

Ministère de l'Enseignement
Supérieur et de la Recherche
Scientifique (MESRS)

République du Mali
Un Peuple-Un But-Une Foi



**UNIVERSITE DES SCIENCES, DES
TECHNIQUES ET DES TECHNOLOGIES
DE BAMAKO**



FACULTE DE PHARMACIE

Année Universitaire 2019 - 2020

N°

THESE

Mise au point d'une technique Multiplexe PCR en temps réel pour la détection simultanée des mycobactéries tuberculeuses et non tuberculeuses dans le crachat.

Présentée et Soutenue Publiquement le/..../2020

Devant la Faculté de Pharmacie

Par Mme Fanta SANOGO

Pour Obtenir le Grade de Docteur en Pharmacie

(DIPLOME D'ETAT)

JURY

Président : Pr Souleymane DIALLO

Membres : Dr Ibrehima GUINDO

Dr Yeya dit Sadio SARRO

Co-directeurs : Dr Bassirou DIARRA

Directeur : Pr Yacouba TOLOBA



DEDICACES & REMERCIEMENTS

DEDICACES

Gloire à **Allah** (soubhana watallah), le Tout Puissant miséricordieux, le Très Clément et le Très Miséricordieux. Le créateur des cieux et de la terre, le très haut, le clément, l'omniscient, l'omnipotent, de m'avoir donné cette vie, la santé et le courage nécessaire à la réalisation de ce travail.

Paix et salut sur le sceau du prophète Mohamed, sa famille, ses compagnons et tous ceux qui le suivent jusqu'au jour du jugement dernier.

➤ **Mon père : Moussa SANOGO**

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que tu as consenti pour mon instruction et mon bien être.

Tu as été l'épaule solide, l'œil attentif et compréhensif et la personne la plus digne de mon estime et de mon respect.

Je n'oublierais jamais la joie sur ton visage et le câlin que tu m'as donné le jour de ma fin d'étude.

Je te remercie pour tout le soutien et l'amour que tu me porte depuis mon enfance et j'espère que ta bénédiction m'accompagnera toujours.

Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que je ne te en acquitterai jamais assez.

Puisse Dieu, le Très Haut, t'accorder santé, bonheur et longue

➤ **Ma mère : Sétan DIARRA**

Tu m'as donné la vie, la tendresse et le courage pour réussir.

Tous ceux que je peux t'offrir ne pourra exprimer l'amour et la reconnaissance que je te porte.

En témoignage je t'offre ce modeste travail pour te remercier pour tes sacrifices et pour l'affection dont tu m'as toujours entourée.

➤ **A la mémoire de mon grand-père feu Djibril DIARRA**

Toi qui a toujours été présent pour moi et qui m'a donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance. Que Dieu garde ton âme dans son vaste paradis.

➤ **A mes sœurs : Penda, Safiatou, Aminata, Kadidiatou et Mariam SANOGO**

Je ne sais même pas par où commencer pour vous exprimer tout l'amour que je ressens pour vous. Vous êtes et vous serez toujours mes compagnons dans la vie, je vous souhaite beaucoup

de courage et de chance dans la vie. Vous avez été là pour partager mes peines mais aussi les moments de gaieté. Je vous demande surtout l'union pour la sauvegarde de la cohésion familiale. Ce travail est le vôtre, puisse le tout puissant Allah bénir ce lien de fraternité, réaliser le rêve de tout un chacun

- **A mes grands-parents** (feu Seydou SANOGO, feu Penda DIARRA et feu Koïta Demba)

J'aurais tant aimé que vous soyez présents. Que Dieu ait vos âmes dans sa sainte miséricorde

- **A mes tantes** (Fatoumata et Maïmouna Tacko DIARRA)

En témoignage de mon affection, de ma profonde tendresse et reconnaissance, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès et que Dieu, le tout puissant, vous protège et vous garde

- **A mon très cher ami Mahamadou SACKO**

Mon conseiller, et ami fidèle, qui m'a assisté dans les moments difficiles et m'a pris doucement par la main pour traverser ensemble des épreuves pénibles....

Je te suis très reconnaissante, et je ne te remercierai jamais assez pour ton amabilité, ta générosité, ton aide précieuse.

REMERCIEMENTS

- **A mes oncles maternels** : Alassane, Seydou, Cheick Hamala, feu Dramane et Bakary DIARRA

Vous avez été comme des pères pour moi car vous m'avez toujours soutenu et encouragé dans la vie. Je ne saurai vous remercier pour vos bienfaits. Trouvez en ce travail le fruit de vos encouragements, vos conseils et bénédictions.

- **A mes oncles paternels** : feu Sidi TRAORE, feu Madou SANOGO

Veillez trouver dans ce travail l'expression de mon respect le plus profond et mon affection la plus sincère.

- **A mes tantes paternelles** : feu Aminata, Fanta SANOGO
Soyez rassurées de ma profonde reconnaissance

- **A Salimata DEMBELE**

En souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments agréables que nous avons passés ensemble.

Veillez trouver dans ce travail l'expression de mon respect le plus profond et mon affection la plus sincère.

- **A mes cousins et cousines** :

Voyez en ce travail toute ma sympathie

- **A mes amies de tous les temps** : Fatoumata Zaharah CISSE, Assiétou MAIGA, Edith DEMBELE, Diarrahou DIARRA, Ténin Kadiatou SAMAKE, Awa Bamory TRAORE

Retrouvez ici l'expression de toute ma reconnaissance que DIEU nous unisse à jamais jusqu'à la fin de nos vies

- **A mes compagnons de tous les jours** : Seydou DEMBELE, Moussa TOURE, Amadi COULIBALY, Amadou DIENG, Balla DIARRA

Retrouvez ici mes remerciements pour vos accompagnements moraux et inconditionnels.

- **A Alou SAWADOGO et famille** : Salif DIARRA, Fati, Aissata ZEBERE, Mariam COULIBALY, Salimata KEITA, Djènèba GUIRO, Djènèba MAIGA

Je vous remercie pour votre hospitalité et votre bienveillance à mon égard tout au long de mes études, retrouvez ici l'expression de ma profonde gratitude.

➤ **A mes camarades thésards** : Hawa Baye DRAME, Fah Gaoussou TRAORE

Soyez rassuré de ma reconnaissance, bonne carrière professionnelle à tous.

➤ **Au Dr Bassirou DIARRA**

Vous avez accepté volontiers de m'enseigner dans le domaine de la recherche scientifique. Votre disponibilité, votre rigueur dans le travail, votre délicatesse est plus que salutaire. Je tiens à vous exprimer toute ma gratitude, merci pour la formation et l'assistance. Qu'Allah vous assiste et vous protège.

➤ **Au Dr Moumine SANOGO**

Vous avez été plus qu'un Maître, vos conseils, votre amour du travail, votre humanisme, votre modestie, votre droiture nous ont profondément marqué. Infatigable, courageux, patient, nous avons admiré votre simplicité, votre courtoisie et l'ambiance cordiale dans laquelle nous avons travaillé constituent sans doute une infime partie de vos nombreuses qualités. Merci pour tout que DIEU vous prête une longue vie.

➤ **Au Dr Antieme Combo Georges TOGO**

Merci pour votre encadrement et pour votre disponibilité, vos conseils ont permis la réalisation de ce travail. Merci à vous.

➤ **Au Dr Sidy BANE**

Merci de nous avoir encadrés durant notre formation et pour vos conseils

➤ **Au Dr Yeya dit Sadio SARRO**

Plus qu'un maître, vous avez été un grand frère, vos conseils, votre simplicité, votre humanisme, votre amour pour le travail, votre modestie et votre disponibilité m'ont profondément marquée. Merci pour tout, que le tout puissant vous le rende au centuple.

➤ **A toute l'équipe de TB-Lab**

Mr Gagni COULIBALY, Dr Amadou SOMBORO, Mahamadou KONE, Boureima DEGOGA, Fatimata DIALLO, Mariam GOUMANE

J'ai été extrêmement sensible par la bonne humeur et l'intérêt manifestés à l'égard de ce travail. Je voudrais vous témoigner mes sincères reconnaissances et vous remercier pour les moments partagés, votre patience et votre indulgence à mon égard. Vous êtes ma famille. Puisse le tout puissant Allah vous assister, Merci

➤ **A Mr Bourahima KONE**

Ce travail est le fruit de votre encadrement, vous avez été une inspiration pour moi au cours de ma formation et depuis ce jour vous êtes une idole pour moi. Merci pour les formations reçues tout au long de notre séjour au laboratoire UCRC/SEREFO.

➤ **Au Dr Ousmane KODIO**

Je tiens à vous remercier pour votre disponibilité, vos conseils, vos encouragements inconditionnels et vos bénédictions, qu'ALLAH vous prête longue vie

➤ **Au Dr Mamoudou MAIGA**

Votre dynamisme fait de vous un exemple digne d'inspiration pour tous. Soyez rassuré de ma reconnaissance.

➤ **A Dr Almoustapha MAIGA et toute l'équipe de résistance aux ARV**

Merci pour les efforts consentis pour la réalisation de ce travail. Je vous remercie également pour la collaboration et les moments de joie partagés. Que le seigneur vous paye au centuple

➤ **Au Dr Amadou KONE et toute l'équipe de biologie moléculaire**

Merci pour votre grand humanisme et courtoisie et votre disponibilité tout au long de ce travail.

➤ **Au Dr Djènèba DABITAO et toute l'équipe du laboratoire Core d'immunologie de l'UCRC :**

Les mots me manquent pour vous exprimer toute la joie que j'ai dans le cœur. Vous avez été toujours là pour la réalisation de ce travail. Votre courtoisie, votre gentillesse et l'ambiance cordiale dans laquelle nous avons travaillé

➤ **A notre tante Oumou NIARE**

Toujours souriante, vous avez été toujours présente pour la réalisation de ce travail. Votre gentillesse et votre courtoisie font de vous une femme exemplaire. Merci pour les moments partagés, que le tout puissant vous prête une longue vie.

➤ **Aux cliniciens de SEREFO Dr Bocar BAYA, Dr Mohamed Tolofoudie**

Merci ne suffira pas pour vous témoigner la qualité de l'encadrement et vos bons conseils reçus.

A toute l'équipe clinique de SEREFO/UCRC, merci pour la sympathie

➤ **A tous les enseignants et éducateurs de la primaire et du secondaire du Prosper Kamara et du supérieur**

Pour la qualité des enseignements reçus, je vous en serai reconnaissante durant toute ma vie, et que vous en soyez rétribués par la miséricorde divine.

➤ **A mes aînés médecins et pharmaciens de la FMOS/FAPH**

Adama GOITA, Seydou DOUGNON, Bréhima SANOGO, Moussa DAO, Daouda SANOGO, Seydou THIAM, Cheick Hamala DIARRA.

➤ **A l'ensemble des étudiants de la 10ème promotion du Numérus clausus de la faculté de pharmacie.**

➤ **A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail**

Merci pour le soutien moral, l'aide précieuse inestimable et désintéressé apportée tout au long de ce travail. << **Rien n'a plus de valeur sur terre qu'un cœur pur et généreux. Et c'est parmi les gens les plus simples que se cachent les plus grands trésors d'amour et de bonté>>.**

➤ **Au Professeur Souleymane DIALLO,**

Nous vous remercions pour la confiance que vous nous avez accordée en nous acceptant avec gentillesse dans votre service et guider nos premiers pas dans la recherche

Merci pour tout, je vous souhaite plein de succès dans les études menées.

Veillez accepter, cher Maître, le témoignage de notre sincère et profonde gratitude et l'assurance de notre indéfectible attachement.



**HOMMAGE AUX
MEMBRES DU JURY**

HOMMAGES AUX MEMBRES DU JURY

A notre Maître et président du jury

Pr Souleymane DIALLO

- **Professeur Honoraire de Pneumologie à la FMOS,**
- **Président d'honneur de la société Malienne de Pneumologie (SOMAP),**
- **Président d'honneur de l'Association pour la Formation continue en Allergologie (ANAFORCAL),**
- **Ancien chef du service de Pneumo-phtisiologie du CHU du Point-G,**
- **Colonel major de l'Armée Malienne à la retraite,**
- **Chevalier de l'Ordre National du Mali,**
- **Directeur du programme SEREFO**

Cher Maître

Nous vous faite un grand honneur en acceptant de présider ce jury de thèse malgré vos multiples occupations.

Vos qualités d'homme de science éclairé, de praticien infatigable, de pédagogue averti font de vous un enseignant aimé et admiré de tous.

Soyez rassurer cher Maître de notre sincère reconnaissance et de notre profond respect.

A notre maître et juge

Dr Ibrehima GUINDO

- **Pharmacien biologiste**
- **Chef de département laboratoire et Recherche Biomédicale à l'INSP,**
- **Maître assistant en Bactério-virologie à la FAPH**

Cher Maître

C'est pour nous un grand honneur de vous voir siéger dans notre jury.

Nous vous sommes très reconnaissants de la spontanéité et de l'amabilité avec lesquelles vous avez accepté de juger notre travail.

Veillez trouver, chère Maître, le témoignage de notre grande reconnaissance et de notre profond respect

A notre maître et juge

Dr Yeya Dit Sadio SARRO

- **Master en santé publique,**
- **Epidémiologiste au Centre de Recherche et de Lutte contre la Drépanocytose,**
- **Maître assistant en Epidémiologie à la FMOS,**
- **Senior Chercheur au laboratoire UCRC**

Cher Maître

Vous nous faites un honneur en acceptant de siéger dans ce jury.

Nous avons eu le grand plaisir de travailler avec vous, et avons trouvé auprès de vous le conseiller et le guide qui nous a reçus en toute circonstance avec sympathie, sourire et bienveillance.

Votre compétence professionnelle incontestable ainsi que vos qualités humaines vous valent l'admiration et le respect de tous.

Vous êtes et vous serez pour nous l'exemple de rigueur et de droiture dans l'exercice de la profession.

A notre maître et co-directeur

Dr Bassirou DIARRA

- **Médecin,**
- **Assistant à la FMOS de l'USTTB,**
- **Titulaire d'un Master en Médecine Tropicale de l'Université de Nagasaki au Japon,**
- **Titulaire de PhD à l'Institut de Médecine Tropicale et l'Université d'Anvers en Belgique,**
- **Senior chercheur et Responsable du laboratoire P3 de Tuberculose de l'UCRC**
- **Membre de l'équipe d'intervention rapide de la CEDEAO contre les fièvres Hémorragiques**

Cher Maître,

Nous sommes ravis de l'honneur que vous nous faites en acceptant de co-diriger ce travail. Nous avons été marqués par votre simplicité, votre disponibilité et votre modestie. Vos qualités humaines et surtout votre culture pour la science nous ont impressionnés. Les valeurs professionnelles et scientifiques dont vous êtes porteur ainsi que votre courage ont forgé notre estime et notre admiration en vous.

Veillez recevoir notre profonde reconnaissance.

A notre maître et directeur de thèse

Pr Yacouba TOLOBA

- **Pr titulaire en pneumo-phtisiologie**
- **Chef de service de pneumo-phtisiologie CHU-Point G**
- **Chef de DER de médecine/FMOS**
- **Président de la SAFAIC**
- **Membre de la SAPLF**
- **Expert de la TB-MR à l'OMS**
- **Praticien hospitalier CHU du Point-G,**
- **Président de la société malienne de pneumologie (SAMAP),**
- **Président de l'association nationale de formation continue en allergologie au Mali (ANAFORCAL)**

Cher Maître

Plus qu'initiateur de ce travail vous avez été pour nous un guide permanent, tant par vos encouragements, vos suggestions et votre disponibilité durant la réalisation de ce travail.

Humble et modeste, homme de science et clinicien apprécié par ses pairs, vous êtes pour nous un modèle de rigueur, de sérieux et d'intégrité.

Recevez toute notre gratitude pour l'intérêt que vous avez su porter à ce travail

Soyez-en remercié.

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Répartition géographique de la tuberculose dans le monde (27).....	10
Figure 2 : Répartition de la population d'étude selon le sexe	31
Figure 3: Répartition des patients selon la tranche d'âge.....	32
Figure 4: Résultat du test Multiplexe RT-PCR sur une souche du Complexe <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	34
Figure 5 : Résultat du Multiplexe RT-PCR de la souche du complexe <i>Mycobacterium avium</i>	35
Figure 6: Résultat du Multiplexe RT-PCR d'une souche de <i>Mycobacterium gordonae</i>	36
Figure 7: Résultat du Multiplexe RT-PCR d'une souche de <i>Mycobacterium kansasii</i>	37
Figure 8 : Résultat du Multiplexe RT-PCR sur une souche de <i>Mycobacterium fortuitum</i>	38
Figure 9 : Résultat du Multiplexe RT-PCR sur un échantillon négatif.....	39
Figure 10 : Résultat du crachat d'un patient infecté par le Complexe <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	41
Figure 11 : Résultat du crachat d'un patient infecté par le Complexe <i>Mycobacterium avium</i>	42
Figure 12 : Résultat du crachat d'un patient infecté par les mycobactéries non tuberculeuses.....	43
Figure 13 : Résultat du crachat d'un patient négatif de l'étude.....	44

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Critère d'interprétation des résultats du Multiplexe RT-PCR.....	29
Tableau 2 : Détermination des limites de détection du test Multiplexe RT-PCR pour la détection simultanée des mycobactéries tuberculeuses et non tuberculeuses.	33
Tableau 3: Répartition des participants selon le statut VIH.....	40
Tableau 4: Comparaison entre la culture et le Multiplexe chez les patients inclus dans l'étude pilote.....	40

SIGLES ET ABREVIATIONS

- ADN** : Acide Désoxyribonucléique
- A/R** : Auramine/Rhodamine
- ARN** : Acide Ribonucléique
- ARV** : antis rétroviraux
- AST** : Société Américaine des Maladies Thoraciques
- BAAR** : Bacille Acido-Alcool Résistant
- BK**: Bacille de Koch
- BPCO** : Broncho-pneumopathie Chronique Obstructive
- BSL3** : Laboratoire de niveau de sécurité 3
- CD4** : Cluster de Différenciation
- CDT** : Centre de Diagnostic et de Traitement
- CE** : Contrôle d'Extraction
- CFU** : Unité de Format Colonie
- CHU** : Centre Hospitalier Universitaire
- CIGHT** : Centre pour l'Innovation en Santé Globale
- CM**: *Mycobacterium* Commune
- CMT**: Complexe *Mycobacterium tuberculosis*
- CSRef** : Centre de Santé de Référence
- Ct** : cycle seuil
- DNTPs** : **Desoxyribonucleotide**-Tris phosphate
- FDA** : Administration Fédérale des Médicaments
- IDSA** : Société Américaine des Maladies Infectieuses
- INH** : Isoniazide
- LBA** : Lavage Bronchoalvéolaire
- MAC** : Complexe *Mycobacterium avium*
- MCR** : Mycobactérie à Croissance Rapide
- MNT** : Mycobactérie non tuberculeuse
- mPCR** : multiplexe Polymerase Chain Reaction
- MTB** : *Mycobacterium tuberculosis*
- NIH** : Instituts Nationaux de la Santé des Etats Unis d'Amérique
- OMS** : Organisation Mondiale de la Santé
- PCR** : Polymerase Chain Reaction
- PZA**: Pyrazinamide

qPCR : quantitative Polymerase Chain Réaction

UCRC: Centre Universitaire de Recherche Clinique

UN : Université Northwestern

USTTB: Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako

RIF: Rifampicine

SDS : Lauryl Sulfate de Sodium

SEREF0/CEREF0 : Centre de Recherche et de Formation sur le VIH et la Tuberculose

SIDA : Syndrome de l'Immunodéficience Acquis

SOP : Procédure Opératoire Standardisé

TAR : Traitement Anti Rétroviral

TB: Tuberculose

TB-MR : Tuberculose Multi Résistante

TB-UR : Tuberculose Ultra Résistante

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

TABLES DES MATIERES

TABLES DES MATIERES

I.INTRODUCTION.....	2
II. OBJECTIFS.....	6
2.1 Objectif Général.....	6
2.2 Objectifs spécifiques.....	6
III. GENERALITES.....	8
3.1 Définitions des termes.....	8
3.2. Epidémiologie de la tuberculose.....	9
3.2.1. Epidémiologie globale.....	9
3.2.2. Epidémiologie de la tuberculose au Mali.....	11
3.3 Co-infection VIH/ Tuberculose.....	11
3.4 Epidémiologie des mycobactéries non tuberculeuse (MNT).....	11
3.5 Le Complexe <i>mycobacterium avium</i> (MAC).....	12
3.6. Quelques mycobactéries atypiques MNT.....	13
3.6.1. <i>Mycobacterium kansasii</i>	13
3.6.2. <i>Mycobacterium abscessus</i>	13
3.6.3. <i>Mycobacterium marinum</i>	14
3.6.4. <i>Mycobacterium xenopi</i>	14
3.6.6. <i>Mycobacterium Szulgai</i>	15
3.6.7. <i>Mycobacterium malmoense</i>	15
3.6.8. <i>Mycobacterium fortuitum</i>	15
3.6.9. <i>Mycobacterium ulcerans</i>	15
3.7. Diagnostic biologique de la tuberculose et des mycobactéries non tuberculeuses... .	16
3.7.1. Diagnostic microscopique.....	16
3.7.2 Diagnostic par la culture.....	16
3.7.3. Diagnostic moléculaire de la tuberculose par le test Xpert® MTB/RIF.....	16
3.7.4. Diagnostique des mycobactéries non tuberculeuses (MNT).....	17
3.7.5. Diagnostic bactériologique des MNT.....	17
3.7.6 Diagnostic moléculaire des mycobactéries non tuberculeuses (MNT).....	17
3.8. La Polymérase Chain Réaction (PCR).....	18
3.8.1 Définition de la PCR quantitative (qPCR).....	18
3.8.2 Principe du test qPCR.....	18
3.8.3. Nouvelles perspectives de diagnostic par la technique de qPCR Multiplexe.....	19

3.9. Traitement des mycobactéries non tuberculeuses MNT	19
IV. MATERIELS ET METHODE.....	21
4.1. Matériels.....	21
4.1.1. Matériels biologiques	21
4.1.2. Matériel de laboratoire	21
4.2. Méthodes	21
4.2.1. Cadre et lieu d'étude.....	21
4.2.2. Type et période d'étude.....	22
4.2.3. Populations d'étude	23
4.2.3. Détermination de la sensibilité analytique	23
4.2.4. Critères d'inclusions.....	23
4.2.5. Critères de non inclusions	23
4.3. Méthode de laboratoire.....	23
4.3.1. Extraction d'ADN	24
4.3.2. La Polymérase Chain Réaction (PCR)	26
V. RESULTATS	31
5.1. Résultats globaux	31
5.1.1. Répartition selon le sexe.....	31
5.1.2. Répartition des participants selon la tranche d'âge	32
5.2. Résultats de l'étude de la sensibilité analytique (limite de détection) en utilisant de l'ADN commercial :	33
5.3. Résultats des essais réalisés sur les souches déjà identifiées au laboratoire	34
5.3.1 Cas du Complexe <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	34
5.3.1 Cas du Complexe <i>Mycobacterium avium</i>	35
5.3.2 Cas des autres mycobactéries non tuberculeuses (Pan-Mycobactérie)	36
5.4. Validation du test Multiplexe RT-PCR avec des échantillons cliniques des crachats.....	40
5.4.1. Répartition selon le statut VIH	40
5.4.2. Résultats de la culture et de l'essai multiplexe RT-PCR pour la détection simultanée de CMT et MNT chez des participants de l'étude	40
VI. DISCUSSION	46
VII. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS.....	51
7.1 Conclusion.....	51
7.2 Recommandations	52
VIII. REFERNCES	54

ANNEXES 60



INTRODUCTION

I. INTRODUCTION

La tuberculose est une maladie infectieuse contagieuse provoquée par une mycobactérie du complexe tuberculosis principalement le *Mycobacterium tuberculosis* ou bacille de Koch (1,2). C'est une maladie infectieuse fréquente et mortelle en dépit de l'existence d'un traitement efficace (3). Elle constitue aujourd'hui un problème majeur de santé publique au niveau mondial. D'après les dernières estimations de l'organisation mondiale de la santé (OMS), il y a environ 10 millions de cas de tuberculose à l'échelle mondiale dont 90% d'adultes, 65% de sexe masculin, et 10% vivant avec le VIH (2,4). En Afrique, le taux de décès estimé à 81 pour 100 000 habitants est le plus élevé au monde (2,5).

Les techniques recommandées par l'OMS pour diagnostiquer la tuberculose sont notamment l'examen microscopique par la recherche de BAAR (techniques de Ziehl Neelsen et de coloration fluorescente), la culture et le test Xpert MTB/RIF du GeneXpert (6). Les tests moléculaires ont l'avantage d'être rapides et ils peuvent être mis en place au premier échelon du système de santé. Les exigences qui leur sont associées en matière de bio sûreté sont moindres, et ils permettent d'accélérer le diagnostic(6). Seule la culture et les tests moléculaires peuvent faire la distinction entre le complexe *M. tuberculosis* et les mycobactéries non tuberculeuses, mais la microscopie ne permet de faire cette distinction.

Les infections à mycobactérie non-tuberculeuse (MNT) sont associées à la morbidité et à la mortalité croissante dans de nombreuses régions du monde. Actuellement, plus de 125 différents types de MNT existent dans l'environnement, avec au moins 20 espèces connues pour être causes de maladies humaines (7,8). Le rôle des MNT dans les maladies pulmonaires ou systémiques a été très bien étudié dans les pays développés, mais le rôle et le fardeau de ces infections dans les pays en voie de développement (où la tuberculose est endémique) n'a pas été bien étudié (9). Ceci pourrait être dû aux symptômes non spécifiques de ces infections qui sont souvent non distinguables des symptômes de la tuberculose (TB) et aussi de l'insuffisance de plateau technique pour le diagnostic qui est la culture et l'identification des isolats (9). Une étude conduite au laboratoire du Centre Universitaire de Recherche Clinique (UCRC) a montré que le fait de ne pas pouvoir poser correctement le diagnostic d'une infection par les MNT chez les patients avec suspicion de tuberculose pulmonaire chronique, et de la tuberculose multi ou ultra résistante conduit généralement à un faux diagnostic dans 40% des cas (10). Ceci entraîne donc un traitement inapproprié qui est long, coûteux, toxique et qui ne répond pas aux besoins du patient (10–12).

Bien que les infections à MNT étant connues comme être associées au Syndrome d'Immunodéficience acquis (SIDA), il est de plus en plus évident que la maladie pulmonaire

due aux MNT est très fréquente dans la population séronégative au VIH (7,13). Cependant, des résultats montrent que la tuberculose pulmonaire et les maladies à MNT atteignent les formes sévères chez les personnes séropositives (14,15). La capacité de faire la différence entre une infection MNT et la tuberculose est donc d'une importance primordiale pour traiter correctement ces patients (13). Dans la plupart des centres de diagnostic, la culture n'étant pas disponible (à cause de son coût et de sa complexité de mise en œuvre), la microscopie des frottis de crachats est généralement le seul test bactériologique disponible (16,17). La microscopie est très limitée pour le diagnostic des MNT mais acceptable pour la tuberculose pulmonaire (puisque'il faut au moins 10 000 CFU/ml) (10,18). Cette performance est encore plus faible chez les patients séropositifs au VIH (14).

Au Mali, il existe un chevauchement important entre les maladies dues aux MNT et la tuberculose pulmonaire. Dans une étude récente menée au laboratoire SEREFO/ UCRC, à Bamako, il a été constaté que parmi 142 patients en échec de traitement antituberculeux, 12% étaient infectés par les MNT (10). Dans cette population des patients infectés par le MNT, 73% étaient infectés uniquement par *Mycobacterium avium* (10). La fréquence élevée d'un diagnostic erroné des infections à MNT dans les pays en voie de développement est surtout favorisée par les algorithmes utilisés en son temps pour le traitement des patients tuberculeux. Dans ces algorithmes les 'cas chroniques' de tuberculose sont définis comme des patients qui continuent d'excréter les bacilles acido alcool résistants (BAAR) dans les crachats à la microscopie après 5 mois de traitement et/ou retraitement avec les antituberculeux de première ligne (la rifampicine [R], l'isoniazide [H], le pyrazinamide [Z], l'éthambutol [E] et la streptomycine)(8).

Le Complexe *Mycobacterium avium* (MAC) est la cause la plus fréquente des infections pulmonaires dues aux MNT aussi bien chez les patients séropositifs que les patients séronégatifs au VIH(11,19). Et pourtant, un traitement relativement efficace existe pour l'infection MAC (contrairement à beaucoup d'autres MNT) et est généralement traitée avec 2 ou 3 molécules pendant au moins 12 mois. C'est ce qui justifie la nécessité de diagnostiquer correctement ces cas (13). Les médicaments de première intention couramment utilisés sont les macrolides (clarithromycine ou azithromycine), l'éthambutol et les rifamycines (rifampine, rifabutine) (13). Des aminoglycosides, tels que la streptomycine et l'amikacine sont également utilisés comme options supplémentaires.

Dans les pays développés comme aux États-Unis par exemple, les MNT sont de plus en plus reconnues comme une cause importante de morbidité, avec au moins 47 cas d'infections/100 000 habitants rapportées en 2012 dont 80% sont des cas dus aux MAC(9).

Ceci démontre la nécessité d'avoir un outil de diagnostic qui nous permettra de poser le diagnostic simultané de la tuberculose pulmonaire et des infections causées par les MNT. C'est pour cette raison que nous avons entrepris cette étude qui s'est fixé comme objectif principal, la mise au point d'un test moléculaire qui nous permettra de diagnostiquer la tuberculose pulmonaire et/ou les infections dues aux MNT directement dans le crachat sans faire la culture.



OBJECTIFS

II. OBJECTIFS

2.1 Objectif Général

Mettre au point une technique de Multiplexe RT-PCR en temps réel pour la détection simultanée des mycobactéries tuberculeuses et des mycobactéries non tuberculeuses chez les patients tuberculeux au Mali.

2.2 Objectifs spécifiques

1. Déterminer la sensibilité analytique des amorces utilisées dans la technique Multiplexe RT-PCR en temps réel pour la détection simultanée des mycobactéries tuberculeuses et non tuberculeuses.
2. Tester la procédure sur des souches déjà isolées et identifiées au laboratoire BSL-3 du Centre Universitaire de Recherche Clinique (UCRC).
3. Tester la procédure sur des échantillons cliniques de crachats à travers une étude pilote.



GENERALITES

III. GENERALITES

3.1 Définitions des termes

- **Les mycobactéries**

Les mycobactéries sont des bacilles responsables d'un grand nombre d'infections tuberculeuse et non tuberculeuse à localisation pulmonaire et extra pulmonaire (20).

- **La tuberculose**

La tuberculose (TB) est une maladie infectieuse causée par une bactérie *Mycobacterium tuberculosis* qui peut se transmettre à d'autres personnes lorsque les personnes atteintes de tuberculose expulsent des bactéries dans l'air à travers des gouttelettes (par exemple en toussant ou en parlant) et qui est inhalées par une autre personne. Elle touche généralement les poumons (tuberculose pulmonaire) mais peut également toucher d'autres organes (tuberculose extrapulmonaire) (21).

L'agent pathogène responsable de la tuberculose est une mycobactérie, appartenant au phylum des *Actinobacteria*, à l'ordre des *Actinomycetales*, au sous ordre des *Corynebacterineae*, à la classe des *Shizomycetes* et à la famille des *Mycobacteriaceae*. Cette famille a un seul genre : le genre *Mycobacterium*, dans lequel nous avons de nombreuses espèces. Les trois espèces les plus connues en Afrique de l'Ouest sont : *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, et *Mycobacterium africanum*. Le *Mycobacterium tuberculosis* est responsable de la plupart des infections tuberculeuse chez l'homme (22).

- **L'infection Tuberculeuse Latente (ITL)**

L'ITL est la présence de bacilles tuberculeux dans l'organisme, à l'état quiescent, sans manifestation de la tuberculose maladie. Les individus diagnostiqués d'ITL sont par définition non contagieux et ne représentent aucun risque pour leur entourage (23).

- **Les Mycobactéries non Tuberculeuses ou Atypiques**

Les mycobactéries atypiques ou mycobactéries non tuberculeuses sont des bactéries environnementales, et peuvent être pathogènes ou non pathogènes pour l'homme. Ceux sont des groupes de bacilles souvent non pathogènes pour l'homme comparés aux mycobactéries tuberculeuses. Elles se distinguent de ces dernières par leurs caractères biochimiques, culturels, morphologiques et leurs résistances à certains antibiotiques (24). Les Mycobactéries atypiques sont de petits bacilles aérobies assez longs et fins sans spore et sans capsule et ont une croissance lente.

Les infections aux mycobactéries non tuberculeuses répondent toujours à la définition des maladies rares et leur plus grand nombre d'espèce rend leur étude encore plus complexe (25).

3.2. Epidémiologie de la tuberculose

3.2.1. Epidémiologie globale

La tuberculose est l'une des 10 premières causes de mortalité due aux maladies infectieuses dans le monde (26). En 2018, 10 millions de personnes ont contracté cette maladie et 1,2 million en sont décédés (21). L'OMS estime que le diagnostic et le traitement de la tuberculose ont permis de sauver 53 millions de vies entre 2000 et 2016(21).

La tuberculose est due à une bactérie *Mycobacterium tuberculosis* touchant le plus souvent les poumons. C'est une maladie que l'on peut éviter et soigner. Elle se transmet d'une personne à une autre par émission de gouttelette en toussant, éternuant ou même en parlant. Quand une personne atteinte de tuberculose pulmonaire tousse, crache ou éternue, elle projette des bacilles tuberculeux dans l'air, qu'il suffit d'inhaler pour s'infecter (27).

Environ 5% des sujets infectés par le bacille tuberculeux développent la tuberculose maladie au cours de leur vie. En revanche, le risque est beaucoup plus élevé chez les personnes séropositives au VIH de développer la tuberculose active et d'en mourir à cause de l'immunodépression que provoque le VIH.

Géographiquement les cas de tuberculose enregistré en 2018 par l'OMS étaient situés dans l'Asie du Sud-Est (44%), Afrique (24%), la Pacifique Occidentale (18%), la Méditerranée (8%), l'Amérique et l'Europe (3%) (21).

Huit pays ont totalisé les deux tiers des nouveaux cas, il s'agit de: l'Inde (27%), la Chine (9%), l'Indonésie (8%), la Philippines (6%), le Pakistan (6%), le Bangladesh (4%), le Nigéria (4%), et l'Afrique du Sud (3%) (21).

Estimated TB incidence rates, 2018

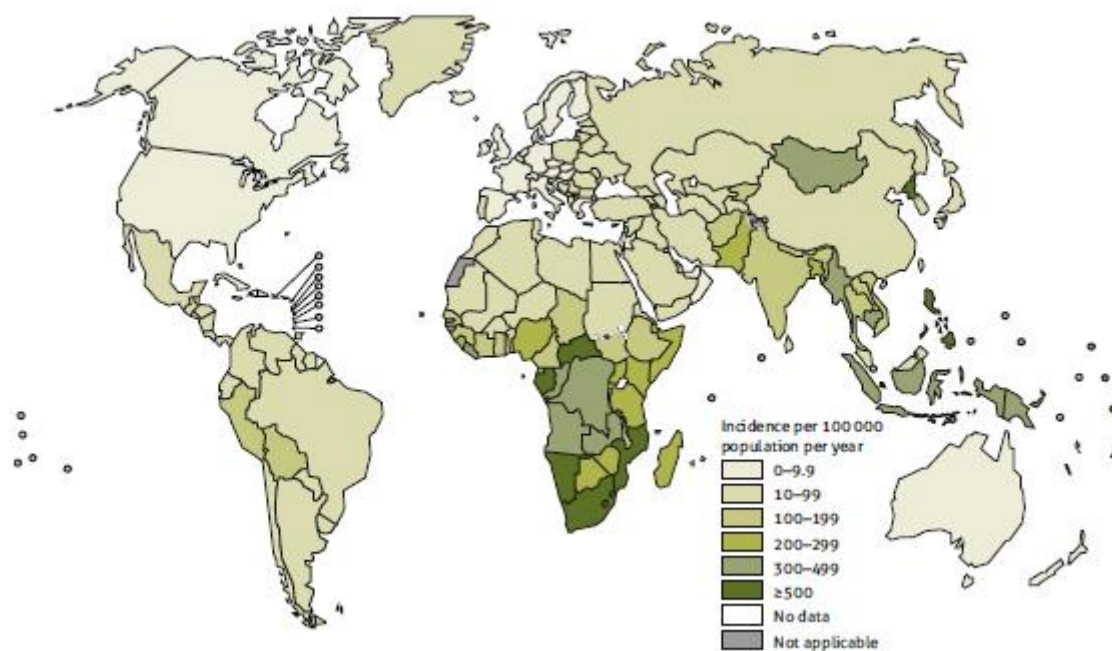


Figure 1: Répartition géographique de la tuberculose dans le monde (27)

3.2.2. Epidémiologie de la tuberculose au Mali

Au Mali, la tuberculose demeure un problème de santé publique avec une incidence estimée à 37 cas pour 100000 habitants en 2018 (28). Le programme a enregistré 7084 cas de tuberculose toutes formes confondues en 2018 contre 6605 cas en 2017 (28). Cette augmentation du nombre de cas pourrait s'expliquer par la création des nouveaux Centre de Diagnostic et de Traitement (CDT).

Le niveau de transmission de la maladie et les paramètres épidémiologiques ont été globalement stables ces dernières années. Ainsi, les différentes formes notifiées en 2018 se répartissent comme suit :

- La proportion de nouveaux cas de tuberculose à frottis positifs 4463 cas ;
- 431 cas de retraitement (rechutes, échecs, reprises de traitement) a été observé en 2018
- 912 nouveaux cas de tuberculose pulmonaire à frottis négatifs en 2018 ;
- 1278 cas de tuberculose extra pulmonaire ont été enregistrés en 2018

Une évolution en dents de scie du taux de détection de la maladie a été observée entre 2014 et 2018, passant de 58% des estimations de l'OMS en 2014 à 65% en 2018. Le taux de décès était de 9,77% en 2018. L'incidence de la maladie a diminué légèrement dans le pays au cours des dernières années (28). Sur les 7084 cas notifiés en 2018, 71% ont bénéficié du test de VIH avec un taux de positivité national de 10% (29).

3.3 Co-infection VIH/ Tuberculose

Les sujets infectés par le VIH ont 20 à 30 fois plus de risque de développer une tuberculose active qu'un individus non infecté par le VIH (21). La tuberculose et le VIH forment une association meurtrière, chacun accélérant la progression de l'autre.

En 2018, environ 251000 milles décès ont été enregistrés chez les personnes co-infectés TB/VIH (21). Cette même année, on estime que 8,6% des tuberculeux sont des personnes vivantes avec le VIH (21).

3.4 Epidémiologie des mycobactéries non tuberculeuse (MNT)

Selon les estimations de la société Américaine des maladies thoraciques (ATS/IDSA), l'incidence des MNT a été de 1 à 1,8 cas pour 100 000 habitants en 2007 (7) .

Les infections à MNT ne font pas l'objet de déclaration obligatoire et l'estimation de leurs incidences est basée sur le nombre de cas rapportés parmi les cas suspects de tuberculose.

De manière globale, l'isolement des MNT chez les cas suspect de tuberculose augmente chaque année, même s'il reste difficile de savoir si cela est associé à une augmentation de

l'incidence de la maladie à MNT ou simplement à une amélioration des techniques d'isolement des MNT (30).

L'épidémiologie des MNT diffère d'un pays à l'autre et d'un continent à l'autre.

Les mycobactéries non tuberculeuses les plus fréquemment responsables d'infections respiratoires peuvent être classées comme suite :

Les mycobactéries non tuberculeuses à croissance lente : *M. avium*, *M. intracellulaire* et *M. chimaera* qui forment le Complexe *avium* (MAC) *M. kansasii* *M. xenopi* et plus rarement *M. szulgai*, *M. malmoense*, *M. simiae* ;

Les mycobactéries non tuberculeuses à croissance rapide : *M. abscessus*, *M. bolletii* et *M. massiliense* qui forment le Complexe *abscessus* (MABSC), *M. fortuitum* et *M. chelonae* (31). Les pathologies que peuvent causer ces mycobactéries sont très variées (infections pulmonaires, adénites, affections cutanées ou sous-cutanées, voire formes généralisées).

Les antituberculeux sont habituellement inactifs sur ces mycobactéries non tuberculeuses par conséquent un antibiogramme doit être réalisé dans certaines situations pour initier le traitement. La chirurgie peut être parfois envisagée lorsque c'est possible (32).

Il n'existe pas de contamination interhumaine pour ces mycobactéries non tuberculeuses.

3.5 Le Complexe *Mycobacterium avium* (MAC)

Le Complexe *Mycobacterium avium-intracellulare* (MAC) est un groupe hétérogène de bacilles ubiquitaires saprophytes à croissance lente (33). Ce Complexe est retrouvé dans l'environnement, l'eau et le sol. Il est composé de deux espèces distinctes, mais suffisamment proches pour être groupées dans le Complexe *M. avium*. *Mycobacterium avium* est responsable de la tuberculose aviaire et des infections surtout ganglionnaires chez des mammifères domestiques tel que le porc (20). Les oiseaux sauvages ou domestiques peuvent être contaminés par *M. avium*. *Mycobacterium avium* peut infecter le sujet sain, en particulier les femmes de plus de 45 ans, mais cette infection se développe le plus souvent soit dans les poumons préalablement affectés, soit chez un immunodéprimé, soit à la suite d'un geste iatrogène (25). *Mycobacterium avium* est la mycobactérie atypique la plus fréquemment isolée chez les personnes vivantes avec le VIH à un stade avancé avec un taux de lymphocytes CD4 en dessous de 100 cellules par μl (20).

Le traitement de l'infection à *Mycobacterium avium* est difficile en raison de sa résistance aux antibiotiques et de sa capacité à muter. *M. intracellulare* est plutôt responsable d'infections pulmonaire ou d'adénites cervicales chez l'homme (11).

3.6. Quelques mycobactéries atypiques MNT

3.6.1. *Mycobacterium kansasii*

Mycobacterium kansasii est une mycobactérie non tuberculeuse (MNT) facilement reconnue en raison de sa photochromogénicité caractéristique (34), il produit un pigment jaune lorsqu'il est exposé à la lumière.

Buhler et Pollack ont décrit pour la première fois cette mycobactérie à croissance lente en 1953. En microscopie optique, *M. kansasii* se présente sous la forme de barres épaisses rectangulaire, perlées, à Gram positif, plus longues que celles de *M. tuberculosis* (34).

Les infections à *M. kansasii* étaient des infections mycobactériennes non tuberculeuses les plus courantes dans les années 1960 et 1970, avant d'être dépassées par *M. avium-intracellulare*. Cliniquement, *M. kansasii* provoque une maladie caverneuse chronique du lobe supérieur du poumon, semblable à *M. tuberculosis*.

Avec l'avènement de l'infection à VIH, il y avait résurgence de *M. kansasii*, qui a maintenant diminué avec le traitement anti rétroviraux (TAR). *M. kansasii* peut survenir à la fois chez les personnes immunodéprimés et immunocompétents. Il provoque des infections disséminés chez les patients transplantés (34). La rifampicine est le médicament le plus important du traitement des infections dues à *M. kansasii*. Le traitement de première intention recommandé par les directives de l'IDSA-ATS pour *M. kansasii* est la rifampicine, l'éthambutol et l'isoniazide plus la pyridoxine.

La durée de traitement recommandé est de 18 mois, l'objectif étant d'obtenir des résultats de culture négative après 12 mois de traitement.

Aucune transmission interhumaine n'a été documentée avec *M. kansasii*, et il n'y a pas non plus de réservoir animal.

3.6.2. *Mycobacterium abscessus*

M. abscessus est une mycobactérie atypique présente dans l'environnement (eau, sol). Sa première description (à partir d'un abcès du genou) date de soixante ans. Mais cette bactérie n'a été identifiée comme une espèce distincte en 1990 (35,36). On sait aujourd'hui qu'elle est la principale mycobactérie à croissance rapide (MCR) pathogène pour l'homme. Elle est aussi de loin, la principale MCR responsable d'infections parenchymateuses pulmonaires chez des patients présentant une pathologie sous-jacente (mucoviscidose, dilatation des bronches etc. ...) mais également chez les sujets indemnes de toute pathologie respiratoire. On peut ajouter que *M. abscessus* est aussi la MCR la plus fréquemment retrouvée dans les sécrétions bronchiques des patients atteints de mucoviscidose. Outre leur fréquence, il s'agit là (selon les

critères de la Société Américaine des maladies Thoracique) d'une vraie infection pulmonaire dans la majorité des cas (36,37).

3.6.3. *Mycobacterium marinum*

Mycobacterium marinum est une espèce atypique des mycobactéries trouvée dans l'eau froide ou tiède, fraîche ou salée (38).

L'infection à *M. marinum* intervient à la suite de lésions de la peau et des parties molles exposées à un environnement aquatique ou à des animaux marins (38).

L'infection se présente généralement sous la forme d'un granulome localisé, mais peut évoluer en une lymphangite ascendante qui ressemble à la sporotrichose ou peut se propager aux tissus plus profonds.

3.6.4. *Mycobacterium xenopi*

Mycobacterium xenopi fait partie des mycobactéries non tuberculeuses (MNT). Elle a été isolée pour la première fois en 1959 (39), et son caractère pathogène pour l'homme a été mis en évidence plus tardivement.

La transmission se fait par l'intermédiaire d'aérosols contaminés via les pommeaux de douches. Les oiseaux marins pourraient être le réservoir naturel de *M. xenopi*, hypothèse développée devant l'incidence plus importante d'infections sur les côtes Grande-Bretagne qu'à l'intérieur des terres. Mais aucun prélèvement sur des oiseaux marins n'a permis de la confirmer. L'infection à *M. xenopi* survient essentiellement chez les patients ayant une pathologie respiratoire chronique, plus rarement chez les patients avec une immunodépression générale, en particulier séropositif pour le VIH, et parfois chez les patients sans comorbidité particulier (40).

3.6.5 *Mycobacterium gordonae*

Mycobacterium gordonae est un type de mycobactérie non tuberculeuse à croissance lente, est généralement considéré comme un agent pathogène faible, bien qu'il ait provoqué certaines maladies chez l'homme (41–44).

Des techniques avancées de diagnostic en laboratoire ont amélioré l'isolement et l'identification des mycobactéries non tuberculeuses. *Mycobacterium gordonae*, une espèce de mycobactérie couramment trouvée, et doit son nom au bactériologiste américaine Ruth E. Gordon (45).

Cette espèce présente dans l'environnement est retrouvée dans des prélèvements plurimicrobiens (prélèvements buccaux, des selles etc...) chez l'être humain. Il s'agit très souvent de colonisation sans incidence pathogène.

Elle est responsable de contamination de l'eau potable, elle donne aussi des colonies scotochromogènes, rondes, jaune-orangées, lisses, brillantes d'aspect large au microscope (20).

3.6.6. *Mycobacterium Szulgai*

Mycobacterium szulgai (*M. szulgai*) est une mycobactérie non tuberculeuse à croissance lente qui a été décrite pour la première fois en 1972 par Marks et al. (46). Il a été nommé d'après le Dr T. Szulga, qui a mis au point la méthode d'analyse des lipides qui identifiait cette MNT comme une nouvelle espèce.

Elle est génétiquement proche de *M. malmoense* mais, phénotypiquement différente (24). Bien que cette mycobactérie soit rarement isolée chez l'homme, sa présence dans les prélèvements signe le plus souvent une réelle infection respiratoire (24,46). La présentation clinique et radiologique est très proche de la tuberculose, avec des lésions cavitaires apicales chez des patients ayant des antécédents de tuberculose pulmonaire (24). L'immunosuppression est un facteur de risque d'infection extra pulmonaire à *M. szulgai*.

3.6.7. *Mycobacterium malmoense*

Mycobacterium malmoense est principalement responsable d'infections pulmonaires dans le Nord de l'Europe (la Scandinavie et la Grande-Bretagne). Comme *M. kansasii* et *M. szulgai*, *M. malmoense* est généralement responsable de réelles infections respiratoires, cliniquement et radiologiquement proches de la tuberculose (24)

3.6.8. *Mycobacterium fortuitum*

Ce sont des mycobactéries atypiques qui se développent rapidement dans l'environnement. Il a été retrouvé dans des sources d'eau naturelle, ainsi que dans les eaux usées et la boue (47).

Elles sont fréquemment isolées dans les eaux domestiques et hospitalières et sont retrouvées à l'état commensal chez l'homme. Elles sont retrouvées dans des situations iatrogènes : pose de cathéters, prothèses cardiaques, après mésothérapie ou lors des dialyses péritonéales.

Ces mycobactéries sont naturellement résistantes aux antituberculeux et à des nombreux antibiotiques (20)

3.6.9. *Mycobacterium ulcerans*

Mycobacterium ulcerans est une bactérie présente dans l'environnement. Son mode de transmission à l'être humain reste inconnu (48). Toutefois, pour se développer, *Mycobacterium ulcerans* a besoin d'une température comprise en 29°C et 33°C (alors qu'elle est de 37°C pour *Mycobacterium tuberculosis*) et d'une faible concentration en oxygène (2,5%). Ce micro-

organisme produit une toxine particulière, la mycolactone, qui provoque des lésions tissulaires et inhibe la réponse immunitaire (48).

L'ulcère de Buruli est une infection chronique débilissante causée par *Mycobacterium ulcerans*. Cette infection affecte la peau et parfois les os et peut entraîner des déformations et des incapacités permanentes.

Au moins 33 pays situés dans les régions tropicales, subtropicales et tempérées ont signalé l'ulcère de Buruli en Afrique, en Amérique du Sud et dans le Pacifique occidental. Depuis 2013, l'Australie enregistre une augmentation du nombre de cas.

Selon les données partielles provenant de 13 pays, il y a eu 2206 cas d'ulcère de Buruli en 2017 contre 1920 en 2016 ; l'Australie et le Nigéria sont les pays notifiant le plus de cas (48).

3.7. Diagnostic biologique de la tuberculose et des mycobactéries non tuberculeuses

3.7.1. Diagnostic microscopique

La microscopie des frottis d'expectorations est la principale méthode de diagnostic de la tuberculose pulmonaire dans les pays à faible revenu et à revenu intermédiaire (49). C'est un test simple, rapide mais elle a une faible sensibilité avec un taux de détection qui est autour de 10 000 CFU/ μ l d'expectoration et une spécificité faible surtout dans les zones où la co-infection CMT MNT sont fréquents (11,18,50–52).

3.7.2 Diagnostic par la culture

Initialement pratiquée sur milieux solide de Löwenstein-Jensen nécessitant 3 à 6 semaines pour pousser, elle est aussi aujourd'hui réalisée sur un milieu liquide de Middlebrook réduisant le temps de positivité de la culture. La lecture de ces milieux peut être automatique à travers l'automate ou le manuelle mais ne diffère pas le CMT des MNT (52).

La culture des échantillons est la méthode de référence ne nécessitant que de 10 CFU/ml pour être positive (53). Cependant, elle doit être effectuée dans un laboratoire à haut confinement, de niveau de biosécurité élevée souvent non disponible dans les pays à ressources limités (53).

3.7.3. Diagnostic moléculaire de la tuberculose par le test Xpert® MTB/RIF

C'est un test PCR en temps réel permettant à la fois la détection du Complexe *Mycobacterium tuberculosis* et leur résistance à la Rifampicine.

C'est un test simple à réaliser ne nécessitant pas de compétences particulières pour le manipulateur ni d'infrastructures répondant aux critères d'exigence habituels pour réaliser des tests moléculaires(54).

Ce test est sensible aux membres du Complexe *Mycobacterium tuberculosis* uniquement, il ne peut pas détecter les MNT. Selon les données non publiées du Laboratoire UCRC, la performance diagnostic du Xpert MTB/RIF est comparable à la microscopie améliorée après concentration (données non publiées).

3.7.4. Diagnostique des mycobactéries non tuberculeuses (MNT)

Le réservoir des MNT étant environnemental (terre, eau, mais également dans les réseaux de distribution, même après traitement), la présence d'une MNT dans un prélèvement ne permet pas d'affirmer le diagnostic d'infection.

L'isolement d'une MNT dans les prélèvements respiratoires n'apporte pas la certitude d'une infection pulmonaire à MNT. En effet, étant donnée leur caractère environnemental, leur présence peut n'être liée à une contamination du prélèvement (25). Dans les dernières recommandations communes à l'ATS (2007) et la société américaine des maladies infectieuses (IDSA), il faut deux prélèvements positifs pour confirmer une infection et un prélèvement de Lavage broncho alvéolaire (LBA) reste suffisant pour confirmer le diagnostic positif(7).

3.7.5. Diagnostic bactériologique des MNT

Les critères microbiologiques sont indispensables au diagnostic d'infection due aux MNT. Ces critères ont été régulièrement modifiés au cours des dernières décennies. Actuellement, il est nécessaire d'avoir soit (24,31):

- Au moins 2 expectorations positives en culture à la même mycobactérie isolée ;
- Ou une culture positive d'une aspiration bronchique ou lavage bronchoalvéolaire disponible.

3.7.6 Diagnostic moléculaire des mycobactéries non tuberculeuses (MNT)

L'identification des mycobactéries atypiques est réalisée par tests moléculaires également.

a. Line probe assay Hain® Test des MNT

Geno Type *Mycobacterium* CM® (« Mycobactéries communes ») permet l'identification rapide et fiable du Complexe *M. tuberculosis* et des MNT.

Le Geno Type *Mycobacterium* CM® permet l'identification du Complexe *M. tuberculosis* et 27 espèces de MNT cliniquement importante pour l'homme en utilisant des sondes spécifiques à chaque espèce de *Mycobacterium tuberculosis* et MNT. Dans ce cas, une identification supplémentaire avec Geno Type *Mycobacterium* AS® est recommandée (55).

b. Test GenProbe

Le système d'identification AccuProbe est un test commercial approuvé par l'Administration Fédérale des médicaments (FDA) des États-Unis pour l'identification des CMT, MAC, *M. goodnae* et *M. kansasii* à partir de la croissance dans des milieux de culture solides ou liquides (56,57). Le principe du test Gen Probe repose sur l'amplification d'une cible de l'ARN ribosomal par une reverse transcriptase.

3.8. La Polymérase Chain Réaction (PCR)

3.8.1 Définition de la PCR quantitative (qPCR)

La PCR quantitative permet d'évaluer des charges virales ou parasitaires. C'est une technique qui a beaucoup d'avantages par rapport aux techniques conventionnelles plus anciennes (58).

3.8.2 Principe du test qPCR

La PCR quantitative en temps réel repose sur la possibilité de suivre le résultat de l'analyse en cours (« en temps réel ») à l'aide de la fluorescence. Les données de fluorescence sont collectées à chaque cycle de la PCR et représentent la quantité de produits amplifiés à cet instant. Plus l'échantillon est concentré en molécules cibles à l'origine, moins il faudra de cycles pour atteindre un point pour lequel le signal fluorescent est significativement supérieur au bruit de fond. Ce point est défini comme le cycle seuil (Ct) et apparaît en début de phase exponentielle (59).

Les matériels et réactif nécessaires pour la qPCR sont :

a) Le matériel génétique : ADN ou ARN

Avant les réactions PCR, le matériel génétique est extrait à partir de l'échantillon à analyser. Puis, ces extraits d'ADN ou d'ARN contenant le fragment que l'on souhaite amplifier sont purifiés et peuvent être utilisés pour les réactions PCR.

b) Les deux amorces

Ce sont des fragments courts d'ADN, capables de s'hybrider de façon spécifique, grâce à la complémentarité des bases, sur l'un des deux brins d'ADN. Les amorces sont choisies de façon à encadrer la séquence d'ADN à amplifier. La taille de ces amorces est généralement d'une vingtaine de Bases. De plus, les amorces sont en très forte concentration par rapport à celle de l'ADN à amplifier.

C) Les DésoxyriboNucléotides-Tri-Phosphates (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

Les dNTPs (Désoxyribonucléotides-Tri-Phosphates) sont des molécules de base, qui constituent l'ADN, utilisés par la Taq polymérase pour la synthèse du nouveau brin d'ADN complémentaire.

- d) Une enzyme, Taq polymérase

L'enzyme utilisée est une polymérase, c'est-à-dire qu'elle peut synthétiser un nouveau brin d'ADN à partir du brin d'ADN matrice après s'être fixée à une amorce.

e) Le milieu réactionnel

Le milieu réactionnel de la PCR comporte l'ADN à amplifier, les dNTPs, les deux amorces, la Taq polymérase, un tampon et des ions magnésium (MgCl₂). Ces deux derniers composants définissent un milieu avec un pH optimal et une concentration saline optimale pour le bon fonctionnement de l'enzyme.

3.8.3. Nouvelles perspectives de diagnostic par la technique de qPCR Multiplexe

La PCR Multiplexe (mPCR) est une technique validée pour la détection rapide et l'identification précise d'un grand nombre de virus et des bactéries respiratoires en incorporant plusieurs amorces dans un tube de réaction pour amplifier les fragments génomiques de nombreux pathogènes (60–63).

3.9. Traitement des mycobactéries non tuberculeuses MNT

Le traitement des infections à MNT est long (12 mois) et complexe avec association de plusieurs antibiotiques dont le choix n'est pas toujours clairement guidé par des évidences. Les antibiotiques utilisés pour le traitement posent des problèmes de toxicité chez les patients pouvant provoquer des infirmités (surdité et autres) et ils sont peu abordables (64,65). Il est donc préférable que leur prise en charge soit faite par des cliniciens expérimentés dans cette pathologie et disposant d'un laboratoire de microbiologie adapté (31).

Le traitement standard des infections à MAC est basé sur l'utilisation d'un macrolide (clarithromycine ou azithromycine) l'éthambutol, la rifampicine et parfois un aminoglycoside en administration quotidienne ou hebdomadaire (7,13).

Le traitement standard des infections à *M. kansasii* est plus simple et les rechutes sont rares. La durée recommandée est de 12 mois après négativation des cultures (7,31)



METHODOLOGIE

IV. MATÉRIELS ET METHODE

4.1. Matériels

4.1.1. Matériels biologiques

- Souches de mycobactéries :
 - Souches du Complexe *Mycobacterium tuberculosis*
 - Souches du Complexe *Mycobacterium avium*
 - Souches du *Mycobacterium gordonae*
 - Souches du *Mycobacterium kansasii*
 - Souches du *Mycobacterium fortuitum*
- Echantillons de crachats
- ADN de références ou commerciaux
 - ADN du Complexe *Mycobacterium tuberculosis*
 - ADN du Complexe *Mycobacterium avium*
 - ADN des mycobactéries non tuberculeuses ou Pan

4.1.2. Matériel de laboratoire

- ABI Fast 7500 Dx :

L'instrument de PCR en temps réel 7500 Fast Dx est conçu pour fournir les performances requises pour des résultats de haute qualité dans un format à 96 puits (66). Le mode rapide effectue généralement les analyses en moins de 40 minutes, le mode standard facilite l'utilisation de tests PCR en temps réel sans modifier les paramètres du cycle thermique. Excitation variable à 5 couleurs permet des dosages multiplexe.

4.2. Méthodes

4.2.1. Cadre et lieu d'étude

Le laboratoire SEREFO (Centre de Recherche et de Formation sur le VIH et la Tuberculose, actuel UCRC) a été inauguré officiellement le 6 mars 2006, Ce programme de recherche est le fruit d'un partenariat entre l'Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako (USTTB ex Université de Bamako) et l'Institut National d'allergie et des maladies infectieuses des Instituts Nationaux de la Santé des Etats Unis d'Amérique (NIH/NIAID). Depuis 2015, les laboratoires UCRC/SEREFO font partir du programme de recherche clinique de l'université appelé Centre Universitaire de Recherche Clinique (UCRC). Ce centre possède plusieurs laboratoires :

- Un Laboratoire Core Immunologie
 - Un Laboratoire Clinique
 - Un Laboratoire de Tuberculose et des Fièvres hémorragiques
 - Un Laboratoire de biologie moléculaire
 - Un laboratoire d'immunologie (Core)
 - Un Laboratoire d'épidémiologie moléculaire du VIH
- **Un laboratoire d'immunologie (Core) :** Il a en son sein des cymomètres de flux et des chaînes ELISA complète. Ce laboratoire conduit des études permettant de complexes visant à mieux comprendre la pathogénie de la maladie, explore le système immunitaire et conduit des évaluations de nouveaux vaccins contre le paludisme et la maladie à virus Ebola.
- **Le laboratoire de tuberculose et des fièvres hémorragiques :** C'est un laboratoire de Biosécurité de Niveau 3 (BSL-3+) permettant la manipulation de pathogènes hautement dangereux. Il est certifié annuellement par des structures habilitées pour les normes internationales de sécurité microbiologiques depuis 2006. C'est un des premiers laboratoires de niveaux de sécurité 3 plus dans la sous-région francophone. Elle a conduit le diagnostic des suspects de la maladie à virus Ebola du Mali et certains pays tels que la Guinée. Elle a joué un rôle clé dans la riposte contre l'épidémie ouest africaine (2014-2015) de la maladie à virus Ebola et conduit actuellement le diagnostic des patients suspect de COVID-19 au Mali (67).
- **Un laboratoire de biologie moléculaire :** composé de plusieurs thermocycleurs pour PCR classique et PCR en temps réelle. Ce laboratoire fait essentiellement le typage des souches mycobactérie isolées dans le BSL-3 en vue d'établir l'épidémiologie moléculaire de la tuberculose au Mali et conduit le diagnostic les fièvres hémorragiques et le nouveau coronavirus après inactivation dans le BSL-3.
- **Un laboratoire d'épidémiologie moléculaire du VIH :** il s'occupe essentiellement du suivi de la charge virale des patients infectés par le VIH/SIDA sous traitement antirétroviral (ARV). Elle conduit aussi le génotypage des souches de VIH en vue de déterminer s'ils sont résistants aux ARV.

4.2.2. Type et période d'étude

Nous avons réalisé une étude transversale au laboratoire de Tuberculose et des fièvres hémorragiques du centre Universitaire de recherche clinique (UCRC/SEREFO) qui s'est déroulée de février 2018 au septembre 2019.

4.2.3. Populations d'étude

L'étude a porté sur 13 volontaires qui étaient répartis comme suit :

- Des nouveaux cas de tuberculose pulmonaire
- Des cas d'échec et/ou rechutes de tuberculose
- Des cas suspects de mycobactériose atypique

4.2.3. Détermination de la sensibilité analytique

La sensibilité analytique a été déterminée en utilisant l'ADN commercial des mycobactéries tuberculeuses et non tuberculeuses à différentes concentrations de CFU/ml.

4.2.4. Critères d'inclusions

Etaient inclus dans cette étude, les patients :

- Cas suspects de tuberculose ou de mycobactériose non tuberculeuse ;
- Âgé(e)s de 18 ans au moins ;
- Qui acceptaient volontiers de signer le consentement libre et éclairé ;
- Qui étaient capables de donner les échantillons biologiques requis pour l'étude ;
- Qui acceptaient de se faire dépister pour le VIH ;
- Qui acceptaient que ses échantillons soient gardés pour des études futures.

4.2.5. Critères de non inclusions

N'ont pas été inclus dans l'étude, les patients :

Qui avaient des troubles médicaux connus ou toute autre circonstance qui de l'avis du médecin investigateur pourrait rendre la participation néfaste pour la santé du volontaire.

4.3. Méthode de laboratoire

La mise au point de l'essai Multiplexe PCR pour le diagnostic simultané de CMT et MNT s'est déroulé au laboratoire UCRC/SEREFO à la Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie de l'Université des Sciences, Techniques et Technologies de Bamako (USTTB).

Avant d'utiliser les échantillons des patients, nous avons mené une étude pilote qui a utilisé l'ADN commercial des souches de mycobactéries déjà identifiées par séquençage, pour faire la mise au point de la technique de Multiplexe RT-PCR en temps réel.

Des souches de mycobactéries déjà identifiées ont été isolées dans le laboratoire P3 de UCRC-SEREFO chez des personnes atteintes de tuberculose pulmonaire ou de mycobactériose non tuberculeuses. Les souches utilisées ont été : complexe *M. avium*, *M. goodsona*, *M. kansasii*, *M. intracellulaire*, *M. fortuitum* et des souches de CMT comme souche de référence.

Nous avons poursuivi l'évaluation sur les crachats de 13 patients suspects de tuberculose et/ou de mycobactéries atypiques.

4.3.1. Extraction d'ADN

❖ Principe

L'extraction base sur la capture spécifique de l'ADN ou l'ARN est une technique qui utilise des sondes spécifiques et des billes magnétique pour capturer des séquences d'ARN ou d'ADN spécifiques, puis les extraire directement de la solution. Ces billes magnétiques offrent une alternative efficace et en phase solide à la nitrocellulose et vous offrent un niveau inégalé de qualité de produit et de cohérence des données.

➤ Matériels et réactifs utilisés

- Matériels utilisés

- Tubes coniques 1.8ml
- Tube de fluidification contenant de la solution de Lauryl Sulfate de Sodium (SDS) et du Tris PH8 pour homogénéiser le crachat
- Tube de liaison contenant du sel de Magnésium et de Sodium
- Plaque chauffante agitatrice
- Portoir magnétique
- Portoir rotatrice
- Micropipette et embouts de 10 μ l
- Micropipette et embouts de 20 μ l
- Micropipette et embouts de 100 μ l
- Micropipette et embouts de 200 μ l
- Micropipette et embouts de 1000 μ l
- Pipette de 1 μ l
- Pipette de Pasteur
- Portoir de tube conique
- Centrifugeuse
- Les tubes coniques 1.5 ml

- Réactifs utilisés et leur rôle

- **Tampon de Tris et Tween20** : Il est utilisé comme solution de lavage.
- **Protéinase K** : Il lyse la paroi bactérienne et libère le matériel génétique.

- **Contrôle d'extraction** : il permet de confirmer la présence ou pas de l'ADN après extraction.
- **Solution de Bille** : elle permet de capturer l'ADN par l'intermédiaire de la capture sonde.
- **Capture sonde** : il permet la capture des brins d'ADN complémentaire des MNT et du CMT.

➤ **Procédure d'extraction d'ADN par capture spécifique**

Préparer le poste de sécurité microbiologique (Hotte) : placer du papier absorbant et l'imbiber de solution désinfectante.

1. Transférer le crachat dans les tubes de fluidifications, ajouter 10 μ l du contrôle d'extraction et 50 μ l de protéinase K pour fluidifier le crachat.
2. Incuber pendant 8 minutes à 55°C et ensuite continuer cette incubation pendant 10 minutes à 100°C sur une plaque chauffante agitatrice en même temps.
3. Pendant l'incubation préparer des tubes de liaisons et mettre 5 μ l de sonde de capture (une sonde qui va se lier avec les ADN de mycobactéries dans le tube).
4. Après les 10 minutes d'incubation, centrifuger brièvement l'échantillon de crachat fluidifié.
5. Transférer l'échantillon de crachat fluidifié dans le tube préparé contenant la sonde de capture.
6. Mélanger et le remettre en incubation à 60°C pendant 20 minutes.
7. Avant la fin de l'incubation, prendre 22 μ l d'une solution de bille pour chaque échantillon et placer les sur le portoir magnétique pour laver les billes. Les billes adhèrent la paroi du tube en contact avec le portoir magnétique et on enlève le surnageant.
8. Reprendre ce lavage 3 fois avec la solution tampon.
9. Après ces lavages, remettre en suspension les billes dans le volume initial.
10. Après les 20 minutes ajouter 20 μ l de cette solution de bille lavé dans chaque échantillon
11. Placer les échantillons sur un portoir rotatif pendant 10 minutes afin de bien mélanger la solution. Les billes vont se coller aux ADN de mycobactéries déjà hybridés avec les sondes de capture.
12. Centrifuger brièvement après cette étape.
13. Placer l'échantillon sur le portoir magnétique pour retirer le surnageant les billes collées aux ADN de mycobactéries hybridés restera collé à la paroi du tube.

14. Ajouter 1ml de solution tampon dans le tube avec ADN hybridé et bille, bien mélangé puis le remettre dans un nouveau tube
15. Placer le tube sur le portoir magnétique et retirer encore le surnageant (Reprendre ceci 3 fois).
16. Ajouter 20µl de la solution d'élution.
17. Incuber pendant 3min sur la plaque chauffante à 75°C et agitatrice.
18. Récupérer l'éluât (ADN de mycobactérie) à l'aide du portoir magnétique pour la PCR.

4.3.2. La Polymérase Chain Réaction (PCR)

❖ Principe

La RT-PCR (reverse transcription- polymerase chain reaction) est une technique qui associe une transcription inverse (RT) suivie d'une PCR. Elle synthétise le brin complémentaire d'un ARN avec des désoxyribonucléotides en utilisant une ADN polymérase ARN dépendante (transcriptase inverse). Cet ADNc est généralement destiné à être amplifié par PCR (l'ADNc étant plus stable, il permet plus de liberté que les ARN pour des analyses).

➤ Matériels et réactifs utilisé

- Matériels

19. Micropipette de 10µl
20. Micropipette de 20µl
21. Micropipette de 100µl
22. Micropipette de 200µl
23. Plaque de PCR

- Réactifs et amorces utilisées pour la préparation du Master Mix

- **Tréhalose** : Il est un acteur crucial dans l'assemblage et l'architecture de la remarquable enveloppe cellulaire mycobactériennes en tant qu'élément de glycolipides hautement antigéniques uniques, à savoir le diméthylcolate de tréhalose.
- **L'amorce du gène IS6110** : Elle est présente uniquement dans les agents pathogènes du Complexe *Mycobacterium tuberculosis* et est le marqueur épidémiologique de référence pour la tuberculose et joue un rôle important dans la plasticité du génome des micro-organismes.
- **L'amorce du gène IS1311** : Elle est présente dans le Complexe *Mycobacterium avium* est le marqueur spécifique de ce dernier.
- **Gène CotJc** : gène d'atrophaeus *Bacillus* spore et sert de contrôle d'extraction.

- **DésoxyriboNucléotides de Ti-Phosphate DNTP** : sont les monomères précurseurs de l'ADN et qui peuvent ainsi être utilisés pour l'amplification de l'ADN par PCR.
- **L'amorce du gène SenX3-RegX3** : C'est un gène qui est nécessaire à la survie du CMT lors d'une infection murine (infections des rats, des souris etc...).
- **Les amorces des autres mycobactéries (Pan Myco)** : Ensembles des amorces spécifiques pour les mycobactéries non tuberculeuses considérées par notre étude en se basant sur leur capacité à engendrer une pathologie chez l'homme et leurs prévalences au Mali.
- **Tween20** : est un agent dispersant et solubilisant non ionique, ni toxique, ni irritant dériver du sorbitol utilisé dans l'industrie alimentaire et chimique.
- **L'Eau ultra pure** : Il est utilisé pour les dilutions.
- **Albumine du Sérum de Bovin (BSA)** : offre de nombreuses utilisations possibles comme protéine porteuse et comme agent stabilisant dans les réactions enzymatiques.

Des quantités indiquées par le fabricant sont prises dans chaque amorce pour faire le mélange réactionnel (Master Mix). A la fin il est conditionné en quantité de 10 réactions et 20 réactions puis lyophilisé par la chaleur pour faciliter sa conservation. Ce qui constitue le lyophilisat de « Master Mix ».

➤ **Reconstitution du lyophilisat du Mélange réactionnel (Master Mix)**

Le lyophilisat est reconstitué avec une solution de Glycérol 60%, de la Bicine, du Chlorure de Magnésium, de l'Acétate de Potassium (KoAc), du Tris PH8, du Tween20 et de l'eau ultra pure. Des quantités spécifiques sont indiquées pour le nombre de réaction utilisé.

Ensuite on transfère 15ul du mélange réactionnel (Master-Mix) reconstitué dans les puits de la plaque de PCR et on ajoute 10ul de l'éluât d'ADN.

La plaque sera ensuite mise dans le thermocycleur (ABI Fast 7500 Dx®).

Le test compte trois cycles avec des temps, températures et cycles différents et prends au maximum 2h qui sont :

- **Le premier cycle ou cycle de dénaturation initiale** : elle consiste à chauffer les brins d'ADN et dure 2min.
- **Le deuxième cycle ou dénaturation cyclique** : divise le double brin de l'ADN en simple brin. Elle dure 15sec et est répété 45 fois.
- **Le troisième cycle** : il consiste à l'hybridation des brins d'ADN puis faire la synthèse de ce brin, les amorces se couplent aux sondes et ses sondes émettent des fluorescences pour la lecture.

Les thermocycleurs utilisés dans notre étude sont Applied Biosystems® 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument avec le logiciel SDS. C'est un système d'amplification en temps réel et de détection de fluorescence à cinq couleurs disponibles pour un diagnostic in vitro. C'est un instrument qui offre des performances requises pour des résultats de haute qualité dans avec les plaques de 96 puits.

Deux régions ou génomes sont ciblées par l'essai. Il s'agit de la région IS6110 et le SenX3-regX3 pour détecter le CMT. Ces deux régions sont largement préservées chez le CMT et absentes chez les MNT.

L'IS1311 a été utilisé comme cible d'identification pour toutes les espèces de MAC excepté *M. intracellulaire*.

Interprétation des résultats

Tableau 1 : Critère d'interprétation des résultats du Multiplexe RT-PCR

Critères						
Identification	IS6110+ SenX3- Reg X3	IS1311+ DT1	Pan- Myco bacte rium	Contrôle D'extraction CotJc gène	Contrôle Positif CMT/MA C	Contrôle Négatif
Cibles	CMT	MAC	MNT	Extraction		
Fluorochromes	FAM	VIC/ HEX	TEX 615	CY5		
CMT	+	-	+	+	+	-
MAC	-	+	+	+	+	-
Autres MNT	-	-	+	+	+	-
Résultats négatifs	-	-	-	+	+	-

Ce tableau donne les directives pour l'interprétation des résultats du test Multiplexe RT-PCR CMT et MNT).

Une fiche technique d'interprétation des tests était utilisée et se présentait comme suit : présence du CMT, présence du complexe *M. avium* (MAC), présence d'autres mycobactéries atypiques ou négatifs. Pour valider les résultats d'une amplification il fallait que contrôle d'extraction soit détecté

RESULTATS

V. RESULTATS

5.1. Résultats globaux

Notre population d'étude était constituée de 13 patients souffrant de tuberculose pulmonaire ou des cas suspects de mycobactériose atypique

5.1.1. Répartition selon le sexe

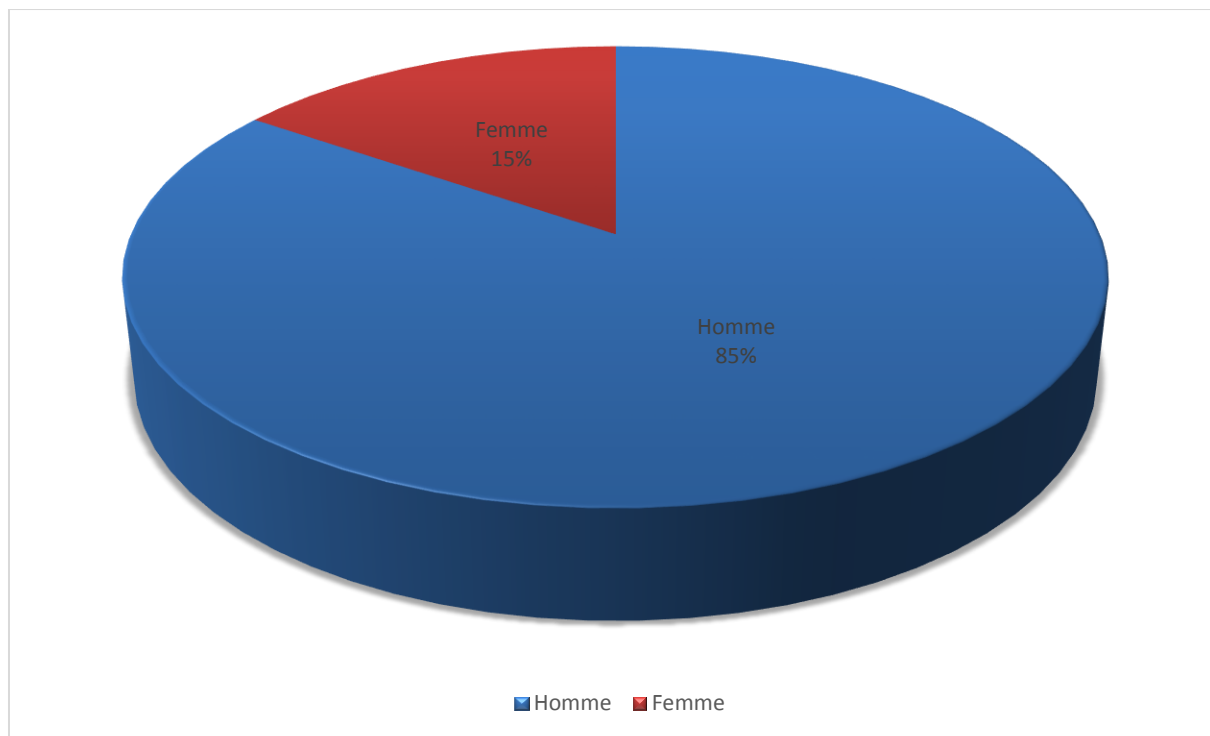


Figure 2 : Répartition de la population d'étude selon le sexe

Le sexe ratio était de 5,5 dans la population d'étude.

5.1.2. Répartition des participants selon la tranche d'âge

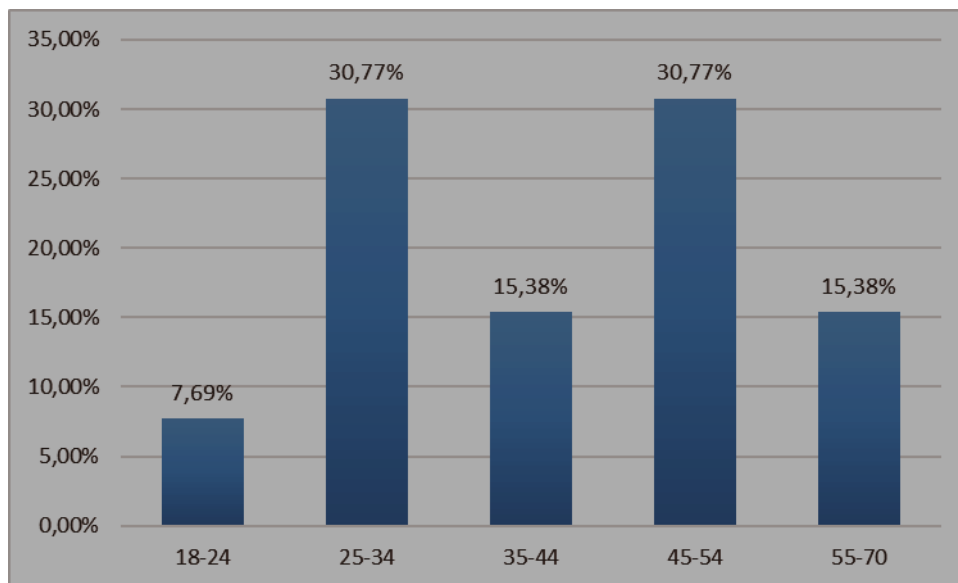


Figure 3: Répartition des patients selon la tranche d'âge

La tranche d'âge 25-34 et 45-54 ans était la plus représentée de notre population d'étude avec 30,77%.

L'âge moyen de 42,30 ans, l'âge minimal et maximal était respectivement 23 et 62 ans.

5.2. Résultats de l'étude de la sensibilité analytique (limite de détection) en utilisant de l'ADN commercial :

Tableau 2 : Détermination des limites de détection du test Multiplexe RT-PCR pour la détection simultanée des mycobactéries tuberculeuses et non tuberculeuses.

CFU/ml	Proportion détectée		
	ISI6110 + <i>SenX3-regX3</i> CMT	IS1311 + <i>DT1</i> MAC	Pan- <i>Mycobacterium</i>
50	20/20	20/20	20/20
20	20/20	20/20	15/20
10	20/20	20/20	12/20
5	20/20	20/20	0/20
1	0/20	0/20	0/20

ISI6110= marqueur épidémiologique de CMT

SenX3-regX3= amorce de survie de CMT

IS1311= amorce spécifique au MAC

DT1= marqueur de MAC

Pan= amorce des MNT

MAC= Complexe *Mycobacterium avium*

Ce tableau illustre le seuil de détection de l'essai mis au point à travers des ADN commerciaux des mycobactéries avec différentes concentration en unité de format colonie par millilitre (CFU/ml). Ainsi toutes les trois sondes ont détecté l'ADN de CMT et MNT jusqu'à au moins 10 CFU/ml, ce qui montre que le Multiplexe RT-PCR mis au point sera un test sensible

5.3. Résultats des essais réalisés sur les souches déjà identifiées au laboratoire

5.3.1 Cas du Complexe *Mycobacterium tuberculosis*

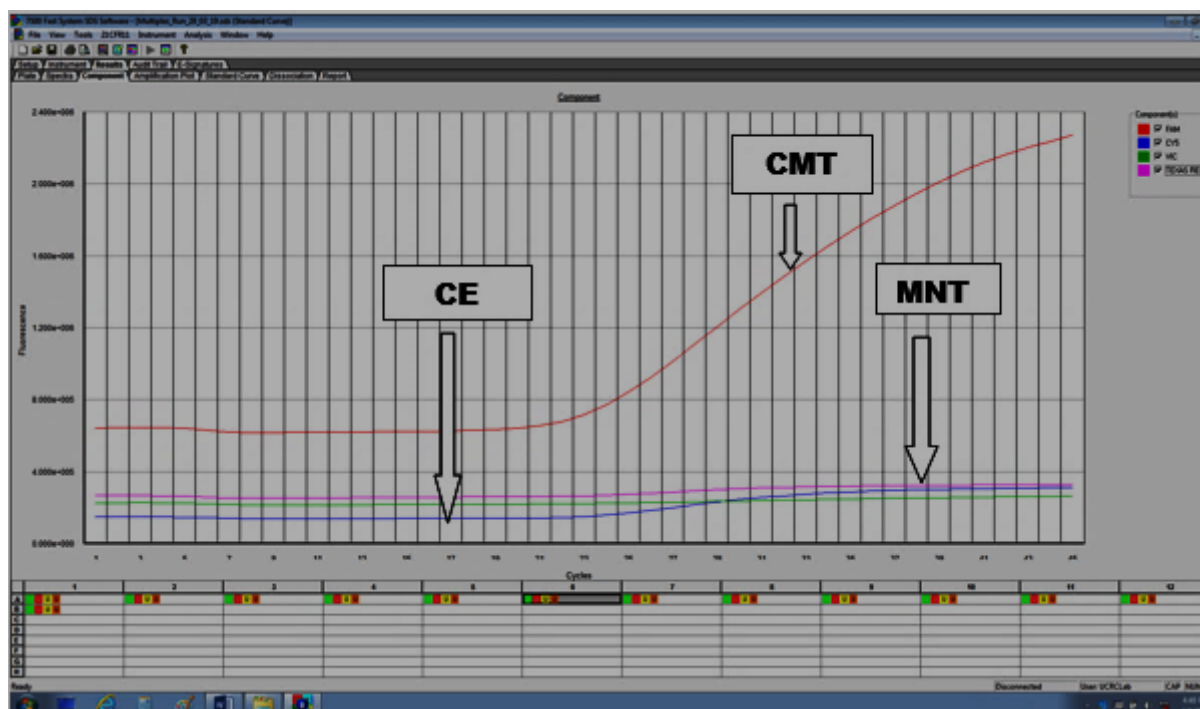


Figure 4: Résultat du test Multiplexe RT-PCR sur une souche du Complexe *Mycobacterium tuberculosis*

CE : Contrôle d'extraction

CMT : Complexe *Mycobacterium tuberculosis*

MNT : Mycobactéries non tuberculeuses (Pan Myco)

MAC : Complexe *Mycobacterium avium*

La courbe du CMT montre une détection dès le 23^{ème} cycle de l'amplification. Le contrôle d'extraction a été détecté au 27^{ème} cycle (Figure 2). Les sondes choisies pour la détection du CMT donnent une courbe avec une allure typique.

En conclusion le test marche sur les souches de CMT.

5.3.1 Cas du Complexe *Mycobacterium avium*

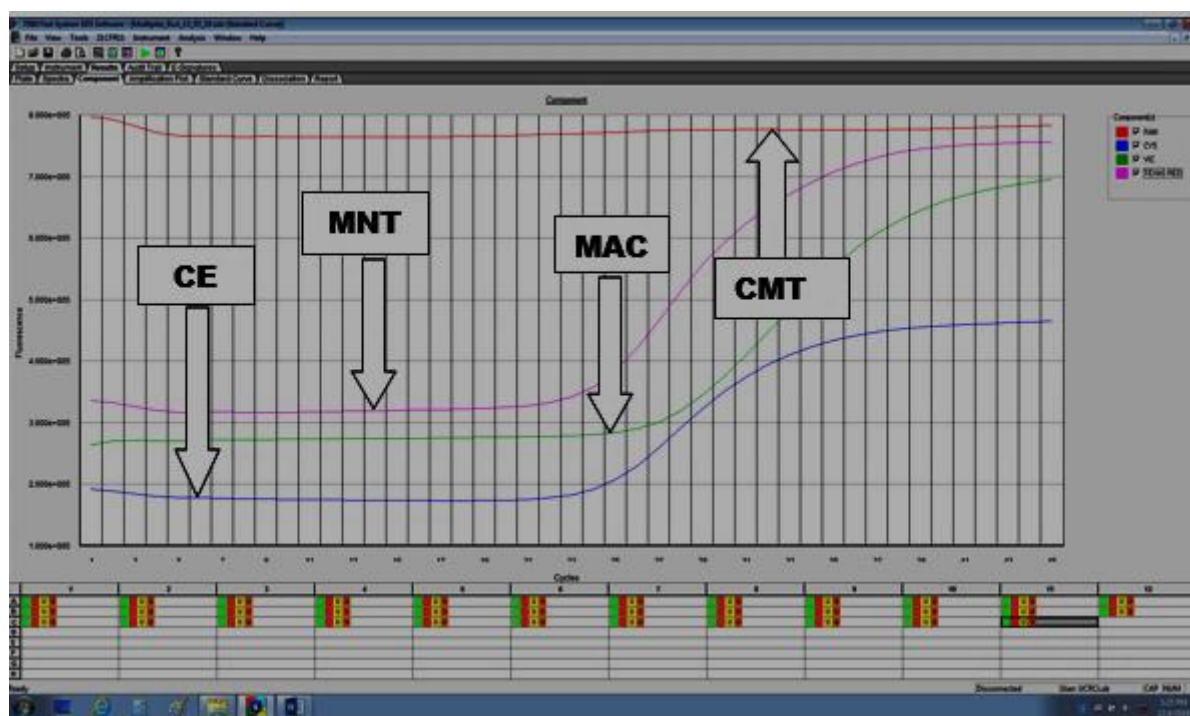


Figure 5 : Résultat du Multiplexe RT-PCR de la souche du complexe *Mycobacterium avium*

CE : Contrôle d'extraction,

CMT : Complexe *Mycobacterium tuberculosis*,

MAC : Complexe *Mycobacterium avium*,

MNT : Autres mycobactéries non tuberculeuses

Le gène du **Complexe *Mycobacterium avium*** (MAC) a été détecté au 27^{ème} cycle de l'amplification et la courbe de MNT est détectée au 23^{ème} cycle (Figure 3). Le contrôle d'extraction a été détecté au 24^{ème} cycle.

Les souches du **Complexe *Mycobacterium avium*** utilisées pour la mise au point ont été détectées par les sondes choisies, ainsi le test détecte le gène du MAC avec les sondes choisies. La discrimination est nette avec le gène du CMT.

5.3.2 Cas des autres mycobactéries non tuberculeuses (Pan-Mycobactérie)

L'essai Multiplexe RT-PCR CMT MNT a été testé avec succès sur certaines autres souches de mycobactéries non tuberculeuses déjà identifiées par le GenProbe AccuProbe :

5.3.2.1. Souche de *Mycobacterium gordonae*

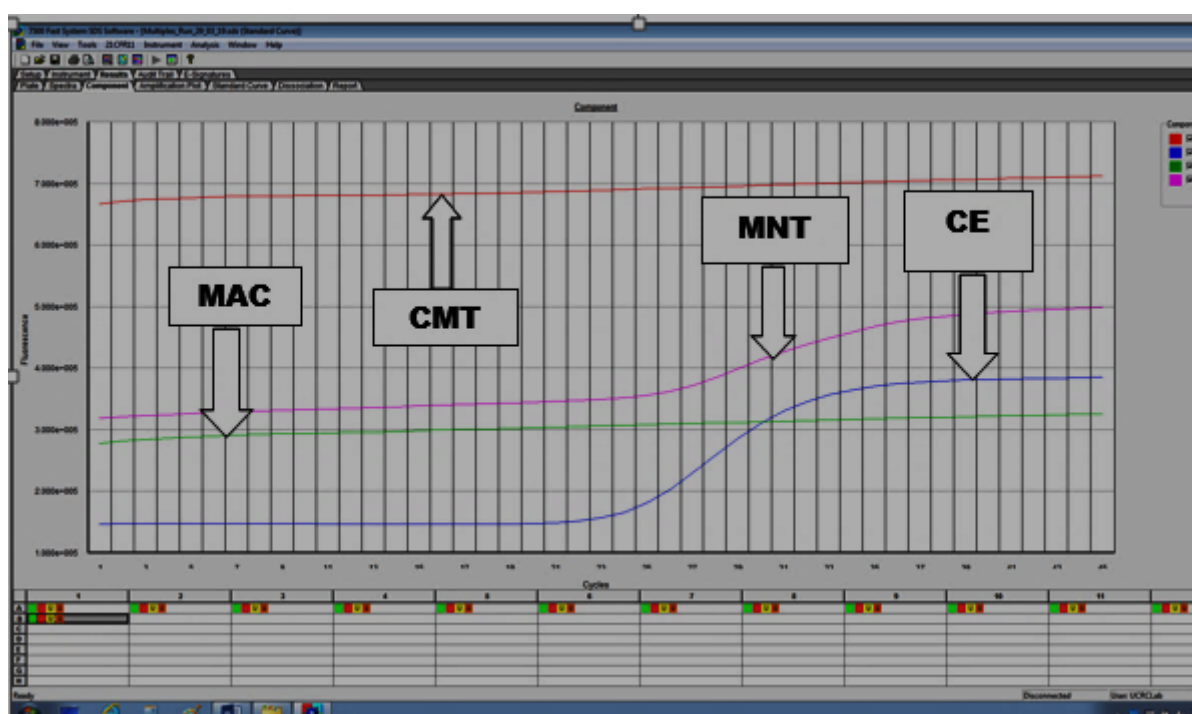


Figure 6: Résultat du Multiplexe RT-PCR d'une souche de *Mycobacterium gordonae*.

MNT : Mycobactéries non tuberculeuses : *M. gordonae*

CMT : Complexe *Mycobacterium tuberculosis*,

CE : Contrôle d'extraction,

MAC : Complexe *Mycobacterium avium*

Les autres MNT (non MAC) sont toutes détectées sur le même canal. La courbe des autres MNT montre une détection au 28^{ème} cycle de l'amplification de la souche de *M. gordonae* et le contrôle d'extraction est détecté au 24^{ème} cycle de l'amplification (Figure 4). Les gènes du MAC et du CMT ne sont pas détectés.

5.3.2.2. Souche de *Mycobacterium kansasii*

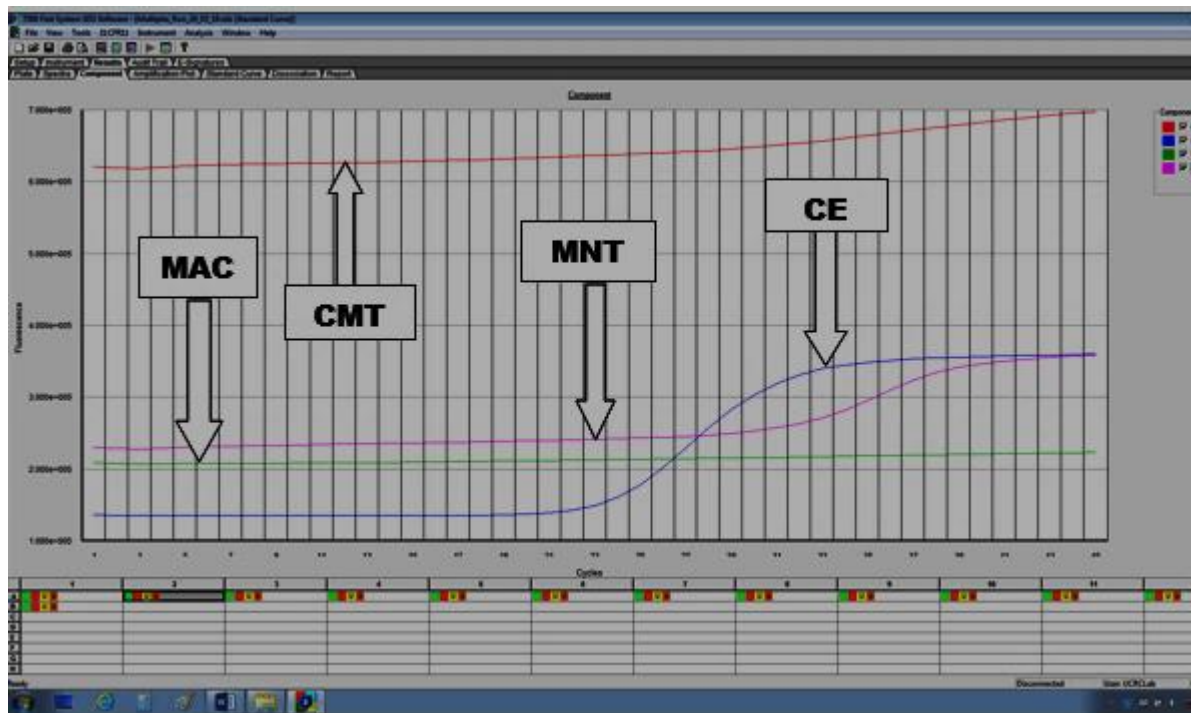


Figure 7: Résultat du Multiplexe RT-PCR d'une souche de *Mycobacterium kansasii*

MNT : Mycobactéries non tuberculeuses : *M. kansasii*

CMT : Complexe *Mycobacterium tuberculosis*,

CE : Contrôle d'extraction,

MAC : Complexe *Mycobacterium avium*

Dans le cas de *M. kansasii* le gène a été détecté au 32^{ème} cycle de l'amplification et celle du contrôle d'extraction au 25^{ème} cycle (Figure 5).

5.3.2.3. Souche de *Mycobacterium fortuitum*

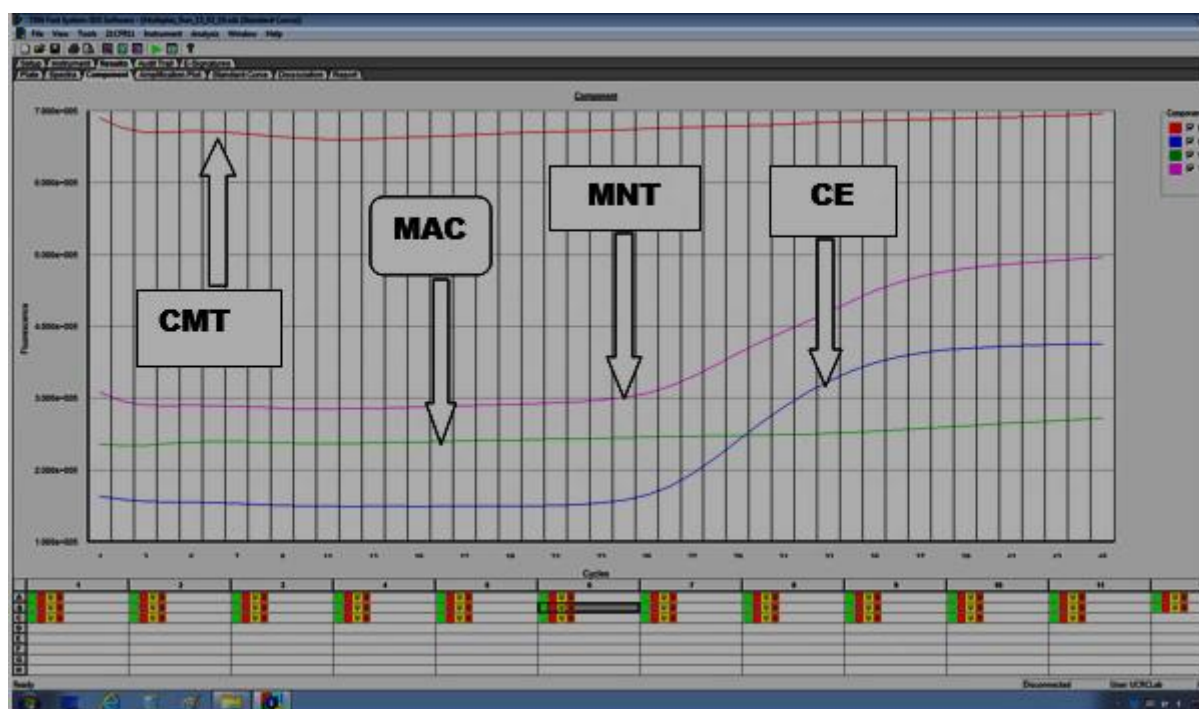


Figure 8 : Résultat du Multiplexe RT-PCR sur une souche de *Mycobacterium fortuitum*

MNT : Mycobactéries non tuberculeuses : *M. fortuitum*

CMT : Complexe *Mycobacterium tuberculosis*,

CE : Contrôle d'extraction,

MAC : Complexe *Mycobacterium avium*

La souche de *Mycobacterium fortuitum* utilisé pour la mise au point a été détectée au 27^{ème} cycle de l'amplification de la courbe d'extraction apparaît au 25^{ème} cycle (Figure 6).

5.3.2.4. Cas d'un échantillon négatif

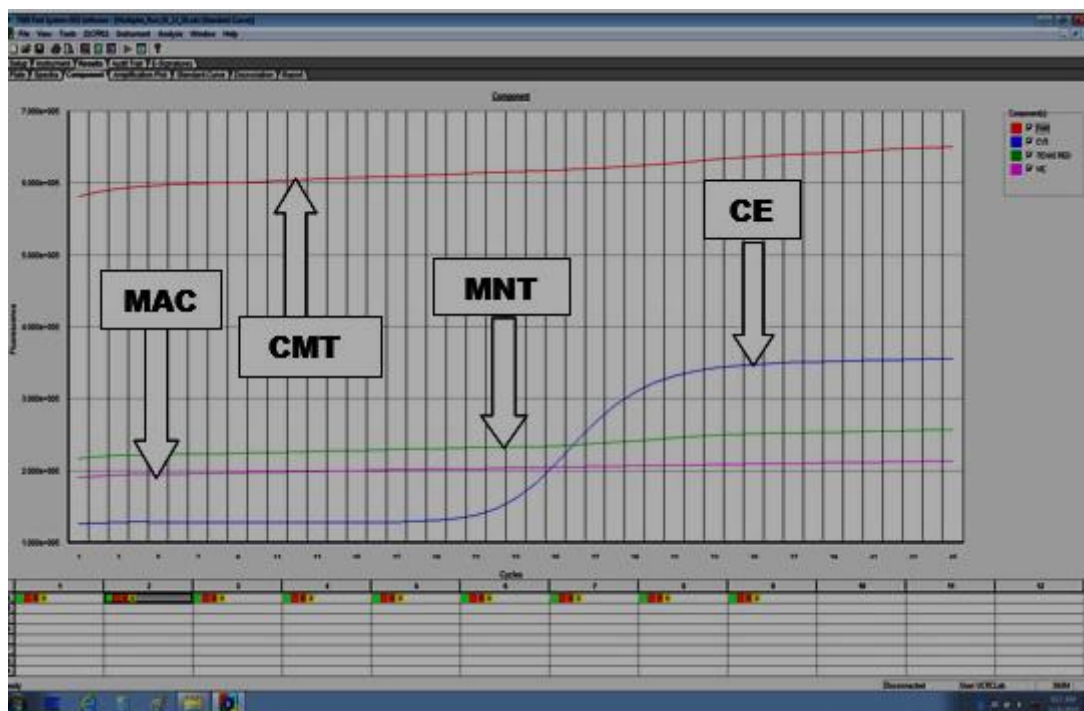


Figure 9 : Résultat du Multiplexe RT-PCR sur un échantillon négatif

MNT : Mycobactéries non tuberculeuses,

CMT : Complexe *Mycobacterium tuberculosis*,

CE : Contrôle d'extraction,

MAC : Complexe *Mycobacterium avium*

Pour vérifier que notre technique marche aussi sur les échantillons qui n'ont pas de génome de mycobactérie, nous avons utilisé un échantillon qui ne contenait aucune trace de mycobactérie. C'est ainsi que les courbes de CMT, de MAC et des autres MNT n'ont pas été détectées, preuve qu'il n'y a pas de présence de mycobactéries dans l'échantillon (Figure 7). Le gène du contrôle d'extraction a été détecté au 23^{ème} cycle de l'amplification.

Les sondes n'ont pas détecté de présence de mycobactéries chez ce cas négatif, ce qui peut démontrer la bonne spécificité des sondes utilisées pour cette mise au point.

5.4. Validation du test Multiplexe RT-PCR avec des échantillons cliniques des crachats.

Treize patients suspects de tuberculose ont été inclus dans l'étude pilote. Deux crachats ont été collectés chez ces patients et testés par le Multiplexe RT-PCR mis au point. Les résultats de l'essai Multiplexe RT-PCR ont été comparés à ceux de la culture, l'identification par le GenProbe et Hain NTM® pour les MNT.

5.4.1. Répartition selon le statut VIH

Tableau 3: Répartition des participants selon le statut VIH

VIH	Effectifs	Pourcentage
Négatif	2	15,38%
Positif	11	84,62%
TOTAL	13	100,00%

La majorité de la population d'étude était de patients séropositifs au VIH avec 84,62%

5.4.2. Résultats de la culture et de l'essai multiplexe RT-PCR pour la détection simultanée de CMT et MNT chez des participants de l'étude

Tableau 4: Comparaison entre la culture et le Multiplexe chez les patients inclus dans l'étude pilote

Culture de crachat	Multiplexe RT-PCR		
	CMT	MNT	Total
Positif	9	1	10
Négatif	0	3	3
Total	9	4	13

L'essai Multiplexe RT-PCR et la culture ont été réalisés chez tous nos participants, et chaque participant a fourni deux échantillons de crachats à J1 et J2.

Parmi les 13 patients inclus 10 avaient une culture positive et 3 avaient une culture négative. Les résultats montrent que 9/10 (90%) échantillons positifs ont été détectés par le Multiplexe et 3/3 (100%) échantillons négatifs à la culture sont aussi revenus négatifs au Multiplexe.

Exemple d'un patient infecté par le Complexe *Mycobacterium tuberculosis* (CMT)

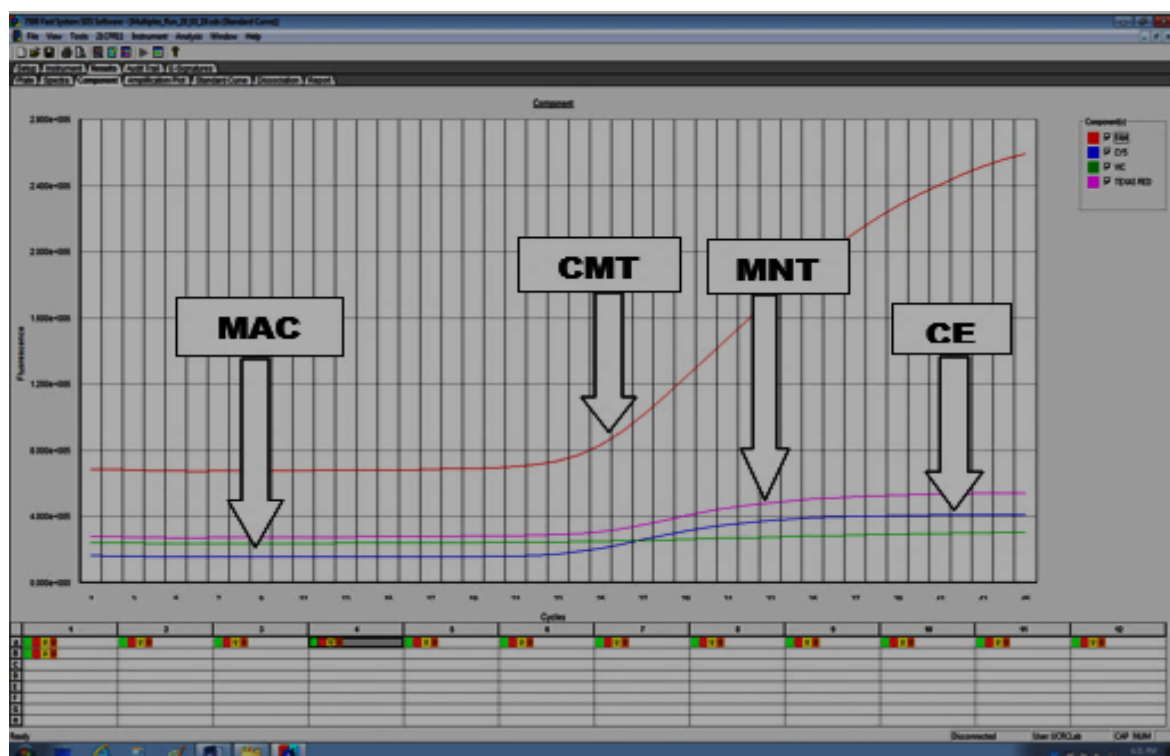


Figure 10 : Résultat du crachat d'un patient infecté par le Complexe *Mycobacterium tuberculosis*

Nous observons une courbe nette de CMT. Sur cet exemple, le *Mycobacterium tuberculosis* a été détecté au 23^{ème} cycle de l'amplification et les courbes des mycobactéries (Pan *Mycobacterium*) et contrôle d'extraction apparaissent respectivement au 26^{ème} et 25^{ème} cycle de l'amplification (Figure 10). Le CMT a été détecté par le test, cela témoigne la capacité de discrimination des sondes utilisées pour l'essai mis au point.

➤ Exemple d'un patient infecté par le Complexe *Mycobacterium avium* (MAC)

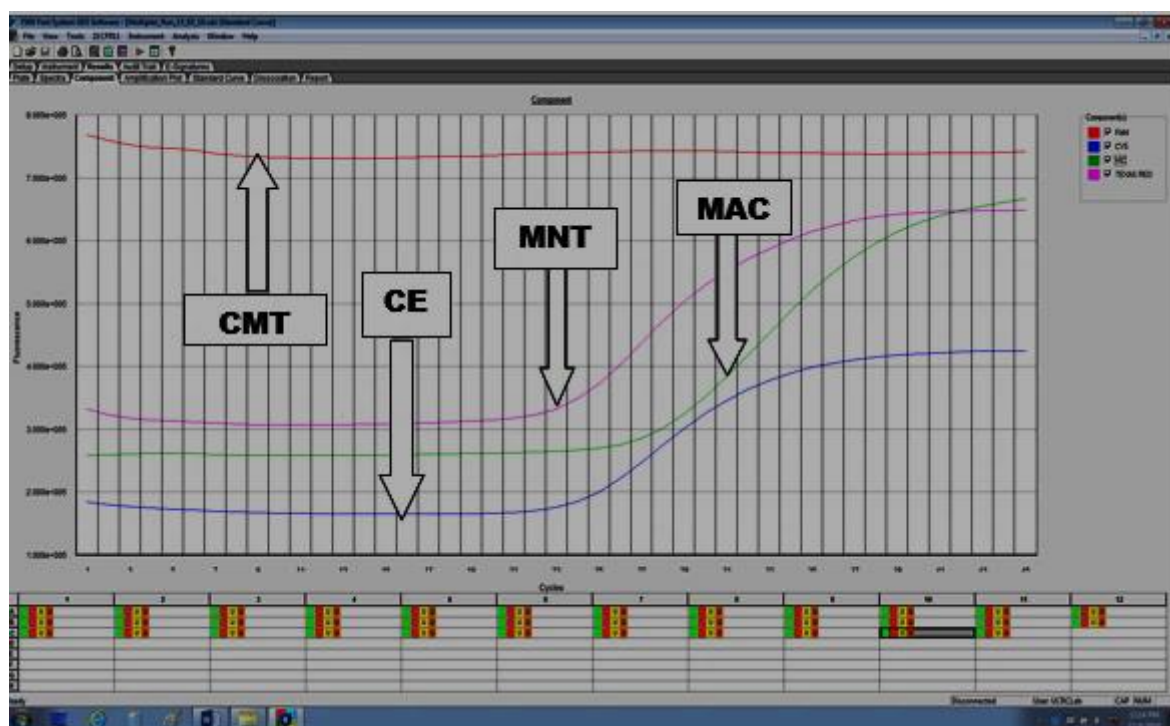


Figure 11 : Résultat du crachat d'un patient infecté par le Complexe *Mycobacterium avium*

Nous observons une courbe typique du MAC. Sur cet exemple, le MAC a été détecté au 27^{ème} cycle de l'amplification et les courbes des mycobactéries (Pan *Mycobacterium*) et contrôle d'extraction apparaissent respectivement au 25^{ème} et 23^{ème} cycle de l'amplification (Figure 11). Les résultats montrent une bonne discrimination de la détection du MAC et du CMT.

➤ Exemple des patients infectés par les autres mycobactéries non tuberculeuses (Autres MNT)

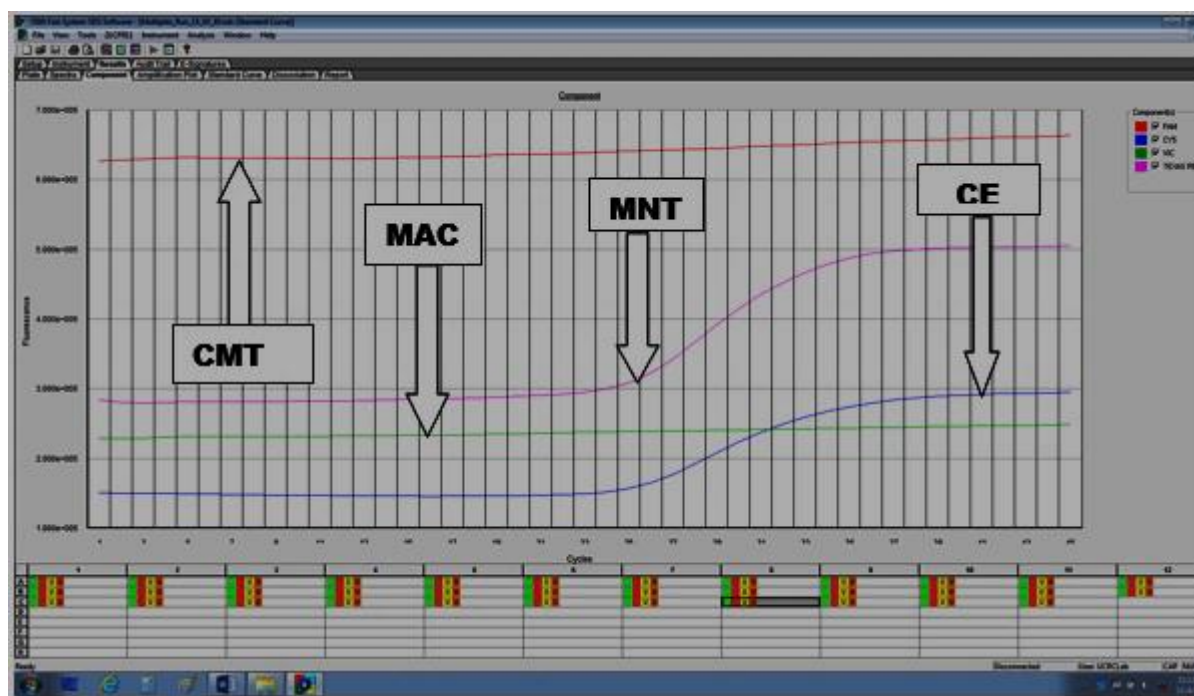


Figure 12 : Résultat du crachat d'un patient infecté par les mycobactéries non tuberculeuses

Plusieurs cas de mycobactéries non tuberculeuses ont été détectés avec des courbes typiques chez ses participants. Chez ce patient (Figure 12) nous observons une courbe typique des autres MNT (*Pan Mycobacterium*) au 26^{ème} cycle de l'amplification et le contrôle d'extraction apparaît au même cycle d'amplification.

➤ Exemple d'un patient négatif

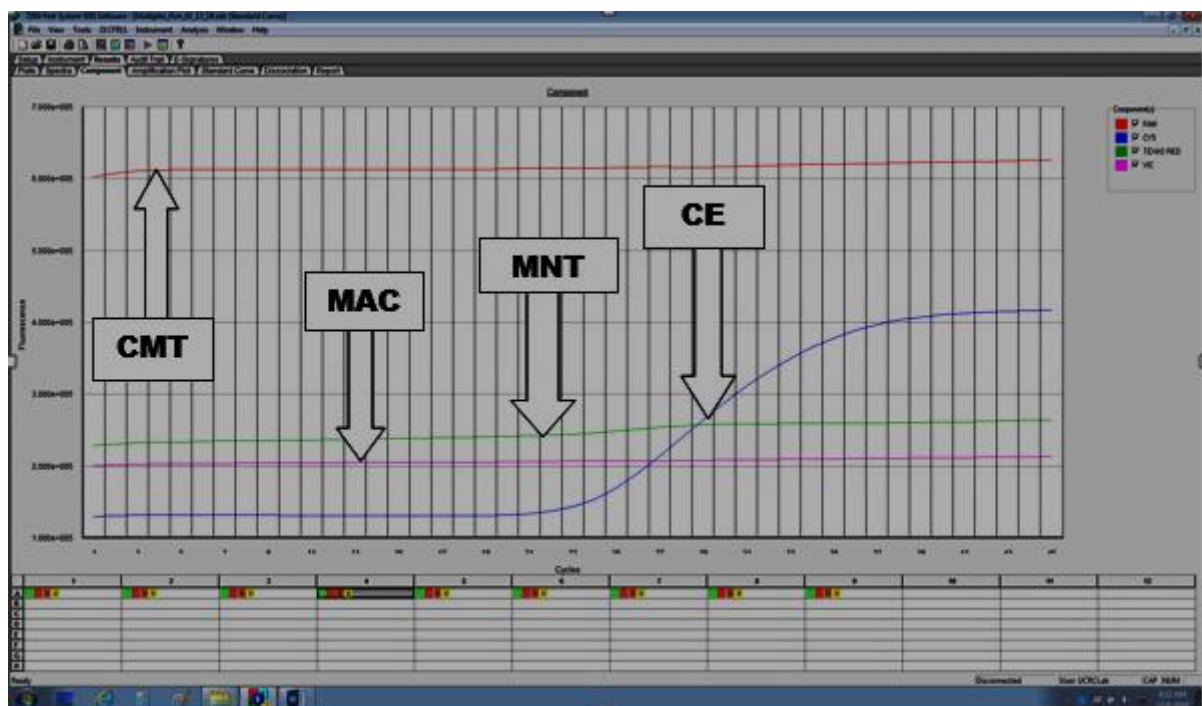


Figure 13 : Résultat du crachat d'un patient négatif de l'étude

Seul le contrôle d'extraction a été observé chez ce patient (Figure 13) et il a été détecté au 23^{ème} cycle de l'amplification. Les gènes du CMT et du MAC n'ont pas été détectés. Ceci montre qu'on pourrait avoir une bonne spécificité à l'évaluation finale de cet essai.



DISCUSSION

VI. DISCUSSION

Nous avons mené une étude pour mettre au point un test moléculaire Multiplexe RT-PCR pour diagnostiquer simultanément le CMT et les MNT au Centre Universitaire de Recherche Clinique (UCRC/SEREFO). La tuberculose pulmonaire reste un problème majeur de santé, et la prévalence des maladies pulmonaires à MNT a augmenté dans le monde ces dernières années (68–72). La non-reconnaissance des MNT chez les patients suspects de TB conduit généralement à des diagnostics erronés de la tuberculose pulmonaire chronique et de la tuberculose multi-résistante (TB-MR) ou ultrarésistante (TB-UR). Ce qui peut entraîner un traitement empirique inapproprié, long, coûteux et qui surtout ne répond pas aux besoins du patient (10,11,73). Ce problème est particulièrement important dans les pays à revenu faible où les infections tuberculeuses et non tuberculeuses sont endémiques, dans un contexte d'absence d'outils de diagnostic adapté qui peut faire la différence entre la tuberculose et l'infection MNT.

Au Mali, nous avons récemment rapporté que les infections MNT représentaient 18% des cas considérés cliniquement comme tuberculose chronique et qui, en tant que tels, ont été traités empiriquement comme des cas de tuberculose multi résistante (TB-MR) avec les molécules de deuxième ligne après les premières lignes (74). Ceci peut avoir des implications sur le risque de transmission à d'autres personnes, ainsi que le coût et la toxicité du traitement antituberculeux.

Le diagnostic définitif des maladies pulmonaires à MNT est plus difficile, les résultats radiographiques entre les deux maladies MNT et TB sont identiques, ainsi les diagnostics microbiologiques sont indispensables pour instaurer un traitement approprié.

6-1- Détermination de la sensibilité analytique (Seuil de détection) du test Multiplexe RT-PCR.

Les résultats nous ont montré que les sondes pour ce test Multiplexe détectent les mycobactéries tuberculeuses et non tuberculeuses jusqu'à environ 10 CFU/ml. Ce qui montre que le test mis au point serait plus sensible que le Xpert MTB/RIF qui détecte à 130 CFU/ml et la microscopie (plus de 1000 CFU/ml). Les résultats de cette sensibilité analytique ont été faits sur des ADN commerciaux. Elle a besoin d'être confirmé sur des souches isolées au laboratoire à l'évaluation finale de l'essai. Nous avons constaté une faible sensibilité pour la détection des autres MNT (Pan Mycobactéries). Ceci est probablement due au fait qu'on a beaucoup de sondes sur ce canal qui diminue la sensibilité analytique de détection des gènes sur ce canal.

Par contre, nous n'avons pas pu quantifier l'ADN dans les éluas (solution d'ADN) au cours de notre mise au point, mais nous avons vérifié que l'extraction a bien marché par la détection d'un contrôle d'extraction qui est ajouté sur chaque échantillon de crachat avant

l'extraction. Ainsi tous les tests dont les contrôles d'extraction n'ont pas été détectés ont été considérés comme non interprétable et sont remis à refaire.

6.2. Détection de d'ADN du Complexe *Mycobacterium tuberculosis* (CMT)

Nous avons noté que 100% des souches de *Mycobacterium tuberculosis* utilisées pour cette mise au point ont données des courbes typiques avec des allures acceptables. La courbe de CMT (Figures 4 et 10) apparait aux environs du 20^{ème} cycle de l'amplification dans la plupart des tests de notre étude pilote et les contrôles d'extractions ont validé la réussite de l'extraction de l'ADN. Ceci montre que nous pouvons espérer sur une grande sensibilité et spécificité des amorces utilisées pour cette mise au point dans l'évaluation finale du test RT-PCR pour le diagnostic simultané de mycobactéries tuberculeuse et non tuberculeuse.

Dans ces exemples, la courbe indiquant la présence de *Mycobacterium avium* n'apparait pas, ceci pourrait dénoter une grande spécificité des amorces utilisées dans le Multiplexe RT-PCR.

6.3. Détection de l'ADN du Complexe *Mycobacterium avium* (MAC)

La courbe de MAC (Figures 5 et 11) apparait aux environs du 20^{ème} cycle de l'amplification dans la plupart des tests de notre étude pilote comme pour le CMT et les contrôles d'extractions ont validé l'extraction de l'ADN. Ceci montre que nous pouvons espérer sur une grande sensibilité et spécificité des amorces pour le MAC utilisées pour cette mise au point dans l'évaluation finale du test RT-PCR. Dans ces échantillons aussi, la courbe indiquant la présence de CMT n'a pas été détectée et ceci pourrait dénoter une grande spécificité des amorces utilisées dans le Multiplexe RT-PCR.

6.3. Détection de l'ADN des autres mycobactéries non tuberculeuses (Autres MNT)

Nous avons testé des souches de mycobactéries atypiques à de nombreuses reprises afin de pouvoir faire la mise au point. Ainsi, nous avons utilisé des souches de *Mycobacterium goodii*, *Mycobacterium kansasii* et des souches de *Mycobacterium fortuitum*. Les courbes indiquant les présences de ces autres mycobactéries non tuberculeuses (Figures 6, 7, 8, et 12), apparaissent aux environs du 20^{ème} ou au début du 30^{ème} cycle de l'amplification dans la plupart des tests de notre étude pilote et les contrôles d'extractions ont validé la réussite de l'extraction de l'ADN.

Les courbes indiquant les présences de CMT et MAC n'ont pas été détectées. Ceci pourrait dénoter une grande spécificité des amorces utilisées dans le Multiplexe RT-PCR.

6.4. Cas du contrôle négatif

Nous avons utilisé l'eau ultra pure pour préparation moléculaire comme contrôle négatif. On ne devrait pas détecter d'ADN dans ces puits. Effectivement les courbes indiquant

les présences de CMT et MAC (Figures 9 et 13) n'ont pas été détectées. Mais nous avons parfois observé une petite élévation de la courbe indiquant les présences des Autres MNT, cela pourrait s'expliquer par des micro-contaminations de l'eau ultra pure utilisée dans l'essai.

6.4. Résultat du test d'évaluation chez les patients

Notre population d'étude était des patients naïfs aux traitements antituberculeux et la majorité était des hommes avec 84,6%. La tranche d'âge la plus représentée a été celle comprise entre 25-34 ans et 45-54 ans. La population séropositive au VIH représentait 84,62%, ceci est due au fait notre étude s'est beaucoup plus focalisée sur les patients VIH car le diagnostic dans ce groupe de patient est un challenge mondial.

Parmi les 10 patients ayant une culture positive, 9 étaient positifs pour le Multiplexe RT-PCR et une culture positive est revenue négative au Multiplexe RT-PCR. Ce qui montre que la culture a une meilleure sensibilité par rapport au Multiplexe. Sur les 3 cas de cultures négatives, le multiplexe a été négatif chez les trois cela montre qu'on pourrait espérer avoir une bonne spécificité à l'évaluation finale de l'essai malgré le nombre petit de patients inclus. Cependant, le Multiplexe est un test plus rapide de quelques heures, ne nécessitant pas une longue période d'incubation comme la culture. Nous avons observé que la culture a une bonne sensibilité que le Multiplexe mais la taille de notre échantillon est petite pour tester cette hypothèse.

D'autres études sont en cours avec un plus grand échantillonnage pour pouvoir calculer la sensibilité, la spécificité, les valeurs prédictives positives et négatives afin de valider ce test.

Difficultés Rencontrées

Au cours de cette étude, nous avons rencontré quelques difficultés liées à la mise au point comme :

- La mauvaise qualité des échantillons de crachat
- La nature pauci bacillifère des échantillons des patients VIH positifs
- La détermination du temps optimum d'extraction et du seuil de détection des différentes mycobactéries
- Quelques discordances entre les résultats de la culture et du Multiplexe

Lors de la phase d'évaluation du Multiplexe, il faudra mettre en place des stratégies en vue de maîtriser ces difficultés.

CONCLUSION & RECOMMANDATIONS

VII. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

7.1 Conclusion

Nous avons mené une étude pilote transversale entre février 2018 et septembre 2019 pour mettre au point un test Multiplexe RT-PCR pour détecter simultanément les mycobactéries tuberculeuses et non tuberculeuses dans un échantillon suspect de TB.

La sensibilité analytique des ADN commerciaux était de 10 FCU/ml.

Le Multiplexe RT-PCR a montré une bonne capacité de détection des mycobactéries sur les souches de CMT et MNT déjà identifiées et isolée au laboratoire P3 de l'UCRC.

Le Multiplexe a donné un taux de détection acceptable sur les échantillons de crachats inclus dans l'étude pilote, et est prêt à être évalué sur des échantillons cliniques de grande taille en vue de calculer les performances diagnostiques et sa faisabilité pratique sur le terrain.

7.2 Recommandations

Au terme de notre étude et vu nos résultats, nous formulons les recommandations suivantes :

- **AU Ministère de la Santé et des Affaires Sociales/PNLT**
- ✓ Soutenir le programme UCRC/SEREFO dans le développement des nouveaux outils pour le diagnostic précoce des mycobactéries tuberculeuses et non tuberculeuses dans la tuberculose pulmonaire au Mali.
- ✓ Créer des conditions pour un déploiement du Multiplexe RT-PCR dans les Centres de Référence pour l'évaluation et le diagnostic de la tuberculose pulmonaire et des MNT.

- **A l'équipe de recherche UCRC/SEREFO et ses partenaires**
- ✓ Etendre cette étude à un échantillonnage de grande taille comprenant toutes les formes de TB pour mieux apprécier les caractéristiques de cette technique
- ✓ Continuer à optimiser l'essai pour une plus grande maîtrise sur terrain et dans les échantillons cliniques



REFERENCES

VIII. REFERENCES

1. Yombi JC, Olinga UN. La tuberculose: épidémiologie, aspect clinique et traitement. *Louvain med.* 2015; 134(10): 549- 559. Google Scholar.
2. Mahaman Laouali Harouna Amadou, Ousmane Abdoulaye, Oumarou Amadou, Ahamadou Bouraïma. Profil épidémiologique, clinique et évolutif des patients tuberculeux au Centre Hospitalier Régional (CHR) de Maradi, République du Niger. 2019 Juin;
3. Gaspard Tékpá, Valentin Fikouma, Régis Martial Marada Téngothi, Jean de Dieu Longo. Aspects épidémiologiques et cliniques de la tuberculose en milieu hospitalier à Bangui. 2019 Mai;
4. ONUSIDA. Statistiques mondial sur le VIH. Fiche d'information. 2017. Accessed November 18 2018.
5. Dagnra AY, Adjoh K, Tchaptchet Heunda S, Patassi AA, Sadzo Hetsu D, Awokou F, Tidjani O. Prévalence de la co-infection VIH/tuberculose et impact de l'infection VIH sur l'évolution de la tuberculose pulmonaire au Togo. *Bulletin de la Société de pathologie exotique.* 2011; 104(5): 342- 348. PubMed | Google Scholar.
6. Réflexion et enseignement tirés de l'Afrique de l'Ouest, du Centre et d'ailleurs. Bonne pratique de dépistage et de traitement de la tuberculose. 2018.
7. Griffith T, Aksamit BA, Brown-Elliott et al., ATS Mycobacterial Diseases Subcommittee, American Thoracic Society, and Infectious Disease Society of America. 2007. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 175:367-416.
8. Atif, M., Sulaiman, S. A., Shafie, A. A., Ali, I., Hassali, M. A. & Saleem, F. WHO guidelines for treatment of tuberculosis: the missing links. *Int J Clin Pharm* 34, 506-509, doi:10.1007/s11096-012-9657-8 (2012).
9. Adjemian, J., Olivier, K. N., Seitz, A. E., Holland, S. M. & Prevots, D. R. Prevalence of nontuberculous mycobacterial lung disease in U.S. Medicare beneficiaries. *American journal of respiratory and critical care medicine* 185, 881-886, doi:10.1164/rccm.201111-2016OC (2012).
10. Maiga M, Siddiqui S, Diallo S, Diarra B, Traoré B, Shea YR, et al. Failure to recognize nontuberculous mycobacteria leads to misdiagnosis of chronic pulmonary tuberculosis. *PloS One.* 2012;7(5):e36902.
11. Nishiuchi, Y., Iwamoto, T. Nishiuchi, Y., Iwamoto, T. & Maruyama, F. Infection Sources of a Common Non-tuberculous Mycobacterial Pathogen, *Mycobacterium avium* Complex. *Front Med (Lausanne)* 4, 27, doi:10.3389/fmed.2017.00027 (2017).
12. Maxwell Oluwole Akanbi, C. A., Babafemi Taiwo, John Idoko, Agatha Ani, Yetunde Isa; Oche Agbaji, Christiana Ukoli, Patrick Akande, Mamoudou Maiga and Robert Leo Murphy. Evaluation of Gene Xpert for routine diagnosis of HIV-associated tuberculosis in Nigeria: A prospective cohort study. *BMC Pulmonary Medicine* (Under Review PULM-D-17-00055) (2017).
13. Ryu, Y. J., Koh, W. J. & Daley, C. L. Diagnosis and Treatment of Nontuberculous Mycobacterial Lung Disease: Clinicians' Perspectives. *Tuberc Respir Dis (Seoul)* 79, 74-84, doi:10.4046/trd.2016.79.2.74 (2016).
14. Getahun H1, Harrington M2, O'Brien R3, Nunn P4. Diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis in people with HIV infection or AIDS in resource-constrained settings: informing urgent policy changes. 2016 Juin;

15. Pawlowski, A., Jansson, M., Skold, M., Rottenberg, M. E. & Kallenius, G. Tuberculosis and HIV co-infection. *PLoS pathogens* 8, e1002464, doi:10.1371/journal.ppat.1002464 (2012). 2012;
16. Maiga M1, Abaza A, Bishai WR. Current tuberculosis diagnostic tools & role of urease breath test. 2p. 2012 Mai;
17. Desikan, P. Sputum smear microscopy in tuberculosis: is it still relevant? *Indian J Med Res* 137, 442-444 (2013).
18. Ngabonziza JC, Ssengooba W, Mutua F. Diagnostic performance of smear microscopy and incremental yield of Xpert in detection of pulmonary tuberculosis in Rwanda. *BMC Infect Dis*. 2016;16(1):660.
19. Porvaznik, I., Solovic, I. & Mokry, J. Non-Tuberculous Mycobacteria: Classification, Diagnostics, and Therapy. *Adv Exp Med Biol* 944, 19-25, doi:10.1007/978-3-319-44488-8_45 (2017).
20. Prévalence et caractéristiques des mycobactéries non tuberculeuses isolées chez les personnes vivant avec le VIH/SIDA à Bamako, Mali. 2014;
21. Organisation Mondiale de la Santé. Rapport sur la Tuberculose dans le monde 2019.
22. World Health Organization. 2009. Treatment of tuberculosis: guidelines - 4th ed. WHO Press, Geneva, Switzerland.
23. Tuberculose (Infection à *Mycobacterium tuberculosis*. Maladies infectieuses. 2018 Février;
24. C. Andréjak, F.-X. Lescure, J.-L. Schmit, V. Jounieaux. Diagnostic et traitement des mycobacterioses atypiques d'expression respiratoire. 2011;
25. B. Dautzenberg. Mycobacteriose Atypique.
26. World Health Organization 2018. Global tuberculosis report 2018. 2018;
27. Who. Global tuberculosis 2019. 2019;
28. Ministère de la Santé et de l'Hygiène Publique du Mali. Annuaire statistique 2018 du système local d'information sanitaire du Mali. 2018.
29. OMS Mali. Rapport annuelle 2018.
30. Martin-Casabona N., Bahrmand A.R., Bennedsen J., et al. "Non tuberculous mycobacteria: patterns of isolation," A multi-country Retrospect. *Surv. Int J Tuberc Lung Dis*, 2004: vol.8, pp.1186-1193-93.
31. Anne BERGERON-LAFAURIE, Claire ANDREJAK, Olivier LORTHOLARY, Emilie CATHERINOT, Nicolas VEZIRIS. Mycobactéries non tuberculeuses Guide diagnostique et clinique en 10 questions. *Help medical. Collection Insight en Pneumologie*; 2017. 23 p.
32. Emmanuelle CART-TANNEUR ,Georges CHYDERIOTIS. Diagnostic des infections à Mycobactéries. *Eurofins Biomnis*. 2018 Mar;
33. E.Legrand, C.Sola, N.Rastogie. Le complexe avium intracellulaire:marqueurs phénotypiques et génotypiques et les bases moléculaire de la transmission inter-espèces.
34. Sami M. Akram; Steve S. Bhimji. *Mycobacterium Kansasii*. 2018 Oct 27;
35. Bryant JM, Grogono DM, Floto RA, et al. Whole-genome sequencing to identify transmission of *Mycobacterium abscessus* between patients with cystic fibrosis : A retrospective cohort study. Published online March 29, 2013.

36. Jean-Yves Nau. Nouvelles lumières sur la contagiosité de *Mycobacterium abscessus*. *Revue Medicale Suisse*. 2013 Avril;
37. Roux AL, Herrmann JL, Gaillard JL, Rottman M. *Mycobacterium abscessus*, pathogène émergent dans la mucoviscidose. *Immuno-analyse & Biologie spécialisée* 2009; 25:26-33.
38. Shirin A Mazumde. *Mycobacterium Marinum*. *Medscape*. 2017 Mai;
39. Dixmier, L.J Meymard. Les infections pulmonaires à *Mycobacterium xenopi* en dehors du VIH/SIDA. 2007;
40. Andrejak C. Traitement des infections pulmonaires à *Mycobacterium xenopi*. *Antibiotiques*. 2010 Jun 1;12(2):107–13.
41. Foti C, Sforza V, Rizzo C, De Pascale G, Bonamonte D, Conserva A, et al. Cutaneous manifestations of *Mycobacterium gordonae* infection described for the first time in Italy: a case report. *Cases J*. 2009;2:6828. <http://dx.doi.org/10.4076/1757-1626-2-6828>.
42. Gajurel K, Subramanian AK. False-positive QuantiFERON TB-Gold test due to *Mycobacterium gordonae*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2016;84:315–7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.10.020>.
43. Asija A, Prasad A, Eskridge E. Disseminated *Mycobacterium gordonae* infection in an immunocompetent host. *Am J Ther*. 2011;18:e75–7. <http://dx.doi.org/10.1097/MJT.0b013e3181e32e55>.
44. Yanqing Chen, Juan Jiang, Haiqin Jiang,. *Mycobacterium gordonae* in Patient with Facial Ulcers, Nosebleeds, and Positive T-SPOT.TB Test, China 2. 2017 juillet;
45. Klaus-Dieter Lessnau. *Mycobacterium gordonae* Infection1. 2017 Sep 8;
46. Kim JJ, Lee J, Jeong SY. *Mycobacterium Szulgai* Pulmonary Infection: Case Report of an Uncommon Pathogen in Korea1. *Korean J Radiol*. 2014;15(5):651–4.
47. Sethi S, Arora S, Gupta V, Kumar S. Cutaneous *Mycobacterium fortuitum* Infection: Successfully Treated with Amikacin and Ofloxacin Combination 2. *Indian J Dermatol*. 2014;59(4):383–4.
48. Organisation Mondiale de la Santé. Ulcère de Buruli. 2018 avril;2.
49. Desikan P. Sputum smear microscopy in tuberculosis: is it still relevant? *Indian J Med Res* 137:442444. 2013;
50. Reed JL, Basu D, Butzler MA. *Mycobacterium tuberculosis* molecular screening test with sensitivity approaching culture. *Sci Rep* 7:3653. 2017;
51. Anonymous. Diagnostic standards and classification of Tuberculosis in Adults and Children. This official statement of the American Thoracic Society and the Centers for Disease Control and Prevention was endorsed by the infectious Disease Society of America. 2000;
52. Yeya DS Sarro¹, Bourahima Kone¹, Bassirou Diarra¹. Simultaneous diagnosis of tuberculous and nontuberculous mycobacterial diseases: Time for a better patient management.
53. Van Zyl-Smit RN, Binder A, Meldau R. Comparaison of quantitative techniques including Xpert MTB/RIF to evaluate mycobacterial burden. *Plos One* 6:e28815. 2011;
54. Pr Florence Doucet-Populaire. Apport de la technique PCR GeneXpert® dans le diagnostic et le traitement de la tuberculose (Test Xpert MTB/RIF). 2011;

55. GenoType Mycobacterium CM VER 2.0 Your test system for the detection of *M. tuberculosis* complex and differentiation of 27 clinically relevant NTM from cultivated material. HAIN LIFSCIENCE.
56. Huh HJ, Kim SY, Jhun BW, Shin SJ, Koh WJ(2018) Recent advances in molecular diagnostics and understanding mechanisms of drug resistance in non tuberculous mycobacterial diseases. *Infect GenetEvol* pii: S1567-1348(18)30784-30786. 2018;
57. Herold CD, Fitzgerald RL, Herold DA (1996) Current techniques in mycobacterial detection and speciation. *Crit Rev Clin Lab Sci* 33:83138.
58. Scanelis. Diagnostic direct vs indirect.
59. Principes Théoriques de la qPCR.
60. Reijans M, Dingemans G, Klaassen CH, Meis JF, Keijndener J, Mulders B, et al. RespiFinder: a new multiparameter test to differentially identify fifteen respiratory viruses. *J Clin Microbiol* 2008;46:1232e40.
61. Frobert E, Escuret V, Javouhey E, Casalegno JS, Bouscambert-Duchamp M, Moulinier C, et al. Respiratory viruses in children admitted to hospital intensive care units: evaluating the CLART® Pneumovir DNA array. *J Med Virol* 2011;83:150e.
62. Huguenin A, Moutte L, Renois F, Leveque N, Talmud D, Abely M, et al. Broad respiratory virus detection in infants hospitalized for bronchiolitis by use of a multiplex RT-PCR DNA microarray system. *J Med Virol* 2012;84:979e85.
63. H.-S. Huang, C.-L. Tsai, J. Chang, T.-C. Hsu, S. Lin, C.-C. Lee. Multiplex PCR system for the rapid diagnosis of respiratory virus infection: systematic review and meta-analysis. 2017 Dec;
64. Christian Chuard, Véronique Erard. Infections pulmonaires dues aux mycobactéries non tuberculeuses. 2011;
65. Taiwo B, Glassroth J. Nontuberculous mycobacterial lung diseases. *Infect Dis Clin North Am* 2010;24: 769-89. [Medline].
66. Appliedbiosystems, ThermoFisher. 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument.
67. Bassirou Diarra,1 David Safronetz,2,a Yeya dit Sadio Sarro,1 Amadou Kone,1 Moumine Sanogo,1 Sady Tounkara,1,† Antieme C. G. Togo,1 Fatoumata Daou,1, Almoustapha I. Maiga,1 Sounkalo Dao,1 Kyle Rosenke,2 Darryl Falzarano,2,b Seydou Doumbia,1 Kathryn C. Zoon,4 Michael Polis,5 Sophia Siddiqui,5, Samba Sow,6 Tom G. Schwan,3 Heinz Feldmann,2 Souleyman Diallo,1 and Ousmane A. Koita1. Laboratory Response to 2014 Ebola Virus Outbreak in Mali. 2014 Avril;
68. WHO 2017. WHO. Global tuberculosis report 2017. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2017. 2017;
69. Glassroth J. Glassroth J. Pulmonary disease due to nontuberculous mycobacteria. *Chest* 2008;133:243–51.
70. Griffith DE. Nontuberculous mycobacterial lung disease. *Curr Opin Infect Dis* 2010;23:185–90. 2010;
71. Weiss CH, Glassroth J. Pulmonary disease caused by nontuberculous mycobacteria. *Expert Rev Respir Med* 2012;6:597–613. quiz 3. 2012;
72. Somoskovi A, Salfinger M. Nontuberculous mycobacteria in respiratory infections: advances in diagnosis and identification. *Clin Lab Med* 2014;34:271–95.

73. Akanbi MO, Achenbach C, Taiwo B, Idoko J, Ani A, et al. (2017) Evaluation of gene xpert for routine diagnosis of HIV-associated tuberculosis in Nigeria: A prospective cohort study. *BMC Pulm Med* 17: 87. [Crossref].
74. Bassirou DYT, Bakary K, Moumine S, Antieme CGT, Fatimata C, et al. (2017) Case Report: Extensively Drug Resistant Tuberculosis in Mali: lessons to be learned. *BMC Res Notes* 10: 51. [Crossref].



ANNEXES

ANNEXES

ANNEXE 1 : Fiche d'enquête N°....

Si vous acceptez de participer à cette étude, veuillez signer ou mettre votre empreinte digitale sur les parties désignées ci-dessous.

_____/_____/_____

Prénom et Nom
jour/mois/année

Signature Ou Empreinte
Digitale du participant

Date :

_____/_____/_____

Nom de l'Investigateur

Signature de l'investigateur

Date (J/M/A)

Témoin de la personne interviewée pour le Consentement

A la date donnée à côté de ma signature, J'ai été témoin de l'interview du consentement du participant à l'étude de recherche nommé ci-dessus dans ce document. J'atteste que les informations dans ce formulaire de consentement ont été expliquées au participant, et le participant a indiqué que ses questions et soucis ont été répondus, et qu'il/elle a donné volontairement son consentement à participer à cette étude.

Nom du Témoin_____

(Nom)

(Prénom)

Signature du témoin_____ **Date:**____/____/____

J/ M /

ANNEXE 2 : PROCEDURE DE LA TECHNIQUE D'EXTRACTION D'ADN ET DE PCR

1- Matériaux et réactifs utilisés

- Tubes coniques 1.8ml
- Tube de fluidification contenant de la solution de Lauryl Sulfate de Sodium et du Tris PH8 pour homogénéiser le crachat
- Tube de liaison contenant du sel de Magnésium et de Sodium
- Plaque chauffante agitatrice
- Plaque magnétique
- Plaque rotatrice
- Micropipette et embouts de 10µl
- Micropipette et embouts de 20µl
- Micropipette et embouts de 100µl
- Micropipette et embouts de 200µl
- Micropipette et embouts de 1000µl
- Pipette de 1µl
- Pipette de Pasteur
- Portoir de tube conique
- Centrifugeuse
- Les tubes
- SDS 20%
- Tris Ph8
- Chlorure de sodium
- Chlorure de magnésium
- Tampon de Tris et Tween20
- Glycérol 60%
- Solution Tampon
- Contrôle d'extraction
- Protéinase K
- Capture sonde
- Solution de Bille
- Eau distillée

- Saline
- Bicine
- KoAc
- Plaque de PCR
- Amorces et Sondes

2- Procédure de la technique d'extraction

- Préparer l'hôte : placer du papier absorbant et l'imbiber de vesphène
- Placer les tubes de fluidifications et de liaisons
- Transférer le crachat dans les tubes de fluidifications
- Ajouter du contrôle d'extraction et la protéinase K
- Faire une incubation pendant 8 minutes et 10 minutes à 55° et 100° respectivement
- Mettre dans les tubes de liaisons 5µl de la capture sonde
- Préparer la solution de bille pour la quantité d'échantillons à extraire
- Transférer les échantillons dans les tubes de liaisons après les temps d'incubation cité en dessus
- Incuber à 60° pendant 20 minutes
- Ajouter 20µl de la solution de bille après les 20 minutes
- Roter pendant 10min
- Faire trois lavages avec la solution tampon
- Ajouter 20µl d'éluant
- Incuber à 75° pendant 3min
- Retirer le surnageant pour la PCR

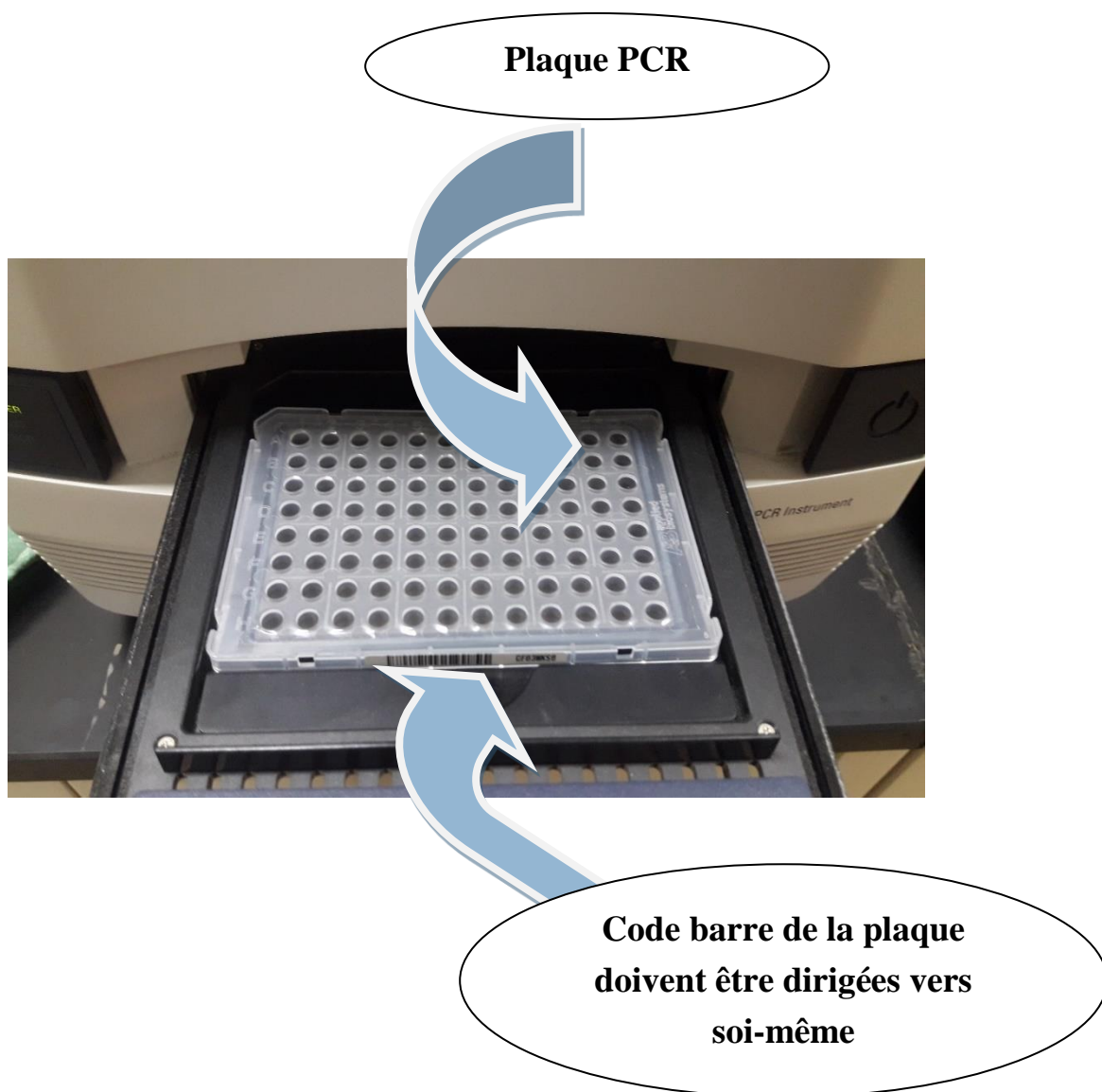
3- Technique de la PCR

- Prendre une quantité des amorces et sonde pour faire le mélange.
- Ensuite faire la reconstitution du Mix.
- Prendre 15µl du Mix pour le mettre dans les puits de la plaque PCR.
- Ajouter 10µl de l'ADN extrait
- Placer la plaque dans la machine ABI

- **Présentation de la machine ABI Fast Dx**



- **Disposition de la plaque PCR dans la machine ABI Fast Dx**



ANNEXE 3 : Fiche de consentement

CONSENTEMENT ECLAIRE POUR PARTICIPER

A UNE ETUDE DE RECHERCHE MEDICALE

Titre de l'étude : Évaluation Clinique d'un Multiplex pour le Diagnostic Moléculaire Simultané des Mycobactéries Tuberculeuses et Non tuberculeuses

Version : 3.0 (Septembre 2019)

Investigateur Principal Northwestern : Dr. Mamoudou Maiga, MD, PhD ; Tél : +001-847-467-2560 ; email: mamoudou.maiga@northwestern.edu

Investigateur Principal USTTB : Dr. Yéya dit Sadio Sarro, PharmD, Candidat PhD ; Tel : (223)75151943 ; e-mail : sadio@icermali.org.

Sponsors : Université de Northwestern (UNW)

ET

Université des Sciences, Techniques et Technologies de Bamako (USTTB)

Site : Bamako, Mali

Nom du volontaire :

Prénom	Surnom	Nom
---------------	---------------	------------

Numéro d'identification du volontaire : ____ - ____ - ____

Age : ____ **Ans**

INFORMATION GENERALE

Nous vous invitons à participer à une étude de recherche médicale conduite par le programme de recherche sur le VIH/Tuberculose (SEREFO) du Centre Universitaire de Recherche clinique (UCRC) de l'USTTB. Le projet est financé par l'UNW et les Instituts Nationaux de la Santé des USA. Tout d'abord, il est important que vous compreniez certaines règles qui ne s'appliquent à toute personne qui participe à cette étude :

1. Votre participation à l'étude est purement volontaire ;
2. Vous pouvez mettre fin à votre participation à tout moment ;
3. Vous ne perdrez pas d'avantages si vous décidez de ne pas participer à cette étude ;

Vous et votre médecin serez informés de tout résultat pertinent qui pourrait aider à améliorer votre santé.

HISTORIQUE/BUT DE CETTE ETUDE

La tuberculose est une infection des poumons causée par des bactéries du genre *Mycobacterium tuberculosis* complexe (MTBC). Les mycobactéries non tuberculeuses (MNT) donnent des maladies très semblables à la tuberculose mais les médicaments utilisés contre les MNT sont différents de ceux utilisés dans la tuberculose, d'où la nécessité de les différencier. De nos jours les mycobactéries non tuberculeuses identifiées sont plus d'une centaine dont une vingtaine peut causer la maladie chez l'homme. Le diagnostic de la tuberculose se fait essentiellement par la microscopie et cette technique ne permet pas de faire la différence entre les mycobactéries tuberculeuses et non-tuberculeuses. Ce qui engendre très souvent un retard important de diagnostic des MNT et des confusions avec les formes résistantes de la tuberculose. Pour résoudre ce problème, nous avons mis au point un test qui permettra de faire le diagnostic des mycobactéries tuberculeuses et non tuberculeuses simultanément. L'objectif donc de cette étude est d'évaluer la capacité de notre nouveau test à différencier ces deux maladies. Ce test s'il est validé, permettra de raccourcir considérablement le délai de diagnostic et traiter correctement les patients pour les deux maladies.

PARTICIPANTS A L'ETUDE

Au total, 300 participants seront enrôlés dans cette étude. Vous êtes éligible pour participer à cette étude si vous avez 18 ans ou plus pour le test dans le crachat et de 0 à 12 pour le test dans les selles, et si vous êtes un cas suspect d'infection par une MNT (50 personnes seront choisies), un nouveau cas de tuberculose (50 personnes seront choisies) ou un cas de tuberculose

chronique qui a reçu plusieurs mois de traitement déjà (100 personnes seront choisies) et un enfant de 0 à 12 ans (100 personnes seront choisies). Pour pouvoir participer vous devez accepter et être en mesure de suivre les instructions et procédures nécessaires de l'étude (produire les échantillons de crachats).

CRITERES DE SELECTION DES PARTICIPANTS

Critères d'inclusion

Vous êtes éligible pour l'étude, si vous

1. Êtes un patient qui a reçu plusieurs mois de traitements de la tuberculose OU un cas suspect d'infection par une MNT, OU un nouveau cas de tuberculose ;
2. Êtes âgé(e) de 18 ans au moins pour le groupe dont le test sera effectué sur les crachats et de 0 à 12 ans pour le groupe des enfants dont le test sera basé sur les selles et l'écouvillonnage anal ;
3. Avez la volonté et la capacité de donner votre consentement éclairé ;
4. Avez la volonté et l'aptitude de donner les échantillons biologiques requis pour l'étude ;
5. Acceptez de vous faire dépister pour le VIH si cela s'avère nécessaire ;
6. Acceptez que l'on garde vos échantillons pour des études futures.

Critères de non inclusion

Vous ne serez pas éligible si vous :

1. Ne remplissez pas un des critères d'inclusion ;
2. Souffrez de trouble médical connu ou toute autre circonstance qui selon l'avis du médecin investigateur pourrait rendre votre participation dangereuse ou difficile.

VISITES DE L'ETUDE

Si vous êtes éligible, nous allons vous demander de donner un échantillon de crachats d'environ 5-15 mL chacun (c'est à dire le volume de deux à six fois une cuillère à café) en deux jours consécutifs.

Première visite

Si vous acceptez de participer à cette étude, les docteurs de l'étude vous expliqueront l'étude et répondront à toutes vos questions, et ensuite vous demanderont de signer ce document de consentement éclairé.

On vous posera des questions sur votre santé, telles que les maladies courantes ou antérieures connues (y compris votre statut pour le SIDA si vous le connaissez), et des questions à propos des signes typiques de la tuberculose et des infections par les MNT (fièvre, toux, sueurs

nocturnes et perte de poids). Vos signes vitaux (température, battement du cœur, tension artérielle, et le rythme respiratoire) seront aussi contrôlés. On vous demandera également de fournir un échantillon de crachat (toussez pour émettre du crachat) d'une quantité d'environ 5-15 mL (équivalent de deux à six cuillères à café) dans un crachoir que nous vous donnerons. Il vous sera aussi demandé de donner un échantillon de sang d'environ 11 ml de sang l'équivalent d'un peu plus de 2 cuillerées à soupe. Ce sang sera utilisé pour tester la présence du VIH et des parasites. Pour les enfants de 0 à 12 ans un échantillon de 8 ml de sang au total sera prélevé pour le test de la sérologie VIH et les éléments figurés du sang (le taux de globule blancs et d'éosinophile). Deux bocal seront remis aux parents de l'enfant pour recueillir des selles du jour et du lendemain. Un écouvillonnage anal sera effectué par le médecin de l'étude le jour de la première visite.

Deuxième visite

Pendant cette visite, on vous demandera également de ramener un échantillon de crachats produits le matin au réveil (toussez pour émettre des crachats) d'une quantité d'environ 5-15 mL (équivalent de deux à six cuillères à café) dans un crachoir que nous vous donnerons. Pour les enfants les deux bocal contenant les échantillons de selles seront recueillis le jour de la deuxième visite.

DISCUSSION SUR LES ALTERNATIVES À LA PARTICIPATION

Vous pouvez décider de ne pas participer à cette étude. Si vous voulez vous retirer de l'étude, vous pouvez le faire à n'importe quel moment. Le fait de refuser d'y participer n'affectera d'aucune manière vos soins médicaux courants ou futurs, que ce soit dans les centres de référence ou à l'Hôpital du Point G. Si vous décidez de vous retirer de l'étude plus tard, veuillez s'il vous plait en informer l'un des membres de cette équipe de recherche pour que des dispositions soient prises.

CONSERVATION DES ECHANTILLONS

Si vous acceptez de participer à cette étude, vous acceptez également à nous laisser garder vos échantillons de crachats et leurs dérivés pour de futures études de recherche médicale. Ces échantillons qui seront gardés pourront nous aider à apprendre davantage sur la tuberculose et les infections par les MNT. Les échantillons seront étiquetés avec un code que seule notre équipe peut déchiffrer et remonter éventuellement jusqu'à votre nom. Toute information qui peut permettre de déchiffrer les codes sur les échantillons et remonter jusqu'à vous sera gardée autant que possible de façon sécurisée et à accès limité seulement aux docteurs de l'étude. Si

vous décidez de vous retirer de l'étude, toutes vos informations seront enlevées de notre base de données et ne seront plus utilisées. Toutefois, les bactéries isolées de vos échantillons n'étant pas associées avec votre nom seront gardées dans notre laboratoire pour d'éventuelles futures études de recherche.

Vos échantillons de crachats et dérivés, codés et sans votre nom pourront être envoyés à d'autres investigateurs pour des analyses. Des informations telles que votre sexe, âge, histoire de santé, et/ou ethnie pourront aussi être communiquées, mais pas votre nom. Vos échantillons ne seront pas vendus, et vous ne serez payé pour aucun produit provenant de cette recherche. Certaines études futures peuvent nécessiter des informations supplémentaires sur votre santé (telles qu'une histoire de tabagisme ou le statut actuel de votre santé par exemple). Dans de tel cas, notre équipe de recherche vous contactera pour ces informations. Une recherche future qui utilise vos échantillons ne va pas probablement vous aider personnellement et directement, mais elle pourra nous aider à mieux apprendre certains aspects des maladies. Souvent, les tests de recherche qui sont effectués ne sont pas comme les tests médicaux de routine, et il se peut qu'ils ne soient pas utiles directement à vos soins médicaux.

RISQUES LIÉS A LA PARTICIPATION À CETTE ETUDE

Les risques liés au fait de tousser pour faire sortir du crachat sont rares mais possibles. Ces risques comprennent le fait de tousser plus, la nausée, le vomissement, la difficulté respiratoire, les gonflements au point de pique, la douleur, les problèmes de coagulation, et quelque rare fois des évanouissements. L'autre risque possible que vous courez en nous permettant d'emmagasinier vos échantillons est la publication non voulue de votre identité avec les échantillons ou résultats des tests, qui peut être provoqué par un problème avec les bases de données par exemple. Les chances pour que cela se produise sont très faibles, car des précautions très rigoureuses sont prises pour limiter l'accès seulement aux docteurs de l'étude.

ARRET DE LA PARTICIPATION

Un volontaire peut être retiré de l'étude pour l'une des raisons suivantes:

- A la demande du patient: à tout moment de l'étude, le patient peut se retirer de l'étude. La raison de chaque retrait si identifiée sera documentée ;
- En cas de décès;
- A la discrétion de l'investigateur: si l'investigateur pense que le retrait du patient de l'étude est dans l'intérêt du patient ou de l'étude. La raison du retrait si identifiée sera toujours documentée.

AVANTAGES LIES A LA PARTICIPATION A CETTE ETUDE

L'avantage lié à la participation à cette étude est que vous et votre docteur aurez accès aux résultats des tests qui sont beaucoup plus précis pour le diagnostic de la tuberculose et des infections par les MNT. Ces tests peuvent également fournir à vous et à votre docteur des informations sur les médicaments qui seront plus efficaces pour traiter votre maladie. Votre participation pourra permettre de valider ce test que nous évaluons et donc de profiter plutard à d'autres futurs patients de tuberculose ou d'infections à MNT. Ceux-ci auront donc une identification plus rapide et plus précise de leur maladie, et de leur mise sous un traitement approprié.

FAIRE VOTRE CHOIX

Si vous consentez à participer à cette étude, vous acceptez également de nous permettre de garder vos échantillons de crachats pour de futures recherches. Vous acceptez également que nous puissions vous contacter encore dans l'avenir si nécessaire. Si au cours de l'étude, vous décidez que vos échantillons de crachats ne soient pas gardés, vous serez retiré de l'étude. Quel que soit votre décision maintenant, vous pourrez toujours participer dans d'autres études futures. Aussi, même si vous consentez maintenant à nous laisser garder vos échantillons de crachats, vous pourrez si vous le jugez nécessaire changer d'avis plus tard. Au cas où vous changez d'avis, veuillez-nous le faire savoir.

COMPENSATION

Si vous participez à cette étude, vous recevrez une compensation de 5.000 F CFA (environ 10\$ US) pour juste compenser votre temps et vos efforts.

CONFIDENTIALITE

Vos informations tout au long de cette étude seront gardées confidentiellement. Tous les dossiers contenant des informations qui pourront vous identifier seront gardés dans des cabinets fermés à clef sous la garde du docteur principal de l'étude. À chacun de vos échantillons sera attribué un numéro d'identification qui permettra de remonter à vous (votre nom) si besoin y est. Les étiquettes de ces échantillons n'auront pas votre nom écrit dessus. Cependant, la confidentialité peut être levée à la demande des institutions telles que le comité d'éthique de la FMOS & FAPH, de l'Université du Northwestern et les autorités du pays pour des raisons

juridiques par exemple. Les comités d'éthique sont des comités indépendants qui ont pour rôle de s'assurer que vos droits sont préservés.

NOUVELLES DECOUVERTES

Les découvertes provenant de cette étude pourront être communiquées lors de rencontres scientifiques ou publiées dans des journaux médicaux sans votre nom. Quoique les informations spécifiques que nous apprenons sur vous ne soient pas communiquées à une autre personne, excepté les docteurs de l'étude, une confidentialité absolue ne peut pas être garantie. Toute nouvelle information qui devient disponible et qui pourra affecter votre participation à cette étude de recherche fera l'objet d'une discussion avec vous. Si vous avez des inquiétudes sur votre participation à l'étude, vous êtes libre d'en discuter avec un membre de l'équipe à tout moment.

LISTE DES CONTACTS

Si vous avez des questions maintenant ou plus tard, vous pouvez parler avec:

- ✓ le personnel de l'étude, [OU](#)
- ✓ le Docteur principal de l'étude du nom de Dr Yeya dit Sadio Sarro à la FMOS/USTTB, téléphone: 75 15 19 43, email: sadio@icermali.org [OU](#)
- ✓ le Président du Comité d'Éthique de la FMOS & FAPH, le Professeur Marouf KEITA, téléphones: 66722022/73 05 50 84; E-mail: mmaroufkeita@yahoo.fr) [OU](#)
- ✓ le secrétaire permanent du comité d'éthique de la FMOS & FAPH , le Professeur Mahamadou DIAKITE, téléphones: 76 23 11 91/ 66 23 11 91, Fax: (223) 20 22 49 87) Email : mdiakite@icermali.org/mdiakite65@yahoo.com

FICHE SIGNALÉTIQUE

Nom : SANOGO

Prénom : Fanta

Téléphone : 74574181

E-mail : fanta.sanogo@yahoo.com

Titre de la thèse : Mise au point d'une technique Multiplexe PCR en temps réel pour la détection simultanée des mycobactéries tuberculeuses et non tuberculeuses dans le crachat

Année Universitaire : 2019-2020

Pays : Mali

Ville de soutenance : Bamako

Lieu de dépôt : Bibliothèque de la faculté de médecine et d'odontostomatologie (FMOS) et de la faculté de pharmacie (FAPH) de Bamako

Secteur d'intérêt : Bactériologie, infectiologie, Pneumologie

RESUME :

Le but de notre étude était de mettre au point une technique multiplexe PCR en temps réel pour la détection simultanée des mycobactéries tuberculeuses et des mycobactéries non tuberculeuse dans le crachat.

Pour atteindre ce but, une étude transversale pilote a été menée au laboratoire P3 de Tuberculose et des Fièvres Hémorragiques du Centre Universitaire de Recherche Clinique (UCRC). L'étude a porté sur les ADN commerciaux de différentes mycobactéries, des souches de mycobactéries déjà identifiées à l'UCRC et du crachat frais. Ces échantillons ont été traités suivant différentes techniques telles que l'extraction d'ADN, la PCR et la culture des crachats frais. Nous avons observé un taux de détection acceptable des souches de mycobactéries utilisées pour la mise au point (10 CFU/ml) avec une apparition des courbes entre le 20^{ème} et le 30^{ème} cycle de l'amplification.

Cette technique de PCR Multiplexe a montré une bonne capacité de détection des mycobactéries à partir des crachats de patients suspects de tuberculose et/ou de mycobactériose (MNT).

Mots clés : Culture, Multiplexe PCR, mycobactéries tuberculeuses, mycobactéries non tuberculeuses.

SHEET

Name: Fanta SANOGO

Phone: 74574181

E-mail: fanta.sanogo@yahoo.com

Thesis title: Set up of a real-time PCR multiplex technique for the simultaneous detection of tuberculous and non-tuberculous mycobacteria in sputum.

Year: 2019-2020

Country: Mali

Town of defense: Bamako

Discharge point: Bacteriology, infectious diseases, Pneumology,

Summary:

The aim of our study was to develop a real-time multiplex PCR technique for the simultaneous detection of tuberculous Mycobacteria (MTBC) and non-tuberculous mycobacteria (NTM) in sputum.

To achieve this goal, a pilot cross-sectional study was conducted in Tuberculosis and Viral Hemorrhagic BSL-3 laboratory of the University Clinical Research Center (UCRC).

The study used commercial DNA of various mycobacteria strains, strains of mycobacteria already identified at UCRC and fresh sputum samples. These samples were processed following different techniques as PCR, DNA extraction and culture.

We observed an acceptable detection limit of the strains of mycobacteria (10 CFU/ml) used for the development with an appearance of the curves between the 20th and 30th cycle of amplification. In conclusion, the technique has shown a good capacity for detecting mycobacteria from the sputum of patients suspected of tuberculosis and / or non-tuberculous mycobacteria.

Key words: Culture, Multiplex PCR, tuberculous mycobacteria, Non-tuberculous mycobacteria.

SERMENT DE GALIEN

- Je jure en présence des maîtres de cette Faculté, des conseillers de l'ordre des Pharmaciens et de mes chers condisciples.
- D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement;
- D'exercer dans l'intérêt de la santé publique ma profession, avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement
- De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine. En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.
- Respectueux et reconnaissant envers mes maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.
- Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

Je le jure !