

# Sommaire

Table des figures .....	5
Table des tableaux .....	8
Introduction bibliographique.....	10
I L'interféron gamma .....	11
I.1 Le gène codant pour l'interféron gamma .....	11
I.2 La structure .....	12
I.3 Le récepteur de l'interféron gamma .....	13
I.4 Voie de signalisation de l'interféron gamma .....	14
I.5 Régulation de l'activation du récepteur de l'interféron gamma.....	16
I.6 Infections à mycobactérie et interféron gamma .....	18
II. Les anomalies de la voie de signalisation de l'interféron gamma en pathologie humaine.....	22
II.1 Anomalies génétiques. ....	22
II.2 Production d'auto-anticorps neutralisants anti-interféron gamma.....	27
2.1 Description dans la littérature .....	28
2.2 Le déterminant antigénique .....	33
2.3 Origine des auto-anticorps : hypothèses .....	35
2.4 Infections disséminées à MNT à auto-anticorps anti-interféron gamma neutralisant : maladie auto-immune ?.....	37
2.5 Effets biologiques des anticorps anti-interféron gamma .....	37
2.6 Modalités de détection.....	38
A La technique ELISA.....	38
B Cytométrie en flux.....	40
C Multiplex .....	42

Objectifs de la thèse .....	43
Patients et méthodes .....	45
I Sélection des groupes de patients .....	46
I.1 Groupe sélectionné d'après un critère biologique.....	46
I.2 Groupe sélectionné d'après un critère clinique.....	48
I.3 Groupe contrôle .....	49
II Méthodes.....	49
Résultats .....	51
I Protocole ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)...	52
I.1 L'antigène et le coating .....	52
I.2 Lavages .....	52
I.3 Saturation .....	52
I.4 Lavages .....	53
I.5 Dépôt des échantillons .....	53
I.6 Lavages .....	53
I.7 Dépôt du conjugué.....	53
I.8 Lavages .....	53
I.9 Révélation.....	53
I.10 Lecture de la plaque .....	53
II Corrélation entre plasma et sérum .....	54
III Validation du test par un anticorps anti-interféron gamma commercial. ....	56
IV Définition de la valeur seuil à partir de sérums issus de l'Établissement Français du Sang (EFS).....	57

V Résultats des cohortes sélectionnées à partir de critères biologiques et cliniques .....	60
V.1 Résultats de la cohorte sélectionnée selon des critères cliniques. (Sérums).....	60
V.2 Résultats de la cohorte sélectionnée selon des critères biologiques (Plasmas) .....	61
VI Détermination de la répétabilité et de la reproductibilité	63
VII Évaluation de la spécificité du signal obtenu avec notre technique ELISA.....	64
VIII Titration des échantillons positifs .....	67
IX Présentation des différents paramètres clinico-biologiques des patients à auto-anticorps anti-interféron gamma positif en ELISA.....	68
X Tests fonctionnels réalisés sur les échantillons positifs en ELISA. ....	69
XI Tests ELISA réalisés sur deux échantillons positifs validés par l'équipe de JL Casanova (CHU Necker).....	71
Discussion .....	72
Conclusion .....	75
Bibliographie .....	78
Glossaire.....	88

# Table des figures

Figure 1 : Séquence complète des acides aminés composant l'interféron gamma humain. (1).....	12
Figure 2 : Structure de l'interféron gamma composé de deux dimères chacun divisé en 6 hélices alpha reliées entre elles par des boucles. ....	13
Figure 3 : Voie de signalisation de l'interféron gamma. (7) .....	15
Figure 4 : Les étapes moléculaires induites par la fixation de l'interféron gamma à son récepteur. (2).....	17
Figure 5 : Voie IL-12/IFN-gamma et les différents mécanismes interactifs permettant la lutte contre les mycobactéries. (21).....	19
Figure 6 : Arbre décisionnel pour le diagnostic de MSMD. (20) .....	20
Figure 7 : Répartition mondiale des sujets atteints par la MSMD indiquée par les pays en rouge sur la carte du monde. (35) Environ 250 patients à travers 40 pays. ....	25
Figure 8 : Voie de signalisation de l'interféron gamma et les molécules impliquées. Des anomalies des molécules dont le nom est écrit en noir sont décrites comme étant associées à des MSMD. (7) .....	26
Figure 9 : Tableau de synthèse des atteintes, leur mode de transmission, les pathogènes incriminés et le pronostic des MSMD. (23) .....	27
Figure 10 : Représentation graphique des patients avec des auto-anticorps anti-interféron gamma ou non par groupe.....	30
Figure 11 : Séquence de la protéine NOC2 et son analogie avec l'interféron gamma. ....	34
Figure 12 : Motif d'acides aminés KRKR conservé par différentes espèces. Sa reconnaissance en tant qu'épitope par un auto-anticorps lui permet d'être neutralisant. (55) .....	35
Figure 13 : Représentation schématique des différentes phases d'un ELISA..	39
Figure 14 : Mise en évidence d'une production d'interféron gamma par les lymphocytes T d'un sujet en présence d'antigènes spécifiques du génome de <i>M.tuberculosis</i> permettant ou non la sécrétion d'interféron gamma : principe de base du test du Quantiféron® (Qiagen). ....	47
Figure 15 : Représentation schématique de l'ELISA utilisé pour la mise en évidence des auto-anticorps anti-interféron gamma dans ce travail. ....	54
Figure 16 : Courbe de corrélation plasma/sérum établie en mesurant les DO sérum/plasma de chacun des échantillons. (n=13 patients).....	56

Figure 17 : Courbe d'étalonnage établie après mesure des DO de l'anticorps avec des dilutions croissantes et les valeurs obtenues. ....	57
Figure 18 : Répartition des valeurs de DO obtenues en ELISA à partir des sérums contrôle. ....	59
Figure 19 : Répartition des valeurs de DO obtenues à partir de sérums.....	60
Figure 20 : Répartition des valeurs des densités optiques obtenues à partir de plasmas.....	62
Figure 21 : Titration des échantillons positifs. ....	67
Figure 22 : Graphe des résultats du test fonctionnel réalisés sur deux sérums. ....	70

## Table des tableaux

Tableau 1 : Synthèse des différentes études parues sur les infections disséminées à MNT avec auto-anticorps anti-interféron gamma. ....	31
Tableau 2 : Tableau comparatif des différents protocoles utilisés pour la détection des auto-anticorps anti-interféron gamma dans la littérature. ....	40
Tableau 3 : Démographie des populations étudiées. ....	48
Tableau 4 : Tableau récapitulatif des différents tableaux cliniques de la cohorte sélectionnée selon le critère clinique.....	48
Tableau 5 : Démographie de la population de l'EFS. ....	49
Tableau 6 : Valeurs des DO en fonction de la matrice pour un même échantillon. ....	55
Tableau 7 : Valeurs des DO mesurées pour 72 échantillons EFS au 1/100. ...	58
Tableau 8 : Analyses statistiques de la population EFS.....	58
Tableau 9 : Tableau récapitulatif des 51 valeurs des DO obtenues à partir des sérums sélectionnés à partir de critères cliniques.....	60
Tableau 10 : Tableau récapitulatif des 105 valeurs des DO obtenues à partir des plasmas sélectionnés à partir de critères biologiques. ....	61
Tableau 11 : Les six échantillons positifs et leur densité optique. ....	62
Tableau 12 : Valeurs des deux échantillons utilisés pour la détermination de la reproductibilité du test. ....	63
Tableau 13 : Valeurs obtenues pour détermination de la répétabilité. ....	63
Tableau 14 : Valeurs des échantillons EFS et détermination du blanc coating.65	
Tableau 15 : Valeurs des DO et du DO blanc coating des échantillons positifs66	
Tableau 16 : Analyses statistiques des valeurs de Delta DO de la population EFS. ....	66
Tableau 17 : Titration des échantillons considérés positifs sur plaques coatées et non coatées à des dilutions croissantes.....	67
Tableau 18 : Présentation des paramètres clinico-biologiques des échantillons positifs en ELISA.....	68
Tableau 19 : Tableau des valeurs des deux sérums de Necker testés au 1/100. ....	71



# Introduction bibliographique

## I L'interféron gamma

Les interférons forment une famille de protéines apparentées sur le plan fonctionnel et synthétisées par les cellules eucaryotes en réponse à l'action des virus et des différents stimuli naturels ou artificiels.

L'interféron gamma ou interféron de type II a été initialement décrit comme une cytokine antivirale tout comme les interférons de type I (dont les interférons alpha et bêta). (1)

Les interférons tirent leur nom du fait qu'ils interfèrent dans le développement des infections virales. (2)

L'interféron gamma est aussi impliqué dans la lutte contre les infections parasitaires et bactériennes ainsi que dans les processus d'immunosurveillance et d'échappement des tumeurs.

Au stade actuel des connaissances, l'interféron gamma semble être moins puissant que les interférons de type I.

L'interféron gamma est majoritairement sécrété par les cellules NK (Natural Killer), NKT (Natural Killer T), les lymphocytes T cytotoxiques CD8+ et les lymphocytes auxiliaires de type I CD4+ Th1. (3)

### I.1 Le gène codant pour l'interféron gamma

Le gène codant pour l'interféron gamma se positionne sur la bande chromosomique 12q15 à proximité des microsatellites D12S335 et D12S313. L'acide désoxyribonucléique (ADN) de l'interféron gamma a, pour la première fois, été purifié et caractérisé en 1982 par Derynck et son équipe.(1)

Ce gène est composé de 6 kilos bases ainsi que d'une séquence promotrice comportant une boîte TATA et une séquence servant de site de reconnaissance à l'ARN polymérase.

Des séquences homologues à celles qui précèdent les gènes codant pour l'interféron alpha et l'interféron bêta sont identifiées dans la région promotrice, supposant une similarité dans la régulation de leur expression. (1)

## I.2 La structure

L'interféron gamma est une glycoprotéine de 143 acides aminés avec une masse molaire théorique de 17,1 kDa. (4)

La séquence d'acides aminés de référence de l'interféron gamma humain (référence NCBI Q14609\_HUMAN) est représentée dans la figure 1.

10	20	30	40	50
MQDPYVKEAE	NLKKYFNAGH	SDVADNGTLF	LGILKNWKEE	SDRKIMQSQI
60	70	80	90	100
VSFYFKLFKN	FKDDQSIQKS	VETIKEDMNV	KFFNSNKKKR	DDFEKLTNYS
110	120	130	140	
VTDLNVQRKA	IHELIQVMAE	LSPAAGTGKR	KRSQMLFRGR	RASQ

Figure 1 : Séquence complète des acides aminés composant l'interféron gamma humain. (1)

L'interféron gamma est un homodimère dans lequel les deux polypeptides sont agencés tête-bêche et forment un dimère globulaire en forme de V. (5)

Chaque monomère est composé de six hélices  $\alpha$  (nommées de A à F) reliées entre elles par des boucles. (Figure 2)

Le dimère a une forme ovoïdale avec des dimensions globales de 60 Å par 40 Å et par 30 Å.

L'intercalation des hélices  $\alpha$  maintient cet homodimère dans sa conformation.

La partie C-terminale de la protéine est hautement hydrophile. Sa dégradation partielle est susceptible de modifier l'activité biologique de la cytokine. (1)

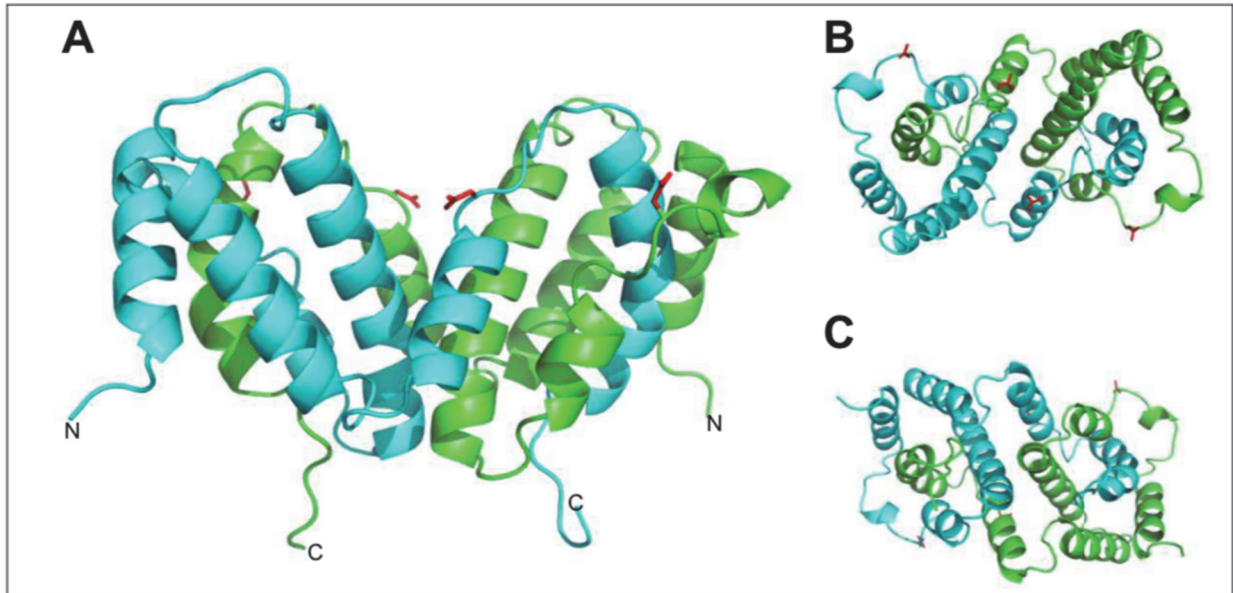


Figure 2 : Structure de l'interféron gamma composé de deux dimères chacun divisé en 6 hélices alpha reliées entre elles par des boucles.

En A, la structure vue de face, en B, la structure vue du dessus et en C, la structure vue du dessous. (1)

### I.3 Le récepteur de l'interféron gamma

Le récepteur de l'interféron gamma est présent à la surface des cellules dendritiques et des cellules à capacité phagocytaire (comme les macrophages) et les polynucléaires neutrophiles. (6)

Il fait partie de la famille des récepteurs des cytokines de classe II.

Il s'agit d'un tétramère comportant deux chaînes R1 (IFN-GR1) sur lesquelles se fixent l'interféron gamma et deux chaînes R2 (IFN-GR2) permettant la transduction du signal.

Le récepteur est composé d'une région cytoplasmique, d'une région extracellulaire glycosylée et d'un unique peptide transmembranaire.

La partie intracellulaire contient des sites de liaison pour :

- JAK1 (Janus Kinase) et STAT1 (Signal Transducers and Activators of Transcription) sur la chaîne R1
- JAK2 sur la chaîne R2.

L'IFN-GR1 contient deux domaines globulaires composés de deux feuillets bêta maintenus ensemble par des ponts disulfures.

#### I.4 Voie de signalisation de l'interféron gamma

Les Janus Kinases JAK1 et JAK2 sont associées aux domaines cytoplasmiques du récepteur, respectivement à la chaîne IFN-GR1 et IFN-GR2.

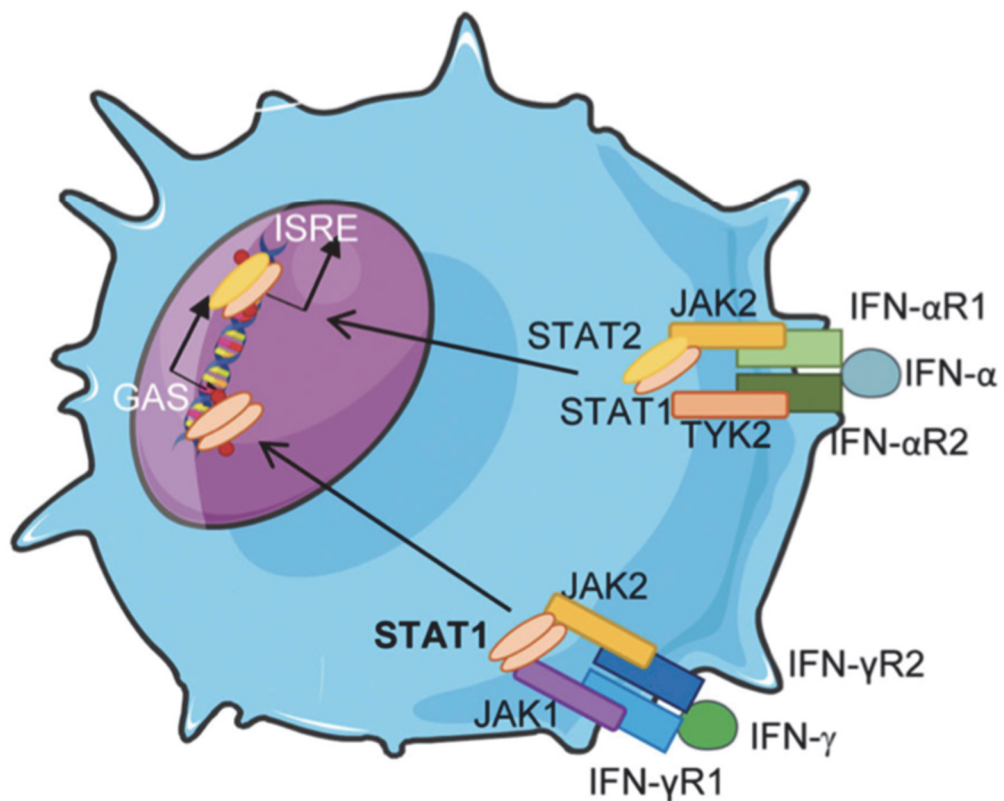
En se fixant à son récepteur, l'interféron permet le rapprochement des deux chaînes du récepteur et active JAK1 et JAK2 mutuellement. (7)

S'ensuit une phosphorylation des domaines intra-cytoplasmiques des chaînes IFN-GR1 ainsi que du site de fixation de la molécule STAT1 sur la chaîne IFN-R1. (1,3,6)

Le facteur de transcription STAT1 va donc s'ancrer, se phosphoryler et se dimériser. (8)

Ce dimère phospho-STAT1, formant le complexe GAF (Gamma-interferon Activation Factor) jouera son rôle en atteignant le noyau et en le traversant pour permettre la transcription de gènes pro-inflammatoires. (9)

Il ira se fixer sur les sites GAS (Gamma interferon Activation Sequence) au niveau nucléaire. (Figure 3)



## Macrophages

Figure 3 : Voie de signalisation de l'interféron gamma. (7)

Le rapprochement des 2 kinases JAK1 et JAK2 constitutives des 2 chaînes respectives du récepteur va permettre la formation d'un homodimère STAT1. (10)

On peut citer les principaux effets de l'activation de la voie de l'interféron gamma (11) :

- Action immuno-modulatrice de l'interféron gamma sur la réponse Th1 (12)
  - Active la lignée lymphocytaire T plus que la lignée B (13)
  - Induit une réponse cellulaire par différenciation des lymphocytes T CD4+ en sous population effectrice Th1(2)
  - Stimule les lymphocytes T CD4+ qui produisent à leur tour l'interféron gamma (14)

- Renforce l'aptitude des macrophages à tuer les pathogènes phagocytés
- Active la production d'opsonine
- Active la voie du complément
- Permet la commutation de classe d'anticorps et stimule la production d'anticorps IgG (Immunoglobulines G) favorisant la phagocytose.
- Augmentation de la présentation d'antigène par stimulation de production de CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) de type 1 (15)
- Stimulation de la sécrétion de radicaux libres oxygénés (16)
- Action sur le cycle cellulaire et l'apoptose
- Régulation de la migration des leucocytes par production d'ICAM et VCAM en vue de permettre le rolling de la cellule et son intervention sur le site inflammatoire.

## I.5 Régulation de l'activation du récepteur de l'interféron gamma.

STAT1 agit comme facteur de transcription s'il est transporté vers le noyau.

Il existe deux modèles décrivant l'entrée de STAT1 dans le noyau :

- Complexation avec l'importine Alpha-1 avec translocation par un pore nucléaire.
- Des signaux de localisation nucléaire présents dans le domaine C-terminal de l'interféron gamma permettraient l'entrée du dimère STAT1 dans le noyau. (17)

La réponse Th1 active le promoteur de l'interféron gamma amplifiant la réponse immunitaire.

L'interféron, en se fixant sur son récepteur, induit la production d'une protéine inhibitrice assurant le feedback négatif sur l'expression du récepteur à la surface cellulaire.

Cette protéine est la protéine SOCS-1 (Suppressor Of Cytokine Signalling) associée elle aussi aux protéines JAK1 et JAK2. (1)

Cette même protéine inhibitrice promeut la dégradation des récepteurs en permettant la signalisation de ces récepteurs et leur ciblage vers la voie du protéasome. (18)

L'ensemble de la réaction qui suit la fixation au récepteur est schématisé sur la figure 4.

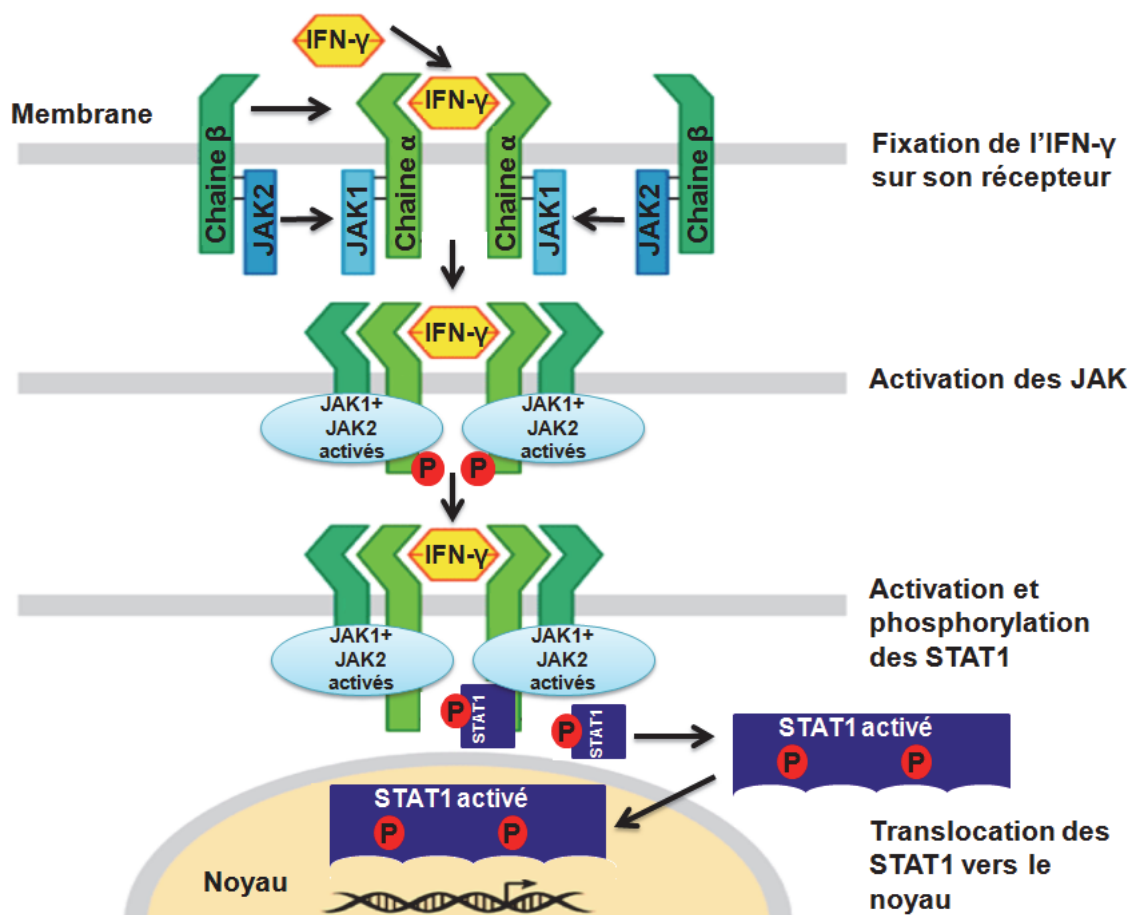


Figure 4 : Les étapes moléculaires induites par la fixation de l'interféron gamma à son récepteur. (2)



De plus, STAT1 phosphorylé permet aussi l'internalisation du récepteur et de son ligand pour être dégradés et dissociés. (1)

## I.6 Infections à mycobactérie et interféron gamma

Les mycobactéries sont des bactéries intracellulaires qui résident dans les macrophages des individus infectés. (19)

En réponse à cette infection, les macrophages produisent de l'IL-12. Cette cytokine active les lymphocytes T et NK qui se répliquent et produisent de l'interféron gamma.(2)

L'IFN gamma active la voie NFkB et STAT1 qui va permettre la synthèse de NADPH pour lyser la cellule infectée.

De plus, le rôle du système immunitaire inné et son activation est un prérequis à l'activation du système immunitaire adaptatif via :

- Les PRR (Pattern Recognition Receptors) .
- Et plus spécifiquement les TLR (Toll-Like Receptors). (20)

La compréhension des mécanismes immunologiques vis-à-vis des agents infectieux intracellulaires a permis de mettre en évidence des facteurs prédisposant aux infections disséminées à MNT et diverses pathologies associées. (Figure 5) (21)

Les symptômes liés à la maladie pulmonaire aux mycobactéries non tuberculeuses (MNT) sont souvent non spécifiques et dépendent de la maladie pulmonaire sous-jacente. La toux chronique est présente chez presque 90% des patients ; la fatigue, la fièvre et la perte de poids sont moins fréquemment décrites qu'avec la tuberculose.

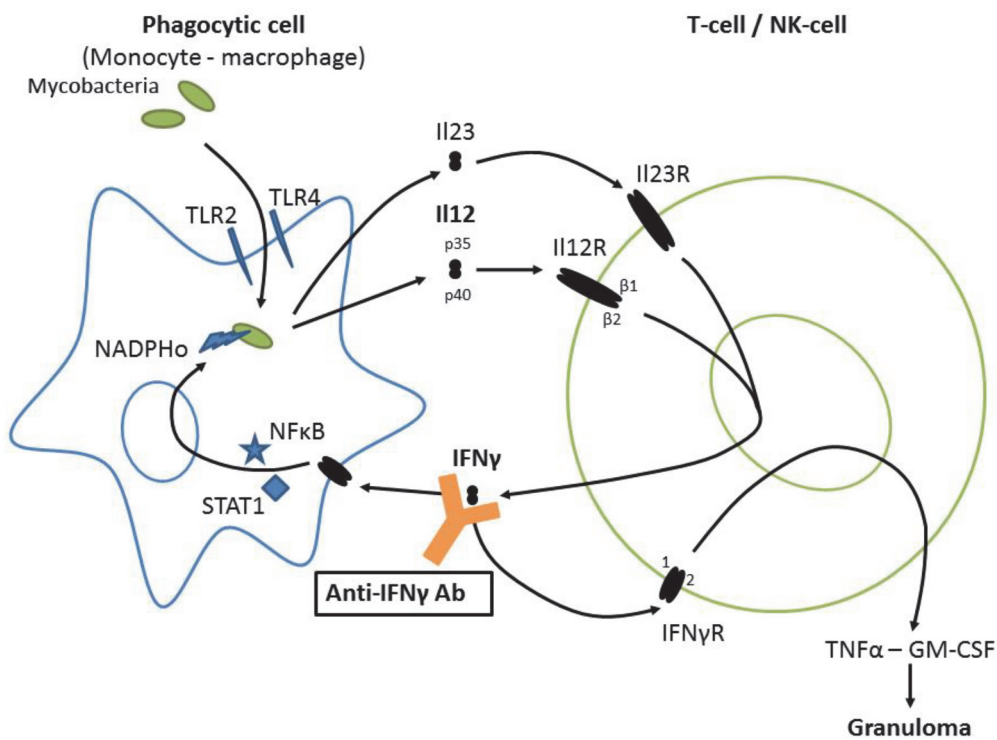


Figure 5 : Voie IL-12/IFN-gamma et les différents mécanismes interactifs permettant la lutte contre les mycobactéries. (21)

Le clinicien dispose d'un arbre décisionnel pour l'aider à poser le diagnostic de prédisposition mendélienne aux infections mycobactériennes ou Mendelian susceptibility to Mycobacterial Disease (MSMD) ou toute autre pathologie. (Figure 6)

Les douleurs thoraciques ou l'hémoptysie peuvent survenir au cours de l'infection, mais plus rarement. L'image radiologique est un élément important dans l'évaluation de la maladie pulmonaire aux MNT. (22)

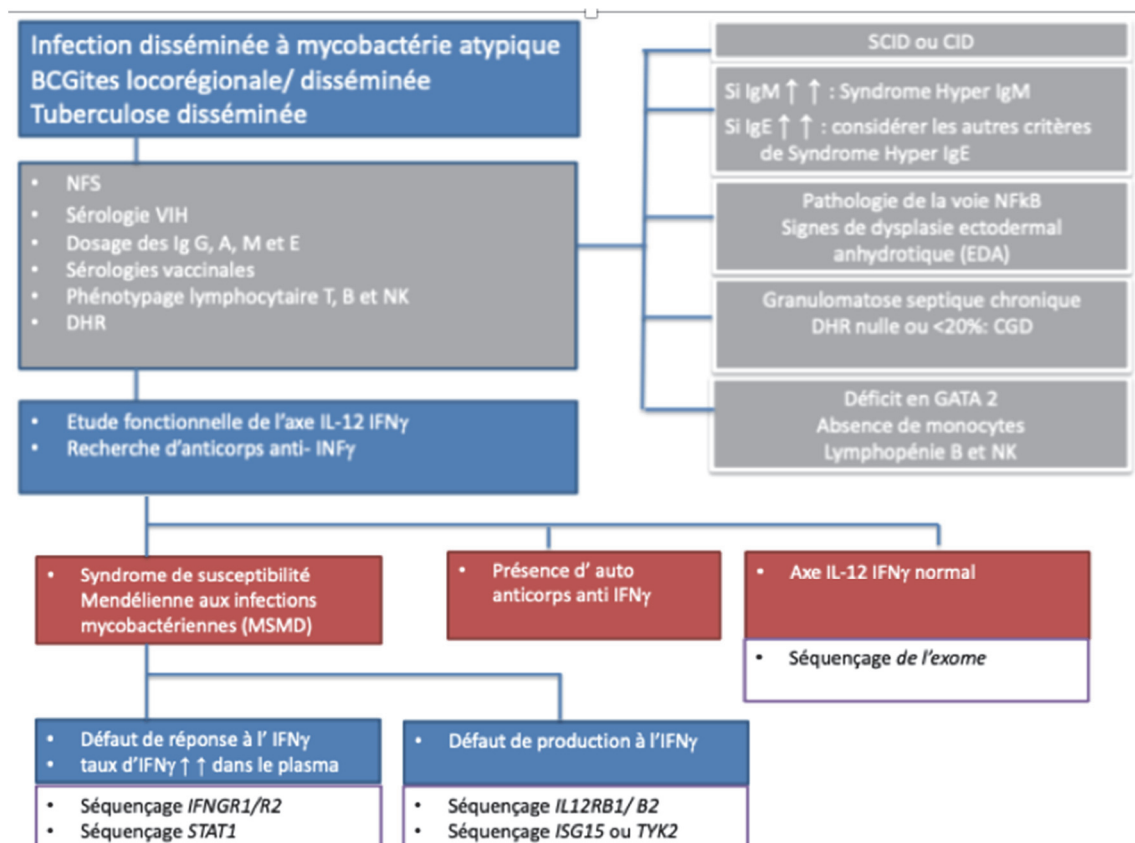


Figure 6 : Arbre décisionnel pour le diagnostic de MSMD. (20)

En dépit de leur faible virulence, les MNT sont généralement résistantes aux antibiotiques.

Les médicaments efficaces contre les MNT sont :

- Imipénème 1 g IV
- Lévofoxacine 500 mg IV ou per os 1 fois/jour
- Clarithromycine 500 mg per os
- Triméthoprime/sulfaméthoxazole 1 comprimé double
- Doxycycline 100 à 200 mg per os 1 fois/jour
- Céfoxitine 2 g IV
- Amikacine 10 à 15 mg/kg IV

Une association thérapeutique est recommandée avec au moins 2 médicaments qui ont une activité in vitro. La durée du traitement est en moyenne de 24 mois et peut être plus longue si la MNT est toujours présente. L'amikacine est généralement incluse pendant les premiers 3 à 6 mois de thérapie. (23)

L'interféron gamma peut être utilisé en cas d'infections à *M. avium*, tuberculoses et de lèpres en parallèle d'une antibiothérapie bien conduite.

Plus récemment, le thalidomide a été étudié et a montré son rôle dans la stimulation de la prolifération des lymphocytes T CD8+ et aussi de la production d'interleukine 12 et d'interféron gamma. (24)

En effet, une cure de Rituximab engendre une décroissance des taux d'anticorps globaux et donc des anticorps anti-interféron gamma. Récemment une équipe déclare que l'utilisation de ce traitement permettrait aussi de faire diminuer le pouvoir neutralisant de l'auto-anticorps. (25)

Le recours au cyclophosphamide est en cours d'évaluation pour le traitement des infections à MNT. (26)

La greffe de cellules souches hématopoïétiques ou la thérapie génique sont aussi des alternatives thérapeutiques envisageables dans certaines mutations.

## II. Les anomalies de la voie de signalisation de l'interféron gamma en pathologie humaine.

### II.1 Anomalies génétiques.

La MSMD est une maladie rare qui se caractérise par une prédisposition génétique à des symptômes cliniques causés par des mycobactéries faiblement virulentes présentes dans l'environnement (27) ou par le vaccin du Bacille de Calmette et Guérin (BCG). (28)

Le phénotype clinique peut s'accompagner des pathologies suivantes :

- Infections disséminées extra-pulmonaires à MNT
- Infections à *S. typhi*
- Infections à *T. gondii*
- Infections à CytoMégaloVirus (CMV)
- Réactivation du Varicella Zoster Virus (VZV)

Et se caractérise par une survenue d'infections disséminées sévères chez les enfants avec un pathogène identifié peu virulent. La transmission aux descendants a suggéré rapidement qu'un gène muté était en cause dans ce syndrome. (29)

Depuis 1996, neuf gènes ont été associés à la survenue de la MSMD. Tous ces gènes ont en commun de coder des protéines impliquées directement ou indirectement dans la réponse immunitaire dépendante de l'interféron gamma. (30)

La première anomalie génétique a été découverte en 1996 et il s'agit d'une mutation du gène IFNGR1 qui code pour la partie du récepteur IFN-GR1. (31,32)

Cette anomalie a été décrite chez 25 malades de 19 familles différentes avec une clinique sévère avec la survenue précoce avant 3 ans, d'infections

disséminées à BCG, des mycobactéries environnementales ou bien encore des cas de salmonelles ou de listérioses avec un pronostic sombre.

Ont été décrits deux types de défauts complets d'IFN-GR1 :

- Sans expression du récepteur à la surface membranaire
- Avec expression du récepteur mais le récepteur est non fonctionnel à la surface membranaire

Une mutation sur cette partie du récepteur engendre une perte totale de réponse à l'interféron gamma. (33)

Ces patients ont un taux sérique mesuré d'interféron gamma anormalement élevé, ce qui constitue un moyen de dépistage.

Le diagnostic de l'anomalie génétique semble compliqué à poser mais repose sur un faisceau d'arguments cliniques mais surtout biologiques :

- Dosage du taux de base d'interféron gamma plasmatique : en règle générale, le taux d'interféron gamma est élevé.
- Dosage du taux d'interféron gamma après stimulation de la voie de la cytokine : diminué si atteinte de la voie de signalisation ou normal
- Détection des récepteurs extracellulaires par cytométrie en flux
- Détection de phosphoSTAT1 en cytométrie en flux : diminué si atteinte génétique en aval du récepteur à l'interféron gamma
- Mise en évidence d'anomalies génétiques caractéristiques (perte du CD11 des cellules dendritiques du déficit partiel en IRF8) (7)

Les autres mutations découvertes par la suite portent sur les gènes de :

- L'IFN-GR2 : c'est une mutation rare décrite chez 3 patients et qui engendre un défaut partiel de réponse à l'interféron gamma. Cette mutation peut être mise en évidence par un test de stimulation de PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) par de l'interféron

gamma et on observe un défaut de production d'IL-12 (InterLeukine 12). (34)

- L'IL-12B codant pour la sous-unité p40 commune entre l'IL-12 et l'IL-23 a été identifié chez 19 patients, seul déficit en cytokine décrit dans le MSMD. Cette mutation se caractérise par une absence de production d'IL-12/IL-23p40 en réponse à la stimulation par le BCG
- L'IL-12/IL-23R B1 codant la chaîne  $\beta$  commune aux récepteurs d'IL-12 et d'IL-23 est l'anomalie la plus fréquente des MSMD retrouvée chez 54 patients, avec une clinique hétérogène.
- STAT1 codant pour la protéine STAT1 est mis en évidence chez 3 malades de deux familles. Il s'agit d'une mutation située au niveau du domaine de liaison de l'ADN à STAT1. (35)
- L'IRF8, protéine qui régule l'expression des gènes stimulés par l'interféron gamma, exprimé par les macrophages et les cellules dendritiques est extrêmement rare, décrites chez deux patients d'Amérique du Sud
- L'ISG5 (Interferon-Stimulated Genes) est une protéine nécessaire à la production de facteurs de transcription, assurant une amplification du signal. Sa mutation est décrite chez 3 patients dans le monde, se caractérise par une production d'interféron gamma dégradée mais pas abolie, est compensée par une production accrue d'interféron alpha et bêta. Cliniquement, les patients sont atteints d'infections disséminées à mycobactéries atypiques après vaccination BCG et souffrant de crises d'épilepsies à répétition.

Plus récemment, de nouvelles mutations ont été décrites, des mutations liées à l'X.

Il s'agit des mutations des gènes :

- NEMO : un gène codant pour une sous-unité de l'inhibiteur de  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  (ou  $\text{I}\kappa\text{B}$ ) kinase (IKK). Six patients d'origine caucasienne atteints de cette mutation présentent un faciès particulier, un tableau clinique d'intensité variable avec des infections plus ou moins graves. (36)
- CYBB, (Cytochrome B-245 Beta chain), composant essentiel de la NADPH oxydase et plus particulièrement du flavocytochrome b558, est une mutation rendant les cellules à capacité phagocytaire incapables de produire peu ou pas de NADPH. Infections récurrentes gravissimes à bactéries, mycobactéries et champignons ponctuent la vie des 38 patients qui présentent cette mutation. (37)

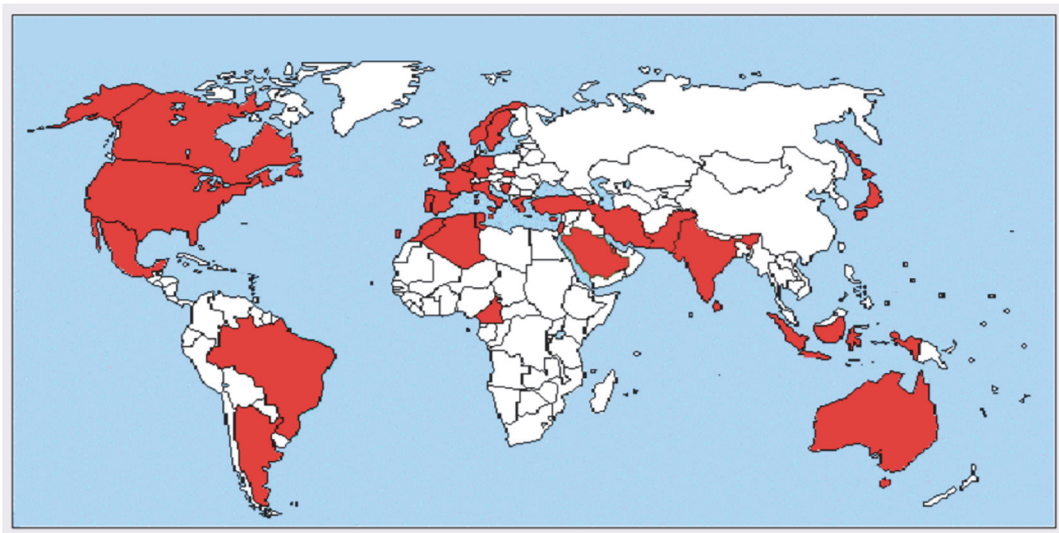


Figure 7 : Répartition mondiale des sujets atteints par la MSMD indiquée par les pays en rouge sur la carte du monde. (35) Environ 250 patients à travers 40 pays.



Les défauts de la voie de signalisation cités ci-dessus ont une pénétrance complète causant des infections à mycobactéries récidivantes et réparties à travers le monde. (38) (Figure 7)

En cas d'un défaut complet, la maladie prend une forme disséminée et précoce et cause des granulomes lépromatoïdes. Le pronostic est sombre.

A contrario, en cas de déficit partiel, la maladie cause des granulomes tuberculoïdes de façon récurrente chez les patients à l'âge adulte. Le pronostic est meilleur que dans les déficits complets.(38)

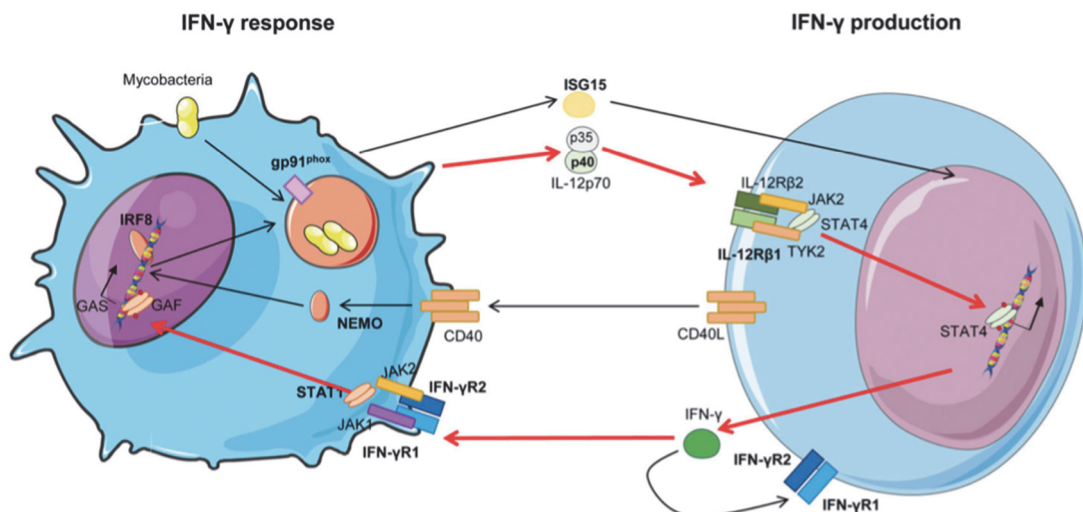


Figure 8 : Voie de signalisation de l'interféron gamma et les molécules impliquées. Des anomalies des molécules dont le nom est écrit en noir sont décrites comme étant associées à des MSMD. (7)

On est convaincu de la corrélation génotype/phénotype dans cette pathologie.

Les éléments de la voie de l'interféron gamma susceptibles d'être mutés et de perturber l'action de l'interféron gamma sont représentés en gras sur la figure 8 pour les anomalies génétiques responsable de MSMD et leurs modes de transmission, le pronostic et le pathogène le plus fréquent. (Figures 8 et 9) (7,21)

## II.2 Production d'auto-anticorps neutralisants anti-interféron gamma

Nous allons rapporter ici l'ensemble des cas décrits dans la littérature

Les infections rapportées dans la littérature sont survenues chez des adultes immunocompétents, non atteints par le VIH (Virus de l'Immunodéficience

	Transmission	Infections		Pronostic
		Salmonellose	Autres	
<b>IFNGR1/R2</b>				
<i>complète</i>	AR	oui	Herpes virus, virus respiratoires, Listeria	sévère
<i>Partielle</i>	AR	oui		bon
<i>Partielle</i>	AD	oui	Histoplasmose	bon
<b>IL12B</b>	AR	oui	Candida, Nocardiose, Klebsielle	réserve
<b>IL12RB1</b>	AR	oui	Candida, Klebsielle	réserve
<b>STAT1 LOF</b>				
<i>complète</i>	AR	non	Herpes virus	sévère
<i>Partielle</i>	AR	oui	Herpes virus	réserve
<i>Partielle</i>	AD	non		bon
<b>IRF8</b>	AR	non	Candida	sévère
	AD	non		bon
<b>IGSG15</b>	AR	oui		bon
<b>NEMO</b>	XR	non	Herpes virus, pyogènes	réserve
<b>CYBB</b>	XR	non		réserve
<b>GATA 2</b>	AD	non	HPV, CMV, EBV, Histoplasmose, aspergillose	sévère

Figure 9 : Tableau de synthèse des atteintes, leur mode de transmission, les pathogènes incriminés et le pronostic des MSMD. (23)

Humaine) et présentant un tableau de lymphadénites.

## 2.1 Description dans la littérature

### A Description initiale

Le travail de Sarah Browne et son équipe a permis de décrire l'existence d'un auto-anticorps anti-interféron gamma neutralisant. (39)

L'équipe a analysé en détail les fonctions immunitaires de 97 patients d'origine asiatique répartis en 2 groupes

- Groupe 1 : 52 patients souffrant d'une infection disséminée à MNT
- Groupe 2 : 45 patients souffrant d'une infection opportuniste avec ou sans mycobactérie

Les patients non apparentés ont été comparés à 3 autres groupes :

- Groupe 3 : 9 patients atteints de tuberculose disséminée
- Groupe 4 : 49 patients atteints de tuberculose pulmonaire
- Groupe 5 : 48 sujets sains (donneurs de sang)

L'équipe a dépisté 41 anticorps anti-cytokines par immunoprécipitation dirigés contre les cytokines suivantes :

- Interférons  $\gamma$ ,  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$ ,  $\epsilon$ ,  $\lambda 1$ ,  $\lambda 3$ , and  $\omega$
- Interleukines  $1\alpha$  and  $1\beta$
- Récepteur antagoniste à l'interleukine 1
- Interleukines 2, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 12p35, 12p40, 15, 17A, 17F, 18, 21, 22, 23p19, 27p28, 32 et 33
- Epstein–Barr virus–induced gene 3 protein (interleukin-27b)
- Granulocyte Colony-Stimulating Factor (G-CSF)
- Granulocyte–Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF)
- TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  )
- TNF- $\beta$
- B-cell–activating factor

- Proliferation Inducing Ligand
- Fas ligand (FasL)
- CD40 ligand
- Érythropoïétine
- TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ )
- Le domaine extracellulaire récepteur CD4.

Les patients avec un anticorps anti-interféron gamma détectés par immunoprécipitation ont aussi été testés en cytométrie en flux. Les PBMC mises en culture sont analysées en cytométrie en flux pour explorer la voie de l'interféron gamma et étudier le caractère neutralisant de l'anticorps. (36)

Les anticorps anti-interféron gamma sont retrouvés par ELISA chez respectivement 81% et 96% des patients dans les groupes 1 et 2.

Le sérum des patients du groupe 2 inhibent l'activité de l'interféron gamma lors du test fonctionnel mentionné.

Ces anticorps sont retrouvés plus rarement dans les autres groupes :

- Le groupe 3 : 11% des individus du groupe sont positifs
- Le groupe 4 : 2% des individus du groupe sont positifs
- Le groupe 5 : 2% des individus du groupe sont positifs

Il faut noter que 3 patients de l'étude sans infection opportuniste (groupe 5) ont des taux élevés d'anticorps anti-interféron gamma détectés par immunoprécipitation. Dans les trois cas, le test fonctionnel s'est révélé négatif. (36) (Figure 10)

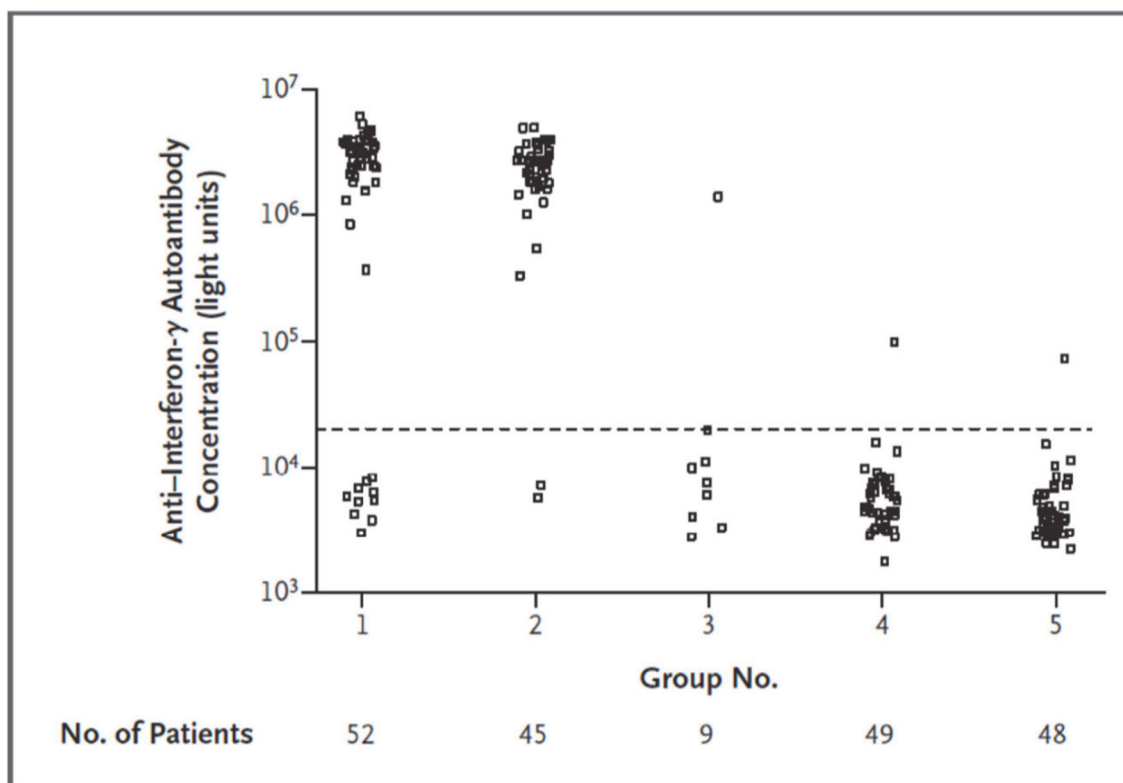


Figure 10 : Représentation graphique des patients avec des auto-anticorps anti-interféron gamma ou non par groupe.

La ligne pointillée correspond au 99<sup>ème</sup> percentile estimé d'après les groupes 4 et 5. Les groupes à infections disséminées à MNT et les infections opportunistes ont le taux d'anticorps anti-interféron gamma le plus élevé. (36)

## B Cas rapportés

Référence de l'article	Nombre de patients	Sexe/âge/ethnie	Clinique	Détection de l'anticorps et résultats du test fonctionnel
Döffinger (40)	1	Masculin/ 47 ans /Philippin	Fièvre, ictère ascite, adénopathies diffuses à <i>M. tuberculosis</i> , expectorations	Anticorps détecté par immunoprécipitation / Anticorps neutralisant
Höflich (41)	1	Féminin/ 25 ans / Thaïlandaise	Lymphadénite nécrosante à <i>M. chelonae</i> et <i>B. coccovenans</i> létale	Anticorps anti-interféron gamma non testé par cytométrie en flux
Picque (42)	1	Féminin / / Thaïlandaise	Patiente VIH négative avec un tableau de lymphadénite nécrosante à <i>M. fortuitum</i> favorable à l'antibiothérapie. Rechute clinique 6 mois après avec toux sèche, expectorations blanchâtres et un lavage broncho-alvéolaire mettant en évidence <i>M. avium</i> et <i>M. scrofulaceum</i>	Anticorps détecté par l'hôpital Necker / Anticorps neutralisant
Hanitsch (43)	1	Féminin / 65 ans / Caucasienne	Amaigrissement, hypercalcémie, infection disséminée des poumons, du pancréas et des adénopathies diffuses. La culture a mis en évidence <i>M. avium</i> .	Un ELISA a détecté des auto-anticorps anti-interféron gamma, neutralisants par cytométrie en flux
Chan (44)	3	Féminin / Asiatique	Dermatoses cutanées	Auto-anticorps anti-interféron gamma neutralisants
Shima (45)	1	Masculin / 66 ans / Asiatique	Infection disséminée à <i>M. avium</i>	Auto-anticorps anti-interféron gamma neutralisants
O'Connell (46)	1	Féminin / 39 ans / Caucasienne	Tableau de dyspnée avec adénopathies diffuses objectivées par la TDM. Les biopsies ganglionnaires ont mis en évidence <i>M. avium</i> . En dépit de l'antibiothérapie bien conduite, rechute clinique à distance avec lésions ostéolytiques et convulsions. Aucun déficit immunitaire objectivé.	Auto-anticorps anti-interféron gamma neutralisants
Yamada (47)	1	Masculin / 76 ans / Japonais	Fièvre persistante de plus de 6 mois, amaigrissement de 10 kg accompagné d'adénopathies inguinales et cervicales. <i>M. intracellulare</i> a été mis en évidence lors de la culture des biopsies ganglionnaire médiastinale.	Auto-anticorps anti-interféron gamma neutralisants
Yerramilli (48)	1	Féminin / 28 ans / Indienne	Fièvre, céphalées, douleurs abdominales accompagnées de sueurs nocturnes et un amaigrissement significatif de 30 kg chez une patiente sans antécédents médicaux, VIH négatif ni déficit immunitaire. Test du Quantiféron réalisé s'est montré indéterminé. Une TDM TAP a révélé des adénopathies diffuses. La culture de ces adénopathies a montré la présence de <i>M. abscessus complex</i> . Une tri-antibiothérapie associée à deux cure de Rituximab ont permis de traiter efficacement la patiente.	Auto-anticorps anti-interféron gamma neutralisants
Namkoong (49)	1	Masculin / 74 ans / Japonais	Adénopathies diffuses confirmées par la TDM avec <i>M. avium</i> à la culture de ces adénopathies. Un mois après la fin de l'antibiothérapie, le patient a présenté un ictère accompagné d'un nodule hépatique portal à l'échographie. Le bilan immunologique réalisé s'est révélé tout à fait normal avec un test du Quantiféron indéterminé.	Auto-anticorps anti-interféron gamma neutralisants
Aoki (50)	50	Revue de la littérature	infections disséminées à MNT	62% d'auto-anticorps anti-interféron gamma neutralisants parmi la cohorte
Wongkulab (53)	11	Féminins / Thaïlandaise	infections disséminées à MNT VIH négatif	100% d'auto-anticorps anti-interféron gamma neutralisants au sein de la cohorte étudiée.
Valour (21)	63	Revue de la littérature	Infections disséminées à MNT : l'étude a montré que cette pathologie atteint préférentiellement la femme d'origine asiatique avec un âge médian de 48 ans	92,2% de la cohorte a un auto-anticorps anti-interféron gamma neutralisant.
Xu (51)	1	Féminin / 43 ans / Chinoise	Fièvre récurrente pendant 8 mois hospitalisée pour des adénopathies ulcérales avec collection de pus. <i>M. avium</i> a été détecté dans la biopsie et le traitement antibiotique à large spectre a été débuté	Auto-anticorps anti-interféron gamma neutralisants
Patel (52)	35	Mixte	Infections disséminées ou pulmonaires à MNT sans immunodéficience	6 sur 35 ont un auto-anticorps anti-interféron gamma positif et neutralisant et les 6 sont des femmes de l'Asie de l'Est atteintes d'infections disséminées.

Tableau 1 : Synthèse des différentes études parues sur les infections disséminées à MNT avec auto-anticorps anti-interféron gamma.

Sont regroupés dans le tableau 1, tous les cas d'infections disséminées à MNT avec auto-anticorps anti-interféron gamma rapportés dans la littérature. (21,40–45,45–54)

### C Étude la plus récente

L'étude la plus récente se concentre sur 331 japonais atteints d'une infection à mycobactérie :

- 189 patients atteints de tuberculoses pulmonaires
- 91 patients atteints d'infections pulmonaires à MNT
- 51 patients atteints d'infections disséminées à MNT

38 patients ont un taux élevé d'anticorps anti-interféron gamma soit 11,5% avec une prévalence de 9,4% d'anticorps neutralisant (soit 31 patients).

Les 7 patients ayant des anticorps non-neutralisants sont atteints d'une forme localisée d'infection à mycobactérie.

Parmi les patients atteints d'infections disséminées à MNT, 30 sur 37 patients immunocompétents (81,1%) ont un auto-anticorps anti-interféron gamma ainsi que 1 patient immunodéprimé sur 13 (7,8%).

La présence de l'auto-anticorps anti-interféron gamma se retrouve surtout chez des patients immunocompétents avec un tableau clinique d'infections disséminées à MNT. (50)

62% des patients atteints d'infections disséminées à MNT et sans infection VIH ont un anticorps anti-interféron gamma dans leur sérum.

Les formes pulmonaires tuberculeuses et à MNT ne comportent pas de patient avec un anticorps anti-interféron gamma positif.

Cette étude confirme les données de l'étude de Browne. (39)

## D Conclusions tirées des observations

Les caractéristiques démographiques de ce phénomène auto-immun semblent se préciser.

En définitive, on pourrait décrire le patient type atteint par cette pathologie comme une patiente d'une cinquantaine d'années d'origine asiatique sans antécédents médicaux. (55)

Cliniquement, le tableau est celui d'infections extra-pulmonaires, disséminées à MNT, réfractaires au traitement antibiotique mais les patients sont aussi atteints par des salmonelloses, des infections à CMV, des toxoplasmoses cérébrales ainsi que des réactivations zostériennes. (56,57)

### 2.2 Le déterminant antigénique

L'épitope reconnu par les anticorps neutralisants anti-interféron gamma est un peptide décrit par l'équipe asiatique de Lin. (58)

La séquence identifiée est la suivante IQVMAELSPA AKTGKR KRSQMLFRGRRASQ, localisée entre les acides aminés 121 et 131 Il s'agit d'une région cruciale pour le récepteur de l'interféron gamma.

Un travail expérimental chez l'homme a montré que l'apparition des auto-anticorps anti-interféron gamma serait liée à une réaction croisée ou plutôt une reconnaissance de l'interféron gamma après immunisation contre la protéine aspergillaire Noc2 (NO C2 domain). En effet, l'homologie structurale de l'interféron gamma et de cette protéine Noc2 est clairement visible. Le mimétisme moléculaire semblerait être à l'origine de la synthèse des auto-anticorps anti-interféron gamma. (Figure 11)

La protéine Noc2 recombinante est extraite d'*A. fumigatus* et d'*A. terreus*. Ce peptide a été mis en contact avec des plasmas contenant des auto-anticorps anti-interféron gamma. Les anticorps anti-interféron gamma reconnaissent les deux antigènes. La réactivité croisée avec l'interféron gamma a été testée par ELISA compétitif et a montré une réaction croisée entre la protéine Noc2 et l'interféron gamma. (58)



Protein	Species	AA		AA	Positive	Accession code
IFN- $\gamma$ <sub>125-133</sub>	<i>Homo sapiens</i>	125	AAKTGKRKRSQML	133	–	NP_000610.2
Ribosome assembly protein Noc2	<i>Aspergillus terreus</i>	105	TPKTGKRKRSEQQ	113	9/9 (100%)	XP_001214344.1
Ribosome assembly protein Noc2	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	TPKIGKRKRSEEQ	108	8/9 (89%)	EDP56846.1
Ribosome assembly protein Noc2	<i>Aspergillus flavus</i>	102	TPKTGKRKRTEEQ	110	8/9 (89%)	XP_002373233.1
Ribosome assembly protein Noc2	<i>Aspergillus nidulans</i>	103	SPKIGKRKRSETQ	111	8/9 (89%)	XP_658550.1
Ribosome assembly protein Noc2	<i>Aspergillus niger</i>	102	TPKIGKRKRSEEQ	110	7/9 (78%)	XP_001389499.2
Hypothetical protein CNAG_05000	<i>Cryptococcus neoformans</i>	623	LGSTGKRKRSSMG	631	7/9 (78%)	AFR94265.1
Hypothetical protein OCO_15660	<i>Mycobacterium intracellulare</i>	124	NPAGGKRKRKSQ – –	132	7/9 (78%)	WP_014382078.1
Diguanylate cyclase	<i>Clostridium sp.</i> MSTE9	14	KEQSKKRKRQMT	22	6/9 (67%)	WP_009062637.1

Amino acid numbers correspond to those of proteins in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database. AA, amino acid number.

Figure 11 : Séquence de la protéine NOC2 et son analogie avec l'interféron gamma.

On remarque que le motif KRKR est compris dans la structure de l'interféron gamma et de cette protéine Noc2, le mimétisme moléculaire peut être, ici, la cause de la reconnaissance de l'interféron gamma par les anticorps anti-Noc2. (55)

Noc2 est une protéine fongique impliquée dans le transport extra-nucléaire des ribosomes fongiques.

Dans cette même étude, six rats ont été immunisés avec le peptide aspergillaire Noc2 en suspension dans de l'albumine ovine. Les rats ont développés des anticorps anti-Noc2 qui reconnaissent l'interféron gamma humain. Inversement, les rats immunisés par l'interféron gamma humain ont développé des anticorps anti-interféron gamma qui reconnaissent le peptide aspergillaire Noc2.

A contrario, les anticorps anti-interféron gamma mis en évidence parmi les patients sains, sans infection disséminée, ne reconnaissent pas le peptide Noc2 et ne sont pas neutralisants en cytométrie en flux vis-à-vis de l'interféron gamma.

L'étude a aussi montré que les anticorps anti-interféron gamma non-neutralisants ont la capacité de fixer l'interféron gamma et donc de perturber son dosage mais son activité biologique est préservée.

Cette équipe a aussi montré que les anticorps anti-interféron gamma neutralisants reconnaissent la partie C-terminale de l'interféron, au niveau d'un épitope linéaire contenant le motif KRKR :

- Motif nécessaire pour assurer l'activité biologique de l'interféron gamma et la liaison à son récepteur.
- Motif contenu aussi dans le peptide aspergillaire Noc2. (59)

Ce motif est conservé par différentes espèces assurant ainsi le rôle biologique de l'interféron gamma et conférant son rôle neutralisant à l'anticorps anti-interféron gamma. (Figure 12)

	116	121	127	
<i>B. taurus</i>	VMNDLSPKSNLR	KRKRS	SQNLFRGRRASM	
<i>E. caballus</i>	VMNDLSPKANLR	KRKRS	SQNPFRGRRALQ	
<i>S. scrofa</i>	VMNDLSPRSNLR	KRKRS	SQTMFQGQRASK	
<i>G. gallus</i>	ILQKLVDPP-	SFKRKRS	SQSQRRCNC	
<i>M. musculus</i>	VVHQLLPESLR	KRKRS	SRC	
<i>H. sapiens</i>	VMAELSPA	AKTG	KRKRSQMLFRGRRASQ	

Figure 12 : Motif d'acides aminés KRKR conservé par différentes espèces. Sa reconnaissance en tant qu'épitope par un auto-anticorps lui permet d'être neutralisant. (55)

### 2.3 Origine des auto-anticorps : hypothèses

L'auto-immunité résulte d'une rupture de la tolérance du soi par le système immunitaire.

Cette rupture conduit à l'activation de lymphocytes T et B auto-réactifs qui vont entraîner la production de cellules effectrices ou, comme dans notre sujet, d'auto-anticorps ciblant des constituants de l'hôte.

Les auto-anticorps peuvent être responsables de lésions cellulaires et tissulaires.

La capacité des anticorps anti-cytokines à provoquer des manifestations cliniques dépend de leurs pouvoirs neutralisants ou stimulants, de leurs concentrations dans la circulation ou dans le tissu atteint, de leurs avidités ou encore des épitopes reconnus par les anticorps. (56)

L'origine du déclenchement des maladies auto-immunes est multifactorielle et peut associer :

- Une prédisposition génétique : les maladies auto-immunes (MAI) sont polygéniques et dépendantes de loci de susceptibilité dans un environnement donné et d'un phénotype Human Leukocytes Antigene (HLA) particulier :
  - Le HLA-DRB1 et le HLA-DR2 semblent avoir une prévalence accrue dans la population atteinte par les infections disséminées à MNT et est retrouvée majoritairement chez les personnes d'origine asiatiques. (60)
  - La production d'auto-anticorps anti-interféron gamma est plus importante dans les populations d'origine asiatique et est significativement associée à certaines molécules HLA de classe II comme HLA-DRB1\*15 :02–HLA-DQB1\*05:01 et HLA-DRB1\*16:02–HLA-DQB1\*05:02. (21,58,61)
  - Ces haplotypes sont très fréquents parmi les populations asiatiques ; sa prévalence est de 2,6% à 18,8%. La prévalence élevée de cet haplotype pourrait expliquer la plus grande prévalence des infections disséminées à MNT à anticorps anti-interféron gamma parmi cette population. (61)
- Une activation de cellules auto-réactives ignorantes vis-à-vis d'antigènes séquestrés (antigènes du cristallin) ou d'antigènes cryptiques (peptides cryptiques de la protéine basique de la myéline lors de la sclérose en plaques) présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)
- Une activation de cellules anergiques associée à :
  - Un mimétisme moléculaire : reconnaissance d'épitopes communs aux antigènes du soi et aux antigènes d'agents. (58,62) Le motif KRKR commun entre l'interféron gamma humain et le peptide Noc2 est en faveur de cette hypothèse pour la synthèse des auto-anticorps anti-interféron gamma neutralisants.
  - Une activation des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) qui stimulent les récepteurs de l'immunité innée permettant la synthèse de cytokines pro-inflammatoires. Ces cytokines peuvent donc sélectionner et permettre l'émergence d'un clone lymphocytaire auto-réactif.

- Une stimulation polyclonale non spécifique
- Un défaut des cellules régulatrices

#### *2.4 Infections disséminées à MNT à auto-anticorps anti-interféron gamma neutralisants : maladie auto-immune ?*

La seule détection des auto-anticorps circulants n'est pas suffisante pour étiqueter la pathologie de maladie auto-immune. Réactualisés en 1993, ce sont les critères suivants émis par l'équipe de Rose qui définissent la maladie auto-immune :

- Par la mise en évidence indirecte via reproduction de la maladie dans un modèle animal
- Par la mise en évidence directe via transfert des anticorps ou des cellules T d'un individu à un autre pour observer le développement de la pathologie
- Par l'indice clinique correspondant à l'amélioration des symptômes après la prise en charge thérapeutique (63)

#### *2.5 Effets biologiques des anticorps anti-interféron gamma*

Il n'est pas seulement important de mesurer le titre des auto-anticorps, le test fonctionnel a toute son importance. La place du cytomètre de flux est cruciale pour réaliser ce test.

Les anticorps anti-interféron gamma inhibent la phosphorylation de STAT1 empêchant l'interféron gamma d'assurer son rôle.

Dans un premier temps, ils inhibent la différenciation des macrophages en macrophages M1 ayant une capacité accrue à lyser les cellules infectées. (64)

De plus, ils inhibent de façon notoire la production de radicaux libres oxygénés et de ROS (Reactive Oxygen Species) pour la lutte contre les germes intracellulaires. Les auto-anticorps anti-interféron gamma ont une activité biologique démontrée. (65)

Cette activité pourrait s'expliquer par 3 hypothèses selon l'équipe d'Aoki (50) :

- La primo-infection sévère à MNT avec auto-anticorps anti-interféron gamma neutralisant chez des patients immunocompétent ni facteur de risque entraîne, pour le patient, une immunodéficience.
- Les patients, au stade initial de l'infection à MNT, présentent un tableau clinique non spécifique et consultent un médecin qui, devant ce tableau, peut évoquer un processus inflammatoire et prescrire une corticothérapie, celle-ci va permettre de créer l'état d'immunodéficience attendue.
- Les patients sans anticorps anti-interféron gamma n'ont pas reçu de corticothérapie, ils sont donc immunocompétents et développent des infections à localisations osseuses

## *2.6 Modalités de détection*

### *A La technique ELISA*

La technique la plus fréquemment utilisée pour la mise en évidence des auto-anticorps anti-interféron gamma est l'ELISA. Cette technique repose sur la reconnaissance par un anticorps d'un antigène préalablement adsorbé sur un support plastique. (66)

L'anticorps, s'il est présent dans notre échantillon, va par la suite être reconnu par un anticorps secondaire couplé à une enzyme. (67) On dépose ensuite un substrat chromogénique qui va être consommé par l'enzyme et donner un signal, une densité optique proportionnelle à la concentration en anticorps contenu dans le sérum. (Figure 13) (66)

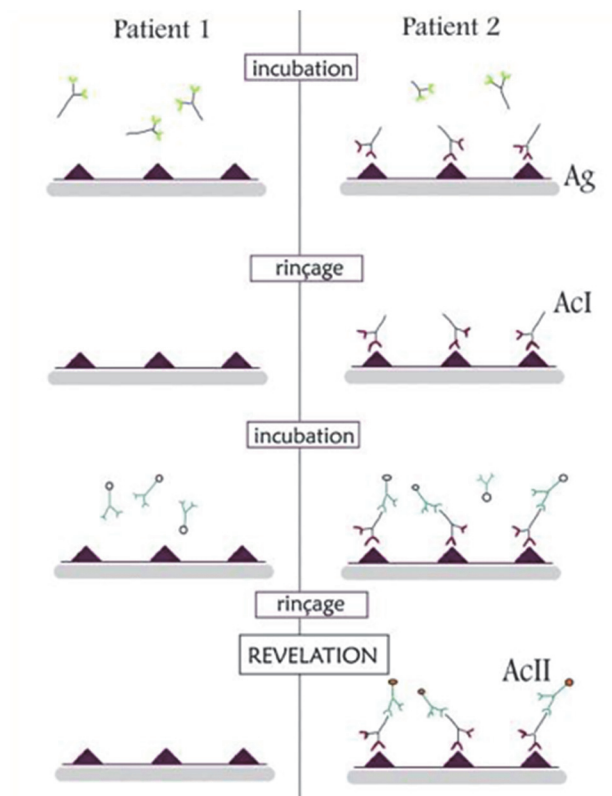


Figure 13 : Représentation schématique des différentes phases d'un ELISA.

Patient 1 négatif pour l'anticorps recherché. Patient 2 positif pour l'anticorps recherché.

Plaques revêtues de l'antigène ; dépôt et incubation du sérum, rinçage pour éliminer ce qui n'est pas fixé ; dépôt et incubation du conjugué couplé à une enzyme ; rinçage et pour terminer dépôt et incubation du substrat de l'enzyme pour la révélation

Patient 1 : absence de signal

Patient 2 : signal proportionnel à son titre d'anticorps. (66)

Nous avons comparé les différents Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) mis en œuvre dans différentes études pour la détection des anticorps anti-interféron gamma. (43,45,53,68–71) Cette revue de la bibliographie fait l'objet de du tableau 2.

	Wongkulab (53)	Doffinger (40)	Wu (69)	Hanitsh (43)	Shima (45)	Koya (70)	Lee (71)
Solution de coating	100 ng d'interféron gamma par puits dans du tampon bicarbonate/carbonate.	2 microgrammes par mL	1 microgramme d'interféron gamma par puits	100 microL ( Imukin ) dans NACO3 pH 9,6	1microg/mL	1000 picog/mL	4 microg/ml (R&D)
Plaque ELISA utilisée	Maxisorb Immunoplate (Nunc)	Maxisorb Immunoplate (Nunc)	Microtitre plates (Nunc)	Maxisorb plate ( Nunc )	Coaster EIA/RIA plate. (Corning Inc.)	NI	Cotar 8 well strip (Sigma)
Durée d'incubation du coating et température	Overnight à 4°C	NI	Overnight à 4°C	2h à 37°C	A température ambiante	Overnight à 4°C	24h
Nombre de lavages et solution de lavages	4 fois Tween PBS ( 0,1% Tween 20/PBS Sigma )	NI	3 fois Tween PBS ( 0,1% Tween 20 / PBS Sigma )	NI	NI	NI	3 lavages avec 0,05% tween 20/PBS
Solution de blocage utilisée	200 microL lait PBS 5%	Lait PBS 5%	NI	PBS / 5% BSA	NI	NI	300 microL de 1% BSA dans PBS pendant 1h
Durée d'incubation du sérum et température	1h à 37°C	NI	3h à température ambiante	2h à température ambiante	NI	NI	1h à 37°C
Contrôle positif utilisé	NI	NI	Anticorps recombinant de souris anti-IFN gamma humain	Anticorps de chèvre anti-IFN gamma humain couplé à HRP (Kit Quantiféron)	NI	NI	NI
Dilution du sérum à tester utilisé	1/1000	1/100 et 1/1000	1/1000	1/100	1/1000	1/10; 1/100; 1/1000; 1/10000	5 dilutions 1/10 100 1000 5000 50000
Nombre de lavages et solution de lavages	4 fois tween PBS ( 0,1% Tween 20/PBS Sigma )	NI	3 lavages	NI	NI	NI	NI
Anticorps conjugué utilisé et sa dilution	Anticorps de chèvre anti IgG humaine au 1/2000 (Invitrogen)	Anticorps de lapin anti IgG humaine au 1/2000 (Dako)	Anticorps de mouton anti IgG humaine au 1/2000 (Thermo Scientific)	Anticorps de chèvre anti IgG humaine au 1/2000 (Star106P)	Anticorps anti IgG humaine couplé à la peroydase au 1/3000 (Life technologies Corporation)	NI	Anticorps anti-IFN gamma humain (Kit R&D de dosage de l'interféron gamma)
Durée d'incubation du conjugué et température	1h à 37°C	NI	1,5h à 37°C	NI	NI	NI	NI
Substrat utilisé pour la révélation	Phénylénédiamine Dihydrochloride	Tétraméthyl-benzidine	NI	NI	Tétraméthyl-benzidine	NI	NI

Tableau 2 : Tableau comparatif des différents protocoles utilisés pour la détection des auto-anticorps anti-interféron gamma dans la littérature.

## B Cytométrie en flux

Cet examen réalisé au laboratoire d'Immunologie repose sur l'incubation de cellules THP-1 avec de l'interféron gamma et l'analyse de la phosphorylation de STAT1 de celles-ci en cytométrie en flux. Les cellules THP-1 ATCC TIB-202 (LGC Standard, Molsheim, France) sont des cellules humaines non adhérentes issue d'une lignée tumorale myélo-monocytaire. Décongelées au bain-marie à 37°C, elles sont ensuite mises en culture dans du RPMI complet.

Les cellules, au nombre de 200 000 par puits, sont mises à incuber à 37°C avec de l'interféron gamma recombinant (BioLegend) à 100 microgrammes/mL dans une plaque 96 puits pendant 20 minutes à 37°C avec l'un de ces éléments par puits :

- L'anticorps monoclonal recombinant IgG1 de souris anti-interféron gamma humain
- Le sérum AB humain recombinant
- L'anticorps irrelevant IgG1 de souris utilisé comme contrôle isotypique
- Le sérum à tester

La plaque est centrifugée et les culots sont repris dans du sérum de veau foetal (SVF) à 37°C.

Après cette étape de stimulation, les monocytes sont fixés par une solution de paraformaldéhyde (solution qui préserve le statut de phosphorylation de la protéine) pendant 10 minutes à température ambiante et rendus perméables grâce au méthanol pendant 5 minutes à 37°C.

Après centrifugation, le culot est remis en suspension dans le SVF et mis pendant 20 minutes à température ambiante avec un mix d'anticorps couplés à des fluorochromes différents l'un l'autre. Ce mix contient :

- Un anticorps anti-CD14-FITC pour marquer les monocytes
- Un anticorps anti-phosphoSTAT1-PE pour le marquage intracellulaire de phosphoSTAT1 ; signe de l'état de phosphorylation de STAT1 et donc la signalisation en aval du récepteur à l'interféron gamma après sa fixation à son récepteur.

L'échantillon est lavé puis est ensuite analysé par un cytomètre en flux BD FACS CANTO II et les données ensuite exploitées avec le logiciel Flow Jo.

En présence d'interféron gamma, les cellules THP1 expriment phosphoSTAT1.

Si l'anticorps s'avère neutralisant, il inhibera la phosphorylation de STAT1, phosphoSTAT1 sera diminué.

Le plasma contenant de l'héparine a un rôle inhibiteur dans la phosphorylation de STAT1. (72) Il faut donc prendre en compte, dans le test fonctionnel, le rôle inhibiteur de l'héparine, glycosaminoglycane, qui sature le récepteur de l'interféron gamma par compétition l'empêchant d'assurer son rôle de cytokine.



## C Multiplex

L'approche innovante de cette technique repose sur le principe de billes à fluorescence propre, sur lesquelles des cytokines sont fixées en surface. Les anticorps anti-cytokine(s) du patient se fixent sur la(les) cytokine(s).

Les complexes immuns sont révélés par des anticorps anti-IgG humaines liés à des fluorochromes différents (73). Il n'existe pas pour l'instant de kits commerciaux disponibles pour cette approche pour la détection des auto-anticorps anti-cytokines.(73)

# Objectifs de la thèse

La mise en évidence des auto-anticorps anti-interféron gamma permet le diagnostic des formes disséminées des infections à mycobactéries non tuberculeuses à auto-anticorps anti-interféron gamma.

Actuellement, aucune technique de détection de ces auto-anticorps n'existe en routine. Ce sont des techniques dites maison et non standardisées.

Mon travail a consisté en l'élaboration d'une technique ELISA de détection des anticorps applicable en routine dans le laboratoire d'Immunologie de la Conception et de son optimisation.

Après nous être appuyés sur divers protocoles retrouvés dans la littérature, nous avons instauré notre propre protocole en modifiant et adaptant ceux de la littérature. (43,45,69–71)

Le dépistage des infections disséminées à MNT avec auto-anticorps anti-interféron gamma documenterait certaines situations inexplicables d'immunodéficience afin de permettre une prise en charge adaptée au patient.

La mise au point et la maîtrise des différentes étapes de la technique ELISA constitue donc l'ensemble du travail réalisé.

## Patients et méthodes

## I Sélection des groupes de patients

### I.1 Groupe sélectionné d'après un critère biologique

La première population testée est constituée de 106 patients sélectionnés selon des critères biologiques via le Quantiféron.

Le test du Quantiféron est un test biologique basé sur un test ELISA évaluant la concentration en interféron gamma par stimulation par des antigènes mycobactériens déjà connus par le système immunitaire (Figure 14) et aidant au diagnostic d'une infection latente à des mycobactéries du groupe *M. tuberculosis*. (55)

Le test du Quantiféron est réalisé en collectant du sang total dans 4 tubes :

- Un tube servant de contrôle négatif
- Un autre contenant la phytohémagglutinine (PHA), un puissant mitogène servant de contrôle positif
- Deux autres tubes contenant un mix d'antigènes spécifiques de *M. tuberculosis* (ESAT-6 ; CFP-10 et Tb 7.7) absents de toutes souches vaccinales (BCG par exemple) et de la plupart des mycobactéries non tuberculeuses. (69) Des réactions croisées peuvent être observées avec *M. kansasii*, *M. szulgai* et *M. marinum*.

Après une nuit d'incubation à l'étuve à 37°C, les concentrations en interféron gamma sécrété par les PBMC dans chaque tube sont mesurées. (Figure 14)

La présence d'anticorps anti-interféron gamma va interférer avec le dosage de l'interféron, notamment dans le tube contenant la PHA, donnant une concentration en interféron gamma inférieure à 0,5 UI/mL. (69,75)

C'est pourquoi, le test du Quantiféron peut être un test utile pour le dépistage des auto-anticorps anti-interféron gamma.

Dans le laboratoire d'Immunologie de la Conception à Marseille, ces tests sont réalisés et révèlent, dans certains cas, un taux d'interféron gamma très faible, inférieur à 0.5 UI/mL, dans le tube contenant la PHA, contrôle positif du test du Quantiféron®.

Il est possible que certains de ces patients produisent des anticorps anti-interféron gamma. C'est la présence de cet anticorps anti-interféron gamma qui impacte le dosage de l'interféron gamma. (70,71)

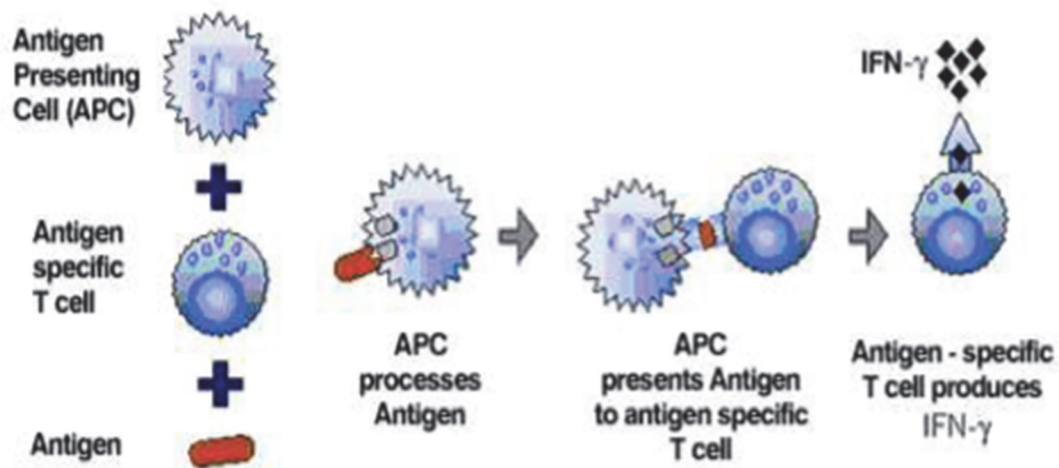


Figure 14 : Mise en évidence d'une production d'interféron gamma par les lymphocytes T d'un sujet en présence d'antigènes spécifiques du génome de *M.tuberculosis* permettant ou non la sécrétion d'interféron gamma : principe de base du test du Quantiféron® (Qiagen).

Les CPA lysent l'antigène pour le présenter aux lymphocytes T qui, grâce à ce stimulus et si l'antigène a déjà été rencontré, vont produire l'interféron gamma. (67)

Les reliquats d'échantillons ont été testés pendant environ deux semestres. Ces échantillons avaient pour caractéristiques d'avoir une concentration en interféron gamma dans le tube contenant la PHA inférieur à 0,5 UI/mL.

Les caractéristiques démographiques de nos deux groupes sont présentées dans le tableau 3.

## I.2 Groupe sélectionné d'après un critère clinique

Sélectionnée à partir de critères cliniques, la population issue de ce groupe présente des diagnostics multiples et variés, listés dans le tableau 4.

En collaboration avec le pôle Infectiologie, les reliquats de sérum ont été utilisés pour la mise au point du test et sa validation biologique.

L'échantillon de sang prélevé sera centrifugé, aliquoté et conservé à - 80°C jusqu'à la réalisation de l'analyse.

	Groupe sélectionné selon un critère biologique	Groupe sélectionné selon un critère clinique
Âge moyen	38,3 ans	46,1 ans
Âge médian	47 ans	43 ans
Pourcentage Homme/Femme	58,9%/41,1%	72%/28%
Effectif	106 patients	51 patients

Tableau 3 : Démographie des populations étudiées.

	Pourcentage de la cohorte issue de critères cliniques
Tuberculose pulmonaire bacillifère	85%
Granulome ganglionnaire avec nécrose caséeuse	7%
Adénocarcinome bronchique métastatique (BK négatif)	3%
Tuberculose disséminée avec localisation péricardique	3%
Suspicion BK	2%

Tableau 4 : Récapitulatif des différents tableaux cliniques de la cohorte sélectionnée selon le critère clinique.

### I.3 Groupe contrôle

Pour mettre en œuvre cet ELISA et définir le seuil de positivité du test, nous avons testé 72 sérums issus de l'Établissement Français du Sang (Convention Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille (AP-HM/EFS). A noter que le profil caucasien est majoritaire dans le groupe contrôle avec lequel nous avons travaillé. (Tableau 5)

Les prélèvements sont conservés à -80°C jusqu'à analyse.

	Groupe contrôle issu de patients de l'EFS
Âge moyen	47,5 ans
Âge médian	54 ans
Pourcentage Homme/Femme	62,5%/37,5%
Effectif	72 sujets

Tableau 5 : Démographie de la population de l'EFS.

## II Méthodes

Les manipulations ont été réalisées dans le service d'Immunologie Biologique de l'AP-HM (Chef de service : Jean-Louis Mège), dans les secteurs Auto-immunité et Immunologie Cellulaire (Frédéric Vély et le CEREDIH) et en partie dans l'UMR 7051 AMU-CNRS (INP, Institut de Neurophysiopathologie, directeur : Michel Khrestchatisky) (Equipe 5, Sophie Desplat-Jégo).

Tous les échantillons ont été testés en ELISA, en dupliquats. Les échantillons positifs ont été contrôlés trois fois.

Le protocole ELISA retenu est détaillé dans la section Résultats.



Les coefficients de variation (CV) ont été calculés comme suit :

$(\text{Moyenne des valeurs obtenues} / \text{écart-type}) \times 100$

Les moyennes, écart-types, médianes et centiles ont été calculés en utilisant le logiciel EXCEL Ve 16.28.

Le test fonctionnel pour étudier le caractère neutralisant des auto-anticorps anti-interféron gamma est celui présenté page 41. Il a été réalisé sur les sérums positifs en ELISA.

*Rapport-gratuit.com*   
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

# Résultats

# I Protocole ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

Nous avons retenu le protocole ELISA décrit ci-après et schématisé sur la figure 15 pour réaliser ce travail.

## I.1 L'antigène et le coating

L'antigène utilisé est de l'interféron gamma recombinant humain à la concentration de 100 microg/mL (BioLegend, San Diego, Californie).

Cet antigène est utilisé pour coater des microplaques 96 puits MaxiSorb C96 (Nuncband ; New York, USA).

Le coating s'effectue avec une solution de tampon de carbonate/bicarbonate de sodium à pH 9,6.

L'antigène est dilué dans cette solution tampon à la concentration de 1 microgramme/mL.

Cent microlitres de cette solution d'interféron gamma sont déposés dans chaque puits de la plaque correspondant à 100 ng d'interféron gamma par puits. Cette plaque coatée avec l'interféron gamma est laissée à incuber toute la nuit à 4°C.

Des plaques non coatées ont été réalisées lors de ce travail pour déterminer l'intensité du bruit de fond spécifique des échantillons testés.

## I.2 Lavages

Les plaques sont ensuite lavées manuellement par retournement avec 300 microlitres par puits d'une solution de Phosphate-Buffered Saline (PBS) (Bio Mérieux, Lyon, France) 0.05% Tween 20, 4 fois de suite.

## I.3 Saturation

Deux cents microlitres de solution PBS/lait écrémé à 5% sont déposés dans chaque puits et laissés incuber pendant 2h à température ambiante.

## I.4 Lavages

Les plaques sont ensuite lavées manuellement par retournement avec 300 microlitres par puits d'une solution de PBS (Bio Mérieux, Lyon, France) 0.05% Tween 20, 4 fois de suite.

## I.5 Dépôt des échantillons

Les sérums testés sont dilués au 1/100 dans du PBS et 100 microlitres sont déposés en duplicat.

Le temps d'incubation est de 1h à température ambiante.

## I.6 Lavages

La plaque est ensuite lavée 4 fois avec la solution PBS 0.05% Tween 20.

## I.7 Dépôt du conjugué

Le conjugué est un anticorps de chèvre anti-IgG humaines lié à la phosphatase alcaline (Jackson ImmunoResearch ; Montgomery, USA). Il est déposé dans le puits à la concentration de 0,2 ng/mL.

Cent microlitres de cet anticorps sont déposés dans chaque puits et incubés 45 minutes à température ambiante

Pour le « blanc coating », (tout sauf l'interféron gamma), on ne dépose pas l'interféron gamma dans le puits.

## I.8 Lavages

La plaque est ensuite lavée 4 fois avec la solution PBS 0.05% Tween20.

## I.9 Révélation

Le substrat utilisé est du paranitrophénylphosphate (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusset).

Cent microlitres sont déposés dans chaque puits et laissés incubés 20 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière.

## I.10 Lecture de la plaque

La plaque est ensuite lue à 405 nm avec un spectrophotomètre (Infinite F200 TECAN. Switzerland, Suisse) en utilisant le logiciel Magellan.

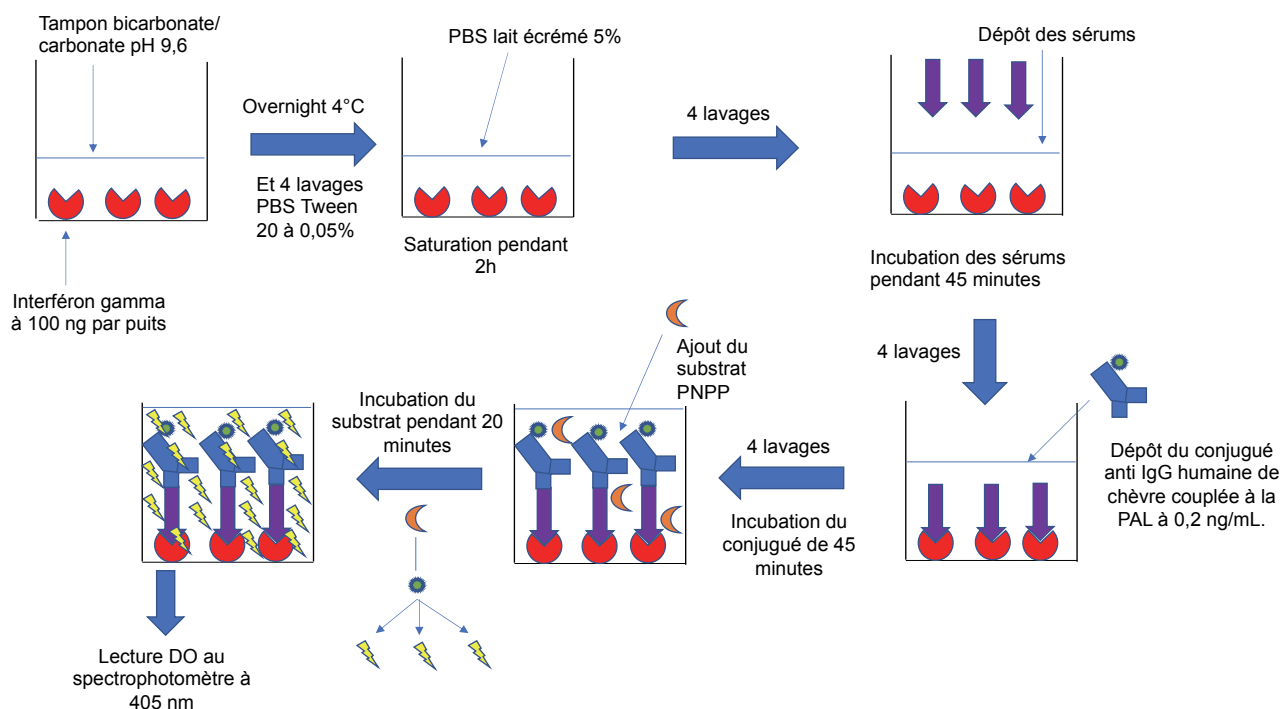


Figure 15 : Représentation schématique de l'ELISA utilisé pour la mise en évidence des auto-anticorps anti-interféron gamma dans ce travail.

## II Corrélation entre plasma et sérum

Étant donné que nous devons tester des sérums et des plasmas, nous avons jugé nécessaire d'évaluer la corrélation des résultats obtenus avec l'interféron gamma dans les deux matrices en mesurant la densité optique (DO) du sérum et du plasma pour un même patient.

Cette détermination a été réalisée pour les échantillons ci-dessous, seuls échantillons pour lesquels nous avons à la fois du plasma et du sérum. (Tableau 6)

Identification de l'échantillon	DO sérum	DO plasma
41224..	0,396	0,288
40397..	0,424	0,553
41409..	0,649	0,449
41472..	1,013	0,957
41470..	1,15	1,19
41433..	0,421	0,349
41463..	0,506	0,417
40467..	2,018	2,955
40368..	1,68	1,64
40314..	0,618	0,548
40345..	0,208	0,209
40441..	0,288	0,226
41697..	2,732	2,508

Tableau 6 : Valeurs des densités optiques en fonction de la matrice pour un même échantillon.

Le R2 ainsi déterminé est de 0,9 comme indiqué sur la courbe de corrélation plasma/sérum. (Figure 16)

La corrélation entre plasma et sérum est satisfaisante avec une légère variation de 10% correspondant à la dilution induite par l'héparine contenue dans le tube du Quantiféron®.

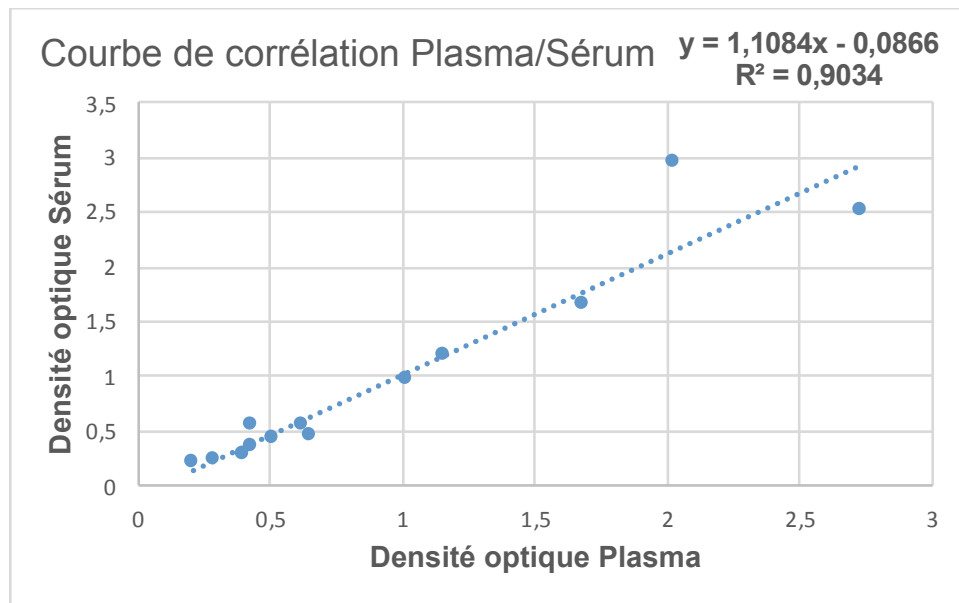


Figure 16 : Courbe de corrélation plasma/sérum établie en mesurant les DO sérum/plasma de chacun des échantillons. (n=13 patients)

### III Validation du test par un anticorps anti-interféron gamma commercial.

L'anticorps anti-interféron gamma couplé à HRP (HorseRadish Peroxidase) provenant du kit du Quantiféron® est utilisé pour démontrer et de valider la spécificité de la réaction anticorps/antigène avec le peptide utilisé, l'interféron gamma.

Il ne permet de pas de l'utiliser comme étalon car l'anticorps commercial a une concentration qui nous est inconnue (secret de fabrication Qiagen). (76)

L'anticorps est testé aux dilutions de 1/10, 1/50, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600 et 1/3200. On obtient les DO suivantes reportées sur le tableau 7 ainsi que la courbe d'étalonnage obtenue à partir des dilutions réalisées en cascade sur la figure 17.

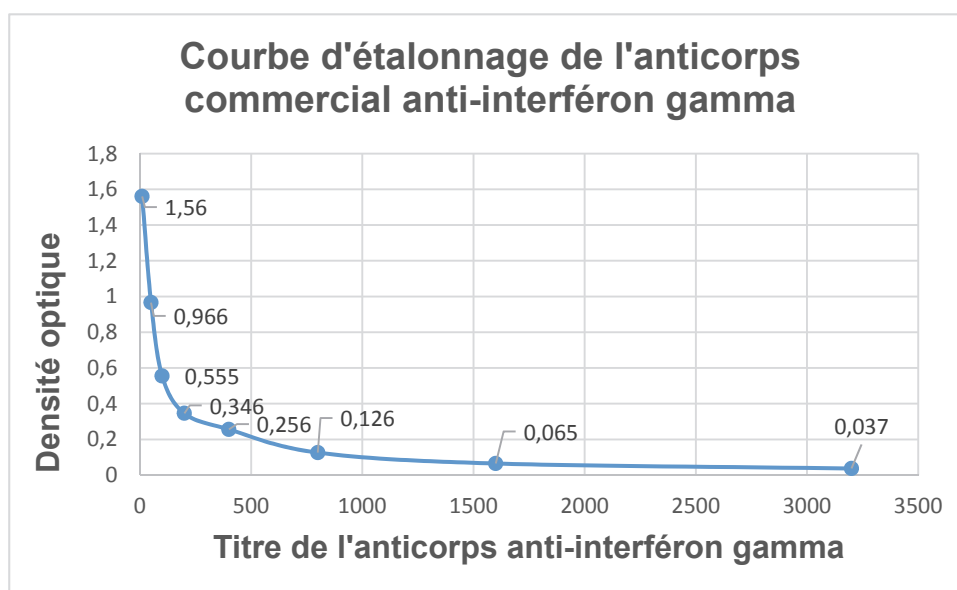


Figure 17 : Courbe d'étalonnage établie après mesure des DO de l'anticorps avec des dilutions croissantes et les valeurs obtenues.

L'aspect de la courbe est en faveur d'un excès d'antigène.

#### IV Définition de la valeur seuil à partir de sérums issus de l'Établissement Français du Sang (EFS).

La détermination du seuil de positivité se fait par mesure des DO de 72 sérums issus de donneurs de sang provenant de l'EFS selon le protocole final retenu. (Tableau 7)



Les sérums provenant de l'EFS sont testés aux dilutions de 1/100.

DO des sérums EFS au 1/100					
0,561	0,83	0,423	0,454	0,813	0,201
0,401	0,124	0,586	0,195	0,473	0,42
0,143	0,283	0,23	0,301	0,382	0,32
0,289	0,484	0,481	0,406	0,155	0,249
0,112	0,981	0,132	0,216	0,538	0,131
0,555	0,745	0,174	0,658	1,013	0,449
0,343	1,042	0,274	0,164	0,153	0,39
0,166	0,572	0,14	0,202	0,129	0,408
0,46	0,426	0,149	0,179	0,126	0,826
0,126	0,126	0,28	0,142	0,277	0,276
0,926	0,533	0,819	0,416	0,453	0,365
0,132	0,143	0,157	0,155	0,13	0,528

Tableau 7 : Valeurs des DO mesurées pour 72 échantillons EFS au 1/100.

L'analyse statistique de la répartition des valeurs des DO au sein de la cohorte EFS se trouve dans le tableau 8.

EFS 1/100	
Moyenne	0,376
Médiane	0,311
Ecart-type	0,246
Centile 99	1,021
Centile 98	0,999
Centile 95	0,873
Centile 75	0,477
Centile 25	0,156
DO minimale	0,112
DO maximale	1,042

Tableau 8 : Analyses statistiques de la population EFS.

Notre population contrôle représentée sur la figure 18 n'étant pas de répartition gaussienne, nous utilisons la méthode du percentile pour obtenir le seuil de positivité.

Vingt-cinq pour cent des valeurs sont inférieures à 0,156 et 75% des valeurs sont inférieures à 0,477. La moyenne est de 0,376 avec un écart-type (ET) (dispersion des valeurs autour de la moyenne) à 0,246.

La médiane (valeur centrale qui partage la cohorte en 2 groupes de même effectif) est de 0,311.

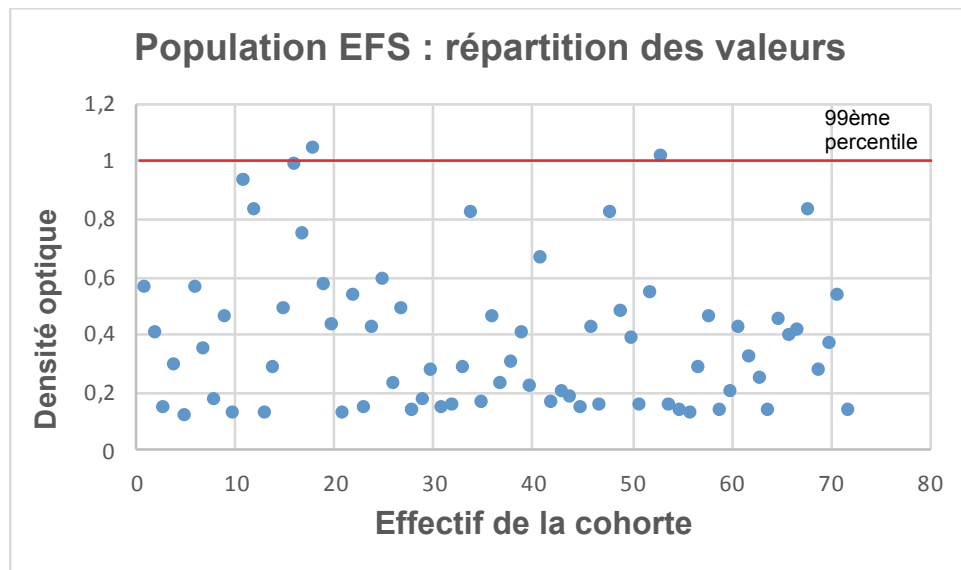


Figure 18 : Répartition des valeurs de DO obtenues en ELISA à partir des sérums contrôle.

Nous retiendrons comme seuil de positivité pour notre test ELISA une DO supérieure à 1,02 selon le 99° percentile.

## V Résultats des cohortes sélectionnées à partir de critères biologiques et cliniques

### V.1 Résultats de la cohorte sélectionnée selon des critères cliniques. (Sérums)

Echantillon	DO	Echantillon	DO	Echantillon	DO	Echantillon	DO
47968..	0,142	49012..	0,18	40590..	0,977	40919..	0,877
48156..	0,159	48832..	0,223	41544..	0,175	49622..	0,182
48156..	0,888	48885..	0,19	41452..	0,228	49386..	0,666
48156..	0,225	49206..	0,214	40942..	0,325	41060..	0,979
46971..	1,955	49300..	0,275	40050..	0,235	40318..	0,636
46940..	0,297	47695..	0,224	48491..	0,187	48656..	0,269
46540..	0,236	49359..	0,18	48715..	0,243	48658..	0,244
48214..	0,233	41199..	0,197	49157..	0,295	47346..	0,603
48212..	0,215	40787..	0,232	49946..	0,293	48784..	0,16
49896..	0,16	40104..	0,222	49262..	0,459	48823..	0,191
49038..	0,167	49014..	0,298	49975..	1,878	48924..	0,283
48911..	0,624	40332..	0,212	40827..	0,258	47346..	0,177
49633..	0,178	48636..	0,189	40203..	0,481		

Tableau 9 : Tableau récapitulatif des 51 valeurs des DO obtenues à partir des sérums sélectionnés à partir de critères cliniques.

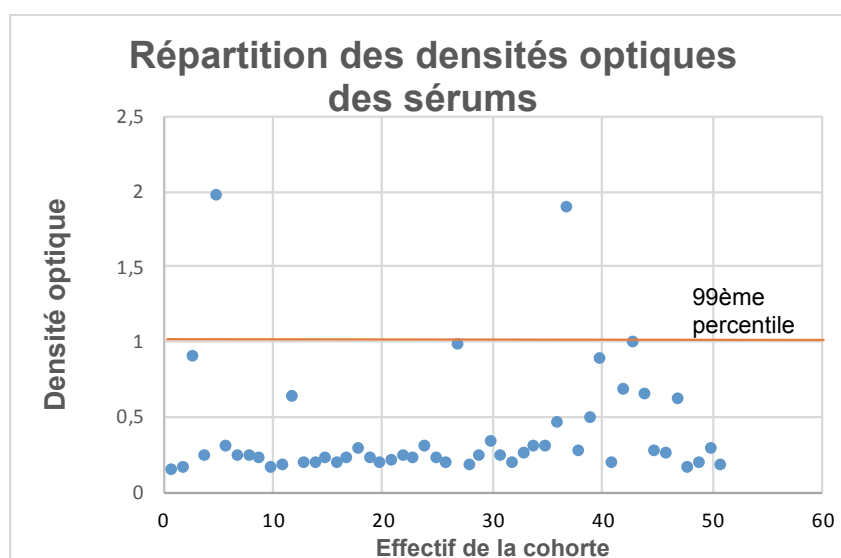


Figure 19 : Répartition des valeurs de DO obtenues à partir de sérums.

Les résultats des densités optiques obtenues à partir des sérums sélectionnés d'après un critère clinique sont présentés dans le tableau 9 et leur répartition en fonction des densités optiques est représentée sur la figure 19.

## V.2 Résultats de la cohorte sélectionnée selon des critères biologiques (Plasmas)

Les résultats des densités optiques obtenues à partir des plasmas sélectionnés d'après un critère biologique sont présentés dans le tableau 10 et leur répartition en fonction des densités optiques est représentée sur la figure 20.

Echantillon	DO	Echantillon	DO	Echantillon	DO	Echantillon	DO
49836..	0,952	40300..	0.174	40351..	0,238	48692..	0,137
49851..	0,437	40300..	0.155	41224..	0,883	48692..	0,131
48136..	0,305	40306..	0.174	41239..	0,711	48694..	0,17
48154..	0,346	40306..	0.222	41239..	0,629	48736..	0,789
48166..	0,44	40306..	0.362	41277..	0,505	48740..	0,125
48239..	0,99	40315..	0.200	41283..	0,524	48758..	0,152
48248..	0,666	40314..	0.240	41331..	0,735	48761..	0,375
48320..	0,87	40318..	0.171	41337..	0,798	48782..	0,902
48396..	1,471	40322..	0.216	41367..	0,488	48782..	0,162
48583..	0,538	40333..	0.172	41367..	0,737	48802..	0,281
48623..	0,564	40367..	0.194	41375..	0,427	48895..	0,156
48692..	0,358	40369..	0.454	48312..	0,793	48902..	0,223
49129..	0,754	40369..	0.174	48340..	0,678	48860..	0,558
49194..	0,845	40382..	0.176	46971..	0,96	48862..	0,69
49271..	0,42	40383..	0.177	40979..	0,278	48926..	0,637
49274..	0,634	40397..	0.334	41863..	0,113	48940..	0,873
49305..	0,411	40406..	0.187	41877..	0,217	48966..	0,444
49703..	0,199	40306..	0.236	41863..	0,657	48973..	0,825
49896..	0,201	40367..	0.254	41877..	0,972	49012..	0,368
40155..	0,194	40382..	0.357	48583..	0,206	49045..	0,124
40226..	0,185	40383..	0.187	48584..	0,2	49045..	0,224
40258..	0,175	40306..	0.81	48597..	0,22	49054..	0,312
40288..	1,713	40322..	0.453	48599..	0,873	49055..	0,869
40290..	0,276	40333..	0.322	48623..	0,113	49056..	0,211
40290..	1,671	40315..	0.199	48625..	0,812	48682..	0,715
40293..	0,277	40314..	0.273	48656..	0,156	40318..	0,281
40291..	1,021						

Tableau 10 : Tableau récapitulatif des 105 valeurs des DO obtenues à partir des plasmas sélectionnés à partir de critères biologiques.

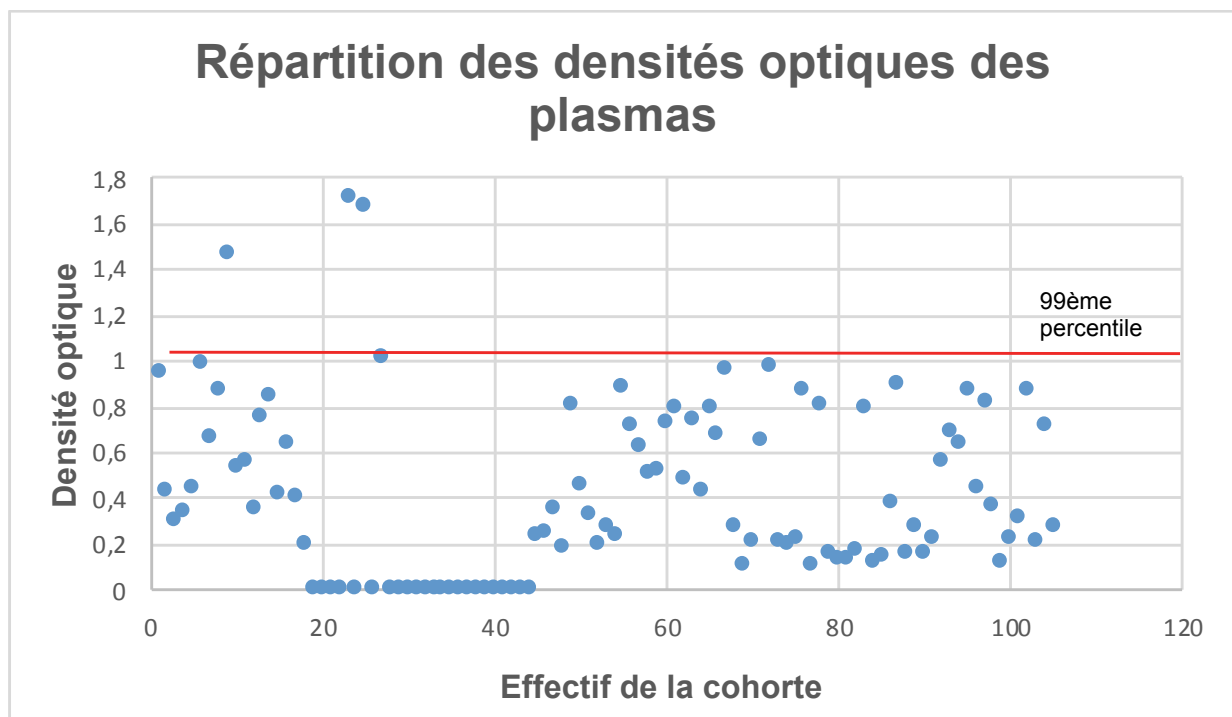


Figure 20 : Répartition des valeurs des densités optiques obtenues à partir de plasmas.

	DO 1/100	
Plasma (échantillons du Quantiféron)	48396..	1,471
	40288..	1,713
	40290..	1,671
	40291..	1,021
Sérum (échantillons du Pôle Infectiologie)	46971..	1,955
	49975..	1,878

Tableau 11 : Les six échantillons positifs et leur densité optique.

Selon la valeur seuil de positivité déterminée à 1,02, on remarque que 6 patients ont un anticorps anti-interféron gamma détecté par ELISA parmi nos groupes testés soit une prévalence de 3,8%, soit 6 individus sur 156. (Tableau 11)

## VI Détermination de la répétabilité et de la reproductibilité

Nous allons maintenant, dans les conditions définies précédemment, évaluer les performances du test.

Dans un premier temps, nous avons déterminé la reproductibilité (ou fidélité intermédiaire) en mesurant la DO d'un même échantillon inter-essais (Tableau 12)

	DO1	DO2	DO3	DO4	DO5	DO6
40290..	1,012	0,999	0.732	0.786	1,012	0,922
46971..	1.9602	1.8689	2.0443	2.0894		

Tableau 12 : Valeurs des deux échantillons utilisés pour la détermination de la reproductibilité du test.

Le coefficient de variation (CV) est de :

- 40290.. : moyenne = 0,94, écart-type = 0,12 et CV = 13,5%
- 46971.. : moyenne = 1,99, écart-type = 0,10 et CV = 4,9%

Le CV correspond à la moyenne des valeurs mesurées divisée par l'écart-type (ET) des valeurs, soit CV en % = moyenne / ET \* 100

	Différentes DO de répétabilité					
49975..	0,689	0,692	0,658	0,663	0,689	0,718
	0,817	0,868	0,74	0,764	0,618	0,725
	0,737	0,79	0,759	0,825	0,838	0,781
	0,832	0,771	0,876	0,757	0,805	0,795

Tableau 13 : Valeurs obtenues pour détermination de la répétabilité.

Dans un second temps, nous avons déterminé la répétabilité en mesurant plusieurs fois la DO d'un même échantillon dans une même manipulation et les valeurs sont reportées dans le tableau 13 :

- 49975.. : écart-type = 0,068 ; moyenne = 0,758 ; CV = 8,9%

## VII Évaluation de la spécificité du signal obtenu avec notre technique ELISA

En déterminant le blanc coating pour chaque échantillon EFS et chaque échantillon positif, on estime l'intensité du bruit de fond de la technique des échantillons EFS et des échantillons positifs en ELISA. (Tableaux 14 et 15)

La DO de la plaque non coatée à l'interféron gamma nous révèle un bruit de fond. Néanmoins, ce bruit de fond reste moindre par rapport à la DO pour le même tube sur une plaque coatée à l'interféron gamma, ce qui nous permet d'exploiter les données.

Echantillon EFS au 1/100	DO coatée	DO non coatée	Delta DO	Echantillon EFS au 1/100	DO coatée	DO non coatée	Delta DO	Echantillon EFS au 1/100	DO coatée	DO non coatée	Delta DO
866674..	0,561	0,498	0,063	866680..	0,533	0,418	0,115	885836..	0,202	0,2	0,002
866674..	0,401	0,345	0,056	866687..	0,143	0,151	0	885839..	0,179	0,176	0,003
885868..	0,143	0,135	0,008	866686..	0,423	0,131	0,292	885836..	0,142	0,139	0,003
866652..	0,289	0,256	0,033	866686..	0,586	0,57	0,016	885860..	0,416	0,345	0,071
866653..	0,112	0,132	0	866671..	0,23	0,195	0,035	885848..	0,155	0,143	0,012
866654..	0,555	0,537	0,018	866670..	0,481	0,352	0,129	885849..	0,813	0,58	0,233
806656..	0,343	0,097	0,246	885807..	0,132	0,137	0	885852..	0,473	0,432	0,041
866656..	0,166	0,167	0	885808..	0,174	0,164	0,01	885844..	0,382	0,101	0,281
866667..	0,46	0,408	0,052	885818..	0,274	0,287	0	885842..	0,155	0,156	0
866671..	0,126	0,126	0	885816..	0,14	0,149	0	885836..	0,538	0,447	0,091
866673..	0,926	0,805	0,121	885812..	0,149	0,138	0,011	885831..	1,013	0,906	0,107
885800..	0,83	0,685	0,145	885808..	0,28	0,266	0,014	885833..	0,153	0,097	0,056
866692..	0,124	0,124	0	885824..	0,819	0,588	0,231	885856..	0,129	0,112	0,017
866673..	0,283	0,283	0	885816..	0,157	0,148	0,009	885856..	0,126	0,116	0,01
885873..	0,484	0,517	0	885824..	0,454	0,31	0,144	885858..	0,277	0,225	0,052
866676..	0,981	0,842	0,139	885856..	0,229	0,205	0,024	885860..	0,453	0,101	0,352
866676..	0,745	0,677	0,068	885856..	0,301	0,259	0,042	866658..	0,13	0,099	0,031
885871..	1,042	0,752	0,29	885853..	0,406	0,395	0,011	866665..	0,201	0,187	0,014
866691..	0,572	0,137	0,435	885827..	0,216	0,187	0,029	885841..	0,42	0,097	0,323
866688..	0,426	0,375	0,051	885840..	0,658	0,41	0,248	866658..	0,32	0,099	0,221
866682..	0,126	0,12	0,006	885840..	0,164	0,142	0,022	885862..	0,249	0,204	0,045

Tableau 14 : Valeurs des échantillons EFS et détermination du blanc coating.



	DO coatée 1/100	DO non coatée 1/100	Delta DO
48396..	1,471	0,879	0,592
40288..	1,713	1,307	0,406
40290..	1,671	0,967	0,704
40291..	1,821	1,576	0,245
46971..	1,955	1,561	0,394
49975..	1,878	1,355	0,523

Tableau 15 : Valeurs des DO et du DO blanc coating des échantillons positifs

L'analyse statistique de la répartition des valeurs des Delta DO au sein de la cohorte EFS nous permet d'établir un nouveau seuil de positivité à partir du Delta DO propre à chaque échantillon se trouve dans le tableau 16.

	Delta DO EFS 1/100
Moyenne	0,068
Médiane	0,095
Ecart-type	0,03
Centile 99	0,114
Centile 98	0,12
Centile 95	0,097
Centile 75	0,061
Centile 25	0,019
DO minimale	0,015
DO maximale	0,134

Tableau 16 : Analyses statistiques des valeurs de Delta DO de la population EFS.

Vingt-cinq pour cent des valeurs sont inférieures à 0,019 et 75% des valeurs sont inférieures à 0,061. La moyenne est de 0,068 avec un écart-type (dispersion des valeurs autour de la moyenne) à 0,03.

La médiane (valeur centrale qui partage la cohorte en 2 groupes de même effectif) est de 0,095.

Nous retiendrons comme seuil de positivité de notre test ELISA une Delta DO supérieure à 0,114.

## VIII Titration des échantillons positifs

Nous avons titré les échantillons positifs en ELISA sur une plaque coatée et sur une plaque non coatée à des dilutions croissantes. (Tableau 17) et la représentation graphique des échantillons en cascade sur une plaque coatée sur la figure 21.

	48396..			40288..			40290..		
	coatée	non coatée	Delta DO	coatée	non coatée	Delta DO	coatée	non coatée	Delta DO
DO 1/100	1,487	1,331	0,156	1,724	1,484	0,24	1,549	1,359	0,19
DO 1/200	1,16	1,037	0,123	1,314	1,185	0,129	1,21	0,993	0,217
DO 1/400	0,728	0,629	0,099	0,807	0,592	0,215	0,889	0,76	0,129
DO 1/800	0,4	0,199	0,201	0,476	0,294	0,182	0,536	0,427	0,109
DO 1/1600	0,247	0,158	0,089	0,124	0	0,132	0,314	0,214	0,1

	40291..			46971..			49975..		
	coatée	non coatée	Delta DO	coatée	non coatée	Delta DO	coatée	non coatée	Delta DO
DO 1/100	1,197	1,024	0,173	2,047	1,828	0,219	1,907	1,698	0,209
DO 1/200	0,753	0,593	0,16	1,535	1,42	0,115	1,481	1,297	0,184
DO 1/400	0,361	0,175	0,186	0,906	0,75	0,156	1,024	0,857	0,167
DO 1/800	0,267	0,141	0,126	0,528	0,409	0,119	0,729	0,627	0,102
DO 1/1600	0,159	0	0,164	0,292	0,176	0,116	0,407	0,219	0,188

Tableau 17 : Titration des échantillons considérés positifs sur plaques coatées et non coatées à des dilutions croissantes.

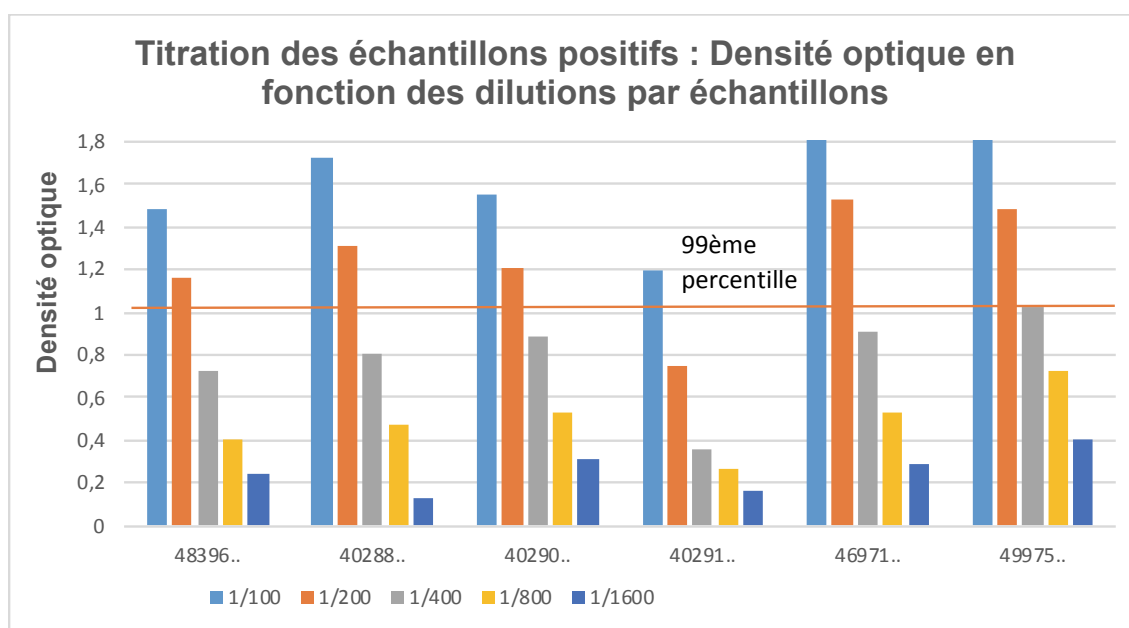


Figure 21 : Titration des échantillons positifs.

Le seuil de positivité étant fixé à 1,02 (selon le 99<sup>ème</sup> percentile de la population contrôle) pour la densité optique, le titre (l'inverse de la dernière dilution positive) est donc :

- 48396.. : titre à 200
- 40288.. : titre à 200
- 40290.. : titre à 200
- 40291.. : titre à 100
- 46971.. : titre à 200
- 49975.. : titre à 400

## IX Présentation des différents paramètres clinico-biologiques des patients à auto-anticorps anti-interféron gamma positif en ELISA.

Le tableau 18 présente les paramètres biologiques et le tableau clinique associé au séjour des patients pour lesquels le test ELISA est positif.

	Concentration en interféron gamma dans le tube PHA (Ui/mL)	DO 1/100	IgG ( g/L )	Autres auto-anticorps associés ?	Âge. (en années)	Sexe	Service d'hospitalisation	Pathologie à l'origine de l'hospitalisation	Statut VIH et immunitaire
48396..	0,09	1,471	18	Non recherché	49	Féminin	Dermatologie	Lésions infiltrées annulaires survenant chaque été depuis 2014 sur le visage.	Négatif
40288..	0,34	1,713	Non recherché	Non recherché	35	Masculin	Médecine Interne	Anémie hémolytique auto-immune possiblement médicamenteuse sous Rituximab	Non recherché
40290..	0,05	1,671	Non recherché	Non recherché	1	Masculin	Pédiatrie	Bronchiolite aiguë dans un contexte de contagé de tuberculose.	Non recherché
40291..	0,08	1,021	18	Anticorps anti-nucléaires positif à 320 moucheté	78	Masculin	Urgences	Suspicion d'infection pulmonaire devant toux fébrile, encombrement pulmonaire sur un terrain asthénique avec altération de l'état général depuis quelques mois.	Non recherché
46971..	Non recherché	1,955	19	Anticorps anti-nucléaires positif à 320 moucheté avec RNP +	23	Masculin	IHU	Granulome avec nécrose évocatrice de tuberculose.	Négatif Lymphopénie T et NK modérée
49975..	Non recherché	1,878	26	Cardiolipines IgM et PE IgM +	35	Masculin	IHU	Tuberculose pulmonaire bacillifère découverte sur hémoptysie.	Négatif

Tableau 18 : Présentation des paramètres clinico-biologiques des échantillons positifs en ELISA.

Le facteur rhumatoïde n'a pas pu être recherché car le volume d'échantillon nécessaire n'était pas suffisant°

Les normes des IgG sont les suivantes en fonction de l'âge ; à 1 an entre 3,3 et 6,2 g/L et à l'âge adulte entre 6,6 et 12,8 g/L

## X Tests fonctionnels réalisés sur les échantillons positifs en ELISA.

Au laboratoire d'Immunologie, les échantillons positifs sont analysés en cytométrie en flux pour réaliser le test fonctionnel. Le test fonctionnel n'est pas à l'heure actuelle une technique de routine.

Les deux sérums ont été testés sur le plan fonctionnel après optimisation de la méthode :

- Détermination de la concentration optimale pour la stimulation en interféron gamma commercial : choix d'une concentration en interféron gamma de 5 U/mL.
- Détermination de la concentration en anticorps anti-interféron gamma commercial pour valider le contrôle positif : choix d'une concentration en anticorps anti-interféron gamma de 1 U/mL.
- Validation du sérum AB commercial (dépourvu d'anticorps anti-interféron gamma) comme contrôle négatif.
- Détermination de la médiane d'intensité de fluorescence (seuil de négativité) à l'aide de sérum de donneurs de sang sains.

Les deux sérums testés en 5 et 6 sur le plan fonctionnel sont les sérums 46971.. et 49975.. avec les résultats présentés sur la figure 22.

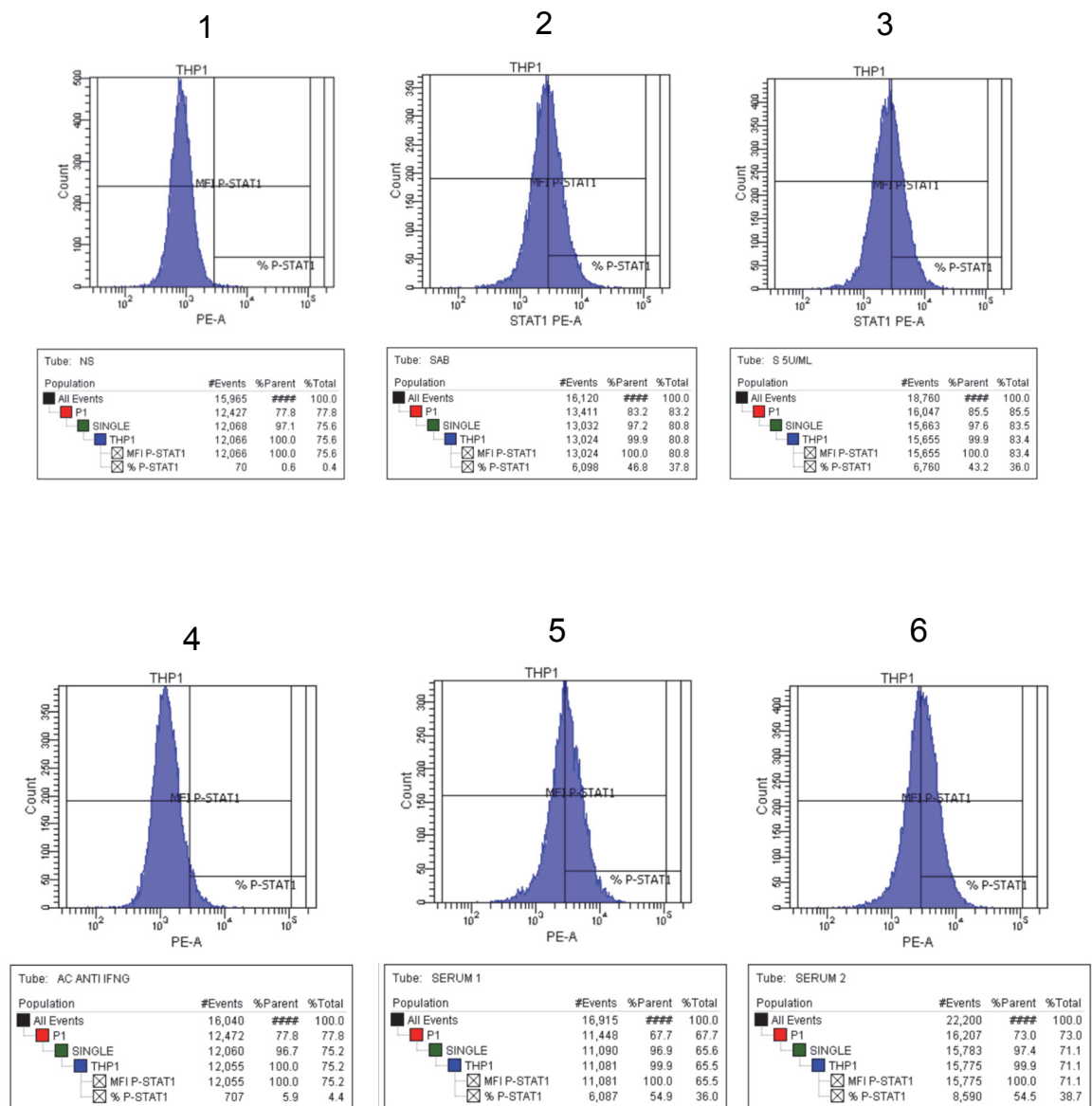


Figure 22 : Graphe des résultats du test fonctionnel réalisés sur deux sérums.

En 1, les cellules THP-1 sont non stimulées. On mesure un taux de phosphoSTAT1 à 0,4% et une MFI à 47.

En 2, les cellules THP-1 sont mises à incuber avec le sérum AB recombinant et l'interféron gamma. Le taux de phosphoSTAT1 est de 45,2% avec une MFI de 5479.

En 3, les cellules THP-1 sont mises à incuber avec l'interféron gamma. On mesure un taux de phosphoSTAT1 à 41,5% et une MFI à 6009 traduisant la

phosphorylation de STAT1 en aval de la fixation de l'interféron gamma sur son récepteur à la surface des THP-1.

En 4, les cellules THP-1 sont mises à incuber avec l'anticorps anti-interféron gamma et l'interféron gamma. On observe alors un taux de phosphoSTAT1 dans ces conditions de 5% avec une MFI de 550. On revient aux conditions des cellules THP-1 non stimulées, traduisant l'inhibition de la phosphorylation de STAT1.

En 5 et 6, les cellules THP-1 sont mises à incuber avec l'interféron gamma et respectivement les sérums 1 et 2 à tester. On observe alors respectivement un taux de phosphoSTAT1 de 53,1% et 52,5% avec une MFI respectivement de 5314 et 7543 traduisant une absence d'inhibition de la phosphorylation de STAT1.

### XI Tests ELISA réalisés sur deux échantillons positifs validés par l'équipe de JL Casanova (CHU Necker).

Nous avons eu l'opportunité de tester notre protocole avec deux plasmas considérés comme positifs en anticorps anti-interféron gamma par l'équipe de JL Casanova qui travaille sur le sujet depuis plusieurs années à l'hôpital Necker.

	DO coatée	DO non Coatée	Delta DO
Plasma 1	2,029	0,523	1,506
Plasma 2	1,278	0,454	0,824

Tableau 19 : Tableau des valeurs des deux sérums de Necker testés au 1/100.

Ces deux échantillons sont aussi positifs avec notre protocole ELISA.  
(Tableau 19)

# Discussion

Lors de la mise au point de notre ELISA au sein du laboratoire, nous avons dû évaluer différents protocoles pour parvenir à établir un protocole optimal.

Tous les facteurs impactant la sensibilité et la spécificité ont été pris en considération tels que le support solide, l'antigène, la phase de saturation, les différentes phases de lavage, le conjugué, la méthode de détermination du seuil de positivité et aussi le milieu environnant. Cela passe par un contrôle de la température de la pièce, des enceintes réfrigérées, la maîtrise de la technique par l'opérateur, l'obtention d'un sérum positif validé par une autre équipe ...

Déterminer un seuil de positivité du test (1,02 selon le 99ème percentile d'après 72 sérums issus de l'EFS), évaluer la répétabilité (CV = 8,9%) et la reproductibilité (CV de 4,9% et 13,5%) sont des étapes de validation du test bien connues du biologiste qui ont donné un résultat satisfaisant dans ce travail.

Après avoir optimisé notre technique ELISA, nous avons testé 162 sérums et plasmas de patients afin de dépister un éventuel auto-anticorps anti-interféron gamma.

Le choix de la dilution de 1/100 pour tester les échantillons est basé sur notre expérience de routine en auto-immunité. Dans la littérature, les valeurs de dilution de dépistage pour les échantillons varient de 1/100 à 1/50 000, ce qui rend les résultats difficilement comparables.

Le travail de détermination du blanc « coating » évalue la fixation non spécifique de la technique en retranchant le bruit de fond lié à chaque échantillon. Il s'agit donc de soustraire le signal du puits sans peptide au signal du puits coâté correspondant au même échantillon.

Nous avons été confrontés à un bruit de fond significatif. Les techniques ELISA de routine utilisent très rarement la soustraction du blanc « coating ». Aucune équipe étudiant les auto-anticorps anti-interféron gamma n'a évoqué la soustraction du blanc « coating ».

Notre protocole a aussi été validé par les résultats de deux échantillons positifs qui nous ont été gentiment adressés par l'équipe de JL Casanova.



En l'absence de contrôle externe de qualité, l'incertitude de mesure propre à la technique n'a pas pu être déterminée.

Nous avons voulu réaliser une gamme d'étalonnage avec un anticorps commercial anti-interféron gamma pour pallier le manque de contrôle positif. Cette gamme d'étalonnage ne peut pas être comparée aux signaux des sérums testés, le conjugué utilisé étant différent mais surtout sa concentration nous est inconnue (secret de fabrication Qiagen). L'utilisation de cet anticorps commercial permet, dans le cadre de ce travail, de vérifier l'existence d'une réaction antigène/anticorps dans nos conditions de réalisation de l'ELISA et sa spécificité.

Nous avons pu mettre en évidence des auto-anticorps anti-interféron gamma grâce à notre technique ELISA, technique répétable et reproductible.

Néanmoins, ceux-ci ne semblent pas être neutralisants selon les tests fonctionnels réalisés au sein du laboratoire.

Ces anticorps, bien que non neutralisants, devront être recherchés au fil du temps chez les patients positifs pour évaluer leur persistance.

Le test ELISA couplé au test fonctionnel formera un bon test biologique pour le diagnostic des MNT avec auto-anticorps anti-interféron gamma, en complément d'un examen clinique complet et d'une anamnèse exhaustive.

Le coût du test ELISA pour la mise en évidence des auto-anticorps anti-interféron gamma est raisonnable. En effet, le coût par plaque peut être calculé :

- Dix microgrammes d'interféron gamma par plaque soit 6 € par plaque
- Une plaque MaxiSorb à 3,8 €
- Deux microlitres d'anticorps anti-IgG par plaque soit 0,5 € par plaque
- Deux pastilles de PNPP à 1,6€ chacune soit 3, € par plaque

Soit un coût total par plaque de 13,5 € soit un coût patient de 0,28 € (test en dupliquet).

La prochaine étape sera de cribler des sérums de patients susceptibles aux infections à MNT en lien avec le pôle Infectiologie de l'AP-HM.

## Conclusion

Après deux semestres de manipulations et de recherches bibliographiques, la technique de détection des anticorps anti-interféron gamma par ELISA est mise au point. La détection de ces anticorps est essentielle en cas d'infections disséminées à MNT sans immunodéficience. Un tel tableau touche préférentiellement la femme d'origine asiatique sans antécédents médicaux, vers 50 ans.

Le rôle du biologiste trouve ici tout son sens dans la mise au point d'un ELISA « maison ». Celui-ci va déterminer un seuil de positivité du test, remplacer ou bien supprimer un élément qui compose l'ELISA, prendre en compte le bruit de fond de la technique et qui peut impacter le résultat, valider sa technique avec des contrôles externes et déterminer reproductibilité et répétabilité.

Dans notre population, la prévalence est de 3,8% de positifs (soit 6/162 individus). Döffinger et al (40) obtenaient 4% de patients avec anticorps anti-interféron gamma dans une population similaire. Ces anticorps se sont avérés être non neutralisants comme le suggèrent le test fonctionnel qui indique une absence d'inhibition de phosphoSTAT1.

Ce travail va dans le sens des autres études réalisées en termes de prévalence parmi les groupes sans infections disséminées à MNT. D'autres études concluent à des prévalences d'anticorps anti-cytokines non neutralisants plus importants. Mais la prise en compte de la spécificité par mesure de la DO du blanc sans antigène permet à notre technique d'être plus spécifique.

La cinétique et la persistance de ces auto-anticorps anti-interféron gamma devront être étudiées, ainsi que le lien entre le titre de l'anticorps anti-interféron gamma neutralisant et pronostic de l'infection disséminée à MNT. Le calcul de l'incertitude de mesure de notre technique ne pourra se faire que lorsque nous aurons accès à un contrôle de qualité interne et un contrôle de qualité externe.

Les échantillons positifs vis-à-vis de l'anticorps anti-interféron gamma en ELISA ont été testés en cytométrie en flux afin d'analyser le rôle neutralisant de l'anticorps en observant l'état de phosphorylation de STAT1. Les anticorps dépistés ici ne présentent pas de caractère neutralisant. Les deux tests, ELISA

et test fonctionnel, doivent être raisonnablement associés pour une meilleure définition de la réactivité anti-interféron gamma.

Ce travail nous a aussi permis de prendre conscience que la détection d'une faible concentration en interféron gamma dans le tube contenant la PHA dans un test du Quantiféron ne doit plus être seulement envisagée comme un problème purement pré-analytique. Il faut désormais envisager la présence d'un anticorps anti-interféron gamma perturbant le dosage de l'interféron gamma.

# Bibliographie

1. Saesen E. Bases structurales de la régulation des cytokines par les héparanes sulfates: régulation génique et optimisation d'un inhibiteur de l'interféron-gamma. :296.
2. Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique - 9782294752421 | Elsevier Masson - Livres, ebooks, revues et traités EMC pour toutes spécialités médicales et paramédicales [Internet]. [cité 1 août 2019]. Disponible sur: <https://www.elsevier-masson.fr/les-bases-de-limmunologie-fondamentale-et-clinique-9782294752421.html>
3. Altare F, Casanova J-L. IL-12 et IFN- $\gamma$ : un axe clé de l'immunité anti-mycobactérienne chez l'homme. médecine/sciences. nov 2001;17(11):1112-9.
4. Lefèvre F. Le système interféron: structure, biologie, applications. Ann Rech Vét. 1989;20(1):17-38.
5. PII: S0969-2126(01)00567-6 | Elsevier Enhanced Reader [Internet]. [cité 3 juin 2019]. Disponible sur: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0969212601005676?token=26D837A768CE277BAF61E8A2E48E916E3F4D94475F6D0F1134B463E7A2B3A4F46373637E051D107D27171441ACCAA36A>
6. Hamon Y, Blouin CM, Lamaze C, He H-T. Dynamiques moléculaire et membranaire du récepteur de l'interféron gamma: pour un sucre de trop! médecine/sciences. août 2017;33(8-9):707-10.
7. Esteve-Solé A, Sologuren I, Martínez-Saavedra MT, Deyà-Martínez À, Oleaga-Quintas C, Martinez-Barricarte R, et al. Laboratory evaluation of the IFN- $\gamma$  circuit for the molecular diagnosis of Mendelian susceptibility to mycobacterial disease. Crit Rev Clin Lab Sci. mai 2018;55(3):184-204.
8. Hu X, Ivashkiv LB. Cross-regulation of Signaling and Immune Responses by IFN- $\gamma$  and STAT1. Immunity. 16 oct 2009;31(4):539-50.
9. Decker T, Lew DJ, Mirkovitch J, Darnell JE. Cytoplasmic activation of GAF, an IFN-gamma-regulated DNA-binding factor. EMBO J. avr 1991;10(4):927-32.

10. Casanova J-L, Holland SM, Notarangelo LD. Inborn Errors of Human JAKs and STATs. *Immunity*. 20 avr 2012;36(4):515-28.
11. Boxx GM, Cheng G. The Roles of Type I Interferon in Bacterial Infection. *Cell Host Microbe*. juin 2016;19(6):760-9.
12. Purkerson J, Isakson P. A two-signal model for regulation of immunoglobulin isotype switching. *FASEB J*. nov 1992;6(14):3245-52.
13. Schoenborn JR, Wilson CB. Regulation of Interferon- $\gamma$  During Innate and Adaptive Immune Responses. In: *Advances in Immunology* [Internet]. Academic Press; 2007 [cité 9 août 2019]. p. 41-101. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065277607960022>
14. Torrado E, Cooper AM. CYTOKINES IN THE BALANCE OF PROTECTION AND PATHOLOGY DURING MYCOBACTERIAL INFECTIONS. *Adv Exp Med Biol*. 2013;783:121-40.
15. Früh K, Yang Y. Antigen presentation by MHC class I and its regulation by interferon  $\gamma$ . *Curr Opin Immunol*. févr 1999;11(1):76-81.
16. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J Exp Med*. 1 sept 1983;158(3):670-89.
17. Subramaniam PS, Iii JL, Mujtaba MG, Walter MR, Johnson HM. The COOH-terminal nuclear localization sequence of interferon  $\gamma$  regulates STAT1 $\alpha$  nuclear translocation at an intracellular site. :11.
18. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon- $\gamma$ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*. 2004;75(2):163-89.
19. Mémoire TARIK FAREZ. Maîtrise en médecine expérimentale de l'Université Laval offert en extension à l'Université du Québec à Chicoutimi - PDF [Internet]. [cité 8 juin 2019]. Disponible sur: <https://docplayer.fr/14952263-Memoire-tarik-farez-maitrise-en-medecine-experimentale-de-l-universite-laval-offert-en-extension-a-l-universite-du-quebec-a-chicoutimi.html>

20. Mishra A, Akhtar S, Jagannath C, Khan A. Pattern recognition receptors and coordinated cellular pathways involved in tuberculosis immunopathogenesis: Emerging concepts and perspectives. *Mol Immunol.* juill 2017;87:240-248.
21. Valour F, Perpoint T, Sénéchal A, Kong X-F, Bustamante J, Ferry T, et al. Interferon- $\gamma$  Autoantibodies as Predisposing Factor for Nontuberculous Mycobacterial Infection. *Emerg Infect Dis.* juin 2016;22(6):1124-1126.
22. Netgen. Mycobactéries non tuberculeuses : quoi de neuf ? [Internet]. *Revue Médicale Suisse.* [cité 4 sept 2019]. Disponible sur: <https://www.revmed.ch/RMS/2009/RMS-226/Mycobacteries-non-tuberculeuses-quoi-de-neuf>
23. Infections mycobactériennes non tuberculeuses - Maladies infectieuses [Internet]. Édition professionnelle du Manuel MSD. [cité 4 sept 2019]. Disponible sur: <https://www.msdmanuals.com/fr/professional/maladies-infectieuses/mycobact%C3%A9rie/infections-mycobact%C3%A9riennes-non-tuberculeuses>
24. Haslett PAJ, Klausner JD, Makonkawkeyoon S, Moreira A, Metatrati P, Boyle B, et al. Thalidomide Stimulates T Cell Responses and Interleukin 12 Production in HIV-Infected Patients [Internet]. <https://home.liebertpub.com/aid.2004> [cité 3 sept 2019]. Disponible sur: <https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/088922299310269>
25. Koizumi Y, Sakagami T, Nishiyama N, Hirai J, Hayashi Y, Asai N, et al. Rituximab Restores IFN- $\gamma$ -STAT1 Function and Ameliorates Disseminated Mycobacterium avium Infection in a Patient with Anti-Interferon- $\gamma$  Autoantibody. *J Clin Immunol.* oct 2017;37(7):644-649.
26. Chetchotisakd P, Anunnatsiri S, Nanagara R, Nithichanon A, Lertmemongkolkhai G. Intravenous Cyclophosphamide Therapy for Anti-IFN-Gamma Autoantibody-Associated Mycobacterium abscessus Infection. *J Immunol Res* [Internet]. 30 déc 2018 [cité 3 sept 2019];2018. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6330823/>



27. Boisson-Dupuis S, Bustamante J, El-Baghdadi J, Camcioglu Y, Parvaneh N, Azbaoui SE, et al. Inherited and acquired immunodeficiencies underlying tuberculosis in childhood. *Immunol Rev.* mars 2015;264(1):103-20.
28. Casanova J-L, Conley ME, Seligman SJ, Abel L, Notarangelo LD. Guidelines for genetic studies in single patients: lessons from primary immunodeficiencies. *J Exp Med.* 20 oct 2014;211(11):2137-49.
29. Qu H-Q, Fisher-Hoch SP, McCormick JB. Molecular immunity to mycobacteria: knowledge from the mutation and phenotype spectrum analysis of Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis.* mai 2011;15(5):e305-13.
30. Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Abel L, Casanova J-L. Mendelian susceptibility to mycobacterial disease: Genetic, immunological, and clinical features of inborn errors of IFN- $\gamma$  immunity. *Semin Immunol.* déc 2014;26(6):454-70.
31. Mansouri D, Adimi P, Mirsaeidi M, Mansouri N, Khalilzadeh S, Masjedi MR, et al. Inherited disorders of the IL-12-IFN- $\gamma$  axis in patients with disseminated BCG infection. *Eur J Pediatr.* déc 2005;164(12):753-7.
32. Sologuren I, Boisson-Dupuis S, Pestano J, Vincent QB, Fernández-Pérez L, Chagrier A, et al. Partial recessive IFN- $\gamma$ R1 deficiency: genetic, immunological and clinical features of 14 patients from 11 kindreds. *Hum Mol Genet.* 15 avr 2011;20(8):1509-23.
33. Inherited disorders of cytokines | Ovid [Internet]. [cité 3 sept 2019]. Disponible sur: <https://oce-ovid-com.gate2.inist.fr/article/00008480-200412000-00009/HTML>
34. Dorman SE, Holland SM. Mutation in the signal-transducing chain of the interferon-gamma receptor and susceptibility to mycobacterial infection. *J Clin Invest.* 1 juin 1998;101(11):2364-9.

35. Syndrome de susceptibilité mendélienne aux infections mycobactériennes : défauts de l'axe Interleukine-12 - Interféron- $\gamma$  - EM|consulte [Internet]. [cité 13 août 2019]. Disponible sur: <https://www.em-consulte.com/rmr/article/157162/>
36. Filipe-Santos O, Bustamante J, Chaggier A, Vogt G, de Beaucoudrey L, Feinberg J, et al. Inborn errors of IL-12/23- and IFN- $\gamma$ -mediated immunity: molecular, cellular, and clinical features. *Semin Immunol.* déc 2006;18(6):347-61.
37. Jabot-Hanin F. Recherche des facteurs génétiques contrôlant la réponse à l'infection par *Mycobacterium tuberculosis* et le développement d'une tuberculose maladie. 2017;213.
38. Fieschi C, Saint-Louis H. Déficits immunitaires de l'adulte. :70.
39. Browne SK, Burbelo PD, Chetchotisakd P, Suputtamongkol Y, Kiertiburanakul S, Shaw PA, et al. Adult-onset immunodeficiency in Thailand and Taiwan. *N Engl J Med.* 23 août 2012;367(8):725-34.
40. 38-1-e10.pdf [Internet]. [cité 15 août 2019]. Disponible sur: <https://watermark-silverchair-com.gate2.inist.fr/>
41. Höflich C, Sabat R, Rosseau S, Temmesfeld B, Slevogt H, Döcke W-D, et al. Naturally occurring anti-IFN- $\gamma$  autoantibody and severe infections with *Mycobacterium chelonae* and *Burkholderia cenocepacia*. *Blood.* 15 janv 2004;103(2):673-5.
42. Picque J-B, Blot M, Binois R, Jeudy G, Simonet A-L, Cagnon J, et al. Infections récurrentes à mycobactéries atypiques chez l'adulte : attention aux autoanticorps anti-interféron-gamma ! *Rev Médecine Interne.* 1 févr 2012;33(2):103-6.
43. Hanitsch LG, Löbel M, Müller-Redetzky H, Schürmann M, Suttorp N, Unterwalder N, et al. Late-Onset Disseminated *Mycobacterium avium* intracellulare Complex Infection (MAC), Cerebral Toxoplasmosis and Salmonella Sepsis in a German Caucasian Patient with Unusual Anti-Interferon-Gamma IgG1 Autoantibodies. *J Clin Immunol.* mai 2015;35(4):361-5.

44. Chan JF-W, Trendell-Smith NJ, Chan JC-Y, Hung IF-N, Tang BS-F, Cheng VC-C, et al. Reactive and Infective Dermatoses Associated with Adult-Onset Immunodeficiency due to Anti-Interferon-Gamma Autoantibody: Sweet's Syndrome and Beyond. *Dermatology*. 2013;226(2):157-66.
45. Shima K, Sakagami T, Tanabe Y, Aoki N, Moro H, Koya T, et al. Novel assay to detect increased level of neutralizing anti-interferon gamma autoantibodies in non-tuberculous mycobacterial patients. *J Infect Chemother*. janv 2014;20(1):52-6.
46. O'Connell E, Rosen LB, LaRue RW, Fabre V, Melia MT, Auwaerter PG, et al. The First US Domestic Report of Disseminated *Mycobacterium avium* Complex and Anti-Interferon- $\gamma$  Autoantibodies. *J Clin Immunol*. nov 2014;34(8):928-32.
47. Yamada T, Iwakami S, Hara SAM, Iwakami N, Nakamura A, Suzuki Y, et al. Disseminated non-tuberculous mycobacterial infection caused by anti-interferon- $\gamma$  autoantibodies in a patient of very advanced age. *Geriatr Gerontol Int*. 2018;18(7):1132-3.
48. Yerramilli A, Huang GKL, Griffin DWJ, Kong KL, Muhi S, Muttucumaru RS, et al. Disseminated Nontuberculous Mycobacterial Infection Associated With Acquired Immunodeficiency Due to Anti-Interferon  $\gamma$  Autoantibodies. *Open Forum Infect Dis* [Internet]. 16 mars 2019 [cité 14 août 2019];6(4). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6469433/>
49. Namkoong H, Asakura T, Ishii M, Yoda S, Masaki K, Sakagami T, et al. First report of hepatobiliary *Mycobacterium avium* infection developing obstructive jaundice in a patient with neutralizing anti-interferon-gamma autoantibodies. *New Microbes New Infect*. 19 oct 2018;27:4-6.
50. Aoki A, Sakagami T, Yoshizawa K, Shima K, Toyama M, Tanabe Y, et al. Clinical Significance of Interferon- $\gamma$  Neutralizing Autoantibodies Against Disseminated Nontuberculous Mycobacterial Disease. *Clin Infect Dis*. 3 avr 2018;66(8):1239-45.
51. Xu X, Lao X, Zhang C, Cao C, Ding H, Pang Y, et al. Chronic *Mycobacterium avium* skin and soft tissue infection complicated with scalp osteomyelitis

- possibly secondary to anti-interferon- $\gamma$  autoantibody formation. BMC Infect Dis [Internet]. 28 févr 2019 [cité 3 sept 2019];19. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6396482/>
52. Patel SY, Ding L, Brown MR, Lantz L, Gay T, Cohen S, et al. Anti-IFN- $\gamma$  Autoantibodies in Disseminated Nontuberculous Mycobacterial Infections. J Immunol. 1 oct 2005;175(7):4769–76.
  53. Wongkulab P, Wipasa J, Chaiwarith R, Supparatpinyo K. Autoantibody to Interferon-gamma Associated with Adult-Onset Immunodeficiency in Non-HIV Individuals in Northern Thailand. Rottenberg ME, éditeur. PLoS ONE. 27 sept 2013;8(9):e76371.
  54. Kampitak T, Suwanpimolkul G, Browne S, Suankratay C. Anti-interferon- $\gamma$  autoantibody and opportunistic infections: case series and review of the literature. Infection. févr 2011;39(1):65–71.
  55. Hase I, Morimoto K, Sakagami T, Ishii Y, van Ingen J. Patient ethnicity and causative species determine the manifestations of anti-interferon-gamma autoantibody-associated nontuberculous mycobacterial disease: a review. Diagn Microbiol Infect Dis. 1 août 2017;88(4):308–15.
  56. Merkel PA, Lebo T, Knight V. Functional Analysis of Anti-cytokine Autoantibodies Using Flow Cytometry. Front Immunol [Internet]. 12 juill 2019 [cité 11 août 2019];10. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6640114/>
  57. Nishimura T, Fujita-Suzuki Y, Yonemaru M, Ohkusu K, Sakagami T, Carpenter SM, et al. Recurrence of Disseminated Mycobacterium avium Complex Disease in a Patient with Anti-Gamma Interferon Autoantibodies by Reinfection. J Clin Microbiol. avr 2015;53(4):1436–8.
  58. Lin C-H, Chi C-Y, Shih H-P, Ding J-Y, Lo C-C, Wang S-Y, et al. Identification of a major epitope by anti-interferon- $\gamma$  autoantibodies in patients with mycobacterial disease. Nat Med. sept 2016;22(9):994–1001.
  59. Wipasa J, Chaiwarith R, Chawansuntati K, Praparattanapan J, Rattanathammethee K, Supparatpinyo K. Characterization of anti-

- interferon- $\gamma$  antibodies in HIV-negative immunodeficient patients infected with unusual intracellular microorganisms. *Exp Biol Med.* avr 2018;243(7):621-6.
60. Casanova J-L, Abel L. Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:581-620.
  61. Ku C-L, Lin C-H, Chang S-W, Chu C-C, Chan JFW, Kong X-F, et al. Anti-IFN- $\gamma$  autoantibodies are strongly associated with HLA-DR\*15:02/16:02 and HLA-DQ\*05:01/05:02 across Southeast Asia. *J Allergy Clin Immunol.* mars 2016;137(3):945-948.e8.
  62. Lees JR. Interferon gamma in autoimmunity: A complicated player on a complex stage. *Cytokine.* juill 2015;74(1):18-26.
  63. Rose NR, Bona C. Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). *Immunol Today.* sept 1993;14(9):426-30.
  64. Krisnawati DI, Liu Y-C, Lee Y-J, Wang Y-T, Chen C-L, Tseng P-C, et al. Blockade Effects of Anti-Interferon- (IFN-)  $\gamma$  Autoantibodies on IFN- $\gamma$ -Regulated Antimicrobial Immunity. *J Immunol Res [Internet].* 30 mai 2019 [cité 24 juill 2019];2019. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6589216/>
  65. Browne SK, Holland SM. Immunodeficiency secondary to anti-cytokine autoantibodies. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* déc 2010;10(6):534-41.
  66. Site de vulgarisation scientifique [Internet]. AxiomCafe. 2013 [cité 29 août 2019]. Disponible sur: <http://axiomcafe.fr/test-elisa>
  67. Camara B. Le quantiFERON : qu'est ce que c'est ? à quoi ca sert ? :3.
  68. 38-1-e10.pdf [Internet]. [cité 8 sept 2019]. Disponible sur: <https://watermark-silverchair-com.gate2.inist.fr/>
  69. Wu U-I, Chuang Y-C, Sheng W-H, Sun H-Y, Jhong Y-T, Wang J-Y, et al. Use of QuantiFERON-TB Gold In-tube assay in screening for neutralizing anti-interferon- $\gamma$  autoantibodies in patients with disseminated nontuberculous mycobacterial infection. *Clin Microbiol Infect.* févr 2018;24(2):159-65.

70. Koya T, Tsubata C, Kagamu H, Koyama K, Hayashi M, Takada T, et al. Anti-interferon- $\gamma$  autoantibody in a patient with disseminated *Mycobacterium avium* complex. *J Infect Chemother*. 1 janv 2009;15(2):118–22.
71. Lee W-I, Huang J-L, Wu T-S, Lee M-H, Chen I-J, Yu K-H, et al. Patients with inhibitory and neutralizing auto-antibodies to interferon- $\gamma$  resemble the sporadic adult-onset phenotype of Mendelian Susceptibility to Mycobacterial Disease (MSMD) lacking Bacille Calmette–Guerin (BCG)-induced diseases. *Immunobiology*. mai 2013;218(5):762–71.
72. Fluhr H, Spratte J, Heidrich S, Ehrhardt J, Steinmüller F, Zygmunt M. Heparin inhibits interferon- $\gamma$  signaling in human endometrial stromal cells by interference with the cellular binding of interferon- $\gamma$ . *Fertil Steril*. mars 2011;95(4):1272–7.
73. Ding L, Mo A, Jutivorakool K, Pancholi M, Holland SM, Browne SK. Determination of Human Anticytokine Autoantibody Profiles Using a Particle-Based Approach. *J Clin Immunol*. avr 2012;32(2):238–45.
74. Cytokine assays: An assessment of the preparation and treatment of blood and tissue samples. *Methods*. 15 mai 2013;61(1):10–7.
75. Suárez I, Lehmann C, Gruell H, Graeb J, Kochanek M, Fätkenheuer G, et al. Repurposing QuantiFERON for Detection of Neutralizing Interferon- $\gamma$  Autoantibodies in Patients With Nontuberculous Mycobacterial Infections. *Clin Infect Dis*. 1 août 2017;65(3):518–21.
76. Kobashi Y, Obase Y, Fukuda M, Yoshida K, Miyashita N, Oka M. Clinical Reevaluation of the QuantiFERON TB-2G Test as a Diagnostic Method for Differentiating Active Tuberculosis from Nontuberculous Mycobacteriosis. *Clin Infect Dis*. 15 déc 2006;43(12):1540–6.

# Glossaire

ADN : Acide DésoxyriboNucléique  
 AP-HM : Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille  
 ARN : Acide RiboNucléique  
 BCG : Bacille de Calmette et Guérin  
 CFP-10 : Culture Filtrate Protein 10  
 CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité  
 CMV : CytoMégaloVirus  
 CPA : Cellules Présentatrices d'Antigènes  
 CV : Coefficient de Variation  
 CYBB : Cytochrome B-245 Beta Chain  
 DO : Densité Optique  
 EFS : Établissement Français du Sang  
 ELISA: Enzyme-Linked immunoSorbent Assay  
 ESAT-6: Early Secreted Antigenic Target 6 kDa protein  
 ET : Écart-Type  
 HAS : Haute Autorité de Santé  
 HLA: Human Leukocytes Antigene  
 HRP: HoreRadish Peroxidase  
 IgG : Immunoglobulines G  
 IFN gamma: Interféron gamma  
 IKK: Inhibitor of NFkB Kinase  
 IL-12: Interleukine 12  
 IRF: Interferon Regulatory Factor  
 JAK : Janus Kinase  
 MAI : Maladies Auto-Immunes  
 MNT: Mycobactéries Non Tuberculeuses  
 MSMD: Mendelian Susceptibility to Mycobacterial Disease  
 NADPH: Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate  
 NEMO: Nuclear factor-kappa B Essential Modulator  
 NK/NKT: Natural Killer/ Natural Killer T  
 NOC-2: NO C2 domain  
 PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cells  
 PBS: Phosphate-Buffered Saline  
 PHA: Phytohémagglutinine  
 PRR: Pattern Recognition Receptor  
 ROS: Reactive Oxygen Species  
 RPMI: Roswell Park Memorial Institute  
 STAT: Signal Transducers and Activators of Transcription  
 SOCS-1: Suppressor Of Cytokine Signaling 1  
 SVF : Sérum de Veau Foetal  
 Tb 7.7: Tuberculosis 7.7  
 TGF: Transforming Growth Factor  
 TLR: Toll-Like Receptor  
 TNF: Tumor Necrosis Factor  
 VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine  
 VZV : Varicella Zoster Virus



# SERMENT D'HIPPOCRATE

Au moment d'être admis(e) à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences.

Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis(e) dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçu(e) à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré(e) et méprisé(e) si j'y manque.



## Résumé

L'interféron gamma a un rôle primordial dans la lutte contre les germes intracellulaires et les mycobactéries non tuberculeuses (MNT). Les MNT sont responsables d'infections disséminées chez les patients produisant des auto-anticorps anti-interféron gamma neutralisants. La mise en évidence de ces anticorps constitue un enjeu diagnostique. Dans ce travail, nous avons mis au point un test ELISA permettant la détection des anticorps anti-interféron gamma dans le sang des patients. Notre test ELISA s'est révélé être un test répétable et reproductible. Nous avons déterminé un seuil de positivité à partir de sérums de volontaires sains. Pour nous assurer de la spécificité de la réaction antigène-anticorps nous avons évalué pour chaque patient le signal obtenu sans antigène au fond du puits. Nous avons pu tester 162 échantillons de sang sélectionnés sur leur tableau clinique (essentiellement infections à *M. tuberculosis*) ou sur leur capacité à synthétiser de l'interféron gamma en présence du mitogène phytohéماغglutinine. Six échantillons se sont avérés être positifs en ELISA. La prévalence de l'anticorps anti-interféron gamma dans notre population est donc de 3,8%. Le passage de ces échantillons en cytométrie en flux n'a pas montré d'inhibition de la phosphorylation de STAT1. Les anticorps détectés n'ont donc pas dans ce contexte de caractère neutralisant. Ce travail ouvre de nouvelles perspectives et notre test ELISA pourraient constituer à terme un outil efficace pour le dépistage et la caractérisation des auto-anticorps anti-interféron gamma.

Mots-clés : ELISA, anti-interferon gamma, auto-anticorps.