

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE 2010-2011

THESE N°

Etude des performances du QuantiFERON-TB
Gold In-Tube : phase pré-analytique, répétabilité,
sensibilité, spécificité.

MEMOIRE
DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE
BIOLOGIE MEDICALE

Conformément aux dispositions du décret du
23 janvier 2003, tenant lieu de :

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement le 27 octobre 2010,

PAR

. Marc FRIEDLING
. Né le 29 août 1981 à Saint Germain en Laye

EXAMINATEURS DE THESE

Mme le Professeur Marie Claude SAUX
Mr le Professeur Patrick BLANCO
Mme le Professeur Sylvie ROGEZ
Mr le Professeur Jean François VIALARD
Mme le Docteur Jeanne MAUGEIN

Présidente
Juge
Juge
Juge
Juge

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE 2010-2011

THESE N°

Etude des performances du QuantiFERON-TB
Gold In-Tube : phase pré-analytique, répétabilité,
sensibilité, spécificité.

MEMOIRE
DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE
BIOLOGIE MEDICALE

Conformément aux dispositions du décret du
23 janvier 2003, tenant lieu de :

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement le 27 octobre 2010,

PAR

. Marc FRIEDLING
. Né le 29 août 1981 à Saint Germain en Laye

EXAMINATEURS DE THESE

Mme le Professeur Marie Claude SAUX
Mr le Professeur Patrick BLANCO
Mme le Professeur Sylvie ROGEZ
Mr le Professeur Jean François VIALARD
Mme le Docteur Jeanne MAUGEIN

Présidente
Juge
Juge
Juge
Juge

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

DOYEN DE LA FACULTE

Monsieur **COMBY** Francis, Maître de Conférence

VICE-DOYEN

Monsieur le Professeur **CARDOT** Philippe

VICE-DOYEN

Madame **FAGNERE** Catherine, Maître de
Conférence

PROFESSEURS :

BENEYTOUT Jean-Louis

BIOCHIMIE – BIOLOGIE MOLECULAIRE

BOTINEAU Michel

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE

BROSSARD Claude

PHARMACOTECHNIE

BUXERAUD Jacques

CHIMIE ORGANIQUE-CHIMIE THERAPEUTIQUE

CARDOT Philippe

CHIMIE ANALYTIQUE

CHULIA Albert

PHARMACOGNOSIE

CHULIA Dominique

PHARMACOTECHNIE

DELAGE Christiane

CHIMIE GENERALE ET MINERALE

DESMOULIERE Alexis

PHYSIOLOGIE

DREYFUSS Giles

PARASITOLOGIE - MYCOLOGIE

DUROUX Jean-Luc

PHYSIQUE - BIOPHYSIQUE

LOUDART Nicole

PHARMACOLOGIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES

PHARMACEUTIQUES :

LACHATRE Gérard

TOXICOLOGIE

MOESCH Christian

HYGIENE – HYDROLOGIE - ENVIRONNEMENT

ROGEZ Sylvie

BACTERIOLOGIE – VIROLOGIE

MAITRES DE CONFERENCES

BALSY Philippe

CHIMIE ANALYTIQUE

BATTU Serge

CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE

BEAUBRUN GIRY Karine

PHARMACIE GALENIQUE

BILLET Fabrice	PHYSIOLOGIE
CALLISTE Claude	BIOPHYSIQUE, MATHEMATIQUES, INFORMATIQUE
CLEDAT Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE
COMBY Francis	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DELABASSEE Sylvie	BACTERIOLOGIE - VIROLOGIE
DEMIOT Claire Elise	PHARMACOLOGIE
FAGNERE Catherine	CHIMIE ORGANIQUE
FROISSARD Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
JAMBY Anne Catherine	CHIMIE THERAPEUTIQUE
LABROUSSE Pascal	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
LEGER David	BIOCHIMIE – BIOLOGIE MOLECULAIRE
LIAGRE Bernard	SCIENCES BIOLOGIQUES
LOTFI Hayat	TOXICOLOGIE
MARION-THORE Sandrine	CHIMIE THERAPEUTIQUE
MARRE-FOURNIER Françoise	BIOCHIMIE
MILLOT Marion	PHARMACOGNOSIE
MOREAU Jeanne	IMMUNOLOGIE
POUGET Christelle	CHIMIE ORGANIQUE
ROUSSEAU Annick	BIOMATHEMATIQUES
SIMON Alain	CHIMIE PHYSIQUE ET CHIMIE MINERALE
TROUILLAS Patrick	BIOMATHEMATIQUES - INFORMATIQUE
VIANA Marylène	PHARMACOTECHNIE
VIGNOLES Philippe	BIOMATHEMATIQUES

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES-PRATICIENS HOSPITALIERS

DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

DREYFUSS Marie-Françoise CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE

PROFESSEUR CERTIFIE

MARBOUYT Jean-Michel ANGLAIS

REMERCIEMENTS

J'exprime ma sincère reconnaissance à Madame le Docteur Jeanne Maugein, mon directeur de thèse, pour m'avoir accueilli au sein du Laboratoire de Bactériologie de l'Hôpital Haut Lévêque, accompagné tout au long de ce travail et fait bénéficier de son savoir et de son expérience.

Je tiens vivement à remercier Madame le professeur Marie-Claude Saux de me faire l'honneur de juger ce travail et d'avoir accepté la présidence du jury de thèse.

Je remercie infiniment Monsieur le Professeur Blanco de m'avoir fait bénéficier de ses précieux conseils, de ses connaissances en Immunologie, d'un peu de son sang et d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie chaleureusement Monsieur le Professeur Jean François Viillard et Madame le Professeur Sylvie Rogez pour avoir accepté de faire parti de mon jury de thèse.

Je tiens à remercier tout particulièrement Monsieur le Docteur Thomas Barnetche pour son aide indispensable pour les statistiques, le temps qu'il a bien voulu consacrer à l'interprétation des résultats et leurs mises en forme.

Je remercie l'ensemble du personnel du laboratoire de Bactériologie de l'Hôpital Haut Lévêque pour leur soutien et leurs encouragements, et tout particulièrement Corine Anginard, Marie-France Azema, Jocelyne Daury, Jean Pierre Leymarie, Laetitia Martin-Perdigon, Denise Pied, Genevieve Raud, et Francine Jauffroy pour m'avoir offert un peu d'eux-mêmes pour mener mes expériences.

Madame le Docteur Sylvie Vacher pour ses conseils avisés et sa participation précieuse pour les prélèvements.

Madame le Docteur Carine Greib pour son aide indispensable au recueil des données, sa disponibilité ainsi que pour les échantillons de sang.

Monsieur le Professeur Jean Luc Pellegrin pour avoir participé à cette étude.

Malika, Olivia, Patrick, Romain, Vincent et Guillaume pour leur soutien et leur aide pour les manipulations.

Yohan et Luc pour m'avoir permis de les prélever.

Félix Leclerc et Marie Tuffigo, pour leur patience, leurs encouragements, mais aussi les franches parties de rigolades durant la préparation de ce travail.

Je remercie mes amis Rachid, Bibi, Seb, Gaëlle, Chris, Sandra et tous les autres.

Je tiens aussi à remercier toute ma famille pour leur soutien matériel et moral.

Enfin, je remercie Mélanie, mon amour, pour son soutien, sa générosité et sa patience, au quotidien à mes cotés.

Abréviations :

- ADN** : Acide désoxyribonucléique
- ARN** : Acide ribonucléique
- BAAR** : Bacilles acido-alcoolo-résistants
- BCG** : Bacille de Calmette et Guerin
- CD** : Cluster de différenciation
- CFP-10** : *Culture filtrate protein 10*
- CM** : *Central memory T cell*
- CMH** : Complexe majeur d'histocompatibilité
- CPA** : Cellule présentatrice de l'antigène
- DC** : *Dendritic cell*
- DC-SIGN** : *Dendritic cell-specific intracellular adhesion molecule 3 grabbing non integrin*
- DCi** : Cellule dendritique mature
- DCm** : Cellule dendritique immature
- DO** : Densité optique
- ED** : Examen direct
- EEA1** : *Early endosome antigen 1*
- ELISA** : *Enzyme-linked immunosorbent assay*
- EM** : *Effector memory T cell*
- ESAT-6** : *Early secreted antigenic targeted-6 KDa protein*
- ESX** : *Early secretory antigenic target system*
- FDA** : *Food and drug administration*
- HAS** : Haute Autorité de Santé
- HBHP** : *Heparin Binding Haemagglutinin*
- Hrs** : *Hépatocyte growth factor-regulated tyrosin kinase substrate*
- IDR** : Intradermo-réaction
- IgG** : Immunoglobulines de type G
- IGRA** : *Interferon gamma release assay*
- IL** : Interleukine
- IL1R** : *Toll IL-1 receptor*
- INF** : Interféron
- iNOS** : NO-synthase inductible
- IP3** : Inositol-3-phosphate
- IRAK** : *Interleukin-1 receptor-associated kinase*

IRGM1 : *Immunity-related GTPase family*
ITL : Infection tuberculeuse latente
LABM : Laboratoire d'analyse médicale
LAM : Lipoarabinomannane
LB : Lymphocytes B
LCR : *Ligase Chain Reaction*
LM : Lipomannane
LPS : Lipopolysaccharide
LT : Lymphocyte thymique
LT reg : Lymphocyte T régulateur
LTCD4 : Lymphocyte T CD4
LTCD8 : Lymphocyte T CD8
LT $\gamma\delta$: Lymphocyte T gamma delta
ManLAM : manosyl-lipoarabinomannanes
MBL : *Mannose binding lectine*
MNT : Mycobactéries non-tuberculeuses
MGIT : *Mycobacterial growth indicator tube*
NK : *Natural killer*
NKT : *Natural killer T*
NO : Oxyde nitrique
NOD : *Nucleotide oligomerization domain like receptor*
OMS : Organisation mondiale de la santé
PAMP : *Pathogen associated molecular patterns*
PCR : *Polymerase chain reaction*
PCR : *Polymerase chain reaction*
PHA : Phytohémagglutine
PIM : Phosphatidyl inositol manoside
PNN : Polynucléaire neutrophile
PPD : *Purified protein derivative*
PRR : *Pathogen Recognition Receptor*
QTF-G : *QuantiFERON-Gold*
QTF-GIT : *QuantiFERON-TB Gold In Tube*
RC : Récepteur au complément
RD : Région de différence
RFc : Récepteur Fc
RM : Récepteur au mannose

RNI : *Reactive nitrogen intermediate*
ROI : *Reactive oxygen intermediate*
RT-PCR : *Reverse transcriptase polymerase chain reaction*
SDA : *Strand displacement amplification*
SR : *Scavenger receptor*
Th1, 2, 17 : *Lymphocytes T helpers 1, 2 et 17*
TLR : *Toll like receptor*
TMA : *Transcription mediated amplification*
TNF- α : *Tumor necrosis factor alpha*
VIH : *Virus de l'immunodéficience humaine*

PLAN

Introduction	11
Partie 1. La tuberculose et son diagnostic	12
A. Epidémiologie	13
1. La tuberculose dans le monde	13
2. La tuberculose en France	15
B. Taxonomie	16
C. Physiopathologie de l'infection tuberculeuse	16
D. Aspects cliniques de la tuberculose	18
1. La transmission	18
2. La primo-infection	18
3. La tuberculose pulmonaire	19
4. La tuberculose miliaire	20
5. Les formes extra-pulmonaires	21
6. Tuberculose et traitement anti-TNF- α	21
E. Diagnostic direct	21
1. Le prélèvement	22
2. La paroi des mycobactéries	22
3. Préparation des échantillons	23
4. Examen direct	23
5. Culture	25
a. Les milieux solides	25
b. Milieux liquides	26
6. Méthodes d'amplification moléculaire appliquées au diagnostic direct	26
7. Identification des mycobactéries à partir de la culture	27
a. Identification du complexe <i>tuberculosis</i>	27
b. Diagnostic d'espèce au sein du complexe <i>tuberculosis</i>	28
8. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques: méthode des proportions	28
F. Le diagnostic indirect	29
1. La réponse immunitaire contre <i>M. tuberculosis</i>	29
2. Réponse immunitaire innée contre <i>M. tuberculosis</i>	30
a. Les récepteurs de l'immunité innée	31
b. Mécanismes de survie de <i>M. tuberculosis</i> dans les phagocytes quiescents	39
c. Les cellules dendritiques	43
d. Les macrophages activés	45
e. Les cellules dendritiques matures	48
f. Les <i>Natural Killer</i>	49
3. La réponse Thymodépendante	50
a. Les lymphocytes T CD4+	52
b. Les lymphocytes T CD8+	53
c. Les <i>Natural Killer T</i>	54
d. Les lymphocytes T helpers 17	54
e. Les lymphocytes T gamma delta	54
f. Régulation de la réponse T : les lymphocytes T régulateurs	55
g. Les lymphocytes T mémoires	55
4. Les méthodes de diagnostic indirect	57
a. L'intradermo-réaction	57
b. Les IGRA : QFT-GIT et TB-Spot	64

Partie 2. Le QuantiFERON-TB Gold In-Tube : Phase pré-analytique & Performances dans le diagnostic de la tuberculose	79
Objectifs de l'étude	80
A. Matériels et méthodes.....	81
1. Etude de la phase pré-analytique du test QTF-GIT	81
a. Populations étudiées.....	81
b. Recueil des échantillons	81
c. Phase pré-analytique.....	82
d. Dosage de l'INF- γ	83
2. Etude de la répétabilité du QTF-GIT.....	84
3. Etude de la sensibilité et spécificité du QTF-GIT dans les infections à mycobactéries tuberculeuses et atypiques bactériologiquement documentées.....	84
4. Statistiques	85
B. Résultats	86
1. Etude de la phase pré-analytique des QTF-GIT.....	86
a. Caractéristiques de la population étudiée	86
b. Résultats.....	87
c. Comparaison des résultats qualitatifs des QTF-GIT	89
d. Comparaison des résultats quantitatifs des QTF-GIT	91
e. Influence du <i>cut-off</i> en fonction de la phase pré-analytique sur les résultats qualitatifs	99
f. Répétabilité	100
g. Conclusion	103
2. Etude des résultats du QTF-GIT dans le cadre de la recherche d'une tuberculose active	104
a. Description de la population	104
b. Analyse des résultats des QTF-GIT	107
C. Discussion.....	112
1. Etude de la phase pré-analytique	112
a. Les conditions pré-analytiques.....	112
b. Répétabilité.....	115
c. Evaluation des <i>cut-offs</i>	117
d. Indéterminés	117
2. Etude de l'intérêt du test dans le diagnostic des tuberculoses	118
a. Sensibilité du QTF-GIT	118
b. Spécificité du QTF-GIT	119
c. Tuberculose pulmonaire et extra-pulmonaire.....	119
d. Indéterminés	119
e. <i>Cut-offs</i>	120
Conclusion	121

Introduction

La tuberculose dans le monde représente la première cause de mortalité et de morbidité, due à une bactérie définie.

L'intradermo-réaction (IDR), jusqu'à ces dernières années, représentait le seul test de « diagnostic indirect » de l'infection tuberculeuse latente (ITL) et de la tuberculose maladie.

Ce test présente de nombreux inconvénients, en particulier un manque de spécificité, car il se positive après une simple vaccination ou infection par mycobactéries non tuberculeuses (MNT). Il est, de plus, délicat à réaliser et d'interprétation difficile.

Le développement de nouveaux tests immunologiques appelés IGRA (*interferon gamma release assay*) a permis une avancée majeure dans l'arsenal diagnostique disponible pour les infections tuberculeuses. Ce sont des tests de stimulations lymphocytaires *in vitro*. La réaction est indépendante du vaccin BCG (bacille de Calmette et Guérin) et des MNT. Ils ont une très bonne spécificité, sont reproductibles, faciles à mettre en œuvre, indépendants de l'observateur et ne nécessitent qu'une seule visite. C'est pour ces raisons que l'HAS (Haute Autorité de Santé) recommande leur utilisation dans quatre indications: enquête autour d'un cas de tuberculose, diagnostic des formes extra-pulmonaires, avant traitement par anti-TNF- α (*Tumor necrosis factor alpha*) et avant embauche de personnel de santé.

Deux tests sont commercialisés: le QuantiFERON-TB Gold In Tube (QTF-GIT) et TB-Spot. Par sa simplicité de réalisation, le QTF-GIT est le test le plus utilisé et la compilation des données accumulées depuis quelques années montre que certaines recommandations de l'industriel, sont peut-être à revoir. De plus, la variabilité de certains résultats peut amener à penser qu'il existe, dans la phase pré-analytique, des facteurs influençant les résultats. Or, il n'existe aucune donnée dans la littérature sur certaines étapes de cette phase.

Il nous a donc paru intéressant d'étudier, d'une part l'influence des variations de la phase pré-analytique sur les résultats, dans le cadre des prescriptions de l'industriel, et d'autre part, l'utilité de ce test dans le diagnostic de tuberculose maladie en particulier dans les formes extra-pulmonaires.

Partie 1. La tuberculose et son diagnostic

A. Epidémiologie

1. La tuberculose dans le monde

La tuberculose est considérée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme étant responsable d'une épidémie mondiale de plus en plus dangereuse et comme une urgence sanitaire au niveau planétaire. Elle fait l'objet d'un suivi annuel par l'OMS depuis 1997, pour évaluer les résultats des différents programmes de lutte mis en place. La situation est très préoccupante, en raison de la forte prévalence de la co-infection VIH (virus de l'immunodéficience humaine)/tuberculose (Figure 1), et de l'émergence de bacilles résistants et multi-résistants aux antibiotiques.

La tuberculose infection touche environ un tiers de la population mondiale, soit plus de 2 milliards d'individus, ce qui représente un immense réservoir de bacilles vivants. Parmi ceux-ci, un peu plus de neuf millions d'individus ont une tuberculose maladie. Environ 2 millions d'individus meurent chaque année de la tuberculose.

Depuis 2004 l'incidence mondiale diminue progressivement suite aux différents programmes mis en place. La répartition des cas est très hétérogène dans le monde, avec une forte incidence surtout dans les pays en voie de développement (Figure 2) (1).

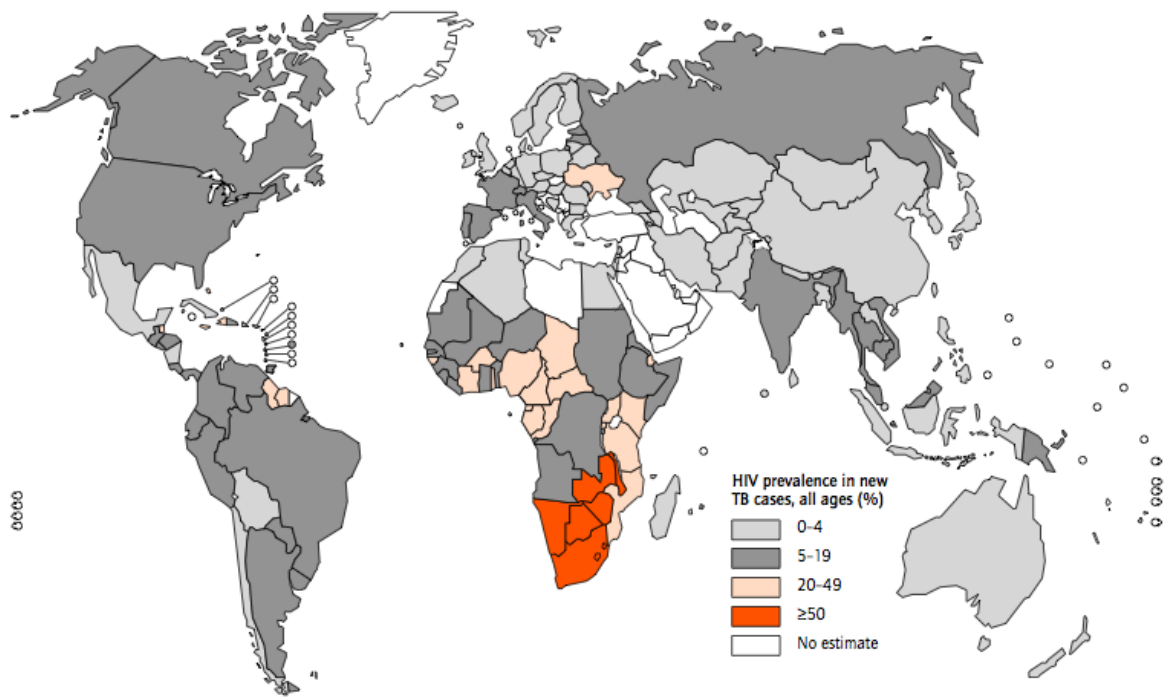


Figure 1. Estimation de la prévalence du VIH chez les nouveaux cas de tuberculose (1).

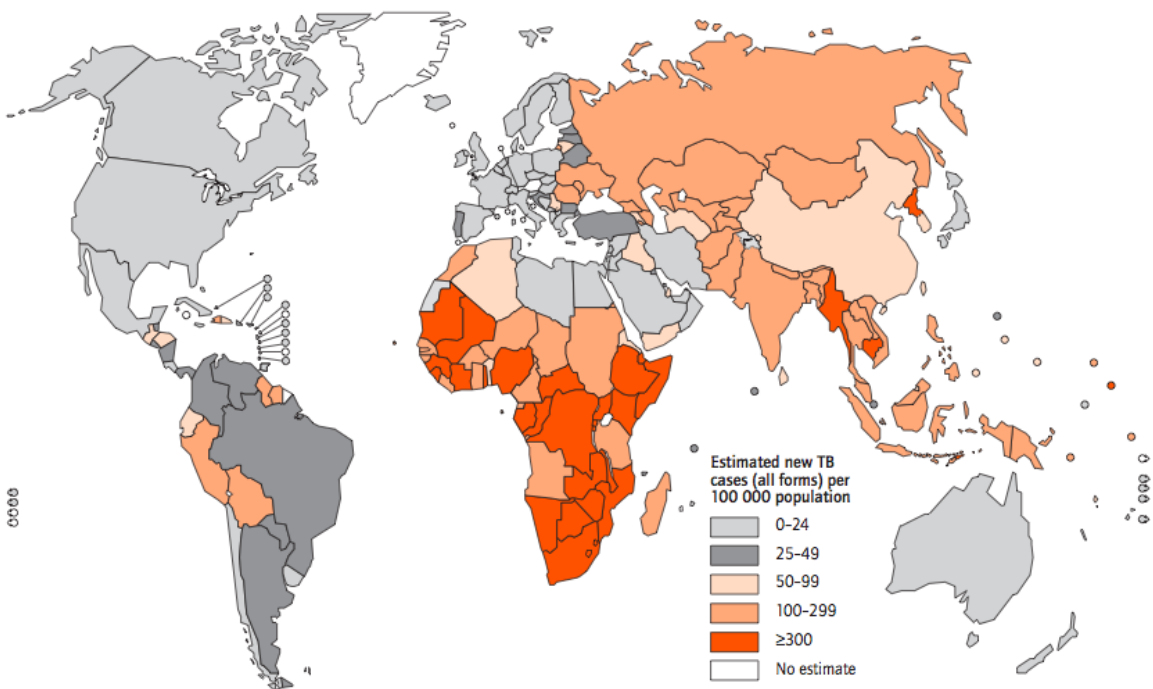


Figure 2. Taux d'incidence de cas de tuberculose notifiée dans le monde (1).

2. La tuberculose en France

En France, les infections à mycobactéries du complexe *tuberculosis* sont des maladies à déclaration obligatoire depuis 1964. L'ITL chez l'enfant de moins de 15 ans, depuis 2003 et l'issue du traitement, depuis 2005, sont à déclaration obligatoire. Cette déclaration comprend les cas probables (signes radiologiques et signes cliniques), ainsi que les cas confirmés (maladies prouvées par culture ou anatomopathologie).

L'incidence en France en 2008 était de 9,0 pour 100 000 habitants soit 5758 cas. Les cas de tuberculose ont baissé jusqu'en 2006, puis ont légèrement augmenté en 2007 et 2008 (Figure 3). La mortalité en France était de 1,1 pour 100 000. Selon les données de l'Institut de Veille Sanitaire (INVS), (2) la répartition des cas de tuberculose est hétérogène en France, la capitale concentrait environ 40% des cas en 2007. La Guyane et les grands centres urbains connaissent aussi une incidence élevée. L'âge médian était de 43 ans. Environ 60% des sujets atteints étaient des hommes. L'incidence était différente en fonction du pays de naissance, 55% des cas concernaient des personnes nées en France, contre 28% nées en Afrique.

La co-infection VIH-Tuberculose est très fréquente et la tuberculose représente l'infection opportuniste la plus fréquente au cours de l'infection à VIH. En effet, elle concerne un tiers des personnes vivant avec le VIH. La tuberculose serait la cause de 13% des décès dus au VIH. Les formes extra-pulmonaires sont beaucoup plus fréquentes lorsqu'il existe une immunodépression.

Cas déclarés de tuberculose maladie 1993-2008 (Nombre de cas et taux)

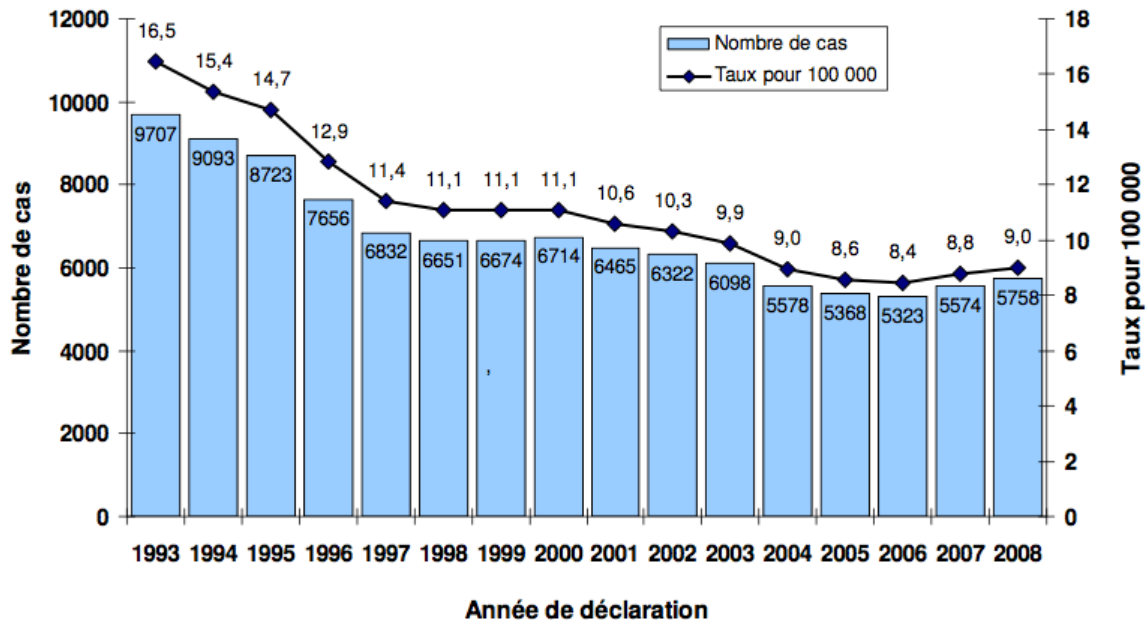


Figure 3. Mise à jour des données nationales de surveillance de la tuberculose, 2010, INVS (2).

B. Taxonomie

Les mycobactéries peuvent être divisées en deux grands groupes : les mycobactéries du complexe *tuberculosis* responsables de la tuberculose et les mycobactéries atypiques présentes dans l'environnement. Ces dernières ne sont pathogènes que dans des cas particuliers (immunodépression, inoculum important).

Le complexe *tuberculosis* comprend les espèces *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canettii* et *M. pinnipedii*. Ces espèces sont impliquées dans des pathologies humaines et/ou animales et sont capables de survivre aux défenses de l'hôte en inhibant les réponses immunes innées et adaptatives (3).

C. Physiopathologie de l'infection tuberculeuse

M. tuberculosis, une fois inhalé et arrivé au niveau des alvéoles, est phagocyté par les macrophages résidents du poumon. A ce stade, le pouvoir pathogène de *M. tuberculosis* dépend essentiellement de la qualité de la réponse immunitaire cellulaire de l'hôte. Une réaction inflammatoire locale s'installe et aboutit à la formation d'un granulome.

Celui-ci est visible en imagerie. La formation du granulome est liée à la difficulté d'élimination de *M. tuberculosis* qui persiste à l'intérieur des macrophages dans les phagosomes. Les cellules dendritiques activées présentent aux lymphocytes thymiques (LT) des peptides de *M. tuberculosis* au niveau des ganglions drainant la région infectée. Les LT spécifiques des antigènes présentés sont sélectionnés et activés. Il s'ensuit une réaction immunitaire puissante de type Th1 qui aboutit à la sécrétion massive de diverses cytokines, notamment de l'interféron gamma (INF- γ). D'autres types cellulaires sont activés : les lymphocytes T gamma delta (LT $\gamma\delta$), NKT (*natural killer T*) et Th17. L'INF- γ et d'autres cytokines (TNF- α et IL-2 principalement) permettent le recrutement et l'activation de macrophages et de LT sur le site de l'infection. Dans le cas particulier de la tuberculose, *M. tuberculosis* peut résister au pouvoir de destruction des macrophages et perdurer pendant une très longue période. Les macrophages et cellules dendritiques (DC pour *dendritic cell*) se transforment alors en cellules épithélioïdes et cellules géantes. Le tout finit par former le granulome tuberculoïde entouré d'une couronne de lymphocytes. Une fois le granulome formé, soit l'intérieur du granulome nécrose et forme le caséum (substance nécrotique), il laisse alors la place à une caverne propice à la multiplication de *M. tuberculosis*, soit le granulome finit par se calcifier et la maladie est sous contrôle.

Les bactéries, si elles survivent, sont piégées à l'intérieur du granulome calcifié. Cette survie est possible parfois jusqu'à plusieurs dizaines d'années (4). Dans certaines conditions, notamment si le système immunitaire devient défaillant, la maladie peut se réactiver, même après une très longue période de latence. C'est la tuberculose maladie.

Le plus souvent, l'organisme contrôle la prolifération bactérienne. *M. tuberculosis* est soit éliminé, soit persiste à l'état quiescent : c'est l'ITL. Elle est définie par une IDR positive chez un sujet ayant été exposé à *M. tuberculosis* et étant asymptomatique. La tuberculose peut quand même se déclarer lors d'un second contact ou lors d'une baisse de l'immunité cellulaire.

La tuberculose maladie survient le plus souvent dans les deux ans qui suivent le contagé. Elle se manifeste dans 10% des cas. La tuberculose est le plus souvent pulmonaire (75% des cas). Tous les organes peuvent potentiellement être atteints.

D. Aspects cliniques de la tuberculose

1. La transmission

La transmission est strictement inter-humaine. Elle se fait par voie aérienne directe, à partir de foyers caséux et de cavernes pulmonaires d'un malade bacillifère. Le malade émet des fines gouttelettes d'un diamètre compris entre 0,5 et 3 µm, ce qui assure une suspension prolongée dans l'air ainsi qu'une bonne dispersion. Ces gouttelettes sont très riches en *M. tuberculosis* (>5000 bactéries/mL). Les gouttelettes en suspension pénètrent jusqu'aux bronchioles et alvéoles pulmonaires. L'importance de la contamination est fonction de la quantité de *M. tuberculosis* dans l'air, de la proximité des sujets, ainsi que de la fréquence des contacts. Les sources de transmission sont quasiment limitées aux tuberculoses pulmonaires (4). La contagiosité est de ce fait surtout liée aux malades avec des examens directs (ED) positifs.

2. La primo-infection

La primo-infection est le plus souvent asymptomatique (90% des cas). Le seul signe observable est la positivité de l'IDR ou des tests IGRA. Environ 10% développent une forme symptomatique : habituellement, il s'agit d'une toux associée à une altération de l'état général. L'érythème noueux, la kératoconjonctivite ainsi que la pleurésie sérofibrineuse sont rares. La radiographie pulmonaire montre typiquement des petits nodules pulmonaires associés à des adénopathies médiastinales. Chez la personne âgée ou l'immunodéprimé, l'évolution peut se faire d'emblée vers une forme pulmonaire ou disséminée. Dans 90% des cas, la primo-infection n'évolue pas vers une tuberculose maladie. Dans environ 10% des cas, les bacilles vont se multiplier à nouveau conduisant à une tuberculose maladie, qui peut être pulmonaire, extra-pulmonaire ou miliaire. Le risque de développement d'une tuberculose maladie est très élevé dans les 2 années qui suivent la primo-infection. Les principaux facteurs de risques sont liés à la malnutrition, l'immunodépression, la toxicomanie intra-veineuse, le contact direct avec des personnes infectées et ou encore le pays d'origine.

3. La tuberculose pulmonaire

L'atteinte pulmonaire prédomine au niveau de l'apex des poumons en raison du caractère aérobic des bacilles et de la très bonne oxygénation de cette partie des poumons. Les signes cliniques de la tuberculose pulmonaire associent une altération de l'état général (amaigrissement, asthénie), de la fièvre vespérale accompagnée de sueurs nocturnes et des signes pulmonaires (toux, expectorations, hémoptysies, douleurs thoraciques). Les expectorations sont de couleur blanchâtre, muqueuses, parfois purulentes. La radiographie pulmonaire est l'examen de référence pour le diagnostic des lésions tuberculeuses. Elle peut être d'aspect très varié. Elle montre le plus souvent des nodules infiltrés ou excavés ainsi que des adénopathies médiastinales satellites (**Figure 4**) (5). Les facteurs prédisposants sont les âges extrêmes de la vie, la malnutrition, l'alcoolisme, le diabète et l'immunodépression. La tomodensitométrie est indiquée pour détecter les lésions fines échappant à la radiographie en cas de doute diagnostique.

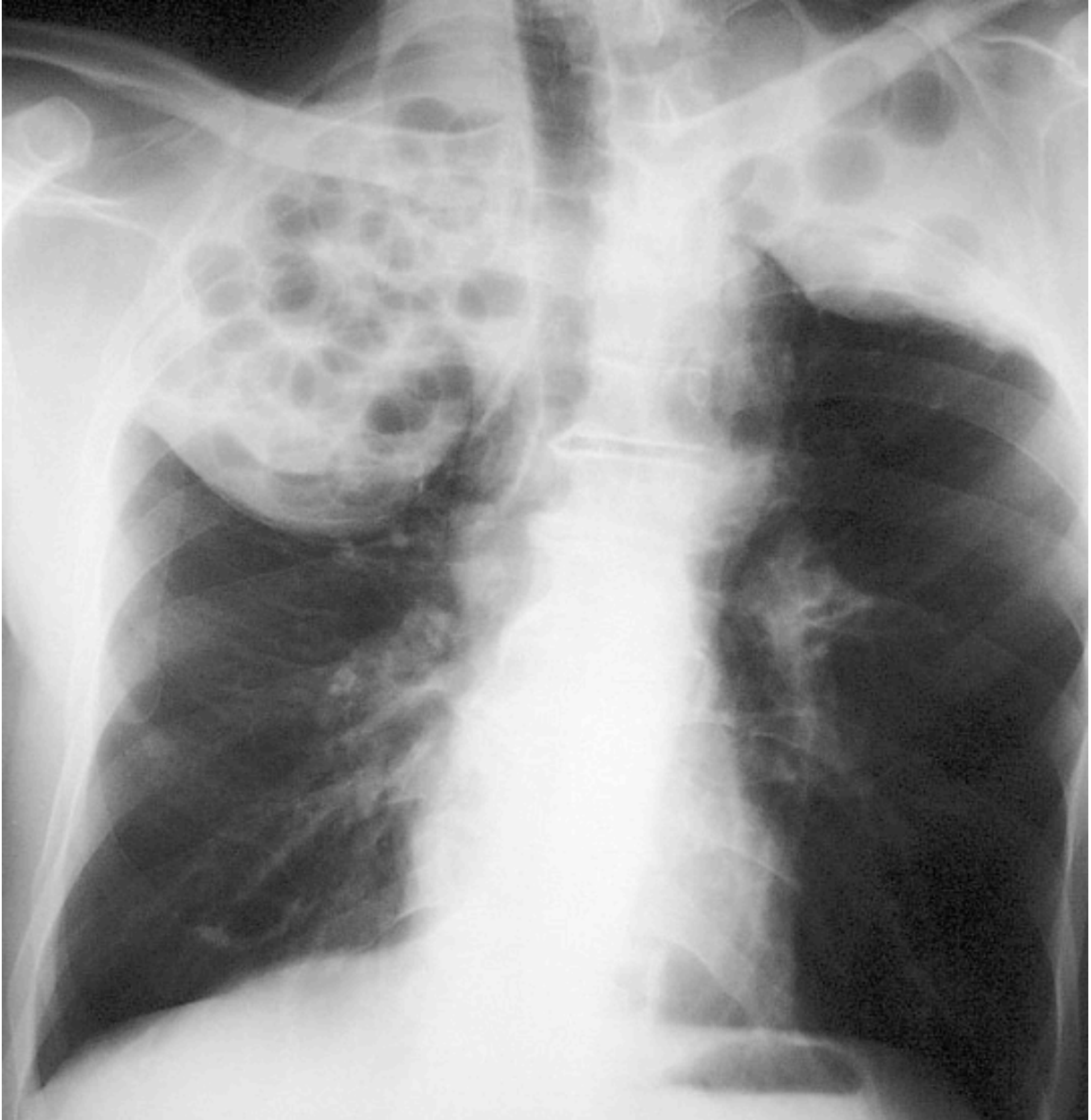


Figure 4. Radiographie pulmonaire montrant un tuberculome dans le poumon droit. (11)

4. La tuberculose miliaire

Il s'agit d'une forme généralisée. Elle survient le plus souvent peu de temps après la primo-infection. La dissémination se fait par voie hémotogène et donne des granulomes de 1 à 2 mm ayant un aspect de « grain de mil ». Ces lésions sont visibles en radiologie dans divers organes (poumons, foie, rate, moelle osseuse, méninges, etc). Elle survient le plus souvent sur un terrain immunodéprimé ou chez l'enfant.

5. Les formes extra-pulmonaires

Elles sont la conséquence d'une dissémination hémotogène ou lymphatique de *M. tuberculosis* à partir d'un foyer initial. Elles sont ou non associées à une localisation pulmonaire. Les localisations par ordre de fréquence sont ganglionnaires, osseuses, uro-génitales, neuro-méningées, péricardiques, pleurales ou péritonéales. Les autres localisations sont beaucoup plus rares. L'immunodépression favorise le développement de formes disséminées et extra-pulmonaires.

6. Tuberculose et traitement anti-TNF- α

Les anti-TNF- α sont utilisés dans le traitement de diverses maladies de système, notamment la polyarthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn et le psoriasis. Ils neutralisent le TNF- α (récepteur soluble ou anticorps). Le TNF- α joue un rôle essentiel dans la réponse immunitaire innée, dans la régulation et dans la mise en place de la réponse adaptative. Dans le cadre de la tuberculose, le TNF- α est essentiel pour la formation et le maintien du granulome (6).

Les patients traités par anti-TNF- α devraient donc présenter un fort risque de réactivation en cas d'ITL. En effet, il a été prouvé que l'incidence de la tuberculose chez les patients traités par anti TNF- α est 4 fois supérieure à l'incidence dans la population générale (7). Ces patients présentent plus souvent une tuberculose extra-pulmonaire (8).

La prévention consiste en la réalisation d'un examen clinique, radiologique et d'un test IGRA ou d'une IDR. En cas de suspicion d'ITL, un traitement antituberculeux prophylactique est mis en route.

E. Diagnostic direct

La clinique, l'histoire de la maladie et la radiologie orientent le diagnostic. Le diagnostic de certitude de tuberculose maladie ne peut être fait que par la mise en évidence directe de *M. tuberculosis* ou de lésions pathognomoniques (anatomopathologie), que ce soit par observation directe, par culture ou par biologie moléculaire.

Le diagnostic bactériologique de la tuberculose maladie s'appuie sur la mise en évidence des bactéries. L'ED est peu sensible et non spécifique. La culture, plus sensible, permet aussi de déterminer l'espèce et d'étudier la sensibilité aux antibiotiques. Les techniques de biologie moléculaire pourront être mises en œuvre dans des cas particuliers.

1. Le prélèvement

Il est réalisé de préférence avant tout traitement antibiotique et de manière la plus aseptique possible. Les prélèvements doivent être conservés à 4°C pour limiter la multiplication des autres bactéries.

Les prélèvements d'origine pulmonaire sont les plus fréquents. Il peut s'agir d'expectorations du matin ou de tubages gastriques faits le matin au réveil. Les prélèvements sont à répéter trois jours de suite pour augmenter la sensibilité des examens en raison de l'excrétion intermittente du bacille. Le tubage gastrique, qui permet de récupérer les sécrétions pulmonaires dégluties pendant le sommeil, est effectué si le patient ne crache pas. Un lavage broncho-alvéolaire ou une fibroscopie peuvent être effectués si les expectorations et les tubages gastriques ne sont pas contributifs. Pour les localisations extra-pulmonaires, les échantillons doivent être prélevés de manière aseptique par ponction ou biopsie.

2. La paroi des mycobactéries

Les mycobactéries ont la particularité d'être acido-alcool-résistantes. Elles ne prennent pas la coloration de Gram, mais sont proches structurellement des bactéries Gram positives. La structure pariétale est complexe, constituée d'une membrane interne rigide (peptidoglycane), d'une couche interne composée d'arabinogalactanes estérifiés avec des acides muramiques et des acides mycoliques (responsables de l'acido-alcool-résistance). La couche externe est composée majoritairement de polysaccharides (9).

La membrane cytoplasmique est une bicouche lipidique composée de lipides polaires, de phospholipides et de protéines. Les phospholipides sont constitués de phosphatidyl inositol manoside (PIM), phosphatidylinositol, lipomannanes (LM) phosphatidylétanolamine et de lipoarabinomannane (LAM) (9). Ces composés sont impliqués dans la physiopathologie de *M. tuberculosis* : ils modulent la réponse immunitaire par leurs propriétés anti-inflammatoires.

La paroi de *M. tuberculosis* est donc très riche en lipides. Cette richesse en lipides explique la résistance particulière des mycobactéries aux agents chimiques comme les acides, les bases, certains détergents, mais aussi au système immunitaire.

3. Préparation des échantillons

Les échantillons à examiner sont le plus souvent poly-microbiens. La croissance des mycobactéries du complexe *tuberculosis* étant très lente, il est nécessaire de « décontaminer » les échantillons pour ne pas inhiber leur pousse. Etant donné la résistance naturelle des mycobactéries aux antiseptiques, les méthodes de fluidification/décontamination les plus utilisées sont celles utilisant le N-acétylcystéine et la soude. L'échantillon est ensuite centrifugé et le culot est repris dans un liquide approprié pour la culture.

4. Examen direct

On peut visualiser les mycobactéries au microscope après coloration de Ziehl-Neelsen ou à l'auramine (3). Ce sont des bacilles droits ou légèrement incurvés de 1 à 10 µm de long et de 0,3 à 0,6µm de large. L'ED peut être réalisé sur l'échantillon avant ou après décontamination.

Les propriétés d'alcoolo-acido-résistances (BAAR) des mycobactéries sont utilisées pour les colorer spécifiquement. Les acides mycoliques réagissent avec les colorants basiques tels que la fuchsine (Ziehl-Neelsen) et l'auramine. Cette coloration résiste à l'action des acides et de l'alcool. La coloration de Ziehl est la plus répandue et la moins coûteuse. Les mycobactéries apparaissent rouges/rosées sur fond bleu-vert en microscopie optique (Figure 5). Deux cents à trois cents champs doivent être parcourus à l'objectif X100 à immersion pour rendre un résultat négatif. Cela en fait une technique longue à mettre en œuvre et qui nécessite un personnel expérimenté.

Pour la coloration à l'auramine, les lames sont observées sur un microscope à fluorescence entre 480nm et 490nm. Les bacilles apparaissent jaunes sur fond rouge et sont plus facilement visibles qu'en microscopie optique (6). Cela permet de faire l'examen à l'objectif X25 et de diminuer le temps nécessaire à la réalisation de cet examen. Il s'agit donc d'une technique de choix pour les laboratoires ayant de grandes séries (10). Les résultats sont exprimés en nombre de Bacilles acido-alcoolo-résistants/champs.

L'ED est une étape clé du diagnostic étant donné sa rapidité d'exécution et son faible coût. Toutefois cet examen n'est pas spécifique de *M. tuberculosis*: les autres

mycobactéries ainsi que *Nocardia spp* prennent ces colorations. L'ED est aussi peu sensible puisqu'il nécessite 5.10^3 à 10^4 BAAR/mL d'échantillon pour voir au moins un BAAR. Comparée à la culture, la sensibilité est de 40 à 60%.

L'ED est donc un examen peu spécifique et peu sensible, mais indispensable, étant donné son coût et sa rapidité d'exécution.

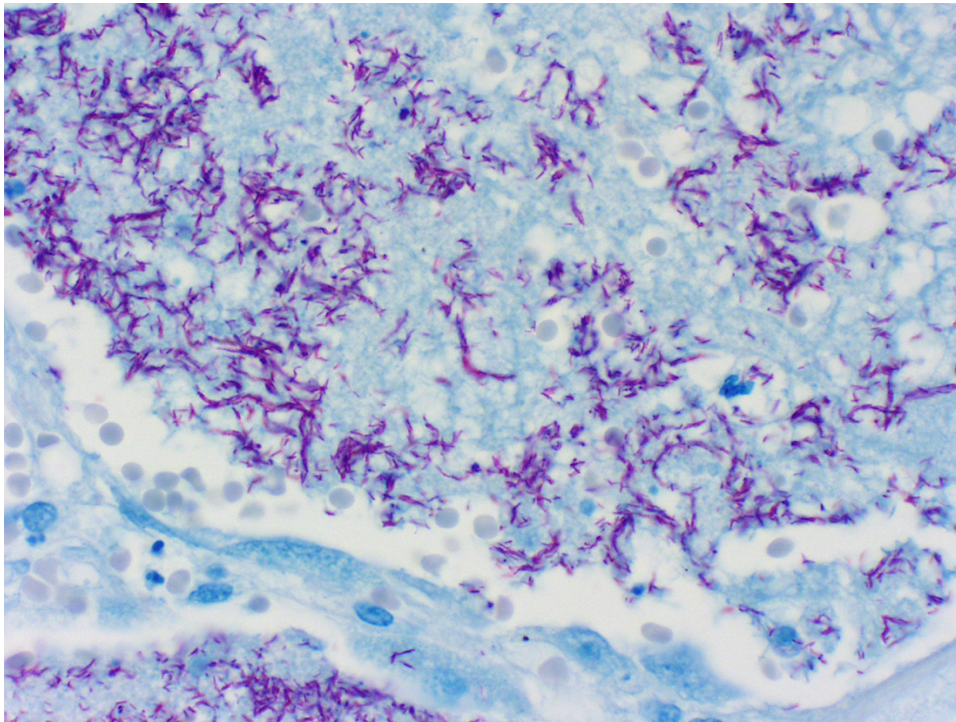


Figure 5. Coloration de Ziehl Neelsen, objectif X100.
(Tiré du site www.microbe-edu.com)

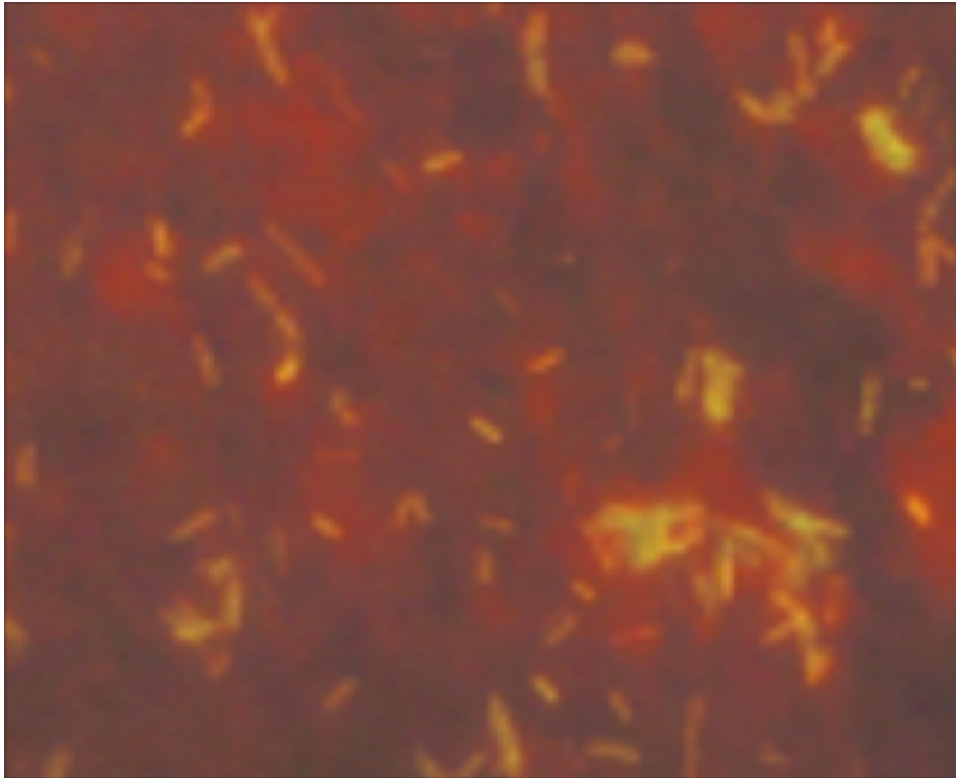


Figure 6. Coloration à l'auramine, objectif X25.
(Tiré du site www.microbe-edu.com)

5. Culture

La culture reste la méthode de référence pour la mise en évidence de *M. tuberculosis*, car c'est la méthode la plus sensible.

M. tuberculosis est un micro-organisme à croissance lente : le temps de division est d'environ 20h. Les mycobactéries sont aussi caractérisées par leurs exigences nutritives: elles ont besoin de milieux de cultures spécifiques. On en distingue deux types : les milieux solides et les milieux liquides.

a. Les milieux solides

Les milieux solides de Löwenstein-Jensen et Coletsos, sont utilisés depuis très longtemps. Ces milieux présentent de nombreux avantages : coût faible, bonne sensibilité, aspect caractéristique des colonies (en "chou-fleur" pour *M. tuberculosis*).

Néanmoins, le délai de croissance très long de *M. tuberculosis* sur ces milieux (15 à 28 jours) a amené les industriels à développer des techniques en milieux liquide

permettant une pousse plus rapide, mais aussi et surtout une détection précoce de la croissance bactérienne.

b. Milieux liquides

La détection de la pousse, dans les premiers milieux liquides commercialisés, est basée sur la mesure du CO₂ radioactif produit par la croissance bactérienne dans un milieu middlebrook 7H12 (BACTEC 460 TB). Le délai moyen de pousse varie de 8 à 12 jours quand l'ED est positif et 14 à 18 jours quand il est négatif.

D'autres techniques de détection de croissance non radioactives en milieu liquide ont été mises au point. Actuellement, il existe plusieurs milieux commercialisés. La méthode *Mycobacterial Growth Indicator Tube* (MGIT) (Becton Dickinson) manuelle et automatisable (Bactec 960 TB) utilise un sel de ruthénium qui émet une fluorescence visible en lumière violette lorsque la pression en oxygène diminue dans le tube. Les délais de croissance de *M. tuberculosis* sont proches de ceux obtenus avec le Bactec 460 TB. D'autres systèmes détectent l'augmentation de CO₂ dans le milieu (Système BacT/Alert 3D) ou la formation de produits colorés (Bio FM de BioRad et MB Redox de Biotest).

Lorsqu'un flacon est positif, il est systématiquement effectué un ED pour confirmer la présence de mycobactéries.

Le principal avantage des milieux liquides est la réduction du temps de pousse d'environ 50%, la sensibilité étant la même que pour les milieux de cultures solides.

6. Méthodes d'amplification moléculaire appliquées au diagnostic direct

Il existe plusieurs techniques d'amplification génique permettant la détection de *M. tuberculosis* à partir des produits pathologiques :

- réaction d'amplification génique par *Polymerase Chain Reaction* (PCR) : Amplicor Roche Diagnostic (Roche Diagnostic). Il s'agit de l'amplification d'un fragment du gène codant pour l'ARN 16S de *M. tuberculosis*,
- réaction d'amplification transcriptionnelle de l'ARN par *Transcription Mediated Amplification* (TMA) Cette technique fait appel à l'amplification isotherme d'une séquence spécifique de l'ARN 16S générant des copies d'ARN.

- réaction d'amplification génique par *Ligase Chain Reaction* (LCR) : test LCX Probe (Abbott). C'est un procédé d'amplification par réalisation de cycle de ligature de 2 sondes nucléotidiques spécifiques de *M. tuberculosis* et choisies de manière à être juxtaposées lorsqu'elles s'hybrident à l'ADN cible.
- réaction d'amplification par *Strand Displacement Amplification* (SDA) : trousse BD ProbeTec ET DTB Assay (Becton Dickinson). Il s'agit d'une amplification isotherme d'ADN réalisée dans un automate qui couple amplification et détection.

La principale indication de l'amplification concerne les échantillons positifs à l'ED. Un test positif permet d'affirmer dans la majorité des cas l'appartenance au complexe *tuberculosis*. La sensibilité est de 96 à 100% pour les échantillons positifs à l'ED (11).

Dans le cas où l'ED est négatif, la sensibilité chute à moins de 50%. L'utilisation de l'amplification génique dans ce cadre est donc discutable, la culture reste la référence (12).

7. Identification des mycobactéries à partir de la culture

a. Identification du complexe *tuberculosis*

La technique d'hybridation moléculaire a supplanté les méthodes d'identifications biochimiques classiques :

- Accuprobe (Gen-Probe) : il s'agit de sondes froides marquées par un ester d'acridinium qui permet le diagnostic différentiel entre le complexe *tuberculosis* et les MNT les plus fréquemment rencontrées au laboratoire (*M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. goodii*).
- INNO LiPA Mycobacteria (Innogenetics) : les sondes spécifiques sont immobilisées sur une bandelette, la réaction d'hybridation se fait après amplification d'une région de l'ADN codant pour l'espace inter-génique 16-23S. Cette technique permet d'identifier les huit espèces les plus fréquemment isolées au laboratoire qui sont en plus de celles identifiées par Gen-Probe, *M. scrofulaceum*, *M. xenopi* et *M. chelonae*.
- GenoType Mycobacteria (Hain Diagnostika) : il s'agit du même principe qu'INNO LiPA, cette méthode nécessite une amplification de l'espace inter-génique 16-23S suivie d'une hybridation sur une bandelette où sont fixées

des sondes biotinylées. Elle permet le diagnostic du complexe *tuberculosis* et de 15 espèces de mycobactéries non tuberculeuses.

b. Diagnostic d'espèce au sein du complexe *tuberculosis*

Jusqu'à ces dernières années, la biologie moléculaire ne permettait pas de différencier les différentes espèces du complexe *tuberculosis*, ainsi l'identification était basée sur des tests biochimiques (production de niacine, activité catalasique, présence d'une nitrate réductase, sensibilité à certains antibiotiques).

Ces techniques autrefois très utilisées sont aujourd'hui supplantées par les techniques de biologie moléculaire. Il existe un test commercialisé GenoType MTBC (Hain Diagnostika) qui permet un diagnostic différentiel entre *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, et *M. bovis* ssp. *caprae*.

8. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques: méthode des proportions

L'antibiogramme des mycobactéries à croissance lente est basé sur la méthode des proportions. La croissance de l'inoculum bactérien en présence de l'antibiotique testé est comparée à une deuxième culture sans antibiotiques et dont l'inoculum est dilué au centième. La résistance à un antibiotique est définie par la présence d'au moins 1% de mutants résistants.

L'antibiogramme peut être réalisé en milieu liquide: la courbe de croissance bactérienne du milieu contenant un antibiotique est comparée à un échantillon ensemencé au centième. Les résultats sont similaires à ceux obtenus en milieu solide.

Le délai de lecture est de 4 semaines pour les milieux solides et de 8 à 15 jours pour les milieux liquides.

F. Le diagnostic indirect

1. La réponse immunitaire contre *M. tuberculosis*

M. tuberculosis est transmis sous forme d'aérosol dans des gouttelettes qui sont inhalées par l'hôte. Elles se déposent dans les poumons qui seront le site de la primo-infection. Une grande partie des bacilles est piégée dans le mucus et éliminée par la muqueuse ciliée qui tapisse l'arbre bronchique. On estime que seulement 10% des bacilles rejoignent le poumon profond. Dans le poumon, le bacille interagit avec les macrophages alvéolaires qui l'englobent au sein d'un phagosome. Les récepteurs mis en jeu lors de la phagocytose sont déterminants pour la survie de *M. tuberculosis* à l'intérieur des macrophages, permettant au bacille de moduler son microenvironnement pour le détourner à son avantage, survivre et se multiplier. A ce stade de l'infection, les macrophages ont la capacité de circonscrire l'infection. Mais, pour mettre en place les mécanismes bactéricides et éliminer *M. tuberculosis*, les macrophages doivent être activés.

Les DC sont des cellules présentatrices de l'antigène (CPA) professionnelles. Elles jouent un rôle déterminant dans la mise en place d'une immunité adaptative. Les DC phagocytent aussi les mycobactéries dans le poumon, ou captent des antigènes bactériens présents dans le milieu. Après maturation, ces DC migrent au niveau des ganglions lymphatiques drainant la région infectée. Les antigènes de *M. tuberculosis* sont présentés, aux lymphocytes T CD4 (LTCD4) associés au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) II, aux lymphocytes T CD8 (LTCD8) au CMH-I et aux les NKT (*natural killer T*) au CD1. Il n'existe pas de structure de présentation connue pour les LT $\gamma\delta$. Les LT qui reconnaissent spécifiquement les antigènes de *M. tuberculosis* sont activés, se multiplient et regagnent la région infectée. Une fois dans les poumons, les LT activés produisent de l'interferon gamma (INF- γ), de l'interleukine-2 (IL-2) et du TNF- α . L'INF- γ est plus particulièrement responsable de l'activation des macrophages. Cette activation des macrophages permet la mise en place de mécanismes bactéricides comme l'autophagie, la production de peptides à activité antimycobactérienne, l'acidification du phagosome, la production d'oxyde nitrique (NO) ou encore la fusion phagosome/lysosome. Néanmoins, malgré la mise en place des mécanismes bactéricides, *M. tuberculosis* peut persister au niveau des poumons, à l'intérieur d'un granulome.

La réponse immune est donc divisée en deux grands axes inter-dépendants et complémentaires : la réponse immunitaire innée et la réponse immunitaire adaptative.

Le problème posé par l'infection à *M. tuberculosis* est la déficience fréquente de la réponse immunitaire. La réponse immunitaire à *M. tuberculosis* fait intervenir des mécanismes complexes et inter-dépendants dont l'étude est souvent difficile notamment *in vivo*, menant à un ensemble de données parfois contradictoires.

2. Réponse immunitaire innée contre *M. tuberculosis*

La réponse immunitaire innée est une réaction rapide, non spécifique et sans mémoire, en réaction à une agression ici bactérienne. L'initiation de cette réponse fait intervenir les cellules du système immunitaire inné qui ont la capacité de reconnaître des motifs produits par les bactéries. Les mycobactéries pénètrent dans les cellules hôtes (macrophages, DC) de manière passive grâce à des récepteurs endocytaires intervenant dans les voies de la phagocytose. La complexité de la structure de l'enveloppe des mycobactéries explique le grand nombre d'interactions possibles entre le bacille et différents types de récepteurs.

D'autres récepteurs de « reconnaissance » sont exprimés à la surface des cellules phagocytaires tels que les macrophages, les DC, des polynucléaires neutrophiles (PNN), des cellules épithéliales, mais aussi lymphocytaires.

a. Les récepteurs de l'immunité innée

Les récepteurs de l'immunité innée sont présentés dans la Figure 7.

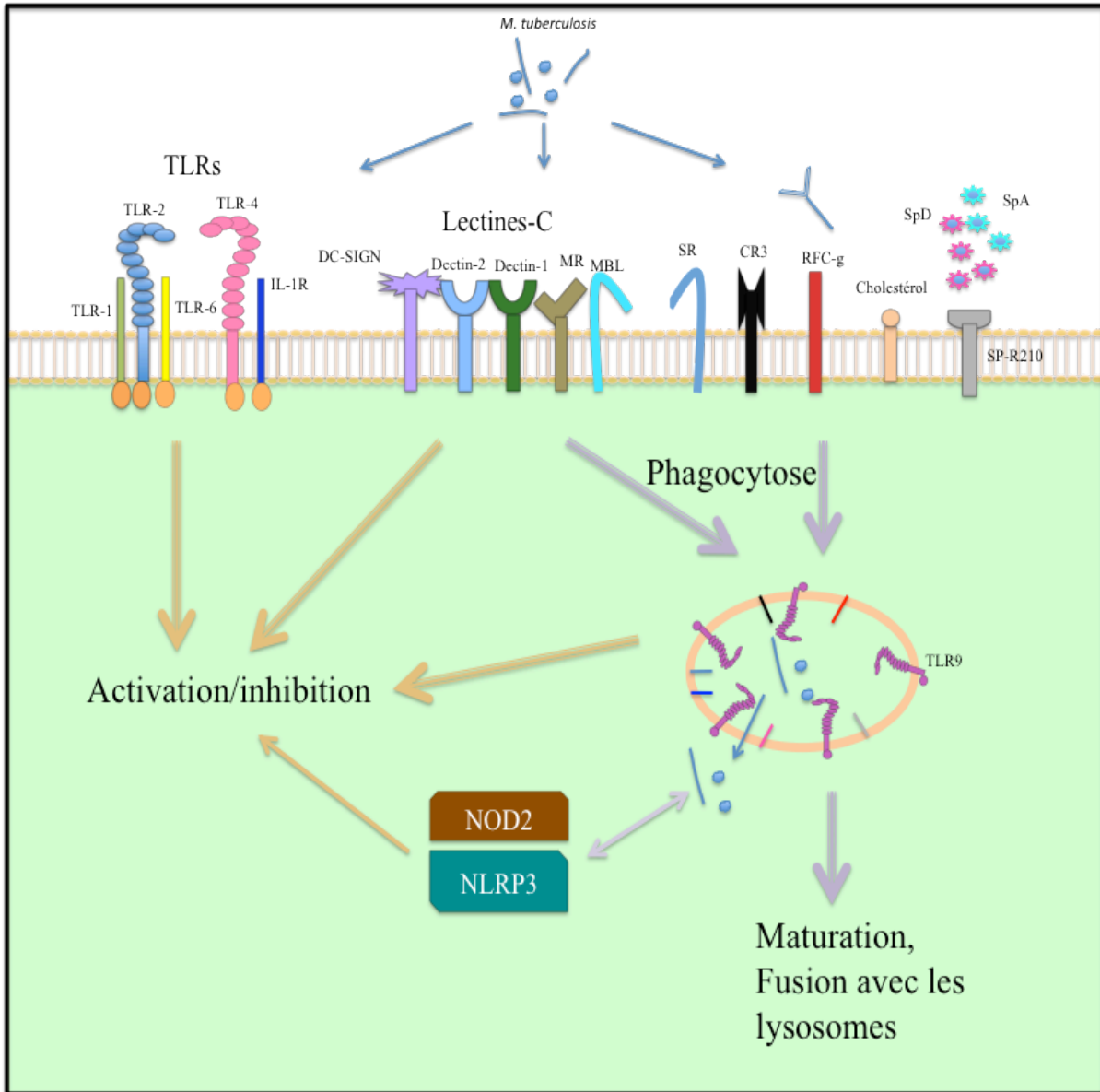


Figure 7. Les récepteurs de l'immunité innée.

M. tuberculosis et/ou les antigènes mycobactériens interagissent avec des récepteurs à la surface des cellules de la réponse immunitaire innée. Ces récepteurs permettent l'endocytose de *M. tuberculosis* et/ou l'activation ou l'inhibition des cellules effectrices. Une fois endocytés le bacille et les antigènes mycobactériens peuvent interagir avec des PRR endosomaux tels que TLR9 qui détecte les acides nucléiques étrangers et aussi, avec des PRR cytoplasmiques tels que les NLR. *M. tuberculosis* pénètre dans les cellules de manière passive via les récepteurs phagocytaires. En fonction de la voie empruntée, celui-ci sera éliminé ou pourra persister. Inspiré de **A. Tanne**, Université de Toulouse, 2009.

La reconnaissance de *M. tuberculosis* ou de ses produits est une étape cruciale pour la réponse immunitaire innée. Elle se fait par les PRR (*pattern recognition receptors*) présents à la surface des cellules phagocytaires, lymphocytaires et épithéliales. Les PRR reconnaissent des motifs moléculaires, conservés dans l'évolution chez les agents pathogènes, appelés PAMP (*pathogen associated molecular patterns*). Ils sont responsables de l'activation des cellules du système immunitaire. Les données concernant leur place dans la réponse immunitaire contre la tuberculose sont ambivalentes, induisant tolérance ou activation en fonction des ligands et des récepteurs mis en jeux.

i. Les récepteurs senseurs de danger

1) Les Toll like récepteur

Les Toll like récepteur (TLR) permettent l'activation des phagocytes et modulent la phagocytose. Ils ne médient pas directement la phagocytose. Ce sont des récepteurs de l'immunité innée, il a été identifié 11 TLR chez l'homme. Ce sont des glycoprotéines transmembranaires qui reconnaissent une grande variété de ligands (ADN, lipopolysaccharide (LPS), acide lipotéicoïques, peptidoglycanes).

Ils sont présents à la surface de nombreux types cellulaires, immunitaires ou non, et provoquent des réactions différentes en fonction des ligands qu'ils reconnaissent et du type cellulaire considéré. La partie extracellulaire des TLR est composée de motifs riches en résidus leucines impliqués dans la reconnaissance de déterminants bactériens. La partie intra-cellulaire présente un domaine qui permet de lier une sérine-kinase de type IRAK (*IL-1R associated kinase*). Les TLR activés déclenchent une cascade de phosphorylation cytoplasmique dépendant de la protéine adaptatrice MyD88 aboutissant à l'activation de facteurs de transcriptions pro-inflammatoires comme NF- κ B et MAP kinase.

Les cellules ainsi stimulées produisent des cytokines pro-inflammatoires (IL-12, TNF- α , INF- γ et INF- α). Les TLR impliqués dans la reconnaissance de *M. tuberculosis* sont TLR2, TLR4, TLR9, TLR1 et TLR6. La déficience en un ou plusieurs de ces récepteurs semble être associée à une sensibilité accrue aux infections à *M. tuberculosis* (13). Mais, c'est surtout la déficience en MyD88 qui est associée à un tableau de tuberculose sévère montrant son importance dans les voies de transduction, dont la voie NF- κ B, pour initier la réponse immunitaire à *M. tuberculosis* (14). MyD88 intervient aussi dans d'autres voies impliquées

dans la défense anti-bacillaire, notamment la régulation de la sécrétion d'INF- γ , de l'inflammasome.

TLR2 est impliqué dans la reconnaissance d'antigènes mycobactériens, notamment de lipoprotéines de la paroi (LpqH, LprA et LprG), mais aussi les LM et PIM (15). L'activation de la voie TLR2 se fait exclusivement par l'intermédiaire de MyD88 (16).

Il semble que l'activation des cellules phagocytaires via TLR2 puisse être utilisée avantageusement par *M. tuberculosis*. L'INF- γ permet une plus grande expression du CMH-II à la surface des macrophages. Cela augmenterait la présentation des antigènes et permettrait aux DC d'améliorer la stimulation de LT spécifiques. Dans le cadre de la tuberculose, la reconnaissance de *M. tuberculosis* par TLR2 n'est pas associée à une régulation positive du CMH-II. Les antigènes de *M. tuberculosis* sont donc moins présentés, ce qui constitue un avantage pour *M. tuberculosis* (17). Cette inhibition est aussi dépendante de MyD88 (18). Même si une partie de l'inhibition de l'expression du CMH-II observée dans l'infection à *M. tuberculosis* est liée aux TLR2 et MyD88, d'autres mécanismes encore inconnus semblent aussi être à l'origine de ce phénomène (19).

D'autres expériences sont en contradiction avec ces conclusions et ont montré que la stimulation de TLR2 est protectrice. Par exemple, Liu *et al.* ont démontré que l'engagement de TLR2 permettait la régulation positive d'un récepteur à la vitamine D (20). La vitamine D est nécessaire à la production de cathelicidine, peptide bactéricide pour *M. tuberculosis* (21).

TLR4 reconnaît une protéine thermolabile, encore non identifiée, associée à *M. tuberculosis*, ainsi que les LAM et PIM. Il est localisé à la surface cellulaire et au niveau de la membrane du phagosome. Il peut induire une voie dépendante de MyD88, mais pas exclusivement (16).

TLR9 est impliqué dans la reconnaissance d'acides nucléiques exogènes (13). Il est présent uniquement dans les compartiments endolysosomals activés et interagit avec des fragments d'ADN de bactéries lysées (22).

Ces données sur les TLR font référence à des expériences *in vitro*. *In vivo*, le rôle des TLR reste incertain et controversé. En effet, les résultats d'études menées chez la souris sont dépendants des conditions expérimentales comme la dose de bactérie, la souche de *M. tuberculosis* utilisée et la nature de la déficience. Si TLR2, TLR4 et TLR9 ne semblent pas essentiels à la défense contre *M. tuberculosis*, MyD88 est un élément indispensable (23).

2) Les récepteurs de type NOD

Les récepteurs *nucleotide oligomerization domain like receptor* (NOD) sont des protéines cytoplasmiques modulatrices impliquées dans la reconnaissance de produits bactériens. Elles ont en commun un domaine central (NATCH) et un domaine C-terminal riches en résidus leucine. Deux familles participent à la régulation de la réponse inflammatoire à *M. tuberculosis*: les NLR-C et les NLR-P.

(a) NLR-C

Les NLR-C les plus décrits sont NOD1 et NOD2. L'activation de ces récepteurs peut conduire à l'activation de deux voies de signalisation. Une voie débouche sur l'activation de NF- κ B. L'autre fait intervenir la voie de l'inflammasome. Les deux aboutissent à la production de cytokines pro-inflammatoires et de peptides anti-microbiens (24). NOD2 a pour ligand un produit de dégradation du peptidoglycane des bactéries gram positif (25). Le mycolylarabinogalactane peptidoglycane (un constituant de la paroi des mycobactéries) provoque une sécrétion de cytokine partiellement dépendante de NOD2 (26). Les macrophages et les DC de souris déficientes en NOD2 montrent une diminution de sécrétion de cytokines et de NO (26). Malgré cela, les souris déficientes en NOD2 ne présentent pas de susceptibilité particulière à l'infection par *M. tuberculosis* (26).

(b) NLR-P

Les NLR-P sont des PRR impliqués dans la régulation de l'inflammasome selon une voie dépendante de la caspase I. L'inflammasome est un complexe multi-protéique dont l'activation permet la maturation des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-18, produites par l'activation de la voie NF- κ B, sous l'action de la caspase I (27). NLR-P3 peut interagir avec des composants mycobactériens sécrétés par *M. tuberculosis* dans le cytoplasme grâce au facteur de virulence ESX1 (*early secretory antigenic target*) et ainsi permettre la sécrétion de IL-1 β et IL-18 (28). Un système inhibiteur a été identifié chez *M. tuberculosis*: la métalloprotéase ZMP1 qui inhiberait l'activation de l'inflammasome par NLRP3 (29).

ii. Les récepteurs d'adhésion à *M. tuberculosis*

La première étape de la phagocytose est l'adhésion de la mycobactérie au phagocyte. Plusieurs récepteurs ont été identifiés comme pouvant servir à la phagocytose. La nature des récepteurs mis en jeu influence la qualité de la réponse de l'hôte. En effet, il a été montré que la porte d'entrée des mycobactéries dans les macrophages était un élément important pour leur survie, et donc pour le devenir de l'infection. *M. tuberculosis* met en place de nombreuses stratégies pour orienter son entrée dans les macrophages.

Ces récepteurs sont les lectines-C, les récepteurs du complément (RC), les *scavenger receptors* (SR) et les récepteurs de la fraction du complément (RFc).

1) Les lectines de type C

(a) *Dendritic cell-specific intracellular adhesion molecule 3 grabbing non integrin (DC-SIGN)*

DC-SIGN est une lectine de type C impliquée dans la reconnaissance de *M. tuberculosis* (30). Il s'agit d'un récepteur aux glucides. C'est un récepteur calcium-dépendant, reconnaissant des résidus mannoses. Il est présent à la surface des DC et des macrophages et reconnaît des composants de la paroi de *M. tuberculosis* comme les LAM ou les PIM. Le résultat de cette reconnaissance serait une diminution de la maturation des DC et une modulation de la sécrétion de cytokines.

Par exemple, l'augmentation de sécrétion d'IL-10 entraîne une suppression de l'immunité protectrice contre *M. tuberculosis* par stimulation de la voie Th2 (30).

(b) *Protéines du surfactant pulmonaire (Collectines)*

L'épithélium pulmonaire est lubrifié et protégé par le surfactant pulmonaire produit par l'épithélium respiratoire. Il s'agit d'une mixture de lipides et de protéines permettant de diminuer la tension de surface au niveau des alvéoles. Parmi les protéines du surfactant pulmonaire, deux sont des collectines faisant partie de la super-famille des Lectines-C. Elles participent à la défense immunitaire innée : SP-A et SP-D (31). Les collectines pulmonaires

interagissent avec une grande variété de micro-organismes et plus particulièrement *M. tuberculosis* (32).

Un étude a montré que SP-A, liée au BCG était reconnue par un récepteur membranaire nommé SP-R210 présent à la surface des macrophages et des pneumocytes (33). D'autres études ont montré que SP-A pourrait se comporter comme une opsonine (34). De plus, SP-A augmente l'expression des récepteurs au mannose (RM), à la surface des macrophages et potentialise ainsi la phagocytose (35). Cette voie de pénétration serait associée à une résistance accrue des mycobactéries par diminution de production de protoxyde d'azote (36-38).

La protéine de surfactant D, présente aussi au niveau des alvéoles, a montré des propriétés inhibitrices envers des souches virulentes de *M. tuberculosis* (39). SP-D se lie aux LAM et provoque l'agglutination de *M. tuberculosis* entraînant une diminution de la phagocytose de *M. tuberculosis* par inhibition des RM (34).

(c) Les récepteurs au mannose (RM)

Ce sont des Lectines de type C transmembranaires. Les RM, aussi appelés CD207, reconnaissent des résidus mannoses terminaux au niveau des LAM présents à la surface de *M. tuberculosis*. Ils sont exprimés à la surface des macrophages résidant des poumons, des DC ainsi que des macrophages dérivés des monocytes sanguins. C'est la voie de pénétration privilégiée des bactéries virulentes (40), qui sont aussi les plus riches en LAM. La reconnaissance de *M. tuberculosis* par ces récepteurs est associée à une résistance particulièrement forte de *M. tuberculosis* à la lyse par les macrophages. La sécrétion de cytokines (41) est perturbée et la fusion des phagosomes avec les lysosomes est inhibée (40).

(d) Mannose binding lectin (MBL)

Il s'agit d'une lectine de type C qui peut interagir avec des résidus manosyl-lipoarabinomannanes (ManLAM) présents à la surface des mycobactéries. Elle est sécrétée par le foie. Le rôle des MBL dans la réponse immunitaire semble toutefois mineur. En effet une étude sur le polymorphisme génétique des MBL a montré l'existence de nombreux variants alléliques (42), dont certains engendrent une forte diminution des taux de MBL.

(e) *Dectin-1 et Dectin-2*

Ce sont des lectines de type C transmembranaires présentes à la surface des cellules phagocytaires, mais aussi des LT et lymphocytes B (LB), interagissant avec des motifs glucidiques. Elles sont principalement impliquées dans les défenses antifongiques. L'activation de Dectin-1 induit la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6, IL-12 et IL-2), la phagocytose, l'activation des DC et la sécrétion d'IL-10. Cette dernière a une activité inhibitrice sur la réponse immunitaire. Elle pourrait limiter la réaction inflammatoire et favoriser la mise en place d'une mémoire immune (43).

Le rôle de Dectin-2 est moins étudié dans l'infection à *M. tuberculosis*.

2) *Les complément receptor (CR)*

M. tuberculosis est opsonisé de façon non spécifique par diverses opsonines dérivées du complément, particulièrement C3b et C3bi. Les bacilles opsonisés sont alors reconnus par CR1 et CR3/CR4 respectivement. Le plus important semble être CR3 (44).

CR3 est un hétérodimère (CD11b/CD18) faisant partie de la famille des intégrines. Il est exprimé au niveau des PNNs, des cellules *natural killer* (NK), des monocytes et des macrophages (45). Le domaine extracellulaire de CR3 peut interagir avec une grande variété de composants bactériens notamment les LAM, mais aussi avec des opsonines. Un composant de la membrane bactérienne encore inconnu peut s'associer au fragment C2a du complément pour former une C3 convertase, en l'absence de C4b, qui produit du C3b à partir de C3 (46). Ainsi, *M. tuberculosis* est l'acteur de son opsonisation et de son ingestion par les macrophages. Il se pourrait que la bactérie en tire un avantage pour sa survie.

L'activation de CR3, quel que soit le ligand impliqué, provoque une cascade de phosphorylations intra-cellulaires entraînant la phagocytose du bacille ainsi que l'activation du phagocyte (29). Cependant, si l'implication de CR3 dans la phagocytose de *M. tuberculosis in vitro* a bien été montrée, les résultats d'expériences *in vivo* chez des souris déficientes en CR3 n'ont pas montré de différences significatives avec les phénotypes sauvages (47). Ces résultats indiquent que ces mécanismes ne sont pas primordiaux et qu'il existe d'autres voies d'interactions avec les cellules phagocytaires.

3) Récepteurs scavengers

Les récepteurs scavengers (SR) sont exprimés à la surface de nombreux types cellulaires comme les macrophages, les DC mais aussi les cellules endothéliales et les adipocytes. Leur rôle est bien connu dans l'athérosclérose. Ils jouent aussi un rôle important dans l'immunité innée et régulent les macrophages. Les adipocytes ont certaines caractéristiques communes avec les macrophages, ils peuvent reconnaître et endocyter *M. tuberculosis* via les SR (48).

Les adipocytes constitueraient donc un réservoir de bacilles extra-pulmonaires, inaccessible au système immunitaire et aux antibactériens. Il a été prouvé que si les récepteurs de type RM et CR étaient bloqués, les SR de type-A étaient alors utilisés par MB pour pénétrer les macrophages (49).

4) R_{FC} gamma

Le récepteur pour le fragment Fc des immunoglobulines gamma (R_{FC}γ) reconnaît le fragment Fc des immunoglobulines de type G (IgG) sur des mycobactéries couvertes d'IgG. L'activation de ces récepteurs aboutit à des cascades de phosphorylation intra-cytoplasmique qui permettent l'activation des cellules et la phagocytose de *M. tuberculosis*.

5) Cholestérol

Des études *in vitro* ont démontré que le cholestérol jouait un rôle important dans l'ingestion des mycobactéries par les macrophages (50). Une déplétion totale de cholestérol plasmatique engendre une inhibition complète de la phagocytose (50). De plus, le cholestérol favorise aussi l'association entre le phagosome et la coronine 1 qui forme une couche protectrice pour MB en inhibant la fusion du phagosome avec les lysosomes (50).

b. Mécanismes de survie de *M. tuberculosis* dans les phagocytes quiescents

Une fois à l'intérieur du phagosome, *M. tuberculosis* met en œuvre des mécanismes complexes lui permettant de survivre. Tout se passe comme si la stratégie de *M. tuberculosis* était de se loger à l'intérieur des macrophages au niveau des phagosomes où il peut perdurer. Cette persistance est à l'origine d'une stimulation chronique du système immunitaire expliquant le maintien de résultats positifs à l'IDR et aux IGRA à distance de l'exposition. Les mécanismes inhibant la bactéricidie et la mise en place d'une immunité spécifique pourraient aussi être à l'origine de l'évolution de certains sujets vers la tuberculose maladie. Chez une fraction de ces patients, et notamment en cas de tuberculose extra-pulmonaire, l'IDR et les IGRA sont souvent négatifs, reflétant l'incapacité du système immunitaire à mettre en place une immunité spécifique contre *M. tuberculosis*.

i. Les macrophages non activés

Le faible nombre de bacilles mis en jeu ainsi que la faible expression des PRR au niveau des poumons permet aux bacilles de se loger dans les phagocytes et de s'y développer sans les activer. Au début de l'infection (les trois premiers jours), il semble qu'il se mette en place un environnement bactériostatique puis, à partir de 3^{ème} jour, la croissance bactérienne devient exponentielle. *M. tuberculosis* inhibe l'activation des DC et des macrophages, ainsi que la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires par interaction avec les TLR.

Les macrophages phagocytent *M. tuberculosis* suite à la reconnaissance de PAMP à la surface de *M. tuberculosis* par des PRR. Les cellules phagocytaires émettent alors des pseudopodes qui englobent le pathogène dans un phagosome. Celui-ci subit une maturation en fusionnant avec des endosomes et des lysosomes pour former successivement les phagosomes intermédiaires et tardifs et les phagolysosomes. A l'intérieur du phagosome, des mécanismes bactéricides se mettent en place : acidification du milieu, production de radicaux libres oxygénés et nitrés (RNI pour *reactive Oxygen Intermediate* et ROI pour *reactive oxygen species*), de protéases et de peptides bactéricides. *M. tuberculosis* peut survivre à ces mécanismes. Le blocage de la maturation des phagosomes est le mécanisme le plus connu et le plus étudié. La multiplication des bactéries dans les vacuoles entraîne une accumulation d'antigènes mycobactériens dans les macrophages et les DC. Ces antigènes induisent la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IN- γ , IL-12) permettant l'initiation de la

réponse immunitaire innée. La sécrétion de chimiokines permet aussi le recrutement d'autres effecteurs comme les PNN, des monocytes circulants et des cellules NK. Cette réponse immunitaire innée ne permet pas la clairance de *M. tuberculosis*.

ii. Inhibition de la fusion phagosome/lysosome

1) Inositol-3-phosphate

L'accumulation d'inositol-3-phosphate (IP3) dans la membrane du phagosome est un élément essentiel pour la fusion avec les lysosomes. La présence d'IP3 est nécessaire pour le recrutement de protéines appelées les « marqueurs tardifs de l'endosome » : Hrs (*hepatocyte growth factor-regulated tyrosin kinase substrate*) et EEA1 (*early endosome antigen 1*). La prévention de l'accumulation d'IP3 est assurée par des composants de MB :

- les LAM qui inhibent l'IP3 Kinase hVP34 des macrophages (51),
- la phosphatase acide SapM, une eucaryote-like phosphatase, produite par MB qui permet d'hydrolyser l'IP3 accumulé dans la membrane du phagosome (52).

2) PknG

PknG est une serine/thréonine kinase dite eucaryote-like. Les mycobactéries non pathogènes ou à multiplication rapide ne possèdent pas PknG et sont rapidement éliminées grâce aux conditions bactéricides dans les phagolysosomes : PknG semble être nécessaire à la survie des mycobactéries à l'intérieur des phagosomes (53). Les mécanismes moléculaires de l'action de PknG ne sont pas encore connus, mais PknG pourrait inhiber la libération des lysosomes dans les phagosomes, dans le cytoplasme des macrophages (53). PknG fait l'objet de recherches actives d'inhibiteurs spécifiques.

3) La coronine 1

La coronine 1 (ou TACO), qui fait partie de la famille des protéines à domaine WD répété est une molécule produite par la cellule hôte. La coronine 1 est associée au cytosquelette et relie la membrane plasmique au cytosquelette des cellules du système immunitaire. C'est un composant de la membrane des phagosomes. En temps normal, la coronine 1 est libérée par le

phagosome avant la fusion avec le lysosome. Lors d'une infection à *M. tuberculosis*, la coronine 1 est retenue au niveau des phagosomes et empêche la fusion avec les lysosomes. De plus, la coronine 1, dans les cellules infectées, produit une élévation du calcium intra-cellulaire qui entraîne l'activation de la calcineurine. En l'absence de coronine 1, la calcineurine n'est pas activée, conduisant à la fusion phagosomes/lysosomes et à la lyse des bactéries. Le traitement de macrophages infectés par *M. tuberculosis* par des inhibiteurs de la calcineurine (comme la cyclosporine A) induit la destruction de *M. tuberculosis* par fusion des phagosomes avec les lysosomes (54).

4) Protéine VPS33B

La maturation des phagosomes est dépendante de la protéine VPS33B qui permet de générer de l'ATPase Rab 7 activée, nécessaire à la maturation des phagosomes. Cette activation se fait grâce à du GTP. Une tyrosine kinase PtpA produite par *M. tuberculosis* inactive VPS33B et bloque ainsi la maturation du phagosome (55).

5) Early secretory antigenic target system

M. tuberculosis possède des systèmes de sécrétion, appelés *early secretory antigenic target system* (ESX), ils sont codés par la région RD1 (région de différence 1) du génome de MB. Cette région comporte de nombreux gènes de résistance. ESX-1 était un candidat en tant qu'inhibiteur de la maturation des phagosomes (56). Il semblerait que ces molécules soient plutôt impliquées dans la capacité qu'ont les mycobactéries virulentes de pouvoir s'échapper du phagosome vers le cytoplasme des phagocytes (57).

6) Dérivés instables de l'oxygène et dérivés instables de l'azote

Les macrophages expriment deux enzymes permettant de générer des composés bactéricides: une NADPH oxydase (NOX2/gp91^{phox}) qui produit des dérivés instables de l'oxygène (ROI) et une NO-synthase inductible (iNOS) qui produit des dérivés instables de l'azote (RNI). Directement après la phagocytose, les sous-unités de NOX2 s'assemblent en un complexe enzymatique actif qui, grâce à du NADPH cytosolique, peut transférer des électrons à des molécules d'oxygène à travers la membrane du phagosome. Cela produit des ions

superoxydes qui se transforment en peroxyde d'hydrogène (58). La iNOS est active uniquement dans les macrophages activés par de l'INF- γ . En condition acide, les nitrites, dérivés de l'arginine, se transforment en acide nitreux qui peut se dismuter en NO et dioxyde d'azote (59). Le NO interfère avec les ions super-oxydes pour former des peroxy-nitrites bactéricides (60). Les RNI et ROI peuvent interagir avec des protéines, des sucres, des lipides ou encore des acides nucléiques, ce qui leur confère une activité bactéricide.

La maturation des phagosomes provoque en temps normal une acidification par recrutement d'une pompe à proton ATPase dépendante. Les bactéries, dans le phagosome, sont exposées à une faible acidité ainsi qu'à des ROI. Suite à l'activation des macrophages par de l'INF- γ , les phagosomes mûrent et fusionnent avec les lysosomes. Il s'ensuit une acidification du milieu et donc, la production de RNI. Néanmoins, *M. tuberculosis* possède des systèmes de détoxification qui lui permettent de contrecarrer ce stress. La catalase-peroxydase KatG permet de détoxifier du peroxyde d'hydrogène. Les ions superoxydes sont détoxifiés par des superoxydes dismutases SodA et SodC. Il existe aussi des anti-oxydants chez *M. tuberculosis* particulièrement les « *Actinobacteria contain mycothiol* ». Enfin, *M. tuberculosis* produit des réductases/peroxydases (61).

Même si chez la souris, NO joue un rôle clef dans la défense innée contre *M. tuberculosis* (62-64), son rôle chez l'homme est controversé. En effet, l'activité bactéricide d'iNOS n'a pas été démontrée (65-67).

iii. Adaptation du métabolisme

M. tuberculosis peut moduler son activité métabolique. Si les bactéries se trouvent dans un environnement pauvre en nutriments comme dans les phagosomes, elles peuvent, par exemple, limiter leur apport en glucides et utiliser uniquement des acides gras (68).

c. Les cellules dendritiques

Les DC sont des CPA professionnelles. Elles présentent les antigènes étrangers aux LT et jouent un rôle central dans l'initiation de la réponse immunitaire spécifique qui aboutit à la production d'INF- γ par les LT. Elles sont produites à partir de cellules totipotentes de la moelle osseuse, puis regagnent le compartiment sanguin. Ce sont alors des monocytes sanguins qui colonisent les tissus périphériques comme le poumon. Elles deviennent alors des DC immatures (DCi pour *immature dendritic cell*) qui pourront devenir matures (DCm pour *mature dendritic cell*) suite à un stimulus. Le phénotype des DC permet de distinguer deux sous-populations : les DC myéloïdes (CD11c +, CD123 faible) et des DC lymphoïdes (CD11c -, CD123 +).

Suite à une interaction avec *M. tuberculosis*, les DCi engagent la maturation. Celle-ci est TLR-dépendante et consiste en un changement phénotypique majeur : augmentation de l'expression de molécules de co-stimulation CD40, B7.1 et B7.2, de molécules d'adhésion ainsi que de récepteurs aux chimiokines. D'autres récepteurs sont réprimés comme les TLR et les récepteurs de la phagocytose. Ces modifications phénotypiques s'accompagnent de modifications fonctionnelles : alors que les DCi ont un fort pouvoir de phagocytose, d'endocytose et de bactéricidie, les DCm ont un fort potentiel de présentation de l'antigène, de stimulation lymphocytaire, ainsi qu'une mobilité accrue (69). La nature des antigènes capturés par les DC a un rôle majeur sur la nature de la réponse immunitaire qui sera développée contre le pathogène et qui déterminera l'issue de l'infection (70).

Les DC reconnaissent *M. tuberculosis* par divers récepteurs dont certains sont aussi présents sur les macrophages. Il s'agit des RM, du CR3, mais aussi des lectines de type C, notamment DC-SIGN (71). Ce dernier est majoritairement utilisé par *M. tuberculosis* pour pénétrer les DC via le ManLAM. Le ManLAM via DC-SIGN inhibe la maturation des DC induites par le LPS. De plus, la neutralisation de DC-SIGN la restaure (72). Cette interaction interfère avec la maturation des DC en induisant la production de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 et constitue un frein à l'établissement d'une immunité protectrice (72). Ces résultats indiquent que *M. tuberculosis* ciblerait DC-SIGN pour la pénétration cellulaire, ce qui pourrait lui permettre d'induire un état de tolérance. Les PAMPs de *M. tuberculosis* interagissent aussi avec les TLR présents à la surface des DC, mais leur rôle dans la maturation des DC reste encore mal défini. Ils semblent avoir un rôle suppresseur. Si la phagocytose de *M. tuberculosis* s'accompagne d'une activation de la DC, elle se fait via NF- κ B. Il s'ensuit une régulation positive des marqueurs de surface, la sécrétion de cytokines et de chimiokines.

La cytokine clef de la maturation des DC lors de l'infection à *M. tuberculosis* est le TNF- α : elle est produite suite à une stimulation de TLR-2 et TLR-4 et dépend de NF- κ B (73). Le TNF- α peut à lui seul induire la régulation positive des récepteurs de surface (73).

Les DC activées via DC-SIGN ont un phénotype particulier avec une faible expression du CMH-I, II et de CCR7 et présentent donc une moindre capacité de présentation de l'antigène, de migration et d'activation des LT. En outre, elles sont susceptibles d'être éliminées par des cellules NK, alors que les DC matures stimulées via un autre récepteur que DC-SIGN sont résistantes aux NK (74). De plus, *M. tuberculosis* peut perturber la transformation des monocytes sanguins en DC. Les DC infectées par *M. tuberculosis* et dérivées des monocytes sanguins présentent un phénotype particulier : elles n'acquièrent pas le CD1 et présentent une moindre expression du CMH-II par rapport à des DC stimulées par du LPS. Ces DC sécrètent du TNF- α et de l'IL-10, mais sont incapables de sécréter de l'IL-12. Enfin, les LTCD4 sélectionnés par ces DC sont incapables de sécréter de l'INF- γ (75).

Au total, en fonction du récepteur impliqué dans la reconnaissance de *M. tuberculosis*, l'interaction entre *M. tuberculosis* et les DC peut, soit donner des DC matures capables d'initier et de soutenir une réponse immunitaire thymodépendante efficace, soit perturber la maturation des DC et donc altérer la réponse cellulaire T.

Les DC offrent, comme les macrophages, un milieu propice à la survie et à la multiplication des mycobactéries. La multiplication lente du bacille dans les DC ne suffit pas à tuer la cellule. La maturation des DC ne conduit pas à la mise en place de mécanismes bactéricides mais plutôt bactériostatiques. *M. tuberculosis* peut donc survivre de façon chronique dans les DC. Il s'ensuit une présentation et une stimulation constante des LTCD4 (76).

L'infection de DC avec *M. tuberculosis* est aussi associée à une augmentation de production de diverses cytokines pro-inflammatoires tels que IL-12 (dont IL-23), TNF- α , INF- γ , IL-1 et IL-6, mais aussi d'IL-10 qui est anti-inflammatoire (77). Ces cytokines jouent un rôle primordial dans la mise en place de l'inflammation locale et dans le recrutement d'autres cellules du système immunitaire comme les PNN. Les DC infectées par *M. tuberculosis* augmentent l'expression de récepteurs aux chimiokines comme CCR7. Cela permet aux DC de rejoindre les ganglions lymphatiques grâce au gradient de concentration des chémokines CCL19 et CCL21 (78). Elles sécrètent aussi des chimiokines qui permettent de recruter d'autres effecteurs de la réponse immunitaire.

d. Les macrophages activés

La maturation des DC permet une présentation efficace des antigènes mycobactériens et ainsi la mise en place d'une immunité lymphocytaire T spécifique. L'immunité acquise est détectable par l'IDR et les IGRA. Si *M. tuberculosis* peut persister dans les macrophages quiescents, l'activation des macrophages provoque la mise en place de mécanismes bactéricides capables d'éliminer *M. tuberculosis*. La sécrétion d'INF- γ par les LT joue un rôle majeur dans l'activation des macrophages.

i. Autophagie

L'autophagie est un processus cellulaire ubiquitaire très conservé dans l'évolution qui permet la clairance de certains constituants cellulaires comme les mitochondries, les organelles cytoplasmiques ou les parasites intra-cellulaires (79). Les preuves de l'implication de l'autophagocytose dans l'élimination des pathogènes intra-cellulaires ont été apportées pour la première fois grâce à *M. tuberculosis* (80). L'autophagocytose consiste en l'isolement, à partir d'une vésicule cytoplasmique, d'une portion du cytoplasme de la cellule, pour former l'autophagosome. Celui-ci peut alors fusionner avec des lysosomes et ainsi éliminer les bacilles contenus dans les phagosomes. L'autophagie est impliquée dans la réponse immunitaire innée contre les pathogènes intra-cellulaires qu'ils soient viraux, bactériens ou parasitaires, mais aussi dans la réponse adaptative. L'autophagie peut être induite par le stress, la privation de nutriments ou de facteurs de croissances. Elle est régulée par la cascade de transduction inhibitrice Akt/mTOR dépendant des cytokines du paradigme Th1/Th2. Les cytokines de la voie Th1 (INF- γ) stimulent l'autophagie (80), tandis que les cytokines de la voie Th2 (IL4 et IL-13) l'inhibent (81). Le TNF- α jouerait aussi un rôle positif dans la régulation de l'autophagocytose. Une étude a montré que l'autophagie interfère avec la voie des TLR. TLR-4 induit l'autophagie en réponse à une stimulation par du LPS (82) et cette voie dépend de MyD88 et de TRIF (83) (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*). Enfin, TLR7 reconnaît de l'ARN monocaténaire et induit aussi l'autophagocytose via MyD88 (84).

L'autophagie est aussi importante pour la présentation des antigènes associés aux CMH-I, II et aux molécules CD1. En effet, les autophagosomes convergent avec des endosomes et des lysosomes. La lyse des bactéries qui s'en suit, délivre des antigènes mycobactériens qui peuvent être apprêtés au CMH-I, II ou sur les molécules CD1, potentialisant ainsi la

présentation aux LTCD4 (85). L'autophagie est donc impliquée dans la réponse immunitaire innée contre *M. tuberculosis*, mais aussi dans la réponse immunitaire adaptative, jouant un rôle clef dans la présentation antigénique.

ii. Vitamine D

Des études récentes ont mis en évidence un lien entre l'activation des TLR et la régulation positive des gènes du récepteur à la vitamine D, ainsi que de la vitamine D-1 hydroxylase dans des monocytes sanguins infectés par *M. tuberculosis*. Ceci aboutit à l'induction d'un peptide appelée cathelicidine, bactéricide pour *M. tuberculosis* (20). La production de vitamine D étant dépendante de l'exposition aux ultra-violets, ces données pourraient expliquer les bienfaits des cures dans les sanatoriums (86).

iii. L'apoptose

Un des plus anciens mécanismes de défense contre les pathogènes intra-cellulaires est le sacrifice des cellules infectées pour le bénéfice des cellules encore saines. Ce mécanisme de défense fait partie des mécanismes de l'immunité innée. La capacité des pathogènes intra-cellulaires à inhiber l'apoptose est bien connue (87, 88). L'apoptose peut être induite par deux grandes voies :

- La voie extrinsèque passe par l'augmentation de l'expression des récepteurs Fas et des récepteurs au TNF- α de type I. Ces récepteurs via l'activation par FasL et TNF- α activent les caspases 8 et 10, respectivement.
- La voie intrinsèque, après un stress, détectée par la mitochondrie, active la caspase 9.

Les deux voies convergent vers une voie commune qui active les caspases 3, 6 et 7. Ces dernières médient la fragmentation de l'ADN et la formation de structures membranaires autour de composants cellulaires appelés corps apoptotiques. Ces corps apoptotiques sont alors phagocytés par les macrophages et les DC. Cela permet une présentation efficace des antigènes mycobactériens associés au CMH-I, II et au CD1 menant à une réponse lymphocytaire T spécifique (89).

M. tuberculosis induit des signaux pro-apoptotiques, mais emploie de nombreuses stratégies pour les inhiber, aboutissant à une apoptose très réduite pour les souches virulentes (90). L'inhibition de l'apoptose apporte un avantage aux souches virulentes en induisant la mort

cellulaire par nécrose plutôt que par apoptose. Cela leur permet de s'échapper des macrophages sans être lysées et d'éviter la formation de corps apoptotiques. Elles peuvent alors infecter d'autres cellules. L'analyse transcriptionnelle de macrophages infectés par *M. tuberculosis* a montré l'augmentation de l'expression de gènes pro-apoptotiques comme de gènes anti-apoptotiques (91, 92).

La démonstration de l'inhibition de l'apoptose par *M. tuberculosis* a été apportée par l'identification de gènes indispensables à cette inhibition chez des souches virulentes. Le gène *nuoG* code pour une sous-unité de la NADPH déhydrogénase bactérienne. Le gène *SecA2* code pour un système de sécrétion *SodA* qui permet la sécrétion de superoxydes dismutases (facteur de protection contre les ions superoxydes). Enfin la sérine-thréonine kinase membranaire *PknE* est stimulée lors de la production de NO (93-95). La perte d'un de ces gènes ne permet plus à *M. tuberculosis* d'inhiber l'apoptose.

L'apoptose de macrophages infectés par *M. tuberculosis* est aussi diminuée par inhibition de la voie extrinsèque par modification de l'expression de gènes comme *Fas* (CD95) ou du récepteur soluble au TNF de type II (TNFR2). L'expression de *Fas* est réduite sur les macrophages infectés par *M. tuberculosis* (96). De plus, les lipo-glycanes de la paroi bactérienne peuvent stimuler NF- κ B via TLR2. L'activation de NF- κ B provoque l'expression d'une protéine anti-apoptotique appelée FLIP, qui inhibe l'apoptose induite par *FasL* (97). Enfin, les macrophages infectés par *M. tuberculosis* sécrètent en plus grande quantité TNFR2 qui se lie au TNF- α et inhibe son activité biologique (98).

Une autre protéine pro-apoptotique *Bad* est inactivée lors de l'infection par *M. tuberculosis* (99).

e. Les cellules dendritiques matures

Les antigènes de *M. tuberculosis* peuvent être apprêtés sur trois structures différentes pour être reconnus par les LT. Les LTCD4 et LTCD8 reconnaissent des antigènes de nature protéique associés au CMH-II sur le CMH-I respectivement. Il est établi que les *Natural Killer T* (NKT) reconnaissent des antigènes lipidiques associés aux molécules de la famille CD1 qui sont apparentées aux molécules du CMH-I (100). Les LT $\gamma\delta$ reconnaissent aussi de petits antigènes de nature non peptidique (phosphoantigènes). Les structures associées à cette présentation ne sont encore pas connues. La présentation des antigènes sur le CMH par les DC est un processus complexe qui se fait en plusieurs étapes : capture de l'antigène, adressage des antigènes aux compartiments appropriés, dégradation protéique, apprêtement sur les structures de présentation de l'antigène et adressage vers la membrane cytoplasmique. L'activation de l'apoptose de certains macrophages alvéolaires (M1) permet le relargage de corps apoptotiques contenant des bacilles ou des antigènes mycobactériens. Ceci favorise la présentation d'antigènes peptidiques sur le CMH-I mais aussi celle d'antigènes lipidiques sur les molécules CD1 par les DC qui les captent (89). Les antigènes immunodominants thymodépendants sont principalement des antigènes sécrétés par *M. tuberculosis*. Les plus étudiés sont des protéines comme ESAT-6 (*early secreted antigenic targeted-6 KDa protein*), CFP-10 (*culture filtrate protein 10*), Ag85, TB9.8, TB8.4, TB10.4 ou TB7.7, mais aussi des lipoprotéines comme les antigènes de 19KDa et 38KDa (101). Les antigènes immunodominants sont sécrétés très tôt lors d'une infection et induisent une réponse immunitaire importante contre *M. tuberculosis*. D'autre part, la réponse des cellules T aux antigènes non sécrétés est faible voire inexistante chez l'animal (101). Le fait que seuls les antigènes sécrétés permettent le développement d'une réponse immunitaire forte, suggère qu'il pourrait exister une inhibition de la présentation des antigènes non sécrétés et que ces antigènes agissent comme une sorte de « cheval de Troie » détournant la réponse immunitaire de son objectif.

M. tuberculosis via la protéine de 19KDa peut aussi inhiber l'expression du CMH-II à la surface des DC (102).

M. bovis interfère avec la production du CMH-II via les cathepsines (protéases essentielles pour obtenir un CMH-II fonctionnel). En effet, les cathepsines sont réprimées par l'IL-10 produites lors de l'infection des DC (103).

f. Les *Natural Killer*

Les NK sont des lymphocytes cytotoxiques impliqués dans la réponse immunitaire innée. Ils possèdent dans leurs cytoplasmes des granules contenant des protéines appelées perforines et granzymes qui possèdent des propriétés cytolytiques. Les NK expriment à leur surface le CD16 et le CD56. Ils sécrètent des cytokines pro-inflammatoires, notamment de l'INF- γ . L'activation des NK est médiée par des cytokines, principalement IL-12, IL-18 et INF- α , et par divers récepteurs membranaires activateurs (NKG2D) et inhibiteurs (CD94-NKG2A).

Il a été montré que les NK sont capables de lyser les mycobactéries intra-cellulaires. Les NK peuvent induire la lyse des macrophages et monocytes infectés par *M. tuberculosis* (104, 105). Ils peuvent aussi limiter la croissance bactérienne en induisant l'apoptose (indépendamment de l'interaction Fas/Fas ligand). Cette apoptose peut être stimulée par IL-2, IL-12 et le glutathion (106).

De plus, les NK peuvent tuer les LT régulateurs (LTreg) CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ induits lors d'une infection à *M. tuberculosis* qui ont une activité inhibitrice sur les LT (107). Les NK interagissent aussi avec les DC en présence de *M. tuberculosis* (107, 108). Ces données sont en faveur d'une implication des NK dans la mise en place et le maintien de l'immunité acquise.

La place des NK *in vivo* est controversée. En effet, les NK, chez les patients atteints de tuberculose semblent être défectueux. Ces lymphocytes présentent une activité anti-tumorale diminuée (109). La production de cytokines par les NK est aussi discutée, alors qu'une étude sur les cellules NK pulmonaires de patient atteint de tuberculose montre qu'elles sont capables de sécréter de l'INF- γ (110). Une autre étude n'a pas montré de différence de production de cytokines entre malade et témoin (111).

Dans des modèles expérimentaux de souris (C57BL/6), les NK s'accumulent dans les poumons et sécrètent de l'INF- γ (112). Dans une autre expérimentation, la déplétion des NK n'affectait pas le contrôle de l'infection. Cette dernière observation montrerait que le rôle des NK se chevauche avec d'autres cellules du système immunitaire (NKT, LTCD4⁺ sécrétant de l'INF- γ) et qu'en leur absence, le relais serait pris par ces autres types cellulaires.

De plus, dans un autre modèle de souris RAG^{-/-} (dépourvue de lymphocytes), les NK étaient la principale source d'INF- γ et dans la double déplétion RAG^{-/-} et Yc^{-/-} (déplétion des lymphocytes et des NK) l'infection n'était pas maîtrisée suggérant que les NK peuvent médier une réponse anti-mycobactérienne, probablement en stimulant les macrophages via l'INF- γ (113).

3. La réponse thymodépendante

La vue générale de la réponse immunitaire thymodépendante contre *M. tuberculosis* est présenté dans la Figure 8.

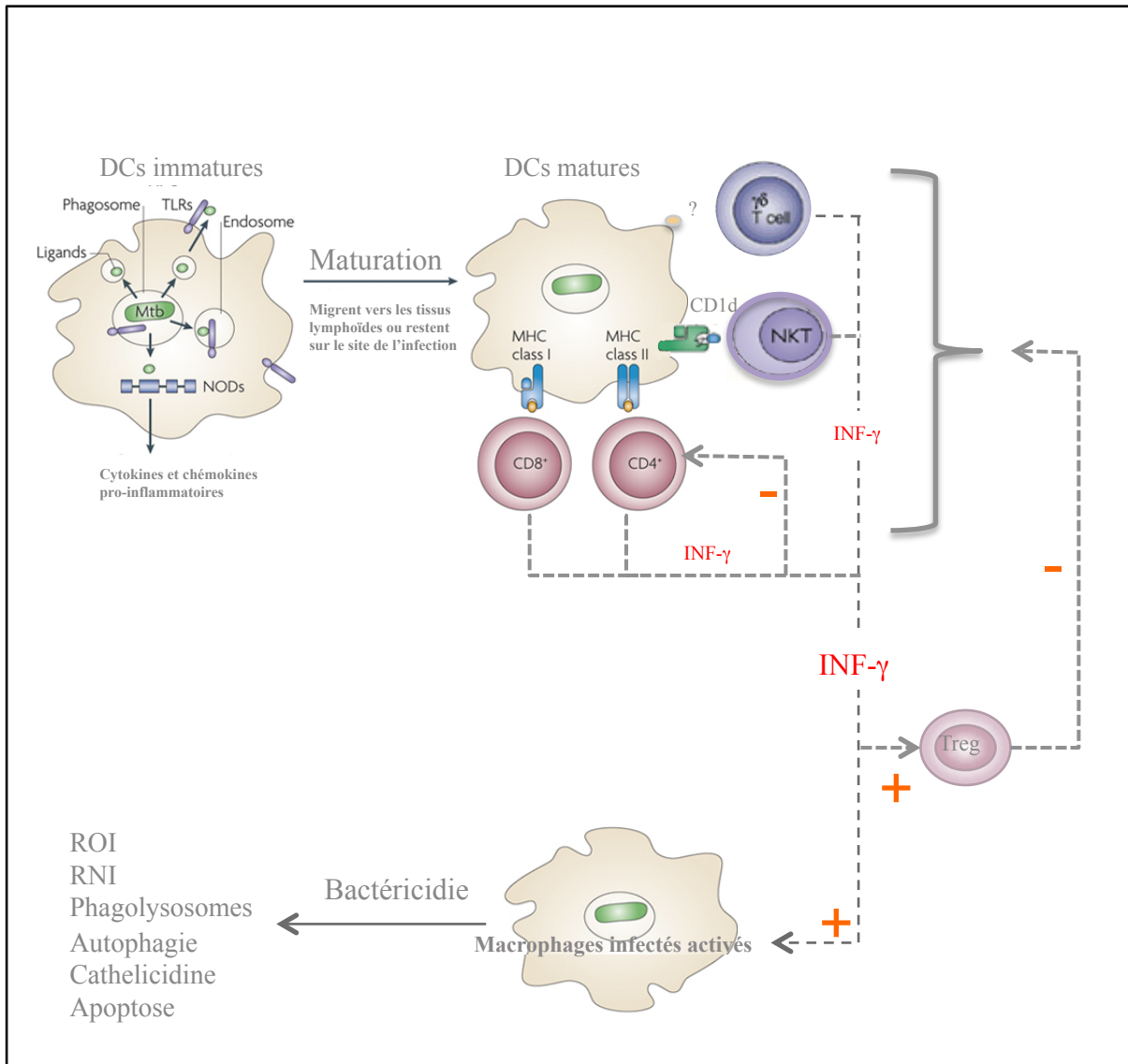


Figure 8. Réponse immunitaire acquise. Inspiré de **Kaufmann**, *Nature reviews*, 2001.

La première démonstration d'une immunité spécifique anti-tuberculeuse médiée par les lymphocytes a été faite par le transfert d'une immunité spécifique via l'administration de lymphocytes d'un individu ayant été en contact avec *M. tuberculosis* à un individu naïf (114). De plus, ces lymphocytes étaient sensibles au cyclophosphamide, montrant qu'ils se divisent activement. Cette observation a été mise en évidence, d'abord pour les LTCD4, puis pour les LTCD8 (114). Puis il a été montré qu'il y a une dissémination lymphatique des bacilles vers les ganglions lymphatiques et la rate (115) et que l'expression de fonctions effectrices se fait

d'abord dans les ganglions lymphatiques, puis dans la rate et enfin dans les poumons (115). La corrélation temporelle entre ces deux événements a permis de supputer que l'immunité cellulaire acquise est initiée dans les ganglions lymphatiques, suite à la dissémination de bacilles depuis le poumon via le drainage lymphatique. Cette même étude a montré l'importance de la cinétique d'induction de l'immunité acquise dans l'infection tuberculeuse (115). En effet, après contagé, les bactéries sont détectables dans les ganglions lymphatiques au neuvième jour (115, 116), ce qui est très long. L'exposition à des médiateurs pro-inflammatoires n'accélère pas la dissémination des bacilles (117). La seule variable qui ait permis de diminuer ce temps de latence est la dose infectante qui l'a réduit de 1 à 2 jours, suggérant que la zone de prise en charge de *M. tuberculosis* par le système immunitaire est cruciale (116). L'expression lente de l'immunité acquise dans le poumon permet aux bactéries de moduler l'environnement local à leur avantage (118).

Les DC sont essentielles pour la migration des bactéries vers les ganglions lymphatiques. Les différences fonctionnelles des sous-types de DC au niveau de l'arbre respiratoire et au niveau alvéolaire pourraient expliquer les différentes cinétiques observées. Plusieurs études ont démontré que des DC infectées par *M. tuberculosis* administrées par voie intra-trachéale sont capables d'initier une réponse cellulaire spécifique. Néanmoins, il n'est pas possible d'affirmer que ces cellules possèdent les mêmes qualités fonctionnelles que les DC présentes au niveau alvéolaire. Les DC qui se trouvent au niveau de l'arbre respiratoire peuvent s'activer et migrer facilement vers les ganglions lymphatiques (119, 120), tandis que les DC alvéolaires sont soumises à un microenvironnement très régulé. Ce microenvironnement pourrait « brider » les capacités d'activations et de migrations des DC (121). Le délai observé serait donc le résultat à la fois de la faible multiplication du bacille et de la fine régulation de l'inflammation au niveau alvéolaire.

Les DC sont considérées comme les inducteurs les plus efficaces pour l'activation des LT naïfs. Ceci est dû au fait que les DC sont non seulement capables de présenter l'antigène aux lymphocytes, mais aussi de délivrer un message secondaire et tertiaire qui soutiennent le développement des cellules effectrices T. Il est largement démontré que les DC immatures peuvent être infectées par le BCG et devenir des CPA matures et efficaces. Mais *M. tuberculosis* peut interférer avec la présentation de l'antigène. En effet, les DC infectées sont moins efficaces que les DC non infectées pour stimuler des LT spécifiques de l'antigène. Toutefois, il est bien démontré que des DC infectées par *M. tuberculosis* peuvent gagner les ganglions lymphatiques et y initier une réponse immunitaire spécifique, suggérant que cette inhibition n'est pas suffisante pour bloquer la capacité des DC à stimuler les LT naïfs (118).

Les DC infectées par *M. tuberculosis* migrent au niveau des ganglions lymphatiques au bout de 14 jours après le contage, c'est à dire plusieurs jours après la détection la plus précoce de *M. tuberculosis* dans les ganglions lymphatiques (9 jours) et l'initiation de la réponse immunitaire T (78). La population cellulaire permettant l'adressage des premiers bacilles au niveau des ganglions lymphatiques n'a donc pas encore été identifiée.

Les LTCD4 naïfs doivent reconnaître efficacement l'antigène et survivre pour développer une réponse. Cela nécessite la présentation des antigènes associés au CMH-II, l'engagement de molécules de co-stimulation ainsi que la sécrétion de cytokines notamment IL-12p70 et INF- γ (122). Les LT activés prolifèrent, sur-expriment le CD44, répriment le CD62L et s'accumulent dans le poumon. La migration des LT spécifiques se fait 15 à 18 jours après le début de l'infection. A leur arrivée dans les poumons, les mycobactéries sont contenues dans les macrophages, les PNNs et les DC.

Les lymphocytes participants à la réponse immune spécifique sont les LTCD8, les LT $\gamma\delta$, les LTCD4 et les NKT. La diversité des LT, qui diffèrent dans les mécanismes de reconnaissance de l'antigène, étend le répertoire d'antigènes mycobactériens reconnus et donc permettrait une meilleure reconnaissance de *M. tuberculosis*. De plus, la croissance lente de *M. tuberculosis* et la nature chronique de l'infection engendre une exposition prolongée à une grande diversité d'antigènes.

Dans l'étude des IGRA, si les antigènes stimulant les LT permettent de différencier la vaccination de l'exposition à *M. tuberculosis*, la distinction entre mémoire immune et activation chronique du système immunitaire ne peut être faite. De plus, on ne sait pas précisément quels sont les sous-types cellulaires qui sécrètent de l'INF- γ , de nombreux sous-types cellulaires pouvant sécréter de INF- γ lors de l'infection tuberculeuse. Les épitopes présents sur les antigènes RD-1, ESAT-6 et TB 7.7 étant reconnus à la fois par les LTCD4 et les LTCD8.

a. Les lymphocytes T CD4+

Les lymphocytes s'accumulent au niveau des lésions inflammatoires et assurent une immunité protectrice en activant les macrophages notamment en sécrétant de grandes quantités d'INF- γ . L'arrêt de la croissance bactérienne et l'arrivée sur le site de l'infection de LTCD4 producteurs d'INF- γ sont concomitants (118). L'absence de LTCD4 diminue les chances de survie. Cela se vérifie dans la co-infection avec le VIH où toute diminution des LTCD4+

s'accompagne d'une progression plus fréquente de la tuberculose infection vers la tuberculose maladie, ainsi que de formes graves (123). Il existe plusieurs catégories de LTCD4 impliqués dans la réponse antituberculeuse : des cellules sécrétant uniquement de l'IL-2, des cellules sécrétant uniquement de l'INF- γ et des cellules sécrétant les deux et du TNF (124). Ces dernières sont retrouvées plus particulièrement chez des patients présentant une tuberculose maladie, dans les zones de forte endémie et chez les enfants vaccinés (118).

b. Les lymphocytes T CD8+

On sait depuis longtemps que les LTCD8 participent à la protection contre *M. tuberculosis* (125). Néanmoins, l'implication des LTCD8 dans les défenses contre les mycobactéries est moins bien étudiée que celle des LTCD4. Les LTCD8 ont des fonctions effectrices, notamment par la sécrétion d'INF- γ et de TNF- α , par la destruction des cellules infectées et par la lyse directe des mycobactéries (126). Les LTCD8 ont une activité cytotoxique importante via la libération de granules cytoplasmiques contenant des perforines et granzymes. L'activité cytotoxique se manifeste en réponse à la reconnaissance par le TCR d'antigènes étrangers apprêtés sur le CMH-I.

L'incidence, chez la souris, de la déficience en β 2-microglobuline (peptide indispensable à l'apprêtement d'antigène sur le CMH-I) lors d'une infection à *M. tuberculosis* a été associée à un mauvais pronostic. Néanmoins, la β 2-microglobuline est aussi un composant des molécules CD1 reconnues par des cellules T non conventionnelles (NKT). Il se pourrait donc que les LT non conventionnels soient absents dans ce modèle. De plus, la β 2-microglobuline est impliquée dans le métabolisme du fer : les souris déficientes en β 2-microglobuline développent rapidement une hémochromatose qui les sensibilisent à l'infection tuberculeuse (127). Plus tard, il a été montré que les souris mutées sur des séquences spécifiques du CMH-I présentaient une survie réduite par rapport aux souris sauvages (128). Cela prouve l'implication des LTCD8 dans les défenses immunitaires contre *M. tuberculosis*.

Les LTCD8 induisent aussi l'apoptose par un mécanisme Fas/FasL dépendant, augmentant ainsi la présentation antigénique via la captation des corps apoptotiques par les DC. Enfin, la sécrétion d'INF- γ stimulerait la destruction des mycobactéries par les macrophages (129). De plus, L'INF- γ produit lors d'une infection à *M. tuberculosis* est aussi responsable de l'érosion du répertoire mémoire des LTCD8 (130).

La déficience en IRGM1 (*immunity-related GTPase family*) provoque une sensibilité accrue aux pathogènes intra-cellulaire. Feng *et al.*, ont montré, dans un modèle de souris infectées par *M. avium*, que la déficience en IRGM1 provoquait une apoptose accrue des LTCD4 en présence d'INF- γ (131).

Les effecteurs Th1 mettraient donc en place des stratégies pour se protéger de ce rétrocontrôle négatif médié par l'INF- γ .

c. Les natural killer T

Les NKT sont des cellules qui expriment à la fois le TCR et des marqueurs des cellules NK (CD16 et CD56). Les NKT reconnaissent des antigènes non peptidiques associés au CD1d à la surface des CPA. Le rôle des NKT dans l'infection à *M. tuberculosis* a été étudié chez l'homme et chez la souris. Les NKT humains activés par du alpha-galactocéramide limitent la croissance de *M. tuberculosis* selon un mécanisme dépendant des granulocytes (132). Les NKT restent très peu étudiés dans la tuberculose.

d. Les lymphocytes T helpers 17

Un nouveau sous-type de LT a récemment été identifié chez l'homme et chez la souris: les Th17 sécrétant de l'IL-17 et de l'IL-22 (133). Chez la souris, la production des Th17 est induite par un contact pulmonaire avec *M. tuberculosis* et est dépendante d'IL-23 (de la famille de l'IL-12) (134). Une large proportion de l'IL-17 est produite par les LT $\gamma\delta$ chez la souris (135). De plus, le blocage d'IL-17 inhibe le recrutement des PNN, ce qui pourrait altérer la mise en place de l'inflammation locale (136). Néanmoins, le blocage d'IL-23 (et donc d'IL-17) montre une altération modeste de la réponse inflammatoire. Au total, on ne sait pas si cette réponse est importante chez l'homme. Néanmoins, une population de LTCD4 spécifiques d'antigènes mycobactériens produisant de l'IL-17 et de l'IL-22 a clairement été identifiée (118).

e. Les lymphocytes T gamma delta

Les LT $\gamma\delta$ participent à la réponse immune à *M. tuberculosis*. Les LTV γ 9V δ 2, sous-population majoritaire des LT $\gamma\delta$ circulants, reconnaissent des phospho-antigènes de *M. tuberculosis*, mais aussi d'autres pathogènes bactériens. La structure de présentation de ces antigènes n'a pas, si elle existe, été identifiée. Les LT $\gamma\delta$ sont recrutés à un stade précoce de l'infection, avant les

LTCD8 et LTCD4. Ils regagnent le site de l'infection grâce aux chémokines CXCL2 et CXCL10 produites par les DC et les macrophages (137). Les LT $\gamma\delta$ activés sécrètent de l'INF- γ et du TNF- α qui augmentent la bactéricidie des macrophages. Récemment, il a été montré que ces cellules sécrètent aussi de l'IL-17 en réponse à IL-23 (135). Les LT $\gamma\delta$ activés ont aussi des fonctions cytotoxiques (138). Enfin, il existe une mémoire immune anti-tuberculeuse spécifique chez ce sous-type cellulaire (139). Ces éléments sont en faveur d'un rôle important des LT $\gamma\delta$, surtout dans la phase précoce de l'infection.

f. Régulation de la réponse T : les lymphocytes T régulateurs

Les LTreg sont des lymphocytes qui contrôlent la réponse immune des sous-populations Th1 ou Th2 en réponse à un antigène du soi ou du non-soi. Ce sont des cellules de phénotype CD4+, CD25+, FOXP3+. Deux populations de Treg sont décrites : les Treg « naturels » qui se développent dans le thymus pendant la période néonatale et les Treg induits à la périphérie. Ils sécrètent des cytokines suppressives comme IL-10 et TGF β . Les Treg sont présents dans les poumons lors de la réponse immune à *M. tuberculosis* et leur suppression permet un meilleur contrôle de la maladie (140). Une étude récente a montré que le développement des Treg durant l'infection à *M. tuberculosis* était dépendant de l'INF- γ et d'un facteur de transcription T-bet (141).

Comme indiqué précédemment, les NK peuvent détruire les Treg, ce qui permettrait de limiter leur expansion pour mieux contrôler l'infection (107).

Les mécanismes régulateurs ne semblent pas être désavantageux pour le contrôle de l'infection, au contraire, ils paraissent plutôt indispensables à la mise en place d'une inflammation maîtrisée et d'une réponse immune adaptée. Des données récentes indiquent que dans des modèles animaux, l'absence de régulateurs négatifs de la réponse immune n'est pas un facteur de protection puisqu'ils meurent précocement malgré un bon contrôle de la maladie. Ces souris meurent très rapidement en raison de l'importance de la réaction inflammatoire dans les poumons (142). Le déficit en tyrosine kinase DAP12, qui a une activité régulatrice négative sur les réponses Th1, montre le même type de résultats avec une réponse inflammatoire très forte (143).

g. Les lymphocytes T mémoires

L'étude de la mémoire immune est rendue complexe dans le cadre de la tuberculose en raison de la persistance d'antigènes bactériens après vaccination ou infection. Il est donc difficile

dans ces conditions de faire la part des choses entre activation chronique du système immunitaire et mémoire immune (144). Une activation chronique pourrait inhiber la production de cellules mémoires. Pour s'affranchir de ces contraintes, les expérimentations sur la mémoire immune contre *M. tuberculosis* sont faites, soit en traitant les individus par anti-tuberculeux après contact, soit en transférant les LT d'un individu immunisé à un individu sain, ou encore en utilisant des vaccins acellulaires (144). La première observation d'une mémoire immune a été faite par Orme en 1987 par le transfert de LTCD4 et LTCD8 spléniques d'un individu infecté à un individu sain (145). Plus tard, il a été mis en évidence que la protection vient des LTCD4.

Pour évaluer l'induction d'une immunité protectrice après vaccination, il a été proposé de comparer les taux d'INF- γ sécrétés par les LTCD4 d'individus naïfs à des individus vaccinés par le BCG. Ceux-ci sont plus élevés chez les individus vaccinés, mais cette production d'INF- γ n'est pas protectrice (146). La protection n'est pas proportionnelle à la production d'INF- γ . En effet, il existe de nombreux exemples de vaccins différents qui permettent d'obtenir une sécrétion d'INF- γ équivalente mais sans protection équivalente ou supérieure. De plus, la sécrétion d'INF- γ en cas de second contact se fait plus rapidement (114), mais elle n'est pas qualitativement supérieure (147).

Le rôle de l'INF- γ est ambigu puisqu'il permet d'une part le contrôle de l'infection (144), mais en même temps il stimule l'apoptose des lymphocytes Th1 (148). La sécrétion d'INF- γ devrait donc inhiber la mise en place d'effecteurs mémoires. C'est ce qu'une étude élégante de WU *et al.* ont montré, en séparant les LTCD4 spécifiques d'antigènes en deux catégories en fonction de leurs capacités à sécréter de l'INF- γ . Les lymphocytes INF- γ positifs ne survivent pas, alors que les cellules INF- γ négatives survivent plus de 120 jours et sont capables de sécréter de l'INF- γ après ce délai en cas de re-stimulation (149). Donc, même si l'INF- γ est indispensable au contrôle de l'infection primaire, il a un effet suppresseur sur l'induction de la mémoire immune.

L'élimination des LTCD4 lors de l'ITL provoque une réactivation de la maladie, mais pas une diminution de la production d'INF- γ (150). Ces résultats suggèrent que si l'INF- γ joue un rôle dans la mémoire immune, il n'est pas exclusif et donc, qu'il existe d'autres mécanismes protecteurs médiés par les LTCD4.

Différentes sous-populations de LTCD4 mémoires existent. La description de ces différentes sous-populations est faite dans le chapitre suivant.

4. Les méthodes de diagnostic indirect

L'IDR et les IGRA dans le diagnostic de tuberculose, ont le même objectif : détecter un contact avec *M. tuberculosis* en stimulant l'immunité spécifique dirigée contre *M. tuberculosis*. L'IDR est une réaction immunitaire secondaire *in vivo* locale alors que les IGRA testent la réaction immunitaire secondaire *in vitro* médiée par des lymphocytes sanguins. Il semble que ces tests fassent intervenir des acteurs lymphocytaires différents.

a. L'intradermo-réaction

L'IDR a été mise au point en 1907 par le Docteur Charles Mantoux à partir des travaux de Robert Koch. L'IDR a représenté pendant environ un siècle le seul test diagnostique de l'infection à *M. tuberculosis*. L'IDR est un test cutané explorant l'hypersensibilité de type IV (hypersensibilité retardée) induite par le BCG, par une infection à *M. tuberculosis* ou par d'autres mycobactéries. Il met donc en évidence la mémoire immunitaire à médiation cellulaire dirigée contre *M. tuberculosis*. L'IDR est pratiquée pour vérifier l'absence de tuberculose avant vaccination dans le cadre d'une enquête autour d'un cas, pour l'aide au diagnostic d'une tuberculose et comme test de référence pour la surveillance de population à risque définie par le législateur (articles R. 3112-1 et R. 3112-2 du Code de la Santé Publique).

i. Mécanismes immunologiques

L'IDR correspond à une réaction d'hypersensibilité de type IV, donc à médiation cellulaire. C'est une réponse immunitaire secondaire.

La réponse immunitaire primaire est initiée dans les organes lymphoïdes secondaires. Elle débute par la reconnaissance d'antigènes associés aux molécules du CMH à la surface des DC par les LT naïfs spécifiques de cet antigène. En réponse à la reconnaissance de l'antigène et grâce à des signaux de co-stimulation, les lymphocytes sont activés et prolifèrent dans les organes lymphoïdes secondaires. Les cellules activées sécrètent des cytokines pro-inflammatoires et expriment à leur surface des « *homing receptors* » qui leur permettent de rejoindre le site de l'infection et d'éliminer les antigènes étrangers. Après élimination des antigènes étrangers, la majeure partie des LT est éliminée. Seul un petit nombre de lymphocytes spécifiques survit. Ils ont une très longue durée de vie, ce sont les LT mémoires.

Deux populations de LT mémoires peuvent être distinguées :

Les CM (*Central memory T cell*) expriment CD62L et CCR7 et résident dans les organes lymphoïdes. Elles sont capables de proliférer massivement très longtemps après la primo-infection et en l'absence d'antigène résiduel, en cas de réintroduction de l'antigène (151).

Les EM (*Effector memory T cell*) n'expriment ni le CD62L ni CCR7 et sont présents dans les organes lymphoïdes secondaires et dans les tissus non-lymphoïdes (152). Elles peuvent proliférer rapidement et fournir en un temps très court une protection contre l'exposition récurrente à des agents pathogènes. Cependant, ces cellules n'ont pas les grandes capacités de prolifération des CM.

La population lymphocytaire à l'origine de la réponse immunitaire secondaire dans le cadre de l'IDR n'a pas été identifiée avec certitude. Des combinaisons de molécules d'adhésion à la surface des EM ont permis de distinguer des sous-populations d'EM. Seules les cellules qui présentent la bonne combinaison de molécules d'adhésion pour un tissu donné peuvent passer la barrière endothéliale et s'établir dans ce tissu (153). Dans le cadre de l'IDR, le test est réalisé sur une période longue (>48H), donc il stimulerait à la fois les EM et les CM (Figure 9).

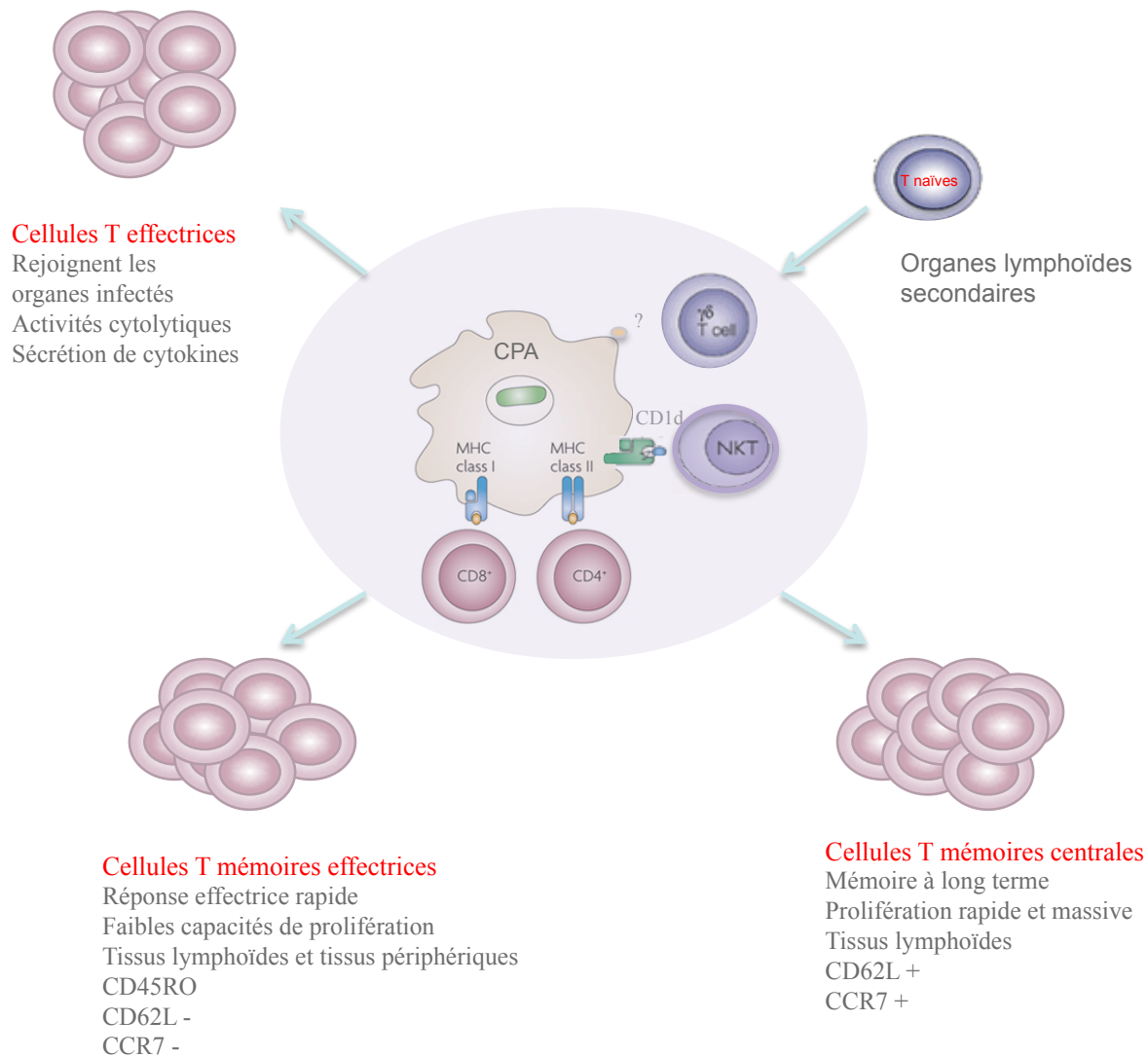


Figure 9. Diversité fonctionnelle des LT et des cellules mémoires. Adapté de **Kaufmann**, *Nature reviews*, 2001.

D'un point de vue histologique, la migration cellulaire est bi-phasique. Dans un premier temps, les cellules qui migrent vers le point d'injection sont majoritairement des PNNs. Il se développe une inflammation locale avec production de cytokines pro-inflammatoires (INF- γ , TNF- α , lymphotoxine). Ces facteurs stimulent localement l'expression de molécules d'adhésion (E-selectin, ICAM-1, VCAM-1) au niveau de l'endothélium et une augmentation de la perméabilité vasculaire. Les molécules d'adhésion permettent dans un deuxième temps, l'afflux de monocytes, macrophages et lymphocytes depuis la circulation sanguine.

De façon surprenante, les cinétiques de la réponse clinique et de la réponse immunitaire sont asynchrones : alors que le pic de réaction clinique s'établit à trois jours de l'injection, le pic de la réponse immunitaire cellulaire est à environ sept jours (154).

Le mécanisme de la réponse immune au niveau cutané est peu connu. Il est démontré qu'en temps normal le tissu cutané présente de nombreux LTCD4 et LTCD8 et parmi ceux-ci une grande proportion de lymphocytes sont mémoires (155). On ne sait pas si, lors d'une réponse immune secondaire, les LTCD4 mémoires sont activés directement dans la peau ou dans les organes lymphoïdes secondaires. De nombreuses études vont dans le sens de l'hypothèse que les cellules mémoires de la peau peuvent reconnaître les antigènes étrangers associés au CMH sur des DC de la peau et déclencher une réponse immunitaire secondaire. La comparaison du raccourcissement des télomères (témoin de prolifération cellulaire) des populations de LTCD4 dans le sang périphérique et dans la peau, lors d'une IDR, montre un raccourcissement significatif des télomères des LTCD4 de la peau, mais pas des LTCD4 du sang périphérique (156). Cela montre que les LTCD4 de la peau ont proliféré.

D'autres études ont conclu à une prolifération locale de LTCD4 mémoire tissulaire de la peau par différents moyens :

- tout d'abord, par l'étude du marqueur de prolifération Ki67 dans des biopsies cutanées effectuées sept jours après l'IDR,
- ensuite, par comparaison des populations lymphocytaires cutanées au site d'injections sanguines. Une prolifération de LTCD4 spécifiques n'était mise en évidence que dans la peau. De plus, il n'y avait pas de LTCD4 activés (Ki67) et spécifiques de la tuberculine dans le sang périphérique (156).

ii. La tuberculine

En 1891, Robert Koch a mis en évidence des composés bactériens dans le milieu de culture de *M. tuberculosis*. Il a nommé ce milieu « tuberculine ». Plus tard, ce milieu a été purifié en fraction protéique et dénommé PPD (*Purified protein derivative*). Ces extraits posent des problèmes de standardisation entre les différents lots puisque leur composition quantitative et qualitative varie entre les différents lots : elle varie d'une culture à l'autre en fonction de la souche utilisée. La concentration est déterminée en unité internationale/mL, puis étalonnée par rapport à une tuberculine de référence.

iii. Interprétation de l'IDR

Les Figure 10 et Figure 11 résument l'interprétation de l'IDR.

Aide à l'interprétation de l'IDR dans le cadre exclusif de la décision thérapeutique (il s'agit du traitement de la tuberculose-infection, après avoir éliminé une tuberculose-maladie).

Chez une personne de 15 ans ou plus		
Induration IDR	Dans le cadre d'une enquête autour d'un cas	Profession exposée (embauche et surveillance)
< 5 mm	IDR négative	
	Tuberculose-infection ancienne ou récente peu probable	
	Pas de traitement	
	Surveillance à 3 mois	Surveillance fonction du risque du secteur professionnel*
Entre 5 et 9 mm	IDR positive	
	Réaction due au BCG ou tuberculose-infection, mais non en faveur d'une infection récente	
	Pas de traitement	
	Surveillance à 3 mois	Surveillance fonction du risque du secteur professionnel*
Entre 10 et 14 mm	IDR positive	
	Tuberculose-infection probable Le contexte aide à définir l'ancienneté	
	Si contexte en faveur d'une infection récente, Traitement Sinon	
	Surveillance à 3 mois	Surveillance fonction du risque du secteur professionnel*
≥ 15 mm	IDR positive	
	Tuberculose-infection probablement récente	
	Traitement	

Notes :

- **traitement** : il s'agit du traitement d'une tuberculose-infection après avoir éliminé une tuberculose-maladie ;
- **de manière générale chez l'adulte**, la primo-vaccination par le BCG est suffisamment ancienne pour ne pas interférer avec l'interprétation de l'IDR ;
- **dans les circonstances ci-dessus, plus l'IDR est positive**, plus elle est en faveur d'une infection récente et doit inciter au traitement ;
- **pour les sujets immunodéprimés**, pour lesquels l'IDR peut être faussement négative, la décision est prise en fonction du type, du degré et de la durée de l'immunodépression.

*Avis du CSHPF du 15 novembre 2002.

Figure 10. Interprétation de l'IDR.

Aide à l'interprétation de l'IDR dans le cadre exclusif de la décision thérapeutique (il s'agit du traitement de la tuberculose-infection, après avoir éliminé une tuberculose-maladie).

Chez l'enfant de moins de 15 ans			
Dans le cadre d'une enquête autour d'un cas			
Induration IDR	BCG < 10 ans	BCG ≥ 10 ans	Absence de BCG
< 5 mm	IDR négative		
	Pas de traitement		
Entre 5 et 9 mm	IDR positive		
	En faveur d'une réaction due au BCG	En faveur d'une réaction due au BCG ou d'une tuberculose-infection	En faveur d'une tuberculose-infection
	Pas de traitement	Avis spécialisé	Traitement
Entre 10 et 14 mm	IDR positive		
	En faveur d'une réaction due au BCG ou d'une tuberculose-infection	En faveur d'une tuberculose-infection	
	Avis spécialisé	Traitement	
≥ 15 mm	IDR positive		
	En faveur d'une tuberculose-infection récente		
	Traitement		

Figure 11. Interprétation de l'IDR.

iv. Sensibilité et spécificité

Dans la tuberculose maladie, la sensibilité est d'environ 70% (157). Malheureusement, elle est beaucoup plus faible dans les formes disséminées et chez l'immunodéprimé. Il existe de nombreuses causes de faux négatif, les erreurs peuvent être dues à la réalisation de l'IDR (injection trop profonde, mauvaise dose de tuberculine), aux erreurs de lecture, mais aussi à la phase pré-allergique qui dure de 2 à 3 semaines. De plus, l'IDR peut rester négative dans certaines situations cliniques, tels que les infections virales (rougeole) ou en cas d'immunodépression (par exemple : VIH, traitement immunosuppresseur, septicémie). Enfin, un autre facteur de variabilité affectant la sensibilité de l'IDR est lié à la production et à la standardisation de la tuberculine. Chaque nouveau lot est comparé chez l'animal à un lot de référence, puis dilué pour obtenir la même activité. Malgré ces essais de standardisation, il peut exister des différences notables entre différents lots de tuberculine.

La spécificité est très variable en fonction de la population examinée. En effet, il existe de nombreuses réactions croisées avec le BCG et avec les mycobactéries atypiques. La spécificité dépend donc beaucoup de la politique vaccinale du pays considéré et de la prévalence des infections à mycobactéries atypiques. Elle varie de 40 à 90% en fonction de la population examinée.

Le BCG entraîne une positivation de l'IDR 2 à 3 semaines après sa réalisation. L'IDR n'est alors pas contributive dans le cadre d'une recherche de tuberculose infection. La réaction diminue au cours du temps mais peut persister toute la vie. En pratique on considère qu'il faut attendre 10 ans après une vaccination pour interpréter une IDR.

L'IDR, malgré une utilisation centenaire est un test imparfait. De nombreuses recherches ont été et sont entreprises pour améliorer les tests de diagnostics indirects dans le cadre de la tuberculose. Ces recherches ont pour but de mettre en place un test diagnostique plus sensible et plus spécifique que l'IDR, neutre vis à vis de la vaccination et des mycobactéries atypiques, réalisable en une seule visite et dont les valeurs sont objectives et indépendantes de l'observateur. La prospection s'est alors orientée vers la recherche d'antigènes immunodominants spécifiques de *M. tuberculosis*. L'étude du génome des mycobactéries a permis de grandes avancées dans ce domaine.

b. Les IGRA : QTF-GIT et TB-Spot

Depuis les années 2000, de nouvelles analyses sont venues étayer les tests diagnostics de la tuberculose. Ces tests s'appuient sur la mise en évidence de la réponse immunitaire spécifique à médiation cellulaire mise en place contre *M. tuberculosis*. Ces nouveaux tests sont réalisés *in vitro* à partir de prélèvements veineux périphériques. Leur réalisation est simple, rapide et ne nécessite qu'une seule visite. Ils mesurent la réactivité des LT circulants mis en culture en présence d'antigènes de *M. tuberculosis*.

i. Historique

Initialement, la réponse lymphocytaire était mesurée par la mesure de la prolifération lymphocytaire en présence de PPD. Cette méthode a été avantageusement remplacée par la mesure de la production de cytokines. Il s'agit de l'INF- γ produit par les lymphocytes activés en présence d'antigènes de *M. tuberculosis*. Cette cytokine a été choisie à cause de son rôle prépondérant dans la défense anti-tuberculeuse (158). Ces tests ont ensuite été évalués et validés chez l'homme en plusieurs étapes. Des antigènes, les plus spécifiques possibles de *M. tuberculosis*, ont été recherchés pour augmenter la spécificité des tests par rapport à l'IDR. Enfin, ces tests ont été évalués dans des études cliniques pour apprécier leur sensibilité et spécificité.

1) Validation des tests utilisant la mesure d'INF- γ *in vitro*

De nombreuses études ont prouvé la bonne concordance entre les tests *in vitro* utilisant du PPD et l'IDR. L'accord entre l'IDR et les tests *in vitro* allait de 79 à 95% avec un coefficient kappa de Cohen compris entre 0,48 à 0,73 (159). Ces études ont mis en exergue la variabilité de l'IDR. Les tests *in vitro* utilisant le PPD, et mesurant l'INF- γ produit permettent de s'affranchir de la variabilité due à l'observateur et au PPD, mais pas à celle due aux vaccinations et aux infections à mycobactéries atypiques.

2) Augmentation de la sensibilité de test *in vitro*

L'étude comparative des génomes des souches vaccinales et des souches du complexe *tuberculosis* a permis de montrer l'existence de régions spécifiques (RD) au complexe *tuberculosis* (160).

La région RD1 code pour la production d'un complexe protéique composé de deux polypeptides, ESAT-6 et CFP-10 produit par *M. tuberculosis* en phase de répliation. Ces deux peptides sont immunodominants pour la réponse immunitaire T chez l'homme (161). Ils ont été recherchés parmi les différentes espèces du complexe *tuberculosis* et des mycobactéries atypiques et n'ont été retrouvés que chez les espèces du complexe *tuberculosis* à l'exception de *Mycobacterium bovis* BCG ainsi que chez 3 mycobactéries atypiques (*M. kansasii*, *M. marinum*, *M. szulgai*) (160). D'autres peptides appartenant à ces régions RD ont été étudiés. L'antigène TB 7.7 très spécifique de *M. tuberculosis* a été incorporé au test quantiféron de troisième génération pour augmenter la sensibilité globale du test.

L'augmentation de spécificité a été démontrée de façon univoque : la vaccination par le BCG n'interfère pas sur la réponse *in vitro* des LT en présence d'ESAT-6 comparativement à celle obtenue en présence de PPD (162). Les personnes ayant été vaccinées récemment par le BCG en l'absence d'infection latente ou de tuberculose maladie présentaient des réponses *in vitro* positives à la PPD, alors que la réponse à l'antigène ESAT-6 était nulle. Ultérieurement, des publications ont logiquement démontré la positivation des tests *in vitro* utilisant ces antigènes chez des patients infectés par *M. kansasii* et *M. marinum* (163).

ii. Mécanismes immunologiques

De la même manière que dans l'IDR, lors de la primo-infection à *M. tuberculosis*, des LT mémoires sont produits. Les lymphocytes mémoires qui nous intéressent ici, sont les LTCD4 spécifiques d'ESAT-6, CFP-10 ou TB 7.7. Il existe, comme vu précédemment, deux populations de lymphocytes mémoires : les CM et les EM. Les incubations courtes avec les IGRA (<24H) seraient responsables d'une sécrétion d'INF- γ uniquement par les EM, tandis que les incubations longues (>24h et jusqu'à 7 jours) seraient responsables d'une sécrétion d'INF- γ par les CM et les EM. Les incubations courtes seraient le reflet des

contacts récents avec *M. tuberculosis* (**Figure 12**). Les expériences effectuées récemment par Tapaninem *et al.* (164) ont montré qu'une immunité médiée par les EM peut être détectée plusieurs années après une tuberculose maladie traitée et guérie. Donc, soit le bacille n'est pas détruit par le traitement, soit les EM ont une durée de vie bien plus longue que celle communément admise. Ces découvertes récentes remettent en cause le paradigme EM/CM qui ne permet plus d'expliquer les fonctions et l'hétérogénéité des cellules T mémoires (165).

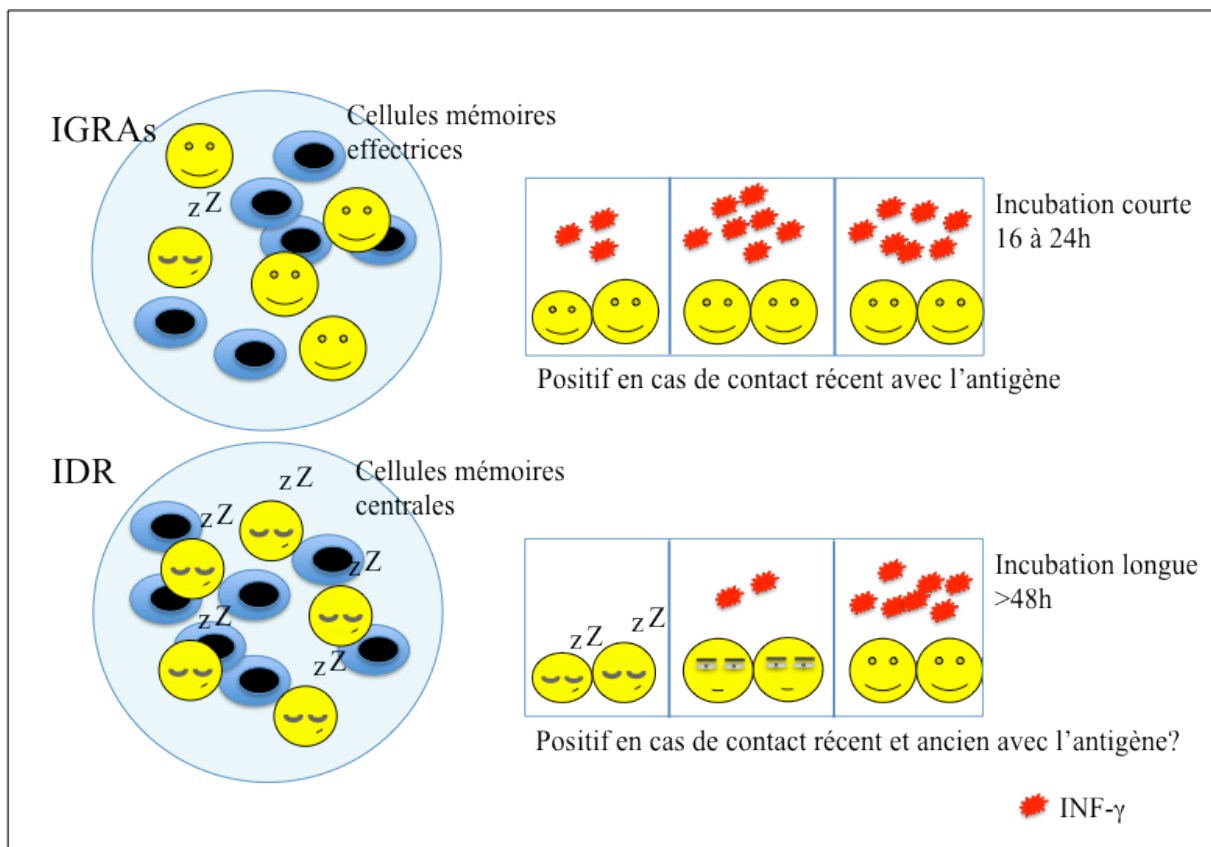


Figure 12. Différence de populations lymphocytaires activées entre l'IDR et les IGRA (Adapté de E. Bouvet, Tests interféron (IGRA) dans l'infection par le VIH, 2009).

Il existe actuellement 2 tests IGRA commercialisés : le QTF-GIT et le QuantiFERON-Gold (QTF-G) (Cellestis, Australie) d'une part et le TB-Spot (Oxford Immunotec, Angleterre). Seul le QTF-GIT et le TB-Spot seront étudié ici.

iii. Le QuantiFERON-TB Gold In Tube

Ce test utilise le sang périphérique veineux du patient. Le sang est incubé à 37°C pendant 16 à 24h. L'INF- γ est ensuite dosé par méthode ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) sur le plasma surnageant dans les tubes.

1) Principe du test

Le sang est recueilli dans trois tubes héparinés. Le premier est un tube contrôle négatif (tube NIL). Il permet de s'affranchir des sécrétions non spécifiques d'INF- γ . Le second contient les antigènes spécifiques de *M. tuberculosis* (ESAT-6, CFP-10, TB7.7). Il permet de mettre en contact les antigènes de *M. tuberculosis* et les LT du patient (tube AG). Le troisième est le contrôle positif contenant de la phytohémagglutinine (PHA) (tube MIT). La PHA est un activateur non spécifique des LT qui permet de contrôler la capacité des LT à sécréter de l'INF- γ . Après prélèvement, les tubes doivent être placés le plus rapidement possible à l'étuve (37,5°C), au plus tard dans les 16h, selon les recommandations du fabricant. Durant ce délai, les tubes doivent être conservés à température ambiante. Après un temps pouvant aller de 16 à 24h d'incubation à l'étuve, les tubes sont centrifugés. Le temps d'incubation doit être respecté scrupuleusement au risque de stimuler la sécrétion non spécifique d'INF- γ par les CMs en cas d'incubation trop longue. La quantité d'INF- γ présente dans le plasma ainsi obtenue est dosée par méthode ELISA. La densité optique (DO) obtenue est convertie en unité internationale (UI) grâce à une courbe d'étalonnage effectuée en parallèle (**Figure 13**).

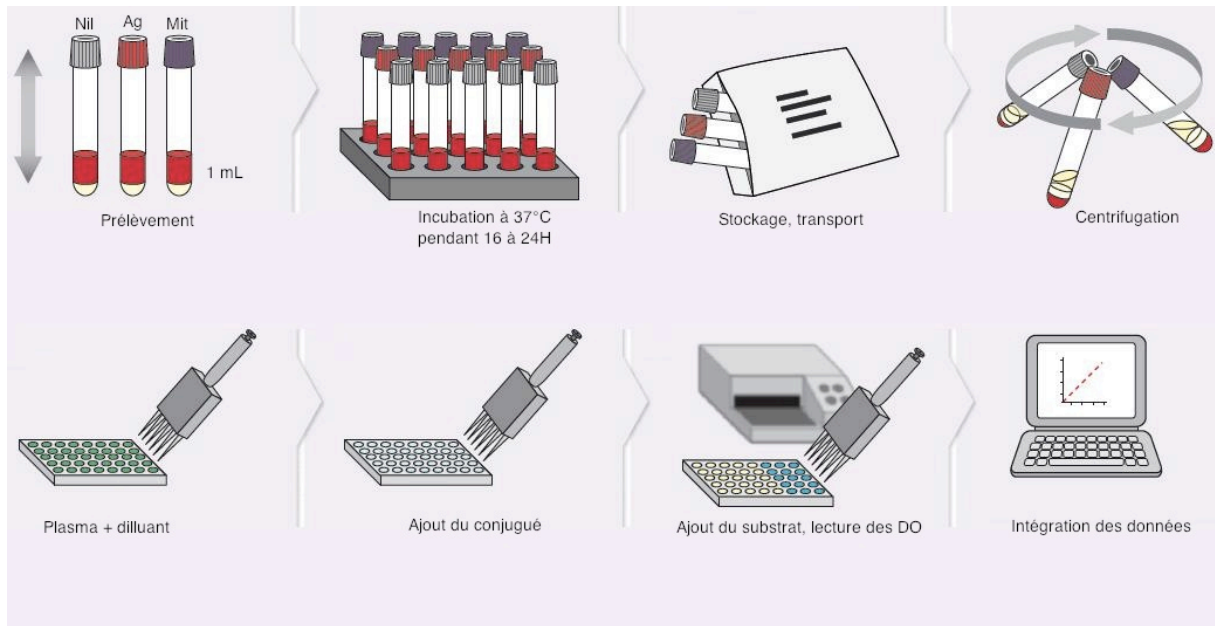


Figure 13. Réalisation du QTF-GIT (Tiré de www.cellestis.com).

2) Interprétation

Un test est considéré comme positif si la quantité d'INF- γ présente dans le plasma du tube Ag est significativement supérieure à la quantité d'INF- γ présente dans le plasma du tube Nil et si le test est valide. Deux conditions sont nécessaires pour qu'un test soit considéré comme valide. D'abord le contrôle positif doit être supérieur à une valeur seuil ($>0,5$ UI/mL). Une réponse diminuée du tube MIT peut être due à une lymphopénie, à une anergie des lymphocytes due à la manipulation de l'échantillon, à un mauvais remplissage des tubes, ou encore à l'incapacité des LT à sécréter de l'INF- γ . L'algorithme d'interprétation est rappelé dans le diagramme ci-dessous (**Figure 14**).

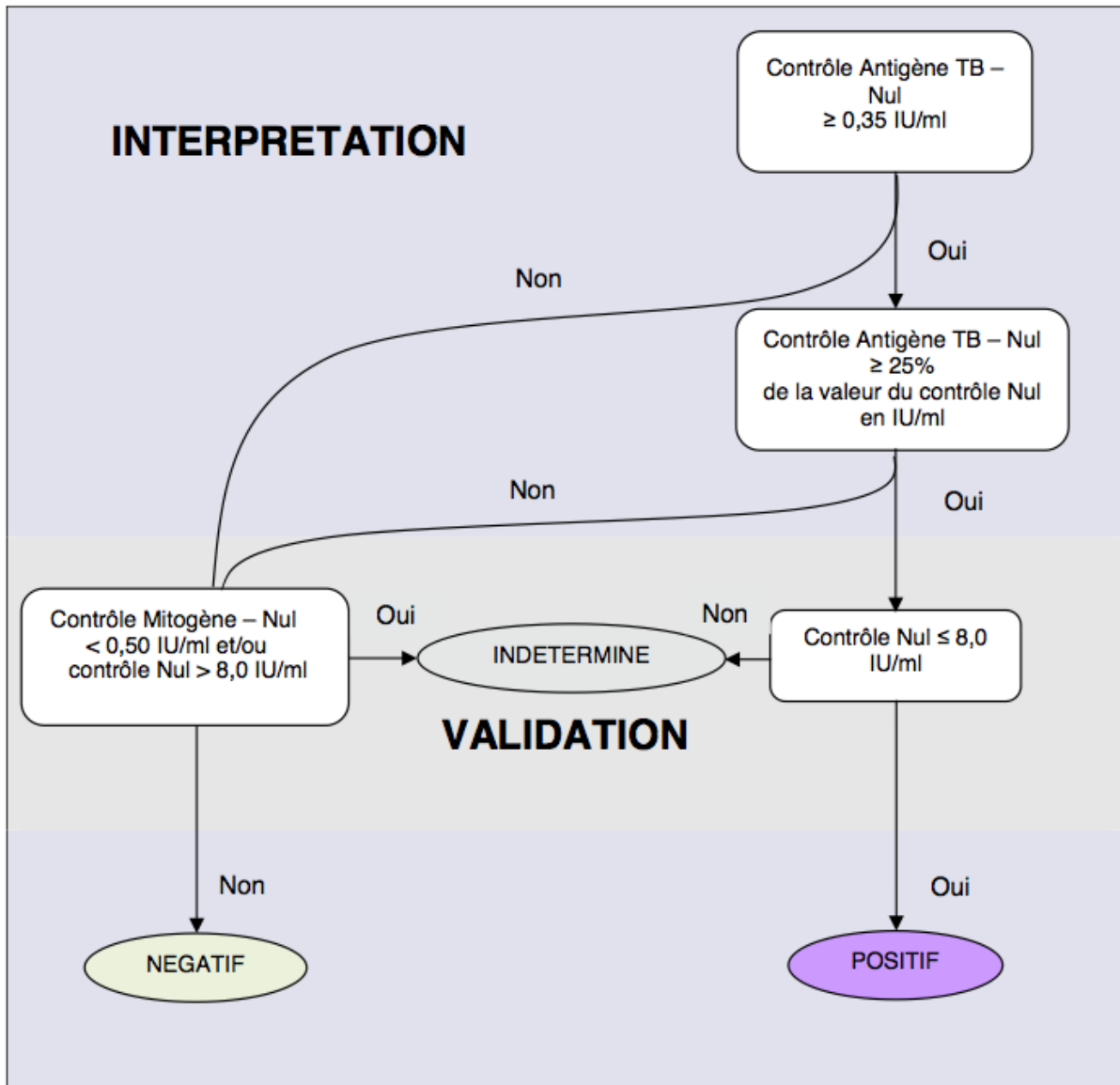


Figure 14. Diagramme synoptique d'interprétation du QTF-GIT (Tiré de www.cellestis.com).

3) Indications

La HAS définit les indications des tests de détection de l'INF- γ dans le cadre de la tuberculose (166). Celle-ci a fixé cinq indications :

- dans le diagnostic des ITL, en remplacement de l'IDR,
- dans le cadre de l'enquête autour d'un cas chez l'adulte (>15 ans),
- lors de l'embauche de professionnels de santé,
- dans l'aide au diagnostic des formes extra-pulmonaires de tuberculose maladie,
- avant la mise en route d'un traitement par anti-TNF- α .

Depuis 2006, de nombreuses études ont été menées dans le but de mieux connaître les performances de ce test. Les indications devraient être revues dans un avenir proche.

iv. Le TB-Spot

Le TB-Spot, comme le QTF-GIT explore l'immunité acquise contre *M. tuberculosis*. La première étape consiste en l'isolation, par centrifugation, des cellules mononucléées du sang périphérique. Ces cellules sont ensuite lavées pour éliminer le « bruit de fond » et sont comptées. Puis elles sont déposées dans quatre puits. Le premier ne contient rien, c'est le contrôle négatif. Le second contient du PHA, c'est le contrôle positif. Les deux derniers contiennent ESAT-6 ou CFP-10. Les lymphocytes stimulés sécrètent de l'INF- γ qui est immédiatement capturé par des anticorps anti-INF- γ « coatés » au fond des puits. Un deuxième anticorps anti-INF- γ couplé à une phosphatase alcaline est ajouté dans les puits. Un substrat de l'enzyme est introduit dans chaque puit et réagit avec la phosphatase alcaline pour donner un précipité coloré qui forme un spot (Figure 15). Chaque spot représente un LT sécrétant de l'INF- γ (Figure 16). Le nombre de spots est ensuite compté, soit par méthode manuelle, soit par méthode automatisée.

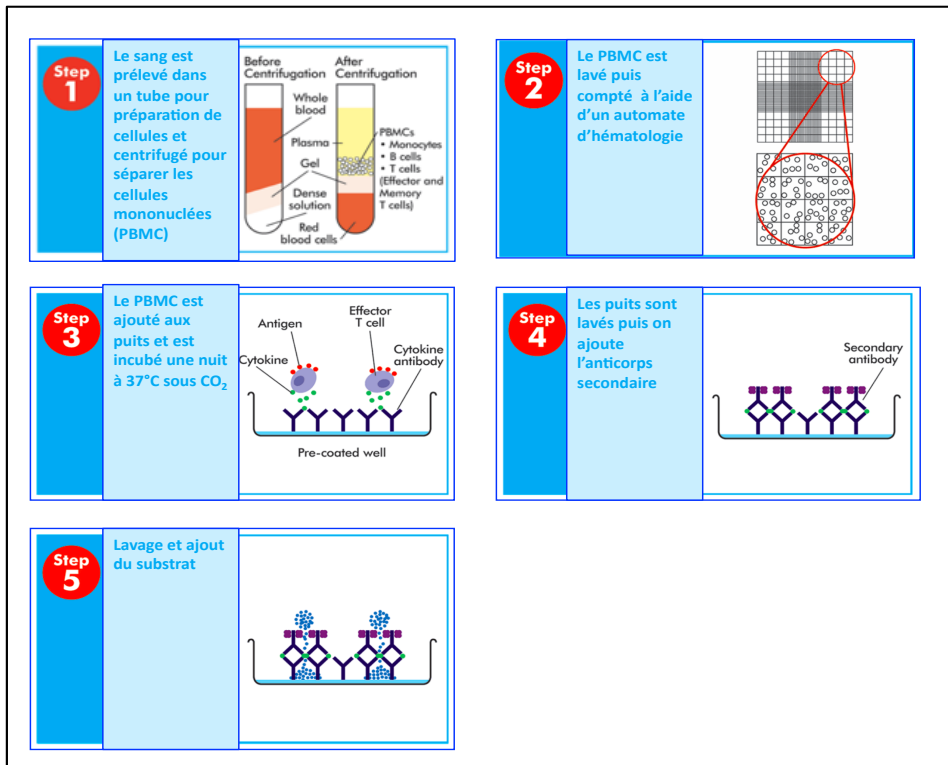


Figure 15. Réalisation du TB-Spot. Adapté de **Monnier**, CHU de Rennes, 2009.

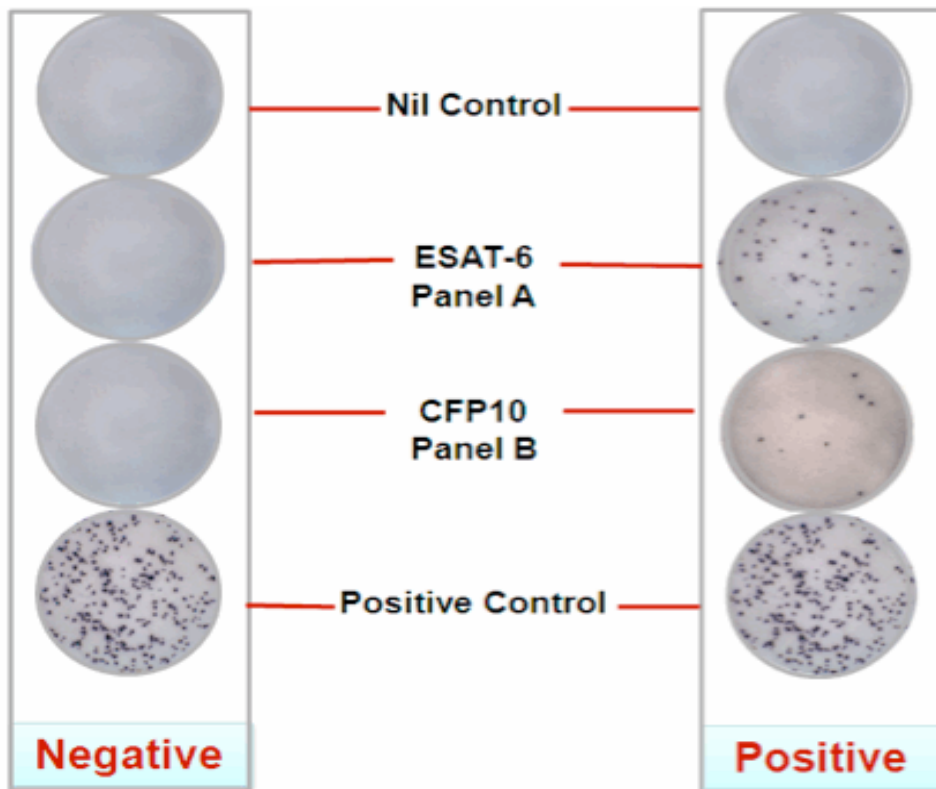


Figure 16. Images typiques d'échantillons positif et négatif. Adapté de **Monnier**, CHU de Rennes, 2009.

Cette technique est lourde à mettre en œuvre du fait des nombreuses manipulations et de l'appareillage nécessaire. Ce test est plus facilement applicable pour de petites séries d'analyses par rapport au QTF-GIT.

En résumé, les IGRA apportent de nombreuses avancées par rapport à l'IDR :

- ils ne nécessitent pas de seconde visite,
- le délai de rendu des résultats est d'environ 48h,
- ce sont des tests reproductibles et objectifs,
- la spécificité est très bonne :
 - Ces tests ne croisent qu'avec *M. kansasii*, *M. szulgai* et *M. marinum*,
 - Pas de réactions croisées avec les souches vaccinales de *M. bovis*,
- Mise en évidence des faux négatifs (immunodéprimés, lymphopénie),
- Absence d'effet booster.

Mais il existe aussi des limites aux tests immunologiques *in vitro* :

- les peptides utilisés ne permettent pas de faire la différence entre *M. tuberculosis*, *M. kansasii* et *M. marinum*,
- ils ne permettent pas de faire la différence entre tuberculose maladie, tuberculose infection latente et tuberculose guérie,
- la mise en œuvre de ces tests peut être source d'erreurs en cas de mauvaise manipulation (temps d'incubation, temps d'attente après le prélèvement, remplissage et agitation des tubes, tests effectués « à la main »), nécessitant un protocole rigoureux au laboratoire,
- données insuffisantes chez l'enfant de moins de 15 ans.

v. Performance des IGRA

1) *Evaluation de la sensibilité et de la spécificité des IGRA*

(a) *Dans la tuberculose maladie*

Les performances des tests indirects de diagnostic sont résumées dans le **Tableau 1**. La dernière méta-analyse de Roland Diel *et al.* (157) pose les bases de la performance des IGRA de dernière génération (utilisant un contrôle positif au PHA) et devrait s'imposer comme une référence dans le domaine. Un an avant eux, Pai *et al.* avaient déjà couplé plusieurs études qui utilisaient déjà les IGRA de dernière génération. L'utilisation de plus en plus courante ces dernières années, de ces tests a permis la publication de nombreuses données en un temps très court. L'étude de Diel *et al.* regroupe 124 études explorant la sensibilité et/ou la spécificité et/ou le nombre d'indéterminés des IGRA et de l'IDR. Quarante études exploraient la sensibilité, 7 études la spécificité et 116 études (dont 82 sans indications sur la sensibilité) donnaient des informations sur les résultats indéterminés. La sensibilité de l'IDR était de 69,9% (IC95%=0,67-0,72) La sensibilité du QTF-GIT était de 81% (IC95%=0,78-0,83). Dans le sous-groupe des études provenant de pays développés, la sensibilité était de 84,5% (IC95%=0,81-0,87) alors qu'elle était de 74,3% (IC95%=0,69-0,79) dans les pays en développement, soit une différence significative ($P < 0,001$). Cette différence pourrait être due au statut immunitaire des patients (infection par le VIH, malnutrition, tuberculose en phase terminale). La sensibilité globale du TB-spot était de 87,5% (IC95%=0,85-0,90). La sensibilité du TB-spot dans les pays en développement n'était pas significativement différente de celle observée dans les pays développés. La sensibilité du TB-spot était supérieure à celle du QTF-GIT. Cette supériorité pourrait être due au choix de *cut-off* pour chaque IGRA. En effet, le *cut-off* du QTF-GIT semble être choisi pour maximiser la spécificité au détriment de la sensibilité. Le *cut-off* du TB-Spot, fixé à 6 spots en Europe, semble lui favoriser la sensibilité. La *Food and Drug Administration* (FDA) a préféré considérer un *cut-off* à 8 spots plus sûrs, introduisant de ce fait la notion de « zone grise » entre 5 et 7 spots. Il est fort probable que la sensibilité et la spécificité soient influencées par cette différence de *cut-off*.

Pour évaluer la spécificité, il faudrait, dans l'idéal, des personnes n'ayant pas d'antécédents de tuberculose infection ou maladie. La spécificité du QTF-GIT, évaluée sur des personnes à faible risque de tuberculose était très bonne: 99,2% (IC95%=0,98 - 1,00). La spécificité du TB-Spot était de 86,3% (IC95%=0,81-0,90), soit une différence significative avec le QTF-GIT.

Dans les études sur le QTF-GIT, dans le cadre de la recherche de tuberculose maladie, la spécificité est évidemment moins bonne, en raison des faux positifs dus aux ITL. Les données dans les pays de forte prévalence montrent logiquement une plus faible spécificité (167).

On pensait que la proportion d'indéterminés était significativement plus élevée avec le QTF-GIT qu'avec le TB-Spot, surtout chez les patients immunodéprimés (168-170). On supposait alors, que cette différence découlait de la possibilité de concentrer les lymphocytes chez les patients lymphopéniques. Si le TB-Spot est supérieur au QTF-GIT chez les patients lymphopéniques (171), l'analyse d'une grande population est en faveur du QTF-GIT. En effet, la méta-analyse de Diel apporte la preuve de la supériorité du QTF-GIT en ce qui concerne les indéterminés: ils ont été évalués à 2,14% (IC95%=0,02-0,023) pour le QTF-GIT et 3,80% (IC95%=0,035-0,042) pour le TB-spot (157). Si on considère les patients qui n'avaient pas assez de cellules pour pratiquer un TB-spot, ce taux passe à 4,46% (IC95%=0,041-0,048) (157). Chez les immunodéprimés, le taux d'indéterminé était de 4,42% pour le QTF-GIT et de 6,12% pour le TB-spot. Dans les deux cas, la différence est significative ($P < 0,001$), en faveur du QTF-GIT. Cette différence s'expliquerait par la différence de méthodologie entre les deux tests. En effet, dans le QTF-GIT, le sang est directement mis en contact avec les antigènes et la PHA, alors que pour le TB-spot, plusieurs étapes sont nécessaires avant de stimuler les lymphocytes (séparation des globules blancs en gradient de densité, compte des cellules, ajustement du nombre de cellules, ajout manuel dans les puits). Toutes ces étapes sont autant d'erreurs de manipulations possibles (157).

	QTF-GIT	TB-Spot	IDR
Sensibilité (%)	81	87,5	70
Spécificité (%)	99,2	86,3	40 à 90
Indéterminés (%)	2,14	3,8	-

Tableau 1. Performances des tests de diagnostics indirects.

En résumé :

- la sensibilité générale du QTF-GIT est supérieure dans les pays à faible endémie tuberculeuse ; ce n'est pas le cas pour le TB-Spot,
- la sensibilité globale du TB-Spot est supérieure à celle du QTF-GIT,
- la spécificité globale du QTF-GIT est supérieure à celle du TB-Spot,
- la proportion d'indéterminés avec TB-Spot est supérieure à celle du QTF-GIT,
- la preuve définitive de la supériorité des IGRA sur l'IDR est apportée.

(b) *Dans la tuberculose infection*

Les IGRA sont souvent utilisés pour détecter les ITL, notamment dans les « études cas témoin ». La détermination des performances des IGRA dans l'ITL pose problème puisque n'existe pas de « *gold standard* ». Des études ont donc été faites sur « l'intensité d'exposition » à *M. tuberculosis* et la positivation des tests. Il semble qu'il y ait un fort lien entre exposition et positivation des IGRA. Néanmoins, de nombreuses interrogations persistent, comme le délai de positivation ou la relation entre intensité de la réponse et risque de développer une tuberculose maladie (167).

2) *Cut-off*

Comme nous l'avons vu précédemment, le *cut-off* pour le QTF-GIT est fixé à 0,35UI/mL. Il a été choisi pour maximiser la spécificité, au détriment de la sensibilité.

Certains auteurs se sont intéressés au *cut-off* du QTF-GIT. Veerapathran *et al.* (172), dans la 2^{ème} partie de leur étude, se sont penchés sur les notions de conversion et réversion, de la même manière que pour l'IDR. Différentes définitions de conversion ont été testées selon :

- 1) le *cut-off* défini par le fabricant (0,35UI/mL) ;
- 2) l'augmentation de plus de 30% d'une valeur de base < 0,35UI/mL ;
- 3) une augmentation de 0,35UI/mL par rapport à une valeur de base <0,35UI/mL ;
- 4) une valeur de base < 0,35UI/mL et une seconde valeur >0,70UI/mL.

Les sujets étaient re-testés 12 mois après la détermination de la valeur de base, une IDR était effectuée en parallèle. Les résultats obtenus donnent un taux de conversion qui va du simple au double : la définition la moins stricte (proposition 2) donnait 21,2% de conversion alors que la plus stricte (proposition 4) donnait 11,8% de conversion.

Le choix dichotomique a aussi été remis en question : ces auteurs ont proposés une zone grise, choisie arbitrairement, où le résultat serait incertain, allant de 0,2 à 0,5 UI/mL. Considérant cette zone grise, seule se maintient la moitié des conversions observées avec le *cut-off* du fabricant. De plus, la concordance entre l'IDR et le QTF-GIT était la meilleure pour la proposition numéro 4, c'est à dire la plus stricte.

Le même raisonnement a été effectué pour les réversions considérant le *cut-off* du fabricant. Sept réversions, sur 109 participants présentant un QTF-GIT positif, ont été observées avec le *cut-off* du fabricant. Avec la zone grise, seulement 4 réversions étaient toujours effectives.

D'autres auteurs comme Harada *et al.* (173) ont aussi proposé une zone grise (de 0,1 à 0,35UI/mL).

Pai *et al.* ont choisi arbitrairement une zone grise allant de 0,2 à 0,5 UI/mL.

3) Performances analytiques du QTF-GIT

Les études de reproductibilité et la précision du QTF-GIT effectuées par le fabricant ont été envisagées du point de vue technique, après stimulation lymphocytaire. Il ne prennent donc en considération que les variations techniques, post-incubations. La reproductibilité intra-plaque (précision) et la reproductibilité inter-plaque (reproductibilité) ont été testés par le fabricant sur des plasmas sélectionnés. Les essais ont été faits sur 20 plasmas avec des concentrations en INF- γ variables (de 0,33 à 7,7UI/mL). Chaque plasma a été testé trois fois, par trois laboratoires différents et par trois techniciens différents. Chaque échantillon a donc été testé 27 fois. L'imprécision était évaluée par le coefficient de variation (CV) pour chaque échantillon, soit 6,6 à 12,3%CV sur une plage de mesure allant de 0,33 à 7,7UI/mL et un CV global de 8,7% (IC95%=0,08-0,087).

L'imprécision inter-sites totale était de 5,3%CV (IC95%=0,047-0,059).

L'imprécision inter-plaques totale était de 6,3%CV (IC95%=0,056-0,072).

L'imprécision inter-opérateurs totale était de 6,6%CV (IC95%=0,06-0,072), cette dernière n'étant pas significativement différente de l'imprécision inter-plaque ($p=0,81$, Test de Student).

Cette méthodologie ne prend pas en compte les variations pré-analytiques comme le recueil des échantillons, la conservation des échantillons et l'étape de stimulation lymphocytaire. Elle ne prend pas non plus en compte les variations touchant les patients comme par exemple la variation nyctémérale du taux de lymphocyte.

vi. Perspectives

Partant du constat des limites actuelles de ces tests, plusieurs approches ont été explorées dans le but d'améliorer ces tests. Une première voie de recherche s'est intéressée à des antigènes de la région RD1 qui permettraient de faire la différence entre tuberculose maladie et ITL. Dans cette approche, les nouveaux antigènes donneraient des réactions positives dans la tuberculose maladie, mais pas en cas d'ITL (115, 116). La mise en œuvre des tests actuels permettrait ainsi de mettre en évidence les ITL et les tuberculoses maladies. Ce nouveau test viendrait en complément des tests existants pour faire la différence entre tuberculose maladie et ITL.

D'autres chercheurs se sont intéressés à la protéine mycobactérienne HBHP (*Heparin Binding Haemagglutinin*) qui donnerait des réactions de stimulation lymphocytaire positive en cas d'ITL, mais pas en cas de tuberculose maladie.

Partie 2. Le QuantiFERON-TB Gold

In-Tube :

Phase pré-analytique

&

**Performances dans le diagnostic de la
tuberculose**

Objectifs de l'étude

Cette étude a pour but, d'une part de déterminer l'influence des variables pré-analytiques du QTF-GIT tolérées par le fabricant (Cellestis) sur les résultats quantitatifs et qualitatifs et d'autre part, d'étudier la sensibilité et la spécificité du test dans les tuberculoses maladies. Notre étude s'articule donc en deux grandes parties, la première est prospective, la seconde rétrospective.

Les épreuves de stimulation lymphocytaire sont des examens délicats à mettre en œuvre en raison de la grande variabilité des résultats obtenus. Ils sont souvent utilisés dans le cadre de la recherche ou plus rarement dans des Laboratoires de Biologie Médicale (LABM) spécialisés en immunologie. Le QTF-GIT et le TB-Spot font exception dans les tests de routine de LABM. Nous avons donc testé les variables qui nous semblent les plus décisives dans le cadre d'une épreuve de stimulation lymphocytaire et pour lesquelles aucune étude n'a été publiée.

Dans la seconde partie de notre étude, nous avons exploité les résultats de QTF-GIT effectués au CHU de Bordeaux dans le cadre du diagnostic de tuberculose maladie entre novembre 2005 et juin 2010. Ces résultats nous permettent d'évaluer la sensibilité et la spécificité du test en fonction des renseignements cliniques et bactériologiques. Nous avons testé d'autre part des variables telles que le *cut-off* afin de mesurer leur influence sur les performances du QTF-GIT.

A. Matériels et méthodes

L'étude comporte deux parties:

- les facteurs variables de la phase pré-analytique,
- l'étude rétrospective de la sensibilité et de la spécificité.

1. *Etude de la phase pré-analytique du test QTF-GIT*

a. Populations étudiées

En ce qui concerne les variables pré-analytiques du QTF-GIT, nous avons postulé sur le fait que si des variations existent, elles se font dans le sens d'une négativation du test. Nous avons donc étudié de février 2010 à mai 2010 des sujets présentant un test QTF-GIT faiblement positif (0.35UI/mL à 1UI/mL), positif ou ayant de forts risques d'exposition professionnelle à *M. tuberculosis*. Un échantillon du personnel de l'Hôpital de Haut Lévêque (aides laboratoires, techniciens, internes, biologistes, médecins) a été testé en raison de leur risque d'exposition, mais aussi parfois d'un antécédent de QTF-GIT positif. Une autre partie des échantillons correspond à des patients hospitalisés ou non, connus pour avoir un QTF-GIT faiblement positif ou positif.

b. Recueil des échantillons

Trois séries de trois tubes de 1 mL (soit 9 mL) fournis par le fabricant (Cellestis) ont été prélevés pour chaque patient. Le premier tube contient de l'héparine, c'est le contrôle négatif. Un autre contient de la PHA, c'est le contrôle positif ou « mitogène ». Le dernier contient les antigènes mycobactériens ESAT-6, CFP-10 et TB7.7, c'est le tube test. Les sujets ont été prélevés en une seule fois, ce qui permet de s'affranchir des variations inter-individuelles et notamment des variations nyctémérales des taux de lymphocytes. Le recueil des échantillons a été effectué selon les prescriptions du fabricant Cellestis pour le QTF-GIT, par des personnes habilitées. Les ponctions veineuses ont été réalisées au pli du coude avec garrot. Dès le prélèvement effectué, les échantillons ont été agités à la main pendant 5 à 10 secondes pour dissoudre l'héparine afin d'éviter la coagulation de l'échantillon et pour permettre la solubilisation des

antigènes mycobactériens dans le tube test et de la PHA dans le tube « mitogène ». Les prélèvements ont tous été effectués en début d'après midi, entre 15h et 16h.

c. Phase pré-analytique

Chacune des trois séries de trois tubes était traitée différemment. Les différents temps d'incubation sont présentés dans le **Tableau 2**. Une première série de tubes a été mise à l'étuve dans un délai d'une heure maximum et pour une durée de 24h (valeur limite haute fixée par le fabricant). La deuxième série de tubes a été placée sur la paillasse à température ambiante (20 à 25°C) pendant 16h (délai maximum fixé par le fabricant), puis les échantillons ont été incubés à l'étuve pendant une durée de 24h. Enfin, la troisième série de tubes a été placée à l'étuve dans l'heure suivant le prélèvement et pour une durée de 16h (valeur minimum fixée par le fabricant). Avant mise à l'étuve, chaque tube a été agité à la main pendant 5 à 10 secondes. Les tubes ont été placés verticalement dans l'étuve à 37°C. Après passage à l'étuve, les tubes ont été immédiatement centrifugés à 3500 tours/minute (soit une force relative de centrifugation de 2383g) pendant 15 minutes. Puis les échantillons ont été aliquotés dans deux tubes secs hermétiques prévus à cet effet. Le premier a été placé au réfrigérateur à une température comprise entre +2 et +8°C, le second a été conservé au congélateur à -80°C. Le dosage d'INF- γ a été fait moins d'une semaine après le prélèvement.

	Incubation	20 à 25°C	37°C
Série 1	0/24h	0	24
Série 2	0/16h	0	16
Série 3	16/24h	16	24

d. Dosage de l'INF- γ

Les dosages d'INF- γ des différentes séries de tubes, pour un même sujet, ont été effectués sur la même plaque d'ELISA. Cela permettait d'éliminer les effets des variations inter-plaques. L'INF- γ a été dosé selon les prescriptions du fabricant. Les DO ont été mesurées à 450 nm avec un filtre de référence entre 620 et 650 nm. Tous les consommables et appareils utilisés sont conformes aux recommandations du fabricant. Les dosages ont été effectués par le personnel du laboratoire formé aux techniques ELISA, selon une méthode manuelle. Les DO étaient intégrées dans le logiciel fourni par le fabricant (Cellestis) permettant de les convertir en UI/mL, ceci en corrélation avec une gamme étalon réalisée sur chaque plaque, à chaque série. L'interprétation des données n'était validée que si la courbe étalon était correcte. Les règles d'interprétation du QTF-GIT sont rappelées dans la **Tableau 3**. Un échantillon était considéré positif si la réponse en INF- γ du tube test était significativement supérieure à la réponse en INF- γ du tube NIL. Le *cut-off* pour un GTF-GIT positif était (INF- γ tube test – INF- γ tube Nil) > 0.35 UI/mL comme le recommande le fabricant du QTF-GIT. Le contrôle positif contenant le mitogène devait être > 0.5UI/mL pour que le test soit acceptable.

Nul [IU/ml]	Antigène TB moins Nul [IU/ml]	Mitogène moins Nul [IU/ml]	Résultat Quantiferon®-TB Gold IT	Rapport/Interprétation
≤ 8,0	< 0,35	≥ 0,5	Négatif	Infection au <i>M. tuberculosis</i> Improbable
	≥ 0,35 et < 25% de la valeur nulle	≥ 0,5		
	≥ 0,35 et ≥ 25% de la valeur nulle	n'importe lequel	Positif	Infection au <i>M. tuberculosis</i> probable
	< 0,35	< 0,5	Indéterminé	Résultats sont indéterminés pour la réponse à l'antigène TB
≥ 0,35 et < 25% de la valeur nulle	< 0,5			
> 8,0 ⁴	n'importe lequel	n'importe lequel		

Tableau 3. Tableau d'interprétation du QTF- GIT (Tiré de www.cellestis.com).

2. Etude de la répétabilité du QTF-GIT

Certains échantillons positifs ainsi que les discordants ont été re-testés. Le deuxième test s'est déroulé avec le même opérateur, dans le même laboratoire, selon le même protocole. La seule variable était le lot de QTF-GIT utilisé. Les essais de répétabilité ont été effectués dans un délai de 2 mois après prélèvement. Les échantillons avaient été congelés à -80°.

Nous avons aussi testé l'influence du changement de *cut-off* sur nos résultats. Le *cut-off* fixé par le fabricant est 0,35UI/mL. Nous avons testé divers *cut-off* déjà décrits dans la littérature, soit 0,2UI/mL, 0,5UI/mL et 0,8UI/mL. Nous avons aussi étudié l'influence de la mise en place d'une zone grise de 0,2 à 0,5UI/mL sur les résultats.

3. Etude de la sensibilité et de la spécificité des infections à mycobactéries tuberculeuses et atypiques bactériologiquement documentées.

Le recueil des données du laboratoire de bactériologie a porté sur l'ensemble des patients pour lesquels a été réalisé une culture pour recherche de mycobactéries et un dosage de QTF-GIT de septembre 2005 à juin 2010 au CHU de Bordeaux et dans le département de la Gironde. La recherche des mycobactéries a été réalisée à partir d'échantillons selon des techniques classiques : décontamination par soude/L-cystéine (Mycoprep de Becton Dickinson), examen direct réalisé après coloration à l'auramine et vérifié par Ziehl Neelsen, ensemencement sur milieu liquide MGIT et sur milieu solide Löwenstein et Coletsos (Bio-Rad). L'identification des souches isolées a été réalisée par des techniques de biologie moléculaire : Accuprobe (bioMérieux) pour le complexe *tuberculosis* et Génotype MTBC (Hain Lifescience) pour l'espèce au sein du complexe *tuberculosis*, Genotype AS (Additional Species) et Genotype CM (Common Mycobacteria) pour les mycobactéries atypiques.

Pour tous ces patients, des informations complémentaires ont été recueillies, notamment le sexe, le pays de naissance, le statut immunitaire, la localisation et la nature de l'infection, le statut immunitaire, le statut virologique vis à vis du VIH, les éventuels antécédents de tuberculose, la date du QTF-GIT effectué et sa valeur.

La sensibilité et la spécificité ont aussi été évaluées en fonction de divers *cut-off*. Ces *cut-off* ont été choisis, de façon à encadrer le *cut-off* du fabricant (0,2 ; 0,5 ; 0,8). Nous

avons aussi repris l'idée d'une zone grise que Pai *et al* (174) avaient introduit de façon arbitraire. Cette zone grise va de 0,20 à 0,50 UI/mL.

4. Statistiques

L'analyse statistique a été réalisée sur le logiciel Excel, puis a été reprise par un statisticien sur le logiciel Stat 8.0. Les variables quantitatives ont été comparées par des tests de Student. L'agrément entre les variables qualitatives était évalué par le coefficient Kappa de Cohen.

B. Résultats

1. Etude de la phase pré-analytique des QTF-GIT

a. Caractéristiques de la population étudiée

Vingt quatre volontaires ont participé à l'étude, la moyenne d'âge était de 51 ans (Sd=15,7), avec pour médiane 40 ans (39,5 ; 61,5). Le sex-ratio Homme/Femme était de 0,6. Parmi les 24 participants, 16 appartenaient au personnel de l'Hôpital Haut Lévêque, 9 travaillaient au laboratoire de bactériologie, 3 étaient médecins en médecine interne, 2 étaient infirmières et 2 étaient internes en biologie médicale. Parmi les professionnels de santé, 2 étaient nés dans des pays de forte prévalence de la tuberculose (Madagascar et Cameroun), 4 présentaient des antécédents d'ITL et 2 des antécédents de tuberculose maladie. Les 8 autres étaient des patients hospitalisés. Parmi ces patients, 3 étaient connus pour ITL, 5 avaient une tuberculose active. Aucun des participants n'était connu comme étant immunodéprimé. Hormis les 5 cas de tuberculose maladie, tous les autres sujets étaient en « bonne santé ».

b. Résultats

Le **Tableau 4** présente les résultats obtenus en fonction de la phase pré-analytique (temps d'incubation et temps d'attente).

Tableau 4. Résultats des QTF-GIT en fonction de la phase pré-analytique.

ID#	Age	Sexe	QTF 0h/24h*		QTF 0h/16h*		QTF 16h/24h*	
			INF- γ (UI/mL)	Résultat**	INF- γ (UI/mL)	Résultat**	INF- γ (UI/mL)	Résultat**
1	40	F	0,13	Négatif	0,05	Négatif	0,01	Négatif
2	53	F	0,06	Négatif	0,05	Négatif	0,02	Négatif
3	52	F	11,51	Positif	11,24	Positif	7,90	Positif
4	35	F	0,98	Positif	0,45	Positif	0,81	Positif
5	61	F	0,05	Négatif	0,03	Négatif	0,01	Négatif
6	53	F	0,01	Négatif	0,15	Négatif	0,02	Négatif
7	40	F	0,02	Négatif	0,01	Négatif	0,01	Négatif
8	63	M	1,00	Positif	0,59	Positif	0,49	Positif
9	55	F	0,42	Positif	0,32	Négatif	0,11	Négatif
10	34	F	0,01	Négatif	0,01	Négatif	0,01	Négatif
11	25	M	0,42	Positif	0,42	Positif	0,12	Négatif
12	51	F	1,74	Positif	1,71	Positif	0,37	Positif
13	39	M	1,85	Positif	2,09	Positif	1,60	Positif
14	35	M	0,01	Négatif	0,01	Négatif	0,01	Négatif
15	54	M	0,06	Négatif	0,23	Négatif	0,01	Indéterminé
16	62	F	0,19	Négatif	0,05	Négatif	0,05	Négatif
17	89	M	0,23	Négatif	0,22	Négatif	0,07	Négatif
18	63	M	23,88	Positif	16,61	Positif	12,79	Positif
19	21	M	0,29	Négatif	0,25	Négatif	0,09	Négatif
20	72	F	0,04	Négatif	0,21	Négatif	0,22	Négatif
21	64	F	2,44	Positif	1,06	Positif	0,30	Négatif
22	56	F	0,52	Positif	0,47	Positif	0,13	Négatif
23	57	M	0,01	Négatif	0,04	Négatif	0,02	Négatif
24	Inc	F	0,60	Positif	0,37	Positif	0,30	Négatif

*Durée d'attente après prélèvement/durée d'incubation à l'étuve
**Cut-off, pour un QTF positif, était : INF- γ \geq 0,35UI/mL

Si l'on considère les sujets positifs à 0/24h, 5 présentaient des résultats discordants (ID 9, 11, 21, 22, 24), pour une autre incubation.

Parmi ces résultats discordants, 4 présentaient des valeurs proches du *cut-off* (0,35UI/mL) (ID 9, 11, 22, 24), le cinquième (ID 21) était fortement positif à 0/24h (2,44 UI/mL). Quatre sujets présentaient des résultats concordants à 0/24h et 0/16h et discordants entre 0/24h et 16/24h. Le dernier était discordant entre 0/24h et 0/16h et entre 0/24h et 16/24h. Entre les incubations 0/16h et 16/24h, 4 sont concordants et un est discordant.

Tous les résultats négatifs sont concordants aux trois incubations, sauf un qui est indéterminé (ID#15) à 16/24h.

En conclusion: 5 résultats sur 24 sont discordants, dont 4 présentent des résultats proches du *cut-off* (0,35 UI/mL). De plus, un échantillon était indéterminé à 16/24h.

c. Comparaison des résultats qualitatifs des QTF-GIT

Si nous considérons les résultats qualitatifs, pour comparer les incubations, l'analyse statistique des résultats peut se faire par la quantification de l'accord entre les résultats comparés deux à deux. Cet accord peut être estimé par le coefficient de Cohen. Le **Tableau 5** présente les résultats qualitatifs en fonction des temps d'incubations, le **Tableau 6** présente les résultats du coefficient de Cohen en fonction de l'incubation.

Tableau 5. Concordance des résultats en fonction de la phase pré-analytique.

		QTF 0h/16h*		Total	QTF 16h/24h*		Total
		Positif**	Négatif**	Total	Positif**	Négatif**	Total
QTF 0h/24h*	Positif**	9	1	10	6	4	10
	Négatif**	0	12	12	0	12	12
Total		9	13	22	6	16	22
QTF 16h/24h*	Positif**	6	3	9			
	Négatif**	0	13	13			
Total		6	16	22			

*Durée d'attente après prélèvement/durée d'incubation à l'étuve

**Cut-off, pour un QTF positif, était : INF- γ \geq 0,35UI/mL

Tableau 6. Accord entre les différentes incubations, estimé par le coefficient kappa de Cohen.

	QTF 0h/16h vs QTF 16h/24h	QTF 0h/24h vs QTF 0h/16h	QTF 0h/24h vs QTF 16h/24h
Coefficient Kappa	0,63	0,91	0,56
Accord	Bon	Excellent	Modéré

L'accord est :

- **modéré si l'on considère les incubations 0/24h et 16/24h (Concordance : 78,3% ; k=0,56),**
- **bon entre 0/16H et 16/24h (Concordance : 82,6% ; k=0,63),**
- **excellent entre 0/24h et 0/16h (Concordance : 95,6% ; k=0,91).**

d. Comparaison des résultats quantitatifs des QTF-GIT

Si nous considérons la quantité d'INF- γ sécrétée pour comparer les incubations, l'analyse statistique des résultats est une comparaison de deux variables appariées, soit un test de Student. Etant donné la large plage de mesure, il est probable que les différences de réponse, si elles existent, soient dépendantes de la valeur du QTF-GIT. Les échantillons ont donc été subdivisés en sous-groupes (tous, négatifs, positifs, discordants, positifs et discordants).

- Comparaison des résultats des échantillons dont la stimulation lymphocytaire à été faite dès le prélèvement effectué : incubations 0/24h et 0/16h (**Tableaux 7,8, 9 et 10**)

Tableau 7. Tous les échantillons 0/24h - 0/16h.

Incubation	0/24h	0/16h
Moyenne	1,935	1,527
Ecart type	5,23	3,93
P-value	0,097	

Tableau 8. Sous-groupe des négatifs 0/24h - 0/16h.

Incubation	0/24h	0/16h
Moyenne	0,088	0,090
Ecart type	0,32	0,09
P-value	0,460	

Tableau 9. Sous-groupe des positifs et des discordants 0/24h - 0/16h.

Incubation	0/24h	0/16h
Moyenne	3,783	2,963
Ecart type	7,05	5,28
P-value	0,099	

Tableau 10. Sous-groupe des discordants 0/24h - 0/16h.

Incubation	0/24h	0/16h
Moyenne	0,738	0,478
Ecart type	0,85	0,30
P-value	0,154	

Il n'existe pas de différence significative entre la quantité d'INF- γ sécrété lors des incubations 0/24h et 0/16h, quel que soit le sous-groupe considéré (tous, négatifs, positifs, résultats discordants), au seuil $p=0,05$.

- Comparaison des résultats positifs (**tableaux 11, 12 et 13**)

Tableau 11. Sous-groupe des positifs 0/24h - 0/16h.

Incubation	0/24h	0/16h
Moyenne	6,827	5,448
Ecart type	9,25	6,81
P-value	0,148	

Tableau 12. Sous-groupe des positifs 0/24h - 16/24h.

Incubation	0/24h	16/24h
Moyenne	6,827	3,993
Ecart type	9,25	5,17
P-value	0,081	

Tableau 13. Sous-groupe des positifs 0/16h - 16/24h.

Incubation	0/16h	16/24h
Moyenne	5,448	3,993
Ecart type	6,81	5,17
P-value	0,048	

Dans le sous-groupe des positifs, les incubations 0/16h et 16/24h ont montré une différence significative (p=0,048). Les autres incubations n'ont pas montré de différence significative au seuil p=0,05.

- Comparaison des résultats, considérant tous les échantillons (**tableaux 14 et 15**)

Tableau 14. Tous les échantillons 0/24h - 16/24h.

Incubation	0/24h	16/24h
Moyenne	1,935	1,061
Ecart type	5,23	2,97
P-value	0,040	

Tableau 15. Tous les échantillons 0/16h - 16/24h.

Incubation	0/16h	16/24h
Moyenne	1,527	1,061
Ecart type	15,484	8,820
P-value	0,017	

Les résultats des incubations 0/24h et 16/24h ($p=0,040$) d'une part et 0/16h et 16/24h ($p=0,017$) d'autre part montrent une différence significative si l'on considère tous les échantillons.

- Sous-groupe des négatifs (**Tableaux 16 et 17**)

Tableau 16. Sous-groupe des négatifs 0/16h - 16/24h.

Incubation	0/16h	16/24h
Moyenne	0,090	0,045
Ecart type	0,09	0,063
P-value	0,016	

Tableau 17. Sous-groupe des négatifs 0/24h - 16/24h.

Incubation	0/24h	16/24h
Moyenne	0,088	0,045
Ecart type	0,10	0,063
P-value	0,088	

Dans le sous-groupe des négatifs, seules les incubations 0/16h et 16/24h ont montré des résultats significativement différents ($p=0,016$).

- Sous-groupe des positifs et des discordants (**Tableaux 18 et 19**)

Tableau 18. Sous-groupe des positifs et des discordants 0/24h - 16/24h.

Incubation	0/24h	16/24h
Moyenne	3,783	2,078
Ecart type	7,05	4,02
P-value	0,043	

Tableau 19. Sous-groupe des positifs et des discordants 0/16h - 16/24h.

Incubation	0/16h	16/24h
Moyenne	2,963	2,078
Ecart type	5,27	4,02
P-value	0,021	

Dans les sous-groupes des positifs et des discordants, la différence est significative entre les incubations 0/16h et 16/24h (p=0,021) d'une part et 0/24h et 16/24h d'autre part (p=0,043).

- Sous-groupe des discordants (**Tableaux 20 et 21**)

Tableau 20. Sous-groupe des discordants 0/24h - 16/24h.

Incubation	0/24h	16/24h
Moyenne	0,738	0,162
Ecart type	0,85	0,11
P-value	0,064	

Tableau 21. Sous-groupe des discordants 0/16h - 16/24h.

Incubation	0/16h	16/24h
Moyenne	0,478	0,162
Ecart type	0,30	0,11
P-value	0,011	

Dans le sous-groupe des discordants, seules les incubations 0/16h et 16/24h ont montré une différence significative (p=0,011).

En résumé, les résultats quantitatifs sont significativement différents pour :

- le sous-groupe des discordants entre 0/16h et 16/24h ($p=0,011$),
- le sous-groupe des positifs et des discordants entre 0/16h et 16/24h ($p=0,021$) et entre 0/24h et 16/24h ($p=0,043$),
- le sous-groupe des négatifs entre 0/16h et 16/24h ($p=0,016$),
- tous les échantillons entre 0/24h et 16/24h ($p=0,040$) et 0/16h et entre 16/24h ($p=0,017$),
- le sous-groupe des positifs entre 0/16h et 16/24h ($p=0,048$).

En conclusion, le délai de 16h, à température ambiante, avant stimulation lymphocytaire est donc à l'origine d'une différence significative dans les résultats quantitatifs, quel que soit le groupe étudié.

e. Influence du *cut-off* en fonction de la phase pré-analytique sur les résultats qualitatifs

Des *cut-offs* différents de celui donné par le fabricant (0,35 UI/mL) ont été décrits dans la littérature, nous les avons donc appliqués à notre étude. Le **Tableau 22** présente les performances du QTF-GIT en fonction du *cut-off* et du pré-analytique.

Tableau 22. Concordance des résultats en fonction de l'incubation et du *cut-off*.

	QTF 0h/16h vs QTF 16h/24h	QTF 0h/24h vs QTF 0h/16h	QTF 0h/24h vs QTF 16h/24h
Coefficient Kappa* (<i>cut-off</i> 0,2UI/mL)	0,51	0,82	0,49
Accord** (<i>cut-off</i> 0,2UI/mL)	Modéré	Excellent	Modéré
Coefficient Kappa* (<i>cut-off</i> 0,35UI/mL)	0,63	0,91	0,56
Accord** (<i>cut-off</i> 0,35UI/mL)	Bon	Excellent	Modéré
Coefficient Kappa* (<i>cut-off</i> 0,5UI/mL)	0,49	0,80	0,57
Accord** (<i>cut-off</i> 0,5UI/mL)	Modéré	Bon	Modéré
Coefficient Kappa* (<i>cut-off</i> 0,8UI/mL)	0,59	0,78	0,59
Accord** (<i>cut-off</i> 0,8UI/mL)	Modéré	Bon	Modéré

Dans nos expériences sur les variations pré-analytiques, la variation du *cut-off* n'offre pas d'amélioration des résultats, quel que soit le *cut-off* considéré.

Le *cut-off* à 0,35UI/mL offre le meilleur accord quel que soit les incubations considérées.

f. Répétabilité

Les résultats de répétabilité sont présentés dans le **Tableau 23**. Trente et un échantillons provenant de 11 des volontaires ont été re-testés, de façon à étudier la variation liée à la manipulation dans notre laboratoire.

Tableau 23. Répétabilité.						
ID #	Incubation	QTF-GIT test 1		QTF-GIT test 2		CV%
		INF- γ	Résultat*	INF- γ	Résultat*	
		(UI/mL)		(UI/mL)		
5	0/16h	0,45	Positif	0,5	Positif	7,44
5	0/24h	0,98	Positif	0,94	Positif	2,95
5	16/24h	0,81	Positif	0,57	Positif	24,60
8	0/16h	0,59	Positif	0,63	Positif	4,64
8	0/24h	1	Positif	1,09	Positif	6,09
8	16/24h	0,49	Positif	0,62	Positif	16,56
9	0/16h	0,32	Négatif	0,38	Positif	12,12
9	0/24h	0,42	Positif	0,42	Positif	0,00
14	0/16h	16,61	Positif	13,87	Positif	12,71
14	0/24h	23,88	Positif	14,76	Positif	33,38
14	16/24h	12,79	Positif	11,07	Positif	10,19
16	0/16h	11,24	Positif	12,9	Positif	9,72
16	16/24h	7,9	Positif	7,21	Positif	6,46
17	0/16h	0,42	Positif	0,53	Positif	16,38
17	0/24h	0,42	Positif	0,51	Positif	13,69
17	16/24h	0,12	Négatif	0,11	Négatif	6,15
18	0/16h	1,71	Positif	2,23	Positif	18,66
18	0/24h	1,74	Positif	1,66	Positif	3,33
18	16/24h	0,37	Positif	0,8	Positif	51,98
19	0/16h	2,09	Positif	8,92	Positif	87,73
19	0/24h	1,85	Positif	6,53	Positif	78,98
19	16/24h	1,6	Positif	4,89	Positif	71,69
20	0/16h	0,23	Négatif	0,41	Positif	39,77
20	0/24h	0,06	Négatif	0,26	Négatif	88,39
20	16/24h	0,01	Indéterminé	0,01	Indéterminé	84,85
21	0/16h	1,06	Positif	0,45	Positif	57,13
21	0/24h	2,44	Positif	2,01	Positif	13,67
21	16/24h	0,3	Négatif	0,27	Négatif	7,44
22	0/16h	0,47	Positif	0,49	Positif	2,95
22	0/24h	0,52	Positif	0,57	Positif	6,49
22	16/24h	0,13	Négatif	0,08	Négatif	33,67

*Le *cut-off* pour un QTF positif était INF- $\gamma \geq 0,35$ UI/mL

Un échantillon présentait des résultats indéterminés et n'a pas été pris en compte dans l'analyse statistique.

i. Répétabilité qualitative

D'un point de vue qualitatif, les résultats étaient discordants pour deux échantillons provenant de 2 sujets différents (Id#20 0/16h et ID#9 0/16h). Le **Tableau 24** montre la concordance qualitative entre tests et re-tests des échantillons.

Tableau 24. Concordance des tests et re-tests du QTF-GIT.

		QTF-GIT re-test		Total
		Positif	Négatif	
QTF-GIT test	Positif	24	0	24
	Négatif	2	4	6
Total		26	4	30

*Le *cut-off* pour un QTF positif était $INF-\gamma \geq 0,35UI/mL$

Deux discordances ont été observées. Le coefficient kappa de Cohen donne $k=0,76$ soit un bon accord entre test et re-test dans des conditions de répétabilité.

ii. Répétabilité quantitative

Les coefficients de variation, calculés à partir de chaque doublon, sont très élevés, allant de 0% à 88,39%.

La représentation de la dispersion des valeurs autour de la médiane dans un diagramme de Bland et Altman donne une idée de la dispersion des valeurs (**Figure 17.**).

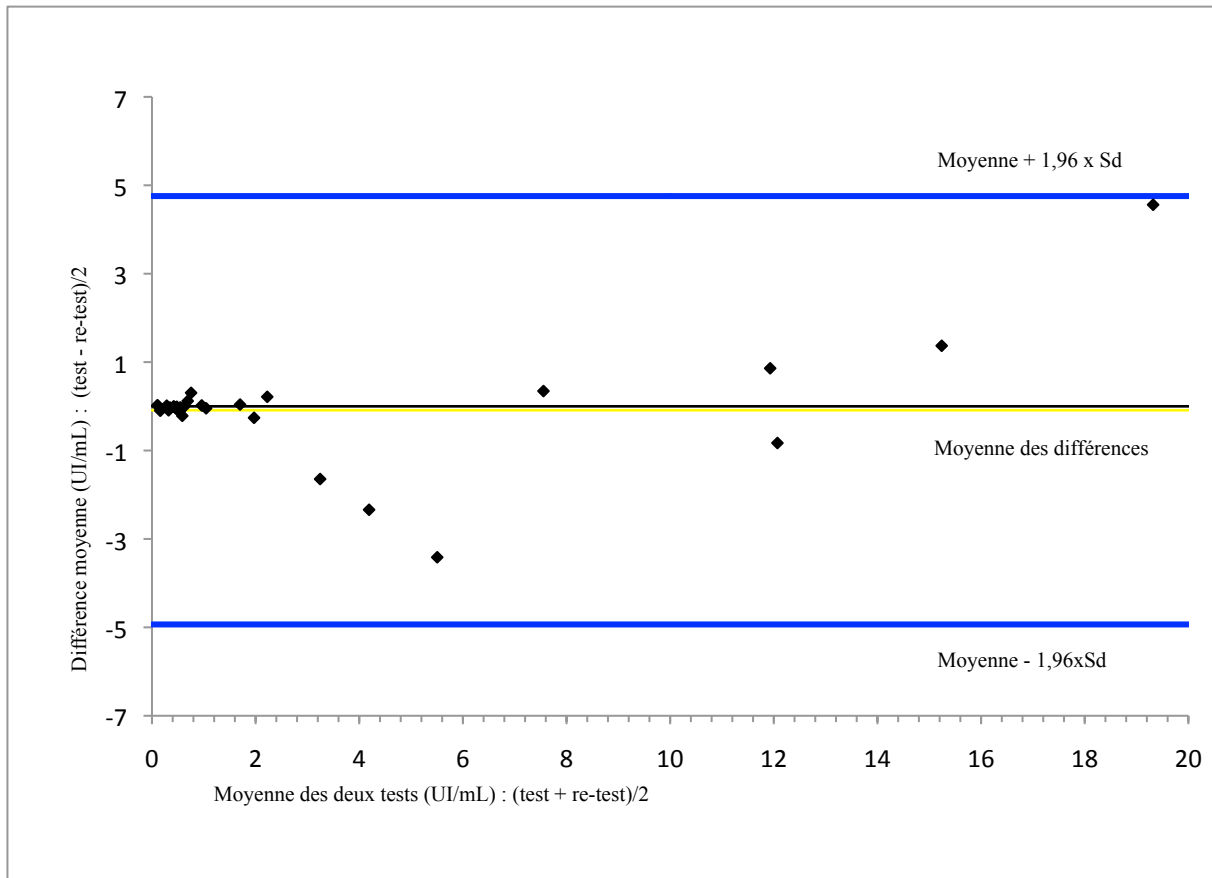


Figure 17. Répétabilité quantitative : diagramme de Bland et Altman. Ce diagramme montre les moyennes de différences (UI/mL) par échantillon entre les tests et re-test sdu QTF-GIT par rapport à la moyenne des différences. Les lignes bleues montrent les limites de l'intervalle de confiance à 95% de la moyenne des différences et la ligne jaune, la valeur moyenne de la différence. La ligne noire est la ligne de zéro.

g. Conclusion

La moyenne des différences entre test et re-test est proche de 0 (-0,089 UI/mL, IC95% -4,96 à 4,75 UI/mL), soit une moyenne des différences entre test et re-test non différente de zéro (p= 0,84), mais présentant un écart-type important.

Toutes les variables de la phase pré-analytique que nous avons étudiées nous permettent de conclure:

- **qu'un délai de 16h à température ambiante, avant stimulation lymphocytaire, et ceci quel que soit le statut positif ou négatif du patient, est à l'origine de discordances, 5 sur 24 (soit 21%) dans notre série,**
- **par contre, on ne note aucun changement, que l'incubation soit de 16 ou 24h,**
- **que le meilleur cut-off reste 0,35UI/mL.**

2. *Etude des résultats du QTF-GIT dans le cadre de la recherche d'une tuberculose active*

Les caractéristiques principales de la population sont résumées dans le **Tableau 25** et la **Figure 18**.

a. Description de la population

Notre étude rétrospective comprend 482 patients pour lesquels une recherche de tuberculose par culture et un QTF-GIT ont été effectués en parallèle. Le sex-ratio H/F était de 1,24. Le pays de naissance était connu pour 468 patients, 349 patients en France, 118 à l'étranger dont 91 étaient nés dans un pays de forte endémie (Afrique et Amérique du Sud), soit 18,6% des patients étudiés. L'âge moyen était de 52 ans (36 ; 68). Le statut VIH était connu pour 351 patients, 34 étaient positifs (9,7% des patients dont la sérologie est connue), 317 étaient négatifs. L'état d'immunocompétence des patients était connu pour 53 patients, parmi eux, 21 étaient immunodéprimés. Vingt patients étaient connus pour des antécédents de tuberculose ou de contagement tuberculeux. Dans la majorité des cas, le statut vaccinal des patients n'était pas connu.

Les cultures de mycobactéries étaient positives pour 134 patients. Les cultures positives à mycobactéries du complexe *tuberculosis* concernaient 106 patients, 102 étaient dues à *M. tuberculosis*, 2 à *M. bovis*, 1 à *M. africanum* et 1 à *M. bovis* BCG.

Dans l'étude des résultats du QTF-GIT, *M. bovis* BCG n'a pas été pris en compte en raison de l'absence des antigènes mycobactériens testés avec le QTF-GIT.

Vingt huit cultures étaient positives pour une mycobactérie atypique (9 *M. intracellulare*, 8 *M. avium*, 3 *M. xenopi*, 2 *M. Kansasii*, 1 *M. chelonae*, 1 *M. gordonae*, 1 *M. abscessus*, 1 *M. lentiflavum*, 1 *M. marinum* et 1 *M. terrae*).

Parmi ces cultures, 3 (2 *M. tuberculosis* et 1 *M. intracellulare*) étaient positives avec une seule colonie (l'ED était négatif pour les 2 infections à *M. tuberculosis* et non effectué pour celle à *M. intracellulare*). Si l'on considère toutes les mycobactéries, 85 patients présentaient une localisation pulmonaire isolée et 49 patients une forme extra-pulmonaire (disséminée, ganglionnaire, urinaire, hépatique, méningée, osseuse, cutanée ou digestive). En ce qui concerne le complexe *tuberculosis*, 67 patients présentaient une forme pulmonaire et 35 une forme extra-pulmonaire.

Dans la population étudiée, les patients nés dans un pays de forte endémie présentaient plus souvent une tuberculose maladie (38 patients sur 91 soit 41,7%) que les patients nés dans un pays de faible endémie (63 patients sur 377 soit 16,7%).

Pour notre étude, nous avons pris en compte, dans l'évaluation de la sensibilité et de la spécificité, uniquement les bactéries du complexe *tuberculosis*. En effet c'est la réponse immunitaire à ces bactéries qui est recherchée.

Parmi les 105 patients présentant une tuberculose, 7 présentaient une sérologie VIH positive sur 92 renseignées soit 7,6%. Pour les 28 patients présentant une mycobactériose, 22 sérologies VIH étaient renseignées, 4 étaient porteurs du VIH, soit 18,2%.

Tableau 25. Caractéristiques de la population étudiée.

Homme/Femme	1,24
Age (années)	52 (Sd=19,79)
Pays de naissance de forte endémie de TB %	18,6
Infection par le VIH %	9,4
Antécédent de tuberculose + (nb de pts renseignés)	20

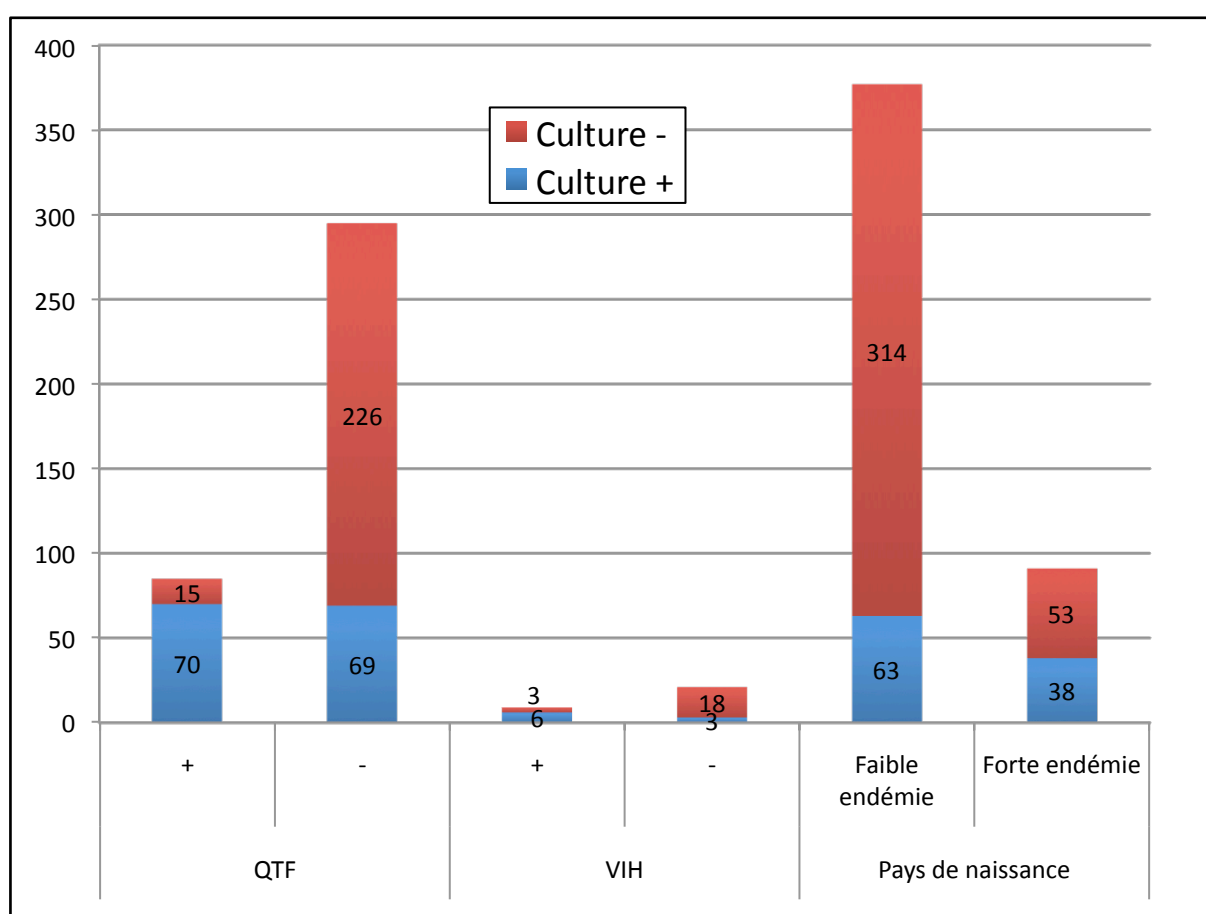


Figure 18. Effectifs en fonction de la culture, du VIH, du pays de naissance et du QTF-GIT.

b. Analyse des résultats des QTF-GIT

i. Généralités

Une recherche de mycobactérie et un QTF-GIT ont été réalisés en même temps pour 482 patients, 70 présentaient un résultat indéterminé (soit 14,5%) et ont été exclus de l'analyse de sensibilité et de spécificité. Cent quarante huit patients présentaient un QTF-GIT positif, parmi eux 74 avaient une culture positive à *M. tuberculosis*, 2 avaient une culture positive à *M. bovis*, 1 à *M. intracellulare*. Les 71 autres présentaient une culture négative. Parmi ces derniers, 10 avaient des antécédents d'infection à *M. tuberculosis*.

264 patients présentaient un QTF-GIT négatif, 18 avaient une culture positive à des mycobactéries exprimant des antigènes testés avec le QTF-GIT (15 à *M. tuberculosis*, 2 à *M. kansasii* et 1 à *M. marinum*). Les 2 patients présentant une BCGite présentaient un QTF-GIT négatif.

Parmi les 34 patients séropositifs pour le VIH, 6 présentaient un résultat indéterminé (soit 17,6%), 21 étaient négatifs et 7 positifs. Les patients séronégatifs pour le VIH et indéterminés pour le QTF-GIT étaient au nombre de 51 (soit 16%), les positifs 106 et les négatifs 160 sur un total de 317.

Pour les patients dont l'immunodépression est renseignée, parmi les non-immunodéprimés, 5 sont indéterminés (soit 15,6%), 19 sont négatifs et 8 sont positifs. Pour les immunodéprimés, 5 sont indéterminés (soit 23,8%), 13 sont négatifs et 3 sont positifs.

Parmi les patients présentant un antécédent de tuberculose, 10 présentaient un QTF-GIT positif (50%) et 10 un QTF-GIT négatif, aucun n'était indéterminé. Parmi les patients ne présentant pas d'antécédent de tuberculose connu, quand l'information était disponible, 6 présentaient un QTF-GIT positif et 36 un QTF-GIT négatif, 9 étaient indéterminés.

ii. Evaluation de la sensibilité et de la spécificité

1) *Complexe tuberculosis*

Le **Tableau 26** présente les résultats des QTF-GIT en fonction de la culture à bactérie du complexe *tuberculosis*.

		Culture (complexe <i>tuberculosis</i>)		
		Positive	Négative	Total
QTF-GIT	Positif	76	72	148
	Négatif	18	246	264
	Total	94	318	412

*Le *cut-off* pour un QTF positif était $\text{INF-}\gamma \geq 0,35\text{UI/mL}$

La sensibilité du QTF-GIT comparée à la culture de mycobactéries du complexe *tuberculosis* (excepté *M. bovis* BCG) était de 82,6% (IC95% 74,9-90,3). La concordance par rapport à la culture était de 78,1% avec un coefficient Kappa de 0,48 (modéré). La spécificité était de 76,9% (IC95% 72,3-81,5). La valeur prédictive négative était de 93,2% (IC95% 90,1-96,2) et la valeur prédictive positive de 51,3% (IC95% 43,3-59,4).

2) Complexe tuberculosis et VIH

Le **Tableau 27** présente, les résultats des QTF-GIT en fonction de la culture à bactérie du complexe *tuberculosis* chez les patients séropositifs.

		Culture (complexe <i>tuberculosis</i>)		
		Positive	Négative	Total
QTF-GIT	Positif	6	3	9
	Négatif	3	18	21
	Total	9	21	30

*Le *cut-off* pour un QTF positif était $\text{INF-}\gamma \geq 0,35\text{UI/mL}$

La sensibilité du QTF-GIT comparé à la culture du complexe *tuberculosis* chez les patients VIH était de 66,7% (IC95% 35,9-97,5) soit un agrément de 80% et un coefficient Kappa de 0.52 (modéré) par rapport à la culture. La spécificité était de 85,7% (IC95% 70,7-100). La valeur prédictive négative était de 85,7% (IC95% 70,7-100) et la valeur prédictive positive de 66,7% (IC95% 35,9-97,5).

La **Figure 19** résume les performances du test.

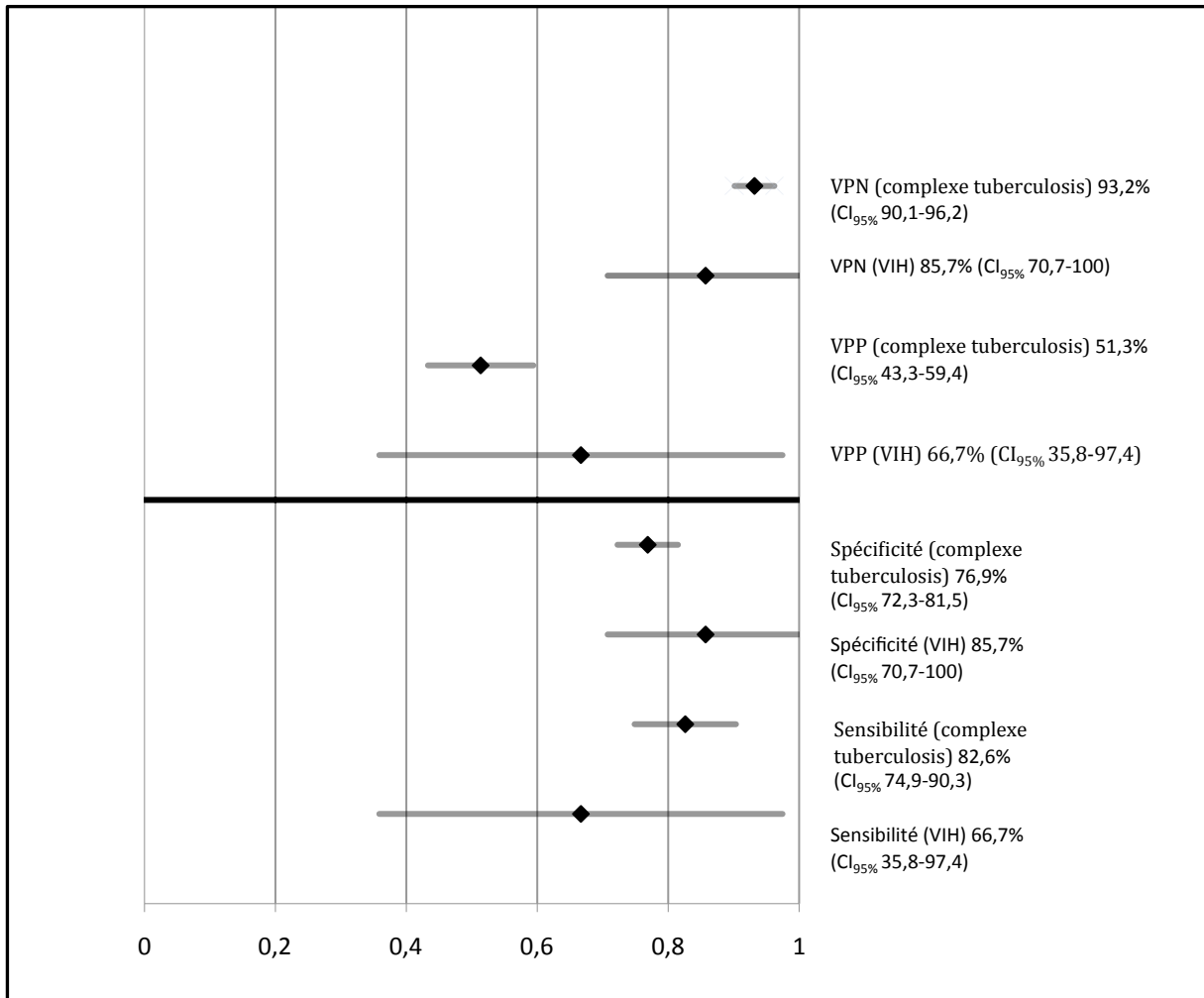


Figure 19. Récapitulatif des performances du QTF-GIT.

3) Résultats quantitatifs des QTF-GIT positifs en fonction de la culture.

Si l'on considère uniquement la quantité d'INF- γ sécrétée (UI/mL), les patients présentant un QTF-GIT positif et une culture négative ont des résultats quantitatifs significativement plus élevés par rapport au patient présentant une culture positive et un QTF-GIT positif ($p=0,0328$).

4) Tuberculose extra-pulmonaire

La sensibilité dans les tuberculoses pulmonaires était de 82,5% tandis que celle était de 77,4% dans les tuberculoses extra-pulmonaires.

iii. Influence du *cut-off* sur les performances du QTF-GIT

Si la valeur de 0,35 UI/mL du *cut-off*, dans l'étude de la phase pré-analytique, était correcte, il nous a paru intéressant d'étudier son impact sur la sensibilité et spécificité. Les résultats en fonction des différents *cut-off* sont exposés dans le **Tableau 28**.

	<i>Cuts-off</i>				
	0,2*	0,35*	0,5*	0,8*	0,2-0,5*
Sensibilité (%)	85,1	80,9	76,1	67,0	81,8
Spécificité (%)	72,9	76,9	77,3	79,0	76,3
VPP (%)	50,3	50,7	51,5	50,8	51,4
VPN (%)	93,8	93,2	91,1	88,1	93,8
Indéterminés (%)	14,5				19,5

*UI/mL

Logiquement, plus la valeur du *cut-off* augmente, plus la sensibilité baisse. Inversement, plus le *cut-off* augmente, plus la spécificité est grande. Néanmoins, le *cut-off* 0,2 offre une sensibilité de 85,1%, tandis que le *cut-off* à 0,8 donne une sensibilité de 67% soit environ 20% de moins. En même temps, cette forte augmentation de sensibilité vers un *cut-off* bas ne s'accompagne que d'une diminution modérée de la spécificité (de 76,3 à 72,9) et la VPP et la VPN varient peu.

Pour ce qui est de la création d'une zone grise (0,2-0,5 UI/mL), elle augmente la proportion de résultats intermédiaires (de 14,5% à 19,5%) et ne permet pas de gain important de sensibilité (de 80,9 à 81,8) ou de spécificité (de 76,9 à 76,3).

iv. Les mycobactéries atypiques

Dans notre étude, 3 patients présentaient des infections à mycobactéries qui possèdent les antigènes présents dans le QTF-GIT (*M. marinum* et *M. kansasii*). Aucun de ces 3 patients ne présentait un QTF-GIT positif. L'échantillon est trop petit pour une exploitation statistique. De plus, parmi les 25 autres mycobactéries atypiques, 1 un seul QTF-GIT était positif et 2 autres étaient indéterminés.

C. Discussion

1. Etude de la phase pré-analytique

a. Les conditions pré-analytiques

L'objectif de ce travail était l'étude des facteurs pouvant influencer les résultats du QTF-GIT. Il est donc nécessaire de rappeler les conditions techniques selon lesquelles ont été effectuées les manipulations, avant de discuter les résultats.

Concernant les variations de la phase pré-analytique, les prélèvements ont été effectués au même moment, par la même personne et le traitement des échantillons a été le même. Le dosage de l'INF- γ a été effectué dans le même laboratoire, avec le même kit de QTF-GIT, sur une même série et par le même opérateur. Ces précautions nous permettent de minimiser les variations qui pourraient être dues à autre chose que les variables pré-analytiques que nous testons, c'est à dire le temps d'incubation à l'étuve et le temps d'attente à température ambiante. La comparaison intra-patient nous permet de nous affranchir des biais systématiques sur la méthode. Néanmoins, des erreurs aléatoires, de pipetage, rinçage ou encore d'autres erreurs techniques dues au manipulateur ne sont pas exclues.

Notre étude montre sans surprise qu'il existe des différences qualitatives et quantitatives significatives lorsqu'il y a un délai avant incubation. Ces résultats indiquent qu'un traitement des échantillons dans le cadre des recommandations du fabricant peut mener à des résultats erronés (faux négatif).

Très peu d'études sont disponibles dans la littérature sur ce sujet. Cependant, deux études confirment nos résultats. Shanaube *et al* se sont intéressés aux variables qui pourraient altérer la fiabilité du QTF-GIT dans les pays en voie de développement. Ils ont testé l'influence des coupures de courant lors de l'incubation. Leurs résultats donnent des sécrétions d'INF- γ significativement plus faibles malgré un temps total d'incubation de 24h. De plus, un délai de 24h avant mise à l'étuve change le résultat pour 22,9% des patients (25/109) (175). Une autre étude s'est intéressée à la manipulation des échantillons avant stimulation lymphocytaire. Cette étude a montré une différence significative de sécrétion d'INF- γ pour le QTF-GIT dès la 2ème heure, à température ambiante, avant mise à l'étuve. Ces variations étaient encore plus importantes avec le TB-Spot (176).

Dès lors que le délai d'incubation diminue la quantité d'INF- γ sécrétée, il est probable que la sensibilité soit sous-estimée. Il faut remarquer que les discordances qualitatives observées concernent, pour la plupart (4 sujets/5) des échantillons présentant un taux d'INF- γ proche du *cut-off*. La sensibilité du QTF-GIT devrait donc être supérieure si les conditions d'analyses respectaient un temps d'attente court avant l'incubation.

Tous les échantillons présentant un « taux réel » compris entre 0,35UI/mL et 1UI/mL pourraient être concernés. Dans notre étude rétrospective sur la sensibilité du test, la proportion de patients présentant des QTF-GIT répondant à ces critères est d'environ 7%. Il est probable que cette proportion soit sous-estimée, justement en raison des faux négatifs.

Un des sujets discordant illustre parfaitement ces résultats (Id#21), avec un taux d'INF- γ très supérieur à 1 UI/L à 0/24H (2,44 UI/L) et négatif après 16h à température ambiante. Cette patiente présentait une tuberculose clinique, mais non confirmée par culture.

La raison de la diminution de sécrétion d'INF- γ , lorsqu'il y a un délai avant incubation, n'est pas connue. Les lymphocytes pourraient être anergiques ou lysés. Il existe des tests permettant d'explorer la viabilité des cellules, comme la méthode au bleu de tryptan ou des composés fluorescents qui marquent uniquement les cellules lysées ou anergiques comme le CFSE (*intracellular covalent coupling dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*). Ces méthodes pourraient être mises en œuvre dans les conditions expérimentales du QTF-GIT pour déterminer si la raison de la diminution de sécrétion est due à une mort cellulaire prématurée ou à l'anergie des lymphocytes.

Ces méthodes pourraient aussi être appliquées dans le cadre du TB-Spot. En effet, les tests sur la phase pré-analytique du TB-Spot trouvent des variations encore plus importantes que pour le QTF-GIT (176).

La très grande discordance observée pour le dernier échantillon (Id#21) pourrait être expliquée par une activation lymphocytaire importante liée à une stimulation importante du système immunitaire. Cette activation pourrait provoquer une sénescence prématurée des lymphocytes (177) et donc une diminution de sécrétion d'INF- γ .

Il existe donc une variabilité connue depuis 2005 et maintenant confirmée, non prise en compte par le fabricant. Cette variabilité pourrait être aisément explorée et permettrait peut-être d'augmenter la sensibilité du test.

De plus, notre étude montre aussi qu'il n'y a pas de différence significative, qualitativement et quantitativement, entre 16 et 24h d'incubation. Cependant, aucune étude n'a été publiée sur ce sujet.

En conclusion :

- **le délai avant incubation est un facteur critique de la phase pré-analytique, il influence la sensibilité dans une mesure qui reste à définir,**
- **la phase d'incubation n'a pas d'influence sur les résultats, aux seuils testés (p=0,05).**

b. Répétabilité

i. Qualitative

D'un point de vue qualitatif, dans notre étude, l'accord (coefficient kappa de Cohen) est bon entre les tests et re-tests. Deux résultats sont discordants sur 30 dosages. Ces 2 résultats étaient très proches du *cut-off*. Les échantillons re-testés étant tous des échantillons positifs, ou faiblement positifs, issus de l'étude de la phase pré-analytique, la sélection de patient proche du *cut-off* introduit un biais qui surestime les variations. Il est probable que l'accord soit en fait bien plus important, la proportion d'échantillons proches du *cut-off* étant beaucoup plus rare dans la population générale.

La répétabilité et la reproductibilité du QTF-GIT ont été peu étudiées. Veerapathan *et al.* (172) ont exploré la reproductibilité à court terme chez des professionnels de santé, ainsi que la répétabilité sur le même échantillon. Les participants ont été testés 4 fois, à J0, J3, J9 et J12, à chaque fois le test ELISA était répété sur le même spécimen. La reproductibilité qualitative à court terme (J0, J3, J9 et J12) des tests était très bonne avec une concordance de 96,4% et un coefficient kappa de 0,91. La répétabilité qualitative sur les échantillons re-testés était très bonne : sur 56 échantillons provenant de 14 patients, seuls deux étaient discordants, soit une concordance de 96,4% (et kappa=0,94). Ces discordances étaient observées quand les sujets présentaient une valeur autour du *cut-off*. La reproductibilité intra-patient à court terme était modérée: si les résultats négatifs variaient peu, les résultats positifs présentaient une grande variabilité.

Une autre étude sud-africaine récente a aussi montré une très bonne reproductibilité à court terme (évolution de la valeur du QTF-GIT dans le temps) ainsi qu'une très bonne reproductibilité (tests et re-tests) (kappa=0,93) (178).

ii. Quantitative

D'un point de vue quantitatif, les coefficients de variation de nos résultats montrent des variations très importantes. Ceci peut être dû, d'une part à des erreurs de laboratoire, mais aussi au fait que les mesures ont été effectuées 2 fois, renforçant l'erreur sur la moyenne de chaque mesure.

Pour les erreurs de manipulations, il est probable que des mesures correctives sur les conditions de réalisation du test permettraient d'améliorer sensiblement la répétabilité. De telles améliorations ont déjà été rapportées avec le QTF-GIT (179). Dans cette étude, les auteurs se sont intéressés aux étapes critiques de la méthode ELISA et ont mis en place des mesures correctives comme la remise en question des étapes de la procédure de dosage, le contrôle des machines, ou encore l'élaboration de listes de contrôles aux étapes clés. La variabilité intra-patient, après correction, était significativement réduite ($p < 0,0001$).

En conclusion:

- **La répétabilité qualitative est bonne, malgré un biais dans la sélection de nos échantillons,**
- **La répétabilité quantitative est médiocre, des mesures correctives devraient permettre de l'améliorer sensiblement.**

c. Evaluation des *cut-offs*

Le *cut-off* a été fixé à 0,35UI/mL par le fabricant. Notre étude montre que cette valeur permet d'avoir le meilleur accord entre les différents temps de la phase pré-analytique testés. Le choix de ce *cut-off* semble donc judicieux d'un point de vue pré-analytique. Mais, aucune publication n'est disponible actuellement sur le sujet.

d. Indéterminés

Sur 23 sujets testés, un seul (soit 4,3%) présentait un résultat indéterminé pour un délai de 16h, alors qu'il était interprétable aux autres incubations. Le résultat était indéterminé en raison d'un manque de production d'INF- γ dans le tube contenant de la PHA.

Ce résultat peut être dû au délai avant incubation, à des erreurs techniques, ou à un problème au moment du prélèvement (volume) ou encore à l'agitation des tubes avant incubation. Cependant, une augmentation de la proportion d'indéterminés a récemment été rapportée par Herrera *et al.* (180), en comparant une incubation immédiate et des incubations différées de 6h ou 12h. La proportion d'indéterminés trouvée était supérieure de 10% à 6h et de 17,1% à 12h par rapport à une incubation immédiate. Les résultats de notre étude sont plus faibles, d'autres investigations seraient nécessaires pour confirmer ou infirmer ces résultats.

2. Etude de l'intérêt du test dans le diagnostic des tuberculoses

a. Sensibilité du QTF-GIT

La sensibilité trouvée, si l'on considère uniquement le complexe *tuberculosis*, est de 82,6%, soit une sensibilité quasi-identique à celle retrouvée dans la méta-analyse de Diel *et al.* (157). La sensibilité est plus faible chez les porteurs du VIH (57,1%), mais cette dernière donnée doit être interprétée avec prudence, étant donné le faible échantillon de patients porteurs du VIH (7,6%).

La sensibilité modérée du test reflète la présence de faux négatifs. De la même façon qu'un IDR peut rester négatif dans la tuberculose maladie (181, 182), le QTF-GIT est parfois négatif lors d'une tuberculose maladie.

Certes, comme nous l'avons précédemment décrit, les erreurs techniques ou de manipulation existent mais ne suffisent pas à expliquer tous ces faux négatifs.

Une autre raison serait l'incapacité du système immunitaire à développer une réponse immune efficace. En effet, dans notre étude, les patients présentant un QTF-GIT positif sans tuberculose active (probables ITL anciennes) avaient des taux d'INF- γ supérieurs à ceux des patients malades ayant un QTF-GIT positif et étant malades ($p=0,0328$). Les patients qui ont un système immunitaire compétent et dont les lymphocytes sont capables de sécréter de l'INF- γ maîtriseraient l'infection, les autres développeraient une tuberculose maladie. Néanmoins, ce raisonnement ne serait valable que si la quantité d'INF- γ sécrétée était proportionnelle à la qualité de la réponse immune. Cela ne semble pas être le cas, en effet, une étude de Higuchi *et al.* (183) a montré que, dans le cadre d'ITL, lorsque le QTF-GIT est positif, plus la sécrétion d'INF- γ est importante, plus le risque de développer une tuberculose maladie est grand.

Ces résultats de sensibilité, dans le cadre d'une recherche de tuberculose active, doivent inciter le clinicien à la prudence en cas de QTF-GIT négatif. En effet cela n'exclut en rien la possibilité d'une tuberculose maladie, le résultat du QTF-GIT n'étant qu'un argument dans le contexte radio-clinico-biologique.

b. Spécificité du QTF-GIT

Un des avantages des QTF-GIT sur l'IDR est sa spécificité. En effet, il ne se positive pas en cas d'infection à *M. bovis* BCG et à mycobactéries atypiques autres que *M. kansasii* et *M. marinum*.

La spécificité trouvée dans notre étude est plus faible (76,9%) que celle de la méta-analyse de Diel *et al.* (157) (99,2%), ceci certainement en raison d'un biais introduit dans notre étude par la sélection des patients. La population étudiée étant une population « à risque » vis à vis de la tuberculose, la prévalence des ITL dans cette population est très probablement forte. Ces résultats sont concordants avec d'autres études comparables (184).

Les études de spécificité prises en compte dans la méta-analyse de Diel *et al.* étaient faites sur des populations sélectionnées pour leur faible risque d'exposition à *M. tuberculosis*, la différence observée n'est donc pas surprenante.

c. Tuberculose pulmonaire et extra-pulmonaire

Comme déjà rapporté (185), le QTF-GIT présente une bonne sensibilité dans les tuberculoses extra-pulmonaires, bien supérieure à celle de l'IDR. Nos résultats sont comparables à ceux décrits dans la littérature.

d. Indéterminés

Les indéterminés représentaient 14,5% des échantillons. Cette proportion est beaucoup plus importante que dans l'étude de Diel *et al.* (2,14%) (157), mais comparable à celle retrouvée dans d'autres études (169, 184).

Cette différence avec l'étude de Diel *et al.* pourrait être due à un biais dans la sélection de la population, à des erreurs, à des problèmes techniques (186) ou encore au délai avant stimulation lymphocytaire.

En ce qui concerne la population, les patients inclus dans notre étude étaient tous sélectionnés en raison d'une suspicion de tuberculose. Un des diagnostics différentiels de la tuberculose est la sarcoïdose. En cas de sarcoïdose, il existe souvent une anergie tuberculique. Cette anergie aurait pu expliquer une partie de l'augmentation des

indéterminés, mais la proportion de QTF-GIT indéterminé n'est pas plus forte en cas de sarcoïdose (187).

D'autres formes d'immunodépression sont probablement à l'origine de cette forte proportion comme déjà montré (184). La totalité des patients inclus dans l'étude étaient hospitalisés, et donc à fort risque d'immunodépression. Nous ne possédons des informations sur l'état immunitaire que pour une petite partie de la population étudiée (21 patients sur 33 renseignés). Parmi ces patients immunodéprimés, 28,3% présentent un résultat indéterminé.

Enfin, une autre cause d'augmentation pourrait être un délai avant incubation trop long comme montré récemment (186, 188).

e. Cut-offs

La démarche du fabricant de fixer un *cut-off* à 0,35 UI/mL permet d'obtenir une très bonne spécificité. Néanmoins, dans le cadre d'une recherche de tuberculose maladie, ce *cut-off* ne permet pas d'optimiser les performances du test. En effet, dans notre étude, une baisse du *cut-off* à 0,2UI/mL par rapport à 0,35UI/mL, permet d'augmenter la sensibilité (de 80,9 à 85,1%) avec peu d'incidence sur la spécificité de (de 76,9 à 72,9%). Ces résultats sont concordants avec d'autres études qui retrouvent une augmentation de sensibilité sans perte significative de spécificité avec des *cut-off* faibles (189, 190).

De plus, Veerapathran *et al.* (172) proposent une zone grise (0,2 – 0,5UI/mL). La mise en place d'une zone grise, dans notre étude, ne permet pas d'améliorer les performances, et conduit à un très grand nombre de résultats pour lesquels on ne pourra pas déterminer s'il s'agit d'un positif ou d'un négatif (environ 5% de la population étudiée). Cette solution semble donc inappropriée.

Il serait nécessaire de réévaluer les performances QTF-GIT en utilisant un *cut-off* différent et en respectant un temps d'attente avant mise à l'étuve faible (<2h).

Conclusion

Le kit QuantiFERON-Gold In Tube est vendu avec des recommandations concernant le délai maximum toléré entre le prélèvement et la stimulation lymphocytaire, la durée de stimulation lymphocytaire, et un cut-off pour déterminer la positivité du test.

Notre étude montre que le délai d'attente avant stimulation lymphocytaire peut mener à une interprétation faussement négative du test. Or il n'est pas rare que dans un hôpital, ou une clinique, les tubes, une fois prélevés, restent plusieurs heures à température ambiante avant de parvenir au laboratoire. Ceci est d'autant plus vrai lorsque les analyses sont sous-traitées par un laboratoire délocalisé, qui n'a aucun renseignement sur la phase pré-analytique. La recommandation serait donc de réaliser le prélèvement du QTF-GIT impérativement dans le laboratoire qui fait la stimulation lymphocytaire et qui incuberait, sans délai, le prélèvement.

Par contre notre étude confirme que la durée d'incubation, dans le cadre des recommandations du fabricant, n'a pas d'influence sur les résultats.

L'étude du QTF-GIT dans le diagnostic des tuberculoses nous a permis de trouver une sensibilité de 82,6%. Ce taux un peu faible, pourrait être attribué à des faux négatifs liés à une phase pré-analytique (délai de 16h à température ambiante) et un *cut-off* mal adaptés.

Si le *cut-off* à 0,35UI/mL est très correct dans le cadre du pré-analytique, il ne permet pas d'optimiser les performances pour la sensibilité, dans le diagnostic de tuberculose maladie. Un *cut-off* de 0,2UI/mL semblerait mieux adapté. Cependant, ces données devraient être confirmées par un nombre plus important de tests et un groupe contrôle mieux adapté.

Bibliographie

1. W. H. O. WHO. Global Tuberculosis Control 2009: Epidemiology, Strategy, Financing. Geneva: WHO. 2009.
2. D. Antoine, D. Che, . Les cas de tuberculose maladie déclarés en 2007. Institut de Veille Sanitaire, 2009, Bulletin épidémiologique hebdomadaire, 10-11, 69.
3. G. Panteix, *Précis de bactériologie clinique Texte imprimé*. (Eska, Paris, ed. 2nd ed., 2007), pp. 1 vol. (1764 - [7] de pl.).
4. H. Dutronc. Tuberculose. La Revue du Praticien, 2009, 3, 20/03/2009, 405
5. O. immunotech. www.oxfordimmunotec.com. 2010.
6. J. L. Flynn *et al.* Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity*, 1995, 2, 6, 561.
7. J. Keane *et al.* Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *N Engl J Med*, 2001, 345, 15, 1098.
8. R. S. Wallis, M. S. Broder, J. Y. Wong, M. E. Hanson, D. O. Beenhouwer. Granulomatous infectious diseases associated with tumor necrosis factor antagonists. *Clin Infect Dis*, 2004, 38, 9, 1261.
9. F. Denis, C. Perronne, *Mycobacterium tuberculosis et mycobactéries atypiques Texte imprimé*. Guides médi-bio (Elsevier, Paris, 2004), pp. 298 dont 8 de pl. en coul.
10. N. V. Hung, D. N. Sy, R. M. Anthony, F. G. Cobelens, D. van Soolingen. Fluorescence microscopy for tuberculosis diagnosis. *Lancet Infect Dis*, 2007, 7, 4, 238.
11. S. Greco, E. Girardi, A. Navarra, C. Saltini. Current evidence on diagnostic accuracy of commercially based nucleic acid amplification tests for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Thorax*, 2006, 61, 9, 783.
12. L. L. Flores, M. Pai, J. M. Colford, Jr., L. W. Riley. In-house nucleic acid amplification tests for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum specimens: meta-analysis and meta-regression. *BMC Microbiol*, 2005, 5, 55.
13. A. Bafica *et al.* TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med*, 2005, 202, 12, 1715.
14. C. M. Fremond *et al.* Fatal *Mycobacterium tuberculosis* infection despite adaptive immune response in the absence of MyD88. *J Clin Invest*, 2004, 114, 12, 1790.
15. K. Bhatt, P. Salgame. Host innate immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Immunol*, 2007, 27, 4, 347.
16. P. Ulrichts, F. Peelman, R. Beyaert, J. Tavernier. MAPPIT analysis of TLR adaptor complexes. *FEBS Lett*, 2007, 581, 4, 629.
17. S. A. Fulton *et al.* Inhibition of major histocompatibility complex II expression and antigen processing in murine alveolar macrophages by *Mycobacterium bovis* BCG and the 19-kilodalton mycobacterial lipoprotein. *Infect Immun*, 2004, 72, 4, 2101.
18. R. K. Pai, M. Convery, T. A. Hamilton, W. H. Boom, C. V. Harding. Inhibition of IFN-gamma-induced class II transactivator expression by a 19-kDa lipoprotein from *Mycobacterium tuberculosis*: a potential mechanism for immune evasion. *J Immunol*, 2003, 171, 1, 175.
19. E. Z. Kincaid *et al.* Codominance of TLR2-dependent and TLR2-independent modulation of MHC class II in *Mycobacterium tuberculosis* infection *in vivo*. *J Immunol*, 2007, 179, 5, 3187.

20. P. T. Liu, S. Stenger, D. H. Tang, R. L. Modlin. Cutting edge: vitamin D-mediated human antimicrobial activity against *Mycobacterium tuberculosis* is dependent on the induction of cathelicidin. *J Immunol*, 2007, 179, 4, 2060.
21. P. T. Liu *et al.* Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science*, 2006, 311, 5768, 1770.
22. S. E. Ewald *et al.* The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor. *Nature*, 2008, 456, 7222, 658.
23. D. S. Korb, B. E. Schneider, U. E. Schaible. Innate immunity in tuberculosis: myths and truth. *Microbes Infect*, 2008, 10, 9, 995.
24. L. Franchi, N. Warner, K. Viani, G. Nunez. Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol Rev*, 2009, 227, 1, 106.
25. N. Inohara, G. Nunez. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol*, 2003, 3, 5, 371.
26. S. Gandotra, S. Jang, P. J. Murray, P. Salgame, S. Ehrt. Nucleotide-binding oligomerization domain protein 2-deficient mice control infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*, 2007, 75, 11, 5127.
27. L. Franchi *et al.* Intracellular NOD-like receptors in innate immunity, infection and disease. *Cell Microbiol*, 2008, 10, 1, 1.
28. I. C. Koo *et al.* ESX-1-dependent cytolysis in lysosome secretion and inflammasome activation during mycobacterial infection. *Cell Microbiol*, 2008, 10, 9, 1866.
29. S. S. Master *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* prevents inflammasome activation. *Cell Host Microbe*, 2008, 3, 4, 224.
30. S. Ehlers. DC-SIGN and mannosylated surface structures of *Mycobacterium tuberculosis*: a deceptive liaison. *Eur J Cell Biol*, 2010, 89, 1, 95.
31. A. L. DeFranco, M. Robertson, R. M. Locksley, R. Cunin, *Immunité : la réponse immunitaire dans les maladies infectieuses et inflammatoires traduction de l'édition anglaise par Raymond Cunin révision scientifique de Pierre Masson.* (De Boeck, Bruxelles [Paris], 2009), pp. 1 vol. (XXIX-365).
32. E. Crouch, K. Hartshorn, I. Ofek. Collectins and pulmonary innate immunity. *Immunol Rev*, 2000, 173, 52.
33. L. F. Weikert *et al.* SP-A enhances uptake of bacillus Calmette-Guerin by macrophages through a specific SP-A receptor. *Am J Physiol*, 1997, 272, 5 Pt 1, L989.
34. Y. Kuroki, M. Takahashi, C. Nishitani. Pulmonary collectins in innate immunity of the lung. *Cell Microbiol*, 2007, 9, 8, 1871.
35. A. A. Beharka *et al.* Pulmonary surfactant protein A up-regulates activity of the mannose receptor, a pattern recognition receptor expressed on human macrophages. *J Immunol*, 2002, 169, 7, 3565.
36. R. Pasula, J. R. Wright, D. L. Kachel, W. J. Martin, 2nd. Surfactant protein A suppresses reactive nitrogen intermediates by alveolar macrophages in response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Invest*, 1999, 103, 4, 483.
37. J. F. Downing, R. Pasula, J. R. Wright, H. L. Twigg, 3rd, W. J. Martin, 2nd. Surfactant protein a promotes attachment of *Mycobacterium tuberculosis* to alveolar macrophages during infection with human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92, 11, 4848.
38. C. D. Gaynor, F. X. McCormack, D. R. Voelker, S. E. McGowan, L. S. Schlesinger. Pulmonary surfactant protein A mediates enhanced phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* by a direct interaction with human macrophages. *J Immunol*, 1995, 155, 11, 5343.

39. J. S. Ferguson, D. R. Voelker, F. X. McCormack, L. S. Schlesinger. Surfactant protein D binds to *Mycobacterium tuberculosis* bacilli and lipoarabinomannan via carbohydrate-lectin interactions resulting in reduced phagocytosis of the bacteria by macrophages. *J Immunol*, 1999, 163, 1, 312.
40. P. B. Kang *et al.* The human macrophage mannose receptor directs *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis. *J Exp Med*, 2005, 202, 7, 987.
41. J. Nigou, C. Zelle-Rieser, M. Gilleron, M. Thurnher, G. Puzo. Mannosylated lipoarabinomannans inhibit IL-12 production by human dendritic cells: evidence for a negative signal delivered through the mannose receptor. *J Immunol*, 2001, 166, 12, 7477.
42. P. Verdu *et al.* Evolutionary insights into the high worldwide prevalence of MBL2 deficiency alleles. *Hum Mol Genet*, 2006, 15, 17, 2650.
43. G. D. Brown. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat Rev Immunol*, 2006, 6, 1, 33.
44. L. S. Schlesinger, C. G. Bellinger-Kawahara, N. R. Payne, M. A. Horwitz. Phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by human monocyte complement receptors and complement component C3. *J Immunol*, 1990, 144, 7, 2771.
45. M. A. Arnaout. Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18. *Blood*, 1990, 75, 5, 1037.
46. J. S. Schorey, M. C. Carroll, E. J. Brown. A macrophage invasion mechanism of pathogenic mycobacteria. *Science*, 1997, 277, 5329, 1091.
47. C. Hu, T. Mayadas-Norton, K. Tanaka, J. Chan, P. Salgame. *Mycobacterium tuberculosis* infection in complement receptor 3-deficient mice. *J Immunol*, 2000, 165, 5, 2596.
48. O. Neyrolles *et al.* Is adipose tissue a place for *Mycobacterium tuberculosis* persistence? *PLoS One*, 2006, 1, e43.
49. S. Zimmerli, S. Edwards, J. D. Ernst. Selective receptor blockade during phagocytosis does not alter the survival and growth of *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1996, 15, 6, 760.
50. J. Gatfield, J. Pieters. Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages. *Science*, 2000, 288, 5471, 1647.
51. I. Vergne, J. Chua, V. Deretic. *Mycobacterium tuberculosis* phagosome maturation arrest: selective targeting of PI3P-dependent membrane trafficking. *Traffic*, 2003, 4, 9, 600.
52. M. T. Saleh, J. T. Belisle. Secretion of an acid phosphatase (SapM) by *Mycobacterium tuberculosis* that is similar to eukaryotic acid phosphatases. *J Bacteriol*, 2000, 182, 23, 6850.
53. A. Walburger *et al.* Protein kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages. *Science*, 2004, 304, 5678, 1800.
54. R. Jayachandran *et al.* Survival of mycobacteria in macrophages is mediated by coronin 1-dependent activation of calcineurin. *Cell*, 2007, 130, 1, 37.
55. H. Bach, K. G. Papavinasasundaram, D. Wong, Z. Hmama, Y. Av-Gay. *Mycobacterium tuberculosis* virulence is mediated by PtpA dephosphorylation of human vacuolar protein sorting 33B. *Cell Host Microbe*, 2008, 3, 5, 316.
56. T. Tan, W. L. Lee, D. C. Alexander, S. Grinstein, J. Liu. The ESAT-6/CFP-10 secretion system of *Mycobacterium marinum* modulates phagosome maturation. *Cell Microbiol*, 2006, 8, 9, 1417.

57. N. van der Wel *et al.* *M. tuberculosis* and *M. leprae* translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. *Cell*, 2007, 129, 7, 1287.
58. K. Bedard, K. H. Krause. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*, 2007, 87, 1, 245.
59. C. Nathan, M. U. Shiloh. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97, 16, 8841.
60. J. S. Beckman, T. W. Beckman, J. Chen, P. A. Marshall, B. A. Freeman. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990, 87, 4, 1620.
61. S. Ehrt, D. Schnappinger. Mycobacterial survival strategies in the phagosome: defence against host stresses. *Cell Microbiol*, 2009, 11, 8, 1170.
62. J. Chan, Y. Xing, R. S. Magliozzo, B. R. Bloom. Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J Exp Med*, 1992, 175, 4, 1111.
63. J. Chan, K. Tanaka, D. Carroll, J. Flynn, B. R. Bloom. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on murine infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*, 1995, 63, 2, 736.
64. J. D. MacMicking *et al.* Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94, 10, 5243.
65. S. Nicholson *et al.* Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. *J Exp Med*, 1996, 183, 5, 2293.
66. K. A. Rockett *et al.* 1,25-Dihydroxyvitamin D3 induces nitric oxide synthase and suppresses growth of *Mycobacterium tuberculosis* in a human macrophage-like cell line. *Infect Immun*, 1998, 66, 11, 5314.
67. S. Thoma-Uszynski *et al.* Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors. *Science*, 2001, 291, 5508, 1544.
68. K. Honer zu Bentrup, D. G. Russell. Mycobacterial persistence: adaptation to a changing environment. *Trends Microbiol*, 2001, 9, 12, 597.
69. M. Buettner *et al.* Inverse correlation of maturity and antibacterial activity in human dendritic cells. *J Immunol*, 2005, 174, 7, 4203.
70. J. Banchereau, R. M. Steinman. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 1998, 392, 6673, 245.
71. L. Tailleux *et al.* DC-SIGN is the major *Mycobacterium tuberculosis* receptor on human dendritic cells. *J Exp Med*, 2003, 197, 1, 121.
72. T. B. Geijtenbeek *et al.* Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *J Exp Med*, 2003, 197, 1, 7.
73. S. Tsuji *et al.* Maturation of human dendritic cells by cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin: involvement of toll-like receptors. *Infect Immun*, 2000, 68, 12, 6883.
74. N. Dulphy *et al.* Intermediate maturation of *Mycobacterium tuberculosis* LAM-activated human dendritic cells. *Cell Microbiol*, 2007, 9, 6, 1412.
75. S. Mariotti *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* subverts the differentiation of human monocytes into dendritic cells. *Eur J Immunol*, 2002, 32, 11, 3050.
76. N. Mohagheghpour, A. van Vollenhoven, J. Goodman, L. E. Bermudez. Interaction of *Mycobacterium avium* with human monocyte-derived dendritic cells. *Infect Immun*, 2000, 68, 10, 5824.
77. S. P. Hickman, J. Chan, P. Salgame. *Mycobacterium tuberculosis* induces differential cytokine production from dendritic cells and macrophages with divergent effects on naive T cell polarization. *J Immunol*, 2002, 168, 9, 4636.

78. A. J. Wolf *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* infects dendritic cells with high frequency and impairs their function in vivo. *J Immunol*, 2007, 179, 4, 2509.
79. T. P. Ashford, K. R. Porter. Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes. *J Cell Biol*, 1962, 12, 198.
80. M. G. Gutierrez *et al.* Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. *Cell*, 2004, 119, 6, 753.
81. J. Harris *et al.* T helper 2 cytokines inhibit autophagic control of intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunity*, 2007, 27, 3, 505.
82. Y. Xu *et al.* Toll-like receptor 4 is a sensor for autophagy associated with innate immunity. *Immunity*, 2007, 27, 1, 135.
83. C. S. Shi, J. H. Kehrl. MyD88 and Trif target Beclin 1 to trigger autophagy in macrophages. *J Biol Chem*, 2008, 283, 48, 33175.
84. M. A. Delgado, R. A. Elmaoued, A. S. Davis, G. Kyei, V. Deretic. Toll-like receptors control autophagy. *EMBO J*, 2008, 27, 7, 1110.
85. V. Deretic *et al.* Autophagy in immunity against *mycobacterium tuberculosis*: a model system to dissect immunological roles of autophagy. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2009, 335, 169.
86. M. Zasloff. Fighting infections with vitamin D. *Nat Med*, 2006, 12, 4, 388.
87. J. C. Carmen, A. P. Sinai. Suicide prevention: disruption of apoptotic pathways by protozoan parasites. *Mol Microbiol*, 2007, 64, 4, 904.
88. M. S. Keckler. Dodging the CTL response: viral evasion of Fas and granzyme induced apoptosis. *Front Biosci*, 2007, 12, 725.
89. F. Winau *et al.* Apoptotic vesicles crossprime CD8 T cells and protect against tuberculosis. *Immunity*, 2006, 24, 1, 105.
90. V. Briken, J. L. Miller. Living on the edge: inhibition of host cell apoptosis by *Mycobacterium tuberculosis*. *Future Microbiol*, 2008, 3, 415.
91. L. Danelishvili, J. McGarvey, Y. J. Li, L. E. Bermudez. *Mycobacterium tuberculosis* infection causes different levels of apoptosis and necrosis in human macrophages and alveolar epithelial cells. *Cell Microbiol*, 2003, 5, 9, 649.
92. D. Chaussabel *et al.* Unique gene expression profiles of human macrophages and dendritic cells to phylogenetically distinct parasites. *Blood*, 2003, 102, 2, 672.
93. K. Velmurugan *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* nuoG is a virulence gene that inhibits apoptosis of infected host cells. *PLoS Pathog*, 2007, 3, 7, e110.
94. J. Hinchey *et al.* Enhanced priming of adaptive immunity by a proapoptotic mutant of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Invest*, 2007, 117, 8, 2279.
95. D. Jayakumar, W. R. Jacobs, Jr., S. Narayanan. Protein kinase E of *Mycobacterium tuberculosis* has a role in the nitric oxide stress response and apoptosis in a human macrophage model of infection. *Cell Microbiol*, 2008, 10, 2, 365.
96. M. Oddo *et al.* Fas ligand-induced apoptosis of infected human macrophages reduces the viability of intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*, 1998, 160, 11, 5448.
97. C. Loeuillet *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* subverts innate immunity to evade specific effectors. *J Immunol*, 2006, 177, 9, 6245.
98. C. Fratazzi *et al.* Macrophage apoptosis in mycobacterial infections. *J Leukoc Biol*, 1999, 66, 5, 763.
99. D. Maiti, A. Bhattacharyya, J. Basu. Lipoarabinomannan from *Mycobacterium tuberculosis* promotes macrophage survival by phosphorylating Bad through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J Biol Chem*, 2001, 276, 1, 329.
100. H. Ibelgaufts. CD1. www.CopeWithCytokine.de, 2002.

101. A. Baena, S. A. Porcelli. Evasion and subversion of antigen presentation by *Mycobacterium tuberculosis*. *Tissue Antigens*, 2009, 74, 3, 189.
102. E. H. Noss *et al.* Toll-like receptor 2-dependent inhibition of macrophage class II MHC expression and antigen processing by 19-kDa lipoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*, 2001, 167, 2, 910.
103. K. Sendide *et al.* *Mycobacterium bovis* BCG attenuates surface expression of mature class II molecules through IL-10-dependent inhibition of cathepsin S. *J Immunol*, 2005, 175, 8, 5324.
104. M. Denis. Interleukin-12 (IL-12) augments cytolytic activity of natural killer cells toward *Mycobacterium tuberculosis*-infected human monocytes. *Cell Immunol*, 1994, 156, 2, 529.
105. R. Vankayalapati *et al.* The Nkp46 receptor contributes to NK cell lysis of mononuclear phagocytes infected with an intracellular bacterium. *J Immunol*, 2002, 168, 7, 3451.
106. A. C. Millman, M. Salman, Y. K. Dayaram, N. D. Connell, V. Venketaraman. Natural killer cells, glutathione, cytokines, and innate immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Interferon Cytokine Res*, 2008, 28, 3, 153.
107. S. Roy *et al.* NK cells lyse T regulatory cells that expand in response to an intracellular pathogen. *J Immunol*, 2008, 180, 3, 1729.
108. F. Gerosa *et al.* Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med*, 2002, 195, 3, 327.
109. P. Schierloh *et al.* NK cell activity in tuberculosis is associated with impaired CD11a and ICAM-1 expression: a regulatory role of monocytes in NK activation. *Immunology*, 2005, 116, 4, 541.
110. P. Schierloh *et al.* *Mycobacterium tuberculosis*-induced gamma interferon production by natural killer cells requires cross talk with antigen-presenting cells involving Toll-like receptors 2 and 4 and the mannose receptor in tuberculous pleurisy. *Infect Immun*, 2007, 75, 11, 5325.
111. M. Kulpraneet *et al.* Cytokine production in NK and NKT cells from *Mycobacterium tuberculosis* infected patients. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 2007, 38, 2, 370.
112. A. P. Junqueira-Kipnis *et al.* NK cells respond to pulmonary infection with *Mycobacterium tuberculosis*, but play a minimal role in protection. *J Immunol*, 2003, 171, 11, 6039.
113. C. G. Feng *et al.* NK cell-derived IFN-gamma differentially regulates innate resistance and neutrophil response in T cell-deficient hosts infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*, 2006, 177, 10, 7086.
114. I. M. Orme. The kinetics of emergence and loss of mediator T lymphocytes acquired in response to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*, 1987, 138, 1, 293.
115. A. A. Chackerian, J. M. Alt, T. V. Perera, C. C. Dascher, S. M. Behar. Dissemination of *Mycobacterium tuberculosis* is influenced by host factors and precedes the initiation of T-cell immunity. *Infect Immun*, 2002, 70, 8, 4501.
116. W. W. Reiley *et al.* ESAT-6-specific CD4 T cell responses to aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection are initiated in the mediastinal lymph nodes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105, 31, 10961.
117. A. J. Wolf *et al.* Initiation of the adaptive immune response to *Mycobacterium tuberculosis* depends on antigen production in the local lymph node, not the lungs. *J Exp Med*, 2008, 205, 1, 105.

118. A. M. Cooper. Cell-mediated immune responses in tuberculosis. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27, 393.
119. W. Xia, C. E. Pinto, R. L. Kradin. The antigen-presenting activities of Ia⁺ dendritic cells shift dynamically from lung to lymph node after an airway challenge with soluble antigen. *J Exp Med*, 1995, 181, 4, 1275.
120. P. G. Holt, S. Haining, D. J. Nelson, J. D. Sedgwick. Origin and steady-state turnover of class II MHC-bearing dendritic cells in the epithelium of the conducting airways. *J Immunol*, 1994, 153, 1, 256.
121. C. von Garnier *et al.* Anatomical location determines the distribution and function of dendritic cells and other APCs in the respiratory tract. *J Immunol*, 2005, 175, 3, 1609.
122. A. M. Cooper, A. Solache, S. A. Khader. Interleukin-12 and tuberculosis: an old story revisited. *Curr Opin Immunol*, 2007, 19, 4, 441.
123. P. F. Barnes, A. B. Bloch, P. T. Davidson, D. E. Snider, Jr. Tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med*, 1991, 324, 23, 1644.
124. P. A. Darrah *et al.* Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major*. *Nat Med*, 2007, 13, 7, 843.
125. J. L. Flynn, M. M. Goldstein, K. J. Triebold, B. Koller, B. R. Bloom. Major histocompatibility complex class I-restricted T cells are required for resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, 89, 24, 12013.
126. J. S. Woodworth, S. M. Behar. *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD8⁺ T cells and their role in immunity. *Crit Rev Immunol*, 2006, 26, 4, 317.
127. U. E. Schaible, H. L. Collins, F. Priem, S. H. Kaufmann. Correction of the iron overload defect in beta-2-microglobulin knockout mice by lactoferrin abolishes their increased susceptibility to tuberculosis. *J Exp Med*, 2002, 196, 11, 1507.
128. M. S. Rolph *et al.* MHC class Ia-restricted T cells partially account for beta2-microglobulin-dependent resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Immunol*, 2001, 31, 6, 1944.
129. R. J. North, Y. J. Jung. Immunity to tuberculosis. *Annu Rev Immunol*, 2004, 22, 599.
130. R. Dudani, K. Murali-Krishna, L. Krishnan, S. Sad. IFN-gamma induces the erosion of preexisting CD8 T cell memory during infection with a heterologous intracellular bacterium. *J Immunol*, 2008, 181, 3, 1700.
131. C. G. Feng *et al.* The immunity-related GTPase Irgm1 promotes the expansion of activated CD4⁺ T cell populations by preventing interferon-gamma-induced cell death. *Nat Immunol*, 2008, 9, 11, 1279.
132. J. L. Gansert *et al.* Human NKT cells express granulysin and exhibit antimycobacterial activity. *J Immunol*, 2003, 170, 6, 3154.
133. S. A. Khader, A. M. Cooper. IL-23 and IL-17 in tuberculosis. *Cytokine*, 2008, 41, 2, 79.
134. S. A. Khader *et al.* IL-23 compensates for the absence of IL-12p70 and is essential for the IL-17 response during tuberculosis but is dispensable for protection and antigen-specific IFN-gamma responses if IL-12p70 is available. *J Immunol*, 2005, 175, 2, 788.
135. E. Lockhart, A. M. Green, J. L. Flynn. IL-17 production is dominated by gammadelta T cells rather than CD4 T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol*, 2006, 177, 7, 4662.
136. J. L. Taylor *et al.* Pulmonary necrosis resulting from DNA vaccination against tuberculosis. *Infect Immun*, 2003, 71, 4, 2192.

137. E. Ferrero *et al.* Macrophages exposed to *Mycobacterium tuberculosis* release chemokines able to recruit selected leucocyte subpopulations: focus on gammadelta cells. *Immunology*, 2003, 108, 3, 365.
138. M. E. Munk, A. J. Gatrill, S. H. Kaufmann. Target cell lysis and IL-2 secretion by gamma/delta T lymphocytes after activation with bacteria. *J Immunol*, 1990, 145, 8, 2434.
139. Z. W. Chen. Immune regulation of gammadelta T cell responses in mycobacterial infections. *Clin Immunol*, 2005, 116, 3, 202.
140. J. P. Scott-Browne *et al.* Expansion and function of Foxp3-expressing T regulatory cells during tuberculosis. *J Exp Med*, 2007, 204, 9, 2159.
141. M. A. Koch *et al.* The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nat Immunol*, 2009, 10, 6, 595.
142. C. Garlanda *et al.* Damping excessive inflammation and tissue damage in *Mycobacterium tuberculosis* infection by Toll IL-1 receptor 8/single Ig IL-1-related receptor, a negative regulator of IL-1/TLR signaling. *J Immunol*, 2007, 179, 5, 3119.
143. M. Divangahi *et al.* Critical negative regulation of type 1 T cell immunity and immunopathology by signaling adaptor DAP12 during intracellular infection. *J Immunol*, 2007, 179, 6, 4015.
144. L. Goldsack, J. R. Kirman. Half-truths and selective memory: Interferon gamma, CD4(+) T cells and protective memory against tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*, 2007, 87, 6, 465.
145. I. Orme. Mechanisms underlying the increased susceptibility of aged mice to tuberculosis. *Nutr Rev*, 1995, 53, 4 Pt 2, S35.
146. D. Elias, H. Akuffo, S. Britton. PPD induced in vitro interferon gamma production is not a reliable correlate of protection against *Mycobacterium tuberculosis*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2005, 99, 5, 363.
147. P. R. Rogers, C. Dubey, S. L. Swain. Qualitative changes accompany memory T cell generation: faster, more effective responses at lower doses of antigen. *J Immunol*, 2000, 164, 5, 2338.
148. X. Li, K. K. McKinstry, S. L. Swain, D. K. Dalton. IFN-gamma acts directly on activated CD4+ T cells during mycobacterial infection to promote apoptosis by inducing components of the intracellular apoptosis machinery and by inducing extracellular proapoptotic signals. *J Immunol*, 2007, 179, 2, 939.
149. C. Y. Wu *et al.* Distinct lineages of T(H)1 cells have differential capacities for memory cell generation in vivo. *Nat Immunol*, 2002, 3, 9, 852.
150. C. A. Scanga *et al.* Depletion of CD4(+) T cells causes reactivation of murine persistent tuberculosis despite continued expression of interferon gamma and nitric oxide synthase 2. *J Exp Med*, 2000, 192, 3, 347.
151. F. Sallusto, J. Geginat, A. Lanzavecchia. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol*, 2004, 22, 745.
152. F. Sallusto, D. Lenig, R. Forster, M. Lipp, A. Lanzavecchia. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, 1999, 401, 6754, 708.
153. L. J. Picker *et al.* Control of lymphocyte recirculation in man. II. Differential regulation of the cutaneous lymphocyte-associated antigen, a tissue-selective homing receptor for skin-homing T cells. *J Immunol*, 1993, 150, 3, 1122.

154. M. Vukmanovic-Stejic, J. R. Reed, K. E. Lacy, M. H. Rustin, A. N. Akbar. Mantoux Test as a model for a secondary immune response in humans. *Immunol Lett*, 2006, 107, 2, 93.
155. P. Schaerli *et al.* A skin-selective homing mechanism for human immune surveillance T cells. *J Exp Med*, 2004, 199, 9, 1265.
156. J. R. Reed *et al.* Telomere erosion in memory T cells induced by telomerase inhibition at the site of antigenic challenge in vivo. *J Exp Med*, 2004, 199, 10, 1433.
157. R. Diel, R. Loddenkemper, A. Nienhaus. Evidence-based comparison of commercial interferon-gamma release assays for detecting active TB: a metaanalysis. *Chest*, 2010, 137, 4, 952.
158. G. Kaplan, A. D. Luster, G. Hancock, Z. A. Cohn. The expression of a gamma interferon-induced protein (IP-10) in delayed immune responses in human skin. *J Exp Med*, 1987, 166, 4, 1098.
159. P. H. Lagrange, N. Simonney, J. L. Herrmann. [New immunological tests in the diagnosis of tuberculosis]. *Rev Mal Respir*, 2007, 24, 4 Pt 1, 453.
160. P. Andersen, M. E. Munk, J. M. Pollock, T. M. Doherty. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet*, 2000, 356, 9235, 1099.
161. S. M. Arend *et al.* Detection of active tuberculosis infection by T cell responses to early-secreted antigenic target 6-kDa protein and culture filtrate protein 10. *J Infect Dis*, 2000, 181, 5, 1850.
162. P. D. Johnson *et al.* Tuberculin-purified protein derivative-, MPT-64-, and ESAT-6-stimulated gamma interferon responses in medical students before and after *Mycobacterium bovis* BCG vaccination and in patients with tuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol*, 1999, 6, 6, 934.
163. S. M. Arend *et al.* Tuberculin skin testing and in vitro T cell responses to ESAT-6 and culture filtrate protein 10 after infection with *Mycobacterium marinum* or *M. kansasii*. *J Infect Dis*, 2002, 186, 12, 1797.
164. P. Tapaninen, A. Korhonen, L. Pusa, I. Seppala, T. Tuuminen. Effector memory T-cells dominate immune responses in tuberculosis treatment: antigen or bacteria persistence? *Int J Tuberc Lung Dis*, 2010, 14, 3, 347.
165. D. Verhoeven, J. R. Teijaro, D. L. Farber. Heterogeneous memory T cells in antiviral immunity and immunopathology. *Viral Immunol*, 2008, 21, 2, 99.
166. P. Bach-Nga *et al.* Test de détection de la production d'interferon gamma pour le diagnostic des infections tuberculeuses. HAS, 2006.
167. T. Mori. Usefulness of interferon-gamma release assays for diagnosing TB infection and problems with these assays. *J Infect Chemother*, 2009, 15, 3, 143.
168. G. Ferrara *et al.* Routine hospital use of a new commercial whole blood interferon-gamma assay for the diagnosis of tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005, 172, 5, 631.
169. G. Ferrara *et al.* Use in routine clinical practice of two commercial blood tests for diagnosis of infection with *Mycobacterium tuberculosis*: a prospective study. *Lancet*, 2006, 367, 9519, 1328.
170. O. Manuel *et al.* Comparison of quantiferon-TB gold with tuberculin skin test for detecting latent tuberculosis infection prior to liver transplantation. *Am J Transplant*, 2007, 7, 12, 2797.
171. K. Komiya *et al.* Impact of peripheral lymphocyte count on the sensitivity of 2 IFN-gamma release assays, QFT-G and ELISPOT, in patients with pulmonary tuberculosis. *Intern Med*, 2010, 49, 17, 1849.

172. A. Veerapathran *et al.* T-cell assays for tuberculosis infection: deriving cut-offs for conversions using reproducibility data. *PLoS One*, 2008, 3, 3, e1850.
173. N. Harada *et al.* [Basic characteristics of a novel diagnostic method (QuantiFERON TB-2G) for latent tuberculosis infection with the use of *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigens, ESAT-6 and CFP-10]. *Kekkaku*, 2004, 79, 12, 725.
174. M. Pai *et al.* Improving the estimation of tuberculosis infection prevalence using T-cell-based assay and mixture models. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2008, 12, 8, 895.
175. K. Shanaube *et al.* Intra-assay reliability and robustness of QuantiFERON(R)-TB Gold In-Tube test in Zambia. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2010, 14, 7, 828.
176. T. M. Doherty *et al.* Effect of sample handling on analysis of cytokine responses to *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples using ELISA, ELISPOT and quantitative PCR. *J Immunol Methods*, 2005, 298, 1-2, 129.
177. D. R. Green, D. W. Scott. Activation-induced apoptosis in lymphocytes. *Curr Opin Immunol*, 1994, 6, 3, 476.
178. A. K. Detjen *et al.* Short-term reproducibility of a commercial interferon gamma release assay. *Clin Vaccine Immunol*, 2009, 16, 8, 1170.
179. N. T. Hang *et al.* Quality assessment of an interferon-gamma release assay for tuberculosis infection in a resource-limited setting. *BMC Infect Dis*, 2009, 9, 66.
180. V. Herrera, E. Yeh, K. Murphy, J. Parsonnet, N. Banaei. Immediate incubation reduces indeterminate results for QuantiFERON-TB Gold in-tube assay. *J Clin Microbiol*, 2010, 48, 8, 2672.
181. J. C. Delgado *et al.* Antigen-specific and persistent tuberculin anergy in a cohort of pulmonary tuberculosis patients from rural Cambodia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99, 11, 7576.
182. A. O. Sousa *et al.* An epidemic of tuberculosis with a high rate of tuberculin anergy among a population previously unexposed to tuberculosis, the Yanomami Indians of the Brazilian Amazon. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94, 24, 13227.
183. K. Higuchi, N. Harada, K. Fukazawa, T. Mori. Relationship between whole-blood interferon-gamma responses and the risk of active tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*, 2008, 88, 3, 244.
184. Y. Kobashi *et al.* Clinical evaluation of QuantiFERON TB-2G test for immunocompromised patients. *Eur Respir J*, 2007, 30, 5, 945.
185. Y. Kobashi *et al.* Clinical utility of a T cell-based assay in the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. *Respirology*, 2009, 14, 2, 276.
186. C. Miranda, B. Yen-Lieberman, P. Terpeluk, J. W. Tomford, S. Gordon. Reducing the rates of indeterminate results of the QuantiFERON-TB Gold In-Tube test during routine preemployment screening for latent tuberculosis infection among healthcare personnel. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2009, 30, 3, 296.
187. C. Greib *et al.* Etude observationnelle du test quantiferon-TB gold au cours de la sarcoïdose. *La revue de médecine interne*, 2008, 20, S3.
188. M. Rutherford *et al.* Sensitivity of the quantiferon-gold in-tube assay in sputum smear positive TB cases in Indonesia. *PLoS One*, 2010, 5, 8, e12020.
189. A. Soysal *et al.* Evaluation of cut-off values of interferon-gamma-based assays in the diagnosis of *M. tuberculosis* infection. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2008, 12, 1, 50.
190. S. M. Arend *et al.* Comparison of two interferon-gamma assays and tuberculin skin test for tracing tuberculosis contacts. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007, 175, 6, 618.

TABLE DES MATIERES

Partie 1. La tuberculose et son diagnostic.....	12
A. Epidémiologie	13
1. La tuberculose dans le monde	13
2. La tuberculose en France	15
B. Taxonomie	16
C. Physiopathologie de l'infection tuberculeuse	16
D. Aspects cliniques de la tuberculose.....	18
1. La transmission.....	18
2. La primo-infection	18
3. La tuberculose pulmonaire	19
4. La tuberculose miliaire.....	20
5. Les formes extra pulmonaires.....	21
6. Tuberculose et traitement anti-TNF- α	21
E. Diagnostic direct	21
1. Le prélèvement	22
2. La paroi des mycobactéries.....	22
3. Préparation des échantillons.....	23
4. Examen direct	23
5. Culture.....	25
a. Les milieux solides.....	25
b. Milieux liquides.....	26
6. Méthodes d'amplification moléculaire appliquées au diagnostic direct	26
7. Identification des mycobactéries à partir de la culture.....	27
a. Identification du complexe <i>tuberculosis</i>	27
b. Diagnostic d'espèce au sein du complexe <i>tuberculosis</i>	28
8. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques: méthode des proportions	28
F. Le diagnostic indirect.....	29
1. La réponse immunitaire contre <i>M. tuberculosis</i>	29
2. Réponse immunitaire innée contre <i>M. tuberculosis</i>	30
a. Les récepteurs de l'immunité innée.....	31
i. Les récepteurs senseurs de danger	32
1) Les <i>Toll like receptor</i>	32
2) Les récepteurs de type NOD	34
(a) NLR-C	34
(b) NLR-P	34
ii. Les récepteurs d'adhésion à <i>M. tuberculosis</i>	35
1) Les lectines de type C.....	35
(a) <i>Dendritic cell-specific intracellular adhesion molecule 3 grabbing non integrin</i> (DC-SIGN)	35
(b) Protéines du surfactant pulmonaire (Collectines).....	35
(c) Les récepteurs au mannose (RMs).....	36
(d) <i>Mannose binding lectin</i> (MBL).....	36
(e) <i>Dectin-1 et Dectin-2</i>	37
2) Les <i>complément receptor</i> (CR).....	37
3) Récepteurs scavengers	38
4) RFc gamma.....	38
5) Cholestérol.....	38
b. Mécanismes de survie de <i>M. tuberculosis</i> dans les phagocytes quiescents	39
i. Les macrophages non activés.....	39
ii. Inhibition de la fusion phagosome/lysosome	40
1) Inositol-3-phosphate	40

2)	PknG.....	40
3)	La coronine 1	40
4)	Protéine VPS33B	41
5)	<i>Early secretory antigenic target system</i>	41
6)	Dérivés instables de l'oxygène et dérivés instables de l'azote	41
iii.	Adaptation du métabolisme	42
c.	Les cellules dendritiques	43
d.	Les macrophages activés	45
i.	Autophagie	45
ii.	Vitamine D.....	46
iii.	L'apoptose.....	46
e.	Les DC matures.....	48
f.	Les <i>Natural Killer</i>	49
3.	La réponse Thymodépendante	50
a.	Les lymphocytes T CD4+.....	52
b.	Les lymphocytes T CD8+.....	53
c.	Les <i>Natural Killer T</i>	54
d.	Lymphocytes T helpers 17	54
e.	Les lymphocytes T gamma delta	54
f.	Régulation de la réponse T : les lymphocytes T régulateurs.....	55
g.	Les lymphocytes T mémoires	55
4.	Les méthodes de diagnostic indirect.....	57
a.	L'intradermo-réaction	57
i.	Mécanismes immunologiques.....	58
ii.	La tuberculine.....	60
iii.	Interprétation de l'IDR	61
iv.	Sensibilité et spécificité	63
b.	Les IGRA : QTF-GIT et TB-Spot.....	64
i.	Historique.....	64
1)	Validation des tests utilisant la mesure d'INF- γ in vitro.....	64
2)	Augmentation de la sensibilité de test in vitro.....	65
ii.	Mécanismes immunologiques	65
iii.	Le QuantiFERON-TB Gold In Tube	67
1)	Principe du test	67
2)	Interprétation	68
3)	Indications	69
iv.	Le TB-Spot	70
v.	Performance des IGRA.	73
1)	Evaluation de la sensibilité et de la spécificité des IGRA	73
(a)	Dans la tuberculose maladie.....	73
(b)	Dans la tuberculose infection	76
2)	Cut-off.....	76
3)	Performances analytiques du QTF-GIT	77
vi.	Perspectives	78

Partie 2. Le QuantiFERON-TB Gold In-Tube : Phase pré-analytique & Performance dans le diagnostic de la tuberculose	79
A. Matériels et méthodes	81
1. Etude de la phase pré-analytique du test QTF-GIT	81
a. Populations étudiées.....	81
b. Recueil des échantillons.....	81
c. Phase pré-analytique.....	82
d. Dosage de l'INF- γ	83
2. Etude de la répétabilité du QTF-GIT	84
3. Etude de la sensibilité et de la spécificité des infections à mycobactéries tuberculeuses et atypiques bactériologiquement documentées.....	84
4. Statistiques.....	85
B. Résultats	86
1. Etude de la phase pré-analytique des QTF-GIT	86
a. Caractéristiques de la population étudiée	86
b. Résultats.....	87
c. Comparaison des résultats qualitatifs des QTF-GIT.....	89
d. Comparaison des résultats quantitatifs des QTF-GIT.....	91
e. Influence du <i>cut-off</i> en fonction de la phase pré-analytique sur les résultats qualitatifs.....	99
f. Répétabilité.....	100
i. Répétabilité qualitative	101
ii. Répétabilité quantitative	102
g. Conclusion	103
2. Etude des résultats du QTF-GIT dans le cadre de la recherche d'une tuberculose active ..	104
a. Description de la population	104
b. Analyse des résultats des QTF-GIT	107
i. Généralités	107
ii. Evaluation de la sensibilité et spécificité.....	108
1) Complexe <i>tuberculosis</i>	108
2) Complexe <i>tuberculosis</i> et VIH	109
3) Résultats quantitatifs des QTF-GIT positifs en fonction de la culture.....	110
4) Tuberculose extra-pulmonaire	110
iii. Influence du <i>cut-off</i> sur les performances du QTF-GIT	111
iv. Les mycobactéries atypiques	111
C. Discussion	112
1. Etude de la phase pré-analytique	112
a. Les conditions pré-analytiques.....	112
b. Répétabilité.....	115
i. Qualitative.....	115
ii. Quantitative	115
c. Evaluation des <i>cut-off</i>	117
d. Indéterminés.....	117
2. Etude de l'intérêt du test dans le diagnostic des tuberculoses.....	118
a. Sensibilité du QTF-GIT	118
b. Spécificité du QTF-GIT	119
c. Tuberculose pulmonaire et extra-pulmonaire	119
d. Indéterminés.....	119
e. <i>Cut-off</i>	120

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1. Performances des tests de diagnostics indirects.....	75
Tableau 2. Temps d'incubations du QTF-GIT.....	82
Tableau 3. Tableau d'interprétation du QTF- GIT.....	83
Tableau 4. Résultats des QTF-GIT en fonction de la phase pré-analytique.....	87
Tableau 5. Concordance des résultats en fonction de la phase pré-analytique.....	99
Tableau 6. Accord entre les différentes incubations, estimé par le coefficient kappa de Cohen.....	90
Tableau 7. Tous les échantillons 0/24h-0/16h.....	91
Tableau 8. Sous-groupe des négatifs 0/24h-0/16h.....	91
Tableau 9. Sous-groupe des positifs et des discordants 0/24h - 0/16h.....	91
Tableau 10. Sous-groupe des discordants 0/24h - 0/16h.	92
Tableau 11. Sous-groupe des positifs 0/24h-0/16h.....	93
Tableau 12. Sous-groupe des positifs 0/24h-16/24h.....	93
Tableau 13. Sous-groupe des positifs 0/16h-16/24h.....	93
Tableau 14. Tous les échantillons 0/24h-16/24h.....	94
Tableau 15. Tous les échantillons 0/16h-16/24h.....	94
Tableau 16. Sous-groupe des négatifs 0/16h-16/24h.....	95
Tableau 17. Sous-groupe des négatifs 0/24h-16/24h.....	95
Tableau 18. Sous-groupe des positifs et des discordants 0/24h - 16/24h.....	96
Tableau 19. Sous-groupe des positifs et des discordants 0/16h-16/24h.....	96
Tableau 20. Sous-groupe des discordants 0/24h-16/24h.....	97
Tableau 21. Sous-groupe des discordants 0/16h-16/24h.....	97
Tableau 22. Concordance des résultats en fonction de l'incubation et du <i>cut-off</i>	99
Tableau 23. Répétabilité.....	100
Tableau 24. Concordance des test et re-tests du QTF-GIT.....	101
Tableau 25. Caractéristiques de la population étudiée.....	106
Tableau 26. QTI-GIT comparé à la culture (complexe <i>tuberculosis</i>).....	108
Tableau 27. QTI-GIT comparé à la culture chez les patients VIH.....	109
Tableau 28. Performance du QTF-GIT en fonction du <i>cut-off</i>	111

TABLE DES FIGURES

Figure 1. Estimation de la prévalence du VIH chez les nouveaux cas de tuberculose.....	14
Figure 2. Taux d'incidence de cas de tuberculose notifiée dans le monde.....	14
Figure 3. Mise à jour des données nationales de surveillance de la tuberculose, 2010, INVS.....	16
Figure 4. Radiographie pulmonaire montrant un tuberculome dans le poumon droit....	20
Figure 5. Coloration de Ziehl Neelsen, objectif X100.....	24
Figure 6. Coloration à l'auramine, objectif X25.....	25
Figure 7. Les récepteurs de l'immunité innée.....	31
Figure 8. Réponse immunitaire acquise.....	50
Figure 9. Diversité fonctionnelle des LT et des cellules mémoires.....	59
Figures 10 et 11. Interprétation de l'IDR.....	61, 62
Figure 12. Différence de populations lymphocytaires activées entre l'IDR et les IGRA.....	66
Figure 13. Réalisation du QTF-GIT.....	68
Figure 14. Diagramme synoptique d'interprétation du QTF-GIT.....	69
Figure 15. Réalisation du TB-Spot.....	71
Figure 16. Images typiques d'échantillons positif et négatif.....	71
Figure 17. Répétabilité quantitative : diagramme de Bland et Altman.....	102
Figure 18. Effectifs en fonction de la culture, du VIH, de l'ED, et du QTF-GIT.....	106
Figure 19. Récapitulatif des performances du QTF-GIT.....	110

SERMENT DE GALIEN

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes Condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

Résumé

Objectifs: De nouveaux tests de stimulation lymphocytaire utilisant la détection de l'interféron gamma ont été récemment commercialisés dans le cadre du diagnostic des infections à *Mycobacterium tuberculosis*. Il existe peu de données sur l'influence de la phase pré-analytique du test QuantiFERON-TB Gold In Tube (QTF-GIT), et le premier objectif de ce travail est l'étude des facteurs pré-analytiques pouvant influencer les résultats du test.

Le deuxième objectif de cette étude est l'utilisation du test dans le diagnostic de tuberculose maladie. Cette étude a été réalisée à partir des données du laboratoire de bactériologie de l'Hôpital Haut Lévêque (Bordeaux) de septembre 2005 à juin 2010.

Résultats: Le délai de 16h à température ambiante, avant stimulation lymphocytaire, est responsable de résultats erronés (21% de résultats discordants). Par contre, la durée de stimulation lymphocytaire, dans les limites fixées par le fabricant, n'a pas d'influence sur les résultats.

En ce qui concerne les performances du test dans le cadre du diagnostic de la tuberculose, la sensibilité trouvée est de 82,6% (IC95% 74,9-90,3) et la spécificité de 76,9% (IC95% 72,3-81,5). Cependant la diminution du *cut-off* de 0,35 à 0,2UI/mL permettrait d'améliorer la sensibilité sans perte notable de spécificité.

Conclusion: Ces données indiquent qu'il serait possible d'améliorer la sensibilité du QTF-GIT en modifiant les recommandations: diminution du délai à température ambiante et modification du *cut-off* pour le diagnostic de tuberculose.

Performances study for QuantiFERON-TB Gold In Tube : pre-analytical phase, repeatability, sensitivity, specificity.

Summary

Objectives : New lymphocyte stimulation tests, using detection of gamma interferon, have been recently put on the market for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* infections. There is few studies about the pre-analytical phase influence of QuantiFERON-TB Gold In Tube (QTF-GIT) test, and the first target for this study is to analyze how pre-analytical factors could affect the tests results.

The second target is the use of the test on the tuberculosis disease diagnosis. On this study we're using the data stored up from 2005,September to 2010,June by the bacteriological laboratory of hospital Haut Lévêque (Bordeaux, France).

Results : At room temperature the 16 hours delay, before lymphocyte stimulation, is responsible for incorrect results. On the other hand the duration of lymphocyte stimulation, within the limits set by the manufacturer, doesn't affect the results.

Regarding the test performances, as part of tuberculosis diagnosis, the sensitivity found was on 82.6% (95%CI 74.9 to 90.3) and specificity found was on 76.9% (95%CI 72.3 to 81.5). However the cut-off decrease from 0,35 to 0,2 IU/mL could improve the sensitivity without any specificity loss.

Conclusion : These data indicate that it would be possible to improve QTF-GIT's sensitivity with a modification of use regulations: decrease of room temperature delay, and cut-off change for tuberculosis diagnosis.

Discipline : Pharmacie – Spécialité Biologie Médicale

Mots clés : Tuberculose, IGRA, QuantiFERON-TB Gold In Tube, quantiféron, phase pré-analytique, spécificité, sensibilité.

Intitulé et adresse de l'unité : Université de Limoges, Faculté de Pharmacie, 2 rue du Docteur Marcland, 87025 LIMOGES Cedex