

Ministère de l'Enseignement
Supérieur et de la Recherche
Scientifique

République du Mali

Un Peuple - Un But - Une Foi

UNIVERSITÉ DES SCIENCES, DES TECHNIQUES ET DES
TECHNOLOGIES DE BAMAKO



FACULTÉ DE PHARMACIE



Année universitaire 2022- 2023

N° :

THESE

**ANALYSE DES FLUCTUATIONS
HORMONALES CHEZ LES PATIENTS
SOUS TRAITEMENT
ANTITUBERCULEUX AU MALI**

Présentée et soutenue publiquement le 09 octobre 2023

Devant la Faculté de Pharmacie

Par M. BEHINAN Gnapo Janvier Stephane

**Pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie
(DIPLÔME D'ETAT)**

JURY :

Président : Pr Mahamadou DIAKITE

Membres : Pr Issa KONATE

Dr Charles ARAMA

Directeur : Pr Djénéba Koumba DABITAO

LISTE DES MEMBRES DE L'ADMINISTRATION ET DU CORPS ENSEIGNANT À LA FACULTÉ DE PHARMACIE ANNÉE UNIVERSITAIRE 2022-2023

➤ ADMINISTRATION

Doyen : Boubacar TRAORE, Professeur

Vice-doyen : Sékou BAH, Maître de Conférences

Secrétaire principal : Seydou COULIBALY, Administrateur Civil

Agent comptable : Ismaël CISSE, Contrôleur des Finances.

➤ PROFESSEURS HONORAIRES

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Flabou	BOUGOUDOGO	Bactériologie-Virologie
2	Boubacar Sidiki	CISSE	Toxicologie
3	Bakary Mamadou	CISSE	Biochimie
4	Abdoulaye	DABO	Malacologie -Biologie animale
5	Daouda	DIALLO	Chimie Générale et Minérale
6	Mouctar	DIALLO	Parasitologie-mycologie
7	Souleymane	DIALLO	Bactériologie - Virologie
8	Kaourou	DOUCOURE	Physiologie humaine
9	Ousmane	DOUMBIA	Chimie thérapeutique
10	Boukassoum	HAÏDARA	Législation
11	Gaoussou	KANOUTE	Chimie analytique
12	Alou A.	KEÏTA	Galénique
13	Mamadou	KONE	Physiologie
14	Brehima	KOUMARE	Bactériologie/Virologie
15	Abdourahamane S.	MAÏGA	Parasitologie
16	Saïbou	MAÏCA	Législation
17	Elimane	MARIKO	Pharmacologie
18	Mahamadou	TRAORE	Génétique
19	Sékou Fantamadv	TRAORE	Zoologie
20	Yaya	COULIBALY	Législation

➤ **PROFESSFURS DECEDES**

N°	PRENOMS	NOMS	SPECIALITE
1	Mahamadou	CISSE	Biologie
2	Drissa	DIALLO	Pharmacognosie
3	Moussa	HARAMA	Chimie analytique
4	Mamadou	KOUMARE	Pharmacognosie
5	Moussa	SANOGO	Gestion pharmaceutique

➤ **DER: SCIENCES BIOLOGIQUES ET MÉDICALES**

1. PROFESSEUR/DIRECTEUR DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOMS	GRADE	SPECIALITE
1	Mounirou	BABY	Professeur	Hématologie
2	Mahamadou	DIAKITE	Professeur	Immunologie-Génétique
3	Alassane	DICKO	Professeur	Santé Publique
4	Abdoulaye	DJIMDE	Professeur	Parasitologie-Mycologie
5	Amagana	DOLO	Professeur	Parasitologie-Mycologie
6	Aldjouma	GUINDO	Professeur	Hématologie. Chef de DER
7	Akory Ag	IKNANE	Professeur	Santé Publique/Nutrition
8	Kassoum	KAYENTAO	Directeur de recherche	Santé publ./ Bio-statistique
9	Ousmane	KOITA	Professeur	Biologie moléculaire
10	Issaka	SAGARA	Directeur de recherche	Bio-statistique
11	Boubacar	TRAORE	Professeur	Parasitologie-Mycologie

2. MAITRE DE CONFERENCES/MAITRE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOMS	GRADE	SPECIALITE
1	Bourèma	KOURIBA	Maître de conférences	Immunologie
2	Almoustapha Issiaka	MAÏGA	Maître de recherche	Bactériologie-Virologie
3	Mahamadou S.	SISSOKO	Maître de recherche	Bio-statistique
4	Ousmane	TOURE	Maître de recherche	Santé Publiq/Santé environ.
5	Djibril Mamadou	COULIBALY	Maître de conférences	Biochimie clinique
6	Djénéba Koumba	DABITAO	Maître de conférences	Biologie moléculaire
7	Antoine	DARA	Maître de conférences	Biologie moléculaire
8	Souleymane	DAMA	Maître de conférences	Parasitologie - Mycologie
9	Laurent	DEMBELE	Maître de conférences	Biotechnologie microbienne

10	Seydina S. A.	DIAKITE	Maître de conférences	Immunologie
11	Fatou	DIAWARA	Maître de conférences	Epidémiologie
12	Ibrahima	GUINDO	Maître de conférences	Bactériologie Virologie
13	Amadou Birama	NIANGALY	Maître de conférences	Parasitologie – Mycologie
14	Fanta	SANGO	Maître de conférences	Santé publ/Santé commun.
15	Yéya dit Dadio	SARRO	Maître de conférences	Epidémiologie

3. MAITRE ASSISTANT/CHARGE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOMS	GRADE	SPECIALITE
1	Mohamed	AG BARAIKA	Maître-Assistant	Bactériologie-Virologie
2	Charles	ARAMA	Maître-Assistant	Immunologie
3	Boubacar Tiétiè	BISSAN	Maître-Assistant	Biologie clinique
4	Seydou Sassou	COULIBALY	Maître-Assistant	Biochimie Clinique
5	Klétigui Casimir	DEMBELE	Maître-Assistant	Biochimie Clinique
6	Yaya	GOITA	Maître-Assistant	Biochimie Clinique
7	Aminatou	KONE	Maître-Assistant	Biologie moléculaire
8	Birama Apho	LY	Maître-Assistant	Santé publique
9	Dinkorma	OUOLOGUEM	Maître-Assistant	Biologie Cellulaire

4. ASSISTANT/ATTACHE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOMS	GRADE	SPECIALITE
1	Djénéba	COULIBALY	Assistant	Nutrition/Diététique
2	Issa	DIARRA	Assistant	Immunologie
3	Merepen dit Agnès	GUINDO	Assistant	Immunologie
4	Falaye	KEITA	Attaché de Recherche	Santé Publique/Santé Environn.
5	N'Deye Lallah Nina	KOITE	Assistant	Nutrition
6	Djakaridia	TRAORE	Assitant	Hématologie

➤ **DER : SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

1. PROFESSEUR/DIRECTEUR DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIALITE
1	Rokia	SANOGO	Professeur	Pharmacognosie Chef de DER

2. MAITRE DE CONFERENCES/MAITRE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIALITE
1	Loséni	BENGALY	Maitre de Conférences	Pharmacie hospitalière
2	Mahamane	H AidARA	Maitre de Conférences	Pharmacognosie

3. MAITRE ASSISTANT/CHARGE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIALITE
1	Bakary Moussa	CISSE	Maitre-Assistant	Galénique
2	Issa	COULIBALY	Maitre-Assistant	Gestion
3	Balla Fatogoma	COULIBALY	Maitre-Assistant	Pharmacie hospitalière
4	Adama	DENOU	Maitre-Assistant	Pharmacognosie
5	Hamma Boubacar	MAÏGA	Maitre-Assistant	Galénique
6	Adiaratou	TOGOLA	Maitre-Assistant	pharmacognosie

4. ASSISTANT/ATTACHE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIALITE
1	Seydou Lahaye	COULIBALY	Assistant	Gestion pharmaceutique
2	Daouda Lassine	DEMBELE	Assistant	Pharmacognosie
3	Sékou	DOUMBIA	Assistant	Pharmacognosie
4	Assitan	KALOGA	Assistant	Législation
5	Ahmed	MAÏGA	Assistant	Législation
6	Aichata Ben Adam	MARIKO	Assistant	Galénique
7	Aboubacar	SANGHO	Assistant	Législation
8	Bourama	TRAORE	Assistant	Législation
9	Sylvestre	TRAORÉ	Assistant	Gestion pharmaceutique
10	Aminata Tiéba	TRAORE	Assistant	Pharmacie hospitalière

11	Mohamed dit Sarmove	TRAORE	Assistant	Pharmacie hospitalière
-----------	---------------------	--------	-----------	------------------------

➤ **DER : SCIENCES DU MEDICAMENT**

1. PROFESSEUR/DIRECTEUR DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIALITE
1	Sékou	BAH	Professeur	Pharmacologie
2	Benoit Yaranga	KOUMARE	Professeur	Chimie Analytique
3	Ababacar I.	MAÏGA	Professeur	Toxicologie

1. MAITRE DE CONFERENCES/MAITRE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIALITE
1	Tidiane	DIALLO	Maitre de Conférences	Toxicologie
2	Hamadoun Abba	TOURE	Maitre de Conférences	Bromatologie Chef de DER

2. MAITRE ASSISTANT/CHARGE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIALITE
1	Dominique Patomo	ARAMA	Maitre-Assistant	Pharmacie chimique
2	Mody	CISSE	Maitre-Assistant	Chimie thérapeutique
3	Ousmane	DEMBELE	Maitre-Assistant	Chimie thérapeutique
4	Madani	MARIKO	Maitre-Assistant	Chimie Analytique
5	Karim	TRAORE	Maître-Assistant	Pharmacologie

3. ASSISTANT/ATTACHE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIALITE
1	Mahamadou	BALLO	Assistant	Pharmacologie
2	Dalave Bernadette	COULIBALY	Assistant	Chimie analytique
3	Blaise	DACKOOU	Assistant	Chimie Analytique
4	Fatoumata	DAOU	Assistant	Pharmacologie
5	Abdourahamane	DIARA	Assistant	Toxicologie
6	Aiguerou dit Abdoulaye	GUINDO	Assistant	Pharmacologie
7	Mohamed El Béchir	NACO	Assistant	Chimie analytique

8	Mahamadou	TANDIA	Assistant	Chimie Analytique
9	Dougoutigui	TANGARA	Assistant	Chimie analytique

➤ **DER : SCIENCES FONDAMENTALES**

1. PROFESSEUR/DIRECTEUR DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIALITE
-	-	-	-	-

2. MAITRE DE CONFERENCES/MAITRE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIALITE
1	Lassana	DOUMBIA	Maitre de Conférences	Chimie appliquée
2	Abdoulaye	KANTE	Maitre de Conférences	Anatomie
3	Boubacar	YALCOUYE	Maitre de Conférences	Chimie organique

3. MAITRE ASSISTANT/CHARGE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIALITE
1	Mamadou Lamine	DIARRA	Maitre-Assistant	Botanique-Biol. Végét Chef de DER
2	Boureima	KELLY	Maître-Assistant	Physiologie médicale

4. ASSISTANT/ATTACHE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIALITE
1	Seydou Simbo	DIAKITE	Assistant	Chimie organique
2	Modibo	DIALLO	Assistant	Génétique
3	Moussa	KONE	Assistant	Chimie Organique
4	Massiriba	KONE	Assistant	Biologie Entomologie

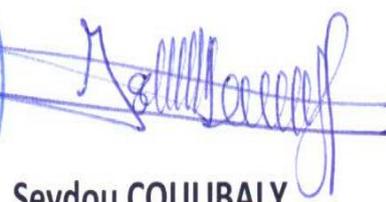
➤ **CHARGES DE COURS (VACATAIRES)**

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Cheick Oumar	BAGAYOKO	Informatique
2	Babou	BAH	Anatomie
3	Souleymane	COULIBALY	Psychologie
4	Yacouba M	COULIBALY	Droit commercial
5	Moussa I	DIARRA	Biophysique
6	Satigui	SIDIBÉ	Pharmacie vétérinaire
7	Sidi Boula	SISSOKO	Histologie-embryologie
8	Fana	TANGARA	Mathématiques
9	Djénébou	TRAORE	Sémiologie et Pathologie médicale
10	Mahamadou	TRAORE	Génétique
11	Boubacar	ZIBEÏROU	Physique

Bamako, le 22 juin 2023



**P/Le Doyen PO
Le Secrétaire Principal**


Seydou COULIBALY
Administrateur Civil

DEDICACES

Au Seigneur

Je tiens tout d'abord à remercier mon Seigneur sauveur Jésus-Christ pour son amour, sa bonté et sa grâce dans ma vie. Merci Seigneur de m'avoir mené sur cette terre malienne afin de réaliser mon rêve. Mon Seigneur durant ce cursus universitaire, tu m'as béni. Je n'ai manqué de rien ; quand j'avais faim tu m'as donné à manger, dans les difficultés tu as toujours été là, pour me fortifier. Mon père, tu as fait tellement de choses pour moi que je ne peux pas les énumérer. J'ai connu des étudiants qui ont eu au cours de l'année universitaire des problèmes mentaux, des problèmes financiers, d'autres ont connu l'hospitalisation, d'autres décédés de maladie, décédés par des accidents de la circulation. A moi tu m'as épargné ces choses, Ô Dieu ! comment ne pas être reconnaissant pour tout ce que tu as fait pour moi. Sois loué Seigneur. A toi l'Honneur, la Gloire, la Révérence, l'Autorité et la Puissance. Amen !!!

À mon père M. BEHINAN GNAPO BERNARD

Communément appelé au quartier « **le Boss** ». Un adage ivoirien dit ceci « **un homme au cœur blanc** ». Homme calme, doux, gentil, persévérant, patient, père des orphelins, quelqu'un qui est toujours prêt à aider son prochain tant qu'il le peut. Sachez que Papa, vous êtes depuis mon jeune âge un modèle. Je me souviens encore, comme si c'était hier lorsqu'en classe de CM2 je devais remplir un formulaire pour l'orientation au collège et où il était question de savoir quelle carrière nous voudrions embrasser dans l'avenir. Et ce jour-là mon choix s'est porté pour le lycée technique option comptabilité. Votre réaction m'a beaucoup marqué ; vous m'avez dit ceci « tous mes enfants ne seront pas salariés, il faut que d'autres fassent des affaires afin que nous nous entraisions ». Ainsi, inconsciemment sans me rendre compte que je serai un jour agent de santé ; j'ai opté pour la médecine comme tout enfant de mon âge à l'époque. Et arrivé en classe de terminal, ne sachant pas quoi faire après le baccalauréat, vous me faites savoir que je ferai la Pharmacie. J'ai accepté cette vision que le tout puissant vous a inspirée. Béni soit le jour où cette révélation vous a été donnée. Après quelques tentatives au pays, votre confiance en moi est toujours restée la même et vous avez accepté mon choix de venir au Mali pour essayer d'atteindre cet objectif. Voici père, vos prières et sacrifices ont payé. Vos conseils et encouragements m'ont permis de réaliser ce rêve. Mon vœu, père, c'est que le Seigneur vous donne la santé et une longue vie afin que vous puissiez profiter avec moi et tous les autres des biens que la vie m'accordera.

À ma mère

Que dire de celle-là même qui m'a porté pendant 9 mois dans son ventre, celle qui m'appelle affectueusement « **le boss** » ; ma maman **AGNISSAN AKOUA MARCELLINE**. Femme au bon cœur, qui ne manque pas d'aider les gens qui la sollicite lorsqu'elle a la possibilité ; qui est toujours prête à partager le peu qu'elle a avec les autres. Sachez que, maman, l'éducation particulière que vous m'avez donnée parmi vos garçons depuis mon très jeune âge a beaucoup impacté ma vie. Au fil des années j'ai compris que vous aviez vu en moi quelque chose de différent et en tant qu'une mère il vous fallait me former pour que je sois en mesure d'exploiter ce potentiel. Pardonnez-moi pour tout le mal que je vous ai fait Maman. C'est l'occasion pour moi de vous dédier spécialement ce travail, qui est pour ma part la meilleure des récompenses que je puisse vous offrir ; après toutes ces années auprès de vous. Qu'il puisse consoler votre cœur. Je prie le tout puissant afin qu'il vous accorde santé et longévité.

À mes mamans

DAGUI Adélaïde et YAGBA Germaine : ce document, vous méritez que je vous le dédie, en guise de reconnaissance pour tout ce que vous faites dans le secret. Sachez que je vous considère comme mes mamans durant tout ce temps. Je profite pour vous remercier pour votre soutien envers mon père. Merci pour vos prières et que le Seigneur vous accorde également, la santé et la longévité.

À mes frères et sœurs

GBOKO Agnissan Francis, BEHINAN Loué Arsène Fabrice, BEHINAN Nabe Suzy Flora, BEHINAN Kevin Hans, BEHINAN Saoua Naomie Esther : C'est une grâce d'avoir un père et une mère, mais avoir en plus d'eux des frères et sœurs, c'est une double grâce. Ce document je vous le dédie. Merci pour vos prières, votre soutien ; que le Seigneur vous le rende au centuple.

À GBOKO Kossia Anna et BEHINAN Ogue Audrey Guillemette

Je vous dis merci. Merci pour tout ce soutien apporté tout au long de ce parcours. Vous avez beaucoup fait pour moi que ce soit financièrement, moralement et spirituellement. Je n'oublierai pas ces efforts menés pour moi. Que le Seigneur vous bénisse, que sa paix soit sur vous, que l'œuvre de vos mains soit bénie, que votre foyer soit béni. Vraiment un grand merci mes grandes sœurs.

À BEGNENA Gaël Kanon

A la fois un cousin, un frère et un ami, tu mérites que je te dédie ce document. Merci pour tous ces moments passés ensemble. Sache que tu as été pour moi une source d'inspiration au niveau scolaire. Merci pour cette relation qu'on a pu garder jusqu'à aujourd'hui. Que le Seigneur te remplisse de sagesse et d'intelligence afin d'exceller dans tout ce que tu entreprends.

À mes cousins et cousines paternel et maternel

Je vous remercie pour tous ces moments merveilleux passés ensemble. Merci pour vos conseils, encouragements. Que le Seigneur vous bénisse et bénisse l'œuvre de vos mains.

À mes Tantes et Oncles (paternel et maternel)

Merci pour votre soutien que Dieu vous bénisse, qu'il vous comble de sa grâce.

À des personnes particulières :

TOURE Bouah Mory Adrien (Dagou)

Mon tuteur de la colline du point G, un ami devenu un frère, merci pour ta loyauté amicale. Nous avons passé d'excellents moments ensemble, je ne t'oublierai pas. Je te souhaite une excellente carrière professionnelle, que cet amour que tu as pour les personnes puisse toujours rester en toi. Que cette ambiance que tu mets au milieu des gens puisse rester en toi. Merci encore « **Bro** ».

Mahmoud CISSE

Mon « **biamiste** », mon élément du « **Ziguinchor** », du « **Kosso** », mon premier tuteur de Bamako. Dieu seul sait ce que nous avons enduré toutes ces années d'Abidjan jusqu'à Bamako. Merci pour tout.

SEMIYOU Lawani

Depuis le « **Kosso** », merci pour cette amitié gardée durant tout ce temps. Je te souhaite une excellente carrière professionnelle.

Dr YAO Josaphat Elie, Dr CISSE Adja Mayaka Raïssa, Dr TRAORE Dotianga (Igwé), Dr BOA Trevis, Dr SANOGO Abdoul Kader, Dr ARRA Frederic, Dr Anoh Serge, Dr YAO Serge Alexandre (Attô), Dr SORO Marie-Paule, Dr YEO Daniel, Feu TRAORE Alyoune Badara, COULIBALY Safiatou Emmanuella, KRAMA Binta, KONE Fatoumata, DIOMANDE Salimata, Armel GODE, TRA Oswald, YETINA Teki KASSARATE Mélinda, TOURE Fatoumata, KOUAME Souraley, BALLOU Philippe, IRIE Jonathan, KAKOU Alex, DIARRA Ali, ASSEMIAN Emmanuella, KARAMA Kathy, Tanoh Evelyne (Eva), VE Vérone ...

Vous êtes tellement nombreux que je ne peux tous vous lister ici. Ce document est pour moi une manière de vous montrer ma reconnaissance pour tout ce que vous avez fait pour moi.

Que Dieu vous bénisse.

Aux ami(e)s du pays et de la diaspora

Dr GOLI Corinne, Dr BAMBA Ilyas, KADJO Noël, Dr FAITAI Emmanuel, AKOUA Yao Didier, MEL Zacharie, Dr OUATTARA Nouhoum, Dr GNAGNE Daniel, DOBRI Dieudonné ...

Merci chers amis et collègues pour cette relation solide maintenue jusqu'aujourd'hui. Je vous souhaite une excellente carrière professionnelle.

A la 13^{ème} Promotion du numéris clausus (Promotion Pr MAMADOU KOUMARE)

Chers camarades, je vous remercie pour tous ces moments passés ensemble. Sachez que grâce à vous j'ai appris à me connaître et à me surpasser. Vous m'avez fait passer un séjour meilleur au Point G. Je vous souhaite une excellente carrière professionnelle. Vous resterez gravés dans ma mémoire.

Aux membres de l'Amicale des Etudiants Ivoiriens (AEI) du Point G

Ma chère communauté ; c'est le moment idéal pour vous montrer ma reconnaissance. Merci à vous pour votre accueil chaleureux, avec vous je me suis senti au pays. Merci pour toutes ces activités mises en place pour nous permettre de nous sentir à l'aise. Je tenais à remercier la section pédagogique de l'amicale ; merci chers pédagogues pour les sacrifices que vous faites pour assurer la pérennité de l'amicale. Sachez chers pédagogues, vous êtes le cœur de l'amicale, votre amour pour la réussite des étudiants de la communauté est à féliciter. Je profite de cette occasion pour vous remercier.

A tous mes jeunes du Point G

BADA Azo Aquilas, ZOHORE Elisée Jonathan (Bigui), KOUAME Cédric, DIABY Mohamed, GNAHO Fabrice (Le Cerveau), YAPO Jaurès, ZOUOGBO Jean Olivier, Sylvestre, AKA Elie, YEO Parfait, DIAWARA Souleymane, TRAORE Mawa, COULIBALY Hassane, KONE Fabrice, KOUAME Fulgence, SANGARE Sarah, ZRANGO Wilfried (ZK), TANGBA Herman, SOGODOGO Hamid, , SANGARE Kandjoura, GLAN Ivan, BAMBA Massa, CISSE Maïmouna, DEMBELE Ibrahim, DOUMBIA Indira, SEKONGO Maïmouna, YAO Sylvestre, TOGBA Olivia, KOUAME Emmanuel, SEKONGO Félicité, GOLI Rosine, DIABY Sandia, BOSSE Rebecca, OUEDRAOGO Justine, GROGBALE Michel-Ange, KOUAME Baudelaire ...

Je vous remercie pour tous les services rendus. Merci pour cette relation amicale et respectueuse. Je vous souhaite le bonheur.

REMERCIEMENTS

À ma directrice de thèse : Prof. Djénéba Koumba DABITAO

Je vous remercie de m'avoir fourni d'excellentes conditions de travail et d'avoir eu confiance en mes capacités tout au long de ces années. Merci pour votre disponibilité, pour tous les efforts consentis pour que je puisse me sentir à l'aise au sein de votre unité d'immunologie. Merci pour vos précieux conseils qui m'ont permis de réaliser ce travail. Je garderai à l'esprit votre rigueur et votre sens du travail bien fait. J'ai énormément appris avec vous, recevez mes sincères remerciements. Que Dieu vous renouvelle chaque matin, qu'il vous accorde santé, longévité, sagesse et prospérité.

À l'équipe ImmunoCore

COULIBALY Nadiè, Dr WAGUE Mamadou, Dr COULIBALY Mariam, Dr NANTOUME Ambadigné Mohamed, Dr KOLOMA Issac, Dr SOMBORO Amadou, Dr KONE Kadidia, PEROU Mamadou, COULIBALY Djénéba, DIARRA Hawa Boukary, CISSE Boubacar, SISSOKO Awa, DIABATE Drissa, SAMBA Sacko ; vous avez participé de près et de loin à la réalisation de ce travail, recevez mes sincères remerciements. Ce fut un moment merveilleux avec vous, j'ai été très marqué par votre hospitalité, par l'atmosphère joyeuse au sein de cette unité et par votre sens du travail en équipe. Je ne vous oublierai pas, vous serez toujours quelque part dans mon cœur. Mes vœux les meilleurs pour vous.

Au Personnel de l'UCRC

Mes remerciements à l'endroit de la direction d'avoir accepté ma demande de thèse au sein du laboratoire. Je tiens aussi à remercier tout le personnel de recherche (laboratoire et clinique) ainsi que le personnel administratif, pour toutes les aides qu'ils m'ont apportées. Mes remerciements particuliers à **Prof. DIARRA Bassirou, Prof. Yeya dit Sadio SARRO, Prof. KONE Amadou.**

À M. Djaz et famille

Merci pour votre hospitalité. Vous m'avez pris comme votre petit frère et je n'oublierai pas tous ces instants passés ensemble. Que Dieu bénisse votre foyer.

À M. DOUCOURE

Merci pour votre amour, votre gentillesse et votre douceur. Que Dieu vous bénisse et qu'il vous accorde longue vie.

Pharmacie de la polyclinique Pasteur

Un grand merci à toute l'équipe de la pharmacie. Un grand merci en particulier à **M. Bamba, Tantie Adélia, Dr N'DIAYE, Kanté**. Ces différents moments d'apprentissage au sein de la pharmacie m'ont beaucoup apporté sur le plan professionnel, merci pour vos conseils et considérations à mon égard.

À la famille KONATE

Ma famille de Bamako, je me permets de le dire car vous avez été pour moi une seconde famille. Je vous remercie pour votre hospitalité, pour l'amour que vous manifestez pour l'étranger et pour vos prières. Je ne vous oublierai pas. Un remerciement particulier à ma petite sœur **Ruth KONATE épouse MASSADA**, merci pour l'ambiance que tu mets quand nous sommes ensemble, que le Seigneur bénisse ton foyer. A **Jeanne KONATE (Dame de feu)**, merci pour cet atmosphère joyeux et paisible lorsque nous échangeons. Sache que je suis vraiment béni par tes encouragements et tes exhortations ; que le Seigneur te bénisse abondamment. Famille **KONATE** soyez bénis. Amen !!!

À la cellule ivoirienne des assemblées de Dieu d'hippodrome

Chers frères et sœurs en Christ, je vous remercie pour l'accueil et l'amour manifesté envers ma personne. Que le Seigneur se souvienne de vous et qu'il bénisse l'œuvre de vos mains. Amen !!!

À l'église les assemblées de Dieu (AD) d'hippodrome

Tout d'abord mes remerciements à l'endroit du premier responsable de l'église ; **Pasteur Mathieu Fousseyni COULIBALY**, je vous remercie pour le souci du salut des âmes. Merci pour l'amour manifesté pour l'œuvre du Seigneur. Je prie que le Seigneur vous renouvelle chaque matin et que sa grâce soit sur vous afin de le servir fidèlement. Merci à toute l'église pour l'accueil accordé et pour la confiance que vous avez eue en moi pour que je puisse occuper le poste de Secrétaire Général de la jeunesse. Mes remerciements particuliers au **bureau de la jeunesse**, à **Mr. Jochoua MASSADA, DJOUMA, Naomie DEMBELE, Amagana DOLO, Sarah, Henriette, NZAMBA Simonie, NDZENGUE Joann, KIKI Ludmilla, Mr Emmanuel KAYODE, Mr André, DIARRA Ibrim** merci pour vos conseils, votre confiance, votre amour et cette atmosphère joyeuse. Que le Seigneur bénisse son peuple.

Aux habitants de PANAM CITY (ma cour)

ADEGNIKA Cyrielle Rosemonde Déla, KONATE Madoussou, SIDIBE M’bombé Hawa, Chadrel (Charo), Hervé (Vétcho), Steve, Willy, Dr DJEUGOUE Stephane, Ismaël, Fanta (Ma fille), Deh (bailleur)...

Je vous remercie pour ces merveilleux moments passés ensemble. Je vous souhaite du bonheur dans votre future carrière professionnelle.

HOMMAGES AUX MEMBRES DU JURY

À notre Maître et Président du jury

Professeur Mahamadou DIAKITE

- **Professeur titulaire d'Immunologie et de Génétique ;**
- **Vice-recteur de l'USTTB ;**
- **Directeur scientifique adjoint du Centre Universitaire de Recherche Clinique (UCRC) de l'USTTB ;**
- **Responsable du laboratoire d'Immunogénétique et de Parasitologie au centre de recherche et de formation sur le paludisme (MRTC) ;**
- **Secrétaire Permanent du Comité d'Ethique de la FMOS/FAPH.**

Cher Maître,

Vous nous honorez en acceptant de présider ce jury de thèse. Nous vous remercions aussi pour la gentillesse et la spontanéité avec lesquelles vous nous avez accueillis. Nous vous prions, cher Maître, d'accepter dans ce travail le témoignage de notre haute considération, de notre profonde reconnaissance et de notre sincère respect.

À notre Maître et juge
Professeur Issa KONATE

- **Médecin spécialiste en maladies infectieuses et tropicales ;**
- **Diplômé interuniversitaire d'antibiologie et d'antibiothérapie en Afrique subsaharienne ;**
- **Maître de Conférences à la faculté de Médecine et d'Odontostomatologie ;**
- **Praticien hospitalier au centre hospitalier universitaire (CHU) du Point G ;**
- **Secrétaire administratif de la Société malienne des pathologies infectieuses et tropicales (SOMAPIT) ;**
- **Membre de la Société africaine des pathologies infectieuses (SAPI) ;**
- **Membre de la cellule assurance qualité de l'USTTB ;**
- **Membre du groupe de coordination multifactorielle de lutte contre les résistances aux antimicrobiens.**

Cher Maître,

Je vous prie de recevoir mes sincères remerciements pour avoir accepté de juger ce travail.

Veillez croire en l'expression de ma respectueuse considération.

À notre Maître et juge
Docteur Charles ARAMA

- **Docteur en Pharmacie ;**
- **Master en Immunologie ;**
- **PhD en Immunologie ;**
- **Maître-Assistant à la Faculté de Pharmacie ;**
- **Chercheur à l'unité d'immunologie cellulaire et moléculaire du parasite au MRTC/département d'épidémiologie des affections parasitaires (DEAP).**

Cher Maître,

C'est un privilège que vous nous accordez en acceptant de juger cette thèse, nous en sommes très honorés. Merci pour vos corrections et suggestions très utiles qui ont permis d'améliorer ce travail.

Trouvez ici, l'expression de nos sincères remerciements.

À notre Maître et directrice de thèse
Professeur Djénéba Koumba DABITAO

- **Docteur en Pharmacie ;**
- **Spécialiste en Biologie moléculaire et en Immunologie ;**
- **Maître de Conférences à la Faculté de Pharmacie ;**
- **Cheffe du laboratoire ImmunoCore de l'UCRC de l'USTTB.**

Cher Maître,

Nous vous remercions de nous avoir accompagné durant tout ce travail. Vos qualités intellectuelles, votre disponibilité, votre rigueur, votre amour pour le travail bien fait et vos qualités humaines font de vous un maître admirable et adorable. Nous avons été profondément touchés par votre rigueur scientifique et votre attention. C'est une fierté pour nous d'être compté parmi vos étudiants. C'est l'occasion pour nous de vous rendre un hommage mérité.

Veillez trouver ici, cher Maître, l'expression de notre profonde gratitude.

SIGLES ET ABBREVIATIONS

% : Pourcentage

°C : Degré Celsius

Ac : Anticorps

ADN : Acide désoxyribonucléique

Ag : Antigène

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

BAAR : Bacilles acido-alcool-résistants

BCG : Bacille de Calmette et Guérin

BD : Becton Dickinson

BK : Bacille de Koch

BSL : Biosafety Level (Niveau de Biosécurité)

Cat : Catalogue

CBA : Cytometric Bead Array (Réseau de billes cytométriques)

CD4+ : Cluster of Differentiation 4 (Classe de Différentiation 4)

CD8+ : Cluster of Differentiation 8 (Classe de Différentiation 8)

CDs : Cellules Dendritiques

CFG : Champs à Fort Grossissement

CFP-10 : Culture filtrate protein (Culture filtrate antigen 10 kDa)

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CO₂ : Dioxyde de carbone

COVID-19 : maladie à Coronavirus 19

DEAP : Département d'épidémiologie des affections parasitaires

DO : Densité optique

DPP : Dérivé protéique purifié

E : Ethambutol

E1 : Estrone

E2 : Estradiol

E3 : Estriol

ELISA : Enzyme-Linked Immuno Assay (Dosage Immuno-enzymatique)
ELISPOT : Enzyme Linked ImmunoSpot (Immunotransfert lié à l'enzyme)
ESAT-6 : Early Secretory Antigenic Target-6kDa (cible antigénique sécrétoire précoce de 6 kDa)
FAPH : Faculté de Pharmacie
FCAP : Flow Cytometric Analysis Program (Programme d'Analyse Cytométrique en Flux)
FMOS : Faculté de Médecine et d'Odonto-Stomatologie
g/dL : gramme/décilitre
GCP : Good Clinical Practice (Bonne Pratique Clinique)
G-CSF : Granulocyte-Colony Stimulating Factor (Facteur de Stimulation des Colonies de Granulocytes)
GLP : Good Laboratory Practice (Bonne Pratique de Laboratoire)
GM-CSF : Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor (Facteur de Stimulation des Colonies de Granulocytes-Macrophages)
gp : glycoprotéine
H : Isoniazide
HRP : Horseradish Peroxydase (Péroxydase de Raifort)
IDR : Intradermoréaction
IFN- γ : Interféron- γ
IgG : Immunoglobuline G
IGRA : Interféron-Gamma Release Assay (Test de libération d'Interféron-Gamma)
IL : Interleukine
IL-2R : Récepteur de l'IL-2
IMC : Indice de masse corporelle
IP : Insuffisance pondérale
J0 : Jour 0
KatG : Catalase Péroxydase
Kg/m² : Kilogramme par mètre carré
LH : Hormone Lutéinisante
LT : Lymphocytes T

M6 : Sixième Mois

mg : milligramme

Mg/Kg : Milligramme/Kilogramme

MGIT : Mycobacteria Growth Indicator Tube (Tube indicateur de croissance des mycobactéries)

MIP-1 α : Macrophage Inflammatory protein-1 alpha (Protéine Inflammatoire des Macrophages-1 alpha)

mL : Millilitre

mm : millimètre

MNT : Mycobactérie Non Tuberculeuse

MRTC : Malaria Research and Training Center (Centre de recherche et de formation sur le paludisme)

MTB : *Mycobacterium tuberculosis*

MTB/RIF : Mycobacterium Résistante à la Rifampicine

MTBC : *Mycobacterium tuberculosis* Complex (Complexe *Mycobacterium tuberculosis*)

ng /mL : nanogramme/ millilitre

NIAID : National Institute of Allergy and Infectious Diseases (Institut national de l'Allergie et des maladies infectieuses)

NK : Natural Killer

OMS : Organisation mondiale de la Santé

PAS : Acide Para-amino Salicylique

PCR : Polymérase Chain Réaction (Réaction de Polymérisation en Chaîne)

PE : Phycoérythrine

PN : Polynucléaires Neutrophiles

PNLT : Programme National de Lutte contre la Tuberculose

PPA : Protéine de la Phase Aiguë

R : Rifampicine

RCF : Relative Centrifugal Force) Force Centrifuge Relative

REDCap : Research Electronic Data Capture (Capture Electronique de Données de Recherche)

Rx : Radiographie
S : Streptomycine
SHBG : Sex Hormone Binding Globulin (Globuline Liant les Hormones Sexuelles)
SST : Serum Separator Tube (Tube Séparateur de Sérum)
T : Thioacétazone
TA : Température Ambiante
TB : Tuberculose
TB-MR : Tuberculose Multirésistante
TBP : Tuberculose Pulmonaire Active
TEP : Tuberculose Extrapulmonaire
TGF- β : Transforming Growth Factor-beta (Facteur de Croissance Transformant Béta)
Th1 : Lymphocytes T-helper de type 1 (Lymphocytes auxiliaires de type -1)
Th17 : Lymphocytes T-helper de type 17 (Lymphocytes auxiliaires de type -17)
Th2 : Lymphocytes T-helper de type 2 (Lymphocytes auxiliaires de type -2)
TMB : Tétraméthylbenzidine
TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α (Facteur de Nécrose Tumoral- α)
Treg : Regulatory T Cell (Lymphocyte T Régulateur)
UCRC : University Clinical Research Center (Centre Universitaire de Recherche Clinique)
UI : Unité Internationale
UICT : Union Internationale Contre la Tuberculose
US : United States (Etats-Unis)
USTTB : Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako
UV : Ultra-Violet
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine
Z : Pyrazinamide
 μ L : microlitre
 μ m : micromètre

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Classification des mycobactéries	6
Figure 2: Structure de la paroi des mycobactéries	7
Figure 3: Transmission aérienne du bacille tuberculeux par les gouttelettes de Flügge (gauche: sujet contagieux ; droite: sujet sain)	8
Figure 4: Pathogénèse de la tuberculose	10
Figure 5: Granulome géantocellulaire épithélioïde à nécrose caséuse	11
Figure 6: A : Coloration avec Ziehl-Neelsen ; B : Coloration à l'auramine	14
Figure 7: Biosynthèse des hormones stéroïdes (Source, Pierre Allain)	26
Figure 8: Cytokines et leurs modes d'action	32
Figure 9: Effets pléiotropes	33
Figure 10: Effet redondant	33
Figure 11: Effet antagoniste	34
Figure 12: Effet en cascade	34
Figure 13: Exemple de résultats obtenues à l'aide du test Alere Determine™ HIV-1/2 COMBO	41
Figure 14: Principe du test CBA.	43
Figure 15: Cytomètre BD™LSR II utilisé pour cette étude.....	43
Figure 16: Spectrophotomètre (SpectraMax Plus 384) utilisé pour cette étude.	45
Figure 17: Variation des concentrations des hormones sexuelles chez les participants au cours du traitement antituberculeux	49
Figure 18: Relation entre les hormones sexuelles et la charge bactérienne des crachats	50
Figure 19: Variation des concentrations des cytokines inflammatoires au cours du traitement antituberculeux.....	51
Figure 20: Cytokines inflammatoires au cours du traitement en fonction du sexe.....	52
Figure 21: Corrélation entre la testostérone et les cytokines inflammatoires chez les hommes atteints de tuberculose active pulmonaire	53
Figure 22: Estradiol et cytokines inflammatoires chez les femmes atteintes de tuberculose active pulmonaire	54

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Echelle de quantification des BAAR	14
Tableau II: Liste des médicaments antituberculeux dits essentiels, leur mode d'action, leur puissance et la dose recommandée	21
Tableau III: Catégories de traitement et les régimes de chimiothérapie correspondants	22
Tableau IV: Effets secondaires des médicaments antituberculeux	23
Tableau V: Prise en charge des effets secondaires des antituberculeux en fonction des symptômes ..	24
Tableau VI: Caractéristiques sociodémographiques des participants de l'étude	48

Table des matières

1. INTRODUCTION	1
2. GÉNÉRALITÉS	4
2.1. Définition.....	4
2.2. Epidémiologie.....	4
2.3. Agent pathogène	5
2.4. Mode de transmission.....	7
2.5. Physiopathologie et réponse immunitaire dirigée contre <i>M. tuberculosis</i>	8
2.6. Diagnostic de la tuberculose.....	11
2.7. Traitement de la TB	19
2.8. Vaccin antituberculeux	24
2.9. Différences entre les deux sexes en matière de TB	25
2.10. Hormones sexuelles.....	26
2.11. Cytokines.....	30
3. MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	38
3.1. Cadre et site d'étude.....	38
3.2. Type et population d'étude	38
3.3. Période d'étude	38
3.4. Méthodes de laboratoire.....	39
3.5. Gestion et analyse des données	46
3.6. Considérations éthiques	46
3.7. Définition opératoire	46
4. RESULTATS	47
4.1. Résultats globaux.....	47
4.2. Résultats analytiques.....	48
5. COMMENTAIRES ET DISCUSSION.....	55
6. Limites de l'étude	57
7. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS	58
7.1. Conclusion :	58
7.2. Recommandations	59
8. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	60
9. SERMENT DE GALIEN	77

1. INTRODUCTION

La tuberculose (TB) est une maladie infectieuse, qui demeure toujours un problème majeur de santé publique. L'Organisation mondiale de la Santé (OMS) considère cette maladie comme la deuxième cause de mortalité due à un seul agent infectieux, derrière la maladie à coronavirus de 2019 (COVID-19). Elle touche principalement les poumons ; TB pulmonaire. L'agent causal est le complexe *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) dont l'espèce *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) est la bactérie la plus impliquée (1).

L'OMS estime qu'un quart de la population mondiale serait infecté par les mycobactéries du MTBC (2). Environ 10,6 millions de personnes ont contracté la TB dans le monde au cours de l'année 2021, soit une augmentation de 4,5% par rapport à 10,1 millions en 2020. Un taux d'incidence à la hausse de 3,6 % entre 2020 et 2021, soit 134 sur 100 000 habitants par an.

Le Continent africain et l'Asie du Sud-Est sont les plus sévèrement touchés, représentant respectivement 23% et 45% des cas de TB en 2021 (1).

Le Mali avec une incidence de 52 cas pour 100 000 habitants estimé par l'OMS, est l'un des pays ayant une forte incidence. La plupart des personnes infectées ont un âge compris entre 15 et 50 ans, soit la tranche de la population la plus productive, ce qui concorde avec les observations au niveau mondial (3).

Plusieurs études ont montré que la TB était plus fréquente chez les hommes (56,5 %) par rapport au sexe opposé (32,5 %) et que la plupart des personnes qui développaient la maladie étaient des adultes (environ 90 %) (1). Cette susceptibilité des hommes à la TB est également observée au Mali, avec 65% d'hommes contre 31% de femmes (3). La cause de cette différence de susceptibilité à la TB entre les deux sexes n'est pas totalement connue. Cependant, des facteurs tels que les barrières socio-économiques et culturelles dans l'accès aux soins de santé ont été longtemps attribués comme la cause de cette différence (4). Aussi, le rôle potentiel de certains facteurs biologiques tels que la réponse immunitaire, la génétique humaine, les hormones sexuelles sont aussi suspectées. Les femmes semblent avoir une réponse immunitaire innée et adaptative plus forte que les hommes, ce qui pourrait entraîner une élimination plus rapide des agents pathogènes (5). Cependant, cette réponse immunitaire importante chez les femmes, qui semble être avantageuse contre les infections, pourrait être défavorable contre l'hôte en provoquant un taux plus élevé de maladies auto-immunes par rapport au sexe opposé (4).

Parmi les facteurs biologiques qui pourraient influencer le devenir du sujet après une infection par le MTBC, les hormones sexuelles stéroïdiennes pourraient jouer un rôle primordial.

Notamment, l'effet que pourrait exercer ces hormones sur la réponse immunitaire sachant que la plupart des cellules immunitaires ont des récepteurs pour les hormones. Par exemple, la testostérone, principal androgène circulant chez l'homme, est connu pour son effet immunosuppresseur. En revanche, les œstrogènes sont considérés comme des médiateurs pro-inflammatoires qui favorisent la réponse immunitaire (4). Ces hormones interviennent dans la pathogenèse de beaucoup de maladies, y compris les maladies infectieuses comme la TB. En effet, une étude pilote de notre laboratoire a montré que la concentration de testostérone sanguine était plus faible chez les hommes affectés par la TB comparés aux participants sains du même sexe (6). Le taux de testostérone de ces patients augmentait plus de 2 fois comparés aux hommes sains, dès le premier mois du traitement antituberculeux (6).

Ce travail rentre dans le cadre d'une étude de cohorte prospective au centre universitaire de recherche clinique (UCRC) à Bamako (Mali), afin d'analyser les fluctuations hormonales, spécifiquement les taux de testostérone et d'estradiol au cours du traitement antituberculeux. Ainsi, la question est de savoir, est-ce que la concentration de la testostérone chez l'homme et celle de l'estradiol chez la femme peuvent prédire le résultat du traitement de la TB ?

Nous avons émis comme hypothèse, la possibilité que les niveaux de testostérone et/ou d'estradiol sont altérés au cours de la tuberculose pulmonaire active (TBP), ce qui entraîne une dérégulation de la réponse immunitaire aux mycobactéries.

OBJECTIFS

1. Objectif général

L'objectif principal de cette thèse est d'étudier les fluctuations des concentrations des hormones sexuelles (testostérone et estradiol) au cours du traitement antituberculeux.

2. Objectifs spécifiques

- a. Mesurer les concentrations de testostérone et d'estradiol au cours du traitement antituberculeux, respectivement chez les hommes et chez les femmes.
- b. Corréler les concentrations des hormones sexuelles au taux de conversion des lames de crachats des patients avant le traitement (J0) et au sixième mois (M6) du traitement.
- c. Mesurer les concentrations des cytokines inflammatoires circulants dans le sang chez les hommes et les femmes atteints de TBP active au cours du traitement.
- d. Corréler les concentrations des hormones sexuelles avec celles des cytokines inflammatoires circulantes au cours du traitement chez les hommes et les femmes atteints de TBP active.

2. GÉNÉRALITÉS

2.1. Définition

La tuberculose est une maladie infectieuse due au complexe *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC), parfois appelée bacille de Koch (BK). La TB affecte le plus souvent les poumons mais peut atteindre d'autres organes (TB extra-pulmonaire) (1).

2.2. Epidémiologie

La TB est une maladie présente dans tous les continents surtout dans les pays en voie de développement notamment en Afrique et en Asie. De nos jours, cette maladie constitue un problème majeur de santé publique au niveau mondial.

L'OMS estime qu'environ 10,6 millions de personnes dans le monde ont contracté la TB en 2021, ce qui équivaut à un taux d'incidence de 134 pour 100 000 habitants. La même année ; on a estimé à 1,4 millions de personnes séronégatives décédées de la TB (contre 1,3 millions en 2020) et 187 000 parmi les personnes vivant avec le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) (contre 214 000 en 2020) (1). La cause de cette évolution de la maladie vers une recrudescence pourrait s'expliquer par l'épidémie de la COVID-19 et celle-ci a eu un impact négatif sur des années de progrès pour réduire à l'échelle mondiale la TB. Entre 2019 et 2021, il y a eu :

- une forte baisse des notifications de cas de TB (passant de 7,1 millions à 6,4 millions),
- une augmentation du nombre de décès lié à la TB de 1,4 millions à 1,6 millions,
- une réduction du nombre de personnes bénéficiant de traitement contre la TB résistante à la Rifampicine et à la TB multirésistante (TB-MR) et d'un traitement préventif de la tuberculose,
- une baisse des dépenses mondiales consacrées aux services essentiels de lutte contre la TB (de 6 milliards de dollars US en 2019 à 5,4 milliards de dollars US en 2021, soit moins de la moitié des besoins) (1).

Pour mettre fin à la TB, l'Assemblée mondiale de la Santé a adopté une nouvelle stratégie d'ici 2030, qui vise à réduire de 90% le nombre annuel de décès dus à la TB et de réduire de 80 % le taux d'incidence de la TB dans le monde par rapport à 2015. La stratégie met l'accent sur la collaboration au niveau mondial et sur l'adaptation au niveau national. Elle insiste sur la nécessité d'adapter la politique nationale de lutte antituberculeuse, à l'épidémiologie locale et

au système de santé du pays surtout aux pays qui se rapprochent d'une incidence annuelle inférieure à 10 cas pour 100 000 habitants (1).

En 2021, le Mali a notifié 7285 cas de TB, soit un taux de notification de 35 cas pour 100 000 habitants et un taux de détection de 66%. Ce taux de notification se répartit entre les nouveaux cas de TBP bactériologiquement confirmés (4 611) et cliniquement diagnostiqués (1096), les rechutes (232) et les nouveaux cas de TB extra-pulmonaire (1346). En gros le taux de notification est resté stationnaire de 2020 à 2021 au niveau national, ensuite une faible variation du taux d'incidence et de détection de la TB. La répartition des nouveaux cas et des rechutes selon le sexe en 2021 a montré que le sexe masculin est le plus représenté avec environ deux fois plus d'hommes (65%) que de femmes (31%) âgés de plus de 15 ans. La TB a touché toutes les tranches d'âge en 2021 plus particulièrement les 25-34 ans, suivis des 35-44 ans (3).

2.3. Agent pathogène

Découvert en 1882 par Robert Koch, prix Nobel de la médecine ; le complexe *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) ou bacille de Koch, est l'agent responsable de la TB dont *M. tuberculosis* est la première cause de cette infection (7). Il s'agit d'une mycobactérie de l'ordre des Actinomycétales, de la famille des *Mycobacteriaceae*. Cette famille renferme un seul genre : le genre *Mycobacterium* (Figure 1). Les mycobactéries sont des bactéries fines de petites tailles, légèrement incurvées, de 2 à 5 µm de long sur 0,2 à 0,3 µm de large, de formes bâtonnets, aérobies strictes, immobiles non sporulées, non capsulées, acido-alcool-résistant (7, 8). Ce sont des bactéries sensibles à la lumière solaire, au rayonnement Ultraviolet (UV), à la chaleur, aux désinfectants (iodés, chlorés...) et résistent à la dessiccation (7).

Le genre *Mycobacterium* renferme une centaine d'espèces considérées comme pathogènes ou non, aussi bien pour l'homme que pour les animaux. De même que, des espèces opportunistes et saprophytes généralement qualifiées d'atypiques ou encore, d'espèces non tuberculeuses. Ce sont entre autres :

- ✓ *M. tuberculosis* ou bacille de Koch (BK), responsable de la TB chez l'homme,
- ✓ *M. bovis*, agent de la TB bovine, d'un spectre large car peut infecter l'homme et d'autres animaux,
- ✓ *M. africanum* fréquemment isolé chez les patients atteints de TB en Afrique de l'Ouest et du Centre ; très proche du *M. tuberculosis*,
- ✓ *M. leprae* ou bacille de Hansen responsable de la lèpre.

Du fait de la relation phylogénique existante entre-elles, *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, et *M. microti* ont été classées au sein du MTBC (9). La TB est une maladie dont le principal réservoir et le vecteur est l'homme.

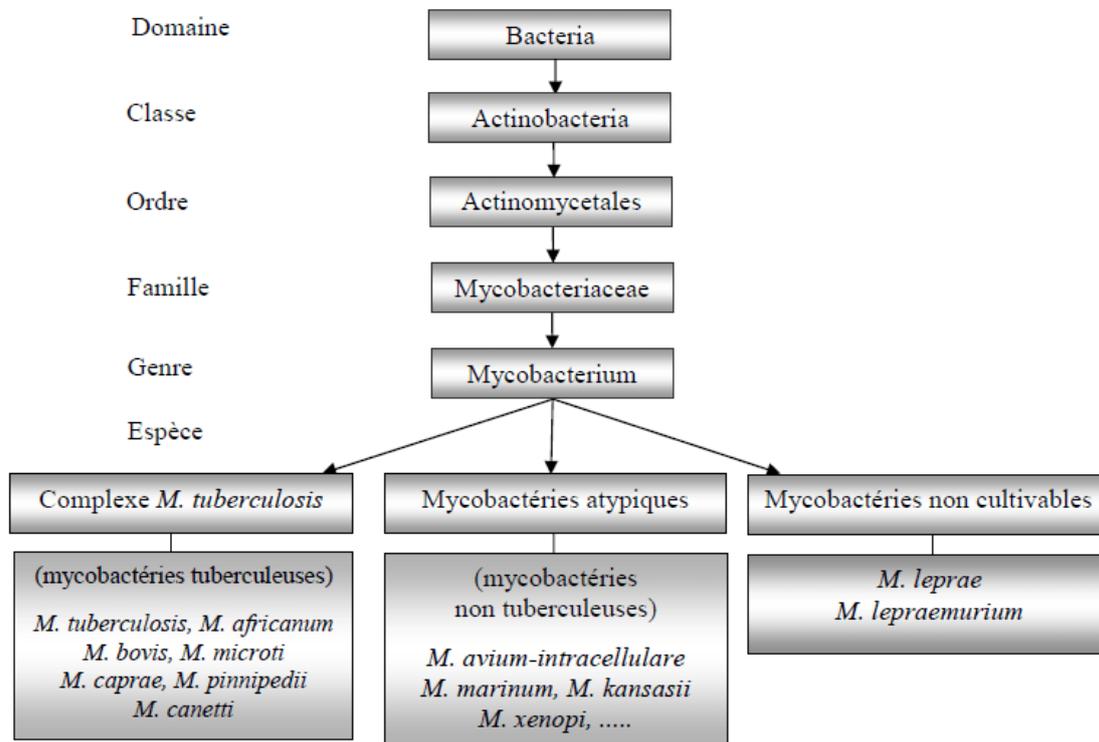


Figure 1: Classification des mycobactéries (10)

La structure particulière de la paroi de *M. tuberculosis* lui donne un caractère unique par rapport aux autres organismes. En effet, sa paroi est constituée d'une forte teneur en lipides. Ce sont principalement, du peptidoglycane relié de façon covalente à un hétéroside, l'arabinogalactane, lui-même estérifié par des acides mycoliques. Ce sont des acides gras particuliers à très longue chaîne (76 à 90 atomes de carbone) (Figure 2) (11). Cette organisation particulière de la paroi des mycobactéries leur confère des propriétés particulières :

- ✓ l'acido-alcool-résistance,
- ✓ la résistance à plusieurs antibiotiques,
- ✓ la capacité de survivre dans les conditions extrêmes telles qu'une acidité ou une alcalinité extrême, une situation de faible teneur en oxygène et une survie intracellulaire (dans le macrophage) (12).

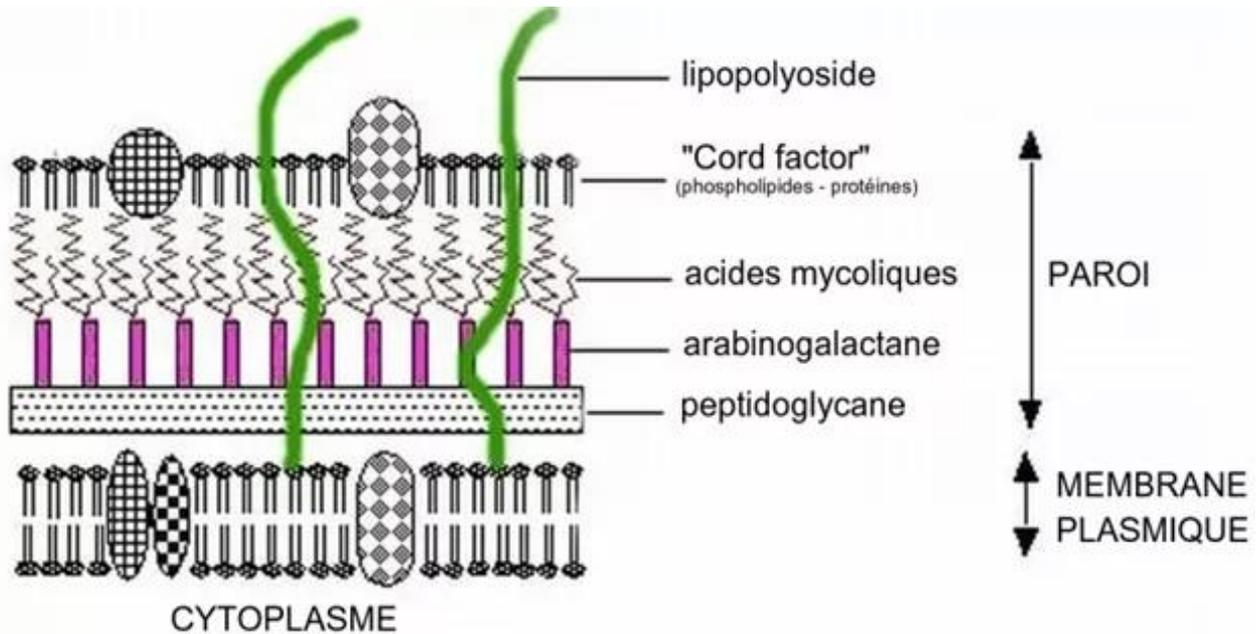


Figure 2: Structure de la paroi des mycobactéries (11)

2.4. Mode de transmission

La transmission de la TB est interhumaine et se fait principalement par voie aérienne, ce qui fait que la plupart des cas de TB sont des formes pulmonaires. Quand une personne ayant une TBP tousse, éternue, parle ou crache, elle émet des microgouttelettes de mucus (gouttelettes de Flügge). Ces microgouttelettes appelées <<droplets nuclei>> infectées de bacilles tuberculeux se dessèchent très rapidement. Les droplets nuclei (environ 1 à 5 μm de diamètre) peuvent rester en suspension dans l'air pendant plusieurs heures selon l'environnement et sont inhalés par les personnes en contact direct avec le malade. Les droplets nuclei les plus gros sont retenus par le mucus bronchique et rejetés à l'extérieur. En revanche, les particules les plus petites (1-3 μm de diamètre) parviennent à traverser le tapis mucociliaire et l'appareil respiratoire, atteignant ainsi les alvéoles pulmonaires où, elles seront phagocytées par les cellules de l'immunité. Le risque de transmission est plus élevé dans une atmosphère confinée et si les contacts sont répétés et durables. Une immunodépression, la toxicomanie sont entre autres des facteurs de risque pour la survenue de l'infection tuberculeuse (13-15).

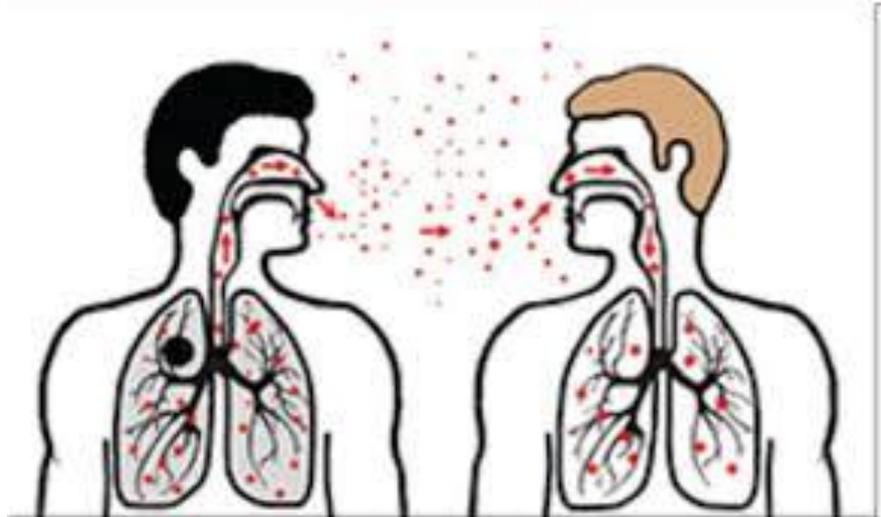


Figure 3: Transmission aérienne du bacille tuberculeux par les gouttelettes de Flügge (gauche: sujet contagieux ; droite: sujet sain) (16)

2.5. Physiopathologie et réponse immunitaire dirigée contre *M. tuberculosis*

Après inhalation, les bacilles atteignent les alvéoles pulmonaires. A ce niveau, les bacilles sont reconnus par différentes cellules immunitaires : les macrophages alvéolaires, les cellules dendritiques qui sont les cellules présentatrices d'antigène et les polynucléaires neutrophiles. Ces cellules constituent la première barrière de défense non spécifique (immunité innée) (13). Les mycobactéries se lient ensuite à la surface cellulaire des macrophages alvéolaires par l'intermédiaire des récepteurs du complément, du récepteur du mannose ou du récepteur piègeur de type A. Après la phagocytose, les mycobactéries parviennent à renverser le trafic endocytairé des phagocytes en réduisant l'acidité dans le phagosome. Cette baisse de l'acidité, abouti à une inhibition de la fusion phagosome-lysosome. La résistance aux mécanismes de défense innée de l'hôte, semble être dû à des facteurs de virulence qui permettent aux bacilles de survivre dans les cellules phagocytaires. Après un arrêt réussi de la maturation des phagosomes, la multiplication des bacilles commence et le macrophage finit par se rompre pour libérer ses bacilles, qui sont absorbés par les macrophages et continuent le cycle d'infection, élargissant encore la propagation (8).

Cette mort des macrophages par nécrose et/ou apoptose permet à la fois la prise en charge des débris cellulaires par les cellules dendritiques (CDs) et la libération de facteurs solubles comme les chimiokines et les cytokines. Ces facteurs favorisent le recrutement de plus de monocytes circulants et la mise en place d'une réponse inflammatoire. Les monocytes se différencient en macrophages et ingèrent les mycobactéries mais ne les détruisent pas. Les bacilles vont alors se multiplier d'une manière logarithmique. Les macrophages et/ou les CDs, activés par les

bacilles ou les corps apoptotiques, quittent le site d'infection. Deux à trois semaines après l'infection, ils atteignent les ganglions lymphatiques satellites où ils stimulent les lymphocytes T (LT) CD4⁺ et CD8⁺, induisant le développement d'une immunité cellulaire T (immunité cellulaire retardée). En effet, ces cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ exercent leur effet protecteur par une production massive de cytokines, essentiellement l'interféron gamma (IFN- γ), nécessaire à l'activation des macrophages. Les cellules T helper (Th1) induites par l'interleukine-12 (IL-12), générée par les CD et les macrophages activés, secrètent l'IL-2 et l'IFN- γ assurant une action protectrice contre MTB. Les LT antigène-spécifiques migrent vers le site d'infection concourant, avec les macrophages activés, à la formation d'un granulome et ainsi à l'arrêt de la croissance logarithmique des bacilles. Ceci permet un contrôle efficace de l'infection (17).

Les granulomes peuvent conserver les bacilles durant plusieurs années voir jusqu'à la fin de la vie ; c'est l'état de latence. Ainsi, chez les personnes immunocompétentes le système immunitaire peut stopper l'infection de façon définitive au stade de latence (chez la plupart des individus infectés). Mais, cet état de latence pourrait être interrompu par réactivation, chez les sujets présentant une immunité faible (personnes âgées, patients sous traitement d'immunosuppresseur à long terme) ou infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ou encore par réinfection par le *M. tuberculosis*. Après réactivation, les bacilles s'échappent du granulome pour provoquer la TB maladie, qui est le plus souvent pulmonaire. A l'examen histologique, on observe un granulome épithélioïde et géantocellulaire avec nécrose caséuse. Les bacilles peuvent passer dans le sang et toucher n'importe quel système, causer des adénopathies, des signes osseux, des signes urinaires, digestifs etc. dans certains cas, les bacilles peuvent disséminer dans le corps et faire des milliers de petits foyers dans les organes, c'est la milliaire.

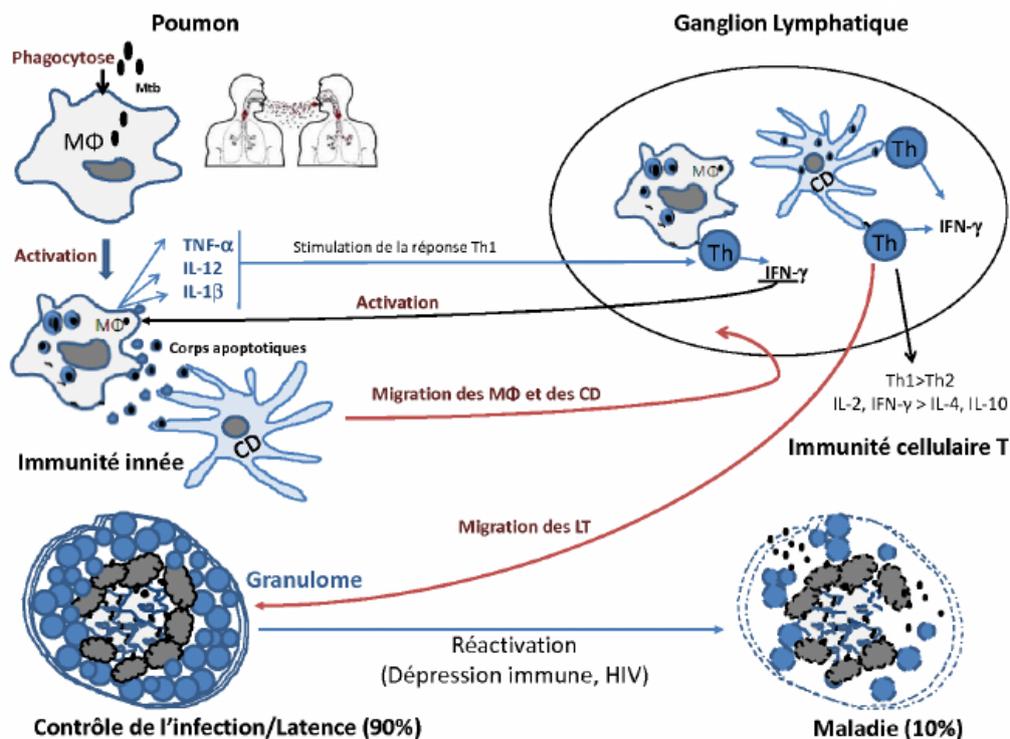


Figure 4: Pathogénèse de la tuberculose (17)

Composition du granulome

Au centre : les macrophages, cellules épithélioïdes (macrophages activés sécrétant des cytokines et des enzymes), macrophages différenciés en cellules géantes multinucléées ou cellules de Langhans, qui correspondent à la fusion de cellules épithélioïdes et de macrophages), macrophages spumeux (chargés de vacuoles lipidiques) qui sont au bord du foyer de nécrose caséuse. D'autres cellules sont présentes dans le granulome, les polynucléaires neutrophiles (PN), des cellules dendritiques, des cellules Natural Killer (NK).

En périphérie : les lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺ qui couronnent le tout ainsi que du fibroblaste qui forme une sorte de capsule.

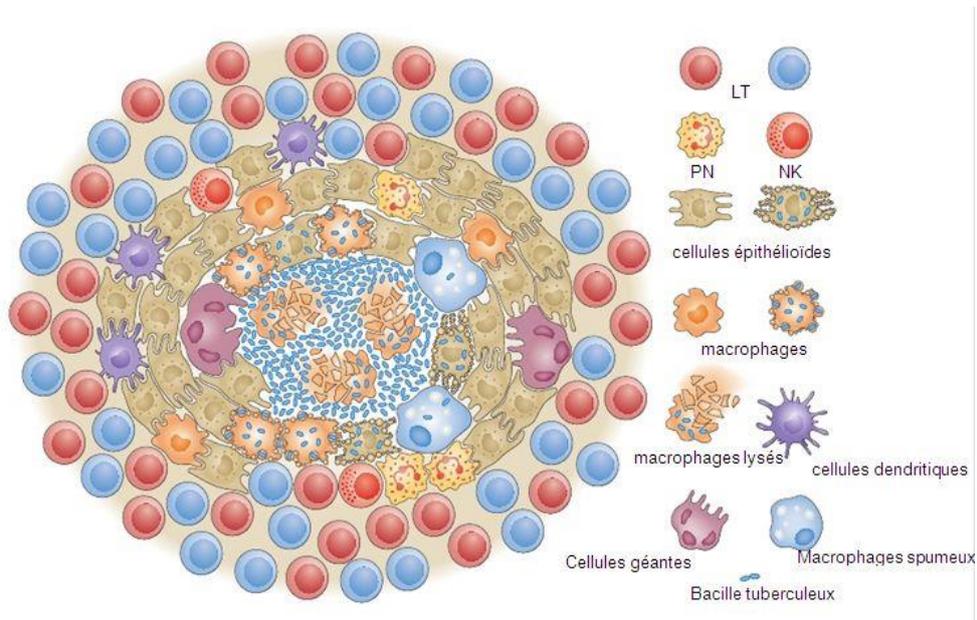


Figure 5: Granulome gigantocellulaire épithélioïde à nécrose caséuse (13)

2.6. Diagnostic de la tuberculose

2.6.1. Diagnostic clinique

Le diagnostic clinique repose essentiellement sur l'interrogatoire du patient. Les signes cliniques de la tuberculose sont une association d'altération de l'état général avec une toux, d'une durée supérieure à 2 semaines, accompagnée ou non d'expectoration, une perte de poids, d'anorexie, de fatigue, d'essoufflement, des douleurs thoraciques, une fièvre modérée, des sueurs nocturnes et d'hémoptysie (présence de sang dans les crachats).

La symptomatologie varie selon les individus mais les signes et symptômes évoluent en général sur un mode chronique et insidieux (15).

Les formes avancées de la maladie et les complications sont :

- insuffisance respiratoire due à l'extension des lésions et la destruction du parenchyme pulmonaire ;
- hémoptysie massive en cas de caverne importante, avec hypervascularisation et érosion des vaisseaux ;
- pneumothorax par rupture d'une caverne dans l'espace pleural.

En zones endémiques, le diagnostic de TBP doit être évoqué chez tout patient consultant pour des symptômes respiratoires persistant depuis plus de 2 semaines (15).

2.6.2. Diagnostic radiologique

La radiographie (Rx) du thorax n'est pas un examen spécifique dans le diagnostic de la TB mais permet d'établir un bilan initial des lésions thoraciques de forme, de siège et de taille variable (6). Elle n'est pas systématiquement indiquée chez les patients à frottis positif dans de nombreux pays, en raison d'un manque de ressources. Elle est considérée comme un outil de diagnostic complémentaire vu son manque de spécificité. Il est souvent difficile de différencier des lésions cicatricielles anciennes d'une TB évolutive. La radiologie est rarement concluante et ne peut que compléter les données de l'examen clinique et les antécédents, pour constituer un faisceau d'arguments en faveur d'une TB active.

La Rx du thorax est toutefois recommandée lorsque l'examen des crachats revient négatif ou chez les enfants dans le cadre d'un diagnostic de TB. Elle est particulièrement utile lorsque la proportion de TB bactériologiquement non confirmée (c'est-à-dire résultat négatif à l'examen microscopique des crachats ou au test Xpert MTB/RIF) peut être élevée, comme dans les populations où la prévalence du VIH est élevée (15). Dans sa forme pulmonaire, la TB se manifeste par la présence d'infiltrats et de nodules principalement localisés aux sommets des poumons et parfois associés à des cavernes. En cas de coinfection par le VIH, les infiltrats, notamment en cas de déficit immunitaire prononcé, tendent à être diffus et localisés aux lobes inférieurs. Au contraire, les cavernes sont moins souvent observées chez les patients infectés par le VIH.

- L'infiltrat se traduit comme des lésions débutantes de l'infection. Il se manifeste comme une partie peu opaque, hétérogène et étendue de l'imagerie radiographique.
- Le nodule est un granulome de taille variable, isolé ou groupé.
- Le tuberculome est un nodule isolé pseudo-tumoral.
- La caverne est une région vide due à une perte de substance au sein d'un infiltrat à paroi épaisse (6, 18, 19).

2.6.3. Diagnostic bactériologique

2.6.3.1. Bactériologie directe

- **Prélèvement**

Le diagnostic de la TB pulmonaire repose principalement sur l'examen bactériologique des sécrétions respiratoires. La qualité de l'examen bactériologique dépend avant tout de la qualité du prélèvement. La qualité des expectorations recueillies et la préparation des lames de lecture permettent d'avoir un examen microscopique sûr. Les crachats émis tôt le matin sont souvent plus riches en bacille (15). Il faut expliquer aux patients la nécessité de tousser à fond pour

obtenir des crachats bronchiques. L'échantillon recueilli doit être à l'abri de la lumière solaire, de la chaleur et des radiations (20). Pour cela, les techniciens doivent être bien formés et le laboratoire doit également faire l'objet d'un contrôle de qualité régulier. Des études ont montré que lorsque les techniques de recueil et d'examen sont correctes, 80% des patients à frottis positif sont détectés lors du premier examen et plus de 15% lors du second. D'où la recommandation et la nécessité de faire au moins 2 examens chez tous les cas suspects de la TBP. Habituellement, un premier échantillon est prélevé lors de la consultation, dès que le patient est considéré comme un cas présumé. Un deuxième échantillon est prélevé le lendemain matin et le patient le ramène au laboratoire si l'échantillon a été recueilli à domicile. Afin de limiter le nombre de déplacements, deux échantillons de crachats peuvent être recueillis le même jour à une heure d'intervalle. Cette stratégie a donné des résultats semblables à la stratégie standard sur deux jours en termes de taux de détection (15). Au cas où le patient ne crache pas, on peut avoir recours au tubage gastrique ou encore à l'aspiration bronchique. Pour la tuberculose extra pulmonaire, un prélèvement est effectué selon la localisation de la maladie.

2.6.3.1.1. Examen microscopique

Pour mettre en évidence les bacilles de la TB à l'examen microscopique, on utilise la propriété acido-alcool-résistante conférée par leur paroi. L'examen microscopique à frottis d'expectoration est une méthode largement utilisée. C'est une méthode facile, sûre, rapide, répétable et peu coûteuse (8). La microscopie présente une faible sensibilité et nécessite un contenu bacillaire élevé (5000 à 10000 bacilles/ml) dans les expectorations mais une spécificité de 100%. Cette méthode ne permet pas de différencier le *M. tuberculosis* des autres bacilles non tuberculeux (21).

L'étape initiale avant de lire les lames avec le microscope est la coloration du culot de crachats, notamment, la coloration de Ziehl Neelsen et Auramine/Rhodamine. Ces colorations se basent sur le caractère acido-alcool résistant des mycobactéries. Les mycobactéries sont difficiles à colorer en raison de la teneur élevée en lipides de la paroi cellulaire (6).

2.6.3.1.1.1. Méthode de Ziehl-Neelsen

Technique de référence utilisée par plusieurs laboratoires pour la coloration des mycobactéries. Cette technique utilise de la fuchsine phéniquée à chaud, suivie d'une décoloration par une solution d'acide et d'alcool mélangé et d'une contre coloration au bleu de méthylène. Le chauffage permettrait une pénétration facile de la fuchsine phéniquée dans ces bacilles. Les frottis sont observés à l'objectif x100. Les mycobactéries apparaissent rouges ou roses sur un

fond bleu-clair (8, 20). Cette méthode a tendance à disparaître en raison des risques qu'elle fait prendre au manipulateur. En effet, la fuchsine a un effet toxique et cancérigène, surtout lorsqu'elle est chauffée.

Il existe aujourd'hui des colorations alternatives inspirées de la technique de coloration de Ziehl-Neelsen, mais présentant des risques moindres pour les manipulateurs.

2.6.3.1.1.2. Méthode Auramine/ Rhodamine

L'auramine phéniquée présente les mêmes propriétés que la fuchsine pour colorer les mycobactéries. Cette technique est plus sensible que la méthode de Ziehl-Neelsen. La coloration à l'auramine est une coloration en fluorescence, les BAAR sont colorés en jaune-vert fluorescent sur un fond rouge ou sombre. L'observation est faite à l'objectif X25 avec un microscope à fluorescence (8, 20).

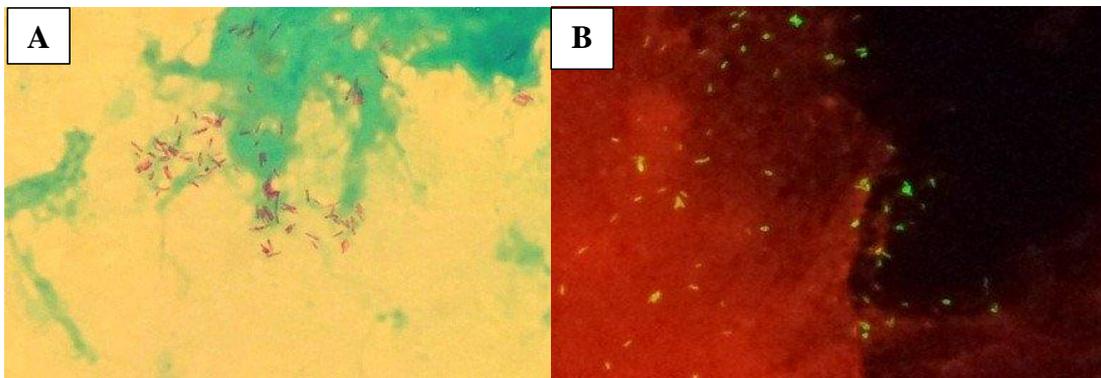


Figure 6: A : Coloration avec Ziehl-Neelsen ; B : Coloration à l'auramine (22)

2.6.3.1.1.3. Notation des résultats d'examen microscopique

Le nombre de bacille observé dans un frottis est proportionnel à la gravité de la maladie et de la contagiosité du malade.

Tableau I: Echelle de quantification des BAAR (15)

Nombre de BAAR (grossissement 1000x : 1 longueur = 100 CFG)	Notation du résultat
Zéro BAAR/une longueur	Pas de BAAR
1-9 BAAR/une longueur ou 100 CFG	Noter le nombre exact de BAAR
10-99 BAAR/une longueur ou 100 CFG	1X
1-10 BAAR/un CFG dans au moins 50 champs	2X
> 10 BAAR/un CFG dans au moins 20 champs	3X

Remarque : Examiner au moins une longueur (100 Champs à Fort Grossissement, CFG), avant de déclarer un résultat négatif. 1-9 BAAR dans 100 CFG est un résultat positif. Noter que 1-9 BAAR dans 100 CFG est rapporté comme « rares bacilles », suivis du nombre exact de BAAR observés dans 100 CFG (par exemple « rares bacilles 5 » signifie 5 BAAR dans 100 CFG). Ne pas confondre « rares bacilles 2 » (2 BAAR dans 100 CFG) avec BAAR 2X (1-10 BAAR par CFG).

2.6.3.1.2. Culture des mycobactéries

La culture demeure la méthode de référence pour le diagnostic de la TB. Elle a une sensibilité plus élevée que la microscopie. Elle permet l'identification des mycobactéries isolées mais aussi de mesurer la sensibilité aux antibiotiques à travers l'antibiogramme (8). En raison de la lenteur de multiplication du bacille tuberculeux (temps de doublement d'environ 20 h) et la croissance rapide des autres bactéries éventuellement associées, les produits pathologiques susceptibles d'être contaminés par une flore commensale doivent être décontaminés avant leur ensemencement (20). Il faut 10 à 100 bacilles/ml pour obtenir un résultat positif, ce qui n'est pas le cas de la microscopie. Seuls les laboratoires spécialisés avec un grand contrôle de qualité régulier peuvent réaliser des cultures (15). Aussi, le délai de culture est fonction de la charge bactérienne et peut être corrélé aux résultats de l'examen direct. Les cultures en milieu solide se positivent en 2 à 6 semaines. Du fait de la croissance lente du *M. tuberculosis*, les résultats des cultures ne sont obtenus qu'après plusieurs jours (6). Les cultures devraient prendre une place plus importante dans le diagnostic et le suivi des patients, en raison des performances limitées de la microscopie dans les cas suivants :

- ✓ confirmation de l'échec thérapeutique,
- ✓ diagnostic de TB extra pulmonaire,
- ✓ confirmation d'une TB à frottis négatif en cas de doute,
- ✓ distinction entre le complexe *M. tuberculosis* et les mycobactéries non-tuberculeuses (MNT),
- ✓ surveillance et évaluation de la réponse au traitement chez les patients sous antituberculeux de deuxième ligne (15).

Au laboratoire TB de l'UCRC, la technique de culture utilisée est la combinaison de deux types de milieu : le milieu liquide et le milieu solide. L'échantillon de crachats est d'abord centrifugé après avoir été décontaminé pour éliminer d'autres micro-organismes. Le sédiment est ensemencé sur différents milieux de culture (liquide ou solide), dans un incubateur à CO₂, à 37°C. La culture en milieu liquide utilisant des tubes MGIT (Mycobacteria growth Indicator

Tube) est couplée à une détection automatique de la croissance à l'aide d'un automate avec incubateur incorporé tel que le Bactec MGIT960[®] de Becton Dickinson (BD). Ceci a l'avantage de réduire significativement le délai de positivité de 10 à 14 jours en moyenne par rapport aux cultures en milieu solide. En cas de positivité de la culture, le germe est identifié selon les recommandations internationales. Il existe plusieurs méthodes pour identifier les bacilles du MTBC. Les tests peuvent être phénotypiques (le test le plus courant est le test à la niacine) ou génotypiques (tests reposant sur l'analyse de l'ADN). Étant donné la complexité de l'identification phénotypique, les tests génotypiques sont préférés au laboratoire UCRC (6).

2.6.3.1.3. Techniques moléculaires de diagnostic de la TB

Aujourd'hui, de nombreuses techniques moléculaires adaptées au diagnostic de la tuberculose sont utilisées (6). Ils sont également utilisés pour détecter une pharmacorésistance en identifiant une mutation génétique (allèles associés à une résistance aux médicaments) de la bactérie responsable (antibiogramme génotypique). Différents tests et plateformes ont été développés (15). Cependant, une technique moléculaire récente, simple et rapide semble être la plus utilisée de nos jours. Il s'agit du test Xpert MTB/RIF, qui est une réaction en chaîne par polymérase (RCP) en temps réel, permettant de diagnostiquer une TBP et une résistance à la Rifampicine (6). Contrairement à d'autres techniques (culture *in vitro*, antibiogramme et techniques moléculaires classiques), le test Xpert MTB/RIF peut être utilisé dans des laboratoires périphériques et sa réalisation n'exige pas de matériel sophistiqué ni de personnel hautement qualifié. Il cible les séquences d'acides nucléiques spécifiques constituant le génome du MTBC et fournit simultanément des informations sur les mutations les plus fréquentes liées à une résistance à la rifampicine.

Il s'agit d'un test automatisé (3 étapes manuelles seulement), géré dans un système fermé avec une cartouche par échantillon, donc moins susceptible d'être contaminé que d'autres tests basés sur les tubes de PCR. Chaque instrument peut traiter simultanément 4 échantillons, en moins de 2 heures. Il existe des instruments de plus grande capacité dans les pays développés. Les performances de ce test sont proches de celles de la culture. Les études ont montré que pour la détection de la TBP, la sensibilité est de 98% pour les échantillons à frottis positif et culture positive et 72% pour les échantillons à frottis négatif mais culture positive. La sensibilité peut atteindre 90% si le test est répété 3 fois.

Le test Xpert MTB/RIF a également une bonne sensibilité (environ 80%) et une excellente spécificité (> 98%) lorsqu'il est effectué sur des échantillons de liquide céphalo-rachidien, suc

ganglionnaire et liquide gastrique (15). L'utilisation de ce test sur des échantillons non pulmonaires, améliore ainsi les diagnostics de la TB extra pulmonaire et la détection de la résistance aux médicaments (8). Du fait de ses bonnes performances, de sa rapidité et de sa simplicité d'utilisation, il a été recommandé d'utiliser ce test en première intention chez les patients infectés par le VIH et lorsqu'une TB multirésistante (TB-MR) ou une TB méningée est suspectée, aussi bien chez l'adulte que chez l'enfant. Le test MTB/RIF ne remplace pas la microscopie directe, la culture et l'antibiogramme conventionnel, qui restent nécessaires pour suivre l'évolution du traitement et détecter les résistances à d'autres médicaments que la Rifampicine (15).

2.6.3.2. Diagnostic indirect de la TB

Jusqu'ici il n'existe pas de sérodiagnostic fiable de la TB active. L'intradermoréaction (IDR) et les tests de libération d'interféron gamma (IGRA) sont des méthodes immunologiques utilisés principalement à des fins de dépistage de la TB latente (21). Ces méthodes visent à mettre en évidence la mémoire immunitaire à la suite d'un contact avec une mycobactérie du complexe tuberculosis (23).

2.6.3.2.1. Test tuberculinique

Le test tuberculinique parfois appelée intradermoréaction (IDR) ou test de Mantoux est le test de dépistage initial de la TB infection. Ce test est basé sur l'injection intradermique de tuberculine pour détecter la réponse immunitaire d'un individu en mesurant l'induration après 48 à 72h dans la zone injectée. La tuberculine utilisée pour le test cutané est connue sous le nom de dérivé protéinique purifié (DPP) (21).

2.6.3.2.1.1. Mode opératoire

L'IDR est réalisée en injectant 5 unités internationales (UI) soit 0,1 millilitre de tuberculine par voie intradermique stricte, à la face palmaire (interne) de l'avant-bras.

La lecture s'effectue 48 à 72 heures après l'injection (hypersensibilité retardée). Elle doit être effectuée par un personnel de santé formé. La réaction est la zone l'induration (perception d'un œdème à la palpation) autour du point d'injection. Le diamètre de l'induration est mesuré (en mm) transversalement, selon le plus grand diamètre, à l'aide d'une règle. Ne pas mesurer la zone érythémateuse (rouge) autour de l'induration, car celle-ci ne constitue pas la réaction mais uniquement la zone indurée. L'induration est liée à l'infiltration de la peau par les macrophages et les LT (13, 15).

2.6.3.2.1.2. Interprétation des résultats

Les résultats de ce test doivent être interprétés soigneusement. Les facteurs de risques médicaux de la personne déterminent à quelle taille en millimètres de l'induration le résultat est positif. IDR est considérée comme positive si :

- l'induration est ≥ 5 mm chez les personnes infectées par le VIH, immunodéprimées (y compris les patients ayant reçu des doses de prednisolone ≥ 15 mg/jour pendant 1 mois ou plus) et les enfants malnutris ;
- l'induration est ≥ 10 mm chez les autres enfants et adultes (vaccinés ou non par le BCG) (15).

2.6.3.2.1.3. Limites

Des résultats faussement positifs peuvent être observés, surtout chez les individus provenant de pays à forte prévalence, vaccinés au bacille Calmette-Guérin (BCG) et infectés par des mycobactéries non tuberculeuses. Aussi, le test de Mantoux ne permet pas de déterminer si la réaction est due au *M. tuberculosis* ou une autre mycobactérie (24).

2.6.3.2.2. Test de libération de l'interféron gamma IFN- γ IGRA

L'IFN- γ est une des cytokines clé sécrétée par les LT en réponse à l'infection à *M. tuberculosis*. Les tests IGRA reposent sur la détection de la production d'IFN- γ par les cellules mononuclées sanguines du patient après contact avec des protéines spécifiques de *M. tuberculosis* : Early Secretory Antigenic Target 6 kDa (ESAT-6), Culture Filtrate Protein 10 Kda (CFP-10) et TB7.7 (23). Ce test est plus spécifique et tout aussi sensible que le test tuberculinique.

Les avantages de ce test sont : il n'y a pas de réaction croisée en cas de vaccination par le BCG et les mycobactéries non tuberculeuses ; le test nécessite une seule prise de sang évitant ainsi les visites répétées pour l'interprétation des résultats. Il est également possible de réaliser des examens complémentaires tels qu'un dépistage du VIH (après consentement du patient) sur la même prise de sang (12). Il existe deux types de tests : le test appelé T-SPOT-TB[®] basé sur une technique d'Enzyme Linked ImmunoSpot (ELISPOT) quantifiant le nombre de cellules mononuclées sanguines capables de produire de l'IFN- γ en réponse à un contact avec ces différents antigènes et le Quantiféron basé sur la mesure de la production in vitro d'IFN- γ par test ELISA (Enzyme-Linked Immuno Assay) (Quantiferon-TB[®]) (25).

2.7. Traitement de la TB

Bien avant la découverte des médicaments antituberculeux, le traitement de la TB visait simplement à renforcer la résistance du malade. Aujourd'hui, l'objectif du traitement antituberculeux est d'assurer une guérison sans rechute, tout en prévenant l'émergence d'une pharmacorésistance, prévenir les complications ou les décès et diminuer la transmission des BK à d'autres sujets (26, 27). Le traitement de la tuberculose confirmée nécessite une combinaison de médicaments (12).

2.7.1. Médicaments antituberculeux

2.7.1.1. Médicaments essentiels

En 1982 à Buenos-Aires (Argentine), la commission du traitement de l'Union internationale contre la tuberculose (UICT) a retenu 6 médicaments comme essentiels dans le traitement de la TB : la streptomycine [S], l'isoniazide [H], la rifampicine [R], la pyrazinamide [Z], L'éthambutol [E] et la thioacétazone [T] (14). Ces médicaments ont trois propriétés essentielles : bactéricides, action stérilisante et capables de prévenir l'apparition des résistances et possèdent ces caractéristiques à des degrés divers (20, 27-29). L'OMS a établi deux listes de médicaments antituberculeux dont les médicaments de la première ligne utilisée en première intention et ceux de la deuxième ligne. Elle a aussi établi des traitements standards adaptable à tous les pays. Notons que, pratiquement tous les pays du monde utilisent la stratégie établie par l'OMS pour le traitement de première intention et de seconde intention (29).

2.7.1.2. Médicaments de première ligne (29)

Les médicaments de première ligne ou antituberculeux majeurs sont les plus efficaces. Leur utilisation en association permet d'éviter l'apparition de résistances. Ce sont : l'Isoniazide, la Rifampicine, le Pyrazinamide et l'Éthambutol. Ils sont utilisés en première intention sauf en Pédiatrie.

- **Isoniazide [H]** : chef de file des amides pyridiniques et analogues dont Ethionamide et la Pyrazinamide, est une prodrogue nécessitant une activation in vivo pour donner le métabolite actif. Il agirait par inhibition de la biosynthèse des acides mycoliques, qui sont des constituants essentiels de la paroi mycobactérienne. Bien que son mécanisme d'action moléculaire ne soit pas encore complètement élucidé, il est admis que l'isoniazide déploie son activité par un processus impliquant deux étapes intracellulaires à savoir :
 - une étape d'activation par la catalase peroxydase KatG,

- une étape d'inhibition caractérisée par une interférence de la forme activée avec la biosynthèse des acides mycoliques.
- **Rifampicine [R]** : antibiotique d'hémisynthèse, appartenant à la famille des Rifamycines. Elle possède un large spectre antibactérien qui comprend les staphylocoques, les streptocoques et déploie son activité antibactérienne en se liant de façon spécifique à l'ARN polymérase bactérienne, inhibant ainsi la transcription des ARN messagers. Il s'agit d'un antituberculeux majeur bactéricide sur les bacilles en multiplication, intra et extracellulaires et sur les bacilles dormants, grâce à sa puissante activité stérilisante. Son spectre d'action est large et comprend les bactéries à Gram positif, à Gram négatif et intracellulaires (*M. leprae*, *M. tuberculosis*). Elle n'est cependant pas active sur les mycobactéries atypiques sauf sur *M. kansasii*.
- **Ethambutol [E]** : éthambutol agirait sur les bactéries en croissance au niveau de la paroi mycobactérienne. Le mécanisme d'action évoqué est que la cible de l'Éthambutol serait une enzyme, l'arabinosyltransférase, intervenant dans la liaison arabinose-galactane. Son inhibition par l'Éthambutol, en effet conduirait à l'inhibition de la synthèse de l'arabinane, de l'arabinogalactane et du lipoarabinogalactane de la paroi cellulaire. De ce fait, les acides mycoliques ne peuvent pas se lier sur le motif arabinogalactane (constituant de la paroi). Ceci entraîne une désorganisation de la paroi cellulaire et la mort de la bactérie soumise au stress du milieu extérieur.

2.7.1.3. Médicaments de seconde ligne (29)

Les médicaments de seconde ligne ou antituberculeux mineurs sont des molécules appartenant à des classes chimiques diverses, actives sur *Mycobacterium sp*, utilisées après un échec du traitement par les antituberculeux majeurs. Elles sont considérées comme moins efficaces et/ou plus toxiques. Ces médicaments sont utilisés pour le traitement des cas de TB à bacilles multirésistants apparents ou avérés. Ce sont :

- aminosides injectables et polypeptides injectables,
- aminoglycosides injectables (Streptomycine, Amikacine, Kanamycine),
- polypeptides injectables (Capréomycine),
- fluoroquinolones orales et injectables (Levofloxacin, Moxifloxacin, Ofloxacin),
- l'acide para-amino-salicylique (PAS),
- l'éthionamide, et la prothionamide appartenant à la famille des thioamide,
- la D-Cyclosérine (antituberculeux bactériostatique utilisé en association pour prévenir la résistance),
- la Thioacétazone.

Tableau II: Liste des médicaments antituberculeux dits essentiels, leur mode d'action, leur puissance et la dose recommandée (14, 27)

Médicaments antituberculeux essentiels (Abréviation)	Mode D'action	Efficacité	Dose recommandée (Mg/Kg de poids corporel)		
			Quotidienne	3×/semaine	2×/semaine
Isoniazide [H]	Bactéricide	Haute	5 (4-6)	10 (8-12)	15 (13-17)
Rifampicine [R]	Bactéricide	Haute	10 (8-12)	10 (8-12)	10 (8-12)
Pyrazinamide [Z]	Bactéricide	Basse	25 (20-30)	35 (30-40)	50 (40-60)
Streptomycine [S]	Bactéricide	Basse	15 (12-18)	15 (12-18)	15 (12-18)
Ethambutol [E]	Bactériostatique	Basse	15 (15-20)	30 (25-35)	45 (40-50)
Thioacétazone [T]	Bactériostatique	Basse	15 (15-20)	-	-

Tableau III: Catégories de traitement et les régimes de chimiothérapie correspondants (14)

Catégorie de traitement	Groupe de patients	Régime de chimiothérapie	
		Phase initiale	Phase d'entretien
I	<ul style="list-style-type: none"> • Nouveaux cas de TB à frottis positif • Nouveaux cas de TBP à culture positive seulement • Nouveaux cas de TBP à frottis négatif mais à lésions parenchymateuses évolutives (non cavitaires) • Primo infection avec opacité pulmonaire • Formes sévères de TBP et de TEP 	2 RHZE	4 RH
II	<ul style="list-style-type: none"> • Cas de TBP déjà traités par un primo traitement • Rechute • Reprise évolutive après interruption prématurée • Echec 	2RHZES+ 1RHZE	5 RHE
III	<ul style="list-style-type: none"> • Primo infection symptomatique sans opacité pulmonaire, • Nouveaux cas de TBP à frottis négatif mais à lésions parenchymateuses peu étendues • Formes communes de TEP (Adénopathies périphériques, Pleurésies, ascite, tuberculose osseuse) Chirurgie des séquelles de la tuberculose thoracique 	2RHZE	4 RH
IV	<ul style="list-style-type: none"> • Cas chroniques (après échec ou rechute du traitement de la catégorie II). • Cas de TBP à bacilles multi résistants 	Régimes standardisés ou individualisés de 2ème ligne	

Tableau IV: Effets secondaires des médicaments antituberculeux (20)

Médicaments	Effets secondaires courts	Effets secondaires rares
Isoniazide	<ul style="list-style-type: none">• Neuropathie périphérique par carence en vitamine B6• Hépatite (surtout en association avec Rifampicine)	Convulsions, pellagre, douleurs articulaires, éruption cutanée, agranulocytose, réactions lipidées.
Rifampicine	<ul style="list-style-type: none">• Digestifs : anorexie, nausées, vomissements, douleurs abdominales.• Hépatite• Diminution de l'effet des contraceptifs oraux	Insuffisance rénale aigue, choc, thrombopénie, éruptions cutanées, colite, pseudomembraneuse, pseudo insuffisance surrénalienne
Pyrazinamide	<ul style="list-style-type: none">• Douleurs articulaires par hyper uricémie• Hépatite	Troubles digestifs, éruption cutanée, anémie sidéroblastique
Streptomycine	<ul style="list-style-type: none">• Lésion du VIIIème nerf crânien fonction auditive et/ou vestibulaire (y compris pour le fœtus)• Lésion rénale	Eruptions cutanées
Ethambutol	<ul style="list-style-type: none">• Névrites optiques	Eruptions cutanées, neuropathies périphériques, arthralgies
Thioacétazone	<ul style="list-style-type: none">• Eruptions cutanéomuqueuses	Hépatites, agranulocytose

Tableau V: Prise en charge des effets secondaires des antituberculeux en fonction des symptômes (20)

Effets secondaires	Médicaments probablement	Prise en charge
--------------------	--------------------------	-----------------

Mineurs

Anorexie, nausées, douleurs abdominales	Rifampicine	Prendre les médicaments justes avant de dormir
Douleurs articulaires	Rifampicine	Prendre les médicaments justes avant de dormir
Douleurs articulaires	Pyrazinamide	Aspirine
Sensation de brûlure dans les Pieds	Isoniazide	Pyridoxine : 10mg/j
Urine teintée en rouge-orangé	Rifampicine	Rassurer le malade

Majeures

Prurit, rash cutané	Thioacétazone (Streptomycine)	Arrêter les antituberculeux
Surdité (absence de cérumen à l'examen), nystagmus, vertiges	Streptomycine	Arrêter la streptomycine substitution par l'éthambutol
Ictère (autres causes exclues)	La plupart des antituberculeux (HRZ)	Arrêter les antituberculeux jusqu'à la disparition de l'ictère
Confusionnel (suspicion d'hépatite médicamenteuse pré ictérique vomissements et état chorique)	La plupart des antituberculeux	Arrêter les médicaments et tester en urgence la fonction hépatique et le taux de prothrombine
Troubles visuels	Ethambutol	Arrêt
Troubles généraux, choc, purpura, insuffisance rénale aigue	Rifampicine	Arrêt

2.8. Vaccin antituberculeux

Malgré des efforts d'éradication agressifs, le seul vaccin approuvé contre la TB est le vaccin Bacille de Calmette et Guérin (BCG).

Ce vaccin a d'abord été produit en faisant passer une souche pathogène de *M. bovis* plus de 230 fois sur une période de 10 ans, ce qui a finalement conduit à son atténuation (30). Il offre une protection efficace contre la TBP chez l'enfant, mais une protection moindre contre la TBP chez l'adulte (31).

Le degré de protection et réduction du taux de mortalité contre les formes pulmonaires de la maladie après une dose de vaccin est de 50% selon plusieurs études observationnelles faite en Afrique de l'Ouest (32, 33). Le BCG pourrait réduire le risque de mortalité infantile des formes graves de la maladie, de 30 à 50% après administration jusqu'à 2 ans en Afrique de l'Ouest et jusqu'à 5 ans (Ouganda) (34). Une fois l'effet protecteur du vaccin installé après 5 à 10 semaines, il peut perdurer pendant plusieurs décennies (35). Le vaccin BCG est injecté par voie intradermique dans le bras. Si l'injection est correctement réalisée dans le derme, on voit apparaître une papule cutanée de +/-8 mm qui disparaît rapidement. Après environ trois semaines, un nodule dur se développe à l'endroit où l'injection a été réalisée. Celui-ci s'ulcère parfois et guérit après 3 à 4 mois tout en laissant une cicatrice (15). Il faudra signaler que la prévention de la TB passe aussi par l'amélioration des conditions de vie en luttant contre la pauvreté, le manque d'hygiène, la malnutrition, le surpeuplement, etc. Aussi, les gestes simples d'hygiène et des mesures barrières peuvent diminuer le risque de contamination (6).

2.9. Différences entre les deux sexes en matière de TB

Au cours des vingt dernières années, les notifications de cas de TB chez les hommes sont nombreux que celles des femmes dans la plupart des contextes (36). En 2020, le rapport homme/femme (H: F) dans la notification des cas de tuberculose pulmonaire à bacilloscopie positive était de 1,7 à l'échelle mondiale (1). Ce constat a souvent été expliqué par les obstacles rencontrés par les femmes pour rechercher des soins et recevoir un diagnostic de TB (36). Cependant, les données de notification à elles seules sont insuffisantes pour déterminer si cela est vrai ou si les différences entre les sexes dans les notifications de cas reflètent un excès de charge de morbidité chez les hommes et même un désavantage chez les hommes dans la recherche et l'accès aux soins de la TB (6, 36).

En revanche, il est maintenant prouvé que le nombre de cas chez les hommes reste élevé même dans les pays où il n'existe aucun obstacle apparent d'accès aux soins de santé. Une analyse antérieure a révélé que la prévalence de la TB chez les hommes dépassait celle des femmes dans 27 (93%) des 29 enquêtes de prévalence menées dans 14 pays entre 1953 et 1997 (37). La même analyse a calculé le taux de diagnostic des patients (l'inverse du rapport prévalence/notification) et a révélé que les cas féminins étaient plus susceptibles d'être notifiés que les cas masculins dans 21 enquêtes (72%).

Cette différence de susceptibilité à la TB entre homme et femme semble varié d'un pays à l'autre et selon l'âge des patients. La question est de savoir si cette différence du taux de prévalence

entre les deux sexes reflète réellement un risque plus élevé de développer la maladie chez les hommes que chez les femmes, ou si cela est factice, reste largement non résolue. Cependant, il est reconnu à l'échelle mondiale que, la prévalence de la tuberculose chez les garçons demeure comparable à celle des filles jusqu'à l'adolescence (38). Ceci suggère une différence biologique réelle entre les deux sexes à partir de la puberté. De plus, nous savons que la susceptibilité et/ou la gravité de la maladie dans certains cas sont dépendantes du sexe. Par exemple, la plupart des maladies auto-immunes et/ou inflammatoires sont prédominantes chez les femmes alors que les hommes développent certains types de cancers qui sont rares chez les femmes (36).

2.10. Hormones sexuelles

Une hormone est une molécule messagère produite par le système endocrinien (une glande endocrine ou un tissu endocrinien) en réponse à un stimuli et capable d'agir à très faible dose. Son action se fait à distance via la voie sanguine sur des récepteurs spécifiques d'une cellule cible (39). Les hormones sexuelles sont de deux types : stéroïdiennes et non stéroïdiennes. Les hormones stéroïdiennes sont : les œstrogènes (estrone (E1), estradiol (E2) et estriol (E3)), la progestérone et la testostérone. Ces hormones sont de petites tailles (poids moléculaire aux environs de 300 daltons), liposolubles et ont des récepteurs qui se trouvent à l'intérieur des cellules cibles (intra-cellulaires). Du faite de leur liposolubilité, ces hormones ne peuvent circuler dans le sang que sous forme lié à des protéines non spécifiques comme l'albumine ou à des protéines spécifiques comme la SHBG (sex hormone binding globulin) (40).

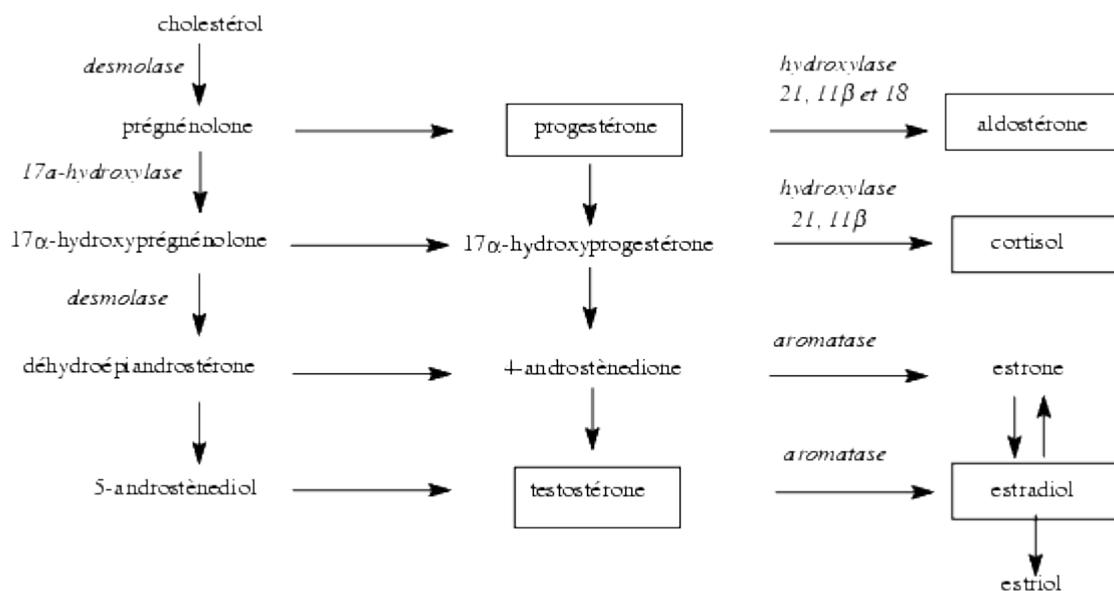


Figure 7: Biosynthèse des hormones stéroïdes (41) (Source, Pierre Allain)

2.10.1. Hormones sexuelles masculines

La testostérone est une hormone stéroïde androgène majeure. Elle est responsable du développement des organes génitaux externes masculins et des caractères sexuels secondaires. Chez les femmes, son rôle principal est celui de précurseur des œstrogènes. Chez les deux sexes, elle exerce également des effets anabolisants et influence le comportement. Chez l'homme, la testostérone est sécrétée par les cellules de Leydig testiculaires et, dans une moindre mesure, par le cortex surrénalien. À la puberté, la testostérone augmente considérablement chez les garçons et diminue progressivement à partir de la quatrième et la sixième décennie de la vie (42, 43). Chez les femmes préménopauses, la testostérone est en partie produite par les ovaires et en partie par les glandes surrénales (44). Après ménopause, la production ovarienne de testostérone est significativement diminuée. La Production de testostérone dans les testicules et ovaires est régulée via une rétroaction hypophyso-gonadique impliquant l'hormone lutéinisante (LH) et, dans une moindre mesure, les inhibines et les activines (43).

La testostérone totale circule dans le sang sous trois formes. Près de la moitié est liée fortement à la Globuline Liant les Hormones Sexuelles (SHBG). Ainsi, la testostérone ne peut entrer dans les cellules. L'autre moitié se trouve faiblement liée à l'albumine. Sous cette forme, la testostérone peut éventuellement se détacher de l'albumine et augmenter le taux de testostérone biologiquement active. Une toute petite fraction nommée « testostérone libre » n'est liée à aucune protéine et constitue la seule forme utilisable directement par les cellules. La testostérone libre et la testostérone liée à l'albumine sont appelées « testostérone biodisponible » (40, 43).

Chez les hommes, les élévations légères à modérées de la testostérone sont généralement asymptomatiques, tandis que des niveaux élevés de testostérone sont associés à un dysfonctionnement de l'unité hypothalamo-hypophysaire, des tumeurs testiculaires, l'hyperplasie congénitale des surrénales, cancer de la prostate ou prise de stéroïdes anabolisants (45, 46). Les niveaux de testostérone masculins en dessous de la plage de référence indiquent un hypogonadisme partiel ou complet, causé soit par une insuffisance testiculaire primaire ou secondaire/tertiaire (hypophyse/hypothalamique). De faibles niveaux de testostérone sont rencontrés chez les patients de sexe masculin atteints des maladies suivantes : hypogonadisme primaire (par exemple, syndrome de Klinefelter), féminisation testiculaire, orchidectomie, cryptorchidie congénitale, anomalies enzymatiques, anorexie, cirrhose du foie, toxicomanie ou consommation prépubère de stéroïdes anabolisants (47). Les symptômes d'un faible taux de

testostérone peuvent inclure une baisse de la libido et des changements d'humeur non spécifiques (46, 48).

2.10.2. Hormones sexuelles féminines

Les œstrogènes et la progestérone constituent les hormones sexuelles féminines (46). Ils sont sécrétés par les ovaires, le placenta et en faible quantité par le cortex surrénal et les testicules (49). Les œstrogènes sont des hormones sexuelles primaires qui appartiennent au groupe des stéroïdes. Les trois œstrogènes naturels sont : estrone (E1), estradiol (E2) et estriol (E3). Les œstrogènes jouent différents rôles chez la femme (50):

- ils sont responsables du développement des caractères sexuels secondaires (développement des seins, modification anatomique de la vulve),
- favorisent le confort vaginal en empêchant la sécheresse vaginale et stimule la prolifération de la muqueuse utérine,
- responsables de la sécrétion et de la bonne qualité de la glaire ovulatoire, indispensable pour permettre aux spermatozoïdes de rejoindre l'ovule pour le féconder,
- permettent la fixation du calcium sur les os et améliorent le confort articulaire.

L'œstradiol (E2) est l'œstrogène naturel le plus puissant (49). L'œstradiol (E2) est sécrété dans la circulation sanguine où 98% de celui-ci circule lié à la globuline liant les hormones sexuelles (SHBG) et dans une moindre mesure à d'autres protéines sériques telles que l'albumine. Seule une petite fraction circule sous forme d'hormone libre ou sous forme conjuguée (49, 51, 52). Chez les femmes non enceintes ayant des cycles menstruels normaux, la sécrétion d'œstradiol suit un schéma cyclique et biphasique avec la concentration la plus élevée trouvée immédiatement avant l'ovulation. Pendant la grossesse, les taux sériques d'œstradiol maternels augmentent considérablement, bien au-dessus des niveaux maximaux pré-ovulatoires et des niveaux élevés sont maintenus tout au long de la grossesse (49).

Les mesures de l'œstradiol sérique sont un indice précieux pour évaluer une variété de dysfonctionnements menstruels tels que la puberté précoce ou retardée chez les filles (53) et l'aménorrhée primaire et secondaire et la ménopause. Il a été rapporté que les taux d'œstradiol étaient augmentés chez les patientes atteintes de syndromes féminisants, de gynécomastie et de tumeurs testiculaires. En cas d'infertilité, les mesures d'œstradiol sérique sont utiles pour surveiller l'induction de l'ovulation après le traitement (49).

2.10.3. Interactions entre les hormones sexuelles et cellules de l'immunité

Les hormones sexuelles sont non seulement importantes pour l'appareil reproducteur mais également des acteurs clés responsables des différences immunitaires entre homme et femme. En effet, ces hormones sont mises en cause dans la modulation de différent aspect de l'immunité grâce à leur récepteur exprimé dans de nombreuses cellules immunitaires (54). Les effets des hormones sexuelles peuvent varier en fonction non seulement de leur concentration mais également du type de cellule cible et du sous-type de récepteurs exprimés sur les cellules (6). En plus de leurs propriétés immunomodulatrices, les stéroïdes sexuelles modifient l'expression et le comportement des gènes qui influencent la susceptibilité et la résistance aux infections (55).

Des études ont montré que les hormones sexuelles les plus importantes incluant les androgènes (testostérone et dihydrotestostérone), les œstrogènes (E1 et E2) et la progestérone sont susceptibles de moduler le recrutement et la fonction de divers types de cellules immunitaires (56). Selon plusieurs littératures, la testostérone et la progestérone ont des activités immunodépressives, tandis que l'effet de l'œstrogène est plus nuancé et dépendant de la dose (4, 57). Par exemple, de faibles doses d'estradiol favorisent la réponse Th1, alors que des taux élevés de 17 β -estradiol favorisent l'immunité Th2 (4). Pour certains, l'aptitude de l'œstrogène à moduler les réponses immunitaires est énormément due à sa capacité à contrôler l'activité transcriptionnelle des gènes de cytokines et des chemokines sur les cellules, notamment l'expression de l'IFN- γ par les cellules Th1. En fait, les gènes qui codent pour l'IFN- γ et son facteur de transcription le T-bet ont des séquences d'ADN régulatrices dans leur promoteur qui sont reconnues par les hormones (54, 58, 59). Inversement, la testostérone diminue la production d'IFN- γ , de TNF- α et des espèces réactives de l'oxygène par les macrophages. Les effets des androgènes sur la fonction immunitaire comprennent un passage du phénotype Th1 à Th2, basé sur une production accrue de l'IL-5 et d'IL-10 et une diminution des cytokines pro-inflammatoires, y compris IFN- γ , TNF- α et IL-17. La testostérone réduit également la prolifération et la différenciation des lymphocytes et peut supprimer la production d'immunoglobulines (54, 60, 61). Des doses supra-physiologiques de testostérone peuvent également inhiber l'activité des cellules NK cytotoxiques (54). Par exemple, les hommes souffrant de déficience en androgènes, se manifestant par de faibles taux de testostérone en circulation, présentent des taux élevés de cytokines pro-inflammatoires par rapport aux hommes sans altération génétique des androgènes (60, 62).

2.11. Cytokines

Le rôle du système immunitaire consiste à préserver l'intégrité des personnes face à leur environnement, donc à se défendre contre les organismes pathogènes qui les menacent : des virus, des bactéries, des champignons ou des parasites. Il a également pour mission de détruire les cellules qui deviennent anormales, comme les cellules tumorales. Pour mener à bien cette fonction de défenseur, le système immunitaire se doit de mener des combats permanents qui doivent être strictement contrôlés, car ceux-ci ne doivent pas se retourner contre la personne elle-même. L'intensité des réponses immunitaires se doit donc d'être réglée, suffisamment intense mais pas trop, et spécifique, dirigée exclusivement contre les intrus. Les réponses des multiples acteurs cellulaires en jeu doivent, de plus, être rigoureusement coordonnées. C'est ainsi que, les échanges entre les multiples cellules du système immunitaire se font soit par des contacts directs entre cellules, soit via des messagers solubles (des molécules) libérés par les cellules : les cytokines (63).

Les cytokines (du grec « cyto » : cellules et « kinos » : mouvement), représentent un groupe diversifié de protéines qui agissent en tant que médiateurs entre cellules et également comme régulateurs de la réponse immunitaire. Ce sont des petites protéines sécrétées par les cellules (immunitaires et non immunitaires) en réponse à divers stimuli. La production des cytokines se fait généralement après une activation des cellules immunitaires (lymphocytes, macrophages), le plus souvent par un agent pathogène. A la différence des hormones les cytokines ne sont généralement pas stockées sous forme de protéines préformées ; l'ARNm et les protéines sont synthétisés de manière spontanée puis sécrétés (64).

2.11.1. Classification :

Les cytokines sont une grande famille de molécule qui sont classées de différentes manières en raison de l'absence d'un système de classification unifié.

Ils peuvent être classés en fonction de leurs rôles :

- les interleukines (IL),
- les interférons (IFN),
- les TNF (Tumor Necrosis Factor),
- les facteurs de croissance hématopoïétique (Growth Factor) : érythropoïétines, GM-CSF, G-CSF, IL-7, IL-15, ...
- Les chimiokines ou chémokines.

Ils peuvent également être classées sur la base de leur réponse biologique en cytokine pro ou anti-inflammatoires :

- Cytokines pro-inflammatoires : IL-1, IL-6, TNF- α , IL-12, INF- γ ...
- Cytokines anti-inflammatoires : IL-4, IL-13 ...
- Cytokines immuno- régulatrices : IL-10, TGF- β

Ces cytokines sont secrétées par plusieurs cellules qui sont notamment :

- Les LT auxiliaires (LT helper)
 - Cytokines produites par les cellules Th1 : IL-2, IFN- γ , IL-15, ...
 - Cytokines produites par les cellules Th2 : IL-4, IL-5, ...
- Les LT régulateurs (Tr) : IL-10, TGF- β
- Le macrophage
 - Cytokines des réponses inflammatoires : TNF- α , IL-1 β , IL-6, chimiokines
 - IL-12

2.11.2. Mode d'action des cytokines

Les cytokines peuvent avoir soit une action autocrine, soit un effet paracrine, ou encore agir à distance : c'est alors l'effet endocrine, tel qu'il existe entre l'IL-6 et la cellule hépatique (Figure 8). En plus de ces trois effets, lorsque l'interaction comporte un contact entre deux cellules, elle est appelée juxtacrine et s'accompagne généralement de phénomènes d'adhésion intercellulaire. La principale caractéristique de cette interaction est que la molécule informative reste associée à la cellule qui l'a produite et interagit ainsi avec la cellule cible. C'est le cas de l'interaction entre une cellule présentatrice de l'antigène et un lymphocyte (64-66).

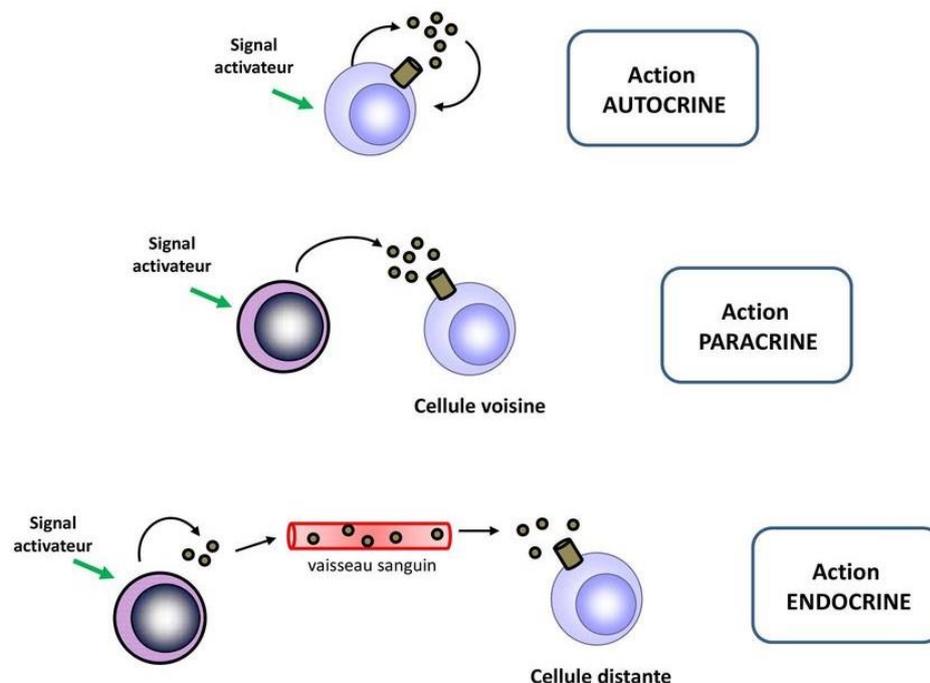


Figure 8: Cytokines et leurs modes d'action (67)

Les cellules présentes dans le tissu infecté ou lésé, telles que les phagocytes mononucléés résidents (macrophages et cellules dendritiques) et les mastocytes, sont les premières cellules activées par des signaux de danger. En réponse à cette activation, elles libèrent de l'histamine, des cytokines pro-inflammatoires et des médiateurs de l'inflammation (65).

La production des cytokines et leur effet peuvent être modulés, donc augmentés ou diminués, par d'autres cytokines. Ces molécules font donc parties d'un réseau extrêmement complexe de communication entre les cellules. Les cytokines ont une demi-vie courte et exercent leur activité biologique à faible concentration, soit en se liant à des récepteurs spécifiques de haute affinité à la surface des cellules, soit en se fixant à des récepteurs solubles qui vont eux-mêmes, secondairement, se fixer à un récepteur membranaire (65, 66).

2.11.3. Propriétés des cytokines

En outre, chacune des cytokines peut reconnaître un ou plusieurs récepteurs spécifiques : effet pléiotrope (Figure 9), et lorsqu'elles se lient à des récepteurs différents, elles induisent des effets différents. Aussi, des cytokines différentes peuvent avoir une action similaire : effet redondant (Figure 10). Ces récepteurs cellulaires de haute affinité sont constitués de deux sous-unités, des protéines, dont l'une a pour but de fixer la cytokine, et l'autre d'assurer la transduction du signal d'activation vers l'intérieur des cellules (64). Ces cytokines peuvent également agir de manière

synergique ou additif (décuple l'effet d'une cytokine), parfois de manière antagoniste (figure 11) et enfin selon un phénomène de cascades de signalisation (Figure 12).

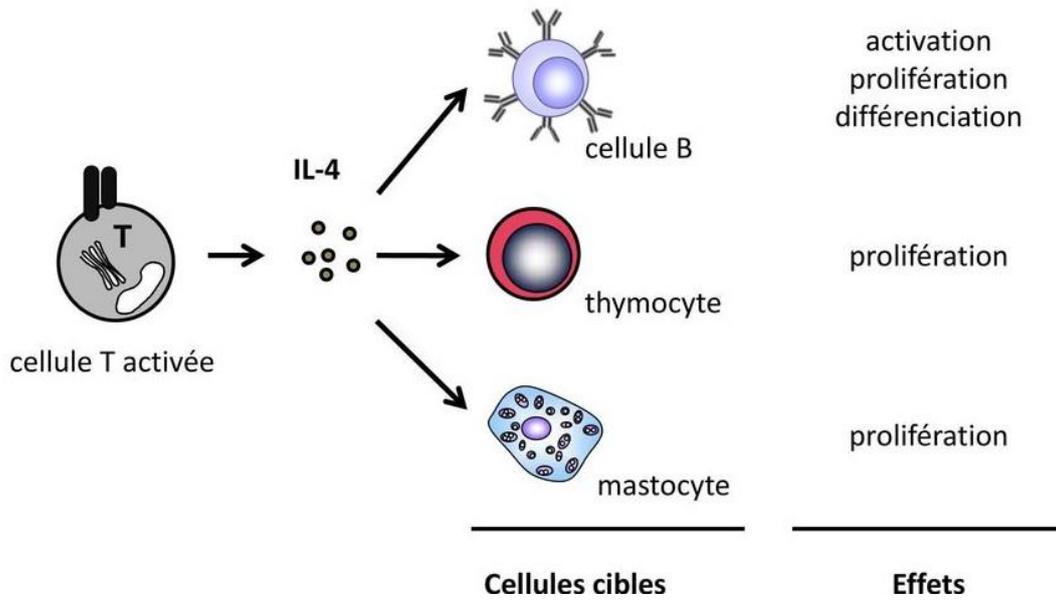


Figure 9: Effets pléiotropes (67)

L'IL-4 sécrétée par la cellule T activée, exerce son effet sur des cellules très différentes et induit des changements divers.

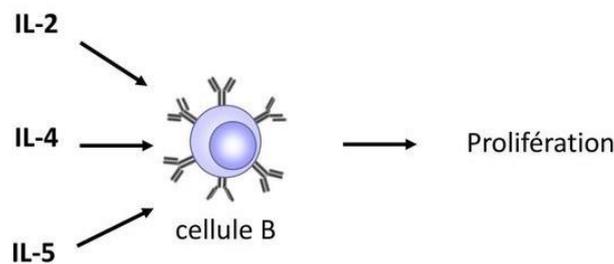
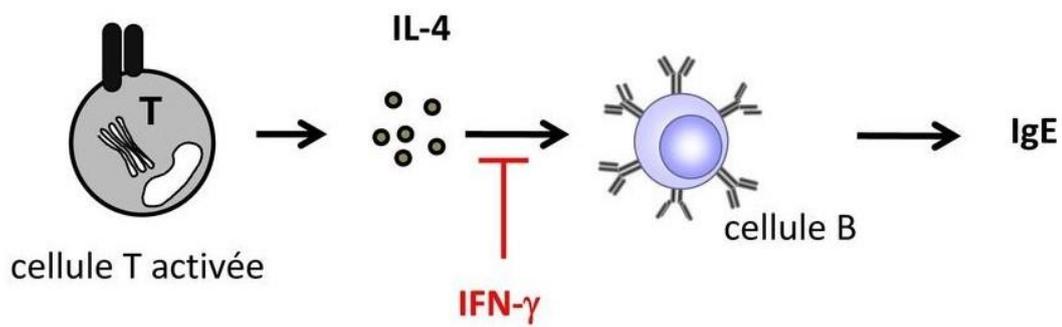


Figure 10: Effet redondant (67)

Un même effet est obtenu par différentes cytokines se fixant chacune sur leur récepteur spécifique.



L' IFN- γ inhibe la production d'IgE induite par l'IL-4.

Figure 11: Effet antagoniste (67)

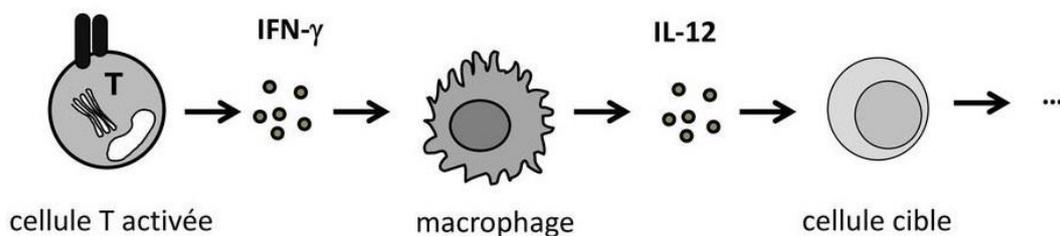


Figure 12: Effet en cascade (67)

La plupart des cytokines entraînent des réactions en cascade en induisant la production d'une autre cytokine par les cellules cibles.

2.11.4. Cytokines analysées au cours de notre étude

Il existe plus d'une centaine de cytokines. Les cytokines énumérées ci-dessous sont celles qui ont fait l'objet de notre étude.

2.11.4.1. TNF- α

Le facteur alpha de nécrose tumorale (TNF- α) est produit principalement par les macrophages et les monocytes mais aussi par certains LT (lorsque ceux-ci sont activés en réponse aux agents pathogènes). C'est une cytokine pléiotropique et médiatrice importante de l'inflammation aiguë. Il permet le recrutement des neutrophiles et des macrophages vers les sites infectieux en stimulant la production des molécules d'adhésion et des chimiokines (des cytokines

chimiotactiques) par les cellules endothéliales. Le TNF- α agit également sur l'hypothalamus pour déclencher la fièvre et favorise également la production des protéines de la phase aiguë (PPA). Le TNF joue un rôle crucial dans l'immunité contre les infections à *M. tuberculosis*. En effet, le contrôle de cette infection requiert la formation de granulomes, qui sont des agrégats cellulaires hautement organisés (cellules multinucléées, macrophages et lymphocytes Th1), et le TNF est primordial pour la formation et le maintien de ces granulomes (64, 68).

2.11.4.2. IL-10

L'IL-10 est produite par les macrophages activés et les cellules T régulateurs (Treg). C'est principalement une cytokine inhibitrice. Elle inhibe la production d'IFN- γ par les cellules Th1, ce qui oriente les réponses immunitaires vers un type Th2. Elle inhibe également la production de cytokines par les macrophages activés ainsi que l'expression du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) de classe II et des molécules de co-stimulation par ces mêmes macrophages, ce qui entraîne une diminution des réponses immunitaires. En d'autres termes, c'est une cytokine anti-inflammatoire qui permet la régulation de la réaction inflammatoire. En revanche, des études ont montré que dans l'infection à MTB, l'IL-10 pourrait jouer un rôle important dans le processus de maturation des phagosomes. En effet, lorsqu'il est fortement induit, l'IL-10 réduirait la réponse protectrice au MTB ; ce qui favoriserait la survie et la croissance des bacilles (64, 69).

2.11.4.3. INF- γ

L'interféron gamma est une cytokine importante produite majoritairement par les cellules Th1, bien qu'il puisse également être produit, dans une moindre mesure, par les cellules T cytotoxiques et les cellules NK. Il a de nombreux effets à la fois sur l'immunité innée et sur l'immunité adaptative (64). Dans l'infection à *M. tuberculosis* l'INF- γ est une cytokine essentielle dans l'activation des macrophages, permettant ainsi une action protectrice contre le bacille (17). Également, c'est un puissant inducteur de l'expression du CMH de classe II.

2.11.4.4. IL-2

L'IL-2 est produite par les cellules Th, mais peut aussi être produite, dans une moindre mesure, par les cellules T cytotoxiques. C'est le principal facteur de croissance des cellules T. Elle favorise également la croissance des cellules B et peut activer les cellules NK et les monocytes.

L'IL-2 agit sur les cellules T sur un mode autocrine. L'activation des cellules T se traduit par l'expression de l'IL-2R (récepteur de l'IL-2), et la production d'IL-2. L'IL-2 se lie à l'IL-2R et favorise la division cellulaire. Lorsque les cellules T ne sont plus stimulées par l'antigène, l'IL-2R finira par être dégradé et la phase de prolifération se terminera. Au repos, les cellules T ne produisent pas de cytokines et n'expriment pas non plus leurs récepteurs (les IL-2R sont absents). Le contact des cellules T à l'antigène lié au CMH-II va conduire à l'expression de récepteurs de haute affinité pour l'IL-2R ainsi qu'à l'induction de la synthèse et sécrétion d'IL-2, d'IL-4 ... Ces cytokines se lient à leurs récepteurs et les cellules prolifèrent. Quand la stimulation par les interleukines diminue (par exemple lorsque la stimulation antigénique diminue), les récepteurs sont moins exprimés et la phase proliférative s'achève (64).

2.11.4.5. IL-4

L'IL-4 est une cytokine pléiotropique, produite par les macrophages et les cellules Th2. Elle stimule le développement des cellules Th2 à partir des cellules Th naïves et favorise la croissance des cellules Th2 différenciées conduisant à la production d'une réponse d'anticorps. Elle stimule également la commutation de classe des Ig vers l'isotype IgE. L'IL-4 est une cytokine inhibitrice de la réponse Th1 par la régulation à la baisse de l'IL-12 ; inhibant ainsi la différenciation des cellules de types Th1. Il est capable de bloquer ou de supprimer les cytokines dérivées des monocytes, notamment l'IL1, le TNF- α , l'IL6, l'IL8 et la protéine inflammatoire des macrophages (MIP)-1 α (64, 70).

2.11.4.6. IL-17

L'IL-17 est une cytokine pro-inflammatoire d'environ 150 acides aminés. La famille de l'IL-17 comprend six membres qui partagent une homologie de séquence mais ont une expression tissulaire différentielle. L'IL-17 est produite par les cellules Th17 et sa surexpression est associée à des maladies auto-immunes telles que la sclérose en plaques, l'arthrite rhumatoïde et la maladie inflammatoire de l'intestin (64).

2.11.4.7. IL-6

L'IL-6 est une cytokine pléiotropique, produite par les cellules endothéliales, musculaires lisses et immunitaires (cellules T et B, neutrophiles et monocytes). Dans l'immunité innée, elle module l'hématopoïèse, l'accumulation de PN neutrophiles sur le site infectieux à travers le contrôle de la granulopoïèse. Dans l'immunité adaptative, l'IL-6 intervient dans la régulation des

lymphocytes T et des lymphocytes B. L'IL-6 favorise la différenciation des cellules T naïves en lymphocytes Th17 pro-inflammatoires aux dépens des lymphocytes T régulateurs. L'IL-6 est également impliquée dans la prolifération, la survie des cellules T et la régulation de leur production cytokinique. Elle contrôle aussi la survie, l'expansion et la maturation des cellules B en plasmocytes. Le rôle biologique de l'IL-6 dans l'immunité innée et adaptative est confirmé par des réponses antivirales, antiparasitaires et antibactériennes défectueuses lors d'un déficit. Les principaux rôles homéostatiques et immunitaires contrôlés par l'IL-6 se font principalement par la voie classique. L'IL-6 favorise la production de protéine de la phase aigüe (PPA) par les hépatocytes (68, 70).

3. MATERIELS ET METHODES

3.1. Cadre et site d'étude

L'étude a été menée au centre universitaire de recherche clinique (UCRC).

L'UCRC est une initiative entre le Ministère de la Santé et du développement social, le ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche scientifique à travers l'Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako (USTTB), et l'Institut National d'Allergie et des Maladies Infectieuses des Etats-Unis d'Amérique (NIAID). Cette collaboration a pour but d'améliorer les infrastructures et les ressources nécessaires pour faciliter la recherche. Il fournit des capacités de recherche de base et du personnel à la recherche scientifique, à la régulation, à la gestion des données, la pharmacie et les travaux de laboratoire (avec une unité d'Immunologie, communément appelé ImmunoCore, une unité de biologie moléculaire et de génomique, une unité d'hématologie et de biochimie, un laboratoire de niveau de sécurité 3 (BSL3) pour le diagnostic de la tuberculose et les fièvres hémorragiques. Notre étude s'est déroulée plus précisément au sein du laboratoire ImmunoCore de l'UCRC.

3.2. Type et population d'étude

Notre travail fait partie d'une étude de cohorte prospective en cours ayant pour objectif d'enrôler les participants faisant une tuberculose pulmonaire active et/ou latente à Bamako. Ici, nous nous sommes axés sur deux groupes d'individus (hommes et femmes) âgés de 18 ans et plus, faisant une TB pulmonaire active bactériologiquement confirmée.

3.3. Période d'étude

Notre collecte a été réalisée sur une année ; de janvier 2022 à décembre 2022.

3.3.1. Echantillonnage

Nous avons analysé les échantillons de sérum et de plasma déjà conservés dans la banque d'échantillons. L'étude s'est focalisée sur la détermination des concentrations hormonales (testostérone chez les hommes et l'œstradiol chez les femmes) de chaque patient avant la prise des médicaments antituberculeux de première ligne (J0) ainsi qu'au sixième mois du traitement qui est la fin du traitement (M6) ; par conséquent, deux (2) échantillons analysés par patient. La même approche a été entreprise pour le dosage des cytokines inflammatoires au cours du traitement (J0 et M6). Les participants éligibles pour cette étude étaient au nombre de 40 (respectivement 20 hommes et 20 femmes). Sur ces 40, les participants ayant effectué les deux visites ont été inclus dans notre étude.

3.3.1.1. Critères d'inclusion

Les participants volontaires inclus dans cette étude avaient les caractéristiques suivantes :

- accepter de participer à l'étude de façon libre et éclairée ;
- adultes âgés de 18 ans au moins faisant une tuberculose pulmonaire active ;
- infection due à une souche de *M. tuberculosis*, bactériologiquement confirmée et sensible aux médicaments de première ligne ;
- naïfs de traitement antituberculeux ;
- sérologie négative au VIH ;
- taux d'hémoglobine $\geq 8\text{g/dL}$.

3.3.1.2. Critères de non-inclusion

Tout patient ne répondant pas aux critères d'inclusion, tel que :

- refus de participer à l'étude ;
- patients âgés de moins de 18 ans ;
- TB pulmonaire à bactériologie négative (TB pulmonaire négative) et TB extra pulmonaire ;
- femmes enceintes ;
- personnes non consentantes ;
- patients ayant débuté un traitement antituberculeux ;
- sérologie positive au VIH ;
- taux d'hémoglobine $< 8\text{g/dL}$.

Au total, 40 échantillons ont été testés pour chaque sexe, soit un total de 80 échantillons analysés.

3.3.1.3. Variables mesurées

Variabes mesurées sont les suivantes :

- caractéristiques sociodémographiques et cliniques ;
- taux de testostérone et d'estradiol ;
- concentration des cytokines ;
- charge bactérienne dans le crachat.

3.4. Méthodes de laboratoire

3.4.1. Prélèvement

Le sang total prélevé chez les participants de l'étude a été collectionné dans des tube sec SST

(Tube Séparateur Serum ; Cat#367955) pour la sérologie du VIH, le dosage des cytokines et des hormones sexuelles.

L'urine a aussi été collecté chez toutes les femmes avant leur inclusion pour le test de grossesse. Des échantillons d'expectorations (crachat) ont été également recueillis dans une cupule stérile lors des trois (3) visites.

3.4.2. Diagnostic du VIH

Au niveau du laboratoire ImmunoCore de l'UCRC, le dépistage du VIH se fait selon le protocole ou algorithme suivant :

- premier test utilisé : Test rapide Alere Combo™ HIV-1/2 (Abott) ;
- deuxième test utilisé en cas de positivité au premier test : Genscreen™ ULTRA HIV Ag-Ac (Biorad) ;
- troisième test utilisé en cas de positivité du deuxième test : New Lav-Blot I/II (Biorad).

Le principe et un résumé des protocoles pour faire ces tests sont présentés dans les sections ci-dessous.

3.4.2.1. Test rapide Alere Combo™ HIV-1/2

C'est un test immunologique qualitatif in vitro rapide permettant de détecter les anticorps dirigés contre le VIH de type 1 (VIH-1) et de type 2 (VIH-2). Ce test a été effectué avec les échantillons de sérum obtenus après centrifugation du sang total (tube SST) à 1000 x RCF (g) pendant 15 minutes. Ensuite nous avons collecté le sérum dans des cryotubes de 1,5 mL, puis 50 µL était déposé sur la zone de dépôt des échantillons. Pendant 15 minutes, le sérum migrait à travers la bandelette, il se mélangeait avec le conjugué d'antigène. Ce mélange continuait de migrer vers les antigènes recombinants et les peptides synthétiques fixés au site de la fenêtre de lecture des résultats du patient. Si des anticorps anti-VIH-1 et/ou VIH-2 sont présents dans l'échantillon, les anticorps se lient aux antigènes fixés à la fenêtre du patient, formant une ligne rouge. Si les anticorps au VIH-1 et/ou au VIH-2 sont absents, aucune liaison ne se produit et aucune ligne rouge ne se forme à la fenêtre du patient. Pour garantir la validité du test, une barre de témoin procédurale est incorporée dans le dispositif de test. Les échantillons positives sont retestés par le test de Genscreen.

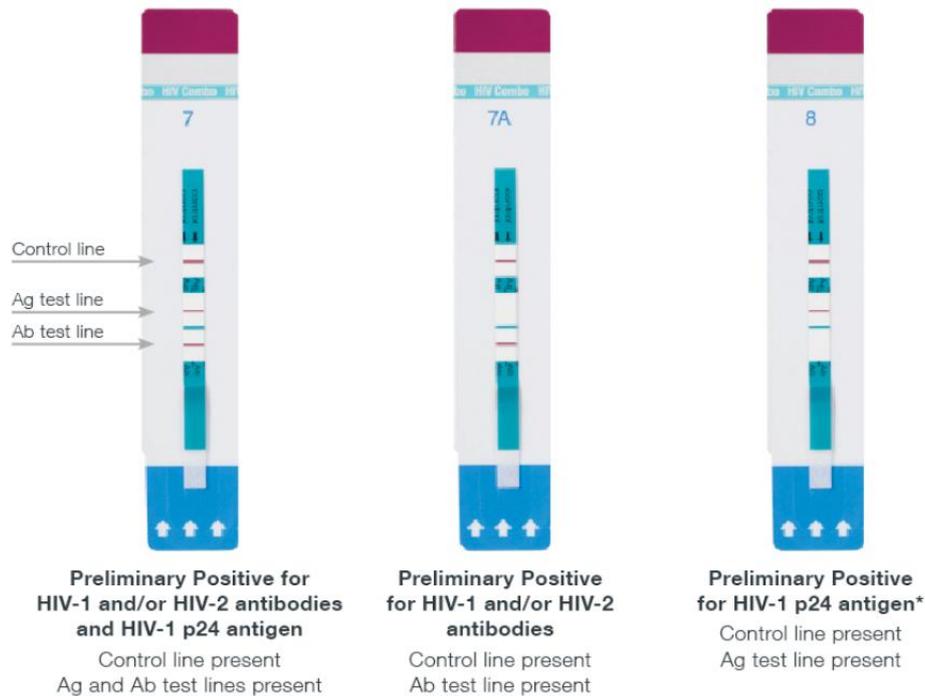


Figure 13: Exemple de résultats obtenues à l'aide du test Alere Determine™ HIV-1/2 COMBO (71)

3.4.2.2. Genscreen™ ULTRA HIV Ag-Ac

3.4.2.2.1. Définition et principe

Le Genscreen™ ULTRA HIV Ag-Ac est une technique immuno-enzymatique basée sur le principe immunoabsorption enzymatique ; Enzyme Linked Immunosorbant Assay (ELISA) sandwich pour la détection de l'antigène (Ag) du VIH et des différents anticorps (Ac) associés aux virus VIH-1 et/ou VIH-2, dans le sérum ou le plasma sanguin. La phase solide est préparée avec des anticorps monoclonaux dirigés contre l'antigène p24 du VIH-1, des antigènes purifiés tel que la protéine gp160 recombinée, un peptide synthétique mimant un épitope spécifique du virus VIH-1 groupe O totalement artificiel (c'est à dire codé par aucun virus existant) ainsi qu'un peptide mimant l'épitope immunodominant de la glycoprotéine d'enveloppe du virus VIH-2. Les conjugués sont préparés avec des Ac polyclonaux biotinylés contre l'Ag VIH (conjugué 1) et avec de la streptavidine et des antigènes VIH marqués à la peroxydase (peptides gp41 et gp36 mimant les épitopes immunodominants des glycoprotéines d'enveloppe des virus VIH-1 et VIH-2, et le même peptide synthétique mimant un épitope spécifique du virus VIH-1 groupe O totalement artificiel comme celui utilisé dans la phase solide) (conjugué 2).

3.4.2.2.2. Procédure

Elle a été réalisée selon les recommandations du fabricant (voir **Annexe 1**).

3.4.2.3. New Lav-Blot I/II

3.4.2.3.1. Principe

Le New Lav Blot est une technique de Western Blot utilisée pour confirmer Le type de VIH. Elle est basée sur une technique d'ELISA indirecte sur une bandelette de nitrocellulose contenant toutes les protéines constitutives du VIH-1 ou du VIH-2 et un contrôle interne anti-IgG. La bande correspondant au contrôle interne est localisée sur l'extrémité de la bandelette sans aucun numéro, avant la réaction p18 pour le VIH-1 et p16 pour le VIH-2, et permet de valider l'ajout de l'échantillon et des réactifs ainsi que le bon déroulement de la procédure. Les protéines VIH-1 ou du VIH-2 inactivées sont séparées selon leur masse moléculaire par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dans un milieu de dissociation et de réduction et ensuite transférées électriquement sur une feuille de membrane de nitrocellulose. (64)

3.4.2.3.2. Procédure

La procédure d'analyse est décrite en **Annexe 2**.

3.4.3. BD™ CBA (Cytometric Bead Array) pour le dosage des cytokines inflammatoires

BD™ Cytometric Bead Array (CBA) est une méthode de cytométrie en flux qui permet de quantifier plusieurs protéines simultanément. Le kit BD™ CBA est un test d'immunofluorescence directe, basé sur le principe de la liaison en sandwich proche de celui de l'ELISA sandwich.

3.4.3.1. Principe

Des billes de fluorescences connues sont décorées avec des anticorps spécifiques de chaque cytokine à doser, ces complexes sont appelés « billes de capture ». Les billes de capture sont mises en présence de l'échantillon, elles vont alors fixer les cytokines par leurs anticorps. Un second anticorps (anticorps de détection) conjugué à la phycoérythrine (PE) et spécifique de la même cytokine est ajouté. Après incubation, des complexes sandwich (bille de capture + cytokine + réactif de détection) se forment. Ces complexes sont mesurés à l'aide de la cytométrie en flux. Et l'intensité de la fluorescence PE de chaque complexe sandwich est alors proportionnelle à la quantité de cytokine capturée par la bille. Les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel FCAP Array™ (72).

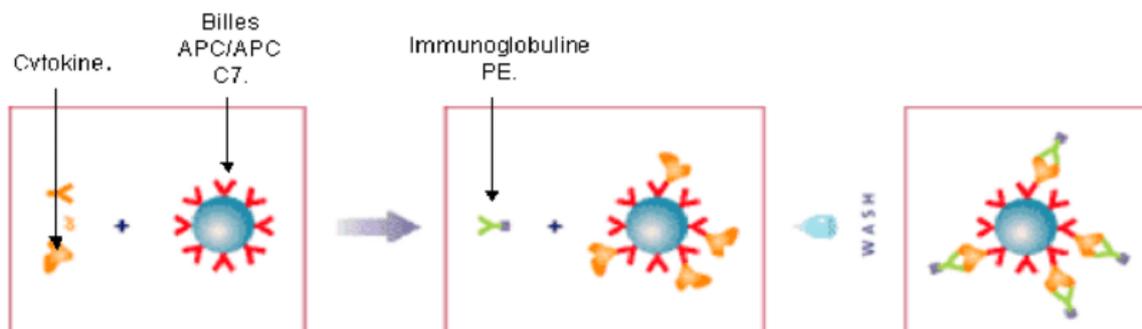


Figure 14: Principe du test CBA.

3.4.3.2. Equipements, matériel et réactifs

✓ Equipements

BDTMLSR II et un ordinateur (figure 15)

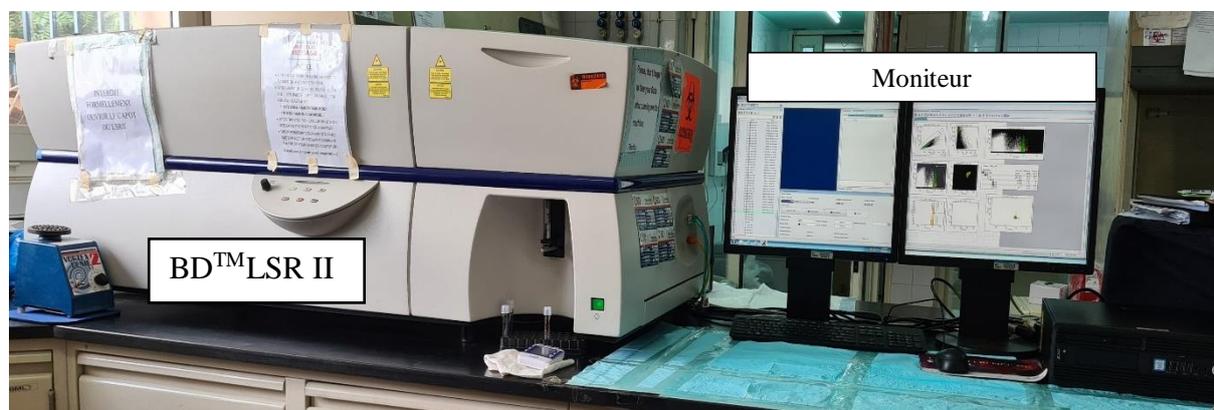


Figure 15: Cytomètre BDTMLSR II utilisé pour cette étude.

✓ Matériels

- Pipettes (10 μ l, 200 μ l, 1000 μ l) et embouts ;
- Tubes Falcon® jetables, dimension : 12 \times 75 mm (tubes à essai en polystyrène avec capuchon) ;
- Vortex mixer et papier aluminium ;
- Tubes coniques en polypropylène de 15 ml ;
- Centrifugeuse eppendorf (Model 5810R)

✓ Réactifs (Voir Annexe 3)

3.4.3.3. Procédure du BDTM CBA human Th1/Th2/Th17

Le dosage des cytokines a été fait selon les recommandations du fabricant. La procédure a été faite en trois phases. La première phase a consisté à préparer les standards de cytokines Th1/Th2/Th17. Il s'agit des protéines recombinantes lyophilisées (7 boules) et reconstitués avec

du diluant. Le mélange obtenu a été dilué du plus concentré au moins concentré (dilution en série) à l'aide du même diluant. En phase deux, nous avons préparé des billes de capture de cytokines Th1/Th2/Th17, qui est un mélange de billes de capture spécifiques. Enfin, la phase de réalisation du dosage des cytokines humaines Th1/Th2/Th17 (phase trois). Toute cette procédure se termine par l'acquisition des échantillons sur le cytomètre en flux (LSR II) et l'analyse des données à l'aide du logiciel FCAP Array. La procédure de préparation des échantillons est décrite en **Annexe 3**.

3.4.4. Dosage des hormones

Pour le dosage des hormones nous avons utilisé le test ELISA compétitif. Il s'agit d'un test immunologique qui permet la détection ou le dosage de molécules (généralement des protéines) dans un échantillon biologique. La testostérone (pour les hommes) et l'estradiol (pour les femmes) sont les deux hormones dosées au cours de cette étude. Le principe du test ELISA de compétition et la procédure d'analyse de ces deux hormones sont décrits en bas.

3.4.4.1. Dosage de la testostérone

3.4.4.1.1. Principe

Le kit ELISA de testostérone est un dosage immuno-enzymatique en phase solide basé sur le principe de la liaison compétitive. Les puits de micro-titrage sont recouverts d'un anticorps monoclonal (de souris) dirigé contre un site antigénique de la molécule de testostérone. Pendant la première incubation, la testostérone dans l'échantillon entre en compétition avec l'enzyme conjuguée ajoutée, qui est de la testostérone conjuguée au peroxydase raifort (HRP), pour se lier à l'anticorps enrobé. Après une étape de lavage pour éliminer toutes les substances non liées, la phase solide est incubée avec la solution de substrat. La réaction colorimétrique est arrêtée par addition de solution d'arrêt, et la densité optique (DO) du produit jaune résultant est mesuré. L'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la concentration de l'analyte dans l'échantillon (45).

3.4.4.1.2. Mode opératoire

Le mode d'opération a été fait selon les recommandations du fabricant. Les détails de la procédure sont décrits dans l'**Annexe 4**.

3.4.4.2. Dosage de l'estradiol

3.4.4.2.1. Principe

Le kit Calbiotech, Inc. Estradiol (E2) ELISA est basé sur le principe du dosage de liaison compétitive retardée entre E2 dans l'échantillon à tester et le conjugué enzymatique E2 pour une quantité constante d'épitopes d'anticorps monoclonaux anti-Estradiol (réactif biotine). Au cours de l'incubation, le réactif biotine anticorps anti-E2, les standards, les contrôles et les échantillons sont incubés pendant 45 minutes à température ambiante (TA), puis le conjugué enzymatique E2 est ajouté au-dessus du mélange réactionnel et l'incubation se poursuit pendant 45 minutes de plus. Pendant l'incubation, une quantité fixe d'E2 marqué à la HRP entre en compétition avec l'E2 endogène dans le sérum standard, l'échantillon ou le contrôle de qualité pour un nombre fixe de sites de liaison de l'anticorps E2 spécifique. Le conjugué de peroxydase E2 lié immunologiquement au puits diminue progressivement à mesure que la concentration d'E2 dans l'échantillon augmente. Le réactif anti-Estradiol biotine non lié et le conjugué peroxydase E2 sont ensuite éliminés et les puits sont lavés. Ensuite, une solution de réactif TMB est ajoutée et incubée à la température ambiante pendant 20 minutes, ce qui entraîne le développement d'une couleur bleue. Le développement de la couleur est arrêté par addition de solution d'arrêt, et l'absorbance est mesurée par spectrophotométrie à 450 nm. Une courbe d'étalonnage est obtenue en traçant la concentration de l'étalon en fonction de l'absorbance (49).

3.4.4.2.2. Mode opératoire

Le mode d'opération a été fait selon les recommandations du fabricant. Les détails de la procédure sont décrits dans l'**Annexe 5**.



Figure 16: Spectrophotomètre (SpectraMax Plus 384) utilisé pour cette étude.

3.5. Gestion et analyse des données

Les paramètres sociodémographiques, comportementaux, bactériologiques, et cliniques de chaque participant ont été enregistrés sur un fichier électronique à l'aide du logiciel REDCap (Research Electronic Data Capture) par les cliniciens de l'étude centrale. Ces données ont été exportées sur Microsoft Excel (Office 10). De même, les données sur les hormones et les cytokines étaient transférées, respectivement du logiciel SoftMax Pro 7 version 7.0.3 et FCAP (Flow Cytometric Analysis Program) Array, sur un fichier Excel. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 9 : pour comparer les profils hormonaux chez les patients atteints de TBP avant et après les traitements, un test de classement signé par paires appariées non paramétrique de Wilcoxon a été utilisé (nonparametric, Wilcoxon matched-pairs signed rank test). Pour la comparaison des cytokines inflammatoires entre le groupe des hommes et celui des femmes, un test de classement non apparié non paramétrique de Mann-Whitney a été utilisé (Nonparametric, Mann-Whitney test. Compare ranks). La corrélation entre les taux d'hormones et de cytokines ont été analysées par des méthodes non paramétriques de Spearman. La signification statistique a été déduite pour les valeurs de $P < 0,05$.

3.6. Considérations éthiques

Les données et les échantillons traités au cours de cette thèse ont tous été obtenus à partir d'un protocole de recherche clinique approuvé par le comité d'éthique de l'USTTB (N°2020/197/CE/FMOS/FAPH). Nous avons pris soin de respecter les bonnes pratiques cliniques (BPC) et de laboratoires (BPL) au niveau de toutes les procédures de laboratoire. Un consentement éclairé et écrit a été obtenu de chaque participant.

3.7. Définition opératoire

Indice de masse corporelle (IMC) est une mesure simple du poids par rapport à la taille couramment utilisée pour estimer l'insuffisance pondérale, le surpoids et l'obésité chez l'adulte. Il correspond au poids divisé par le carré de la taille, exprimé en (Kg/m^2). Chez l'adulte ces paramètres sont définis comme suit :

insuffisance pondérale ($\text{IP} < 18,5 \text{ Kg}/\text{m}^2$) ; IMC normale ($18,5 < \text{IMC} < 24,9 \text{ Kg}/\text{m}^2$) ; surpoids ($25 - 29,9 \text{ Kg}/\text{m}^2$) ; obésité modérée ($30 - 39,9 \text{ Kg}/\text{m}^2$) ; obésité sévère ($\geq 40 \text{ Kg}/\text{m}^2$).

4. RESULTATS

4.1. Résultats globaux

Globalement, nous avons obtenu les résultats suivants :

- Nous avons travaillé sur 40 volontaires, hommes et femmes à nombre égale.
- L'âge moyen des participants de notre étude était de 30,7 ans pour les hommes et 25,6 ans pour les femmes.
- Les taux de testostérone et d'estradiol étaient significativement plus élevés après 6 mois de traitement (M6) par rapport à J0, respectivement chez les hommes ($p < 0,0001$) et les femmes ($p = 0,0083$).
- Nous avons observé que le taux de testostérone était inversement proportionnel aux différentes charges bactériennes.
- Également, une relation statistiquement inversée et significative a été observée entre la testostérone et IL-6 ($p = 0,0001$; $r = - 0,5981$) ainsi que IFN- γ ($p = 0,0001$; $r = - 0,7313$).

4.2. Résultats analytiques

Tableau VI: Caractéristiques sociodémographiques des participants de l'étude

<i>Caractéristiques</i>	<i>Total</i> <i>n = 40</i>	<i>Homme</i> <i>n = 20</i>	<i>Femme</i> <i>n = 20</i>
	N (%)	N (%)	N (%)
Age			
18- 24	14 (35)	3 (15)	11 (55)
25- 34	18 (45)	11 (55)	7 (35)
≥ 35	8 (20)	6 (30)	2 (10)
IMC			
Insuffisance pondérale (IP)	18 (45)	9 (45)	9 (45)
Normale	19 (47,5)	11 (55)	8 (40)
Surpoids	3 (7,5)	-	3 (15)
Microscopie			
3X	33 (82,5)	19 (95)	14 (70)
2X	4 (10)	-	4 (20)
1X	3 (7,5)	1 (5)	2 (10)
Résultat du traitement			
Guéri	40 (100)	20 (100)	20 (100)
Echec	-	-	-

Les participants des deux sexes ont été sélectionnés selon des variables sociodémographiques et cliniques communes tels que l'âge, l'IMC, la sérologie VIH, le nombre de bacille détectés par la microscopie (3X, 2X ou 1X) et le résultat du traitement.

Une analyse univariée a été utilisée pour décrire ces caractéristiques en fonction du sexe. Il s'agissait des adultes avec un âge moyen de 30,7 ans pour les hommes et de 25,6 ans pour le sexe opposé. Parmi les jeunes adultes, la tranche d'âge la plus représentée était 25 à 34 ans, avec une prédominance pour le sexe masculin. En revanche, le groupe de 18 à 24 ans était majoritairement représenté par les femmes. Il n'y avait pas de différence entre les deux sexes en ce qui concerne l'IMC faible (<18,5). Cependant, la proportion de participants ayant un IMC normal était plus élevée chez les hommes (55%), tandis que tous les patients en surpoids étaient des femmes (15%). La microscopie a révélé que les hommes avaient en moyenne une charge bactérienne plus élevée que les femmes. La proportion d'individus ayant obtenu la guérison sur la base de la culture au sixième mois était similaire chez les deux sexes.

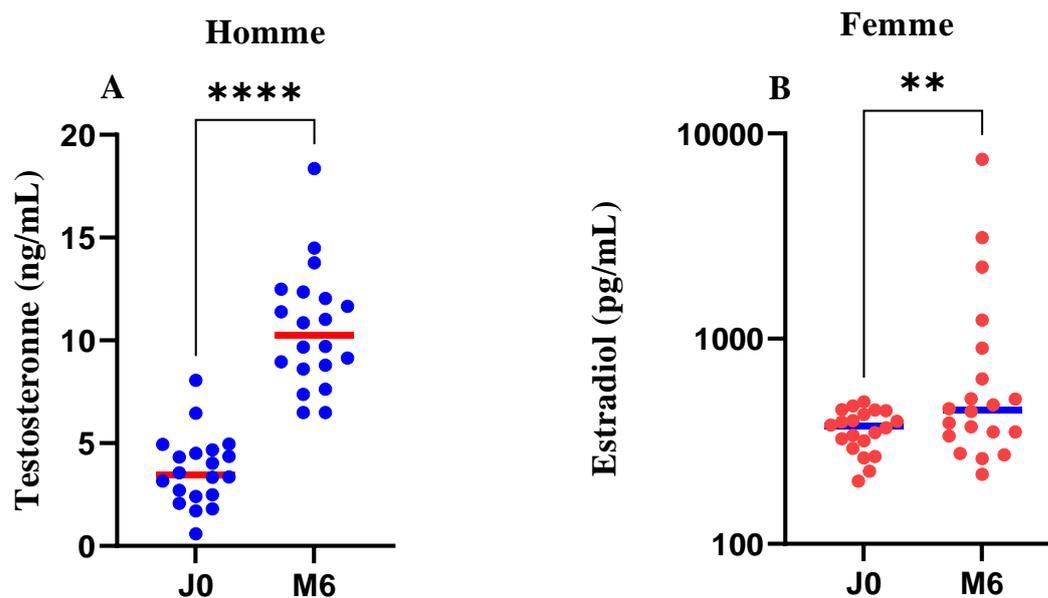


Figure 17: Variation des concentrations des hormones sexuelles chez les participants au cours du traitement antituberculeux

Nous avons mesuré respectivement chez les hommes et les femmes les concentrations de testostérone (A) et d'estradiol (B) au cours du traitement antituberculeux. Nous avons trouvé que le niveau de testostérone était significativement très bas à J0 (avant le traitement) comparé à M6 (la fin du traitement). La concentration de testostérone a doublé à M6 par rapport à J0 ($p < 0,0001$). De même, le taux d'estradiol était également significativement augmenté après 6 mois de traitement par rapport à J0 chez les femmes ($p = 0,0083$).

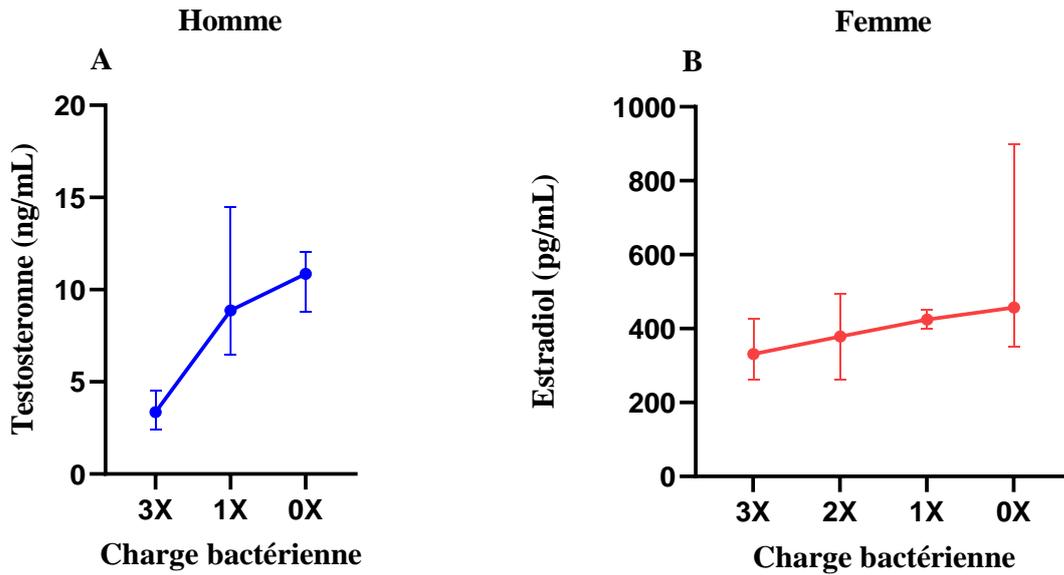


Figure 18: Relation entre les hormones sexuelles et la charge bactérienne des crachats

Nous avons catégorisé les concentrations des hormones sexuelles en fonction de la charge bactérienne obtenue à partir des lames de crachats. Nous avons observé que le taux de testostérone semble être inversement proportionnel à la charge bactérienne. Spécifiquement, les lames avec 3X avaient les concentrations de testostérone les plus faibles. Cependant cette tendance n'est pas évidente entre les niveaux d'estradiol et les différentes charges bactériennes au cours de l'étude.

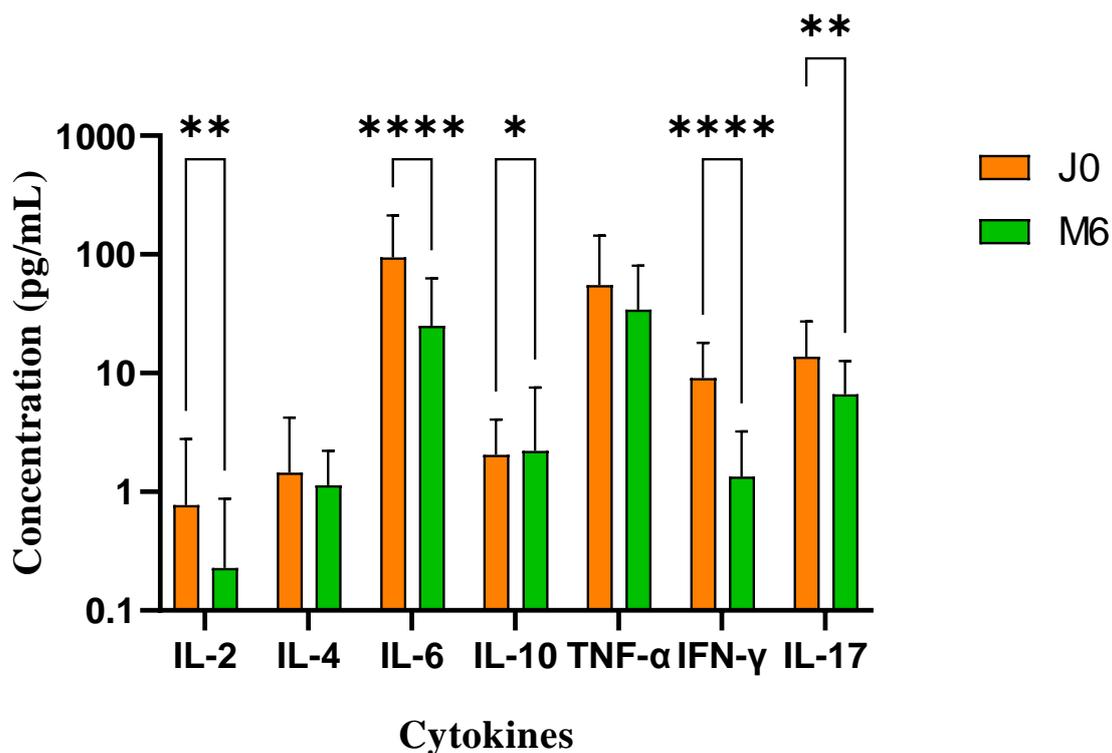


Figure 19: Variation des concentrations des cytokines inflammatoires au cours du traitement antituberculeux

Nous avons comparé les concentrations des cytokines chez les personnes affectées par la TB à J0 (couleur orange) et après 6 mois de traitement (M6) (couleur verte) sans distinction de sexe. Nous avons observé une différence statistiquement significative entre J0 et M6 pour les cytokines suivantes : IL-2 ($p = 0,007129$) ; IL-6 ($p = 0,000017$) ; IL-10 ($p = 0,024556$) ; IFN- γ ($p < 0,000001$) et IL-17 ($p = 0,001116$) qui sont tous des cytokines impliquées dans la réponse inflammatoire.

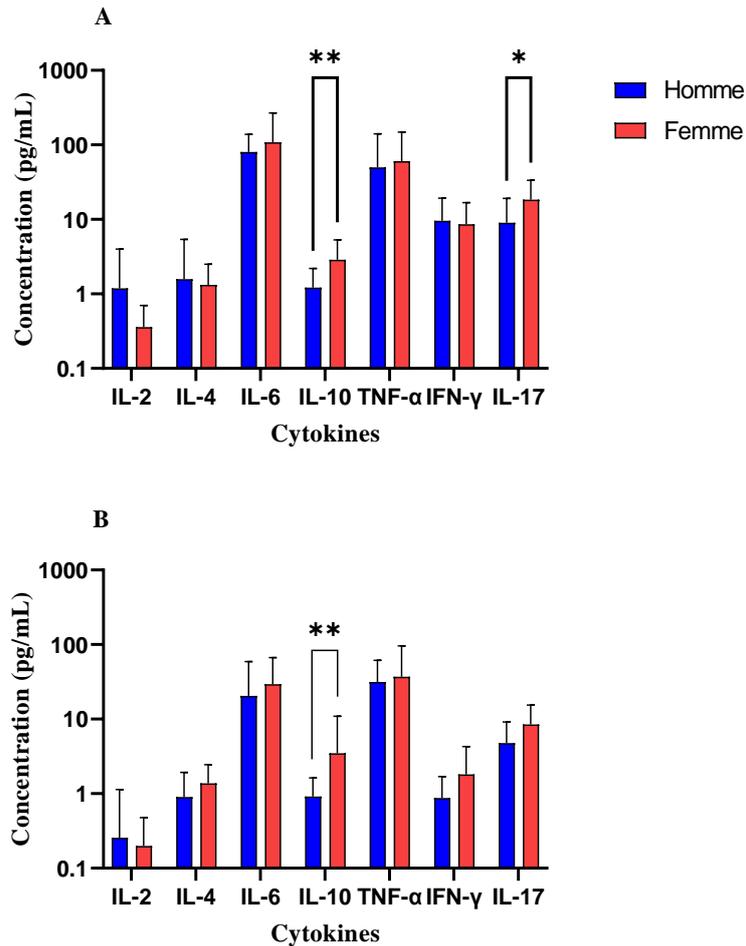


Figure 20: Cytokines inflammatoires au cours du traitement en fonction du sexe.

Nous avons fait une comparaison des concentrations des cytokines inflammatoires selon le sexe du participant avant le traitement (A) et après le traitement (B) contre la tuberculose.

Nous avons observé que l'IL-10 et l'IL-17 étaient statistiquement plus élevées chez les femmes comparées aux hommes (respectivement : $p = 0,001319$; $p = 0,012792$) avant la prise des médicaments (J0). Cependant, après le traitement (M6), seule la différence liée au sexe de l'IL-10 ($p = 0,001902$) est maintenue.

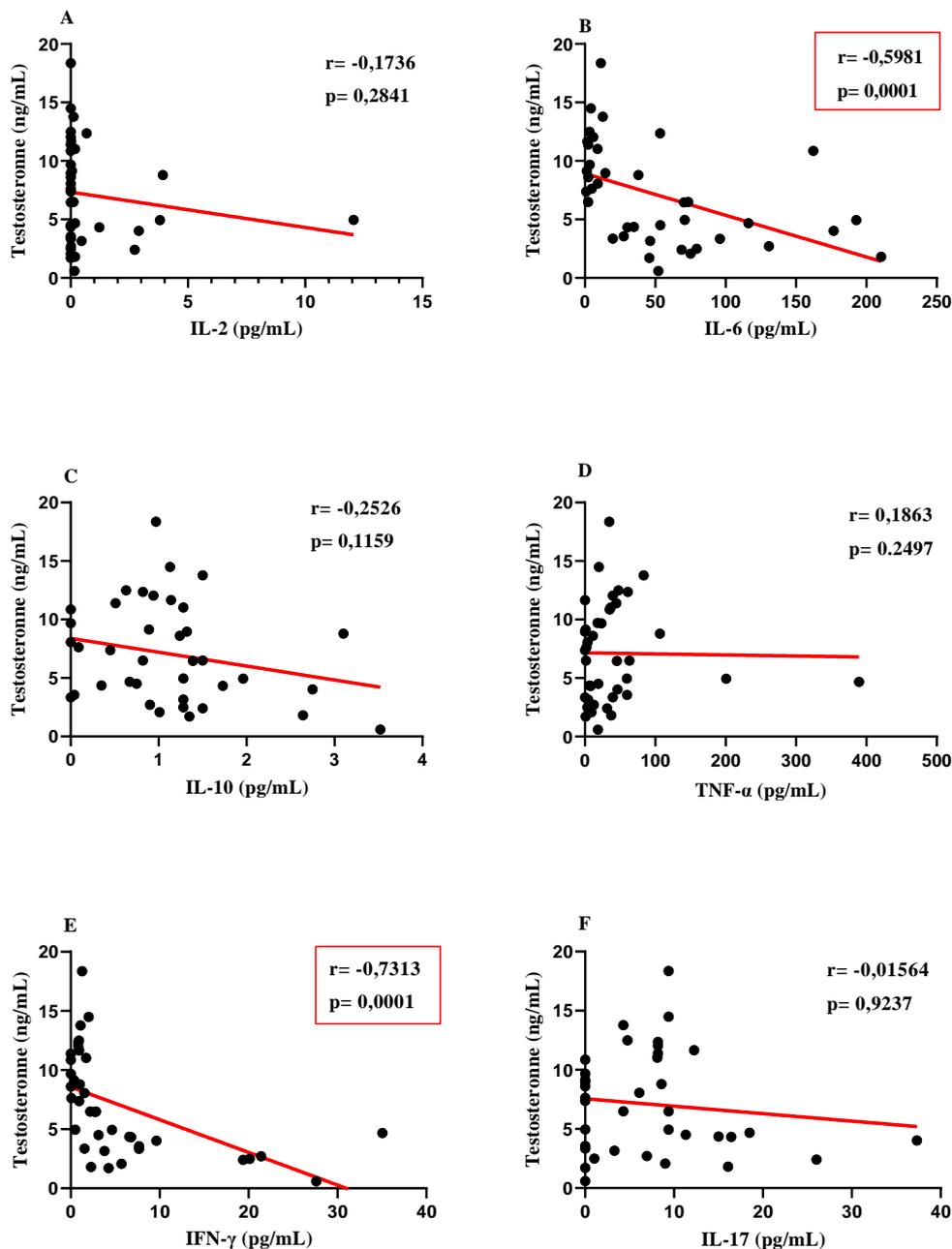


Figure 21: Corrélation entre la testostérone et les cytokines inflammatoires chez les hommes atteints de tuberculose active pulmonaire

Nous avons examiné le lien entre le niveau de la testostérone et les cytokines inflammatoires, à savoir IL-2, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ . et IL-17. Les concentrations de la testostérone sont représentées sur l'axe des ordonnées et celles des cytokines sur l'axe des abscisses. Nous avons observé une corrélation négative et significative entre le niveau de testostérone et deux cytokines associées à la réponse immunitaire contre les mycobactéries à savoir IL-6 (B) ($r = -0,5981$; $p = 0,0001$) et IFN- γ (E) ($r = -0,7313$; $p = 0,0001$).

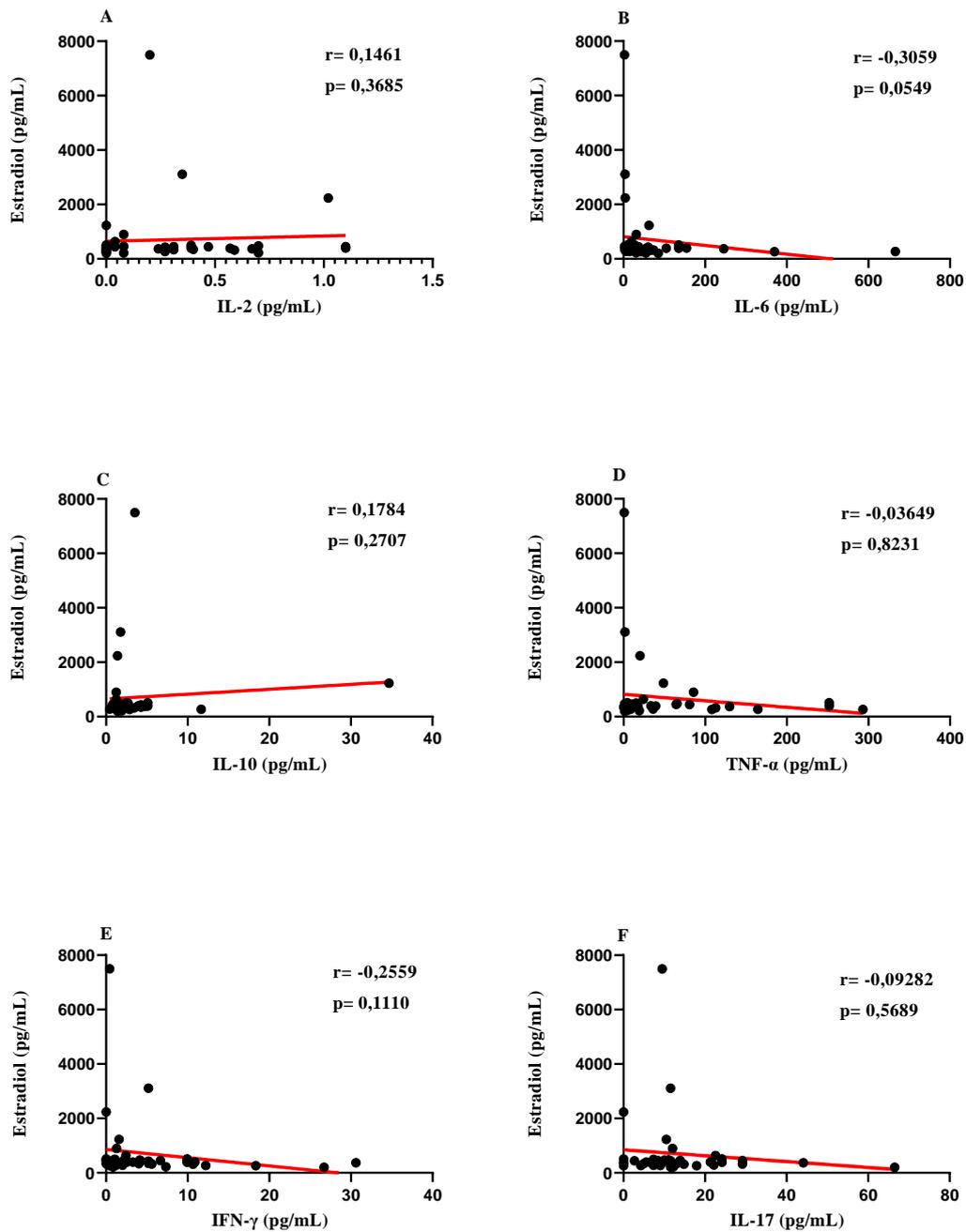


Figure 22: Estradiol et cytokines inflammatoires chez les femmes atteintes de tuberculose active pulmonaire

Comme pour la figure précédente, les concentrations de l'estradiol sont représentées sur l'axe des ordonnées et celles des cytokines sur l'axe des abscisses. Lorsque ces mêmes cytokines ont été mises en relation avec le niveau d'estradiol ; nous n'avons observé aucun lien substantiel entre les deux variables.

5. COMMENTAIRES ET DISCUSSION

Dans le cadre de notre thèse, nous avons suivi des participants atteints de tuberculose pulmonaire active avant l'initiation du traitement et à la fin du traitement soit une période de six mois. Le but de ce travail était d'investiguer les changements hormonaux qui surviennent au cours du traitement antituberculeux chez les hommes et femmes affectés par la tuberculose afin d'étudier l'effet des hormones sexuelles sur la réponse immunitaire lors de la tuberculose. Nos résultats ont révélé une augmentation globale des concentrations de testostérone et d'estradiol au cours du traitement antituberculeux. En plus des hormones, les concentrations de certaines cytokines, notamment IL-6, INF- γ , IL-10, IL-17 et IL-2, changeaient significativement pendant les six mois du traitement. Spécifiquement, des différences liées au sexe ont été notées, pour IL-10 et IL-17. De même, le niveau d'IL-6 et d'INF- γ était négativement corrélé avec le niveau de testostérone, suggérant un rôle anti-inflammatoire de la testostérone au cours de la tuberculose.

L'augmentation du taux de testostérone au cours du traitement antituberculeux dans notre étude avait été reportée par des études antérieures. En effet, au Mali en 2021, Koloma et collègues, avaient trouvé que le niveau de testostérone très faible avant l'initiation du traitement augmentait de façon significative un mois après le début du traitement (6). De plus, une étude de cohorte récente menée en Ethiopie, a également observé une amélioration significative du niveau de testostérone à la fin du traitement antituberculeux (73). Des hypothèses ont été émises pour expliquer les fluctuations des concentrations hormonales au cours de la tuberculose. La première hypothèse est que la forte charge bacillaire pulmonaire entraînerait une réponse inflammatoire excessive qui pourrait avoir des effets préjudiciables pour les tissus pulmonaires. Ainsi, la testostérone connue pour ses propriétés anti-inflammatoires est augmentée en vue de contrôler l'inflammation et prévenir les lésions tissulaires pulmonaires (4). Mais, cette réponse hormonale pourrait aussi induire la multiplication bacillaire par réduction des cytokines pro-inflammatoires et mener à une progression de la maladie. Une autre hypothèse à ce phénomène pourrait être la reprise normale de la fonction testiculaire par la production de testostérone par les cellules de Leydig (74). En effet, une étude menée par Bini et collègues en 2015 a révélé la présence de cytokines inflammatoires tel qu'IL-6, TNF- α dans les testicules humains. Ces médiateurs sont suspectés d'interférer dans la stéroïdogénèse des cellules de Leydig en inhibant la production de testostérone (74).

L'évolution du niveau de testostérone au cours du traitement contre la tuberculose allait dans le sens contraire de la charge bactérienne dans notre étude. Cette observation était consistant avec les résultats menés par Magdy et collègues en Egypte en 2019, qui ont trouvé une forte corrélation négative entre le taux de testostérone et la charge mycobactérienne sur les lames des crachats obtenues chez les hommes affectés par la tuberculose (75).

Le taux médian d'estradiol chez les femmes augmentait significativement à la fin du traitement dans notre étude. Ces données sont alignées avec deux études précédentes qui ont constaté une augmentation du niveau d'estradiol en fin de traitement (73, 76). Le rôle de l'estradiol lors de la tuberculose n'est pas bien connu. Une étude récente a montré que le traitement par l'estradiol des cellules 16HBe infectées par *M. tuberculosis* entraîne une inhibition de la croissance de bacille intracellulaire et la nécrose des cellules hôtes infectées en inhibant l'autophagie, suggérant un rôle protecteur pour l'hormone féminine (77).

Notre étude a montré une corrélation statistiquement inversée entre le taux plasmatique de testostérone et deux cytokines pro-inflammatoires notamment l'IL-6 et l'IFN- γ qui jouent un rôle important dans le mécanisme de défense de l'hôte contre *M. tuberculosis*. Notamment, les souris génétiquement déficientes du gène producteur de l'IFN- γ succombent rapidement à l'infection par *M. tuberculosis* contrairement aux souris sauvages sans déficit de production de cette cytokine (78). Cette corrélation négative entre la testostérone et ces cytokines pourrait indiquer que la testostérone joue un rôle anti-inflammatoire dans la tuberculose maladie comme indiqué plus haut. Ainsi, nous constatons que, d'un côté, la testostérone pourrait avoir un effet bénéfique pour l'organisme, par la prévention d'une lésion tissulaire. Et d'un autre côté, l'effet nocif que pourrait avoir cette hormone, en concourant à une multiplication des bacilles ; altérant ainsi l'état du patient. De ce fait, nos données supportent les deux hypothèses émises plus haut mais le mécanisme reste à élucider.

Nos données sur les taux des cytokines circulantes inflammatoires en fonction du sexe ont montré une différence statistiquement significative pour IL-10 en faveur des femmes avant et après le traitement mais aussi IL-17 lors de la visite initiale (Jour 0). L'IL-10 qui est une cytokine anti-inflammatoire notable est connu pour son rôle immuno-régulateur dans la tuberculose maladie (79). En effet, IL-10 régule négativement la production d'IFN- γ et d'IL-17 (79), deux cytokines essentielles dans l'immunité contre la tuberculose. Le niveau d'IL-10 chez les femmes pourrait expliquer pourquoi les femmes contrôlent mieux l'infection que les

hommes en ayant une réponse immunitaire bien régulée pour éviter les pathologies liées à l'inflammation excessive dans les poumons.

6. Limites de l'étude

Notre étude présente plusieurs points forts mais également des limites qu'il faut discuter :

- La taille de l'échantillonnage était faible car constituée de 40 personnes au total dont 20 hommes et 20 femmes. En plus, cette analyse s'est basée sur les fluctuations hormonales entre les deux sexes avant traitement (J0) et après traitement (M6). Donc, les changements qui pourraient avoir lieu une semaine, un ou deux mois après le traitement n'ont pas été pris en compte dans cette étude.
- La concentration de l'estradiol varie en fonction des phases du cycle menstruel atteignant son niveau maximal pendant l'ovulation. Du coup, nous ne savons pas à quelle période du cycle menstruel l'estradiol a été dosée chez les femmes de notre étude.
- D'autre part, nous n'avons pas pu faire des analyses multivariées pour voir l'effet de certains paramètres tels que le comportement des patients (consommation de cigarette, alcool, profession, la prise d'autres médicaments tel que les contraceptifs oraux chez les femmes), et l'IMC.
- Le test ELISA utilisé pour le dosage des hormones est un test approximatif. Le test idéal pour le dosage des hormones est la spectrométrie de masse qui n'était pas disponible dans notre laboratoire.

7. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

7.1. Conclusion :

Ce travail nous a permis de démontrer une association entre la testostérone et la charge bactérienne, ce qui suggère que la testostérone pourrait jouer un rôle dans la pathogénèse de la tuberculose active pulmonaire mais aussi dans la réponse au traitement au cours de la tuberculose pulmonaire active.

7.2. Recommandations

Aux termes de cette étude et vu les résultats, nous formulons les recommandations suivantes :

❖ **Au laboratoire ImmunoCore de l'UCRC et Partenaires**

- Initier une étude prospective avec un échantillonnage plus large en incluant les participants en échec thérapeutique et/ou avec comorbidités ;
- Augmenter la fréquence de dosage des hormones sexuelles au cours du traitement, en tenant compte du cycle menstruel chez les femmes ;
- Étudier les changements de concentrations de la progestérone au cours du traitement chez les femmes atteintes de tuberculose ;
- Tester les échantillons déjà collectés avec un panel plus large de cytokines et de chemokines à l'aide de la technique multiplex de Luminex ;
- Etudier l'impact des hormones sexuelles sur l'immunité cellulaire en stimulant les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMCs) avec les antigènes du *Mycobacterium* sous la présence ou à l'absence des hormones citées plus haut.

❖ **Au Ministère de la Santé et du Développement Social/ Au CSLS-TBH/ Aux Praticiens**

- Introduire un bilan hormonal (hormones sexuelles) dans le suivi des patients faisant une TBP, avant le traitement et au cours du traitement afin de confirmer la validité externe de cette étude.
- Soutenir le programme UCRC dans la recherche des nouveaux bio marqueurs pour le traitement de la tuberculose pulmonaire au Mali.

8. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Rapport Global de la Tuberculose 2022. <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2022>. Consulté le 12 Juillet 2023.
2. Diarra B, Goita D, Tounkara S, Sanogo M, Baya B, Togo AC, et al. Tuberculosis drug resistance in Bamako, Mali, from 2006 to 2014. *BMC infectious diseases*. 2016;16(1):714.
3. Cellule Sectorielle De Lutte Contre Le VIH/SIDA, La Tuberculose Et Les Hépatites Virales (CSLS-TBH). Rapport Annuel 2021.
4. Bini EI, Mata Espinosa D, Marquina Castillo B, Barrios Payán J, Colucci D, Cruz AF, et al. The influence of sex steroid hormones in the immunopathology of experimental pulmonary tuberculosis. *PloS one*. 2014;9(4):e93831.
5. Lanser L, Burkert FR, Thommes L, Egger A, Hoermann G, Kaser S, et al. Testosterone Deficiency Is a Risk Factor for Severe COVID-19. *Frontiers in endocrinology*. 2021;12:694083.
6. Koloma I. Rôle du Sexe Biologique dans la Réponse Immunitaire contre le Complexe *Mycobacterium tuberculosis*. [Thèse de Pharmacie]. [Mali]. Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako (USTTB); 21P93 ; 2021.
7. Orcau À, Caylà JA, Martínez JA. Present epidemiology of tuberculosis. Prevention and control programs. *Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica*. 2011;29 Suppl 1:2-7.
8. Natarajan A, Beena PM, Devnikar AV, Mali S. A systemic review on tuberculosis. *The Indian journal of tuberculosis*. 2020;67(3):295-311.
9. Gagneux S. Ecology and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature reviews Microbiology*. 2018;16(4):202-13.
10. Shinnick TM, Good RC. Mycobacterial taxonomy. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 1994;13(11):884-901.
11. Songo S. La bédaquiline : un nouveau antituberculeux. *Sciences Pharmaceutiques*. 2019. dumas-02494477.
12. Adigun R, Singh R. Tuberculosis. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; July 11, 2023.
13. Démarche du diagnostic microbiologique d'une tuberculose. 2013. http://campus.cerimes.fr/microbiologie/enseignement/microbiologie_3/site/html/. Consulté le 31 mai 2022.
14. Togo ACG. Le poids de *Mycobacterium africanum* dans la tuberculose pulmonaire au Mali. [Thèse de Médecine]. [Mali]. Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako (USTTB); 13M224 ; 2013.

15. Varaine F, Rich ML. Tuberculose: guide pratique à l'usage des médecins, infirmiers, techniciens de laboratoire et auxiliaires de santé: Médecins sans frontières; 2022. <https://medicalguidelines.msf.org/viewport/TUB/francais/tuberculose-20321162.html>. Consulté le 12 juin 2022.
16. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Transmission and Pathogenesis of Tuberculosis. 2013. <https://www.cdc.gov/tb/education/corecurr/pdf/chapter2.pdf>. Consulté le 14 juillet 2023.
17. Haoues M, Essafi M. The macrophage: chief of tuberculosis immune response Le macrophage: chef d'orchestre de l'immunité anti-tuberculeuse. Archives de l'Institut Pasteur de Tunis. 2012;89(1-4):3-21.
18. Bhalla AS, Goyal A, Guleria R, Gupta AK. Chest tuberculosis: Radiological review and imaging recommendations. The Indian journal of radiology & imaging. 2015;25(3):213-25.
19. Van Dyck P, Vanhoenacker FM, Van den Brande P, De Schepper AM. Imaging of pulmonary tuberculosis. European radiology. 2003;13(8):1771-85.
20. Karembe S. Itinéraire et délai de diagnostic de la tuberculose pulmonaire à bactériologie positive à Bamako, Mali. [Thèse de Médecine]. [Mali]. Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako (USTTB); 20M210 ; 2020.
21. Acharya B, Acharya A, Gautam S, Ghimire SP, Mishra G, Parajuli N, et al. Advances in diagnosis of Tuberculosis: an update into molecular diagnosis of Mycobacterium tuberculosis. Molecular biology reports. 2020;47(5):4065-75.
22. Monvoisin J. Techniques de coloration des mycobactéries. 2016. <https://microbiologiemedicale.fr/coloration-mycobacteries-ziehl-auramine/>. Consulté le 05 Juillet 2023.
23. Guillet-Caruba C, Martinez V, Doucet-Populaire F. [The new tools of microbiological diagnosis of tuberculosis]. La Revue de medecine interne. 2014;35(12):794-800.
24. Karen T. TB testing: new approaches to old scourge. CAP today. 2018. <https://www.captodayonline.com/tb-testing-new-approaches-old-scurge/>. Consulté le 04 juillet 2022.
25. Diel R, Goletti D, Ferrara G, Bothamley G, Cirillo D, Kampmann B, et al. Interferon- γ release assays for the diagnosis of latent Mycobacterium tuberculosis infection: a systematic review and meta-analysis. The European respiratory journal. 2011;37(1):88-99.
26. Toman K. Comment la chimiothérapie antituberculeuse agit-elle? In: Frieden T, ed. La tuberculose d'après K Toman. Dépistage, chimiothérapie et surveillance : questions et réponses, 2 ed. Genève: Organisation Mondiale de la Santé, 2004. p. 82-84.
27. Anthony Harries DM, Stephen Graham. TB/HIV: a clinical manual. 2 ed. World Health Organization (WHO) Library, geneva.2004. 111-9. p.

28. Gentilini M. Tuberculose In: Médecine Tropicale. 5 ed. Paris: Flammarion médecine-sciences; 1993. 315 - 323 p.
29. Coulibaly S. Synthèse et activité antituberculeuse de quelques dérivés de la 1,10-phénanthroline. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2018. Français. NNT : 2018NORMC407ff. fftel-01874704f.
30. Cho T, Khatchadourian C, Nguyen H, Dara Y, Jung S, Venketaraman V. A review of the BCG vaccine and other approaches toward tuberculosis eradication. *Human vaccines & immunotherapeutics*. 2021;17(8):2454-70.
31. Fatima S, Kumari A, Das G, Dwivedi VP. Tuberculosis vaccine: A journey from BCG to present. *Life sciences*. 2020;252:117594.
32. Garly ML, Martins CL, Balé C, Baldé MA, Hedegaard KL, Gustafson P, et al. BCG scar and positive tuberculin reaction associated with reduced child mortality in West Africa. A non-specific beneficial effect of BCG? *Vaccine*. 2003;21(21-22):2782-90.
33. Roth A, Gustafson P, Nhaga A, Djana Q, Poulsen A, Garly ML, et al. BCG vaccination scar associated with better childhood survival in Guinea-Bissau. *International journal of epidemiology*. 2005;34(3):540-7.
34. Butkeviciute E, Jones CE, Smith SG. Heterologous effects of infant BCG vaccination: potential mechanisms of immunity. *Future microbiology*. 2018;13(10):1193-208.
35. Mangtani P, Nguipdop-Djomo P, Keogh RH, Trinder L, Smith PG, Fine PE, et al. Observational study to estimate the changes in the effectiveness of bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccination with time since vaccination for preventing tuberculosis in the UK. *Health technology assessment (Winchester, England)*. 2017;21(39):1-54.
36. Thorson A. Gender Issues in Tuberculosis In: Klein SN, Craig WR, ed. *Sex and Gender Differences in Infection and Treatments for Infectious Diseases*. Springer International Publishing Switzerland; 2015, 231-253 p.
37. Khader SA, Guglani L, Rangel-Moreno J, Gopal R, Junecko BA, Fountain JJ, et al. IL-23 is required for long-term control of Mycobacterium tuberculosis and B cell follicle formation in the infected lung. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2011;187(10):5402-7.
38. Long NH, Johansson E, Lönnroth K, Eriksson B, Winkvist A, Diwan VK. Longer delays in tuberculosis diagnosis among women in Vietnam. *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*. 1999;3(5):388-93.
39. Stárka L, Dušková M. What is a hormone? *Physiological research*. 2020;69(Suppl 2):S183-s5.
40. Hammond GL. Plasma steroid-binding proteins: primary gatekeepers of steroid hormone action. *The Journal of endocrinology*. 2016;230(1):R13-25.

41. Allain P. Pharmacorama. Hormones sexuelles stéroïdiennes. <https://www.pharmacorama.com/pharmacologie/hormones-cytokinesantigenes-anticorps/hormones-sexuelles-steroidiennes/>. Consulté le 05 Juillet 2023.
42. Zirkin BR, Papadopoulos V. Leydig cells: formation, function, and regulation. *Biology of reproduction*. 2018;99(1):101-11.
43. Tostain J, Rossi D, Martin PM. [Physiology of androgens in adult men]. *Progres en urologie : journal de l'Association francaise d'urologie et de la Societe francaise d'urologie*. 2004;14(5):639-60.
44. Shifren JL, Braunstein GD, Simon JA, Casson PR, Buster JE, Redmond GP, et al. Transdermal testosterone treatment in women with impaired sexual function after oophorectomy. *The New England journal of medicine*. 2000;343(10):682-8.
45. MyBioSource. Human testosterone ELISA Kit. <https://www.mybiosource.com/human-elisa-kits/testosterone/494249>. Consulté le 24 octobre 2023.
46. Lang F. Hormones. In: Silbernagl S, Lang F, ed. *Atlas de poche de physiopathologie*. Paris: Lammarion Médecine-Sciences; 2000, 256-296 p.
47. Basaria S. Male hypogonadism. *Lancet (London, England)*. 2014;383(9924):1250-63.
48. Soman M, Huang LC, Cai WH, Xu JB, Chen JY, He RK, et al. Serum androgen profiles in women with premature ovarian insufficiency: a systematic review and meta-analysis. *Menopause (New York, NY)*. 2019;26(1):78-93.
49. Calbiotech. Estradiol ELISA. <https://calbiotech.com/products/estradiol-elisa-1>. Consulté le 24 octobre 2023.
50. Delgado BJ, Lopez-Ojeda W. Estrogen. StatPearls. Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Wilfredo Lopez-Ojeda declares no relevant financial relationships with ineligible companies. StatPearls Publishing. Copyright © 2023, StatPearls Publishing LLC; 2023.
51. Siiteri PK, Murai JT, Hammond GL, Nisker JA, Raymoure WJ, Kuhn RW. The serum transport of steroid hormones. *Recent progress in hormone research*. 1982;38:457-510.
52. Martin B, Rotten D, Jolivet A, Gautray JP. Binding of steroids by proteins in follicular fluid of the human ovary. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1981;53(2):443-7.
53. Jenner MR, Kelch RP, Kaplan SL, Grümbach MM. Hormonal changes in puberty. IV. Plasma estradiol, LH, and FSH in prepubertal children, pubertal females, and in precocious puberty, premature thelarche, hypogonadism, and in a child with a feminizing ovarian tumor. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1972;34(3):521-30.
54. García-Gómez E, González-Pedrajo B, Camacho-Arroyo I. Role of sex steroid hormones in bacterial-host interactions. *BioMed research international*. 2013;2013:928290.

55. Klein SL. The effects of hormones on sex differences in infection: from genes to behavior. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2000;24(6):627-38.
56. Galligan CL, Fish EN. Sex Differences in the Immune Response. In: Klein SN, Craig WR, ed. *Sex and Gender Differences in Infection and Treatments for Infectious Diseases*. Springer International Publishing Switzerland; 2015, 1-29 p.
57. Marc L, Julien T, Christian C, Jean-Louis M. Sex Hormones and Bacterial Infections. In: Raghvendra KD, editor. *Sex Hormones*. Rijeka: IntechOpen; 2012. p. Ch. 10.
58. Straub RH. The complex role of estrogens in inflammation. *Endocrine reviews*. 2007;28(5):521-74.
59. Karpuzoglu E, Phillips RA, Gogal RM, Jr, Ansar Ahmed S. IFN-gamma-inducing transcription factor, T-bet is upregulated by estrogen in murine splenocytes: role of IL-27 but not IL-12. *Molecular immunology*. 2007;44(7):1808-14.
60. Ysrraelit MC, Correale J. Impact of sex hormones on immune function and multiple sclerosis development. *Immunology*. 2019;156(1):9-22.
61. Fox HS, Bond BL, Parslow TG. Estrogen regulates the IFN-gamma promoter. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1991;146(12):4362-7.
62. Gold SM, Voskuhl RR. Estrogen and testosterone therapies in multiple sclerosis. *Progress in brain research*. 2009;175:239-51.
63. Ponvert CI. Les cytokines. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*. 1997;37(1):36-55.
64. Mayer G. Immunology- Chapter Thirteen: Cytokines and Immunoregulation. *Microbiology and Immunology On-line*. 2013.
<https://www.microbiologybook.org/bowers/imm-reg-ver2.htm>. Consulté le 05 Juillet 2023.
65. Blibek K. Etude de la modulation de la NO synthétase 2 par l'extrait des pépins de raisin au cours de l'hydatidose humaine: Impact sur la production du monoxyde d'azote. [Mémoire de Biologie]. Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene (USTHB), Algérie; 2009.
66. Les cytokines ont 20 ans : de la culture cellulaire aux applications thérapeutiques, Didier Fradelizi, *médecine/sciences* 1996 ; 12 : 447-50.
67. Guglielmi L. Les cytokines et leurs récepteurs. <https://docplayer.fr/1740801-Les-cytokines-et-leurs-recepteurs-laurence-guglielmi-laurence-guglielmi-univ-montpl-fri.html>. Consulté le 05 Juillet 2023.
68. Noack M, Kolopp SMN. Cytokines et inflammation: physiologie, physiopathologie et utilisation thérapeutique. *Revue Francophone des Laboratoires*. 2018;2018(499):28-37.

69. O'Leary S, O'Sullivan MP, Keane J. IL-10 blocks phagosome maturation in mycobacterium tuberculosis-infected human macrophages. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2011;45(1):172-80.
70. Opal SM, DePalo VA. Anti-inflammatory cytokines. *Chest*. 2000;117(4):1162-72.
71. Alere™. Alere Determine™ HIV-1/2 Ag/Ab Combo Clinician Training. Octobre 2014.
72. Revol B. Potentiel des cellules dendritiques plasmacytoïdes dans l'immunité anti-tumorale : nature de la réponse T induite par des pDC activées par différents ligands TLR: étude de candidats adjuvants au vaccin immunothérapeutique. *Sciences Pharmaceutiques*. Université Grenoble Alpes; 2011. dumas-00604387.
73. Tsegaye Y, Admassu W, Edao A, Kinde S, Gentu M, Negash M, et al. Alteration of Endocrine Hormones and Antibody Responses in Different Spectrum of Tuberculosis Disease. *Frontiers in immunology*. 2022;13:849321.
74. Bini EI, D'Attilio L, Marquina-Castillo B, Mata-Espinosa D, Díaz A, Marquez-Velasco R, et al. The implication of pro-inflammatory cytokines in the impaired production of gonadal androgens by patients with pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*. 2015;95(6):701-6.
75. Magdy DM, Ahmed Metwally, and Randa A. El Zohne. "Erectile Dysfunction in Pulmonary Tuberculosis: Is It a Common Association?" *The Egyptian Journal of Bronchology* 13.1 (2019): 105–108. Web.
76. Kleynhans L, Ruzive S, Ehlers L, Thiart L, Chegou NN, Conradie M, et al. Changes in Host Immune-Endocrine Relationships during Tuberculosis Treatment in Patients with Cured and Failed Treatment Outcomes. *Frontiers in immunology*. 2017;8:690.
77. Gan Y, Hu Q, Li A, Gu L, Guo S. Estradiol inhibits autophagy of Mycobacterium tuberculosis-infected 16HBE cells and controls the proliferation of intracellular Mycobacterium tuberculosis. *Molecular medicine reports*. 2022;25(6).
78. Cooper AM, Dalton DK, Stewart TA, Griffin JP, Russell DG, Orme IM. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. *The Journal of experimental medicine*. 1993;178(6):2243-7.
79. van Crevel R, Ottenhoff TH, van der Meer JW. Innate immunity to Mycobacterium tuberculosis. *Clinical microbiology reviews*. 2002 ;15(2) :294-309.

FICHE SIGNALÉTIQUE

Nom : BEHINAN

Ville de soutenance : Bamako

Prénom : Gnapo Janvier Stephane

Secteur d'intérêt : Biologie et Santé

Nationalité : Ivoirienne

Publique

Courriel : behinanstephane01@gmail.com

Section : Pharmacie

Année universitaire : 2021-2022

Tel : (+223) 90 46 15 51 ; (+225) 07 49 58 35 85

Lieu de dépôt : Bibliothèque de la Faculté de Médecine et d'Odonto-Stomatologie (FMOS) et de la Faculté de Pharmacie (FAPH), Bamako, Mali.

Titre de la thèse : Analyse des fluctuations hormonales chez les patients sous traitement antituberculeux au Mali.

RESUMÉ

La tuberculose (TB) est un problème majeur de santé publique et touche plus les hommes que de femmes dans le monde. Les hormones sexuelles sont suspectées d'être un des facteurs biologiques contribuant à ce biais liés au sexe. Nous avons initié cette étude au niveau du Centre Universitaire de Recherche Clinique (UCRC) dans le but d'analyser les fluctuations des concentrations des hormones sexuelles (testostérone et estradiol) au cours du traitement antituberculeux. C'était une sous étude d'une étude de cohorte prospective ayant pour objectif d'enrôler les participants faisant une tuberculose pulmonaire active à Bamako. L'échantillonnage était compris de 20 hommes et 20 femmes séronégatifs pour le VIH et recrutés avant l'initiation du traitement contre la tuberculose. Nous avons trouvé que les taux de testostérone et d'estradiol étaient significativement plus élevés après six mois de traitement par rapport à la visite de base avant le début du traitement, respectivement chez les hommes ($p < 0,0001$) et les femmes ($p < 0,0083$). En effet, le taux de testostérone était négativement corrélé avec les cytokines inflammatoires (IL-6 et INF- γ), fortement impliqués dans la réponse immunitaire contre les mycobactéries. Cependant, nous n'avons pas observé de lien entre le taux d'estradiol et les cytokines inflammatoires étudiées chez les femmes. Nos données suggèrent la présence de différences biologiques significatives entre les deux sexes au cours du traitement antituberculeux. Ces différences semblent être médiées par les hormones sexuelles en agissant sur l'immunité. En conclusion, nos données suggèrent que la testostérone pourrait être utilisée comme un biomarqueur potentiel de la réponse au traitement pour une meilleure prise en charge des hommes atteints de la tuberculose pulmonaire active.

Mots clés : Mycobacterium ; sexe ; stéroïdes ; médicaments ; Afrique.

IDENTIFICATION SHEET

Last Name: BEHINAN

City of Defense: Bamako

First Name: Gnapo Janvier Stephane

Sector of Interest: Biology and

Nationality: Ivorian

Public Health

E-mail: behinanstephane01@gmail.com

Section: Pharmacy Academic

Year: 2021-2022

Phone: (+223) 90461551; (+225) 0749583585

Place of Deposit: Library of the Faculty of Medicine and Odontostomatology and the Faculty of Pharmacy, Bamako, Mali.

Thesis Title: Analysis of hormonal fluctuations in patients receiving anti-tuberculosis treatment in Mali.

SUMMARY

Tuberculosis (TB) is a major public health problem which affects more men than women worldwide. Sex hormones are suspected to be one of the main biological factors contributing to this sex bias. We initiated this study at the University Center for Clinical Research (UCRC) with the aim of analyzing fluctuations in the concentrations of sex hormones (testosterone and estradiol) during anti-tuberculosis treatment. It was a sub-study of a prospective cohort study aimed at enrolling participants with active pulmonary tuberculosis in Bamako. The sample was comprised of 20 HIV-negative men and 20 women recruited prior to initiation of TB treatment. We found that testosterone and estradiol levels were significantly higher after six months of treatment compared to the baseline visit before the start of treatment, respectively in men ($p < 0.0001$) and women ($p < 0.0083$). Indeed, testosterone level was negatively correlated with inflammatory cytokines (IL-6 and INF- γ) strongly involved in the immune response against mycobacteria. However, we did not observe a link between estradiol levels and the inflammatory cytokines studied in women. Our data suggest the presence of significant biological differences between the two sexes during antituberculosis treatment. These differences appear to be mediated by sex hormones acting on immunity. In conclusion, our data suggest that testosterone could be used as a potential biomarker of treatment response for better management of men with active pulmonary tuberculosis.

Keywords: Mycobacterium; sex, steroids; medications; Africa.

Annexe

Annexe 1 : Genscreen™ ULTRA HIV Ag-Ab

Procédures

La mise en œuvre du test comprenait les étapes réactionnelles suivantes :

- Le conjugué 1 (anticorps polyclonal anti-p24 du VIH-1 biotinylé) était distribué dans toutes les cupules de la microplaque ;
- Les sérums à étudier, ainsi que les contrôles étaient ensuite distribués dans les cupules : les antigènes VIH éventuellement présents se fixent sur les anticorps monoclonaux de la phase solide et forment des complexes avec les anticorps biotinylés du conjugué 1. Si des anticorps anti-VIH-1 et/ou VIH-2 sont présents, ils se lient aux antigènes fixés sur la phase solide. Le dépôt du conjugué 1 et des échantillons est validé par un changement de couleur, du jaune-vert au bleu ;
- Après incubation à 37°C, puis lavage, le conjugué 2 était ajouté : la streptavidine réagit avec les complexes Ac-Ag-Ac biotinylés éventuellement fixés sur la phase solide. Les antigènes VIH-1 et VIH-2 purifiés, marqués à la peroxydase se lient à leur tour aux IgG et/ou IgM et/ou IgA, retenus par la phase solide ;
- Après incubation à température ambiante (18-30°C) la fraction de conjugué 2 restée libre était éliminée par lavage ;
- Après une nouvelle incubation à température ambiante (18-30°C) la présence de l'enzyme immobilisée sur les complexes était révélée par la modification de la coloration du substrat ;
- Après arrêt de la réaction, la lecture était effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre de type VERSAmax à 450/620-700 nm. L'absorbance observée pour un échantillon permettait de conclure quant à la présence ou l'absence d'antigène VIH et/ou d'anticorps anti-VIH-1 et/ou VIH-2.

Annexe 2: New Lav-Blot I/II

Procédures

La procédure comprend les étapes suivantes :

- Réhydratation de la bande de nitrocellulose ;
- Incubation des échantillons à tester ou des sérums témoins. Si des anticorps anti-VIH-1 ou anti-VIH-2 sont présents, ils se lient aux protéines virales identifiées, présentes sur la bandelette ;

- Après lavage, les anticorps anti-IgG humains marqués à la phosphatase alcaline sont incubés. Le conjugué se lie aux anticorps anti-VIH capturés sur la phase solide ;
- Après lavage et élimination de l'excès de conjugué, la solution de développement couleur permet de mettre en évidence l'activité enzymatique des complexes liés à la nitrocellulose ;
- L'apparition de bandes colorées spécifiques permet de mettre en évidence la présence d'anticorps anti-VIH-1 ou anti-VIH-2 dans l'échantillon.

Au laboratoire ImmunoCore de l'UCRC, nous utilisons le New Lav Blot I pour confirmer la présence de l'infection au VIH-1 et le New Lav Blot II pour le VIH-2.

Annexe 3: Réactifs du kit BD CBA Human Th1/Th2/Th17

Le kit BD CBA Human Th1/Th2/Th17 Cytokine contient les composants suivants:

Etiquette Du flacon	Réactifs	Quantité pour un kit et Catalogue
A1	Human IL-2 Capture Beads	1 flacon, 0,8 mL 51-9005736
A2	Human IL-4 Capture Beads	1 flacon, 0,8 mL 51-9005715
A3	Human IL-6 Capture Beads	1 flacon, 0,8 mL 51-9005738
A4	Human IL-10 Capture Beads	1 flacon, 0,8 mL 51-9005740
A5	Human TNF Capture Beads	1 flacon, 0,8 mL 51-9005724
A6	Human IFN- γ Capture Beads	1 flacon, 0,8 mL 51-9005727
A7	Human IL-17A Capture Beads	1 flacon, 0,8 mL 51-9006289
B	Human Th1/Th2/Th17 PE Detection Reagent	1 flacon, 4 mL 51-9006291

C	Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Standards	2 flacons, 0,2 mL lyophilisé 51-9006249
D	Cytometer Setup Beads	1 flacon, 1,5 mL 51-9005731
E1	PE Positive Control Detector	1 flacon, 0,5 mL 51-9005732
E2	FITC Positive Control Detector	1 flacon, 0,5 mL 51-9005734
F	Wash Buffer	1 bouteille, 130 mL 51-2431KC
G	Assay Diluent	1 bouteille, 30 mL 51-2432KC
H	Serum Enhancement Buffer	1 bouteille, 10 mL 51-9002150

Réactifs des billes

Billes de capture de cytokines humaines (A1–A7) : Ce sont des billes de capture spécifiques, ayant des caractéristiques d'intensité de fluorescence discrètes et sont réparties du plus brillant (A1) au plus sombre (A7).

Billes de configuration du cytomètre (D) : Ces billes permettent de régler les tensions initiales du photomultiplicateur (PMT) de l'instrument (cytomètre) et les paramètres de compensation.

Anticorps et réactifs standards

Réactif de détection humain Th1/Th2/Th17 PE (B) : C'est un cocktail d'anticorps anti-IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ et IL-17A humains conjugués à la PE.

Standards de cytokines humaines Th1/Th2/Th17 (C) : Ces flacons contiennent des protéines de cytokines humaines recombinantes lyophilisées.

Détecteur de contrôle positif PE (E1) : Anticorps conjugués à la PE. Ce réactif est utilisé avec les billes de configuration du cytomètre pour définir les paramètres de compensation initiaux de l'instrument.

Détecteur de contrôle positif FITC (E2) : Anticorps conjugués au FITC. Ce réactif est utilisé avec les billes de configuration du cytomètre pour définir les paramètres de compensation initiaux de l'instrument.

Réactifs tampons

Tampons de lavage ou solution de lavage (F) : Une bouteille de 130 ml de solution saline tamponnée au phosphate (PBS) (1X), contenant des protéines et un détergent, utilisée pour les étapes de lavage et pour remettre en suspension les billes lavées pour analyse.

Diluant de dosage (G) : Un flacon de 30 ml d'une solution de protéines tamponnées (1X) utilisée pour reconstituer et diluer les standards de cytokines humaines Th1/Th2/Th17 et pour diluer les échantillons inconnus.

Tampon d'amélioration du sérum (H) : Un flacon de 10 ml d'une solution protéique tamponnée (1X) utilisée pour diluer les billes de capture mélangées lors du test d'échantillons de sérum ou de plasma.

Procédure du BDTM CBA human Th1/Th2/Th17

Tout d'abord, les réactifs sont mis à la température ambiante pendant au moins 30 minutes avant de commencer la technique.

Phase 1 : Préparation des standards de cytokine Th1/Th2/Th17 humains

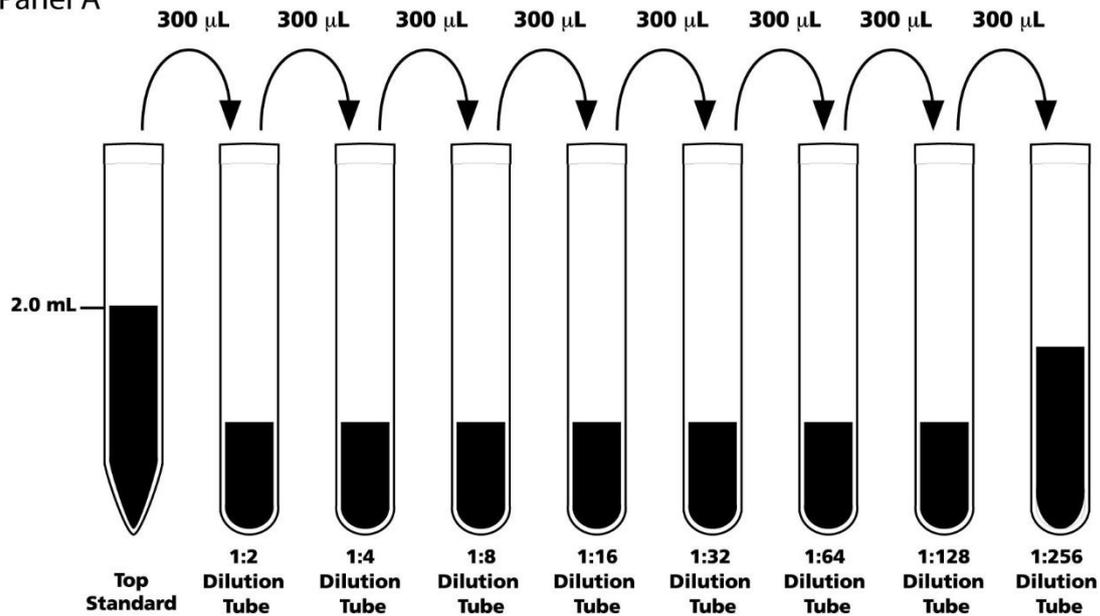
Reconstitution et dilution en série des standards

- 1- Prendre un flacon de standard Th1/Th2/Th17 humains lyophilisés (7 boules) et transféré 2 mL du diluant de dosage. Laissez le tout pendant 15 minutes à la température ambiante. Ensuite, transférez le mélange obtenu dans un tube conique en polypropylène de 15 mL étiqueté "Top Standard" (S10). La protéine reconstituée est mélangée à l'aide d'une pipette et non vortexer (ou mélanger vigoureusement).
- 2- Sur des tubes de 12 × 75 mm étiquetés selon le tableau ci-dessous (plus concentré au moins concentré) ; pipetez 300 µL du diluant dans chacun des tubes.

Protéine (pg/mL)	1 :2	1 :4	1 :8	1 :16	1 :32	1 :64	1 :128	1 :256
Standard (S)	S9	S8	S7	S6	S5	S4	S3	S2

- 3- Par la suite, réaliser une dilution en série :
 - a- Transférer 300 µL du Top Standard dans le tube de dilution 1 :2 (S9) et bien mélanger à la pipette uniquement.
 - b- Continuer à faire des dilutions en série en transférant 300 µL du tube (S9) au tube (S8) et ainsi de suite au tube (S2).
- 4- Enfin, préparer un tube de 12 × 75 mm contenant uniquement le diluant de dosage pour servir de contrôle négatif 0 pg/mL. Le tout recouvert par du papier aluminium et mis à l'abri de la lumière.

Panel A



Exemple de dilution en série des standards pour le kit BD CBA Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit

Phase 2 : Préparation des billes de capture de cytokine Th1/Th2/Th17 humains

✚ Mélange des billes de capture et remise en suspension des billes :

- 1- A ce niveau, il faut déterminer le nombre de tubes à essai (standards et échantillons) nécessaire pour l'expérience. Par exemple pour 50 échantillons nous avons (50 tubes pour le sérum + 2 excédents), 9 dilutions standard de cytokines et 1 contrôle négatif au total 62 tubes à essai.
- 2- Vortexer vigoureusement chaque bille de capture avant de les mélanger.
- 3- Pour chaque tube de dosage à analyser, prélevez 8 µL de chaque bille de capture et mettre dans un seul tube de 15 mL étiqueté « Billes de capture mixtes ».
Exemple : 8 µL de billes de capture × 62 tubes de dosage = 496 µL de chaque bille de capture.
- 4- Vortexer soigneusement le mélange de bille obtenu
- 5- Après l'étape précédente, passez les billes à la centrifugeuse à 200 g pendant 5 minutes.
- 6- Aspiré soigneusement le surnageant et le jeté.
- 7- Remplacez-le par du Serum Enhancement Buffer (H) au volume retiré et vortexer.
- 8- Enfin, incubez les billes de capture mélangées pendant 30 minutes à température ambiante, à l'abri de la lumière.

Phase 3 : Réalisation du dosage des cytokines humaines Th1/Th2/Th17

Procédure de dosage

- 1- A cette étape, disposez à nouveau des tubes vides de 12 ×75 mm étiquetés comme suite :

Etiquette du tube	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
Concentration (pg/ mL)	0 (control négatif)	20	40	80	156	312,5	625	1250	2500	5000
Dilution standard de cytokines	Diluant seulement	1 :256	1 :128	1 :64	1 :32	1 :16	1 :8	1 :4	1 :2	Top standard

- 2- A la fin des 30 min, bien mélanger au vortex les billes de capture et ajoutez 50 µL à tous les tubes standards (S1- S10) ainsi qu'à tous les tubes de dosage.
- 3- Ensuite, ajoutez 50 µL de chaque standard et échantillon dans leurs tubes correspondants correctement étiquetés.
- 4- Par la suite, 50 µL du réactif de détection a été ajoutés dans tous les tubes.
- 5- Mélanger et couvrir avec du papier aluminium.
- 6- Incubez le tout pendant 3 heures à la température ambiante, à l'abri de la lumière.
- 7- Après incubation, ajoutez 1 mL de solution de lavage à chaque tube à essai et centrifugez à 200 g pendant 5 minutes.
- 8- Aspirez et jetez le surnageant de chaque tube à essai.
- 9- Terminer cette étape par l'ajoute de 300 µL de solution de lavage dans chaque tube à essai pour remettre en suspension le culot de billes.
- 10- Acquérir les échantillons sur le cytomètre en flux et analyser les données à l'aide du logiciel FCAP Array.

Annexe 4 : Dosage de la testostérone

Contenu du kit

- Microplaque, 12x8 barrettes (séparables), 96 puits ; Puits recouverts d'anticorps anti-testostérone (monoclonal).
- Standards (Standard 0-6), 7 flacons, 1 ml, prêt à l'emploi avec les concentrations suivantes : 0 - 0,2 - 0,5 - 1 - 2 - 6 - 16 ng /ml.

- Conjugué enzymatique, 1 flacon, 25 ml, prêt à l'emploi ; Testostérone conjuguée à la peroxydase de raifort.
- Solution de substrat Tétraméthylbenzidine (TMB), 1 flacon, 25 ml.
- Stop Solution, 1 flacon, 14 ml, prêt à l'emploi ; contient 0,5 M H₂SO₄.
- Solution de lavage 40x, 1 flacon, 30 ml (concentré 40X).

Matériel requis mais non fourni

- Un spectrophotomètre (SpectraMax Plus 384) (figure 17) calibré de microplaque ;
- Micropipettes calibrées à précision variable ;
- Papier absorbant ;
- Papier Aluminium ;
- Eau distillée ;
- Minuteur ;
- Logiciel de réduction des données (logiciel SoftMax Pro 7 version 7.0.3).

Préparation des réactifs

Laisser tous les réactifs et le nombre de barrettes requises à la température ambiante 30 mn avant utilisation. Par la suite, on a dilué 30 ml de solution de lavage concentrée (40X) avec 1170 ml d'eau déminéralisée jusqu'à un volume final de 1200 ml. La solution de lavage diluée était stable pendant 2 semaines à la température ambiante.

Mode opératoire

Tous les réactifs et échantillons ont été amenés à température ambiante avant utilisation. Tous les réactifs ont été mélangés sans formation de mousse. Nous avons procédé comme suite :

- Distribuer 25 µl de chaque standard, contrôle et échantillons avec de nouveaux embouts jetables dans les puits appropriés.
- Ajouter 200 µl de conjugué enzymatique dans chaque puits. Bien mélanger pendant 10 secondes. Il est important d'avoir un mélange complet à la fin de cette étape.
- Incuber pendant 60 minutes à la température ambiante.
- Rincer les puits 3 fois avec 400 µl de solution de lavage diluée par puits
- A la fin du lavage, frapper les puits d'un coup sec sur du papier absorbant pour éliminer les gouttelettes résiduelles.
- Ajouter 200 µl de solution de substrat dans chaque puits.

- Incuber pendant 15 minutes à température ambiante.
- Arrêtez la réaction enzymatique en ajoutant 100 µl de solution d'arrêt à chaque puits.
- Déterminer la densité optique de la solution dans chaque puits à 450 nm (lecture) et à 620 nm avec un spectrophotomètre (SpectraMax Plus 384).

Il est recommandé de lire les puits dans les 10 minutes suivant l'ajout de la solution d'arrêt.

Annexe 5 : Dosage de l'estradiol

Contenu du kit

- Micro-puits, 12x8 barrettes (séparables), 96 puits ; micro-puits recouverts de streptavidine.
- Standards (Standard 0-5), 6 flacons, 0,5 mL, prêt à l'emploi avec les concentrations suivantes : 0 - 10 - 30 - 100 – 300 - 1000 pg /mL.
- Conjugué d'estradiol Biotine, 1 flacon, 7 mL, prêt à l'emploi.
- Diluant d'échantillon, 1 flacon, 12 mL, prêt à l'emploi
- Concentré de conjugué enzymatique d'estradiol 20X, 1 flacon, 0,7 mL.
- Solution de substrat Tétraméthylbenzidine (TMB), 1 flacon, 12 mL, prêt à l'emploi.
- Solution d'arrêt, 1 flacon, 12 mL, prêt à l'emploi.
- Concentré de solution de lavage 20x, 1 flacon, 25 mL (concentré 20X).

Matériel requis mais non fourni

- Un spectrophotomètre (SpectraMax Plus 384) calibré de microplaque ;
- Micropipettes calibrées à précision variable ;
- Papier absorbant ;
- Papier Aluminium ;
- Eau distillée ou déminéralisée ;
- Minuteur ;
- Logiciel de réduction des données (logiciel SoftMax Pro 7 version 7.0.3).

Préparation des réactifs

Laisser tous les réactifs et le nombre de barrettes requises à la température ambiante avant utilisation. Par la suite, on a dilué la solution de lavage à 1X en ajoutant le contenu du flacon (25 mL, 20X) à 475 mL d'eau distillée ou déminéralisée jusqu'à un volume final de 500 ml. La solution de lavage diluée était stable pendant 2 semaines à la température ambiante. Conjugué enzymatique 20X : Préparez la solution de travail 1X à 1 :20 avec le diluant du test (par

exemple, ajoutez 0,1 ml de concentré de conjugué enzymatique E2 à 1,9 ml de diluant du test)

Mode opératoire

Tous les réactifs et échantillons ont été amenés à température ambiante avant utilisation. Tous les réactifs ont été mélangés sans formation de mousse. Nous avons procédé comme suite :

- Distribuer 25 µl de chaque standard, contrôle et échantillons avec de nouveaux embouts jetables dans les puits appropriés.
- Ajouter 50 µl de conjugué d'estradiol biotine dans chaque puits. Bien mélanger pendant 10 à 20 secondes sur un agitateur. Il est important d'avoir un mélange complet à la fin de cette étape.
- Incuber pendant 45 minutes à la température ambiante (20-25°C).
- Ajouter 100 µl du conjugué enzymatique d'estradiol dans tous les puits. (Remarque : ajouter directement sur le dessus de la biotine)
- Bien mélanger en plaçant sur l'agitateur pendant 10 à 20 secondes
- Incuber pendant 45 minutes à la température ambiante (20-25°C).
- Retirez le liquide de tous les puits. Laver les puits 3 fois avec du solution de lavage (300 µL par puits).
- A la fin du lavage, frapper la plaque d'un coup sec sur du papier absorbant pour éliminer les gouttelettes résiduelles.
- Ajouter 100 µl de réactif TMB dans chaque puits. Puis incuber pendant 20 minutes à température ambiante.
- Arrêtez la réaction enzymatique en ajoutant 50 µl de solution d'arrêt à chaque puits.
- Mélanger doucement pendant 30 secondes. Il est important de s'assurer que toute la couleur bleue passe à la couleur jaune complètement.
- Déterminer la densité optique (DO) de la solution dans chaque puits à 450 nm avec un spectrophotomètre (SpectraMax Plus 384).

Il est recommandé de lire les puits en 15 minutes suivant l'ajout de la solution d'arrêt.

9. SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens 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 en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des 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 !!!

Je le jure !!!