

## LISTE DES ABBREVIATIONS

**Ag** : Antigène

**AG** : Arabinogalactane

**°C** : Degré Celsius

**BAAR** : Bacille Acid Alcoolo Résistant

**BCG** : Bacille de Calmette et Guerin

**BK** : Bacille de Koch

**CD** : clusters de différenciation

**CFP-10** : Culture Filtrate Protein 10

**CHNU** : Centre Hospitalier National Universitaire

**CMH** : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

**CM**: (Central Memory T cell)

**CPA** : Cellules Présentatrices d'Antigènes

**DO** : Densité Optique

**DCs**: Dendritique Cells

**ELISA**: Enzym Linked Immuno Sorbent Assay

**ELISpot**: Enzym Linked Immuno Spot

**ESAT-6**: Early Secretory Antigenic Target 6

**FBS**: Foetal Bovin Serum

**FDA**: Food and Drug Administration

**GD**: Green Diluent

**HBHA**: Heparin-binding haemagglutinin

**IDRt** : Intra Dermo Réaction à la tuberculine

**IFN- $\gamma$** : Interféron gamma

**IgG**: Immunoglobuline G

**IGRA**: Interferon gamma release assays

**IL**: Interleukine

**LT**: Lymphocytes T

**LPA**: Lipoproteine a

**MGIT**: *Mycobacterium* Growth Indicator Tube

***M. kansaii*** : *Mycobacterium kansaii*

***M. marinum***: *Mycobacterium marinum*

***M. szulgai***: *Mycobacterium szulgai*

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

**NIL**: Contrôle négatif

**NK**: Natural killer

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**PBMC**: Peripheral Blood Mononuclear Cells

**PBS**: Phosphate Buffered Saline

**PCR**: Polymerase Chain Reaction

**PHA**: Phytohemagglutinin

**PNN**: Polynucléaire neutrophile

**PPD**: Purified Protein Derivative

**PS**: Pénicilline Streptomycine

**QFT-IT**: Quantiferon TB GOLD –IN TUBE

**RD1**: Région de différentiation 1

**ROS**: Radicaux Oxygénés

**RNI**: Radicaux azotés

**RPMI**: Roswell Park Memorial Institute

**SIDA**: Syndrome de l'Immunodéficience Acquise

**SEB**: *Staphylococcus* Enterotoxine B

**SFC**: Spot Forming Cells

**TA** : Température Ambiante

**TB**: Tuberculose

**TB-Ag**: Tuberculose antigène

**Th1**: T helper de type 1

**TNF- $\alpha$** : Tumor Necrosis Factor alpha

**TLRs**: Toll-like Receptors

**Tpm**: Tour par minute

**UI** : Unité Internationale

**VIH** : Virus de l'immunodéficience humaine

# LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1:</b> Représentation schématique de l'enveloppe du BK (Adapté) [32].	4
<b>Figure 2 :</b> Pathogenèse de la tuberculose (Adapté) [18].	5
<b>Figure 3 :</b> Rôle des macrophages dans l'immunité innée et adaptative (Adapté) [18].	7
<b>Figure 4 :</b> Rôle des macrophages dans l'immunité adaptative (Adapté) [53].	9
<b>Figure 5 :</b> Rôle des cellules T CD8+ dans l'immunité adaptative (Adapté) [38].	11
<b>Figure 6:</b> Représentation schématique d'ESAT6 et CFP10 (Adapté) [23].	12
<b>Figure 7</b> Diversité fonctionnelle des LT et des cellules mémoires (Adapté) [24].	15
<b>Figure 8 :</b> Inoculation de la tuberculine par voie intradermique à la face antérieure de l'avant bras (Adapté) [22].	16
<b>Figure 9 :</b> IGRA QFT-IT et T-SPOT.TB®(Adapté) [53].	20
<b>Figure 10 :</b> Procédure de séparation cellulaire et la stimulation pour ELISA	26
<b>Figure 11:</b> Production de l'IFN- $\gamma$ en réponse à une stimulation par l'HBHA	28
<b>Figure 12:</b> Production de l'IFN- $\gamma$ en réponse à une stimulation par l'HBHA.	32
<b>Figure 13:</b> Production de l'IFN- $\gamma$ en réponse à la stimulation par HBHA au niveau des différents groupes.	34
<b>Figure 14:</b> Production de l'IFN- $\gamma$ en réponse à la stimulation par HBHA au niveau des sujets IDRt positive /QFT-IT négatif	35
<b>Figure 15 :</b> Production de l'IFN- $\gamma$ en réponse à la stimulation par HBHA au niveau des étudiants de la FMPO et ceux de la FST	36

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau I:</b> Interprétation de l'IDR [12].	17
<b>Tableau II:</b> Interprétation du QTF-IT	19
<b>Tableau III :</b> Préparation du conjugué pour QFT-IT	29
<b>Tableau IV:</b> Caractéristiques démographiques et immunologiques de la population d"étude.	31
<b>Tableau V :</b> Caractéristiques démographiques et immunologiques des étudiants de la FST (master) comparés aux étudiants de la FMPO (6 <sup>ème</sup> et 7 <sup>ème</sup> année de médecine)	32

# ***SOMMAIRE***

Introduction	1
Première partie: Généralités sur la Tuberculose	
I. Définition	3
II. Épidémiologie	3
II.1. Fréquence et répartition géographique	3
II.2. Agents pathogènes	3
II.3. Pathogenèse de la tuberculose	4
III. Généralités sur la réponse immunitaire anti tuberculeuse	5
III.1. Réponse immunitaire innée	5
III.2. Réponse immunitaire adaptative	7
III.2.1. Réponse humorale	7
III.2.2. La réponse cellulaire	7
III.2.2.1. Le rôle des macrophages et cellules dendritiques	8
III.2.2.2. Le rôle des lymphocytes T CD4+	9
III.2.2.3. Le rôle des lymphocytes T CD8+	10
III.2.2.4. Le rôle des interleukines (IL)	11
III.2.2.4.1. Protéine de surface HBHA	11
III.2.2.4.2. Protéines secrétées ESAT6 et CFP10	12
IV. Généralités sur les méthodes de diagnostic de la tuberculose	14
IV.1. Diagnostic de l'infection tuberculeuse latente	14
IV.1.1. L'intradermoréaction à la tuberculine (IDRt)	14
IV.1.1.1. Principe Technique de l'IDR de Mantoux	16
IV.1.1.2. Lecture et interprétation des résultats	17
IV.1.2. les Tests „„Interferon Gamma Release Assays““IGRA	17
IV.2. Diagnostic de la tuberculose active	21
IV.2.1. Examens cliniques	21
IV.2.2. Examens radiologiques	21
IV.2.3. Diagnostic bactériologique	21
IV.2.4. Les nouvelles méthodes de diagnostic	21
IV.2.5. Méthodes de mesure de l'interféron gamma secrété après activation lymphocytaire	22
<i>Deuxième partie : Méthodologie, Résultats et Discussion</i>	
I. Méthodologie	23
I.1. Cadre de l'étude	23

I.2. Population de l"étude	23
I.3. Matériel et méthodes	23
I.3.1. Matériel	23
I.3.2. Réactifs	24
I.3.3. Protocole de l"étude	25
I.3.4. IGRA basé sur la stimulation par l"HBHA	25
I.3.4.1. Principe	25
I.3.4.2. Protocole technique	26
I.3.5. QUANTIFERON- TB GOLD IN TUBE	28
I.3.6. Analyse des données	30
II. RÉSULTATS	31
II.1. Caractéristiques démographiques et immunologiques de la population d"étude	31
II.2. Production de l"IFN-γ après stimulation par le test HBHA	32
II.3. Comparaison de la production d"IFN-γ après stimulation par l"HBHA dans les différents groupes	33
II.4. Comparaison de la sécrétion d"IFN-γ en réponse à l"HBHA chez les sujets IDRt positive/QFT négatif	34
II.5. Comparaison de la sécrétion cytokinique IFN-γ en réponse à l"HBHA chez les étudiants (6 <sup>ème</sup> et 7 <sup>ème</sup> ) de la FMPO et ceux de la FST (master)	35
III. DISCUSSION	37
CONCLUSION	39
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	41

La tuberculose (TB) constitue un réel problème de santé publique. C'est une maladie bactérienne, contagieuse principalement par voie aérienne, se transmet d'homme à homme. Cependant, trois espèces peuvent être responsables de la tuberculose : *Mycobacterium tuberculosis* ou Bacille de Koch (BK), *M. bovis* et *M. africanum*.

Environ un tiers de la population mondiale est infecté par *M. tuberculosis*. Pour l'année 2013 selon l'OMS, on estime que 9 millions de personnes ont contracté cette maladie avec 1,5 million de décès (dont 375000 décès parmi les personnes vivant avec le VIH) [39].

Cependant, parmi les individus infectés seuls 5 à 10% font une TB maladie [38]. Ainsi, les individus infectés restent majoritairement asymptomatiques et peuvent le demeurer à vie, on parle alors d'infection latente ou TB latente.

La détection de l'infection tuberculeuse est surtout basée sur le test cutané à la tuberculine ou Intra Dermo Réaction à la tuberculine (IDRt) et les tests de relargage de l'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ) (Interferon gamma release assays (IGRA)) comme le Quantiferon TB-Gold In-tube (QFT-IT) ou le TB-Spot. Les trois sont basés sur une stimulation par des antigènes de *M. tuberculosis*, avec une réponse inflammatoire locale pour l'IDRt, et la mesure *in vitro* de la production d'IFN- $\gamma$  pour les IGRA.

L'IDRt, utilise la tuberculine ou "Purified Protein Derivative" (PPD) qui est un lysat de bactérie. Les antigènes ne sont pas spécifiques du BK car donnant de faux positifs chez les personnes saines mais vaccinées avec le Bacillus de Calmette-Guerin (BCG) et les personnes infectées par les mycobactéries atypiques. De plus, il nécessite une lecture après 48-72h.

Les deux tests IGRA sont basés sur un mélange de peptides de la Région de différenciation (RD1), que sont : 6 kDa "Early Secretory Antigenic Target" (ESAT-6) et 10 kDa "Culture Filtrate Antigen" (CFP-10), ces tests mesurent *in vitro* de la production d'IFN- $\gamma$ . Le test QFT-IT contient également « Tuberculose 7.7 » codé par le gène RD11. Ces gènes sont uniquement présents dans les souches *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. marinum* et *M. szulgai*. Les deux tests sont dès lors plus spécifiques que l'IDRt, et même s'ils sont moins sensibles, ils donnent de meilleures valeurs prédictives positives et négatives [9;10]. Chez les patients immunodéprimés, la sensibilité est diminuée pour les trois tests.

Considérant ces données, il est désormais crucial d'améliorer nos outils de dépistage de l'infection latente.

Une nouvelle cible pour la détection de la tuberculose latente, l'hémagglutinine liée à l'héparine (Heparin-binding haemagglutinin (HBHA)), a été récemment identifiée. C'est une molécule d'adhésion que la bactérie utilise pour sortir des poumons vers l'endothélium et se

répandre vers d’autres organes, elle constitue donc un facteur de virulence. L’HBHA est exprimée à la surface de *M. tuberculosis*. Elle est également exprimée au niveau du BCG mais à un niveau plus faible. Le test IGRA basé sur l’HBHA a montré des résultats prometteurs pour détecter la TB latente chez des sujets d’origines diverses [19]. Un seuil de positivité de 0,100 ng/ml d’IFN- $\gamma$  donnait une spécificité de 94% et une sensibilité de 92% pour la TB latente. Une vaccination antérieure au BCG n’affectait pas les réponses après la stimulation par l’antigène HBHA [19]. En effet, la HBHA est une protéine méthylée et la méthylation s’avère essentielle pour ses propriétés immunoprotectrices.

C’est dans ce cadre que nous nous sommes proposés :

- ✓ d’évaluer la performance du test IGRA basé sur la stimulation par HBHA dans le dépistage de l’infection latente en comparaison aux tests actuels
- ✓ De voir si réellement lors de la TB active, il y’a une faible sécrétion d’IFN- $\gamma$  spécifique après stimulation par HBHA. De faire une comparaison des réponses à l’HBHA, IDRt, QFT-IT des étudiants exposés ou non à l’infection tuberculeuse

Ce travail comporte deux parties :

- Une première consacrée à des rappels relatifs à la TB.
- Une seconde qui aborde la méthodologie et la discussion des résultats obtenus

## I. Définition

La TB est une maladie bactérienne, contagieuse principalement par voie aérienne, et qui se transmet d'homme à homme. L'agent responsable appartient à la famille des *Mycobacteriaceae*. Cette famille renferme un seul genre: le *Mycobacterium*, comportant de nombreuses espèces [36]. Au sein du genre *Mycobacterium*, trois (3) espèces seulement sont responsables de la TB [51]:

- ✓ *M. tuberculosis* ou BK, responsable de la quasi-totalité des cas de tuberculose ;
- ✓ *M. bovis*, responsable de la tuberculose du bétail, est rarement retrouvé chez l'homme ;
- ✓ *M. africanum*, identifié en Afrique de l'ouest,

Ces trois espèces de bacilles appartiennent au « complexe tuberculosis» selon une classification basée sur des critères moléculaires [6].

## II. Epidémiologie

### II.1. Fréquence et répartition géographique

Selon le rapport de l'OMS en 2013, 9 millions de cas de tuberculose ont été enregistrés avec 1,5 million de décès. Cependant, la maladie connaît un recul chaque année avec ainsi 37 millions de vies qui ont été sauvées entre 2000 et 2013[39].

Au Sénégal, la TB reste encore un problème de santé prioritaire. Des efforts ont permis d'améliorer le taux de détection de 13 points entre 1990 et 2011. Selon le rapport Global TB de l'OMS en 2012, l'incidence estimée est de 136 cas toutes formes pour 100 000 habitants avec un taux de détection de 69%. Les cas attendus de coïnfection sont estimés à 1700 soit 14 cas pour 100 000 habitants.

### II.2. Agent pathogène

La TB humaine est due au *M. tuberculosis*. C'est un bacille aérobie strict, immobile, droit ou légèrement incurvé, acapsulé, asporulé, de 2 à 5µm de longueur sur 0,3 à 0,5µm de largeur, aux extrémités arrondies. Sa paroi se présente en petits amas ou sous forme isolée (figure 1). Le squelette de sa paroi est composé de peptidoglycanes reliés de façon covalente à un hétéroside l'arabinogalactane (AG) lui-même estérifié par des acides mycoliques (acides gras particuliers), ils forment des cires. La paroi joue un rôle essentiel dans la virulence et la pathogénicité des mycobactéries. En effet, certains composants constituent des antigènes majeurs (exemple : HBHA) reconnus par différents récepteurs à la surface des cellules immunitaires et induisant ainsi une variété de réponses immunes.

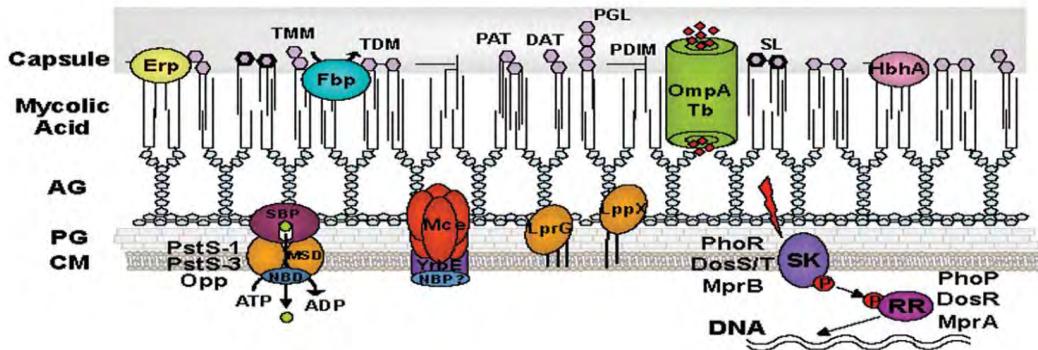


Figure 1: Représentation schématique de l'enveloppe du BK (Adapté) [32].

### II.3. Pathogénèse de la tuberculose

Après inhalation, le BK pénètre dans le parenchyme pulmonaire. Il est phagocyté par les macrophages [11]. La multiplication du BK intra vacuolaire conduit à la destruction du macrophage et à la libération de nombreux bacilles, qui seront phagocytés à leur tour par d'autres macrophages et éventuellement par d'autres cellules inflammatoires du voisinage, les monocytes et les polynucléaires. Ainsi se constitue un foyer infectieux local ayant au début des caractères non spécifiques [21].

Les BK libres ou phagocytés par les macrophages sont transportés vers les ganglions lymphatiques. Ces derniers sont riches en lymphocytes T spécifiques c'est-à-dire porteurs d'un récepteur interagissant avec les antigènes du BK. Les différents types de lymphocytes sont impliqués (T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup>). Les lymphocytes activés se multiplient localement puis migrent dans la totalité de l'organisme.

Dans 90% des cas, le BK est contrôlé par le système immunitaire des personnes infectées. Lorsque la tuberculose maladie ne se développe pas, on parle de porteur sain ou de tuberculose latente. Durant cette phase de latence, la multiplication bactérienne est contrôlée et les bactéries sont confinées dans les granulomes (figure 2). C'est une structure dynamique, où les cellules immunitaires sont constamment renouvelées [48]. Les macrophages alvéolaires des voies respiratoires, après internalisation des mycobactéries inhalées, sont stimulés et envahissent l'épithélium pulmonaire. Seules 10% des tuberculeux latent feront une tuberculose active au cours de leur vie. Ceci pouvant être dû à un affaiblissement du système immunitaire. Les personnes qui développent une tuberculose active sont contagieuses et présentent des symptômes.

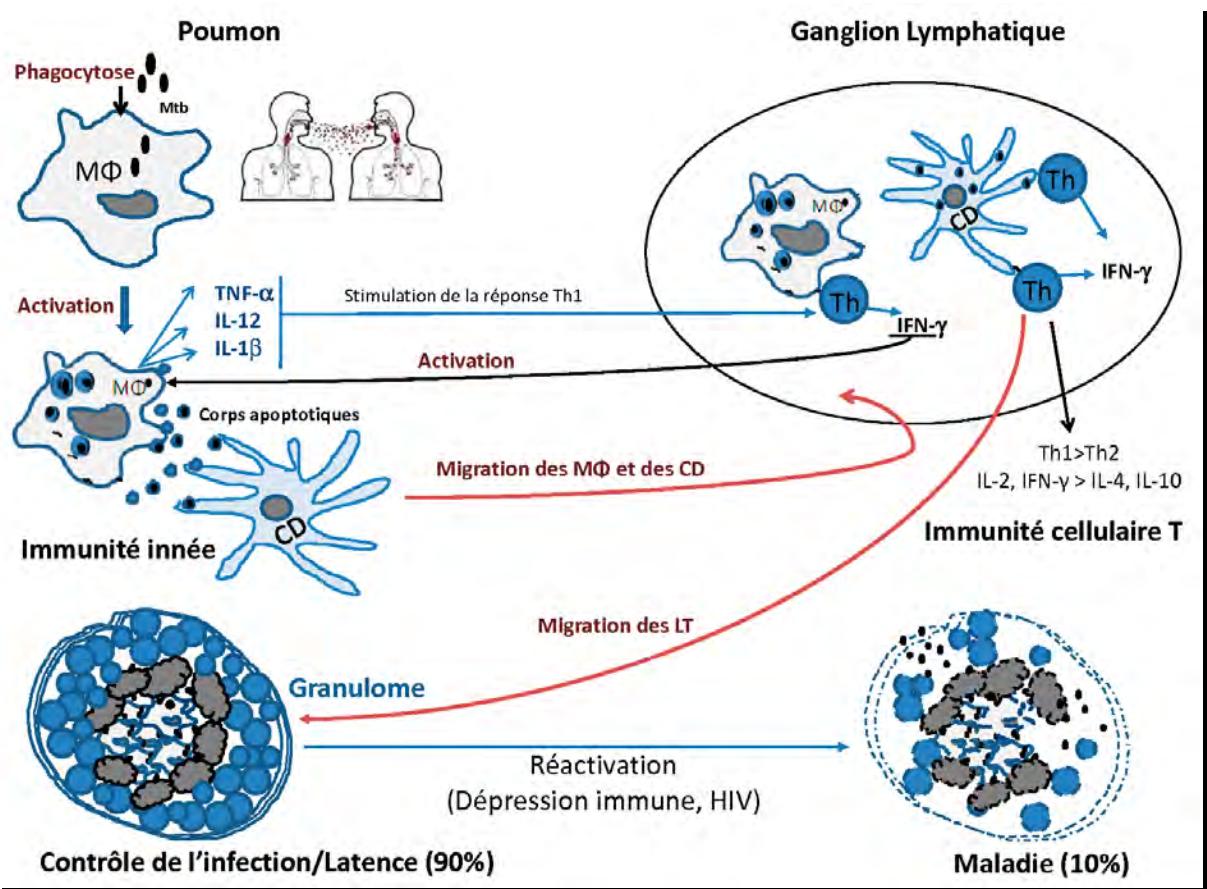


Figure 2 : Pathogenèse de la tuberculose (Adapté) [18].

### III. Généralités sur la réponse immunitaire anti tuberculeuse

#### III. 1. Réponse immunitaire innée

L'immunité cellulaire acquise protège d'une façon efficace contre la TB disséminée mais ne prévient ni l'infection pulmonaire initiale ni la réinfection exogène des poumons. Ce rôle de protection contre l'infection est joué par les cellules de l'immunité innée qui influencent également la réponse acquise de l'hôte. Les phagocytes recrutés au niveau du site d'infection tels que cellules dendritiques et les macrophages alvéolaires (figure 2) ont un rôle primordial dans la destruction du pathogène et la stimulation de la réponse cellulaire acquise suite à une présentation antigénique efficace aux cellules T [42]. *M. tuberculosis* est internalisé au sein des phagosomes des macrophages (figure 3) à travers plusieurs récepteurs tels que les récepteurs au mannose, les "scavenger receptor" et les récepteurs au complément. La fusion du phagosome avec les lysosomes crée une nouvelle vacuole chargée d'hydrolases et protéases dirigées contre la bactérie avec un pH acide et des radicaux oxygénés (ROS) et azotés (RNI).

Récemment, une attention particulière a été portée sur le rôle des "Toll-like Receptors" (TLRs) dans la liaison du bacille aux macrophages. La signalisation dépendante des récepteurs Toll est déclenchée suite à l'association des antigènes mycobactériens avec ces récepteurs localisés à la surface de la cellule et des phagosomes (TLR-MyD88). Brightbill et al avaient démontré que l'activation des TLR par les lipoprotéines du *M. tuberculosis*, permet la production d'IL-12 par les cellules Th 1 [4]. Cette IL-12 est un activateur des macrophages entraînant la production d'oxyde nitreux et de peroxyde d'hydrogène qui augmentent l'acidification du phagolysosome. Ces substances ont une activité bactéricide. Cependant, le bacille peut échapper à ce phénomène par la production de molécules pouvant inhiber la fusion phagolysosomale.

En plus du macrophage plusieurs autres types cellulaires jouent un rôle important dans l'infection par *M. tuberculosis*.

Les neutrophiles, premières cellules qui arrivent au niveau du site infectieux pour phagocytter les bactéries, ont une action bactéricide basée sur la production de défensines.

Les cellules dendritiques (DCs) qui entrent en contact avec *M. tuberculosis* acquièrent leur maturation et deviennent de puissantes cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Elles migrent vers les nodules lymphatiques où elles vont stimuler les cellules T naïves permettant leur maturation en Th1 grâce à la sécrétion des cytokines telles que : IL-12, IL-18 et IL-23 [50]. Contrairement aux macrophages, les DCs activées par l'IFN- $\gamma$ , sont capables de contrôler la réplication des mycobactéries sans les éradiquer.

D'autres types cellulaires peuvent intervenir comme les « Naturel Killers » (NKs) qui sont capables d'activer les cellules phagocytaires au niveau du site d'infection. Ces phagocytes augmentent, d'une manière non spécifique, leur activité mycobactéricide suite à leur infection par *M. tuberculosis*. Les NKs peuvent lyser directement les pathogènes ou encore les monocytes et les macrophages infectés. D'autres études ont montré que les cellules épithéliales sont aussi capables de sécréter des polypeptides anti-mycobactériens comme les défensines et des agents bactéricides puissants tels que le monoxyde d'azote (NO, Nitric Oxyde) [44]. Elles peuvent aussi induire une réponse inflammatoire non spécifique par la synthèse de l'IL-8. Les mastocytes peuvent aussi sécréter des médiateurs tels que l'histamine et la  $\beta$ -hexosamidase et des cytokines proinflammatoires telles que l'IL-6 et le TNF- $\alpha$  (Tumor necrosis factor-alpha) [23]. Ces médiateurs et cytokines sont impliqués à la fois dans l'induction d'une réponse inflammatoire, l'activation des neutrophiles et le maintien de l'intégrité du granulome [24].

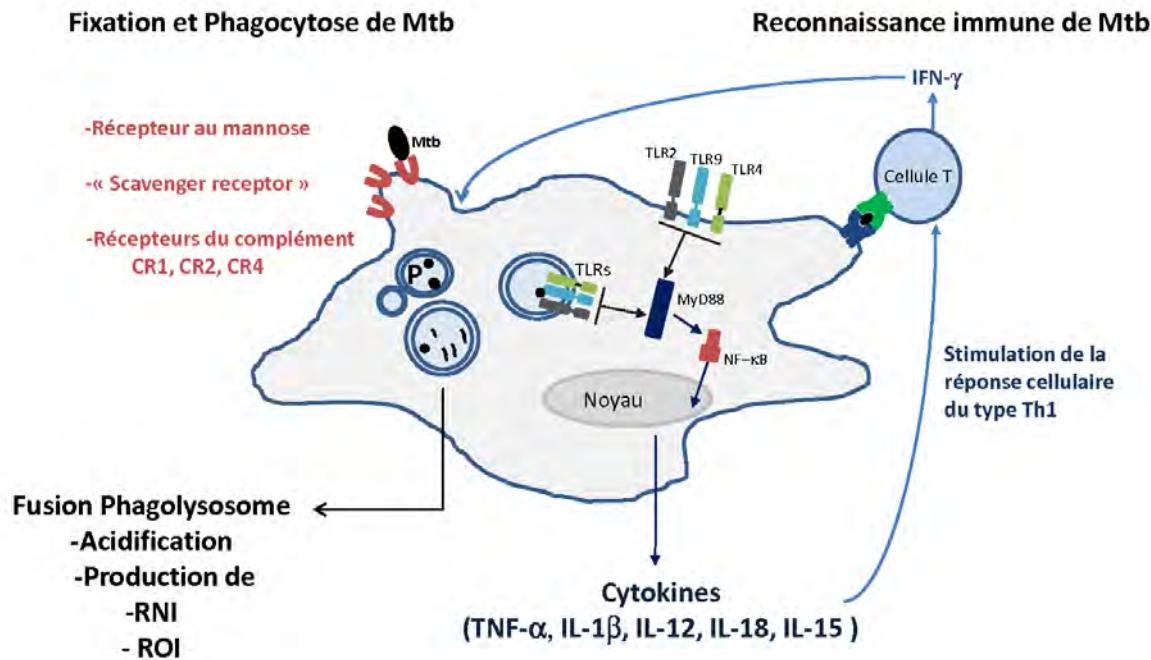


Figure 3 : Rôle des macrophages dans l'immunité innée et adaptative (Adapté) [18].

### III. 2. Réponse immunitaire adaptative

#### III. 2.1. Réponse humorale

La réponse immunitaire vis-à-vis du BK est principalement cellulaire. La contribution de la réponse humorale est peu efficace. Cette dernière est très hétérogène et dépend du stade de la maladie [1]. Un titre élevé en anticorps, principalement des IgG, a pu être observé chez les malades tuberculeux à un stade avancé de la maladie.

Cette réponse humorale est très marginale au cours de l'infection tuberculeuse car les mycobactéries sont des bactéries intracellulaires d'où la réponse anticorps systémique n'est pas protectrice.

#### III.2.2. Réponse cellulaire

L'immunité dirigée contre le BK repose essentiellement sur l'immunité à médiation cellulaire et principalement sur les lymphocytes T CD4 $^{+}$  de type Th-1 et sur les macrophages [40].

Lors de l'infection tuberculeuse, les bactéries sont phagocytées par les macrophages puis présentées aux lymphocytes T CD4 $^{+}$  et T CD8 $^{+}$ . Ces lymphocytes ainsi activés sont les supports de l'immunité spécifique antituberculeuse [41].

### III.2.2.1. Le rôle des macrophages et cellules dendritiques

Les monocytes/macrophages (figures 3 et 4), semblent jouer un rôle clef dans l'initiation et l'orientation de la réponse adaptative dirigée contre le *M. tuberculosis*, grâce à leur capacité à présenter l'antigène, leur activité co-stimulatrice et leur production de cytokines et chimiokines (figure 4).

Les fragments antigéniques de la mycobactérie, dégradés et présentés à travers les molécules du Complexe Majeur d'histocompatibilité (CMH) classe II, aux cellules T CD4<sup>+</sup>, permettent une reconnaissance spécifique des cellules infectées. Les cellules NK et T secrètent l'IFN- $\gamma$ , nécessaire à augmenter l'effet bactéricide des macrophages et à produire d'avantage de cytokines du type Th1.

Les macrophages contribuent également à la réponse immunitaire en sécrétant du TNF- $\alpha$  qui joue un rôle central dans la formation de la lésion granulomateuse. Bien que ce rôle n'ait pas été prouvé chez l'homme, des études ont montré que les animaux ne produisant pas cette cytokine meurent dans un tableau de tuberculose sévère [15]. En général, le macrophage internalise et contrôle le développement du bacille. Le fait de contenir l'infection au niveau du macrophage fait intervenir plusieurs cellules de l'immunité adaptative dont les cellules suivantes : T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup>, T  $\gamma\delta$ , T CD1<sup>+</sup> [27]. Ces cellules interviennent en sécrétant des cytokines principalement l'IFN- $\gamma$ . Les cellules T CD4 activées peuvent directement secréter de la lymphotoxine  $\alpha$ 3 (LT $\alpha$ 3) qui a une action cytolytique directe sur les macrophages infectés.

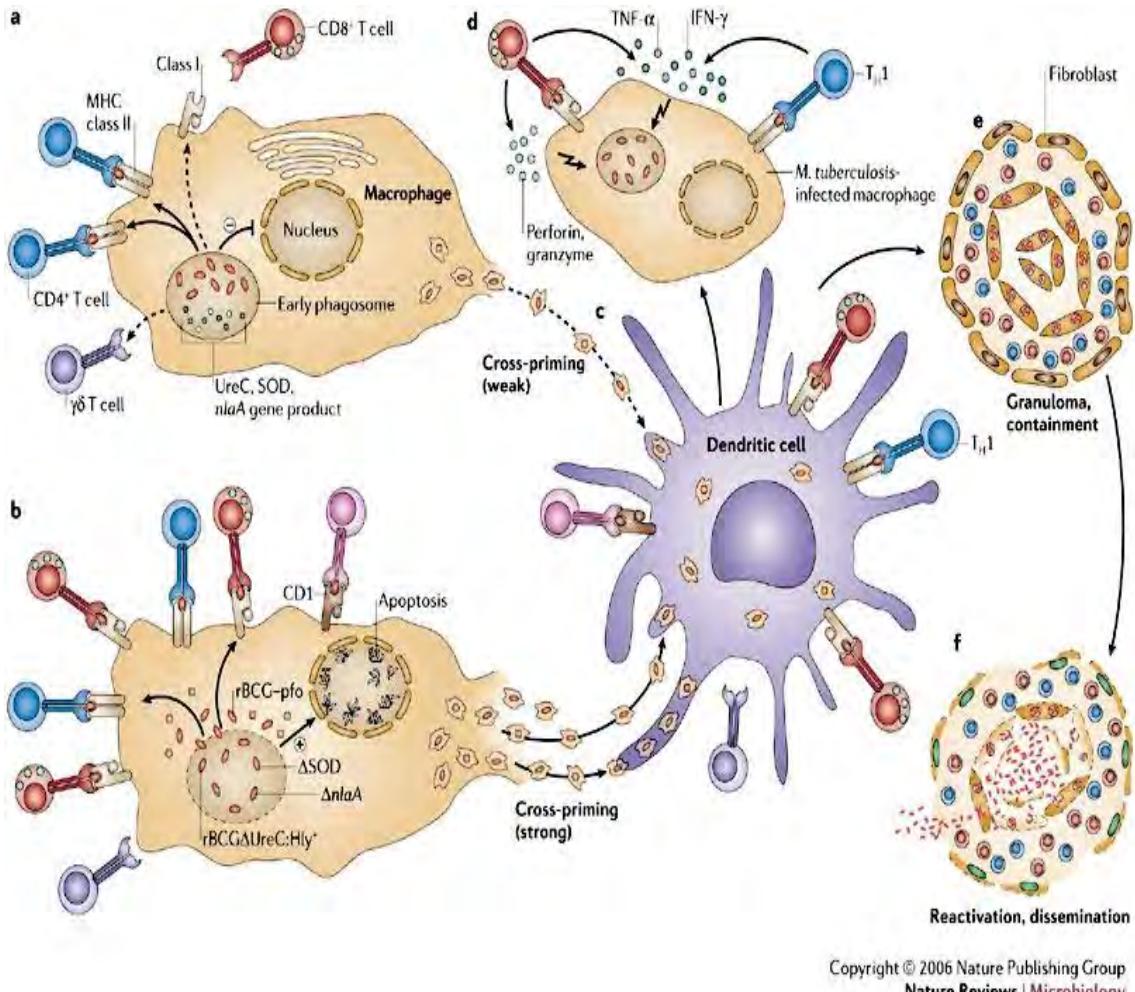


Figure 4 : Rôle des macrophages dans l’immunité adaptative (Adapté) [53].

### III.2.2.2. Le rôle des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> encore appelés T auxiliaires interagissent avec les autres cellules du système immunitaire en amplifiant leur action. Ils sécrètent l’IL-2. Deux voies découlent de leur activation la voie des Th-1 et celle des Th-2.

➤ **Les Th-1** sécrètent de l’interféron- $\gamma$  qui correspond à la cytokine clé de l’individu contre la tuberculose [25]. Beaucoup d’études ont montré le rôle majeur de cette cytokine [47]. Son action pro-inflammatoire a plusieurs effets. Elle agit surtout sur l’activation du macrophage dans la production des dérivés oxydés. L’IFN- $\gamma$  permet l’augmentation de l’expression des molécules de classe II (HLA II), ceci au profit de l’intensification de la présentation des peptides par les macrophages aux cellules T CD4<sup>+</sup> en présence du CD40L [5]. Il a été également montré que les individus présentant un déficit génétique en production d’IFN- $\gamma$ , étaient sujets à des infections systémiques sévères dues à des mycobactéries généralement non pathogènes. L’IFN- $\gamma$  en synergie

avec le TNF- $\alpha$  activent les macrophages en plus, des séries de travaux menés par Flesch et Kaufmann ont montré que l'IFN- $\gamma$  stimulait beaucoup plus la fonction anti-mycobactérienne [19].

➤ **L'action des Th-2 passe par la production d'IL-5, d'IL-4, d'IL-10.**

Ces interleukines jouent également un rôle majeur dans cette affection. L'action des Th-2 assure un contrôle négatif sur les Th-1 et les macrophages. Ce qui permet de limiter l'extension de la lésion granulomateuse et l'élimination du bacille avec une plus grande efficacité.

Les lymphocytes T CD4+ produisent également une lymphotoxine  $\alpha$  (LT $\alpha$ 3) qui participe à l'induction de l'apoptose de la cellule infectée [35].

### **III.2.2.3. Le rôle des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>**

Les cellules T CD8<sup>+</sup> sont capables de produire de l'IFN- $\gamma$  et du TNF- $\alpha$ . [14;47]. En plus, certains d'entre eux sont des cellules T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques, elles agissent directement sur la cellule infectée en sécrétant des granzymes et des perforines tuant ainsi la cellule hôte et les mycobactéries (figure 5). Les cellules T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques peuvent également se lier à la molécule Fas qui est présente à la surface des CPA facilitant ainsi la sécrétion de cytokines (TNF- $\alpha$ ) entraînant ainsi une apoptose cellulaire (figure 5). Selon Pathan et al, les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> mémoires spécifiques de *M. tuberculosis* étaient impliqués dans le contrôle de l'infection chez l'homme [31].

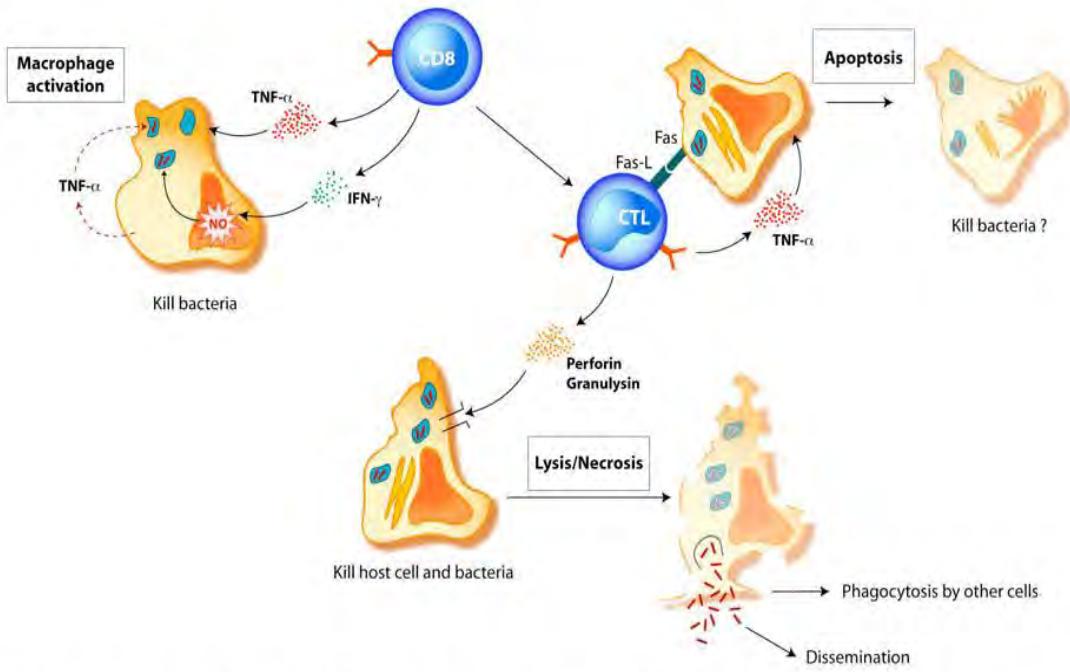


Figure 5 : Rôle des cellules T CD8<sup>+</sup> dans l'immunité adaptative [38].

### III.2.2.4. Le rôle des interleukines (IL)

➤ La principale cytokine de la réponse immunitaire innée jouant un rôle central dans le contrôle de l'infection à *M. tuberculosis* est l'IFN- $\gamma$ . Certaines protéines du *M. tuberculosis* induisent une forte production de cette IL. Parmi ces protéines nous pouvons citer l'HBHA, l'ESAT-6 et le CFP-10

#### III.2.2.4.1 La protéine de surface HBHA

L'interaction de *M. tuberculosis* avec les cellules épithéliales peut être inhibée par des sucres sulfatés tels que l'héparine ou le dextran sulfaté [34]. Par ailleurs, ces sucres sulfatés n'inhibent pas l'interaction de la bactérie avec les macrophages, indiquant ainsi qu'il existe un mécanisme moléculaire propre et spécifique à l'interaction de *M. tuberculosis* avec les cellules autres que les macrophages. Les expériences d'inhibition par les sucres sulfatés suggèrent aussi que les mycobactéries expriment à leur surface des adhésines capables de se lier aux sucres sulfatés. Le BK produit une protéine d'un poids moléculaire d'environ 28 kDa capable de fixer l'héparine. La protéine purifiée est capable d'agglutiner les globules rouges de lapin et cette activité d'hémagglutination peut également être inhibée par la présence de sucres sulfatés. La HBHA est une protéine méthylée et la méthylation s'avère essentielle pour ses propriétés immuno-protectrices. Une forte réponse immunitaire contre la HBHA a en effet

pu être mise en évidence chez les personnes présentant une infection latente par *M. tuberculosis* [33].

Cette réponse est à la fois humorale et cellulaire. Une différence importante a pu être décelée entre les sujets présentant une infection latente et les patients souffrant d'une tuberculose active. Chez les patients tuberculeux, la réponse humorale est forte, alors que la réponse cellulaire, caractérisée par la production d'IFN- $\gamma$  suite à une stimulation *in vitro* de leurs leucocytes périphériques est très faible. En revanche, la réponse cellulaire chez les sujets infectés mais en bonne santé est très importante [19].

La HBHA constitue donc potentiellement un antigène capable de distinguer l'infection latente de la TB active. Pour d'autres antigènes tels que l'ESAT-6, la réponse cellulaire est aussi forte, voire plus forte, chez les patients tuberculeux que chez les sujets infectés non malades. La HBHA présente donc les caractéristiques d'un bon antigène de diagnostic de l'infection latente. Une caractérisation plus approfondie de la réponse immunitaire contre la HBHA au cours de l'infection latente a montré que l'IFN- $\gamma$  en réponse à l'antigène spécifique est produit à la fois par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> [33].

#### **III.2.2.4.2. Les protéines sécrétées ESAT6 et CFP10**

ESAT-6 (Early Secreted Antigenic Target-6) et CFP-10 (10-kDa Culture Filtrate Protein) sont des peptides codés par des gènes (figure 6) de la Région de Différentiation 1 (RD1). Ces antigènes sont présents chez *M. tuberculosis* et *M. bovis* mais absents chez le BCG.

Ces antigènes sont fortement reconnu par les lymphocytes T et provoque une production massive d'IFN- $\gamma$  [49].

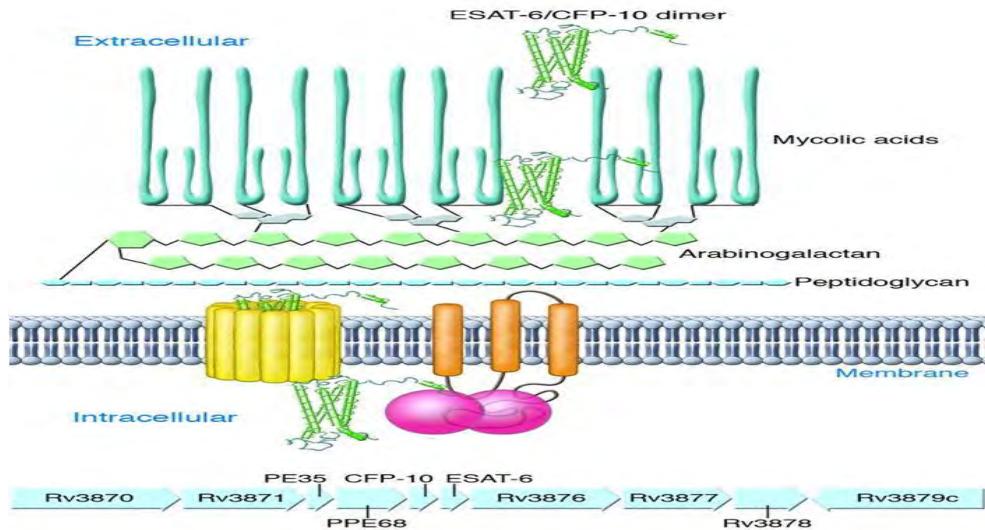


Figure 6: Représentation schématique d'ESAT6 et CFP10 (Adapté) [23].

- Le TNF- $\alpha$  est principalement sécrété par les macrophages et agit sur le phagolysosome.
- L'IL-12 induit la phagocytose du bacille par les macrophages et les cellules dendritiques et contrôle également la sécrétion d'IFN- $\gamma$  par les Th-1.
- L'IL-4 est une cytokine sécrétée par les cellules Th-2 et son rôle dans la tuberculose est controversé. D'après Flynn et al, la présence ou l'absence de cette cytokine ne prédit pas les conséquences cliniques au décours d'une infection à *M. tuberculosis* [35].
- L'IL-10 est une cytokine de l'inflammation qui est sécrétée par les macrophages et surtout par les Th-2. Elle jouerait le même rôle que l'IL-4.
- L'IL-6 est impliquée dans la réponse contre *M. tuberculosis*, dans l'inflammation et la différenciation des lymphocytes.

## IV. Généralités sur les méthodes de diagnostic de la tuberculose

### IV.1. Diagnostic de l'infection tuberculeuse latente

L'IDR et les tests "IGRA" dans le diagnostic de l'infection tuberculeuse, ont le même objectif: détecter un contact avec *M. tuberculosis* en stimulant l'immunité spécifique dirigée contre ce dernier. L'IDR est une réaction immunitaire secondaire *in vivo* locale alors que les IGRA testent la réponse immunitaire secondaire *in vitro* médiée par des lymphocytes sanguins.

#### IV.1.1 L'intradermoréaction à la tuberculine (IDRt)

L'IDRt a représenté pendant environ un siècle le seul test de diagnostic de l'infection tuberculeuse. C'est un test cutané explorant l'hypersensibilité de type IV en réponse à la tuberculine.

Le PPD est constitué d'un mélange d'antigènes de *M. tuberculosis*, *M. bovis* ou BCG et de plusieurs mycobactéries atypiques. Il met donc en évidence la mémoire immunitaire à médiation cellulaire dirigée contre *M. tuberculosis* [17].

Son introduction dans l'organisme permet après présentation des peptides aux lymphocytes T mémoires, une sécrétion de cytokines inflammatoires. Ces molécules sont responsables de l'induration et de l'érythème qui apparaissent au point d'injection.

En effet, c'est une réponse immunitaire secondaire. La réponse immunitaire primaire est initiée dans les organes lymphoïdes secondaires. Elle débute par la reconnaissance d'antigènes associés aux molécules du CMH à la surface des cellules dendritiques par les LT naïfs spécifiques de cet antigène. En réponse à la reconnaissance de l'antigène et grâce aux signaux de co-stimulation, les lymphocytes sont activés et prolifèrent dans les organes lymphoïdes secondaires. Les cellules activées秘tent des cytokines pro-inflammatoires et expriment à leurs surfaces des «*homing receptors*» qui leur permettent de rejoindre le site de l'infection et d'éliminer les antigènes étrangers. Après leurs éliminations, la majeure partie des lymphocytes T est éliminée. Seul un petit nombre de lymphocytes T spécifiques survit. Ils auront une très longue durée de vie, ce sont les LT mémoires.

Deux populations de LT mémoires peuvent être distinguées: Les CM (Central Memory T cell) expriment CD62L et CCR7 et résident dans les organes lymphoïdes. Elles sont capables de proliférer massivement très longtemps après la primo-infection et en l'absence d'antigène résiduel en cas de réintroduction de l'antigène [46].

Les EM (*Effector memory T cell*) n'expriment ni le CD62L ni CCR7 et sont présents dans les organes lymphoïdes secondaires et dans les tissus non lymphoïdes [45]. La population lymphocytaire à l'origine de la réponse immunitaire secondaire dans le cadre de l'IDRt n'a pas été identifiée avec certitude. Des combinaisons de molécules d'adhésion à la surface des EM ont permis de distinguer des sous populations d'EM. Dans le cadre de l'IDRt, le test est réalisé sur une période longue ( $>48H$ ), donc il stimulerait à la fois les EM et les CM (figure 7).

D'un point de vue histologique, la migration cellulaire est bi phasique. Dans un premier temps, les cellules qui migrent vers le point d'injection sont majoritairement des PNNs. Il se développe une inflammation locale avec production de cytokines pro inflammatoires (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , lymphotoxine). Ces facteurs stimulent localement l'expression de molécules d'adhésion (E-selectin, ICAM1, VCAM1) au niveau de l'endothélium et une augmentation de la perméabilité vasculaire. Les molécules d'adhésion permettent dans un deuxième temps, l'afflux de monocytes, macrophages et lymphocytes depuis la circulation sanguine [52].

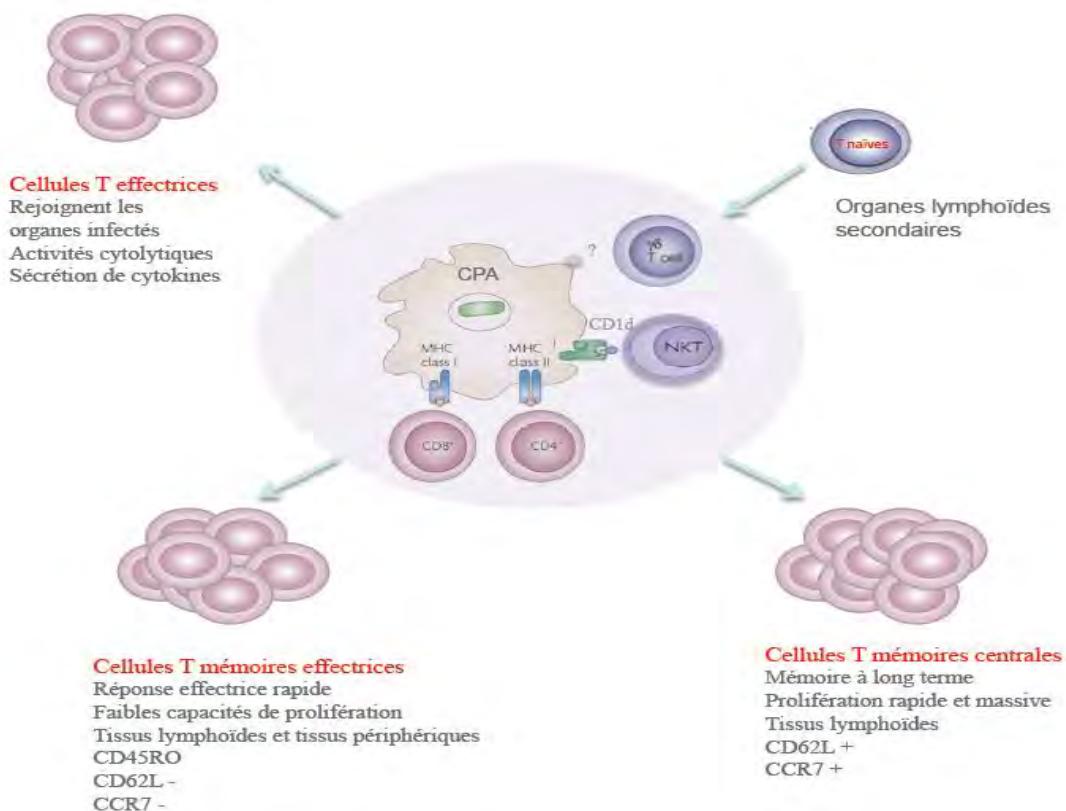


Figure 7 : Diversité fonctionnelle des LT et des cellules mémoires (Adapté) [24].

#### IV.1.1.1. Principe Technique de l'IDR de Mantoux

Il consiste à injecter 0,1ml de tuberculine à la face antérieur de l'avant bras (figure 8). Le développement de l'induration est lent (hypersensibilité retardée, elle prend 48 à 72 heures). Cette induration est liée à l'infiltration de la peau par les macrophages et les LT. Le résultat est lu par mesure du diamètre d'induration (en mm) selon le plus grand diamètre au point d'injection à la 72<sup>ème</sup> heure après l'inoculation. La rougeur n'est pas prise en compte. La positivité de l'IDR témoigne d'un contact avec le bacille tuberculeux ou une vaccination par le BCG. Cependant le test tuberculinique est de très faible spécificité dans une population avec une grande couverture vaccinale par le BCG ou exposée aux mycobactéries atypiques [3].

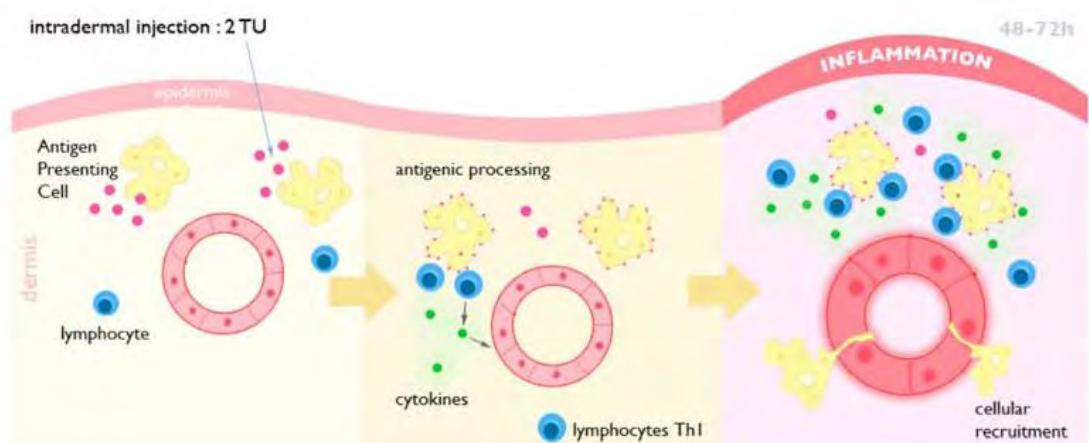
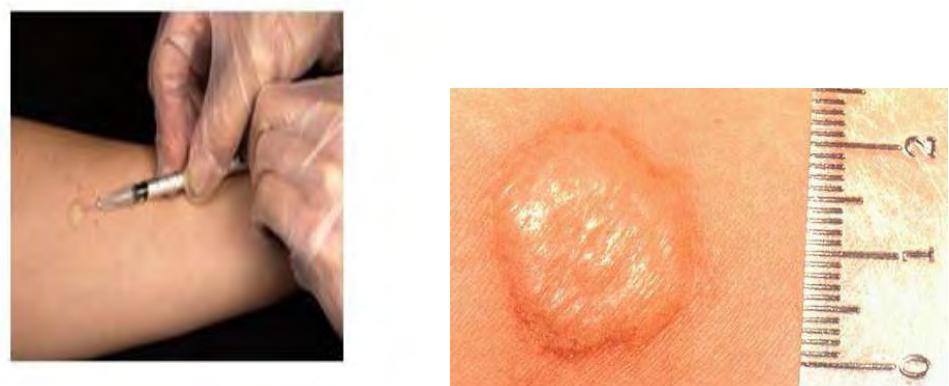


Figure 8 : Inoculation de la tuberculine par voie intradermique à la face antérieure de l'avant bras (Adapté) [22].

#### IV.1.1.2. Lecture et interprétation des résultats

L'induration qui s'est développée autour du point d'injection est mesurée transversalement par rapport au sens de l'injection. Les limites de l'induration sont déterminées par palpation et mesurées en millimètres (mm) à l'aide d'une règle graduée [46].

Le diamètre de l'induration peut varier de 0 à 30 mm. Une réaction fortement positive avec présence d'une vésicule est dite phlycténulaire.

L'interprétation de ce test repose sur la taille de l'induration et exige une grande prudence pour éviter les erreurs par excès ou par défaut.

Une immunodépression telle que le SIDA, peut donner des réactions faussement négatives. A l'inverse, certaines mycobactéries atypiques, la vaccination au BCG positivent l'IDRt.

Tableau I: Interprétation de l'IDR [12].

Diamètre de l'induration	$\emptyset < 5 \text{ mm}$	$5 \leq \emptyset \leq 10 \text{ mm}$	$\emptyset > 10 \text{ mm}$
Type	Palpable	Palpable	Palpable avec phlyctène
Interprétation	Négative	BCG ancien ou infection à mycobactérie atypique	BCG récent ou tuberculose

#### IV.1.2. les Tests “Interferon Gamma Release Assays” IGRA

Elle repose sur la détection de cellules T effectrices qui秘ètent de l'IFN- $\gamma$  en réponse à la stimulation par les antigènes du *M. tuberculosis*. Ces tests ont été mis sur le marché grâce à l'identification du segment génomique RD1 [2] qui est présent sur le complexe tuberculosis mais absent sur le vaccin BCG et les mycobactéries atypiques [16]. Il s'agit de tests *in vitro* mesurant par ELISA (QuantiFERON-TB<sup>®</sup> in tube, Cellestis Ltd) ou par ELISpot (T-SPOT TB<sup>®</sup>, Oxford Immunotec) (figure 9), l'IFN- $\gamma$  produit par les lymphocytes T d'une personne précédemment exposée à la TB lorsqu'ils sont mis en contact avec des antigènes de *M. tuberculosis* [7]. Certains antigènes du *M. tuberculosis* comme le CFP-10 et ESAT-6 sont spécifiques car, à l'exception de *M. kansaii*, *M. szulgai*, et *M. marinum* qui sont rarement responsables d'infections humaines, ne sont pas retrouvés ni au niveau du BCG ni chez les

mycobactéries atypiques. Avec ces tests, le risque de rendre des résultats faussement positifs à la suite d'une vaccination ou à l'exposition à une mycobactérie non tuberculeuse seront largement diminué. De plus, les antigènes n'étant pas administrés au patient, l'analyse peut être répétée sans crainte d'un effet d'immunisation passive.

Par ailleurs, trois éléments essentiels doivent être rappelés et mis en mémoire:

- Il n'existe pas de *gold-standard* de la tuberculose-infection, donc aucun outil diagnostique de référence contre lequel ces tests peuvent être étalonnés.
- En cas de positivité, ils ne sont en aucun cas des indicateurs de protection ou d'évolution vers la tuberculose-maladie.
- Ils ne différencient pas, en cas de positivité la tuberculose-maladie de la tuberculose-infection. Seule l'exclusion, ou la mise en évidence de signes cliniques permettront de faire la différence entre les deux états cliniques.

### ➤ Le QTF-IT

Ce test utilise le sang périphérique veineux du patient. Le sang est incubé à 37°C pendant 16 à 24h. L'IFN- $\gamma$  est ensuite dosé par méthode ELISA sur le plasma surnageant dans les tubes.

#### • Principe du test

Le sang est recueilli dans trois tubes héparines. Le premier est un tube contrôle négatif (tube NIL). Il permet de s'affranchir des sécrétions non spécifiques d'IFN- $\gamma$ . Le second contient les antigènes spécifiques de *M. tuberculosis* (ESAT6, CFP10, TB7.7). Il permet de mettre en contact les antigènes de *M. tuberculosis* et les LT du patient ou tube antigène. Le troisième est le contrôle positif contenant de la phytohemagglutine (PHA) ou tube MIT. La PHA est un activateur non spécifique des LT qui permet de contrôler la capacité des LT à secréter de l'IFN- $\gamma$ . Après prélèvement, les tubes doivent être placés le plus rapidement possible à l'étuve (37,5°C), au plus tard dans les 16h, selon les recommandations du fabricant. Après de 16 à 24h d'incubation à l'étuve, les tubes sont centrifugés.

La quantité d'IFN- $\gamma$  présente dans le plasma ainsi obtenue est dosée par ELISA. La densité optique (DO) obtenue est convertie en unité internationale (UI) grâce à une courbe d'étalonnage effectuée en parallèle.

- **Interprétation**

Un test est considéré comme positif si la quantité d'IFN- $\gamma$  présente dans le plasma du tube Ag est significativement supérieure à la quantité d'IFN- $\gamma$  présente dans le plasma du tube Nil et si le test est valide. Deux conditions sont nécessaires pour qu'un test soit considéré comme valide. D'abord le contrôle positif doit être supérieur à une valeur seuil ( $>0,5\text{UI/mL}$ ). Une réponse diminuée du tube MIT peut être due à une lymphopénie, à une anergie des lymphocytes due à la manipulation de l'échantillon, à un mauvais remplissage des tubes, ou encore à l'incapacité des LT à secréter de l'IFN- $\gamma$ . L'algorithme d'interprétation est rappelé dans le tableau ci-dessous (Tableau II).

Tableau II: Interprétation du **QTF-IT**

NIL (UI/L)	TB Ag-NIL (UI/L)	Mito (UI/L)	QTF-IT	Rapport/interprétation
<ou=8,0	>0,35 et >25% de NIL	tous	Positif	Infection à MTB probable
<ou=8,0	<0,35	>0,5	négatif	infection à MTB improbable
<ou=8,0	>0,35 et <25% de NIL	>0,5	négatif	infection à MTB improbable
<ou=8,0	<0,35	<0,5	indéterminé	Les résultats de la réponse des TB Ag sont IND
<ou=8,0	>0,35 et <25% de NIL	<0,5	indéterminé	Les résultats de la réponse des TB Ag sont IND
>8,0	Tous	tous	indéterminé	Les résultats de la réponse des TB Ag sont IND

➤ **La technique Elispot-TB ou (le test T-SPOT. TB<sup>®</sup>)**

Cette technique est basée sur l'utilisation des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) qui seront mises en contact *in vitro* avec les antigènes du BK [28].

Elle permet de détecter et d'enumérer les cellules lymphocytaires capables de produire de l'IFN- $\gamma$  (figure 9) en réponse à cette stimulation antigénique *in vitro* [28]. Elle permet un dépistage de la tuberculose latente et s'avère positif en cas de tuberculose active.

L'utilisation d'antigènes spécifiques de *M. tuberculosis* ESAT-6, TB7.7 et CFP-10 améliore la spécificité de la méthode en réduisant les réactions croisées avec le BCG et les autres mycobactéries. Cette méthode utilisant les peptides spécifiques ESAT-6 est approuvée par le FDA (Us Food and Drug Administration) en 2008.

**T-SPOT.TB®**  
(Oxfordimmunotech)

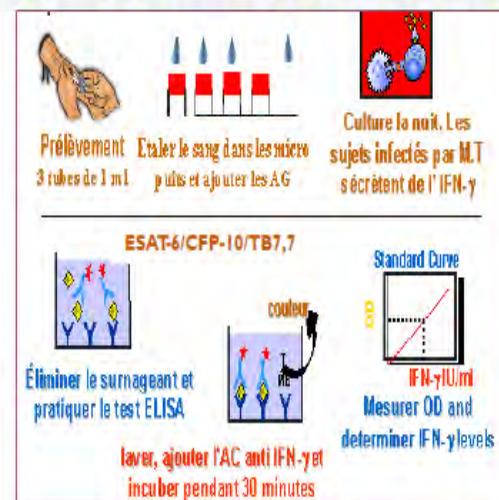
**QUANTIFERON -TB Gold IT**  
(QIAGEN)

### Etape commune : Temps d'incubation 16-24 heures

Seules les CT effectrices activées par un contact récent vont sécréter IFN- $\gamma$

Temps + long : Libération d'IFN- $\gamma$  par les cellules T mémoires (ancienne tuberculose maladie ou latente ?) - (TCT : stimulation de 72 heures )

**3 Tubes : témoin négatif, témoin positif (mitogène PHA), tube avec Ag**



**Nb de LT sécrétant l'IFN  $\gamma$  (SFC/10<sup>6</sup>)**  
Seuil 6 SFC  
Résultats qualitatif : + / - / ?

**Dosage de l'IFN  $\gamma$  (UI/ml)**  
seuil 0,35 UI/ml  
Résultats qualitatif : + / - / ?

Figure 9 : IGRA QFT-IT et T-SPOT.TB®(Adapté) [53].

## **IV.2. Diagnostic de la tuberculose active**

Le diagnostic de la tuberculose repose essentiellement sur les données de l'examen clinique, radiologique et surtout bactériologique.

### **IV.2.1. Examens cliniques**

Ils sont souvent pauvres et non spécifiques. Ils ont pour but de préciser le degré évolutif de la maladie. Généralement, il n'existe aucun parallélisme entre les lésions anatomiques et la symptomatologie clinique.

S'il s'agit d'une tuberculose pulmonaire, le tableau clinique est celui d'une maladie respiratoire aiguë. L'interrogatoire recherche l'absence de vaccination, la notion de réaction tuberculinique positive.

### **IV.2.2. Examens radiologiques**

La radiographie permet de distinguer la tuberculose maladie de la primo- infection tuberculeuse.

### **IV.2.3. Diagnostic bactériologique**

#### **➤ Examen microscopique des crachats**

L'examen permet d'identifier de manière rapide et fiable chez les patients atteints de tuberculose pulmonaire si la charge bacillaire est supérieure à 5000 bacilles/ml de crachat. Sa sensibilité est donc faible. De plus il n'est pas possible de distinguer *M. tuberculosis* des mycobactéries non tuberculeuses en raison du manque de spécificité de l'examen. Toutefois dans les zones où la prévalence de la TB est élevée, il est très probable qu'un frottis positifs soit dû *M. tuberculosis*

- La mise en culture sur milieux spécifiques**
- L'indentification par méthode moléculaire ou biochimique des bacilles obtenus en culture**
- Les tests de sensibilités aux antituberculeux.**

### **IV.2.4 Les nouvelles méthodes de diagnostic**

Il s'agit de méthodes beaucoup plus spécifiques

- Réaction d'amplification génique par PCR en temps réel (test Xpert MTB/RIF)**
- Line Probe Assay : deux tests sont disponibles sur le marché**
  - les tests Hain GenoType® MTBDRplus et GenoType® MTBDRs (Hain lifescience GmbH, Nehren, Allemagne)

- Le test INNO-LIPA Rif-TB® (Innogenetic, Belegique)
- La technique MGIT ("Mycobacterium Growth Indicator Tube")
- La technique BATEC : elle a l'inconvénient d'utiliser des produits radioactifs.

#### **IV.2.5. Méthodes de mesure de l'IFN- $\gamma$ secrété après activation lymphocytaire**

- La technique ELISPOT-TB
- Technique QFT-IT

## **I. Méthodologie**

### **I.1 Cadre de l'étude**

Cette étude a été réalisée à l'unité d'immunologie du Laboratoire de Bactériologie-Virologie du CHNU Aristide Le Dantec de Dakar. Les prélèvements ont été effectués au service de Pneumophysiologie du CHNU de Fann de Dakar.

### **I.2 Population de l'étude**

Dans cette étude, nous avons enrôlé 59 volontaires ayant lu et signé le consentement éclairé. Ces derniers étaient répartis en 4 groupes:

- Groupe 1 : Témoin (n=6)
- Groupe 2 : Tuberculeux latents (n=23)
- Groupe 3 : Sujets IDRt positif / QFT-IT négatif (n=21)
- Groupe 4 : Tuberculeux actifs (n=9)

Dans cette population d'étude, 41 étaient des étudiants répartis comme suit :

- ✓ 29 issus de la FACULTE de MEDECINE, de PHARMACIE et d'ODONTOLOGIE FMPO (FMPO) (6<sup>ème</sup> et 7<sup>ème</sup> année ayant fait un stage au niveau du service de Pneumophysiologie, ce qui implique une supposée exposition à une infection tuberculeuse latente) et
- ✓ 12 issus de la FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES (FST) (master et doctorant).

### **I.3. Matériel et méthodes**

#### **I.3.1. Matériel**

- Poste de Biosécurité II (hotte) : Hotte à flux laminaire
- Centrifugeuse réfrigérée
- Microscope optique
- Mixeur, Vortex
- Chronomètre digital
- Pipette multi-distributeurs
- Pipette Aide
- Bain-marie
- Etuve à CO<sub>2</sub> (37°C + 5% CO<sub>2</sub>)
- Réfrigérateur 2-8°C
- Congélateur -20°C

- Congélateur -80°C
- Vortex
- Pompe à vide
- Filtres (mailles de 0,20 µm de diamètre)
- Cellules hématocytométriques de type Neubauer
- Plaques ELISA maxisorp®
- Lecteur de plaques ELISA (BIORAD)
- Pipettes multicanaux (8 et 12 canaux)
- Micropipettes (20 µl, 50 µl et 1000 µl)
- Pipettes Pasteur (5 ml et 10 ml) stériles
- Pipettes de transfert stériles
- Tubes Falcon stériles (15 ml et 50 ml)
- Tubes Nunc stériles
- Embouts stériles (20 µl, 50 µl, 200 µl et 1000 µl)
- Tubes Eppendorf stériles
- Portoir pour tubes Eppendorf
- Sacs et boîtes à déchets, et gants
- Film autocollant
- Ciseaux
- Tubes QFT-IT qui sont au nombre de trois : TB-Ag, Mitogène et Nil
- Incubateur à 37°C + CO<sub>2</sub>
- Micropipettes ajustables
- Pipettes sérologiques graduées

### 1.3.2. Réactifs

- Eau distillée stérile
- RPMI-1640 With suppl
- Sérum de Veau Fœtal (FCS)
- Solution saline tampon phosphate (PBS)
- Human IFN-γ ELISA kit (CYTOSET)
- Solution de Substrat (TMB)
- Antigènes (HBHA, ESAT-6, SEB,)
- Ficoll
- (Pénicilline/Streptomycine)

- Bleu Trypan
- PBS BSA 1%
- Kit Quantiferon-TB® Gold IT Cellestis
  - Standard : IFN- $\gamma$  Standard Humain, lyophilisé
  - Diluant vert (Green Diluent, GD)
  - Conjugué concentré 100X, lyophilisé
  - Tampon de lavage concentré 20X
  - Solution substrat
  - Solution stop
  - Microplaques de 96 puits (12 barrettes détachables)
  - H<sub>2</sub>O distillée stérile

### I.3.3 Procédures de l'étude

Huit millilitres de sang ont été recueillis sur tube hépariné pour la séparation cellulaire. Les cellules mononucléées du sang périphérique ou PBMC (“Peripheral Blood Mononuclear Cells”) ont été isolées par gradient de centrifugation à 1000 g pendant 10 mn en utilisant le Ficoll-Hystopaque® (Pharmacia). Un million ( $10^6$ ) de cellules ont été resuspendues dans 500 $\mu$ l de milieu de culture cellulaire et incubées pendant 24h avec de 5  $\mu$ g/ml d’IL-7 dans chacun des trois tubes : 2 $\mu$ g/ml pour la stimulation par HBHA, 5 $\mu$ g/ml de SEB comme contrôle positif et un tube médium. Les tubes sont ensuite centrifugés afin de collecter le surnageant pour la détection *in vitro* de la production d’IFN- $\gamma$  dans la tuberculose latente. Le reste des surnageants a été conservé à -70°C pour étudier d’autres biomarqueurs liés à la TB, comme le TNF- $\alpha$  ou l’IP-10.

Des prélèvements de 1 ml dans chacun des 3 tubes du kit du QFT-IT ainsi que l’IDRt ont été réalisés pour chaque volontaire pour la détermination d’une probable infection tuberculeuse.

### I.3.4. IGRA basé sur la stimulation par l’HBHA

#### I.3.4.1. Principe

Son principe repose sur la détection des cellules T effectrices qui sécrètent IFN- $\gamma$  en réponse à la stimulation par les antigènes spécifiques du *M. tuberculosis* par la technique ELISA. En effet, des PBMC sont déposées dans des puits de microtitrage (Maxisorp®) tapissés d’une membrane de nitrocellulose sensibilisée au préalable par un anticorps anti-IFN $\gamma$  (anticorps de capture) (figure 10). L’antigène spécifique du *M. tuberculosis* (HBHA) et un

mitogène servant de contrôle positif (SEB) sont incubés avec les PBMC pour permettre la stimulation des cellules T activées. L'IFN $\gamma$  sécrété est capturé par l'anticorps fixé à la membrane ; les cellules et les autres produits indésirables sont éliminés par lavage.

Un second anticorps, conjugué à la phosphatase alcaline et dirigé contre un épitope différent de la molécule d'IFN $\gamma$  est ajouté. Ce dernier se lie à l'IFN- $\gamma$  pris en sandwich à la surface du puits. Tout conjugué non lié est éliminé par lavage. Un substrat soluble est ensuite ajouté dans chaque puits ; ce substrat est clivé par l'enzyme pour former un produit coloré insoluble dont l'intensité est proportionnelle à la concentration d'IFN- $\gamma$  dans l'échantillon.

#### I.3.4.2. Protocole technique

##### ➤ Séparation des cellules pour stimulation par HBHA

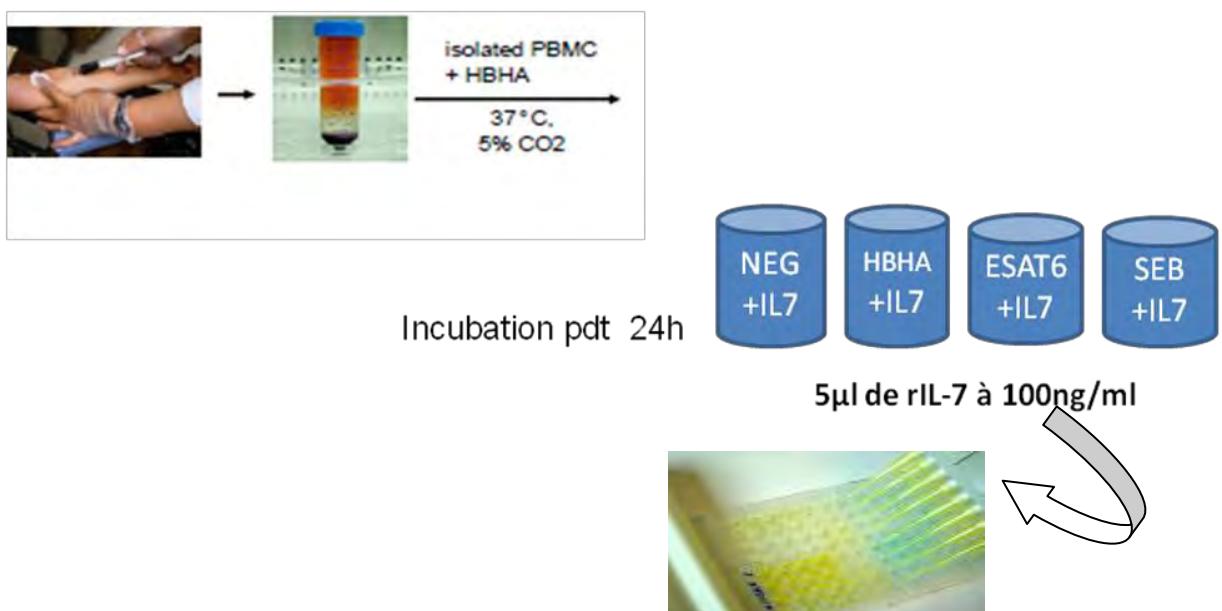


Figure 10 : Procédure de séparation cellulaire et la stimulation pour ELISA

##### ➤ Mesure de l'IFN $\gamma$ (kit human IFN- $\gamma$ Cytoset) par ELISA

###### ✓ 1<sup>ère</sup> étape : 2<sup>ème</sup> jour

La plaque est sensibilisée par l'Ac de capture dans du PBS 1x stérile (100µl/puits) puis couverte hermétiquement par une feuille adhésive et incubée « overnight » à 4°C dans une boîte humide (fond d'eau).

✓ **2<sup>ème</sup> étape : 3<sup>ème</sup> jour**

- Sortir la plaque et la laver 3x avec 200µl PBS/Tween20 0,05% puis vider complètement les puits, ensuite distribuer 200µl/puits de PBS/Tween20 0,05%/ (BSA) 2%. Couvrir hermétiquement la plaque avec une feuille adhésive et agiter pendant 1 mn.
- Incuber 1h (minimum) à température ambiante
- Laver 3fois avec 200µl PBS/Tween20 0,05% et vider complètement les puits

✓ **3<sup>ème</sup> étape : Mesure des échantillons:**

- Distribuer 50µl d'Ac détection à 0,4µg/ml puis préparer les 8 standards
- Ensuite distribuer 100µl des standards en duplicata,
- Puis distribuer 100µl d'échantillon pur (non-dilué) ou dilué 10x (90µl RPMI full + 10µl échantillon)
  - Rapporter la répartition des patients sur la feuille ELISA
- Couvrir hermétiquement (feuille adhésive), agiter 5min et incuber pendant 2h à température ambiante.
- Agiter 5min à la moitié du temps d'incubation
- Après lavage, ajouter 100µl de conjugué streptavidin 0,16µg/ml, puis couvrir hermétiquement et encore incuber 30min avec agitation
- Laver 5x, vider complètement les puits et distribuer 100µl de solution substrat dans chaque puits puis incuber pendant 15-20min dans l'obscurité. Cette étape correspond à la phase colorimétrique se manifestant par une coloration bleue de la solution présente dans les puits.
- Après incubation, 50µl de solution stop sont ajoutées dans chaque puits entraînant un virement de la coloration bleue en jaune pour les tests positifs.
- La lecture bichromatique de la plaque se fait par un lecteur de plaques (à 450nm avec un filtre de référence 630nm) qui détermine la densité optique (DO) pour chaque puits (figure 11).



Figure 11: Lecteur de plaque

➤ **Interprétation des résultats**

Après lecture, les DO obtenues sont introduites dans le Template Excel «Template d'obtention des résultats ELISA pour la stimulation par l'HBHA» qui assure un contrôle de qualité de l'analyse, génère une courbe de standard et fourni un résultat pour chaque patients (des concentrations). Les résultats sont qualitatifs et sont donnés en termes de «positif» ou «négatif».

**I.3.5. QUANTIFERON- TB® GOLD IN TUBE**

✓ **Echantillonnage**

1. Prélever 1ml de sang frais dans chaque tube mitogène, NIL, Ag de TB (ESAT-6, CFP-10, TB7.7).
2. Agiter vigoureusement les tubes 10 fois pour bien mettre en contact le sang avec les antigènes présents sur la paroi des tubes.
3. Incuber les tubes à 37°C pendant 16 à 24 heures.

✓ **Traitements de l'échantillon**

1. Le jour suivant, centrifuger les tubes pendant 15 minutes à 3000 trs/mn
2. Dans des cryotubes, récupérer le plasma pour la quantification de l'IFN- $\gamma$  par la technique ELISA. Sur chaque cryotube, mettre l'identifiant du patient, tube d'origine (TB-Ag, MIT, NIL) et la date.

**3. Stocker les aliquote à -80°C jusqu"à l"utilisation pour la quantification de l'IFN- $\gamma$**

✓ **Test Quantiféron-TB® Gold**

Mettre les réactifs à la température ambiante pendant 60 mn (sauf le conjugué)

▪ **Préparation du conjugué 1X**

La préparation du conjugué une fois concentré se fait en diluant 100 fois la quantité requise de conjugué concentré 100X dans du diluant vert. Le volume de conjugué dilué dépend du nombre de barrettes sur lesquelles s"effectuera le test.

Tableau III : Préparation du conjugué pour QFT-IT

<b>Nombre de barrettes</b>	<b>Volume de conjugué</b>	<b>Volume de diluant vert</b>
2	10 µl	1,0 ml
3	15 µl	1,5 ml
4	20 µl	2,0 ml
5	25 µl	2,5 ml
6	30 µl	3,0 ml
7	35 µl	3,5 ml
8	40 µl	4,0 ml
9	45 µl	4,5 ml
10	50 µl	5,0 ml
11	55 µl	5,5 ml
12	60 µl	6,0 ml

▪ **Préparation des standards S1, S2, S3, S4**

1. Etiquetter 4 tubes, S1, S2, S3 et S4.
2. Ajouter 150 µl de GD (diluent vert) dans chaque tube.

3. Ajouter 150  $\mu$ l de standard (8 UI/ml) dans le tube S1, vortexer.
4. Prélever 50  $\mu$ l de S1 qu'on ajoute dans S2, vortexer.
5. Prélever 50  $\mu$ l de S2 qu'on ajoute dans S3, vortexer.

**Remarque :** Ainsi, on a une dilution à la  $\frac{1}{2}$  pour S1, au  $\frac{1}{4}$  pour S2, au 1/8 pour S3 et pour le S4 le GD fait fonction de standard zéro.

#### ▪ Test ELISA

1. Etablir un plan de distribution des échantillons (tableau VII).
2. Ajouter 50  $\mu$ l de conjugué 1X dans chaque puits à l'aide d'une pipette multicanaux.
3. Ajouter 50  $\mu$ l de standard (de S1 à S4) dans les puits correspondants et 50  $\mu$ l de plasma pour chaque échantillon.

**Remarque :** Les standards sont testés en double et pour chaque patient on utilise trois puits, 1 puit pour le tube NIL, 1 puit pour le tube TB-Ag et 1 puit pour le tube Mitogène.

4. Agiter la plaque pendant 60 secondes.
5. Recouvrir avec du papier aluminium et incuber à l'obscurité pendant 2 heures.
6. Laver la plaque six fois avec 400  $\mu$ l de solution de lavage concentrée 1X par puits et un trempage de 3 minutes au troisième lavage.
7. Essorer la plaque et ajouter 100  $\mu$ l de solution substrat d'enzyme dans chaque puits.
8. Recouvrir avec du papier aluminium et incuber à l'obscurité pendant 30 minutes.
9. Ajoute 50  $\mu$ l/puits de solution stop.
10. Lire la plaque avec le lecteur ELISA (à 450 nm avec un filtre de référence de 630 nm).
11. Les résultats donnés en DO sont introduits dans le logiciel d'analyse Quantiféron-TB Gold qui assure un contrôle de qualité de l'analyse, génère une courbe de standard et fournit un résultat de test pour chaque patient. Les résultats sont qualitatifs et sont donnés en termes de positif, négatif ou indéterminé.

#### I.3.6. Analyse des données

L'analyse des données a été effectuée à l'aide des logiciels GraphPad Prism® version 5.0.1 et du SPSS version 16.0. Les différences entre les groupes ont été déterminées par les tests non paramétriques Mann-Whitney U ou Kruskal Wallis H. Les différences entre deux variables, au sein d'un même groupe, ont été analysées par le test de Chi-Square. Les résultats ont été considérés comme statistiquement significatifs pour des valeurs de  $p < 0,05$ .

## II. RÉSULTATS

### II.1. Caractéristiques démographiques et immunologiques de la population d'étude

Les caractéristiques des participants de l'étude sont illustrées dans les (tableaux IV et V). Parmi les 59 volontaires enrôlés, 23 présentaient une tuberculeuse latente, et 9 étaient atteints de tuberculose active. Les hommes représentent 72% ; la moyenne d'âge était de 25 ans. La médiane d'âge était de 25 ans pour les contrôles, 24 ans pour les patients tuberculeux latents et 41 ans ; et pour les patients tuberculeux actifs. Aucune différence statistiquement significative selon le sexe entre les différents groupes ( $p = 0,146$ ) n'a été retrouvée.

Le statut sérologique des patients qui faisait partie des examens de routine était documenté sur les bulletins d'information fournis par le clinicien et aucun des sujets n'a été diagnostiqué VIH positif.

La vaccination BCG chez les patients tuberculeux actifs et chez les contrôles était de 100%. Par contre elle était de 82,7% chez les volontaires tuberculeux latents et 81,9% chez les discordants.

La technique QFT-IT a été utilisée pour la détermination de la tuberculose latente. Par contre 22 de ces volontaires avaient une réponse positive à l'IDRt mais négative au QFT. La méthode de détection de la production de l'IFN- $\gamma$  par la méthode HBHA a révélé que 33,33% de ces volontaires qui avaient une discordance entre les réponses IDRt et QFT-IT étaient positives à l'HBHA.

Tableau IV: Caractéristiques démographiques et immunologiques de la population d'étude.

<i>Caractéristiques</i>	<i>Témoins</i>	<i>TB latents</i>	<i>Sujets IDR+</i>	<i>TB active</i>	<i>P</i>
<b>Age années, médiane (IQR)</b>	(n = 6) 25 (23-26)	(n = 23) 24 (25-26)	(n = 21) 25 (24-26)	(n = 9) 41 (33-53)	<b>0,002</b>
<b>Sexe (% homme)</b>	66,6	69,6	59,1	100	0,146
<b>Vaccination BCG N (%)</b>	6 (100)	19 (82,7)	18 (81,9)	9 (100)	0,396
<b>Réponse IDRt positive N(%)</b>	0 (0)	23 (100)	<b>21 (100)</b>	8(88,9)	<b>0,002</b>
<b>Réponse QFT positive N(%)</b>	0 (0)	23 (100)	<b>0 (0)</b>	7 (77,8)	<b>0,008</b>
<b>Réponse HBHA positive N(%)</b>	0 (0)	23 (100)	<b>7 (33,33)</b>	5 (55,55)	<0,001

Tableau V : Caractéristiques démographiques et immunologiques des étudiants de la FST (master) comparés aux étudiants de la FMPO (6<sup>ème</sup> et 7<sup>ème</sup> année de médecine)

Caractéristiques	Témoins (n = 6)	FST (n = 12)	FM (n = 29)	P
Age années, médiane (min-max)	25 (23-26)	24 (25-26)	25 (24-27)	0,702
Sexe (% homme)	66,6	58,3	66,6	0,702
Vaccination BCG N (%)	6 (100)	11 (91,7)	24 (82,8)	0,496
Réponse IDRT positive N(%)	0 (0)	12 (100)	29 (100)	0,000
Réponse QFT positive N(%)	0 (0)	7 (58,3)	16 (55,1)	0,039
Réponse HBHA positive N(%)	0 (0)	8 (66,6)	18 (62,1)	0,015

## II.2. Production de l'IFN- $\gamma$ après stimulation par le test HBHA

Le test HBHA utilise 3 conditions de stimulation dont les réponses (production globale d'IFN- $\gamma$ ) sont illustrées sur la figure 12. Le contrôle positif SEB et un contrôle négatif sont utilisés pour valider le test.

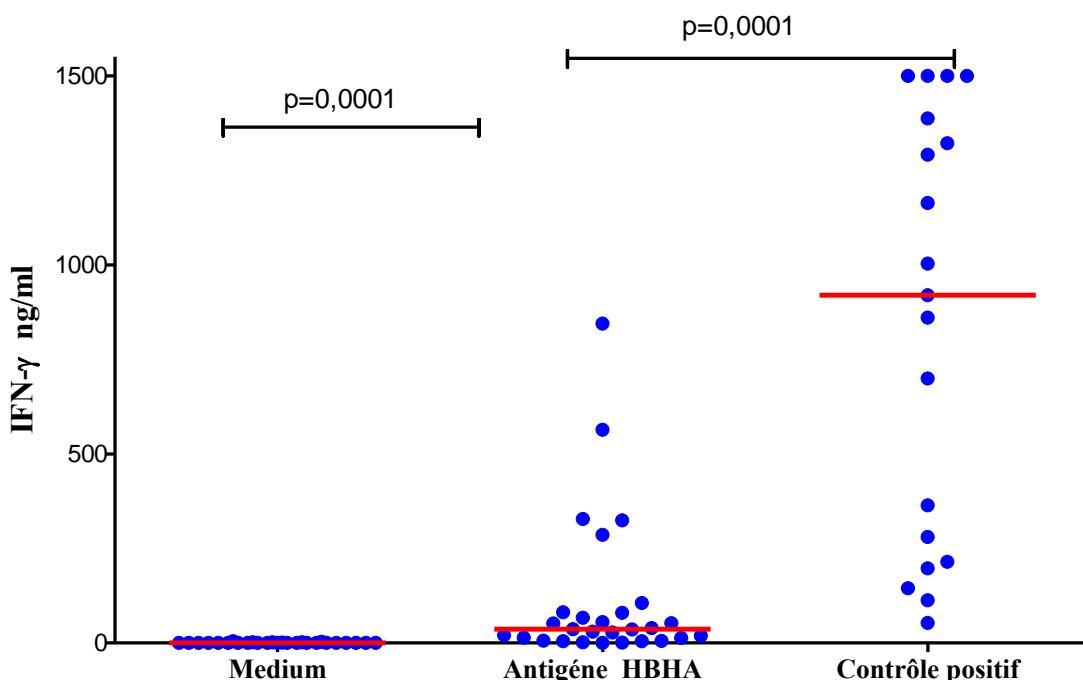


Figure 12: Production de l'IFN- $\gamma$  en réponse à une stimulation par l'HBHA.

Nos résultats montrent en effet des valeurs faibles ou nulles pour le contrôle négatif par rapport à la réponse HBHA ( $P < 0,0001$ ). Le SEB quant à lui a montré des réponses nettement plus fortes ( $P < 0,0001$ ).

### **II.3. Comparaison de la production d'IFN- $\gamma$ après stimulation par l'HBHA dans les différents groupes**

La production d'IFN- $\gamma$  en réponse à une stimulation par l'HBHA a montré des réponses variables selon le statut tuberculeux des patients (figure 13).

Les patients tuberculeux latents présentaient des niveaux de production significativement plus élevés d'IFN- $\gamma$  suite à une stimulation avec l'HBHA comparés aux patients tuberculeux actifs ( $p = 0,002$ ).

Les sujets témoins montraient des niveaux plus faibles d'IFN- $\gamma$  que les patients tuberculeux actifs bien que la différence ne soit statistiquement significative ( $p = 0,30$ ).

Par contre, les niveaux de production de l'IFN- $\gamma$  étaient statistiquement plus élevé chez les sujets ayant une IDRt positive et un QFT-IT négatif, comparé au groupe des tuberculeux latents ( $p = 0,007$ ).

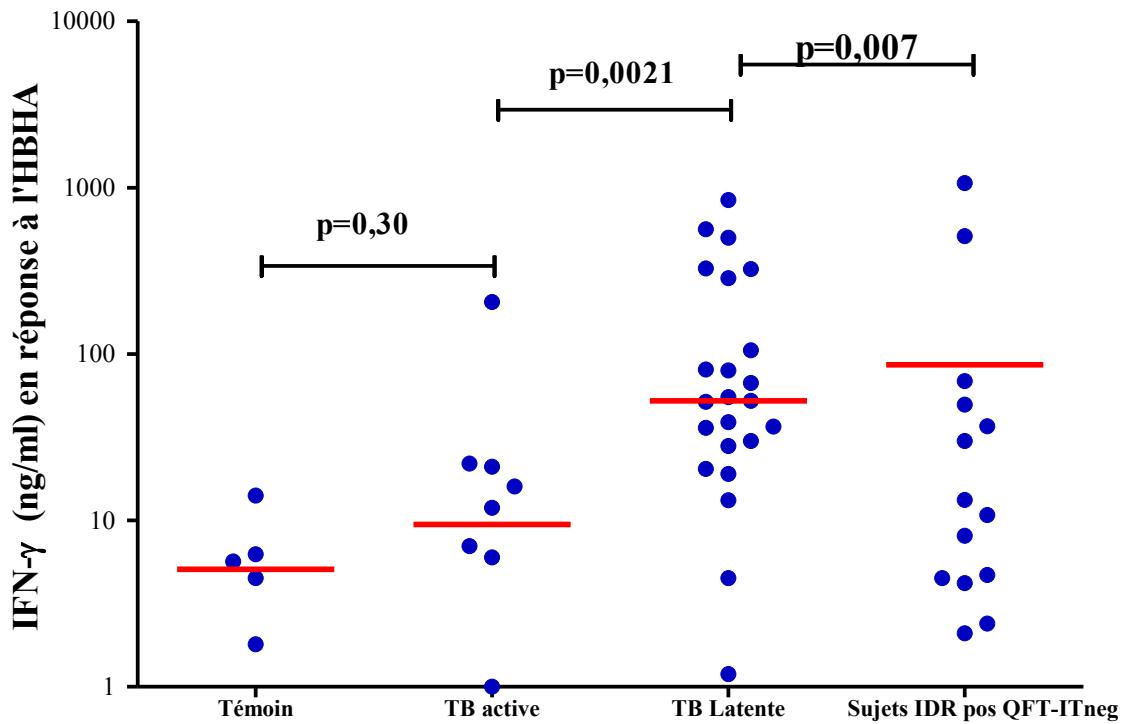


Figure 13: Production de l'IFN- $\gamma$  en réponse à la stimulation par HBHA dans les différents groupes.

#### II.4. Comparaison de la sécrétion d'IFN- $\gamma$ en réponse à l'HBHA chez les sujets IDRt positive/QFT négatif

La production d'IFN- $\gamma$  en réponse à l'HBHA montre des réponses variables au sein du groupe des sujets présentant une réponse positive à l'IDRt mais négative au QFT (figure 14). Parmi ces sujets, (33,33%) montraient une réponse positive suite à une stimulation à l'HBHA. En outre, nous n'avons pas observé une différence statistiquement significative de la réponse HBHA entre les sujets présentant une TB latente avérée (par les tests QFT et IDRt) et ceux ayant un test QFT négatif avec une HBHA positive ( $p=0,281$ ). Ceci montre une plus grande spécificité du test HBHA à détecter une TB latente par rapport au QFT-IT (même en l'absence de QFT négatif).

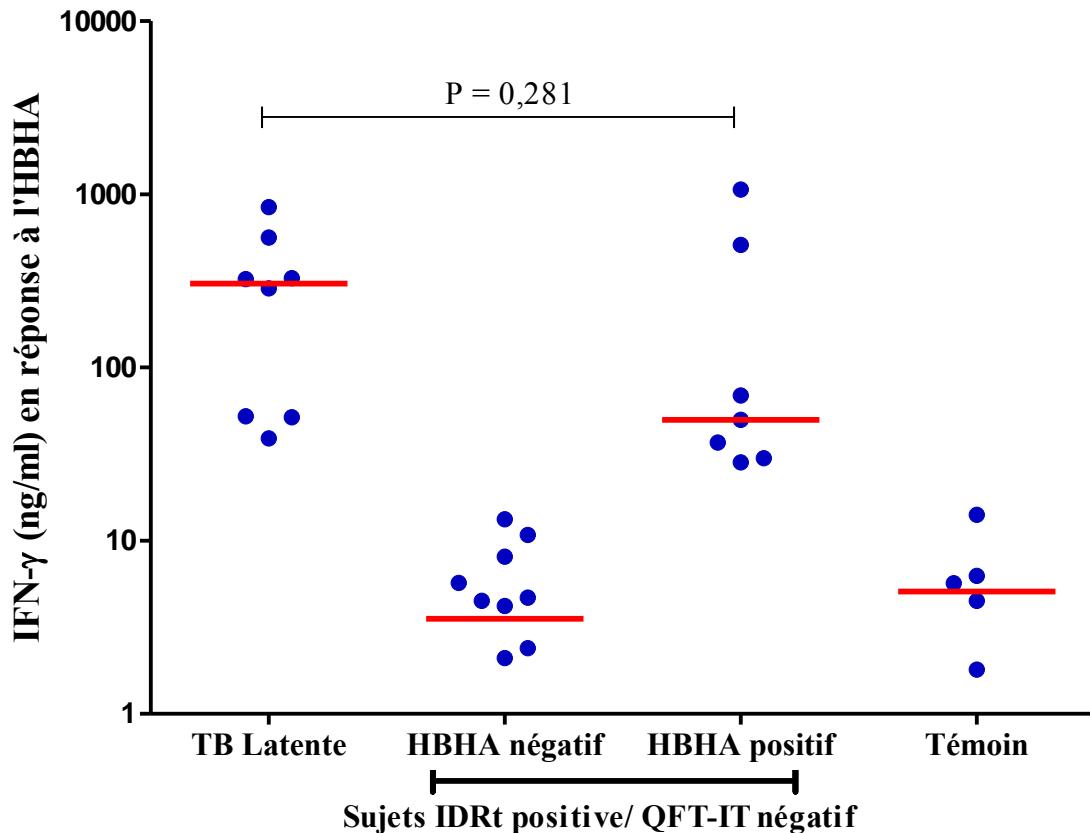


Figure 14: Production de l'IFN- $\gamma$  en réponse à la stimulation par HBHA chez les sujets IDRt positive /QFT-IT négatif

## II.5. Comparaison de la sécrétion cytokinique IFN- $\gamma$ en réponse à l'HBHA chez les étudiants (6<sup>ème</sup> et 7<sup>ème</sup>) de la FMPO et ceux de la FST (master)

La figure 15 montre que la production de l'IFN- $\gamma$  en réponse à l'HBHA chez les étudiants médecins n"était pas statistiquement significative ( $p = 0,60$ ) comparée à celle observée chez les étudiants en master au niveau de la FST. Ceci montre que les étudiants de médecine et de la faculté des sciences ont des degrés similaires d'exposition. Par contre, les niveaux de production de l'IFN- $\gamma$  étaient statistiquement plus élevés chez le groupe des étudiants de la FM comparés au groupe des témoins ( $p = 0,045$ ).

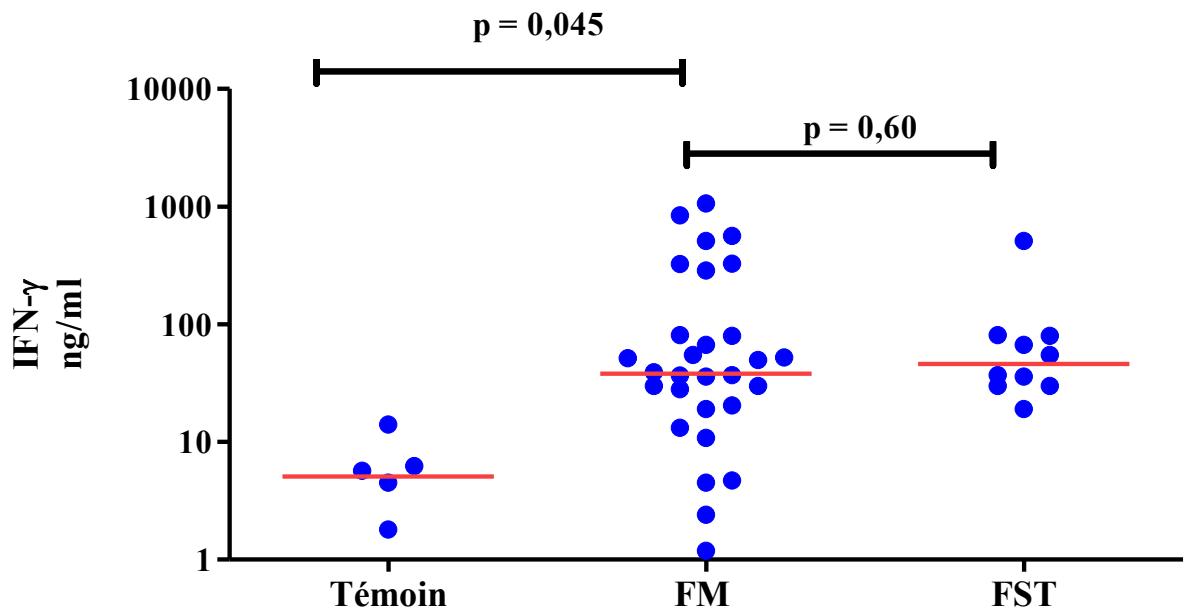


Figure 15 : Production de l'IFN- $\gamma$  en réponse à la stimulation par HBHA au niveau des étudiants de la FMPO et ceux de la FST

### III. DISCUSSION

Dans cette étude, nous avons comparé les caractéristiques immunologiques, en particulier la sécrétion cytokinique IFN- $\gamma$  en réponse à la stimulation par l'HBHA peptide spécifique de *M. tuberculosis*, de 59 sujets répartis en quatre groupes dont: 23 sujets tuberculeux latents, 9 patients tuberculeux actifs, 6 Témoins et 21 sujets dont l'IDRt est positive mais le QFT est négatif. Nous nous sommes surtout intéressés à évaluer la production d'IFN- $\gamma$  après stimulation par l'HBHA chez les sujets tuberculeux latents en comparaison avec le test QFT qui est actuellement la technique de référence.

#### ➤ Production de l'IFN- $\gamma$ en réponse à l'HBHA chez les sujets tuberculeux latents

La production d'IFN- $\gamma$  par les cellules T de patients infectés par le *M. tuberculosis*, est plus élevée comparés aux autres groupes de patients, montrant ainsi une plus forte réponse effectrice des cellules T chez les patients tuberculeux latents. L'hypothèse selon laquelle une personne ayant une primo infection tuberculeuse produiraient plus d'IFN- $\gamma$  en comparaison aux patients tuberculeux actifs est confirmée dans notre étude pour la réponse à l'HBHA avec un seuil de positivité de 0,108 ng/ml d'IFN- $\gamma$ , correspondant à une spécificité de 96,30% et une sensibilité de 95,24% pour la TB latente. De même une vaccination antérieure au BCG n'affectait pas les réponses après la stimulation par l'antigène HBHA avec un seuil de positivité de 0,100 ng/ml d'IFN- $\gamma$  qui donnait une spécificité de 94% et une sensibilité de 92% pour l'infection tuberculeuse latente [19].

#### ➤ Production d'IFN- $\gamma$ en réponse à l'HBHA chez les sujets ayant une IDRt positive et un QFT négatif

Le résultat déterminant dans notre étude est la production de l'IFN- $\gamma$  en réponse à l'HBHA chez 33,33% des sujets ayant une IDRt positive mais dont le QFT-IT était négatif. Une tendance a été rapportée par l'étude de Rodrigue Dessein et al sur le niveau de production d'IFN- $\gamma$  après stimulation avec l'HBHA (47,4%) pour la détection de la TB latente chez les patients hémodialysés ayant un QFT-IT négatif [8]. Par ailleurs nous avons noté une absence de différence statistiquement significative de la réponse HBHA entre les sujets présentant une TB latente avérée et ceux ayant un test QFT négatif avec une IDRt positive. Ceci montre une plus grande spécificité du test HBHA à détecter une tuberculose latente par rapport au QFT-IT [8].

Dans notre population d'étude, la médiane de l'âge était plus élevée chez les patients tuberculeux actifs comparés aux autres groupes. Ces patients atteints de la TB maladie étaient de sexe masculin. Par contre chez les autres groupes le pourcentage de sujets de sexe féminin était moins élevé que celui des sujets de sexe masculin. Néanmoins, cette disparité

n'a pas de valeur épidémiologique car dans le mode de contamination de la TB il n'y a pas de discrimination de sexe.

Il a été noté au cours de notre étude d'une part, chez les sujets tuberculeux actifs, une réponse positive du test IDRt plus faible comparés aux autres groupes et d'autre part, une forte réponse IDRt chez les sujets vaccinés par le BCG est notée. Il devient alors difficile de différencier les personnes vaccinées des personnes contaminées par une souche virulente de *M. tuberculosis*. Ceci montre une faible spécificité de ce test chez ces sujets vaccinés comme dans l'étude de Lalvani A [29].

Tous les sujets tuberculeux actifs de notre étude étaient vaccinés au BCG ; néanmoins ils ont développé la maladie. Ceci confirme que le vaccin BCG est efficace pour prévenir les formes graves de la tuberculose chez l'enfant, mais la protection chez l'adulte varie de 0 à 80% selon le pays [7].

#### ➤ **Production d'IFN- $\gamma$ en réponse à l'HBHA chez les étudiants**

Parmi les sujets de notre population d'étude, il y'a 41 étudiants dont 29 sont des étudiants de la FMPO (6<sup>ème</sup> et 7<sup>ème</sup> année de Médecine) et 12 sont des étudiants de la FST (master). La production cytokinique d'IFN- $\gamma$  en réponse à l'HBHA chez les étudiants médecins supposés être exposés à l'infection tuberculeuse (car ayant effectué leur stage au niveau du service de pneumologie) n'était pas statistiquement différente à ceux supposés non exposés à cette infection (étudiants en master au niveau de la FST) ( $p = 0,60$ ). Par contre, les niveaux de production d'IFN- $\gamma$  étaient légèrement plus élevés dans le groupe des étudiants de la FST avec une médiane de 45,98 ng/ml comparée à ceux des étudiants de la médecine (37,95 ng/ml). Ceci confirme qu'un tiers de la population mondiale est infecté par *M. tuberculosis* [39].

A la lumière de nos résultats et ceux d'études similaires, nous pouvons dire que les patients tuberculeux latents présentent une forte réactivité de leurs lymphocytes en réponse à la stimulation par l'HBHA [5]. De plus, il serait un bon marqueur pour la confirmation de TB latente en cas de discordance des tests IDRt et QFT.

Il serait ainsi important de procéder à des investigations supplémentaires vue la faible taille de l'échantillonnage. La difficulté de recrutement de volontaire fait partie des principaux handicaps de notre étude.

## CONCLUSION

La TB constitue un problème majeur de santé publique, plus particulièrement dans les pays en voie de développement surtout chez les patients vivant avec le VIH. Ainsi leur prise en charge doit être précoce et adaptée. Dans ce contexte plusieurs études ont été effectuées pour mieux comprendre les réponses immunitaires mises en œuvre au cours de cette infection.

Il n'existe pas de *gold-standard* pour détecter l'infection TB latente, donc aucun outil diagnostique de référence contre lequel ces tests peuvent être étalonnés. En cas de positivité, ils ne sont en aucun cas des indicateurs de protection ou d'évolution vers la TB maladie. Ils ne différencient pas en cas de positivité la TB maladie de la TB infection. Seule l'exclusion ou la mise en évidence de signes cliniques permettront de faire la différence entre les deux états cliniques.

C'est dans ce contexte que nous nous sommes proposés d'évaluer la performance du test HBHA dans la détection de la TB latente par rapport au QFT-IT et l'IDRt. Nos patients étaient repartis en quatre groupes :

- Groupe 1 : les témoins (n = 6),
- Groupe 2: les tuberculeux latents (n = 23),
- Groupe 3 : Sujets IDRt positive QFT-IT négatif (n = 21)
- Groupe 4 : TB active (n = 9).

Dans cette population d'étude, 41 étaient des étudiants répartis comme suit: 29 issus de la FMPO (6<sup>ème</sup> et 7<sup>ème</sup> année ayant fait un stage au niveau du service de Pneumophysiologie, et 12 issus de la FST (master et doctorant).

Les patients atteints de TB étaient naïfs aux traitements antituberculeux.

Dans cette étude, les hommes représentent 69,6% et 100% des patients tuberculeux respectivement latents et actifs contre 59,1% chez les sujets IDRt positive. Par contre les témoins représentent (66,6%).

L'âge médian des patients tuberculeux latents est de 24 ans comparé à 41 ans chez les tuberculeux actifs.

Par contre chez les sujets IDRt positive ainsi que chez les sujets témoins l'âge médian est de 25 ans.

La production d'IFN-γ en réponse à la stimulation par l'HBHA des cellules T de patients infectés par le *M. tuberculosis*, est plus élevée comparés aux patients tuberculeux actifs, montrant ainsi une plus forte réponse effectrice des cellules T chez les patients tuberculeux latents ( $p = 0,002$ ). Il ressort de nos résultats que la stimulation par l'HBHA est positive avec

un seuil de 0,108 ng/ml d'IFN- $\gamma$  avec une spécificité de 96,30% et une sensibilité de 95,24% pour la TB latente.

Le résultat déterminant dans notre étude est la production de l'IFN- $\gamma$  en réponse à l'HBHA chez 33,33% des sujets ayant une IDRt positive mais dont le QFT-IT était négatif. Ceci montre une plus grande spécificité du test HBHA à détecter une tuberculose latente par rapport au QFT-IT.

La production cytokinique d'IFN- $\gamma$  en réponse à l'HBHA chez les étudiants médecins supposés être exposés à l'infection tuberculeuse (car ayant effectué leur stage au niveau du service de pneumologie) n'était pas statistiquement différente à ceux supposés non exposés à cette infection (étudiants en master au niveau de la FST).

Dans l'ensemble, nos résultats suggèrent que les patients tuberculeux latents présentent une forte réactivité de leurs lymphocytes en réponse à la stimulation par l'HBHA. De plus, il serait un bon marqueur pour la confirmation de TB latente en cas de discordance des tests IDRt et QFT. Dans le but d'améliorer les résultats, il faudra augmenter si possible la taille de l'échantillonnage; établir un traitement antituberculeux serait également intéressant afin de voir s'il y aura un éventuel impact dans la production d'IFN- $\gamma$  après stimulation par l'HBHA.

- 1- **AIT-Khaled N, Ewnarson D.** Tuberculose manuel pour les étudiants en médecine. WHO/CDS/TB/99.272, 149p.
- 2- **Altet-Gomez N, De Souza-Galvaode M, Latorre I, et al.** Diagnosing TB infection in children: analysis of discordances using in vitro tests and the tuberculin skin test. Eur Respir. J 2011; 37: 1166–74.
- 3- **Andersen P, Munk ME, Pollock JM, et al.** Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. Lancet. 2000; 356: 1099-104.
- 4- **Brightbill HD, Library DH, Krutzik SR, et al.** Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through Toll-like Receptors. Science 1999; 285(5428):732-6.
- 5- **Campos-Neto A, Ovendale P, Bement T, et al.** CD40 ligand is not essential for the developpement of cell-mediated immunity and resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. J Immunol. 1998; 160(5):2037-41.
- 6- **Cissé MF.** Bactériologie des maladies tuberculeuses. Forum médical 1999; vol (N°2): p1-28.
- 7- **Colditz GA, Brewer TF, Berkey CS, et al.** "Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature. JAMA. 1994; 271(9): 698-702.
- 8- **Dessein R, Corbière V, Nortier J, et al.** Heparin-Binding Haemagglutinin, a New Tool for the Detection of Latent *Mycobacterium tuberculosis* Infection in Hemodialysis Patients. PLoS ONE 8(8): e71088. doi:10.1371/0071088. 2013.
- 9- **Diel R, Lodenkemper R and Nienhaus A.** Evidence-based comparison of commercial interferon-gamma release assays for detecting active TB: a metaanalysis. Chest. 2010.,137(4):952-68.
- 10-**Diel R, Lodenkemper R and Nienhaus A.** Predictive value of interferon-gamma release assays and tuberculin skin testing for predicting progression from latent TB infection to disease state: a meta-analysis. Chest. 2012; 142(1):63-75.
- 11-**Dutoau G.** Petite histoire illustrée de la tuberculose. Arch Pediat 2005 ; 12 :588-S-595.
- 12-**Flamment S, M Péronne CH.** Histoire naturelle de l'infection tuberculeuse et réaction tuberculinique. Rev. Mal. Resp. 1997 ;14: 5S27-5S3.

- 13-**Flesch IEA, Kaufmann SHE.** Role of cytokines in tuberculosis. *Immunobiology* 1993; 189:316-39.
- 14-**Flynn JL, Chan J.** Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol.* 2001; 19:93-129.
- 15-**Fontenot JD, Gavin MA et Rudensky AY.** Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 2003; 4(4):330-6.
- 16-**Fortes A, Pereira K, Antas PRZ, et al.** Detection of in vitro interferon- $\gamma$  and serum tumour necrosis factor- $\alpha$  in multidrug-resistant tuberculosis patients. *Clin Exp Immunol* 2005; 141(3): 5418.
- 17-**Groupe de travail du conseil supérieur d'hygiène public, France.** **Intradermoréaction à la tuberculine ou test à la tuberculine.** *Medecine et maladies infectieuses.* 2004; 34, pp. 358-363.
- 18-**Haoues M et Essaf M.** LE MACROPHAGE: CHEF D'ORCHESTRE DE L'IMMUNITE ANTI-TUBERCULEUSE. *Archs. Inst. Pasteur Tunis.* 2012.
- 19- **Hougarde JM, Schepers K, Place S, et al.** Heparin-binding-hemagglutinin-induced IFN-gamma release as a diagnostic tool for latent tuberculosis. *PLoS. One.* 2, e926. 2007.
- 20-**Iseman M.** Biology and laboratory diagnosis. A clinician's guide to tuberculosis: Lippincott Williams & Wilkins; 2000; p. 21-49.
- 21-**Jeannin L.** tuberculose pulmonaire et primo infection tuberculeuse. *Revue du praticien, Paris.* 1997, 47, pp. 97-106.
- 22-**Janeway CA, Travers P, Walport M, et al.** Le système immunitaire fondamental et pathologique. 2<sup>ème</sup> Edition, éd : de Boeck. 2003; p.471-500.
- 23-**Joel DE, Giraldina TN et Niaz B.** Genomics and the evolution, pathogenesis, and diagnosis of tuberculosis. *J Clin Invest* 2007; 117(7):1738-45.
- 24-**Kaufmann SHE.** Diversité fonctionnelle des LT et des cellules mémoires. *Nature reviews.* 2001.
- 25-**Kaufmann SHE.** Protection against tuberculosis: cytokines, T cells, and macrophages. *Ann Rheum Dis.* 2002; 61: 54-58.
- 26-**Kaufmann SHE.** Tuberculosis and tubercle bacillus. Washington DC: ASM Press. 2005; p465-474.
- 27-**Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S, et al.** T-lymphocytes T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV *Nature* 1984; 312(5996):767-8.

- 28-**Latvani A, Nagvenkar P, Udwadia Z, et al.** Enumeration of T cells specific for RD1-encoded antigens suggests a high prevalence of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection in healthy urban Indians. *J Infect Dis.* 2001; 183(3): 469-77.
- 29-**Latvani A.** Diagnosing tuberculosis infection in the 21st century: new tools to tackle an old enemy. *Chest* 2007; 131(6):1898-906.
- 30-**Law K, Weiden M, Harkin T, et al.** Increased release of interleukin-1 beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha by bronchoalveolar cells lavaged from involved sites in pulmonary tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 1996; 153, 799-804.
- 31-**Letonturier P.** Immunologie générale. 6<sup>eme</sup> Edition Masson, Paris. 1998; 11 :100-103.
- 32-**Marina AF, Laura IK, Andrea G, et al.** Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Bioscience* 2013.
- 33-**Masungi C, Temmerman S, Van VJP et al.** Differential T and B cell responses against *Mycobacterium tuberculosis* heparin-binding hemagglutinin adhesin in infected healthy individuals and patients with tuberculosis. *J Infect Dis.* 2002, 185,513-20.
- 34-**Menozzi FD, Rouse JH, Alavi M, et al.** Identification of a heparin-binding hemagglutinin present in mycobacteria. *J Exp Med.* 1996 ; 184, 229-1001. (11)
- 35-**Mills KH.** Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection. *Nat. Rev. Immunol.* 2004; 4(11):841-55.
- 36-**Montagnier L.** SIDA et infection par le VIH. Médecine science, Paris. 1989, Flammarion.
- 37-**Muñoz S, Hernandez-Pando R, Abraham S.N, et al.** Mast cell activation by *Mycobacterium tuberculosis*: mediator release and role of CD48. *J Immunology.* 2003; 170; 5590-5596.
- 38-**OMS.** Tuberculose Aide-mémoire N°104. Novembre 2010.
- 39-**OMS.** Rapport 2014 sur la lutte contre la tuberculose dans le monde : [www.who.int/tb/publications/global\\_report/fr\\_\(Consulté Juillet 2015\).](http://www.who.int/tb/publications/global_report/fr_(Consulté Juillet 2015).)
- 40-**Orme IM, Collins FM.** Protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection by adoptive immunotherapy. Requirement for T cell-deficient recipients. *J Exp Med* 1983; 158(1):74-83.
- 41-**Pedrazzini T, Louis JA.** Functional analysis in vitro and in vivo of *Mycobacterium bovis* strain BCG-specific T cell clones. *J. Immunol.* 1986;136 (5): 1828-34.

- 42-**Raja A.** Immunology of tuberculosis. Indian. J. Med. Res, 2004; 120; 213-232.
- 43-**REY F.** Test de libération de l'IFN- $\gamma$  (IGRA). AFMP Dubrovnik. 2014.
- 44-**Roy S, Sharma S, Sharma M et al** (2004). Induction of nitric oxide release from the human alveolar epithelial cell line A549: an in vitro correlate of innate immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. Immunology 2004; 112, 471-480.
- 45-**Sallusto F, Lenig D, Forster R, et al.** Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. Nature. 1999; 401;6754;708.
- 46-**Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A.** Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. Annu Rev Immunol. 2004; 22:745-63
- 47-**Scanga CA, Mohan VP, Yu K, et al.** Depletion of CD4(+) T cells causes reactivation of murine persistent tuberculosis despite continued expression of interferon gamma and nitric oxide synthase 2. J Exp Med. 2000; 192(3): 347-58.
- 48-**Soler C, Beguinot L, Sorkin A et al.** Tyrosine phosphorylation of ras GTPase-activating protein does not requirassociation with the epidermal growth factor receptor. J. Biol. Chem. 1993; 268(29) : 22010-9.
- 49-**Sorensen AL, Nagai S, Houen G, et al.** Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun. 1995; 63: 1710-1717.
- 50-**Thurnher M, Ramoner R, Gastl G. et al.** *Bacillus Calmette-Guerin* mycobacteria stimulate human blood dendritic cells. *Int. J. Cancer.* 1997; 70(1)128-134.
- 51-**Truffot-Pernot C, Groosset J.** Bactériologie de la tuberculose. Med; Hyg; 1982, 40 :1403-1501.
- 52-**Vukmanovic-Stejic M, Reed JR, Lacy KE, et al.** Mantoux Test as a model for a secondary immune response in humans. Immunol Lett. 2006; 107(2):, 93-101
- 53-**Yasir A, Skeiky W and Jerald CS.** Advances in tuberculosis vaccine strategies. Nat Rev Microbiol 4. 2006; 4(6): 469-76 .

# RESUME

## Introduction :

La TB constitue un problème majeur de santé publique, plus particulièrement dans les pays en voie de développement surtout chez les patients vivant avec le VIH.

De nos jours, la détection de la TB latente pose problème car Il n'existe pas de *gold-standard* pour détecter cette infection TB latente surtout chez les sujets immunodéprimés. C'est dans ce contexte que nous nous sommes proposés d'évaluer la performance du test HBHA dans la détection de la TB latente par rapport au QFT-IT et l'IDRt.

## Patients et méthodes :

Huit millilitres de sang ont été recueillis sur tube hépariné pour la séparation cellulaire. Les cellules mononucléées du sang périphérique ou PBMC pour la stimulation par HBHA et Des prélèvements de 1 ml dans chacun des 3 tubes du kit du QFT-IT ainsi que l'IDRt ont été réalisés pour chaque volontaire pour la détermination d'une probable infection tuberculeuse.

Au total 59 patients ont été enrôlés dont 6 témoins, 23 tuberculeux latents, 21 Sujets (IDRt positive/QFT-IT neg) et 9 patients tuberculeux actifs. Dans cette population d'étude, 41 étaient des étudiants répartis comme suit: 29 issus de la 6<sup>ème</sup> et 7<sup>ème</sup> année de Médecine et 12 issus de la FST (master et doctorant).

## Résultats :

La production d'IFN- $\gamma$  en réponse à la stimulation par l'HBHA des cellules T de patients infectés par le *M. tuberculosis*, est plus élevée comparés au tuberculeux actifs, montrant ainsi une plus forte réponse effectrice des cellules T chez les patients tuberculeux latents ( $p = 0,002$ ). Il ressort de nos résultats que la stimulation par l'HBHA est positive avec un seuil de 0,108 ng/ml d'IFN- $\gamma$  avec une spécificité de 96,30% et une sensibilité de 95,24% pour la TB latente.

Le résultat déterminant dans notre étude est la production de l'IFN- $\gamma$  en réponse à l'HBHA chez 33,33% des sujets ayant une IDRt positive mais dont le QFT-IT était négatif. En outre, nous avons noté une absence de différence statistiquement significative de la réponse HBHA entre les sujets présentant une TB latente avérée et ceux ayant un test QFT négatif avec une IDRt positive.

La production cytokinique d'IFN- $\gamma$  en réponse à l'HBHA chez les étudiants médecins supposés être exposés à l'infection tuberculeuse (car ayant effectué leur stage au niveau du service de pneumologie) n'était pas statistiquement différente à ceux supposés non exposés à cette infection (étudiants en master au niveau de la FST) ( $p = 0,60$ ).

## Conclusion :

Dans l'ensemble, nos résultats suggèrent que les patients tuberculeux latents présentent une forte réactivité de leurs lymphocytes en réponse à la stimulation par l'HBHA. De plus, il serait un bon marqueur pour la confirmation de TB latente en cas de discordance des tests IDRt et QFT-IT.