

# Development and optimization of a viability real-time PCR assay for the detection of viable *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory samples

Author names (**Théo FOUCHET**<sup>1</sup>, Alain HARTMANN<sup>1</sup>, Murielle ROCHELET <sup>1,2</sup>)

<sup>1</sup> UMR Agroécologie INRAe, <sup>2</sup> Université Bourgogne Franche-Comté

En 2022, il y a eu 10,6 millions de nouveaux cas de tuberculose dans le monde, et 1,3 millions de morts en partie à cause de la difficulté à identifier les cas actifs rapidement et précisément. Malgré les avancées diagnostiques, il faut généralement plusieurs semaines pour obtenir des résultats de culture, technique de référence, ce qui reste problématique. Une méthode rapide et fiable pour détecter spécifiquement les mycobactéries viables permettrait non seulement de distinguer les cas actifs des cas inactifs ou traités, mais aussi de limiter la propagation en ciblant rapidement les patients réellement contagieux. Les tests de diagnostic moléculaire, comme le **GeneXpert MTB/RIF**, détectent l'ADN de *Mycobacterium tuberculosis*, mais ne distinguent pas si les bactéries sont mortes ou vivantes. Ainsi, l'axe principal de mon sujet de thèse est de développer et optimiser une PCR temps réel de viabilité pour la détection de mycobactéries viables dans les prélèvements respiratoires. Cette qPCR cible l'IS1081, séquence d'insertion spécifique du complexe *M.tuberculosis*. La PCR de viabilité repose sur l'utilisation d'un intercalant de l'ADN, le **monoazide de propidium** (ou PMA) spécifique des cellules à membranes endommagées. Après mise au point et optimisation des conditions de la PCR temps réel (amorces, sonde, température d'hybridation...), plusieurs paramètres ont été évalués tels que le choix de l'intercalant, la concentration en intercalant et l'utilisation de réactifs perméabilisant les cellules mortes pour favoriser la diffusion de l'intercalant. Les expériences ont été réalisées dans un premier temps en suspension pure puis en expectorations spikées avec des mycobactéries mortes ou vivantes. Une **concentration optimale de PMA** a été déterminée (**25  $\mu\text{mol.L}^{-1}$** ) et il a été montré que le **Tween 80 à 1%** dans les expectorations **permet de favoriser l'entrée du PMA** dans les cellules mortes. D'autres paramètres, comme le temps d'incubation des cellules avec le PMA, le temps d'exposition à la lumière (pour que le PMA se fixe à l'ADN), ou encore l'utilisation combinée de plusieurs intercalants devront être évalués. Des contrôles internes devront aussi être inclus afin de normaliser le signal de qPCR et valider la qualité des échantillons respiratoires testés. Enfin, la répétabilité et la reproductibilité du protocole devront être évaluées pour ensuite tester la méthode sur des échantillons de patients positifs.