'échantillon. Ce dernier est ensuite incubé à 37°C pendant 30 minutes avec mélange régulier.

Une nouvelle PCR BB de ces échantillons de H37Rv a été réalisée dont les résultats indiquent toujours l'amplification d'ADN présent dans les échantillons (Annexe 3B). L'étape DNase supplémentaire a donc été réalisée sur les échantillons de la souche 041195 mais en incubant 1 h les échantillons contenant la DNase au lieu de 30 minutes. La présence d'ADN a ensuite été mise en évidence dans certains de ces échantillons par une PCR BB (Annexe 3B). Aucun de ces deux traitements n'a donc permis de dégrader complètement l'ADN.

Au vu de ces résultats, il a été décidé de réaliser de nouveaux essais des différentes étapes de préparation des échantillons pour les analyses RNAseq. Ces tests ont été réalisés sur des échantillons provenant de la préparation des échantillons pour les RNAseq avec le delamanid. En effet, compte tenu des résultats insatisfaisants du contrôle de l'efficacité du delamanid sur ces échantillons, ceux-ci ne peuvent être utilisés pour l'analyse RNAseq (cfr. 1.1. Contrôle de l'efficacité de l'antibiotique suite à l'extraction de l'ARN). Les essais réalisés sont les suivants :

- Traitement des échantillons par le kit Direct-zol™ avec 1 h de traitement DNase (trois échantillons avec la DNase potentiellement dégradées lors de la préparation du mélange à ajouter (cfr. Le point précédent, « Extraction et purification des ARNs pour la préparation des échantillons destinés à l'analyse RNAseq ») et trois avec de la DNase nouvellement préparée).

Une PCR BB et une CSB ont ensuite été réalisées avec ces six échantillons et ont permis de mettre en évidence la présence d'ADN au sein de certains des échantillons pour la PCR BB tandis qu'aucune amplification, excepté pour le témoin positif, n'a pu être visualisée suite à la PCR CSB, sans distinction entre les deux DNase utilisées. Les résultats obtenus suite à l'électrophorèse sont repris dans la figure 13.

- Un second traitement a été réalisé sur ces six échantillons avec le kit TURBO DNA-free™. Pour ce traitement supplémentaire, les étapes d'ajout de la DNase et d'incubation de 30 minutes à 37°C qui suit cet ajout ont été réitérées.

A nouveau, des PCR BB et CSB ont été réalisées et, à nouveau, des amplifications ont été mises en évidence pour la PCR BB à l'opposé de celle de type CSB. Pour exclure l'hypothèse que ces amplifications seraient dues à une contamination des réactifs, une PCR BB a été réalisée avec des prélèvements de tous les produits utilisés pour réaliser la purification de l'ARN. Aucune amplification, et donc contamination, n'a pu être mise en évidence (Annexe 4).

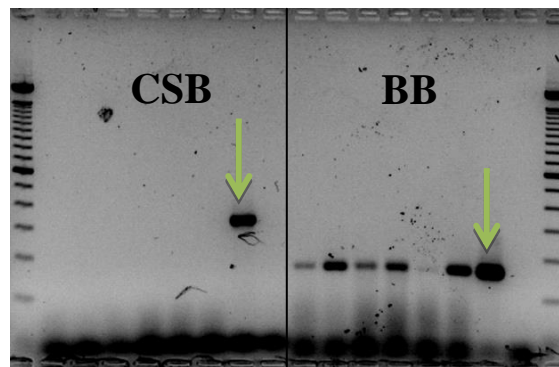


Figure 13. Résultats d'une PCR CSB et BB. Les zones indiquées par une flèche verte correspondent respectivement au témoin positif de la PCR CSB et BB. Les échantillons ont préalablement été traités avec le kit Direct-zol™ RNA MiniPrep dont l'étape de DNase a été allongée à 1 h.

L'ensemble de ces résultats PCR a entraîné diverses interrogations sur les exigences liées aux échantillons destinés à une analyse RNAseq. L'objectif est, en effet, de purifier l'ARN et d'éliminer l'ADN présent au sein de l'échantillon tout en conservant une qualité de l'ARN suffisante pour la bonne conduite des analyses futures. Il est donc nécessaire de trouver un compromis pour un traitement DNase efficace sans pour autant entraîner une trop importante dégradation de l'ARN.

L'ensemble des différents traitements testés jusqu'à présent ne donnaient d'amplification lors de PCR CSB mais certaines amplifications étaient visualisées suite aux PCR BB dont les fragments amplifiés sont seulement de 167 pb (pour 337 pb avec la PCR CSB) et qui sont donc peu spécifiques. Il est donc envisageable que seules des traces d'ADN persistent au sein de l'échantillon et qu'une PCR peu spécifique comme BB peut parfois les mettre en évidence. Il semble donc préférable de se limiter à un seul traitement DNase compris lors de la procédure du kit Direct-zol™ avec une durée de seulement 15 minutes.

Une PCR CSB des échantillons destinés à l'analyse RNAseq a donc été réalisée pour vérifier l'absence d'amplification d'ADN. En effet, comme développé ci-dessus, seule une PCR BB avait été réalisée avec ces échantillons. Comme supposé, la visualisation des résultats de cette dernière PCR n'a mis en évidence

aucun produit PCR. L'analyse Bioanalyzer de ces échantillons a donc finalement été réalisée dont les résultats sont repris dans le tableau 13 et la figure 14.

Tableau 13. Résultats obtenus par analyse Bioanalyzer des échantillons pour l'analyse RNAseq avec PZA. Les échantillons ont été tout d'abord traités avec le kit Direct-zol™ RNA MiniPrep comprenant une étape DNase de 15 minutes. Ensuite, les échantillons de la souche H37Rv ont été traités avec une seconde étape DNase à l'aide du kit TURBO DNA-free™ durant laquelle ils ont été incubés 30 minutes à 37°C avec la DNase tandis que les échantillons de la souche 041195 ont également été traités avec cette étape DNase supplémentaire mais qui a duré 1 h à 37°C au lieu de 30 minutes. Le RIN correspond à l'intégrité de l'ARN et est un indicateur de la qualité de l'échantillon.

Echantillon :	H37Rv		041195	
	RIN	Concentration en ARN	RIN	Concentration en ARN
T0 - A1	3	97 ng/μl	2.3	41 ng/μl
T0 - B1	7.2	159 ng/μl	2.4	28 ng/μl
T0 - C1	/	106 ng/μl	2.5	78 ng/μl
T6 - PZA - A1	/	93 ng/μl	2.4	14 ng/μl
T6 - PZA - B1	5.7	130 ng/μl	2.5	18 ng/μl
T6 - PZA - C1	6.8	174 ng/μl	2.5	26 ng/μl
T6 - mQ - A1	3.1	125 ng/μl	/	283 ng/μl
T6 - mQ - B1	7	81 ng/μl	/	53 ng/μl
T6 - mQ - C1	7.7	132 ng/μl	2.4	67 ng/μl
T24 - PZA - A1	3.7	146 ng/μl	-	-
T24 - PZA - B1	/	44 ng/μl	-	-
T24 - PZA - C1	6.5	136 ng/μl	-	-
T24 - mQ - A1	4.5	114 ng/μl	-	-
T24 - mQ - B1	6.2	155 ng/μl	-	-
T24 - mQ - C1	6.7	111 ng/μl	-	-

Les résultats obtenus pour les échantillons de la souche 041195 indiquaient de tellement faibles concentrations en ARN (tableau 13) et des profils de si mauvaise qualité (figure 14) qu'il a été décidé d'interrompre l'analyse car l'ensemble des échantillons doit être approuvé pour l'analyse RNAseq. Il est, en effet, impossible de distinguer les deux pics caractérisant la qualité des échantillons. Les échantillons de la souche H37Rv présentent de meilleurs résultats en termes de concentration et de qualité. Cette différence entre les deux souches peut s'expliquer par la différence de temps du traitement DNase supplémentaire à 37°C : 30 minutes pour H37Rv et 1 h pour 041195. Néanmoins, les échantillons de H37Rv semblent de faibles concentrations en comparaison des essais précédents avec le kit Direct-zol™. Le traitement avec le TURBO DNA-free™ semble donc nuire à la qualité des échantillons d'ARN sans pour autant permettre une meilleure dégradation de l'ADN. Au vu de la faible qualité des échantillons, même pour la souche H37Rv où le profil obtenu ne permet pas toujours de définir les pics 16S et 23S, et des faibles concentrations d'ARN quantifiées, il a été décidé de refaire de nouveaux échantillons destinés à l'analyse RNAseq avec PZA.

Le traitement choisi pour purifier l'ARN de ces futurs échantillons est donc celui kit Direct-zol™, comprenant 15 minutes d'incubation avec DNase, sans étape supplémentaire. En effet, il permet le meilleur compromis pour purifier l'ARN sans trop le dégrader.

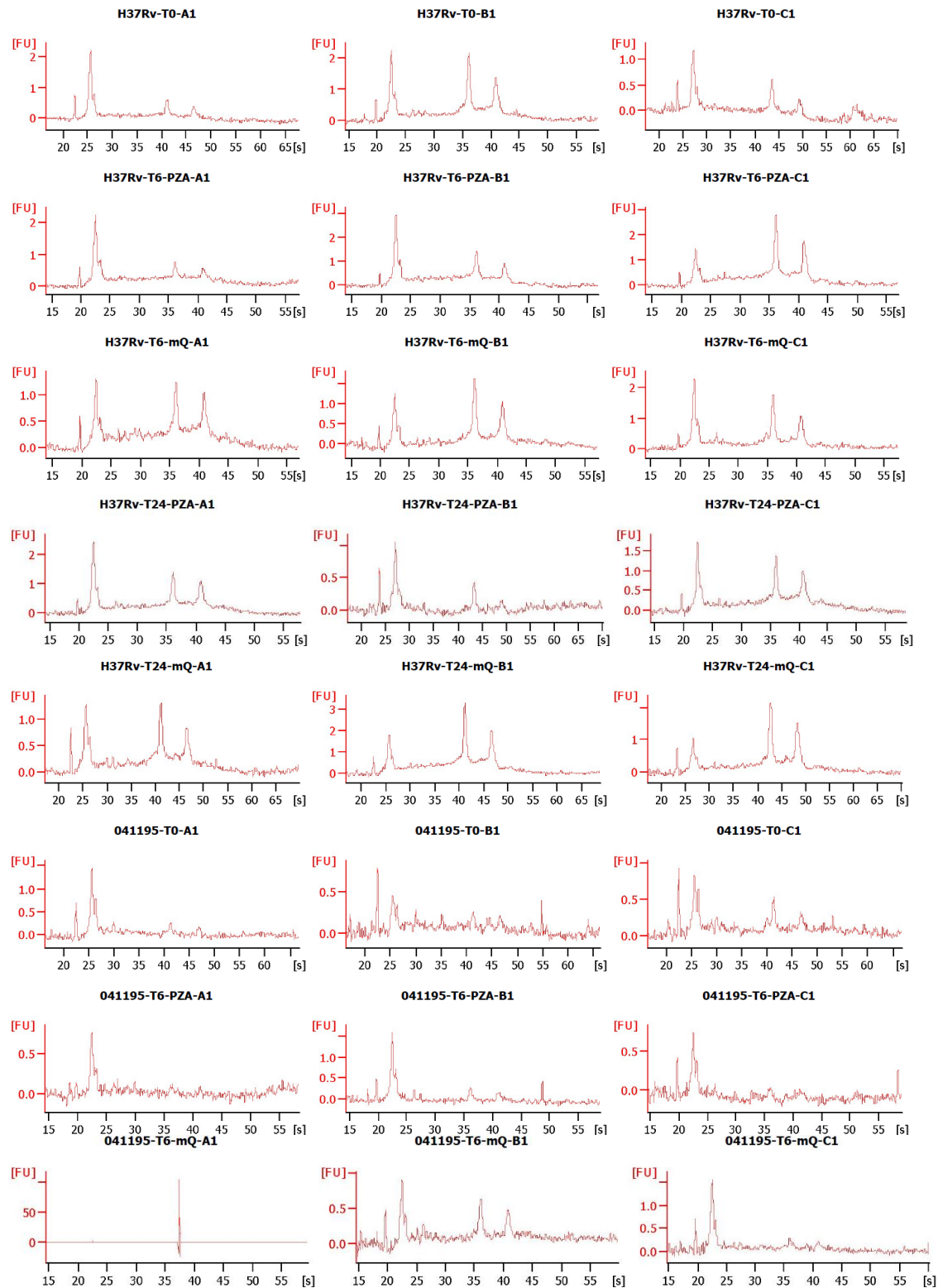


Figure 14. Intensité fluorescente des ARNs séparés par migration obtenue par un bioanalyzer. Ces électrophorégrammes correspondent aux échantillons destinés à l'analyse RNAseq avec PZA. Les échantillons ont été tout d'abord traités avec le kit Direct-zol™ RNA MiniPrep avec une étape DNase de 15 minutes. Ensuite, les échantillons de la souche H37Rv ont été traités avec une seconde étape DNase à l'aide du kit TURBO DNA-free™ où ils ont été incubés 30 minutes à 37°C avec la DNase tandis que les échantillons de la souche 041195 ont également été traités avec cette étape DNase supplémentaire mais qui a duré 1 h à 37°C au lieu de 30 minutes.

2. Optimisation de l'analyse Luminex

Cette partie est consacrée à optimiser les paramètres de la méthode de référence avec INH à partir des conditions reprises dans l'encadré 1 et qui consiste à incuber une culture à 37°C jusqu'à ce qu'elle atteigne une $DO_{600\text{ nm}}$ de 0.3 pour ensuite la séparer en deux. Dans l'une des parties de la culture, de l'INH sera ajouté et, dans l'autre, de l'eau. Ces cultures seront ensuite incubées pendant 6 h avant d'être inactivées par de l'éthanol à 70%. Cette étape permet d'arrêter tous les processus métaboliques (y compris la transcription) de la bactérie. Par conséquent, les manipulations qui suivront et le stress qu'elles pourraient engendrer ne peuvent pas influencer les niveaux d'expression de l'ARN. Les bactéries seront alors lysées pour quantifier certains ARNs cibles à l'aide d'un kit commercial (QuantiGene Plex, QGP) et d'un Bio-Plex® MAGPIX™ Multiplex Reader (cfr. « 3. Analyses Luminex » de la partie « III. Matériels et méthodes »). Comme mentionné dans la description du projet, différents paramètres doivent être testés :

- la méthode de lyse
- le temps de croissance bactérienne avant l'analyse
- le temps d'incubation suite à l'ajout de l'antibiotique
- la concentration de l'antibiotique au sein de la culture

2.1. Optimisation de la lyse bactérienne

L'objectif de la lyse bactérienne est donc de libérer l'ARN exprimé, après un temps d'incubation de la culture en présence d'INH et de l'inactivation de cette culture. L'ARN sera ensuite détecté par le Bio-Plex® MAGPIX™ Multiplex Reader (cfr. « 3. Analyses Luminex » de la partie « III. Matériels et méthodes »). La méthode doit donc être suffisamment efficace pour permettre la détection de cet ARN et n'est pas supposée avoir d'impact sur les résultats SPD. Si la lyse est efficace, la méthode sera donc sélectionnée sur base du temps qu'elle prend, de sa capacité en échantillons par cycle d'analyse, du travail qu'elle requiert en terme de manipulations ainsi que de son prix et du matériel nécessaire pour réaliser la méthode. Il est important de préciser que l'analyse Luminex peut traiter 96 échantillons par cycle d'analyse (dans lesquels la culture avec l'antibiotique et son équivalent avec le solvant sont considérées comme deux échantillons).

Pour optimiser cette lyse, deux types d'analyses ont été réalisées suite à l'essai de techniques de lyse bactérienne. Le premier type d'analyse est réalisé avec un versafluor (cfr. « 2.3. Contrôle de la qualité des échantillons d'ARN ou d'ADN » de la partie « III. Matériels et méthodes ») qui mesure la fluorescence d'un marqueur ajouté aux échantillons et permet de quantifier l'ADN présent. Les résultats obtenus avec le versafluor sont exprimés en RFU (Relative Fluorescence Units) puis convertis en une concentration

d'ADN présent dans l'échantillon grâce à une courbe de calibration. Le principe est que, plus la concentration en ADN est importante au sein de l'échantillon, plus la lyse bactérienne a été efficace et a permis de laisser sortir l'ADN de la bactérie. Pour ce type d'analyse, trois réplicats sont réalisés par traitement différent et les échantillons testés proviennent de cultures de la souche H37Rv incubées à 37°C jusqu'à une $DO_{600\text{ nm}}$ de 0.3 puis inactivées par de l'éthanol à 70% (cfr. « 1.4. Inactivation des cultures » de la partie « III. Matériels et méthodes »). Cette technique a pour avantage de donner rapidement une idée de l'efficacité de la lyse des cellules bactériennes et à moindre coût. Si les résultats du versafleur sont encourageants, le second type d'analyse, l'analyse Luminex (cfr. « 3. Analyses Luminex » de la partie « III. Matériels et méthodes »), sera réalisé. Pour cette seconde analyse, chaque culture est séparée en deux puis l'une des parties est incubée avec de l'INH et l'autre avec de l'eau pendant un temps donné afin de calculer un ratio des résultats absolus (exprimés en MFI) de ces cultures pour chaque ARN cible et définir une valeur SPD unique par souche en combinant les résultats des ARNs. Cette valeur est proche de 0 pour les souches sensibles à INH et de 1 pour celles qui y sont résistantes.

Essai de trois méthodes : bead-beating, shaking et traitement thermique.

Pour chacune de ces trois techniques, une première analyse Luminex a tout d'abord été réalisée avec quatre souches: une souche sensible à INH, S16BD03137, une résistante à 0.4 µg/ml d'INH également appelée « avec un haut niveau de résistance », S16BD03197, et deux souches avec un bas niveau de résistance (résistantes à 0.1 µg/ml d'INH mais sensibles à 0.4 µg/ml), S16BD04256 et S16BD04768. Elles ont été cultivées jusqu'à une $DO_{600\text{ nm}}$ de 0.3 avant d'être séparées en deux cultures. La partie sous INH de ces souches a respectivement été en présence de 0.1, 1 et 0.4 µg/ml pendant 6h et 0.4 µg/ml d'INH pendant 3 h pour la dernière, S16BD04768. Ces cultures ont donc été traitées avec trois méthodes de lyse dont les caractéristiques sont reprises dans le tableau 14 tandis que les résultats SPD sont représentés dans la figure 15.

Tableau 14. Capacité en échantillons de trois techniques de lyse, le bead-beating, le shaking et le traitement thermique (à l'aide d'un four), ainsi que le traitement correspondant testé sur quatre souches et analysé par analyse Luminex.

	Bead-beating	Shaking	Four
Traitement:	3 x 1 min	1 h à 1000 rpm	5 min à 95°C
Capacité:	16 échantillons	96 échantillons	96 échantillons

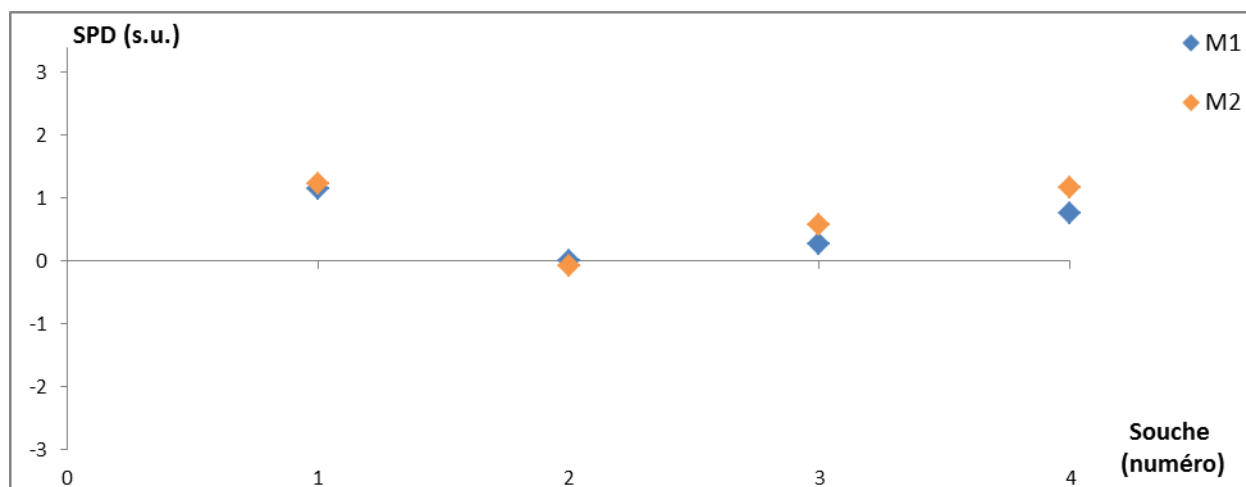


Figure 15. Résultats SPD (sans unité) de quatre souches (respectivement, de gauche à droite, (1) S16BD03137 (sensible à INH), (2) S16BD04256 (avec un bas niveau de résistance à INH), (3) S16BD03197 (avec un haut niveau de résistance à INH) et (4) S16BD04768 avec un bas niveau de résistance à INH) suite à l'essai, pour chacune des souches, de trois méthodes de lyse bactérienne: trois fois 1 minute de bead-beating (M1) et 1 h de shaking à 1000 rpm (M2). Les souches ont préalablement été cultivées jusqu'à une $DO_{600\text{ nm}}$ de 0.3 avant d'être séparées en deux cultures. Dans l'une des parties, respectivement pour S16BD03137, S16BD04256, S16BD03197 et S16BD04768, 0.1 $\mu\text{g/ml}$, 0.4 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$ et 0.4 $\mu\text{g/ml}$ d'INH ont été ajoutés et de l'eau a été ajoutée dans l'autre partie. Ces cultures ont ensuite été incubées 6 h pour les trois premières souches et 3 h pour la dernière avant d'être inactivées par de l'éthanol à 70 %.

Le tableau 15 reprend les MFI obtenus, par gène, pour chaque échantillon ainsi que la limite de détection calculée selon la formule: « Le LOD est égal à la moyenne des blancs additionnée à trois fois leur écart-type ». Les résultats du traitement thermique (Four) ne sont pas présents dans la figure ci-dessus car le signal, exprimé en MFI (Median Fluorescence Intensity), permettant de quantifier les ARNs cibles était, pour certains de ces gènes (en rouge dans le tableau 15), sous la limite de détection. Ils ne permettent donc pas de calculer les SPDs de cette méthode de lyse. Cette faible quantification des ARNs serait, semble-t-il, liée à l'incapacité de ce traitement à lyser les cellules bactériennes de manière suffisamment efficace pour en libérer l'ARN.

En ce qui concerne les deux autres méthodes, il est possible d'observer sur la figure 15 qu'il semble n'y avoir, comme attendu, que relativement peu de variation du SPD entre la méthode du bead-beating et du shaking. Compte tenu du fait que la lyse n'influence pas les valeurs de SPD et que celles-ci présentent des variations relativement faibles d'une mesure à l'autre, une explication à ces différences est que ces variations sont potentiellement liées à la manipulation des échantillons et/ou la détection des ARNs cibles. Il y a, en effet, toujours des variations d'un réplicat à un autre mais il serait intéressant de réaliser plus d'essais pour se faire une idée de l'ordre de grandeur de ces variations.

Les SPD, c'est-à-dire les résultats relatifs, sont donc à peu près équivalents pour le bead-beating et le shaking mais une observation de leurs résultats absolus, présentés dans le tableau 15, permet de se donner une idée plus précise de l'efficacité de la lyse. En effet, bien que les deux autres méthodes aient permis de quantifier le SPD des souches, il est possible de constater que, excepté pour l'ARN « INH_R5 » de l'échantillon « S16BD04768_0/3h » (en vert dans le tableau), l'ensemble des résultats des échantillons lysés par bead-beating (M1) est supérieur à ceux lysés par le shaker en comparant les MFI d'échantillons équivalents. Cela suggère que la lyse par M1 est plus efficace que celle par M2 et permet donc une meilleure détection des ARNs cibles.

Tableau 15. MFI des neuf ARNs cibles et leur LOD de quatre souches lysées avec trois traitements différents. Ces traitements sont 3 fois 1 minute de bead-beating (M1), 1 h de shaking à 1000 rpm (M2) et 5 minutes à 95°C (M3). Pour chaque méthode, une partie de la culture de chaque souche a été incubée 6 h avec de l'eau, excepté S16BD04768 qui a été incubé 3 h, et une autre partie avec INH: 0.1 µg/ml d'INH pour S16BD03137, 0.4 µg/ml pour S16BD04256, 1 µg/ml pour S16BD03197 pendant 6 h et 0.4 µg/ml pendant 3 h pour S16BD04768. Les valeurs mises en rouge sont sous le LOD correspondant. Les deux valeurs en vert correspondent à l'unique cas où la valeur obtenue par un échantillon lysé par M1 n'est pas supérieure à celle de l'échantillon équivalent traité avec M2.

Echantillon/ARN cible	INH_R1	INH_R2	INH_R3	INH_R4	INH_R5	INH_R6	INH_N1	INH_N2	INH_N3
S16BD03137_0_M1	24990	6580.5	3471	2150	8087	16732	582	624	884.5
S16BD03137_0.1_M1	25401	8950.5	4786	2623	11166	20283	755.5	892.5	1223
S16BD04256_0_M1	14471	4004	3207	6611.5	5716.5	16982	1121	1329	1835
S16BD04256_0.4_M1	19374	5425	3416.5	1682.5	6677	16612	617	520	1013
S16BD03197_0_M1	1962	698	305	1778	1068	2012	247	260	471
S16BD03197_1.0_M1	6702	1559.5	722.5	2382.5	2371	5697.5	371.5	441	626.5
S16BD04768_0/3h_M1	1213	342	293	868.5	406	1500	192	145	230.5
S16BD04768_0.4/3h_M1	1487	362	343.5	841.5	513	1634.5	191	142	238
S16BD03137_0_M2	17216	4351	2135	1282	5207	9977	299	250	534
S16BD03137_0.1_M2	14660	3321	1655	1082	4215.5	9681	297	243	449
S16BD04256_0_M2	4906	996	1001	2784	1561.5	6724	326	252	693
S16BD04256_0.4_M2	16117	4414.5	2640	1125	5076	13140	296	224	602
S16BD03197_0_M2	1865	506	230	1433.5	807.5	1840	153.5	178	325
S16BD03197_1.0_M2	2537	612	258	1178.5	851	1897.5	161	148.5	273
S16BD04768_0/3h_M2	1115	290	258	718	407	1432	124.5	81.5	164.5
S16BD04768_0.4/3h_M2	697	226.5	190	425	295	1042.5	107	75	119
S16BD03137_0_M3	169.5	45	40	26	213	197	21	19	26.5
S16BD03137_0.1_M3	226.5	64.5	50	26	286	266	23	21	31
S16BD04256_0_M3	69.5	38	37	38	143	161.5	23	22	32
S16BD04256_0.4_M3	320	66	75.5	33	333	513	30	36	38.5
S16BD03197_0_M3	52	23	18	21	37	33	18	15	18
S16BD03197_1.0_M3	87	26	23	24	56	60	20	18	21
S16BD04768_0/3h_M3	84.5	25	26	21	33	35	20.5	19	18
S16BD04768_0.4/3h_M3	162	22	22	20	33	32	19	17	18
Moyenne des blancs	54.25	23.5	17.5	17.5	17.5	20.75	23	18.5	17
Ecart-type	0.35	4.95	2.12	2.12	0.71	2.48	7.07	0.71	1.41
LOD	55.3	38.3	23.9	23.9	19.6	28.2	44.2	20.6	21.2

Suite à ces résultats, ces trois méthodes ont à nouveau été testées mais par une analyse avec le versafleur et avec différents paramètres repris dans le tableau 16. Il a, en effet, été envisagé que, d'une part, le traitement thermique nécessitait plus de temps pour parvenir à lyser les bactéries et que, d'autre part, un shaking avec un plus haut réglage en rotations par minute (rpm) permettrait peut-être d'atteindre le niveau de lyse du bead-beating. La concentration moyenne en ADN obtenue des trois réplicats est reprise pour chaque traitement est reprise dans le tableau 16.

Tableau 16. Paramètres des traitements de lyse testés et analyses par versafleur et la concentration moyenne en ADN obtenue. Les résultats obtenus en RFU ont été convertis par la droite de calibration « RFU = 15.136 ng/ml d'ADN - 12.801 » dont le R² vaut 1.

Méthode:	Traitement	Concentration moyenne en ADN (ng/μl)
Bead-beating	3 x 1 min	12.34 ± 3.25
	1 h à 1000 rpm	2.84 ± 0.34
Shaking	1 h à 1200 rpm	7.09 ± 2.28
	1 h à 1400 rpm	15.16 ± 1.88
	5 min à 95°C	0.82 ± 0.17
Four	15 min à 95°C	1.55 ± 0.11
	30 min à 95°C	2.62 ± 0.28

Comme les résultats précédents le suggèrent, le traitement thermique de 5 minutes donne une concentration en ADN moyenne plus de dix fois inférieure à celle obtenue par la méthode de référence, le bead-beating. Les autres traitements thermiques laissent supposer qu'en augmentant la durée du traitement à 95°C, la concentration en ADN, et donc l'efficacité de la lyse, augmente mais ces valeurs restent relativement faibles comparées à celle obtenue par bead-beating. Concernant le shaker, la valeur obtenue pour la lyse à 1000 rpm semble relativement faible comparée à son efficacité démontrée au cours de l'analyse Luminex précédente. Néanmoins, il est possible d'observer une augmentation de la concentration en ADN détecté en augmentant les rotations par minutes (rpm). Le traitement à 1400 rpm semble même permettre d'atteindre une lyse aussi efficace que celle par bead-beating. Des essais supplémentaires sont nécessaires pour avoir une idée plus fiable de l'efficacité de la lyse bactérienne par différents traitements de shaking. Il faut également noter que si la méthode de shaking est préférée aux autres techniques de lyse, cette étape sera effectuée avec un shaker ne pouvant atteindre que maximum 1200 rpm mais équipé d'un adaptateur permettant d'y placer des plaques de 96 puits. Il a donc été décidé, d'une part, d'arrêter les essais de lyse par traitement thermique et, d'autre part, de réaliser un nouvel essai de lyse bactérienne par shaking dont un à 1200 rpm mais plus long que celui réalisé précédemment.

Essai de trois méthodes : bead-beating, shaking et sonication.

Différents traitements utilisant ces techniques ont tout d'abord été essayés puis analysés à l'aide du versafluor, dont les résultats sont repris dans le tableau 17. Il est intéressant de préciser que le sonicateur a une capacité de huit tubes par cycle d'analyse.

Tableau 17. Paramètres des traitements de lyse testés et analyses par versafluor et la concentration moyenne en ADN obtenue. La droite de calibration pour la conversion des résultats est « RFU = 13.557 ng/ml d'ADN - 34.07 (R²=0.9999) ».

Méthode:	Traitement	Concentration moyenne en ADN (ng/μl)
Bead-beating	3 x 1 min	9.90 ± 4.03
	1 h à 1200 rpm	9.08 ± 1.97
Shaking	1 h à 1400 rpm	13.89 ± 3.02
	1.5 h à 1200 rpm	15.61 ± 3.34
Sonication	1 min	19.28 ± 3.85
	2 min	18.63 ± 2.26

Ces résultats laissent supposer deux faits. Le premier est que la lyse provoquée par le sonicateur semble, et ce quel que soit le traitement, efficace comparée aux autres résultats. La seconde observation est que la lyse provoquée par le shaker à 1200 rpm pendant 1.5 h donne un résultat plus élevé que celui du shaker réglé à 1400 rpm pendant 1 h mais également que celui du bead-beating. En observant les tableaux 16 et 17, il est possible de constater qu'une certaine variabilité existe d'une analyse versafluor à une autre même si les échantillons pour estimer l'efficacité de ces traitements de lyse ont été réalisés/inactivés au sein d'une même manipulation. Il semble, en effet, que la lyse réalisée par bead-beating du tableau 17 ait été moins efficace que celle réalisée précédemment (tableau 16). Une explication possible serait une différence dans la quantité de billes ajoutées dans ces échantillons. De plus, il est également possible d'observer une certaine variabilité au sein d'une même analyse versafluor compte-tenu des écart-type obtenus (tableau 16 et 17). Ces différences peuvent être liées aux différences d'un échantillon à un autre. En effet, il est difficile d'obtenir une culture de mycobactéries homogène, ces dernières ayant tendance à s'agglomérer ensemble. La quantité de cellules bactériennes peut donc varier d'un réplicat à un autre.

Chacune de ces trois techniques a ensuite été testées avec une analyse Luminex. Pour le shaking, compte tenu de l'efficacité de la lyse démontrée par le versafluor et que le shaker avec adaptateur aux plaques de 96 puits est limité à 1200 rpm maximum, c'est le traitement « 1200 rpm pendant 1.5 h » qui a été sélectionné. Concernant le sonicateur, l'analyse versafluor laisse supposer que les deux traitements sont tout aussi efficaces. Le traitement le plus court (1 minute) a donc été choisi. L'analyse a été réalisée avec trois souches sensibles : respectivement, de gauche à droite sur la figure 16, S16BD03124, S16BD03166 et S16BD03270. Les résultats SPD de ces souches sont repris dans la figure 16 avec M1, le bead-beating, M2, le shaking de 1.5 h à 1200 rpm, et M3, le sonicateur pendant 1 minute.

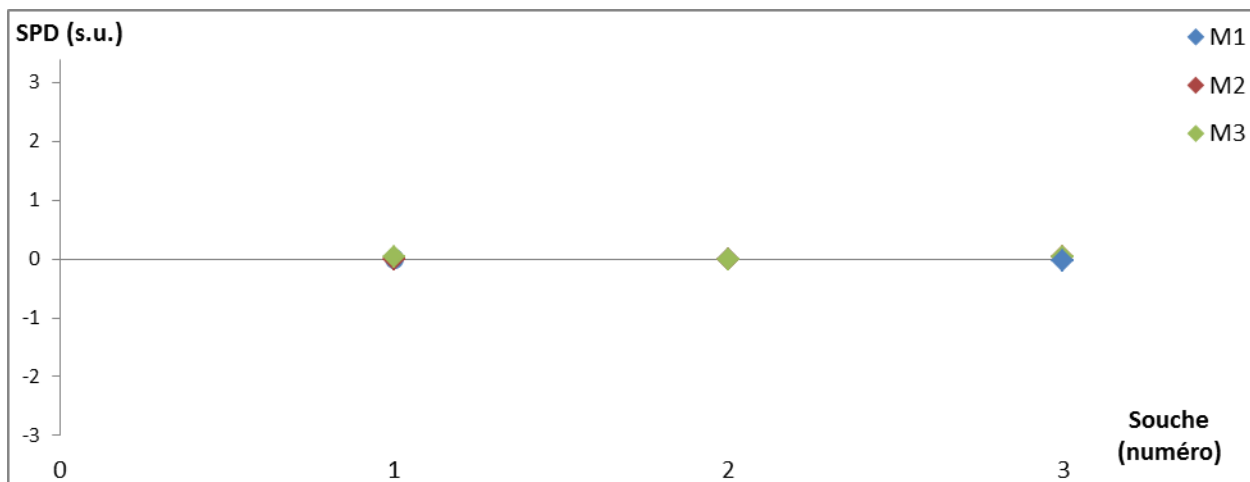


Figure 16. Résultats SPD (sans unité) de trois souches sensibles suite à l'essai, pour chacune des souches, de trois méthodes de lyse bactérienne: trois fois 1 minute de bead-beating (M1), 1.5 h de shaking à 1200 rpm (M2) et 1 minute de sonication. Les souches ont préalablement été cultivée jusqu'à une $DO_{600\text{ nm}}$ de 0.3 puis séparées en deux cultures et traitées selon les conditions de l'encadré 1. Ces souches sont respectivement (1) S16BD03124, (2) S16BD03166 et (3) S16BD03270

Comme précédemment, relativement peu de variations des valeurs de SPD sont observées d'une méthode de lyse à une autre. Et, comme attendu, les lyses ont été suffisamment efficaces pour permettre la détection des ARNs cibles et la quantification des SPD. Le tableau 18 reprend le MFI des ARNs cibles.

Tableau 18. MFI des neuf ARNs cibles et leur LOD de trois souches lysées avec trois traitements différents. Ces traitements sont 3 fois 1 minute de bead-beating (M1), 1.5 h de shaking à 1200 rpm (M2) et 1 minute de sonicateur (M3). Pour chaque méthode, une partie de la culture de chaque souche a été incubée 6 h avec de l'eau (NI) et une autre partie avec 0.4 $\mu\text{g/ml}$ d'INH (I).

Echantillon/ARN cible	INH_R1	INH_R2	INH_R3	INH_R4	INH_R5	INH_R6	INH_N1	INH_N2	INH_N3
S16BD03124_NI_M1	9913.5	2741	769.5	2954	3881.5	7118.5	336	274	945
S16BD03124_I_M1	14733	5706	1597.5	997.5	5885	9979.5	247	203.5	662
S16BD03166_NI_M1	4472.5	1221	310	1697.5	1629	4519	193	173.5	536
S16BD03166_I_M1	4614	1214.5	368.5	309	1506	3372	93	72	223
S16BD03270_NI_M1	18883	5210	2149	1455.5	5683	12042.5	240.5	313	791
S16BD03270_I_M1	6208	1582	521	2644	2082	4214	257.5	297	814
S16BD03124_NI_M2	7540	3025	705	2729	4304	5877	373	275.5	993
S16BD03124_I_M2	11643	3942	1074	711	4845.5	8343	210	141	539
S16BD03166_NI_M2	6661	2014	512	2884.5	2881	7265	343	266	973
S16BD03166_I_M2	6534	1817	585	436.5	2327.5	5046.5	113	86.5	316
S16BD03270_NI_M2	10460	3879	1216	5215	4513	8997.5	444	569.5	1389
S16BD03270_I_M2	15782	5173.5	2012	1893.5	6362	11653	310	355	965
S16BD03124_NI_M3	7043	2297	532	2009	3027.5	5287.5	332	211.5	733
S16BD03124_I_M3	23095.5	9962.5	3329.5	2108	12587	20075.5	575	388	1510
S16BD03166_NI_M3	5871.5	2477	624	3148	4048	6673.5	391.5	336	1108
S16BD03166_I_M3	6151.5	2065	418	392	2320	4103	137	83	232
S16BD03270_NI_M3	10043	2776	851	4317	3857.5	6257.5	483	393	1234.5
S16BD03270_I_M3	20408	8596	3409	2583	9026	14824	465	588	1626.5
Moyenne des blancs	95.00	21.25	14.50	13.00	16.50	16.00	21.00	15.50	12.50
Ecart-type	2.83	0.35	0.71	1.41	0.71	0.00	2.83	0.71	0.71
LOD	103.49	22.31	16.62	17.24	18.62	16.00	29.49	17.62	14.62

Contrairement aux résultats obtenus lors de l'essai précédent de méthodes de lyse, il ne semble pas y avoir une méthode qui présente nettement une détection plus importantes des ARNs cibles et donc une meilleure lyse. Pour sa facilité d'utilisation et sa capacité en échantillons (96 échantillons en 1.5 h), la méthode de shaking à 1200 rpm pendant 1.5 h pourrait potentiellement remplacer le bead-beating comme

méthode de lyse de référence. Quant au sonicateur, bien que son efficacité semble établie, son prix plus important, pour un résultat équivalent au shaking, n'en fait pas le meilleur candidat.

Essai de trois méthodes : bead-beating, shaking et tissue lyser.

Au cours de cet essai, une nouvelle méthode de lyse a été expérimentée avec un tissue lyser dont la capacité en échantillons est de 48 tubes ou de deux plaques de 96 puits par cycle d'analyse. Le même traitement de 5 minutes à 30 Hz a été testés mais avec trois différents type de billes : celles utilisées pour le bead-beating et shaking (Billes 1), celles fournies dans le « Pathogen Lysis Tube L » (Billes 2) et celles des « PowerBead Tubes » (Billes 3). Ces traitements ont été réalisés puis analysés par versafluor avec, à nouveau, le bead-beating et le shaking de 1.5 h à 1200 rpm afin de pouvoir comparer les méthodes entre elles. Les résultats sont repris dans le tableau 19.

Comme précédemment, les résultats du shaking et bead-beating sont relativement proches. Ils sont également nettement supérieurs à ceux obtenus par le tissue lyser. Compte tenu des écart-types des résultats du tissue lyser, il ne semble pas y avoir de claire différence d'efficacité liée au type de billes. Comme le traduit la valeur des écarts-type, il y a une certaine variabilité au sein des réplicats et, ce particulièrement, pour le traitement « Billes 1 » où l'un des résultats est plus de deux fois supérieur aux deux autre réplicats. Une explication plausible est une différence dans les concentrations des échantillons.

Tableau 19. Paramètres des traitements de lyse testés et analyses par versafluor et la concentration moyenne en ADN obtenue. Les billes 1 correspondent aux billes de 0.5 mm en silice et zircone utilisées pour le bead-beating et le shaking, les billes 2 à celles du «Pathogen Lysis Tube L » et les billes 3 à celles des « PowerBead Tubes ». Les résultats ont été convertis par la droite « RFU = 8.1549 ng/ml d'ADN + 52.798 et R² = 0.9973 ».

Méthode:	Traitement	Concentration moyenne en ADN (ng/μl)
Bead-beating	3 x 1 min	35.29 ± 9.76
Shaking	1.5 h à 1200 rpm	35.62 ± 13.23
	Billes 1	15.30 ± 9.10
Tissue lyser	Billes 2	10.34 ± 1.68
	Billes 3	9.34 ± 3.92

Un nouvel essai a, par après, été réalisé pour y tester des traitements plus longs mais également avec plus de billes. Compte tenu que le type de billes ne semble pas avoir d'impact sur les résultats, ces nouveaux traitements ont été réalisés avec les billes 3 (PowerBead Tubes). L'essai sur la méthode de shaking n'a pas été réitéré car son efficacité relativement équivalente au bead-beating a déjà observé. Le bead-beating a néanmoins été à nouveau réalisé pour comparer son résultat à celui des nouveaux essais. De plus, les échantillons précédents lysés par bead-beating (tableau 19) ont à nouveau été analysés par versafluor afin de se faire une idée de la variabilité des résultats d'une analyse versafluor à une autre. Les résultats sont repris dans le tableau 20.

Tableau 20. Paramètres des traitements de lyse testés et analyses par versafluor et la concentration moyenne en ADN obtenue. Les billes 3 correspondent à celles des « PowerBead Tubes ». Le traitement « Billes 3 » est équivalent à celui réalisé précédemment (5 minutes à 30 Hz). Le traitement « Billes 3 – 10 min » est le même mais réalisé deux fois d'affilé (deux fois 5 minutes) et le « Billes 3 – 15 min », trois fois de suite. Le traitement « Billes 3 – Plus de billes » est le même que le « Billes 3 » mais avec un volume de 0.4 ml de billes. L'équation de la courbe de calibration est « RFU = 8.0404 ng/ml d'ADN + 131.84 » avec un R² de 0.9922.

Méthode:	Traitement	Concentration moyenne en ADN (ng/μl)
Bead-beating	3 x 1 min A*	29.85 ± 20.91
	3 x 1 min B	30.56 ± 9.38
Tissue lyser	Billes 3	5.09 ± 1.22
	Billes 3 – 10 min	11.69 ± 6.69
	Billes 3 – 15 min	9.62 ± 1.53
	Billes 3 – Plus de billes	5.19 ± 1.76

*Echantillons utilisés lors du versafluor précédent (Tableau 19).

Une première observation est que l'ensemble des résultats des traitements impliquant le tissue lyser sont inférieurs à ceux du bead-beating. Les résultats des deux traitements par bead-beating sont relativement proches bien que celui du bead-beating réalisé antérieurement ait un écart-type assez important par rapport aux autres. De plus, il est possible d'observer une certaine variabilité pour cet échantillon entre les deux analyses versafluor (tableau 19 et 20).

Globalement, ces différents essais ont permis d'avoir une idée sur l'efficacité de différents traitements de lyse des mycobactéries et ont permis d'exclure les traitements thermiques et ceux impliquant le tissue lyser. Bien que le sonicateur semble permettre une lyse efficace, son prix relativement important, sa capacité d'échantillon et les manipulations qu'elle requiert n'en font pas la méthode la plus adaptée. A l'opposé, le shaking à 1200 rpm pendant 1 h 30 permet une lyse suffisamment efficace pour la méthode et ne requiert que peu de manipulations pour traiter les 96 échantillons à traiter par analyse Luminex. Cette méthode semble donc la plus adéquate pour ce projet.

2.2. Optimisation au niveau de la croissance bactérienne

Dans cette partie, l'objectif est d'estimer, d'une part, le niveau de croissance minimum des cultures avant d'être diluées et traitées selon la méthode du projet, de manière à avoir suffisamment de cellules bactériennes pour dépasser la limite de détection de l'analyse Luminex. D'autre part, il sera question d'estimer le temps d'incubation nécessaire après dilution des échantillons pour permettre une claire et rapide réponse transcriptionnelle et donc une quantification fiable du SPD de ces cultures. La dilution des échantillons est nécessaire pour pouvoir créer plusieurs sous-cultures afin de tester différentes concentrations d'antibiotiques ou des médicaments différents (dans un stade ultérieur du projet). Ces conditions de croissance doivent permettre aux bactéries d'avoir un métabolisme actif pour montrer une réponse transcriptionnelle rapide et ne doivent pas avoir d'influence sur la fiabilité des résultats. L'intérêt est donc d'assurer l'obtention de résultats fiables le plus rapidement possible.

Par conséquent, un premier essai a été réalisé avec quatre souches, avec, pour chacune d'elles, douze combinaisons d'incubation avant l'ajout de l'antibiotique (cfr. « 3. Analyses Luminex » de la partie « III. Matériels et méthodes ») en modifiant deux paramètres de croissance (Figure 14). Le premier paramètre est le temps d'incubation des tubes MGIT™ dans le BACTEC™ avant la dilution de dix fois de l'échantillon (en inoculant un milieu Middlebrook 7H9 pour réaliser de nouvelles sous-cultures) à partir du moment où ce dernier a été détecté comme positif: 4, 3 et 2 jours. Le second paramètre est le temps d'incubation à 37°C après la ré-inoculation de l'échantillon et avant l'ajout d'INH/mQ (cfr. « 3. Analyses Luminex » de la partie « III. Matériels et méthodes »): 1, 2, 3 et 4 jours. Les souches sensibles à INH testées sont respectivement S16BD03273, S16BD03166, S16BD03124 et S16BD03137. Les valeurs de SPD obtenues sont représentées dans la figure 14. Il est important de préciser qu'en pratique, l'objectif de cette méthode est qu'après détection de la présence de *M. tuberculosis* au sein d'un échantillon clinique (grâce à la détection par le BACTEC™), le tube MGIT™ en question soit envoyé pour diagnostiquer les éventuelles résistances aux antibiotiques. Les antibiotiques testés par cette méthode seraient de seconde ligne mais également de première ligne si l'hôpital ne dispose pas de l'infrastructure nécessaire à ces antibiogrammes. Compte tenu du fait que le transport peut prendre 2 à 4 jours, il est intéressant d'estimer l'influence que ce délai peut représenter sur l'analyse Luminex.

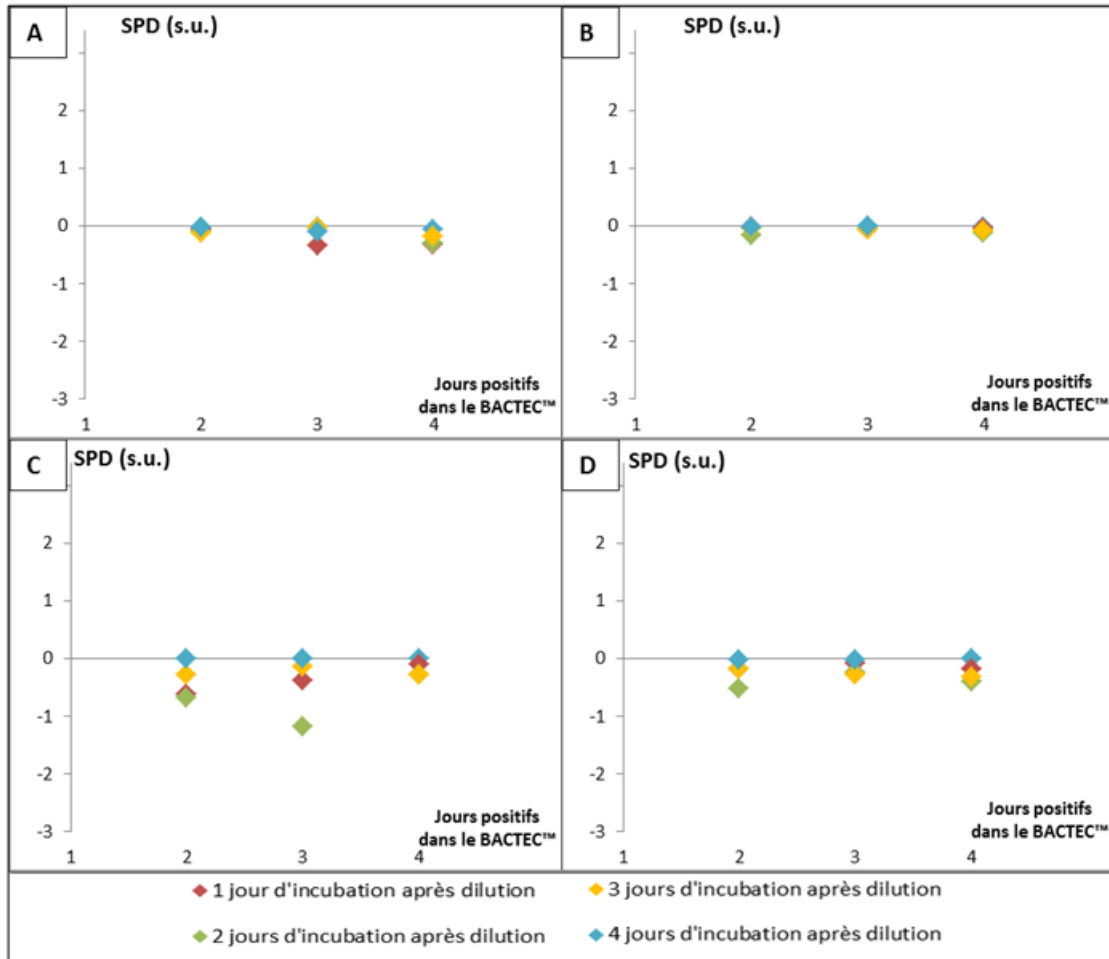


Figure 17. Résultats SPD (sans unité) de quatre souches sensibles, S16BD03273 (A), S16BD03166 (B), S16BD03124 (C) et S16BD03137 (D), testées avec douze combinaisons de deux paramètres de croissance bactérienne. Le premier paramètre est le temps d'incubation avant la dilution de dix fois de l'échantillon à partir du moment où ce dernier est détecté comme positif par le BACTEC™ (2, 3, 4 jours sur l'abscisse) et le deuxième paramètre est le temps d'incubation après dilution de l'échantillon. Après dilution et ré-incubation, les cultures ont été séparées en deux parties. Dans l'une, de l'eau a été ajoutée et, dans l'autre, 0.4 µg/ml d'INH. Les cultures ont ensuite été à nouveau incubées pendant 6 h avant d'être inactivées par de l'éthanol 70 % et lysées par bead-beating.

Compte tenu de l'efficacité de l'ensemble de ces conditions, un deuxième test a été effectué pour vérifier si les échantillons peuvent être utilisés directement après dilution (du tube MGIT™), au lieu d'incuber l'échantillon dilué au moins 1 jour avant l'ajout du médicament. En éliminant cette étape, il serait donc possible de gagner un jour complet pour l'obtention des résultats. De plus, bien que les conditions du test précédent aient permis une détection suffisante des ARNs, une diminution du facteur de dilution pourrait diminuer le risque d'obtenir un MFI trop faible.

Au vu des résultats, il a donc été décidé de tester à nouveau le second paramètre (« temps d'incubation à 37°C après la dilution de l'échantillon ») avec un facteur de dilution de seulement cinq et sans nouvelle incubation avant l'ajout de l'antibiotique/solvant. Cette analyse a été réalisée avec les cinq souches

sensibles positives depuis 2 à 4 jours. Les cultures n'ont donc soit pas été ré-incubées après dilution, soit ré-incubées pendant 1 jour pour comparer les résultats obtenus (Figure 18).

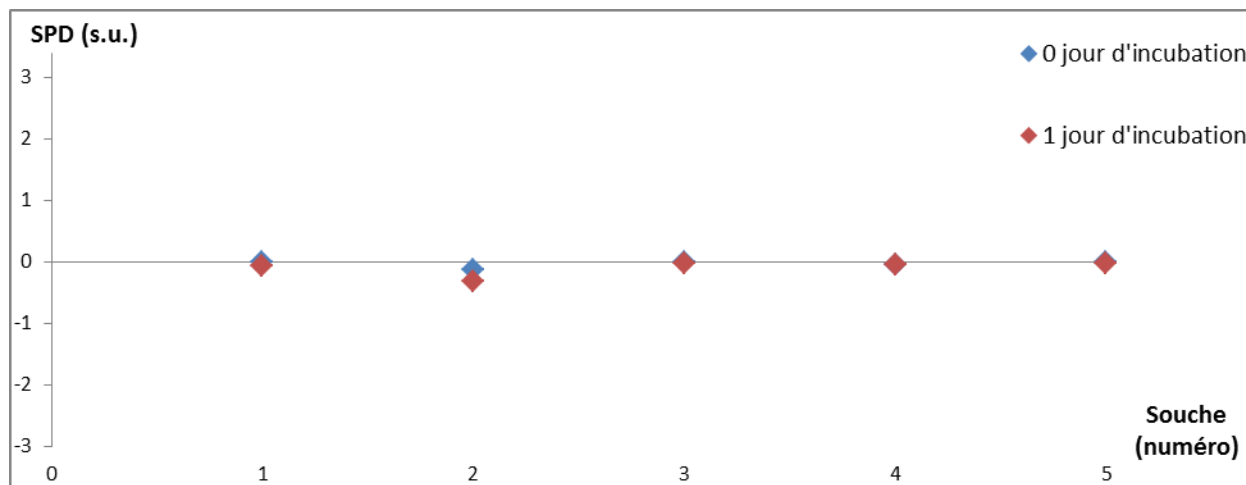


Figure 18. Résultats SPD (sans unité) de cinq souches sensibles (de gauche à droite sur l'abscisse, (1) S16BD03273, (2) S16BD03137, (3) S16BD03270, (4) S16BD03166 et (5) S16BD03124 et positives selon le BACTEC™ depuis 2 à 4 jours). Les cultures ont été séparées en deux pour que l'une des parties soit incubée 1 jour avec une dilution de cinq fois tandis que l'autre a directement été traitée après la dilution. Après leur délai d'incubation respectif atteint, les cultures sont à nouveau séparées en deux pour que, dans l'une, de l'eau soit ajoutée et, dans l'autre, 0,4 µg/ml d'INH. Les cultures sont alors incubées 6 h avec le solvant ou antibiotique puis inactivées par éthanol et lysées par shaking (1200 rpm pendant 1 h 30).

Comme espéré, même sans incubation après la dilution de cinq fois, les valeurs des SPD sont relativement proches pour chacune des souches et sont, comme attendu, égales ou inférieures à 0. Il est donc possible de considérer que ces variations dans les conditions de croissance bactérienne testées ne semblent pas influencer la fiabilité des résultats. Ces nouvelles conditions peuvent donc être définies comme alternatives à celle de la méthode de référence (encadré 1). Les conditions de départ des souches pour analyse Luminex peuvent donc désormais correspondre à « positives depuis 2 à 4 jours dans le BACTEC™ puis diluées cinq fois avant d'être séparées en deux pour ajouter de l'INH dans l'une des parties et de l'eau dans l'autre ». Une étape de validation est toutefois nécessaire pour s'assurer de l'efficacité de ces conditions de départ pour l'analyse Luminex.

2.3. Optimisation du temps d'incubation suite à l'ajout de INH

Le dernier paramètre qui, modifié, permettrait de gagner du temps dans l'obtention des résultats est le temps d'incubation en présence d'INH qui est actuellement de 6 h. L'objectif est donc de définir un compromis pour obtenir un résultat rapidement tout en assurant une distinction entre les souches sensibles et résistantes à INH (supposée avoir, respectivement, un SPD de 0 et 1).

Dans ce but, quatre souches sensibles à INH (S16B03273, S16B03270, S16B03166 et S16B03124) et quatre souches avec un haut niveau de résistance (S16B01774, S16B02068, S16B03197 et S16B01808) ont été testées avec 1, 2, 3 et 6 h sous INH. Les SPD obtenus sont repris dans la figure 19.

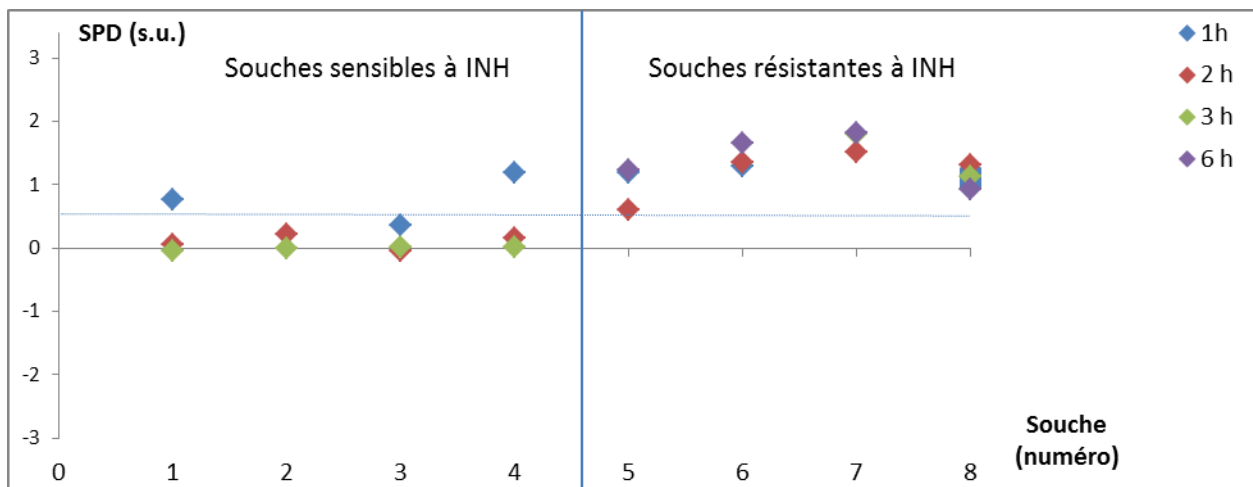


Figure 19. Résultats SPD (sans unité) de quatre souches sensibles et quatre souches résistantes à INH (de gauche à droite sur l'abscisse, (1) S16B03273, (2) S16B03270, (3) S16B03166 et (4) S16B03124 et (5) S16B01774, (6) S16B02068, (7) S16B03197 et (8) S16B01808) positives selon le BACTEC™ depuis 2 à 4 jours. Après dilution d'un facteur cinq et incubation pendant un jour, les cultures sont séparées en deux parties pour que, dans l'une, de l'eau soit ajoutée et, dans l'autre, 0,4 µg/ml d'INH. Les cultures sont alors incubées avec le solvant ou antibiotique avec le prélèvement d'un échantillon par culture après 1, 2, 3 et 6 h. Les échantillons prélevés sont alors inactivés par éthanol et lysés par bead-beating.

Dans un premier temps, il est important de noter que les SPD correspondant aux échantillons S16BD03270 après 1 h et 6 h sous INH et S16BD03137, S16BD03166, S16BD03124 après 6 h sous INH n'ont pas pu être calculés ainsi que ceux des échantillons S16BD01774 et S16BD02068 après 3 h sous INH et S16BD03197 après 1 h sous INH. En effet, certains des MFI nécessaires à cette quantification étaient anormalement faibles, probablement à cause d'une perte de matériel bactérien lors de la procédure. Comme développé précédemment, une valeur SPD proche de 0 correspond à une souche sensible tandis qu'un SPD aux alentours de 1 signifie que la souche est résistante à l'antibiotique. Il s'agit d'une détermination binaire bien qu'en pratique, des valeurs intermédiaires peuvent être obtenues. Par conséquent, un SPD de 0.5 sera envisagé comme seuil provisoire entre un comportement « sensible » ou

« résistant » à l'antibiotique (un SPD inférieur à 0.5 serait donc considéré comme un phénotype « sensible à INH » et supérieur, comme « résistant à INH »).

En se référant à ce seuil, cette analyse Luminex permet de constater que 1 h sous INH n'est pas suffisante pour mettre en évidence la sensibilité des souches sensibles à INH et qu'il n'y a donc pas un changement suffisant dans le transcriptome de ces bactéries. À partir de 2 h, cette condition limite est respectée. Deux des souches sensibles à INH (S16BD03273 et S16BD03166) ont un SPD relativement proches de 0 (0.06 et -0.04) mais cette tendance n'est pas totalement suivie par les deux autres qui ont un SPD de 0.22 pour S16BD03270 et 0.16 pour S16BD03124.

En ce qui concerne les souches résistantes à INH, il semble y avoir une certaine variabilité d'un résultat à l'autre mais qui ne permet pas de définir une réelle influence du temps d'incubation sous INH. De plus, ces souches ne sont pas supposées, compte tenu de leur résistance à INH, avoir une évolution du SPD liée à la présence de l'antibiotique. Globalement, toutes les souches résistantes ont des SPD supérieurs ou aux alentours de 1 et seul l'échantillon S16BD01774 après 2 h sous INH a un SPD relativement bas comparé aux autres, de 0.61, mais supérieur au seuil de 0.5 fixé.

Par la suite, il a été décidé de tester les conditions 2 et 3 h sous 0.4 µg/ml d'INH pour en observer les effets sur quatre souches avec un bas niveau de résistance à INH ainsi que sur une souche sensible à INH, représentées dans la figure 20.

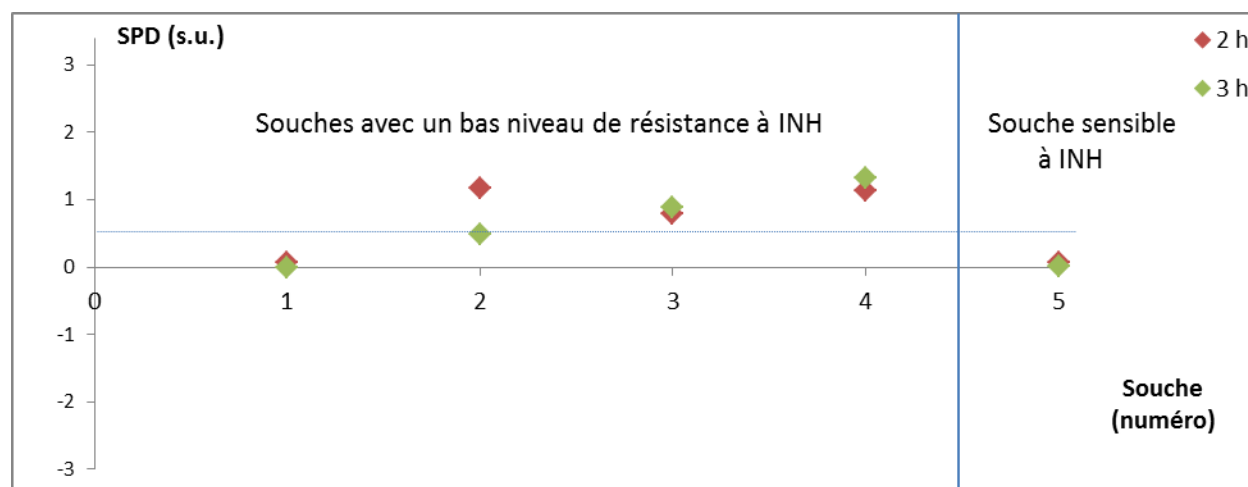


Figure 20. Résultats SPD (sans unité) de quatre souches avec un bas niveau de résistance à INH et une souche qui en est sensible (de gauche à droite sur l'abscisse, (1) S16BD00924, (2) S16BD04256, (3) S16BD03288 et (4) S16BD02654 et (5) S16BD03137) positives selon le BACTEC™ depuis 2 à 4 jours. Après dilution d'un facteur cinq et incubation pendant un jour, les cultures sont séparées en deux parties pour que, dans l'une, de l'eau soit ajoutée et, dans l'autre, 0.4 µg/ml d'INH. Les cultures sont alors incubées avec le solvant ou antibiotique avec le prélèvement d'un échantillon par culture après 2 et 3 h. Les échantillons prélevés sont alors inactivés par éthanol et lysés par bead-beating.

Concernant la souche sensible, les SPD obtenus sont, comme attendu, proches de 0 (0 pour 3 h sous INH et 0.08 pour 2 h sous INH). Pour les autres souches, avec un bas niveau de résistance, les résultats semblent plus variables. Elles sont, en effet, supposées être sensibles à la concentration de 0.4 µg/ml d'INH et donc présentées un SPD proche de 0. Néanmoins, aucun des résultats ne suit cette attente mis à

part ceux de la première souche, S16BD00924, dont les valeurs de SPD sont de respectivement 0.06 et 0.00 pour 2 et 3h sous INH. Les souches S16BD03288 et S16BD02654 présentent, quant à elles, relativement peu de différence entre les échantillons soumis à 2 ou 3 h de 0.4 µg/ml d'INH et ont toutes deux des SPD proches de 1. Finalement, en ce qui concerne la souche S16BD04256, celle-ci présente l'écart le plus important entre ses échantillons soumis 2 et 3 h à la présence d'INH, avec respectivement des SPD de 1.17 et 0.48. De manière générale, ces résultats laissent entendre que 3 h sous 0.4 µg/ml d'INH sont insuffisantes pour mettre en évidence la sensibilité, à cette concentration d'INH, de l'ensemble des souches avec un bas niveau de résistance à INH mais que ce temps semble suffisant pour les souches sensibles.

Cet essai montre que les souches avec un bas niveau de résistance sont les plus contraignantes pour définir le temps d'incubation en présence d'INH. Un nouvel essai a donc été réalisé en testant quatorze souches de ce type soumis à 3, 4 et 6 h sous 0.4 µg/ml d'INH (Figure 21).

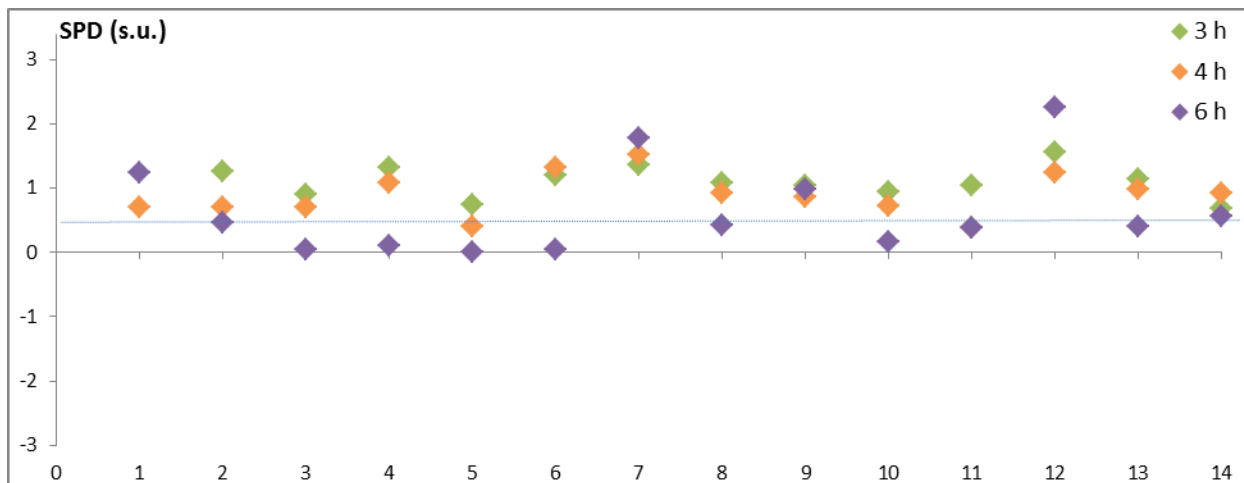


Figure 21. Résultats SPD (sans unité) de quatorze souches avec un bas niveau de résistance à INH (de gauche à droite sur l'abscisse, (1) S15BD10500, (2) S15BD08902, (3) S15BD05142, (4) S15BD05110, (5) S15BD09584, (6) S15BD09808, (7) S16BD00823, (8) S17BD00631, (9) S16BD06129, (10) S17BD01584, (11) S17BD00744, (12) S16BD08755, (13) S16BD07601 et (14) S16BD06161) positives selon le BACTEC™ depuis 2 à 4 jours. Après dilution d'un facteur cinq et incubation pendant un jour, les cultures sont séparées en deux parties pour que, dans l'une, de l'eau soit ajoutée et, dans l'autre, 0.4 µg/ml d'INH. Les cultures sont alors incubées avec le solvant ou antibiotique avec le prélèvement d'un échantillon par culture après 3, 4 et 6 h. Les échantillons prélevés sont alors inactivés par éthanol et lysés par 1 h 30 de shaking à 1200 rpm.

Dans un premier temps, il est important de noter que le SPD de l'échantillon S15BD10500 laissé 3 h sous INH n'a pas pu être calculé car certains des MFI nécessaires à cette quantification étaient anormalement faibles. Ensuite, différentes observations peuvent être faites :

- Aucune des souches laissées 3 h sous INH n'atteint un SPD inférieur au seuil de 0.5.
- Seul deux des échantillons, S15BD09584 et S17BD00744, laissés 4 h sous INH parviennent à un SPD sous le seuil, avec respectivement des SPD de 0.4 et 0.37.
- Sur les quatorze souches, neuf obtiennent un SPD inférieur à 0.5 après 6 h sous INH, dont certains avoisinent 0.

Ces constatations confirment le fait que la sensibilité des souches avec un bas niveau de résistance à 0.4 µg/ml d'INH est plus difficile à établir que pour des souches sensibles à INH. En effet, c'est seulement au bout de 6 h sous INH qu'il est possible d'observer des SPD comparables à ceux de souches sensibles. De plus, ces résultats peuvent présenter des différences relativement importantes d'une souche à l'autre et, ce particulièrement, après 6 h sous INH, comme illustré à la figure 24. Ces écarts de valeurs SPD s'expliquent par le fait qu'une souche n'est pas juste soit sensible, soit résistante à INH mais qu'il existe différents degrés de résistance à cet antibiotique. Il semble donc que 6 h sous INH soient nécessaires pour mettre en avant ces différents degrés de résistance car cette durée permet d'obtenir les valeurs SPD les plus différentes comparées aux deux autres temps d'incubation sous INH mais également d'obtenir des SPD comparables à ceux de souches sensibles à INH.

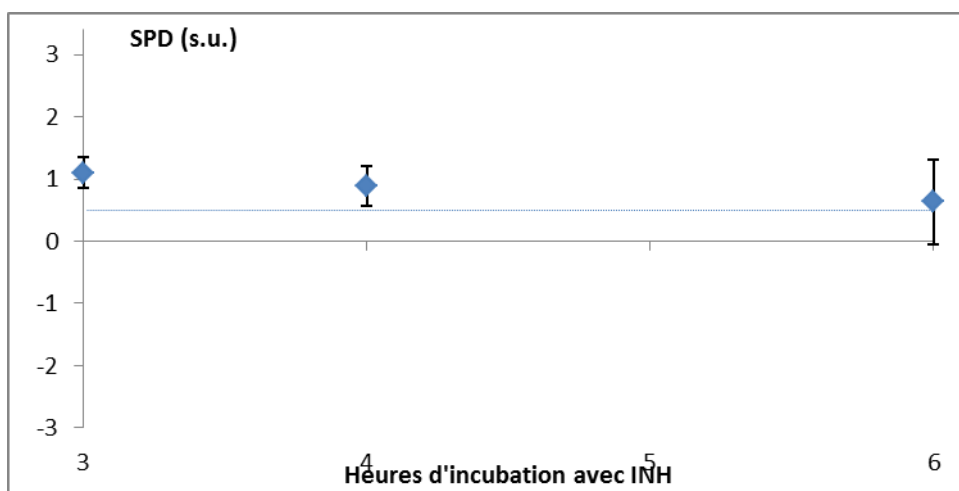


Figure 22. Evolution du SPD moyen de quatorze souches à bas niveau de résistance à INH en fonction du temps d'incubation sous INH.

La méthode étudiée permet donc de distinguer différents niveaux de résistance de manière directe, contrairement aux techniques de diagnostic de résistance basées sur la détection de mutations. En effet, pour onze des quatorze souches testées, une mutation au niveau du gène *inhA* a été détectée (ce qui est lié avec un niveau de résistance bas). Pourtant, bien que ces souches aient le même gène muté, celles-ci présentent des degrés de résistance divers. La détermination du gène muté ne suffit donc pas pour définir la diversité des degrés de résistance à l'antibiotique possibles.

3. Pré-validation de la méthode et optimisation de la concentration d'INH

Lors du point précédent, « 2. Optimisation de l'analyse Luminex », de nouvelles conditions ont été définies pour réaliser la méthode de référence, avec INH, du projet TRIDACE. Ces paramètres sont repris dans l'encadré 2.

L'échantillon clinique ou souche à caractériser est cultivé dans un tube MGIT™ placé dans le BACTEC™ jusqu'à ce qu'il le définisse comme positif. Le tube est ensuite inversé à 37°C pendant 2 à 4 jours avant qu'un volume y soit prélevé et dilué cinq fois. Cette nouvelle culture est alors séparée en deux parties. Dans l'une des parties, de l'eau est ajoutée et, dans l'autre, les bactéries sont soumises à la présence de 0.4 µg/ml d'INH. Ces cultures sont ensuite incubées 6 h puis inactivées. L'ARN est alors récupéré suite à une lyse des cellules bactériennes par 1 h 30 de shaking à 1200 rpm et aux différentes étapes d'un QGP kit (Figure 5) qui permettra ensuite la quantification des ARNs cibles à l'aide du MagPix™.

Encadré 2. Paramètres optimisés de la méthode TRIDACE

Cette étape a donc pour objectif de pré-valider la méthode optimisée avec 73 souches avec des mutations différentes et donc, des niveaux de résistances différents (cfr. tableau 3), également destinées à tester deux niveaux de concentration en INH : 0.1 et 0.4 µg/ml. Les valeurs SPD obtenues sont reprises dans la figure 24. Une première remarque doit tout d'abord être faite sur la souche (68) S16D00479. En effet, celle-ci est caractérisée comme résistante à 0.4 µg/ml d'INH et des mutations au niveau des deux gènes les plus fréquemment liés à la résistance à INH ont été détectées au sein de son génome: *inhA* et *katG*. Pourtant, les résultats pour 0.1 µg/ml et 0.4 µg/ml d'INH présentent tous deux un phénotype de sensibilité à INH avec des SPD inférieurs à 0. L'analyse a donc été renouvelée mais, à nouveau, les SPD correspondaient à ceux d'une souche sensible. Cette souche a donc vraisemblablement été mal enregistrée ou échangée avec une autre.

Un second point doit être signalé: l'analyse Luminex de la souche (67) S16BD04867 n'a pas pu permettre la quantification des SPD car les MFI des ARNs cibles, obtenus pour les trois échantillons (celui avec de l'eau, celui avec 0.1 µg/ml d'INH et celui avec 0.4 µg/ml d'INH), étaient inférieurs au LOD correspondant. Il en est de même pour la souche (30) 13MY1473, dont le SPD n'a été obtenu qu'au bout de la troisième analyse Luminex pour laquelle la souche a été traitée par la méthode (cfr. Encadré 2) 8 jours après avoir été définie comme positive par le BACTEC™. Par conséquent, compte tenu des valeurs anormalement faibles des MFI obtenues pour l'ensemble des échantillons de la même souche, il a été suggéré que ce manque de signal (MFI), et donc ce manque de matériel bactérien, ne provenait pas d'une erreur au cours de la procédure mais bien de la faible croissance (exprimée en GU – cfr « 1.1. Milieux »

de la partie « III. Matériels et méthodes ») des souches traitées. En effet, le niveau de croissance de l'échantillon de la souche S16BD04867, traité le 2^{ème} jour après avoir été détecté comme positif par le BACTECTM, était de 746 GU et ceux des deux premières tentatives avec la souche 13MY1473, positive depuis 4 jours pour les deux essais, valaient respectivement 149 et 222 GU. Le niveau de croissance moyen des souches détectées comme positives depuis 2 à 4 jours et dont l'analyse Luminex a permis la quantification de leur SPD est de 3920.85 ± 3480.40 GU avec comme minimum 502 GU et un maximum de 22192 GU. Il peut donc y avoir une importante différence dans le développement bactérien selon la souche et selon le temps laissé après que l'échantillon ait été dit positif. Vu cette variation, il serait intéressant d'investiguer sur le niveau de croissance seuil pour assurer la bonne conduite de l'analyse et de définir une valeur de GU limite.

Pour en revenir à la figure 24, différentes observations peuvent être faites :

- Pour les souches sensibles à INH, aucun des SPD ne dépasse le seuil provisoire de 0.5 (avec un SPD maximum de 0.17 pour les souches sous 0.1 µg/ml d'INH et 0 pour celles sous 0.4 µg/ml d'INH);
- Pour les souches résistantes, tous niveaux confondus, aucun des échantillons soumis à 0.1 µg/ml n'obtient un SPD inférieur à 0.5 (avec comme SPD minimum pour les souches avec un bas niveau de résistance 0.65 et 0.61 pour les souches avec un haut niveau de résistance);
- Pour les souches avec un haut niveau de résistance, toutes sauf une ((64) S17BD00461 avec un SPD de 0.46) ont un SPD supérieur à 0.5;
- Pour les souches avec un bas niveau de résistance à INH sous 0.4 µg/ml de l'antibiotique, il est possible de constater que neuf souches ont un SPD sous le seuil de 0.5 tandis que ceux des neuf autres souches sont supérieurs à ce seuil, allant d'un SPD de -0.36 à 1.66.

Globalement, ces observations concordent avec les résultats attendus, c'est-à-dire que les souches sensibles à INH ont un SPD proche de 0 ou inférieur et celles avec un haut niveau résistance, proche de 1 et ce, quelle que soit la concentration en INH ajoutée. Cette méthode semble donc permettre une distinction entre ces deux types de souches. Il faut toutefois noter que le seuil d'une valeur unique (0.5) ne garantit pas une délimitation parfaite entre les souches sensibles et résistantes à INH. En effet, certains SPD de souches résistantes sont relativement proches de ce seuil dont un qui en est même inférieur ((64) S17BD00461 avec un SPD de 0.46). Il semble donc préférable, par des essais supplémentaires, de définir une zone d'incertitude au lieu d'un seuil unique. En ce qui concerne les SPD des souches avec un bas niveau de résistance à INH, ceux-ci correspondent, comme attendu, à ceux de souches résistantes lors de l'ajout de 0.1 µg/ml d'INH, concentration limite définie pour distinguer les souches fortement ou faiblement résistantes à cet antibiotique. A l'opposée, ces souches sont supposées sensibles à la

concentration de 0.4 $\mu\text{g/ml}$ d'INH mais seul la moitié présente un SPD sous le seuil de 0.5. Cette combinaison de « concentration en INH/ temps d'incubation sous INH » rend donc compte des différents degrés de résistance existants mais ne permet pas d'obtenir des résultats équivalents à la méthode conventionnelle, l'antibiogramme, qui a préalablement défini ces souches comme sensibles à 0.4 $\mu\text{g/ml}$ d'INH. Au vu des objectifs, d'obtenir des résultats fiables le plus rapidement possible, il serait intéressant par la suite de réaliser une analyse Luminex sur ces mêmes souches avec une concentration en INH plus élevée (1 $\mu\text{g/ml}$) pour observer la différence de SPD qu'une telle concentration peut engendrée sur les souches sensibles ou avec différents niveaux de résistance. Cette augmentation de la concentration pourrait éventuellement permettre d'obtenir un phénotype sensible pour les souches avec un bas niveau de résistance à INH tout en maintenant une séparation apparente entre souches sensibles et résistantes à INH. La figure 23 met en avant la différence dans la réponse transcriptionnelle en fonction de la concentration de INH ajouté. Cette figure semble indiquer que plus la concentration d'INH est importante, plus la différence de réponse transcriptionnelle est marquée.

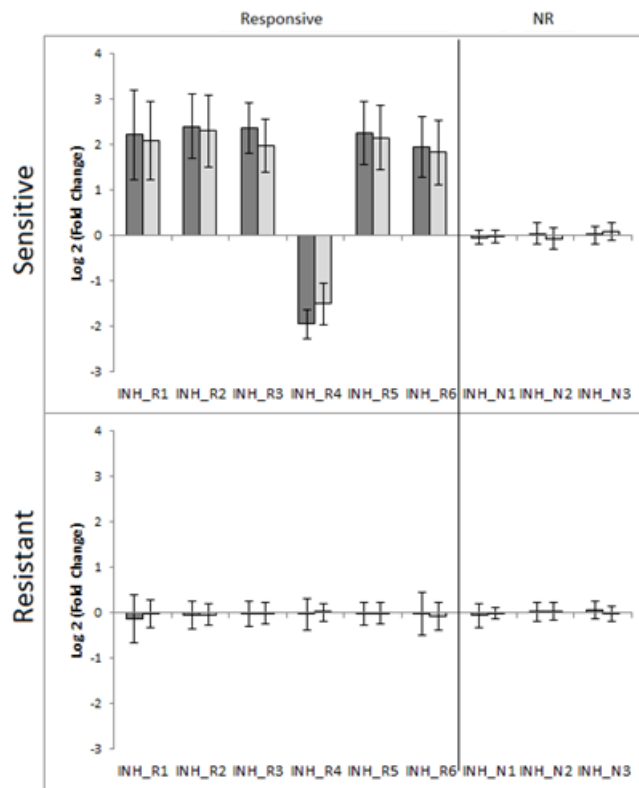


Figure 23. Différence moyenne de la réponse transcriptionnelle liée à l'ajout de 0.4 $\mu\text{g/ml}$ d'INH (barres plus foncées) ou de 0.1 $\mu\text{g/ml}$ d'INH (barres plus claires) pour 27 souches sensibles à INH et 26 souches résistantes à INH. La différence de réponse transcriptionnelle ($\log_2(\text{Fold Change})$) de chaque gène cible (noté INH_R1 à INH_R6 pour les six gènes réactifs à la présence d'INH et INH_N1 à INH_N3 pour les 3 gènes choisis dont l'expression ne change pas en présence d'INH) entre avant et après l'ajout d'INH pour des souches sensibles (haut de la figure) et résistantes (bas de la figure) à INH.

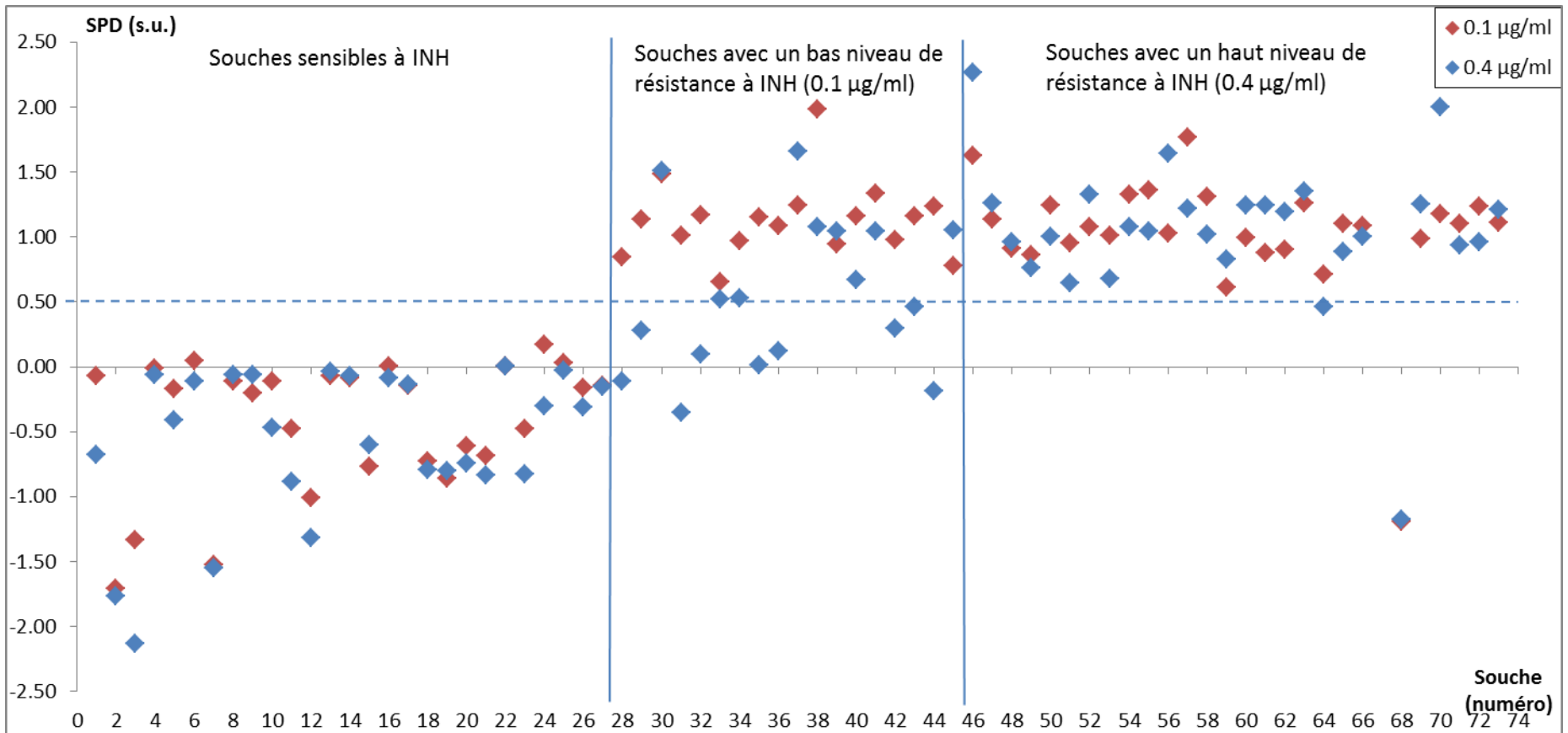


Figure 24. Résultats SPD (sans unité) de 73 souches. Les souches, positives selon le BACTEC™ depuis 2 à 4 jours, ont été diluées cinq fois puis ces cultures ont été séparées en trois parties. Dans l'une de ces parties, de l'eau a été ajoutée, dans une autre, 0,4 µg/ml d'INH et, dans la dernière, 0,1 µg/ml d'INH. Les cultures sont alors incubées 6 h puis inactivés par éthanol et lysés par 1 h 30 de shaking à 1200 rpm. Ces souches sont respectivement, de gauche à droite, (1) S16BD02813, (2) S16BD05456, (3) S16BD05457, (4) S16BD05915, (5) S16BD06448, (6) S16BD08108, (7) S17BD00453, (8) S17BD00456, (9) S17BD00530, (10) S17BD01179, (11) S16BD05505, (12) S15BD05003, (13) S15BD05282, (14) S15BD05898, (15) S16BD00531, (16) S16BD00835, (17) S16BD01396, (18) S16BD01413, (19) S16BD01475, (20) S16BD02310, (21) S16BD02667, (22) S16BD02700, (23) S16BD03143, (24) S16BD04931, (25) S16BD05259, (26) S16BD02650, (27) S17BD00811, (28) 11MY0210, (29) 13MY0376, (30) 13MY1473, (31) 13MY2475, (32) S15BD05110, (33) S15BD05142, (34) S15BD08902, (35) S15BD09584, (36) S15BD09808, (37) S15BD10500, (38) S16BD00823, (39) S16BD06161, (40) S16BD07601, (41) S16BD08755, (42) S17BD00631, (43) S17BD00744, (44) S17BD01584, (45) S16BD06129, (46) 07MY0066, (47) 07MY1004, (48) 07MY1281, (49) 08MY0057, (50) 08MY0593, (51) 08MY0891, (52) 08MY1602, (53) 09MY0391, (54) 10MY0981, (55) 13MY0292, (56) 13MY0498, (57) 14MY0227, (58) 14MY0792, (59) 14MY1571, (60) 14MY2137, (61) 14MY2188, (62) 15MY0479, (63) S16BD03198, (64) S17BD00461, (65) S17BD00812, (66) S15BD10623, (67) S16BD04867, (68) S16BD00479, (69) S16BD04731, (70) S16BD00329, (71) S16BD04395, (72) S15BD09542, (73) S16BD01391. Les 27 premières souches sont sensibles à INH, de la 28 à 45^{ème} souches, il s'agit de souches avec un bas niveau de résistance à INH et les dernières ont un haut niveau de résistance à INH.

La figure 24 permet une visualisation claire de ces résultats et facilite la comparaison des moyennes par niveau de résistance et selon la concentration d'INH ajoutée.

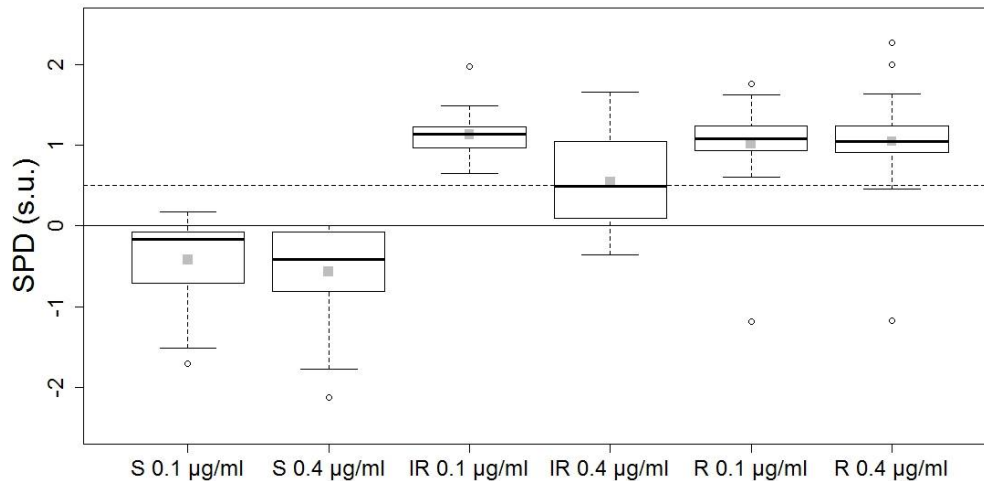


Figure 25. Boxplot des SPD de 27 souches sensibles à INH sous 0.1 µg/ml (S 0.1 µg/ml) ou 0.4 µg/ml (S 0.4 µg/ml) d'INH, 26 souches avec un haut niveau de résistance à INH sous 0.1 µg/ml (R 0.1 µg/ml) et sous 0.4 µg/ml (R 0.4 µg/ml) d'INH et des dix-huit souches avec un bas niveau de résistance à INH sous 0.1 µg/ml (IR 0.1 µg/ml) et 0.4 µg/ml (IR 0.4 µg/ml) d'INH.

Il n'a pas été statistiquement possible de comparer les moyennes des SPD entre elles car, soit la distribution de ces données n'est pas normale, soit il n'y pas d'égalité des variances. Malgré que les conditions d'application ne permettent pas de caractériser statistiquement une différence entre les autres moyennes, la figure 23 permet d'observer une distinction entre les souches sensibles et résistantes à INH. En effet, il est possible de constater que les valeurs pivots de la distribution des souches sensibles ne chevauchent pas celles des souches avec un haut niveau de résistance ni celles des souches avec un bas niveau de résistance où 0.1 µg/ml d'INH a été ajouté. Et, comme développé précédemment, la figure montre clairement que les valeurs de SPD obtenues par les souches avec un bas niveau de résistance sous 0.4 µg/ml se superposent à celles des autres résultats.

L'obtention de ces résultats permet également de s'intéresser à un dernier point à optimiser pour le développement de la méthode: la valeur permettant la conversion du « log2FoldChange » en SPD. Comme expliqué au point « 3. Analyses Luminex » de la partie « III. Matériel et méthodes », les MFI obtenues suite à l'analyse Luminex permettent de quantifier la différence d'expression de chaque gène cible, en présence et en absence d'INH. Cette différence est exprimée en log2FoldChange où une valeur positive correspond à un gène surexprimé en présence de l'antibiotique tandis qu'une valeur négative est associée à la régulation négative de ce gène en présence de l'antibiotique testé. Les valeurs moyennes de log2FoldChange pour chaque gène cible sont reprises dans la figure 23 pour l'ensemble des 27 souches sensibles à INH testées et pour les 26 souches avec un haut niveau de résistance à INH qui ont été correctement quantifiées. Les valeurs de log2FoldChange de chaque gène sont finalement combinées en

une seule valeur par échantillon appelé SPD (squared projected distance). La conversion du $\log_2\text{FoldChange}$ en SPD est possible grâce à la différence de valeurs, dites de référence, des souches sensibles et des souches hautement résistantes à INH, par gène. Ces valeurs de référence ont été définies précédemment au cours du projet à l'aide des moyennes du $\log_2\text{FoldChange}$ de trois réplicats de cinq souches sensibles pour les valeurs de références pour les souches sensibles et de trois réplicats de quatre souches avec un haut niveau de résistance à INH pour les valeurs de référence des souches résistantes. Les souches qui ont permis de caractériser ces valeurs sont les souches S16BD03137, S16BD03124, S16BD03166, S16BD03270 et S16BD0327 pour les sensibles à INH et S16BD03197, S16BD02068, S16BD02670 et S16BD01774 pour les souches résistantes et ont été analysées avec les conditions de départ de la méthode (cfr. Encadré 1). Dés, lors, il serait intéressant de déterminer de nouvelles valeurs de référence sur base d'une collection plus large pour tenter de mieux délimiter/distinguer les SPD de souches sensibles et ceux de souches résistantes à la concentration de INH ajouté.

Le calcul de ces nouvelles valeurs de référence a été réalisé et les résultats des SDP calculés à partir de ces valeurs, par niveau de résistance et selon la concentration en INH, sont repris dans la figure 26.

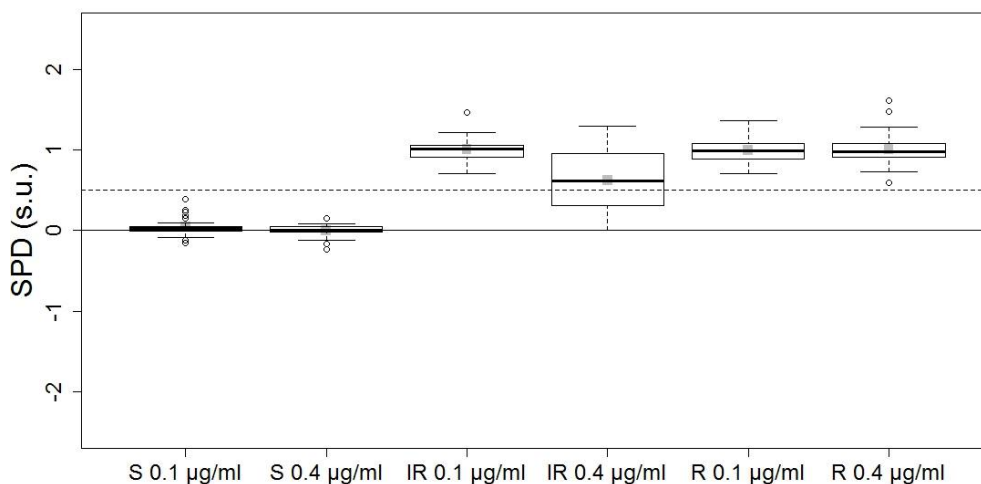


Figure 26. Boxplot des SPD de 27 souches sensibles à INH sous 0.1 µg/ml (S 0.1 µg/ml) ou 0.4 µg/ml (S 0.4 µg/ml) d'INH, 26 souches avec un haut niveau de résistance à INH sous 0.1 µg/ml (R 0.1 µg/ml) et sous 0.4 µg/ml (R 0.4 µg/ml) d'INH et des dix-huit souches avec un bas niveau de résistance à INH sous 0.1 µg/ml (IR 0.1 µg/ml) et 0.4 µg/ml (IR 0.4 µg/ml) d'INH. Les SPD ont été calculés avec, comme valeurs de référence, les moyennes des $\log_2\text{FoldChange}$ pour chaque gène des 27 souches sensibles et des 26 souches avec un haut niveau de résistance.

Une fois encore, il n'a pas été statistiquement possible de comparer les moyennes des SPD entre elles exceptées celle des souches résistantes sous 0.1 µg/ml d'INH avec celle des souches avec un bas niveau de résistance sous cette même concentration et, comme attendu, aucune différence significative n'a été établie entre elles. Ces souches sont, en effet, toutes résistantes à cette concentration d'INH. Malgré que les conditions d'application ne permettent pas de caractériser statistiquement une différence, il est possible d'observer les mêmes tendances que pour les résultats précédents. Ces nouvelles valeurs de

référence permettent d'obtenir des distributions plus faibles que celles obtenues précédemment mais de nombreux SPD de souches sensibles à INH ont définis comme extérieurs à la distribution. Les valeurs calculées à partir des log2FoldChange, prises comme références, ne permettent donc pas réellement d'améliorer l'interprétation des résultats. Néanmoins, la différence avec les résultats précédents montre qu'il s'agit d'une piste éventuelle à explorer pour optimiser la méthode. Pour se faire, une collection de souches plus importante doit être analysée pour permettre une interprétation statistique des résultats.

4. Antibiogrammes

Pour le développement de cette méthode, il est nécessaire de travailler avec des souches dont la sensibilité aux antibiotiques a préalablement été caractérisée par la méthode conventionnelle, l'antibiogramme. Dans cette optique, différents antibiogrammes (de première ligne : INH, RMP, EMB et PZA; et de seconde ligne : AMK, BDQ, CAP, CFZ, MXF, OFX, RIF, ETH, PAS et LIN) ont été réalisés selon la souche dont la sensibilité doit être caractérisée.

Une proportion anormale de souches, au sein des essais réalisés dans le cadre de ce TFE mais également aux niveaux des analyses de l'ISP-WIV, avait pour résultats une résistance à CFZ, BDQ ou à PAS bien qu'elles soient sensibles aux antibiotiques de première ligne.

Suite à ce constat, il a été suggéré que ces PZA présente une perte d'activité au cours de l'analyse (qui peut durer jusqu'à 42 jours) et produise des résultats variables. Pour CFZ et PAS, il est reconnu que ces antibiogrammes donnent parfois des résultats erronés.

Cette constatation renforce l'intérêt de développer de nouveaux outils de diagnostic des résistances aux antibiotiques pour proposer des alternatives à la méthode standard qui ne permet pas toujours une caractérisation efficace.

VI. Conclusions et perspectives

Au cours de ce travail, deux objectifs parallèles ont été développés :

- 1) La préparation des échantillons pour la détermination des ARNs cibles afin de développer la méthode avec PZA et DLM;
- 2) L'optimisation de la méthode de référence élaborée avec INH.

1. Préparation des échantillons pour la détermination des ARNs cibles

Au cours du premier point, un contrôle de l'efficacité des deux antibiotiques a permis de mettre en évidence un effet bactériostatique de PZA mais le manque d'effet bactéricide du DLM sur les cultures. En effet, l'action de l'antibiotique doit être suffisante pour observer une différence d'expression d'ARNs entre une souche soumise au stress provoqué par l'action de l'antibiotique et une non-stressée. De nouvelles conditions d'inhibition du développement bactérien ont donc été définies et consistent à ajouter 3 µg/ml de DLM dans une culture avec une $DO_{600\text{ nm}}$ de 0.1. De nouvelles cultures des deux souches, H37Rv et 041195, vont donc être préparées dans ces conditions.

Des essais ont ensuite été réalisés pour définir le traitement adéquat pour purifier les ARNs extraits. La technique permettant le meilleur compromis entre qualité de l'ARN et dégradation de l'ADN est l'utilisation du kit Direct-zol™ RNA MiniPrep selon son protocole initial, c'est-à-dire avec une étape DNase de 15 minutes (avec 30 U de DNase). Le contrôle de l'efficacité de cette étape doit être réalisé en vérifiant l'absence de produit PCR suite à une PCR CSB. Des échantillons destinés à l'analyse RNAseq pour déterminer les gènes de la signature ARN pour les deux antibiotiques, PZA et delamanid, doivent donc être à nouveau préparés en suivant ces lignes directrices. Si la dégradation de l'ADN semble effective et si la qualité de l'ARN définie par le Bioanalyzer correspond à celles obtenues lors des premiers essais, avec une concentration suffisante pour récupérer plus d'1µg d'ARN, les échantillons seront envoyés à l'Institut Pasteur de Paris. Cet institut réalisera alors une seconde analyse de la qualité avant de poursuivre le traitement des échantillons et le séquençage de l'ARNm par son ADNc. Ce dernier contrôle définira si les échantillons sont exploitables ou si de nouvelles recherches pour améliorer l'extraction et la purification de l'ARN doivent être réalisées.

2. Optimisation et pré-validation de l'analyse Luminex

L'objectif de cette partie consistait à optimiser les paramètres de la méthode de référence pour obtenir des résultats fiables le plus rapidement possibles. Ces paramètres sont :

- la méthode de lyse
- le temps de croissance bactérienne avant l'analyse
- le temps d'incubation suite à l'ajout de l'antibiotique
- la concentration de l'antibiotique au sein de la culture

Avec comme condition de départ de la méthode :

La culture bactérienne est incubée à 37°C jusqu'à une $DO_{600\text{ nm}}$ de 0.3 puis séparée en deux parties. Dans l'une des parties, de l'eau est ajoutée et, dans l'autre, les bactéries sont soumises à la présence de 0.4 µg/ml d'INH. Ces cultures sont ensuite incubées 6 h puis tuées. L'ARN est alors récupéré suite à une lyse des cellules bactériennes par bead-beating et aux différentes étapes d'un QGP kit permettant une quantification des ARNs cibles à l'aide du MagPix™.

1) Optimisation de la lyse des cellules bactériennes

Différentes techniques ont été envisagées pour finalement préférer un shaking de 1 h 30 réglé à 1200 rpm pour son efficacité et de par sa capacité en termes d'échantillons et le peu de manipulations qu'elle requiert pour une lyse bactérienne efficace et à moindre coût. Ce procédé a également pour avantage majeur de permettre facilement une simplification du procédé par la création qu'une plaque à 96 puits à placer sur le shaker pour qu'il suffise de transvaser les échantillons d'une plaque à l'autre lors des étapes de la méthode. Malgré les avantages que confère cette technique, il reste toutefois intéressant d'investiguer d'autres pistes qui permettraient éventuellement de réduire la durée de cette étape.

2) Optimisation au niveau de la croissance bactérienne

Les essais ont montré la faisabilité d'une analyse Luminex sur des échantillons détectés comme positifs par le BACTEC™ depuis seulement quelques jours. La durée testées de 2 à 4 jours après détection par le BACTEC™ est supposé correspondre au temps nécessaire pour le transport des échantillons jusqu'à l'ISP-WIV et a été suffisante pour la plupart des souches. Néanmoins, deux points doivent être développés. Le premier est que les cultures ont été conservées à 37°C après la détection de la souche par le BACTEC™, ce qui ne correspond pas aux réalités liées au transport des tubes MGIT™. Le second point à développer est qu'au cours de l'étape de pré-validation de la méthode, il a été possible de constater que la culture de certaines souches n'était pas assez développée pour avoir suffisamment de matériel bactérien afin de permettre la détection des ARNs cibles. Le BACTEC™ mesure la croissance au

sein d'un tube MGIT™ en GU. Il serait donc intéressant de définir, par des essais supplémentaires, la limite de croissance bactérienne, exprimée en GU, pour réaliser l'analyse Luminex.

3) le temps d'incubation suite à l'ajout de l'antibiotique

Les essais réalisés suggèrent que 3 h d'incubation suite à l'ajout de 0.4 µg/ml d'INH sont suffisantes pour mettre en évidence la sensibilité des souches sensibles à INH, c'est-à-dire pour obtenir un SPD proche ou inférieur à 0. De plus, les résultats semblent indiquer que, comme attendu, la période d'incubation sous INH n'influence pas les valeurs SPD obtenues pour les souches avec un haut niveau de résistance à INH et supposées proches de 1. Il est néanmoins possible de constater que ces SPD sont, par moment, relativement proches du seuil de 0.5 fixé pour délimiter les souches sensibles et résistantes à INH. Il est donc essentiel pour une bonne interprétation des résultats de délimiter une zone d'incertitude par des analyses supplémentaires. En ce qui concerne les souches avec un bas niveau de résistance, celles-ci sont plus contraignantes pour définir les conditions de la méthode. En effet, les SPD obtenus sont fort variables d'une souche à une autre et ce n'est qu'au bout de 6 h d'incubation sous 0.4 µg/ml d'INH que des SPD comparables à ceux de souches sensibles ont été obtenus. Cette méthode permet donc de rendre compte des multiples degrés de résistance à INH possible. Néanmoins, l'objectif est d'obtenir des résultats comparables à ceux obtenus par la méthode conventionnelle, l'antibiogramme, qui a défini ces souches comme sensibles à 0.4 µg/ml d'INH. Il devient difficilement envisageable de prolonger cette période d'incubation mais une augmentation de la concentration pourrait permettre l'obtention des SDP attendus. Ce temps d'incubation sous INH a donc été maintenu à 6 h.

4) la concentration de l'antibiotique au sein de la culture

Au cours de l'étape de pré-validation, il a été constaté que l'ajout de 0.1 µg/ml ou de 0.4 µg/ml d'INH donnent tous deux des SPD en accord avec le type de souches pour les souches sensibles et les souches résistantes. De plus, 0.1 µg/ml d'INH permet l'obtention de SDP supérieur au seuil de 0.5 pour les souches avec un bas niveau de résistance à INH, correspondant à un phénotype de résistance à INH. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par antibiogramme. En revanche, une concentration de 0.4 µg/ml ne permet pas toujours d'obtenir un SPD correspondant à un phénotype sensible pour ces souches qui sont supposées sensibles à cette concentration. Une différence relativement importante est possible entre le SPD de deux souches avec un bas niveau de résistance sous 0.4 µg/ml, en fonction du degré de résistance. Ce degré dépend du type de mutations présentes au sein du génome et il serait donc intéressant de corrélérer l'ordre de grandeur des SPD avec les mutations qui confèrent la résistance.

Néanmoins, les paramètres de la méthode doivent être en mesure de caractériser la sensibilité des souches avec un bas niveau de résistance sous une concentration de 0.4 µg/ml. La comparaison des résultats sous 0.4 µg/ml et 0.1 µg/ml a permis de remarquer que la réponse transcriptionnelle était plus importante une concentration supérieure. Il serait donc intéressant de tester des concentrations supérieures pour parvenir à définir clairement la sensibilité d'une souche. Une autre possibilité à tester en parallèle serait de caractériser le niveau de résistance en réalisant une première analyse avec 0.1 µg/ml d'INH puis, pour les souches résistantes à cette concentration, avec 0.4 µg/ml d'INH ou plus. Une diminution du SPD entre ces deux analyses indiquerait une souche avec un bas niveau de résistance.

De manière générale, la méthode nécessite encore divers essais pour son optimisation et pour s'assurer d'établir une nette distinction entre souches sensibles et résistantes à INH. Pour ce faire, il est également important de travailler sur l'optimisation de l'interprétation des résultats, c'est-à-dire, au fil d'essais, de définir des valeurs seuil et zone d'incertitude ainsi que de déterminer des données de référence optimales. De plus, l'analyse d'une collection plus importante de souches, de différentes origines et avec différentes mutations, permettrait d'établir la présence ou non de différences statistiquement significatives entre les SPD des différents types de souches. En effet, jusqu'à présent, peu de répétitions ont été réalisées et les résultats ne peuvent que donner une idée sur la distinction entre souche sensible et résistantes à INH.

La mise en place de cette méthode nécessite donc encore un travail important. Il faut en effet, terminer l'élaboration de la méthode de référence avant de commencer le processus de validation selon la norme ISO 15189. Il est également intéressant de développer un procédé plus automatisé, qui requiert moins de manipulations. Enfin, une fois la méthode de référence validée, un processus équivalent devra être mis en place avec les autres antibiotiques définis dans les objectifs.

Comme pour les autres techniques de diagnostic de résistance, un suivi du traitement sera toujours nécessaire pour observer si les résultats *in vitro* de la méthode correspondent aux effets *in vivo*. Une bonne concordance entre ces deux résultats est importante, d'autant plus pour PZA où l'antibiogramme ne représente pas un moyen fiable pour déterminer la résistance à cet antibiotique.

Beaucoup d'étapes sont donc encore à réaliser pour obtenir un diagnostic des résistances équivalent à la méthode conventionnelle mais les résultats présentés au cours de ce travail semblent encourageants.

Références bibliographiques

- 1 Barczak, a. K., Gomez, J. E., Kaufmann, B. B., Hinson, E. R., Cosimi, L., Borowsky, M. L. Hung, D. T. (2012). RNA signatures allow rapid identification of pathogens and antibiotic susceptibilities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), 6217–6222. <https://doi.org/10.1073/pnas.1119540109>

- 2 Brown, P. O., Wilson, M., DeRisi, J., Kristensen, H. H., Imboden, P., Rane, S., ... Schoolnik, G. K. (1999). Exploring drug-induced alterations in gene expression in *Mycobacterium tuberculosis* by microarray hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(22), 12833–12838. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.22.12833>

- 3 Chast 1995. (François Chast. *Histoire contemporaine des médicaments*. Paris : Éd de la découverte, coll. Histoire des sciences, 1995

- 4 Cohen, Bishai, A.S. Pym. *Molecular basis of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis* Microbiol. Spectr., 2 (2014)

- 5 Coscolla, M., & Gagneux, S. (2014). Seminars in Immunology Consequences of genomic diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. *Seminars in Immunology*, 26(6), 431–444. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.09.012>

- 6 Cole, S. T., R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S. V. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, C. E. Barry, 3rd, F. Tekaia, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, S. Gentles, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, A. Krogh, J. McLean, S. Moule, L. Murphy, K. Oliver, J. Osborne, M. A. Quail, M. A. Rajandream, J. Rogers, S. Rutter, K. Seeger, J. Skelton, R. Squares, S. Squares, J. E. Sulston, K. Taylor, S. Whitehead & B. G. Barrell, (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**: 537-544.

- 7 Fonds des Affections Respiratoires. *Diagnostic et traitement de la tuberculose, manuel pratique, recommandations destinées au corps médical*. FARES asbl, septembre 2010

- 8 Fonds des Affections Respiratoires. *Registre belge de la tuberculose 2015*, FARES asbl, mars 2017

- 9 Frick, B. M. (2016). The Tuberculosis Prevention Pipeline, 143–162.

- 10 Michael R. Green, Joseph Sambrook. *Molecular cloning : a laboratory manual – 4th ed.* 2012

- 11 Gupta D K. Acceptability of thioamides II. Prothionamide. *J Postgrad Med* 1977;23:181-5

- 12 Islam, M., Hameed, H. M. A., Mugweru, J., Chhotaray, C., Wang, C., Tan, Y., ... Ojima, I. (2016). SC. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2016.10.002>

- 13 Issa, R., Akma, N., Hassan, M., Abdul, H., Hashim, S. H., Seradja, V. H., & Sani, A. A. (2012). Detection and discrimination of Mycobacterium tuberculosis complex ☆. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 72(1), 62–67. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2011.09.021>
- 14 Kumazawa et Yagisawa, 2002 (The history of antibiotics: the Japanese story <https://link.springer.com/article/10.1007/s101560200022>)
- 15 Lawn, S. D., & Zumla, A. I. (2011). Tuberculosis. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)62173-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)62173-3)
- 16 Lessem, B. E. (2014). The Tuberculosis Treatment Pipeline : Activity , but No Answers, 163–180.
- 17 Lienhardt, C., Lönnroth, K., Menzies, D., Balasegaram, M., Chakaya, J., Cobelens, F., ... Denking, C. M. (2016). Translational Research for Tuberculosis Elimination : Priorities , Challenges , and Actions, 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001965>
- 18 Ma, Z., Lienhardt, C., Mcilleron, H., Nunn, A. J., Wang, X., Town, C., & Africa, S. (2010). Tuberculosis 5 Global tuberculosis drug development pipeline : the need and the reality. *The Lancet*, 375(9731), 2100–2109. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60359-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60359-9)
- 19 Mathys, V. (2010). Université Libre de Bruxelles Contribution à la compréhension des mécanismes moléculaires de résistance de Mycobacterium tuberculosis aux agents anti-tuberculeux Remerciements.
- 20 Merker, M., Blin, C., Mona, S., Duforet-frebourg, N., Lecher, S., Willery, E., ... Ballif, M. (2015). Evolutionary history and global spread of the Mycobacterium tuberculosis Beijing lineage. *Nature Publishing Group*, 47(3), 242–249. <https://doi.org/10.1038/ng.3195>
- 21 Nguyen, L. (2016). Antibiotic resistance mechanisms in M. tuberculosis: an update. *Archives of Toxicology*, 90(7), 1585–1604. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1727-6>
- 22 Pai, M., Behr, M. A., Dowdy, D., Dheda, K., Divangahi, M., Boehme, C. C., ... Menzies, D. (n.d.). No Title. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.76>
- 23 Schraufnagel DE. Tuberculosis treatment for the beginning of the next century. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999; 3: 651-62.
- 24 Stucki, D., Brites, D., Jeljeli, L., Coscolla, M., Liu, Q., Trauner, A., ... Gagneux, S. (2016). Mycobacterium tuberculosis lineage 4 comprises globally distributed and geographically restricted sublineages. *Nature Genetics*, 48(12), 1535–1543. <https://doi.org/10.1038/ng.3704>

- 25 Unissa AN, Subbian S, Hanna LE, Selvakumar N. Overview on mechanisms of isoniazid action and resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Infect. Genet. Evol.* 2016;45: 474–92.
- 26 World Health Organization (WHO). Global Tuberculosis Report 2016.
www.who.int/tb/publications/global_report/en/