

UNIVERSITE DES SCIENCES, DES
TECHNIQUES ET DES TECHNOLOGIES
DE BAMAKO



République du Mali

Un Peuple-Un But-Une Foi



FACULTE DE PHARMACIE

Année Universitaire 2020 – 2021

N°...../

THESE

RÔLE DU SEXE BIOLOGIQUE DANS LA REPOSE IMMUNITAIRE CONTRE LE COMPLEXE *Mycobacterium tuberculosis*

Présentée et soutenue publiquement le 19 NOVEMBRE 2021

Devant la Faculté de Pharmacie

Par M. KOLOMA Isaac

Pour Obtenir le Grade de Docteur en Pharmacie

(DIPLÔME D'ETAT)

JURY :

Président : Pr Souleymane DIALLO

Membres : Dr Khadidia OUATTARA

Dr Yacouba CISSOKO

Co-directrice : Dr Djénéba Koumba DABITAO

Directeur : Pr Mahamadou DIAKITE

LISTE DES MEMBRES DE L'ADMINISTRATION ET DU CORPS ENSEIGNANT A LA FACULTÉ DE PHARMACIE ANNEE UNIVERSITAIRE 2019-2020

➤ ADMINISTRATION

Doyen : Boubacar TRAORE, Professeur

Vice-doyen : Sékou BAH, Maitre 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	Mahamadou	CISSE	Biologie
4	Daouda	DIALLO	Chimie Générale et Minérale
5	Souleymane	DIALLO	Bactériologie-Virologie
6	Kaourou	DOUCOURE	Physiologie
7	Ousmane	DOUMBIA	Chimie thérapeutique
8	Boukassoum	H Aidara	Législation
9	Gaoussou	KANOUTE	Chimie Analytique
10	Alou A.	KEITA	Galénique
11	Mamadou	KONE	Physiologie
12	Mamadou	KOUMARE	Pharmacognosie
13	Bréhima	KOUMARE	Bactériologie-Virologie
14	Abdourahamane S.	MAÏGA	Parasitologie
15	Saibou	MAIGA	Législation

16	Elimane	MARIKO	Pharmacologie
17	Sékou Fantamady	TRAORE	Zoologie

➤ **DER: SCIENCES BIOLOGIQUES ET MEDICALES**

1. PROFESSEURS /DIRECTEUR DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Mounirou	BABY	Hématologie
2	Bakary Mamadou	CISSE	Biochimie
3	Abdoulaye	DABO	Biologie/Parasitologie
4	Mahamadou	DIAKITE	Immunologie-Généétique
5	Alassane	DICKO	Santé Publique
6	Abdoulaye	DJIMDE	Parasitologie-Mycologie
7	Amagana	DOLO	Parasitologie-Mycologie
8	Akory Ag	IKNANE	Santé Publique/Nutrition
9	Ousmane	KOITA	Biologie Moléculaire
10	Boubacar	TRAORE	Parasitologie-Mycologie

2. MAITRES DE CONFERENCE/MAITRE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Aldiouma	GUINDO	Hématologie
2	Kassoum	KAYENTAO	Santé publique/Bio-statistique
3	Bourèma	KOURIBA	Immunologie Chef de DER

4	Issaka	SAGARA	Bio-statistique
5	Mahamadou Soumana	SISSOKO	Bio-statistique
6	Ousmane	TOURE	Santé Publique /Santé Environnement

3. MAITRES ASSISTANTS /CHARGE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Mohamed	AG BARAÏKA	Bactériologie-Virologie
2	Charles	ARAMA	Immunologie
3	Boubacar Tiétiè	BISSAN	Biochimie Clinique
4	Djibril Mamadou	COULIBALY	Biochimie Clinique
5	Seydou Sassou	COULIBALY	Biochimie Clinique
6	Antoine	DARA	Biologie moléculaire
7	Souleymane	DAMA	Parasitologie-Mycologie
8	Djénéba Koumba	DABITAO	Biologie moléculaire
9	Laurent	DEMBELE	Biotechnologie microbienne
10	Kléligui Casimir	DEMBELE	Biochimie Clinique
11	Seydina S. A.	DIAKITE	Immunologie
12	Yaya	GOÏTA	Biochimie Clinique
13	Ibrehima	GUINDO	Bactériologie-Virologie
14	Aminatou	KONE	Biologie Moléculaire
15	Birama Apho	LY	Santé publique
16	Almoustapha Issiaka	MAIGA	Bactériologie-Virologie
17	Dinkorma	OUOLOGUEM	Biologie cellulaire
18	Fanta	SANGHO	Santé publique/Santé communautaire
19	Oumar	SANGHO	Épidémiologie

4. ASSISTANTS /ATTACHE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Djénéba	COULIBALY	Nutrition/Diététique
2	Issa	DIARRA	Immunologie
3	Fatou	DIAWARA	Epidémiologie
4	Merepen dite Agnès	GUINDO	Immunologie
5	Falaye	KEÏTA	Santé publique /Santé Environ.
6	N'Deye Lallah Nina	KOITE	Nutrition
7	Amadou Birama	NIANGALY	Parasitologie-Mycologie
8	Djakaridia	TRAORE	Hématologie

➤ **DER : SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

1. PROFESSEURS/DIRECTEUR DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Drissa	DIALLO	Pharmacognosie
2	Rokia	SANOOGO	Pharmacognosie Chef de DER

2. MAÎTRES DE CONFERENCES/MAÎTRE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
-	Néant	-	-

3. MAÎTRES ASSISTANTS/CHARGE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Loséni	BENGALY	Pharmacie Hospitalière
2	Bakary Moussa	CISSE	Galénique
3	Yaya	COULIBALY	Législation
4	Issa	COULIBALY	Gestion

5	Balla Fatogoma	COULIBALY	Pharmacie Hospitalière
6	Mahamane	H AidARA	Pharmacognosie
7	Hamma Boubacar	MAÏGA	Galénique
8	Moussa	SANO GO	Gestion
9	Adiaratou	TOGOLA	Pharmacognosie

4. ASSISTANTS/ATTACHE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Seydou Lahaye	COULIBALY	Gestion pharmaceutique
2	Daouda Lassine	DEMBELE	Pharmacognosie
3	Adama	DENOU	Pharmacognosie
4	Sékou	DOUMBIA	Pharmacognosie
5	Assitan	KALOGA	Législation
6	Ahmed	MAÏGA	Législation
7	Aichata Ben Adam	MARIKO	Galénique
8	Aboubacar	SANGHO	Législation
9	Bourama	TRAORE	Législation
10	Karim	TRAORE	Sciences Pharmaceutiques
11	Sylvestre	TRAORE	Gestion Pharmaceutique
12	Aminata Tièba	TRAORE	Pharmacie Hospitalière
13	Mohamed dit Sarmoye	TRAORE	Pharmacie Hospitalière

➤ **DER: SCIENCES DU MEDICAMENT**

1. PROFESSEURS/ DIRECTEUR DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOMS	SPECIALITE
1	Benoît Yaranga	KOUMARE	Chimie Analytique
2	Ababacar I.	MAÏGA	Toxicologie

2. MAÎTRES DE CONFERENCES /MAÎTRE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Sékou	BAH	Pharmacologie Chef de DER

3. MAITRES ASSISTANTS/CHARGE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Dominique Patomo	ARAMA	Pharmacie Chimique
2	Mody	CISSE	Chimie Thérapeutique
3	Ousmane	DEMBELE	Chimie Thérapeutique
4	Tidiane	DIALLO	Toxicologie
5	Madani	MARIKO	Chimie Analytique
6	Hamadoun Abba	TOURE	Bromatologie

4. ASSISTANTS/ATTACHE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Mahamadou	BALLO	Pharmacologie
2	Dalaye Bernadette	COULIBALY	Chimie Analytique
3	Blaise	DACKOOU	Chimie Analytique
4	Fatoumata	DAOU	Pharmacologie
5	Abdourahamane	DIARA	Toxicologie
6	Aiguerou dit Abdoulaye	GUINDO	Pharmacologie
7	Mohamed El Béchir	NACO	Chimie Analytique
8	Mahamadou	TANDIA	Chimie Analytique
9	Dougoutigui	TANGARA	Chimie Analytique

➤ **DER: SCIENCES FONDAMENTALES**

1. PROFESSEURS/DIRECTEUR DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Mouctar	DIALLO	Biologie/ Chef de DER
2	Mahamadou	TRAORE	Génétique

2. MAITRES DE CONFERENCES/MAITRE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Lassana	DOUMBIA	Chimie Appliquée

3. MAÎTRES ASSISTANTS /CHARCHÉ DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOMS	SPECIALITE
1	Mahamadou Lamine	DIARRA	Botanique-Biologie végétale
2	Abdoulaye	KANTE	Anatomie
3	Boureïma	KELLY	Physiologie Médicale

4. ASSISTANTS/ATTACHE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
-----------	----------------	------------	-------------------

1	Seydou Simbo	DIAKITE	Chimie Organique
2	Modibo	DIALLO	Génétique
3	Moussa	KONE	Chimie Organique
4	Massiriba	KONE	Biologie Entomologie

➤ **CHARGES DE COURS (VACCATAIRES)**

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Cheick Oumar	BAGAYOKO	Informatique
2	Babou	BAH	Anatomie
3	Souleymane	COULIBALY	Psychologie
4	Yacouba	COULIBALY	Droit Commercial
5	Bouba	DIARRA	Bactériologie
6	Moussa I.	DIARRA	Biophysique
7	Babacar	DIOP	Chimie Organique
8	Aboubakary	MAIGA	Chimie Organique
9	Modibo	SANGARE	Anglais
10	Satigui	SIDIBE	Pharmacie Vétérinaire
11	Sidi Boula	SISSOKO	Histologie-Embryologie
12	Fana	TANGARA	Maths
13	Djénébou	TRAORE	Sémiologie et pathologie Médicale
14	Mamadou B	TRAORE	Physiologie
15	Boubacar	ZIBEÏROU	Physique

A la trinité le Père-le Fils et l'Esprit Saint, merci pour le souffle de vie et de m'avoir permis d'être là aujourd'hui.

DEDICACE :

Je dédie ce travail à toute ma famille, Que Dieu vous garde uni à jamais.

REMERCIEMENTS

Comment commencer ? Il y a tellement de personnes qui m'ont permis d'en arriver là` aujourd'hui. Tellement de personnes qui m'ont accompagné` et qui ont pris part de près ou de loin a` cette aventure. Merci a` chacun d'entre vous !!

Mes remerciements vont en premier lieu à l'endroit à ma co-directrice de thèse, Dr Dabitaou Djeneba. Merci de m'avoir accompagné dans cette aventure, merci pour l'encadrement. Votre disponibilité, vos conseils et votre expertise m'ont été d'une aide précieuse pour la réalisation de ce travail, recevez ici mes sincères et digne reconnaissance.

A mon unité au sein de l'UCRC, ImmunoCore : Ba Nadie Coulibaly, Dr Wague Mamadou, Dr Coulibaly Mariam, Dr Nantoume Ambadigne Mohamed, Perou Mamadou, Djénéba Coulibaly ; vous avez à travers votre sympathie, vos conseils et vos encouragements contribué à la réalisation de ce travail, merci à tout un chacun.

A tout le personnel de l'UCRC, mes séjours en tant que stagiaire m'ont donné l'envie de percer et de vous ressembler un jour. Vous m'avez accueilli et donné l'opportunité de réalisé ce rêve, merci infiniment à tout un chacun pour l'hospitalité.

A l'équipe BSL-3 à sa tête Dr Diarra Bassirou, merci à vous et à votre unité pour l'accueil et la formation. Je remercie Dr Somboro Amadou et Koné Bourahima pour la relecture de ma thèse. Merci à tous les doctorants de l'UCRC.

J'exprime ma profonde gratitude à l'égard de :

Mes mamans : Bintou Dramé ; Kadiatou Dembélé ; Awa Dembélé ; Tenin Goita... je ne peux que vous souhaité longue et pieuse vie, que Dieu dans sa miséricorde vous gratifie. Vos bénédictions, votre aimable soutien et votre affection m'ont été d'une aide inestimable.

A mes amis : Sanogo Mamadou, Sanogo Seydou Zié, mon super Héro Bamba Salia merci pour ton accompagnement sans fin.

A tous les membres de la 11^{ème} promotion <<Promotion Feu Pr. Moussa HARAMA>> le chemin a été long marqué par des beaux souvenirs. Je vous remercie et souhaite une belle carrière pharmaceutique.

A ma famille d'accueil ALLURE merci pour le sens de l'humanisme.

A tout le personnel de la Pharmacie BADJI SOUSSOKO : Dr Mamadou Badji, Tantie Assan, Tantie Amy, Younouss Doumbia, Sekou Ag Oye, Yvonne, le jeune Maiga Ibrahim.... Recevez ici mes sincères gratitude.

A mes aînés : Dr Diarra Bourama (pharmacie DEMPELA), Dr Issiaka Traore (Pharmacie Abdoulaye TRAORE), Dr Diane Mory (Pharmacie Mamadou DIANE).

Le meilleur pour la fin, à mon père ami et confident Denis Koloma, un jour j'avais promis de vous rendre fier....Et me voilà comme je l'avais promis...Baba ! Les mots ne sauront décrire tout ce que j'ai sur le cœur. Tu m'as toujours offert le meilleur de toi pour que je puisse étudier et découvrir l'immensité de la connaissance scientifique. Voici une partie de mes découvertes. En espérant que ceci serait à la hauteur de tes attentes, reçoit toute ma joie de t'avoir eu comme père. Plaise à Dieu de m'autoriser à profiter encore de tes conseils.

A ma mère Mariam DEMBELE, mon Héroïne merci infiniment de ton soutien inconditionnel, ton appui de tous les jours, et pour avoir toujours su me remonter le moral dans les moments moins faciles.

A mon frère Leger-marie et à mes sœurs Philomène et Romaine Koloma.

A toute ma famille, mes oncles, mes tantes, mes cousines je vous aime tous, merci pour vos conseils et vos encouragements !!!

Un grand merci au Père Zongo, à la maman Nani. Vos prières m'ont été d'une aide inestimable. Que Dieu vous dans son immense grâce vous bénisse.

Et à tous ceux que j'ai oublié, j'espère qu'ils ne me tiendront pas rigueur.

HOMMAGES AUX MEMBRES DU JURY

A notre Maître et Président du jury

Professeur Honoraire Souleymane DIALLO

- ✓ **Professeur Honoraire de Bactériologie Virologie à la Faculté de Pharmacie de l'Université des Sciences des Techniques et des Technologies de Bamako (USTTB) ;**
- ✓ **Ancien Directeur Général du Centre d'Infectiologie Charles Mérieux du Mali (CICM) ;**
- ✓ **Ancien Chef de Service du Laboratoire du Centre Hospitalier Universitaire Gabriel Touré ;**
- ✓ **Président du Comité National de Certification de l'Eradication de la Poliomyélite (CNC) pour le Mali ;**
- ✓ **Officier de l'Ordre National du Mali.**

Cher Maître,

Vous nous faites l'honneur de présider ce jury et de juger ce travail. Merci pour le temps que vous passez aux services des étudiants. Ce travail est une occasion pour nous d'apprécier vos qualités humaines et professionnelles. Qu'il me soit permis de vous remercier et de vous exprimer mon estime et mon profond respect.

A notre Maître et Juge
Docteur Khadidia OUATTARA

- ✓ **Médecin spécialiste Pneumo-allergologie ;**
- ✓ **Maitre-Assistant à la Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie (FMOS) ;**
- ✓ **Praticien Hospitalier au CHU du point G ;**
- ✓ **Membre de la Société Malienne en Pneumologie (SOMAP) ;**
- ✓ **Membre de l'Association de Formation Continue en Allergologie (ANAFORCAL) ;**
- ✓ **Membre de la Société de Pneumologie de Langue Française (SPLF).**

Cher Maître,

Vous me faites l'honneur d'apporter votre expérience à la critique de ce travail en siégeant dans mon jury de thèse. Je vous prie de bien vouloir accepter ma profonde et respectueuse considération.

A notre Maître et Juge
Docteur Yacouba CISSOKO

- ✓ **Médecin spécialiste en Infectiologie**
- ✓ **Titulaire d'un Master en Immunologie**
- ✓ **Praticien hospitalier au CHU du point G**
- ✓ **Maitre-assistant en Infectiologie**

Cher Maître,

Je vous prie de recevoir mes sincères remerciements pour avoir accepté de juger ce travail. Veuillez croire en l'expression de ma respectueuse considération.

**A notre Maître et Co-directeur de thèse
Docteur Djénéba Koumba DABITAO**

- ✓ **Docteur en Pharmacie ;**
- ✓ **Spécialiste en Biologie Moléculaire et en Immunologie ;**
- ✓ **Maitre-Assistant à la Faculté de Pharmacie ;**
- ✓ **Cheffe du Laboratoire ImmunoCore du Centre Universitaire de Recherche Clinique (UCRC) de l'USTTB.**

Cher Maître,

Vous avez accepté de m'accompagner tout au long de ce travail. Je vous remercie pour votre gentillesse, votre patience et vos conseils. Cela a été un plaisir d'être encadré par vous, recevez ma sincère gratitude.

A notre Maître et Directeur de Thèse

Professeur Mahamadou DIAKITE

- ✓ **Professeur Titulaire d'Immunologie et de Génétique ;**
- ✓ **Vice-recteur de l'USTTB ;**
- ✓ **Directeur Scientifique-Adjoint du Centre Universitaire de Recherche Clinique de l'USTTB ;**
- ✓ **Responsable du Laboratoire d'Immunogénétique et de Parasitologie au MRTC ;**
- ✓ **Secrétaire Permanent du Comité d'Ethique de la FMOS/FAPH) ;**

Cher Maître,

Vous nous avez accordé un immense honneur et un grand privilège en acceptant de diriger cette 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.

SIGLES ET ABREVIATIONS

% : Pourcentage

AB : anticorps

Ag : Antigène

APC : Allophycocyanine

ADN : Acide desoxyribonucléique

BAAR : Bacilles acido-alcool résistants

BCG : Bacille de Calmette et Guérin

BSL : Biosafety Level (Niveau de Biosécurité)

BSA : Bovine Serum Albumine (Solution Bovine d'Albumine)

CD : Groupe de Différentiation

CD 25 : Groupe de différenciation 25

CD38 : Groupe de différenciation 38

CFP-10 : culture filtrate antigen 10 KDa

CM : central memory (Mémoire centrale)

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CO₂ : Dioxyde de carbone

COVID-19 : la maladie à Coronavirus 19

DO : Densité Optique

DN : Double Negative (Cellules doublement négatives)

DP : Double Positive (Cellules doublement positives)

EM : Effector memory

ESAT-6 : Early Secretory Antigenic Target-6kDa (cible antigénique sécrétoire précoce de 6 kDa)

FACS: Fluorescent Activated Cell Sorter

FN- γ : Interferon γ

FoxP3: ForkHead P3

FITC : Isothiocyanate de Fluorescéine

GC : Guanine-Cytosine

HLA : Human Leukocyte Antigen (Complexe Majeur d'Histocompatibilité)

IFN- γ : Interferon- γ

IFNGR : Interferon-Gamma Receptor (Recepteur de l'Interféron-Gamma)

IDR : Intradermo-Réaction

IL-6 : Interleukine 6

IL-8 : Interleukine 8
IL-10 : Interleukine 10
IL-12 : Interleukine 12
IL 17 : Interleukine 17
IL-18 : Interleukine 18
IGRA : Interferon-Gamma Release Assay (Test de secretion d'Interféron-Gamma)
IgG : Immunoglobuline G
LBA : Lavage Broncho-Alvéolaire
MGIT : Mycobacteria Growth Indicator Tube (Tube indicateur de croissance des mycobactéries) MNT
: Mycobacterium Non Tuberculosis
MTBC : *Mycobacterium tuberculosis* Complex
NaLC-NaOH: N-acétyl L-cystéine Hydroxyde de Sodium
MSMD : la susceptibilité mendélienne aux maladies mycobactériennes
MTB/RIF : Mycobacterium Résistante à la Rifampicine
NK : Natural Killer
NM : non marqué
NS : cellules non stimulées
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PAS : Acide Para-aminosalicylique
PCR : Polymérase Chain Réaction (Réaction de Polymérisation en Chaîne)
PE : Phycoérythrine
PerCP: Peridinin-Chlorophyll-Protein
PBS : Phosphate Buffer Saline (Tampon Phosphate Saline)
PPD : Dérivée de protéine purifiée
RD1 : Région de Différence 1
Rx : Radiographie
SEB : Enterotoxine B du Staphylocoque
SIDA : Syndrome d'Immunodéficience Acquise
TEM : Terminal effector memory
Th1 : Lymphocytes T-helper de type 1 (Lymphocytes auxiliaires de type -1)
TB : Tuberculose
TBP : Tuberculose Pulmonaire
TB-MR : Tuberculose Multi-résistante

TNF- α : Tumor necrosis Factor- α

UCRC : Centre Universitaire de Recherche Clinique

USTTB : Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako

VIH : Virus de l'immunodéficience Humaine

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Mycobacterium tuberculosis au microscope (15549X)	6
Figure 2. Cycle de transmission du Mycobacterium tuberculosis chez l'homme	8
Figure 3: Facteurs potentiels pouvant influencer la différence sexuelle au cours de la tuberculose	25
Figure 4. Sélection des participants pour la phase rétrospective de l'étude.....	27
Figure 5. Exemples de résultats obtenus à l'aide du test Alere DetermineTM HIV-1/2	30
Figure 6. Etapes d'analyse des lymphocytes T CD4+ et CD8+ à l'aide du logiciel FlowJo	37
Figure 7. Etapes d'analyse des marqueurs d'activation des lymphocytes T CD4+ sur FlowJo ..	38
Figure 8. Etapes d'Analyse des lymphocytes T CD4+ naïves et mémoires et naïves sur FlowJo ..	39
Figure 9. Caractérisation des lymphocytes T selon le sexe chez les patients faisant de la tuberculose.....	53
Figure 10. Caractérisation des lymphocytes T CD4+ naïves et mémoires chez les hommes et les femmes au cours de la tuberculose	54
Figure 11. Comparaison du statut d'activation des lymphocytes T CD4+ chez les sujets atteints de tuberculose sur la base du sexe	55
Figure 12. Comparaison des concentrations des cytokines inflammatoires dans le sérum des hommes et des femmes faisant tuberculose	56
Figure 13. Comparaison de la fréquence des lymphocytes T CD4+ sécrétrices de cytokines après stimulation antigénique selon le sexe du patient faisant tuberculose.....	57
Figure 14. Comparaison de la concentration de testostérone en fonction du statut TB du participant	60
Figure 15. Variation de la concentration de testostérone circulant chez les hommes atteints de tuberculose au cours du traitement.....	61

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Caractéristiques des participants de l'étude	52
Tableau 2: Caractéristiques des participants inclus dans la phase prospective de l'étude.....	59

TABLE DES MATIERES

1. INTRODUCTION	1
2. OBJECTIFS	4
2.1 Objectif général	4
2.2 Objectifs spécifiques	4
3. GENERALITES	5
3.1 Définition :	5
3.1.1 Agent pathogène :	5
3.1.2 Manifestation clinique, transmission et pathogénèse :	6
3.2 Diagnostic de la tuberculose :	9
3.2.1 Examen microscopique :	9
3.2.2 Culture :	10
3.2.3 Techniques moléculaires :	11
3.2.4 Radiographie :	12
3.3 Traitement et vaccin :	13
3.3.1 Isoniazide :	14
3.3.2 Rifampicine :	14
3.3.3 Pyrazinamide :	15
3.3.4 Ethambutol :	15
3.4 Vaccin :	16
3.5 Epidémiologie de la tuberculose	17
3.5.1 Incidence et prévalence :	17
3.5.2 Cas du Mali :	17
3.6 Réponse immunitaire :	18
3.6.1 Immunité innée et acquise :	18
3.6.2 Initiation de la réponse immunitaire dirigée contre les Mycobactéries :	19
3.6.3 Rôle des lymphocytes T CD4+ dans la réponse immunitaire contre le MTB :	20

3.7	Sexe biologique et Tuberculose :	22
3.7.1	Influence des hormones sexuelles sur l'immunité :	23
3.7.2	Facteurs influençant la différence homme et femme en matière de tuberculose :	24
4.	METHODOLGIE	26
4.1	Cadre et type d'étude :	26
4.2	Sélection des participants pour la phase rétrospective de l'étude :	26
4.3	Sélection des participants pour la phase prospective de l'étude :	28
4.4	Techniques de laboratoire	28
4.4.1	Diagnostic des mycobactéries :	28
4.4.2	Diagnostic du Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) :	29
4.4.2.1	Test rapide Alere Determine™ HIV-1/2:	29
4.4.2.2	Genscreen™ ULTRA HIV Ag-Ab:	31
4.4.2.3	New Lav-Blot I/II:	32
4.4.3	Analyses immunologiques	33
4.4.3.1	Immunophénotypage	33
4.4.3.2	Stimulation antigénique et marquage intracellulaire	40
4.4.3.3	Dosage multiplex des cytokines inflammatoires par le test MesoScale Discovery	45
4.4.3.4	Quantification des hormones	47
4.4.3.5	Saisie et Analyses des données :	48
4.4.3.6	Contrôle de qualité interne et externe :	49
4.4.3.7	Considérations Ethiques :	50
5.	RESULTATS	51
5.1	Résultats Globaux :	51
5.2	Résultats Analytiques	52
5.2.1	Phase Rétrospective :	52
5.2.2	Phase Prospective :	59
6.	COMMENTAIRES ET DISCUSSION	62

7. Limites de l'étude :	64
8. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS :	65
8.1 Conclusion :	65
8.2 Recommandations :	66
9. REFERENCES	67
FICHE SIGNALÉTIQUE	73
10. <i>SERMENT DE GALIEN</i>	75

1. INTRODUCTION

La tuberculose (TB) est une maladie respiratoire contagieuse causée par des bactéries du complexe du *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC).(1) En effet, les bactéries du MTBC sont des bacilles qui se propagent lorsqu' une personne atteinte de tuberculose (TB) expulse des aérosols contenant des mycobactéries dans l'air lors d'une toux. Elle touche généralement les poumons, d'où la forme clinique appelée tuberculose pulmonaire active (TBP). Elle peut se disséminer sur d'autres parties du corps, dans ce cas-ci on parle de tuberculose extra-pulmonaire.

La TB est considérée par l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) comme l'une des dix premières causes de décès dans le monde et la première cause de mortalité due à un seul agent infectieux avant la pandémie à coronavirus. Environ 1/4 de la population mondiale est atteinte de la tuberculose latente (2). L'OMS estime qu'environ 10 millions de personnes ont contracté la tuberculose en 2019 (1), une incidence qui a diminué très lentement au cours des dernières années. Le continent africain occupait 25% des cas de tuberculose dans le monde en 2019, suggérant son rôle majeur de cette région dans la transmission de la TBP dans le monde. (1)

De façon universelle, l'épidémiologie de la TB nous révèle que les hommes sont en général plus affectés que les femmes. Spécifiquement, 64% des cas de tuberculose sont du sexe masculin contre seulement 36% chez le sexe opposé.(1) De même, le nombre de décès dû à la tuberculose était significativement élevé chez les hommes que chez les femmes (56% versus 44%) en 2019.(1) Cette augmentation de cas chez les hommes semble être une tendance globale persistante toute fois l'intensité des différences entre les sexes au cours de la TBP peut aussi varier par région géographique.

Le Mali, pays situé au cœur de l'Afrique de l'Ouest, estimait une incidence de 53/100.000 habitants.(3) Dans une cohorte malienne de patients atteints de TBP (N=1,359), 71% des sujets étaient des hommes contre seulement 29% de femmes.(1) Ce qui nous a incité à émettre l'hypothèse qu'au Mali, comme dans tous les autres pays, les hommes sont plus susceptibles à la tuberculose que les femmes.

Bien que la cause de ce biais lié au sexe ne soit pas connue, les facteurs socio-épidémiologiques et comportementaux ont été historiquement considérés comme la force motrice de cette différence entre les deux sexes. Selon Bozzano et collègues, la différence entre les deux sexes dans l'épidémiologie de la TB, pourrait être expliquée par deux hypothèses dominantes a) le sous-diagnostic ou la sous-

déclaration de la tuberculose chez les femmes, et b) les différences réelles entre les hommes et les femmes dans la capacité de répondre à l'infection causée par *Mycobacterium tuberculosis*.(4)

La première hypothèse englobe des facteurs socioéconomiques, culturels, et comportementaux, notamment la stigmatisation des femmes atteintes de TB et l'accès limité aux soins de santé. Cependant, cette différence entre les deux sexes persiste même dans les pays à revenu élevé, où l'accès au soin de santé est universel. Par exemple, en Europe, il y a une différence remarquable entre les hommes et les femmes avec des prévalences respectives de 65% et 35%. (1)

La seconde hypothèse reflète des facteurs biologiques liés au sexe tels que les hormones sexuelles qui peuvent influencer la réponse immunitaire au MTB soit en favorisant la progression ou la réactivation de la tuberculose latente. En effet, des études ont montré que les femmes ont en général une immunité plus robuste que les hommes ce qui favorise une élimination plus efficace des agents pathogènes et une meilleure efficacité des vaccins.(5) Par contre, ceci pourrait aussi promouvoir une inflammation incontrôlée pouvant être nuisible à la personne. Un exemple patent est la prépondérance des maladies auto-immunes et inflammatoires chez les femmes. De plus, l'incidence mondiale de la TB chez les hommes et les femmes avant la puberté était respectivement de 52% et 49% en 2020, mais elle atteignait 62% chez les hommes adultes et 38% chez les femmes, suggérant ainsi la contribution des hormones dans la susceptibilité à la maladie. (1)

Cependant, malgré les progrès importants au cours des dernières années sur la pathogénèse de la tuberculose, les mécanismes gouvernant l'immunité protectrice surtout la contribution du sexe biologique lors de l'infection à MTB reste à élucider. La vision classique de l'immunité contre le MTB est basée principalement sur la participation des macrophages et des cellules du système immunitaire inné et adaptatif (lymphocytes T CD4+ et CD8+) pour éliminer des mycobactéries.(4) Il faut noter que les lymphocytes T CD4+ occupent un rôle majeur pour restreindre le développement vers une phase active de la TBP surtout les lymphocytes T CD4+ auxiliaires de la réponse Th1 (T-helper 1). En effet, les patients lymphopéniques qui ont un taux de CD4 bas avec ou sans infection par le VIH courent un risque accru de développer une tuberculose active.(6) D'où l'intérêt de mieux comprendre le rôle des hormones sexuelles dans la réponse immunitaire médiée par les cellules T CD4+ pour contenir le MTB.

De ce fait, lors de cette thèse de Pharmacie, nous planifions d'investiguer le rôle potentiel des facteurs biologiques sur cette différence entre les sexes, notamment le rôle des hormones dans la réponse

immunitaire dirigée contre l'infection mycobactérienne. La question centrale de recherche est de déterminer s'il y a une différence dans la réponse immunitaire médiée par les CD4+ entre les hommes et les femmes faisant une TBP. Spécifiquement, nous proposons d'étudier les sous-populations T CD4+ et les médiateurs solubles potentiellement impliqués dans ce processus, avec un accent particulier sur l'interaction entre la réponse immunitaire T CD4+ et les hormones stéroïdiennes sexuelles. Nous croyons fortement que cette étude peut fournir des informations précieuses sur les facteurs biologiques qui confèrent une protection efficace contre le MTB, facilitant ainsi le développement rationnel de nouveaux vaccins et de médicaments efficaces contre la tuberculose dans le monde.

2. OBJECTIFS

2.1 Objectif général

L'objectif principal de cette étude est de comparer la réponse immunitaire cellulaire dirigée contre le complexe *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) entre les hommes et les femmes atteintes de tuberculose.

2.2 Objectifs spécifiques

- Comparer les proportions et les valeurs absolues des sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ entre les hommes et les femmes faisant une tuberculose pulmonaire active ;
- Comparer les fréquences des lymphocytes T CD4⁺ productrices de cytokines inflammatoires en réponse à une stimulation par les antigènes du *Mycobacterium tuberculosis* chez les deux sexes ;
- Comparer les niveaux des cytokines inflammatoires circulantes chez les hommes et les femmes atteints de tuberculose pulmonaire active ;
- Analyser les fluctuations des concentrations de testostérone au cours du traitement de la tuberculose chez les hommes.

3. GENERALITES

3.1 Définition :

La tuberculose est une maladie infectieuse due aux bacilles du complexe *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) qui infectent généralement les cellules pulmonaires (tuberculose pulmonaire) mais peut également toucher d'autres sites (tuberculose extra-pulmonaire).(1)

3.1.1 Agent pathogène :

Le MTBC est l'agent causal de la tuberculose. Découvert par Robert Koch en 1882, il appartient au genre des Mycobactéries (*mycobacterium* spp.). Son génome complet fut séquencé en 1998 .(7) Il se présente en petits bacilles en forme de bâtonnets, aérobies stricts, immobiles, droits ou légèrement incurvés, de 2 à 5 µm sur 0,3 à 0,5 µm capable de provoquer différentes maladies chez l'Homme. (7) Le complexe *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) fait référence à un groupe d'espèces qui sont génétiquement similaires.(8, 9) Il s'agit des 5 membres traditionnels (*Mycobacterium tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. bovis*, Bacille de Calmette et Guérin [BCG]) ainsi que les espèces récemment découvertes, notamment, *M. canettii*, *M. caprae*, *M. pinnidi* et *M. mungii*.

Le genre *Mycobacterium* est généralement séparé en deux grands groupes sur la base de leur taux de croissance. Un groupe comprend des espèces à croissance lente telles que les agents pathogènes bien connus : *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* et *Mycobacterium leprae* qui sont les agents étiologiques de la tuberculose humaine (TB), de la tuberculose bovine (BTB) et de la lèpre, respectivement. L'autre groupe regroupe des espèces à croissance rapide comme *Mycobacterium smegmatis*, qui sont en général des bactéries opportunistes ou non pathogènes.(8, 9)

Parmi ces espèces, le *M. tuberculosis* (MTB) est le membre le plus connu, infectant plus d'un quart de la population humaine mondiale selon l'OMS.(1) Les animaux en contact avec les humains sont souvent touchés par le *M. tuberculosis*. Le *M. canettii* et le *M. africanum*, étroitement apparentés à *M. tuberculosis*, peuvent être responsables de la tuberculose humaine et sont généralement isolés chez les patients africains ou d'ascendance africaine. Le *M. bovis* présente le plus large spectre d'infection de l'hôte. Il peut infecter les hommes, les bovins et les chèvres domestiques ou sauvages. *M. caprae* n'a été isolé que des chèvres.(8, 9)

Le génome de *Mycobacterium tuberculosis* a été entièrement séquencé en 1998. Elle possède un chromosome circulaire de 4 411 529 paires de bases (GC%=65.6) pour 3 924 gènes. Un locus

particulier, appelé RD1 (region of difference 1) semble essentiel au pouvoir pathogène du bacille chez l'homme.(10) Ce gène est absent chez le BCG et les bactéries non pathogéniques. Il s'agit du gène codant pour la protéine ESAT-6, sécrétée par la bactérie et déclenchant une forte production de la cytokine Interféron-gamma (IFN- γ). La paroi du *Mycobacterium tuberculosis* est formée, de l'intérieur vers l'extérieur, d'une bicouche lipidique (membrane plasmique), d'une couche formée de polymères et d'acides mycoliques et d'une seconde bicouche lipidique.

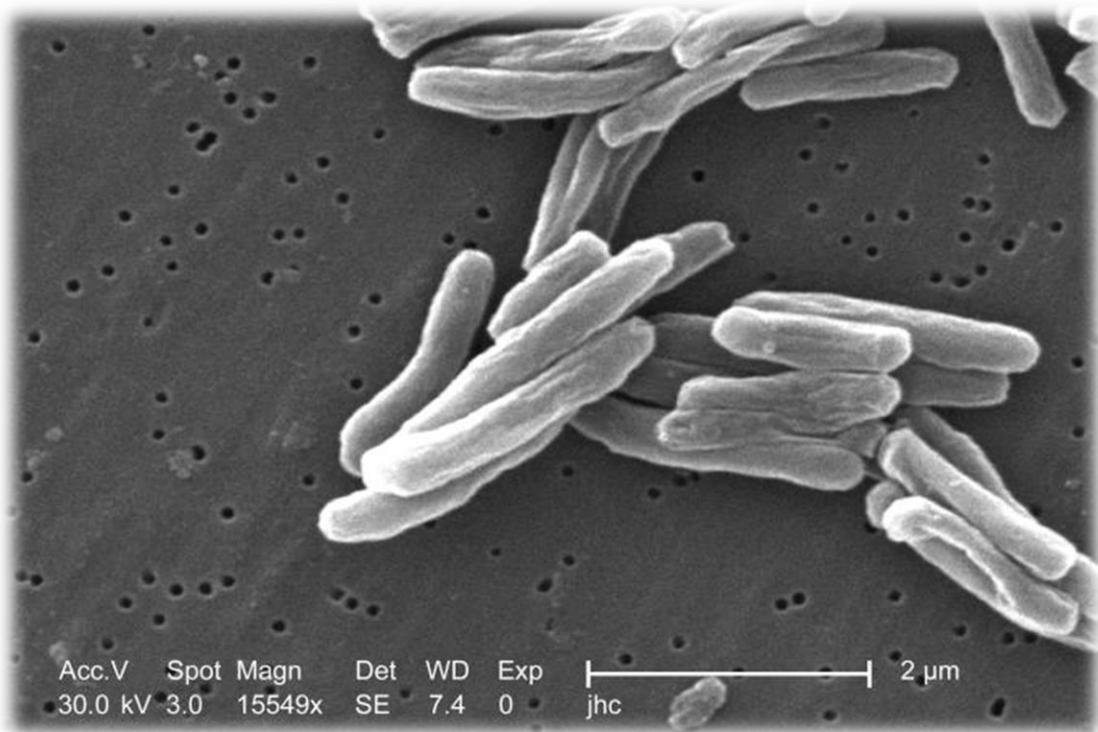


Figure 1. *Mycobacterium tuberculosis* au microscope (15549X)

Source : Bibliothèque d'images de santé publique (*Public Health Image Library*).

3.1.2 Manifestation clinique, transmission et pathogénèse :

Le MTB est transmise par voie aérienne lorsque les personnes atteintes de tuberculose pulmonaire active projettent des aérosols contenant des bactéries, par exemple en toussant.(9) Occasionnellement par voie orale ou digestive. La bactérie provoque des lésions qui sont très riches en germes, ce qui permet une dissémination importante de l'agent infectieux par les voies respiratoires, lors des violentes quintes de toux qui accompagnent la maladie dans sa forme pulmonaire. La tuberculose pulmonaire résulte de l'inhalation de particules « nuclei » suffisamment petites (égales ou inférieures à 8 microns) pour atteindre les alvéoles. Le MTB a la particularité d'être très résistant dans l'air et les poussières ce qui fait de la tuberculose une maladie très contagieuse.

Globalement, une part relativement faible des personnes infectées par MTB développe la maladie. Toutefois cette probabilité est nettement supérieure chez les personnes infectées par le VIH selon l'OMS.(1) La maladie est également plus courante chez les hommes que chez les femmes, et touche principalement les adultes dans les tranches d'âge les plus productives. Les symptômes cliniques sont essentiellement dus à la réponse immunitaire de l'hôte.

La primo-infection peut évoluer de trois façons :

- Guérison complète après un stade exsudatif plus ou moins aigu avec présence de bacilles et polynucléaires.
- Formation de tubercules (stade prolifératif), guérison lente par fibrose et finalement calcification (lésions pauci bacillaires).
- évolution par extension et confluence des tubercules; la liquéfaction du caseum crée une cavité; si celle-ci s'ouvre dans une bronche, il y a apport d'oxygène nécessaire à la survie des bacilles, et la lésion devient pluri bacillaire (un million de bacilles dans une caverne de 2 cm). Cette évolution défavorable se produit dans environ 5 % des cas.
- Les tuberculoses de réinfection, surtout chez l'adulte, peuvent être endogènes (reprise d'activité des bacilles enfermés dans un tubercule plus ou moins fibrose) ou résulter d'une réinfection exogène.

La dissémination dans l'organisme peut se faire par plusieurs mécanismes :

- Extension de proche en proche aux tissus contigus.
- Propagation par les bronches vers d'autres secteurs pulmonaires.
- Passage par les voies lymphatiques vers les ganglions
- Essaimage par voie sanguine (méningite, tuberculose urogénitale, etc.). Le sang est envahi soit par la rupture d'une caverne dans un vaisseau, soit plus souvent par forçage du barrage ganglionnaire (il n'y a pas de septicémie mais seulement une bactériémie transitoire).(4)

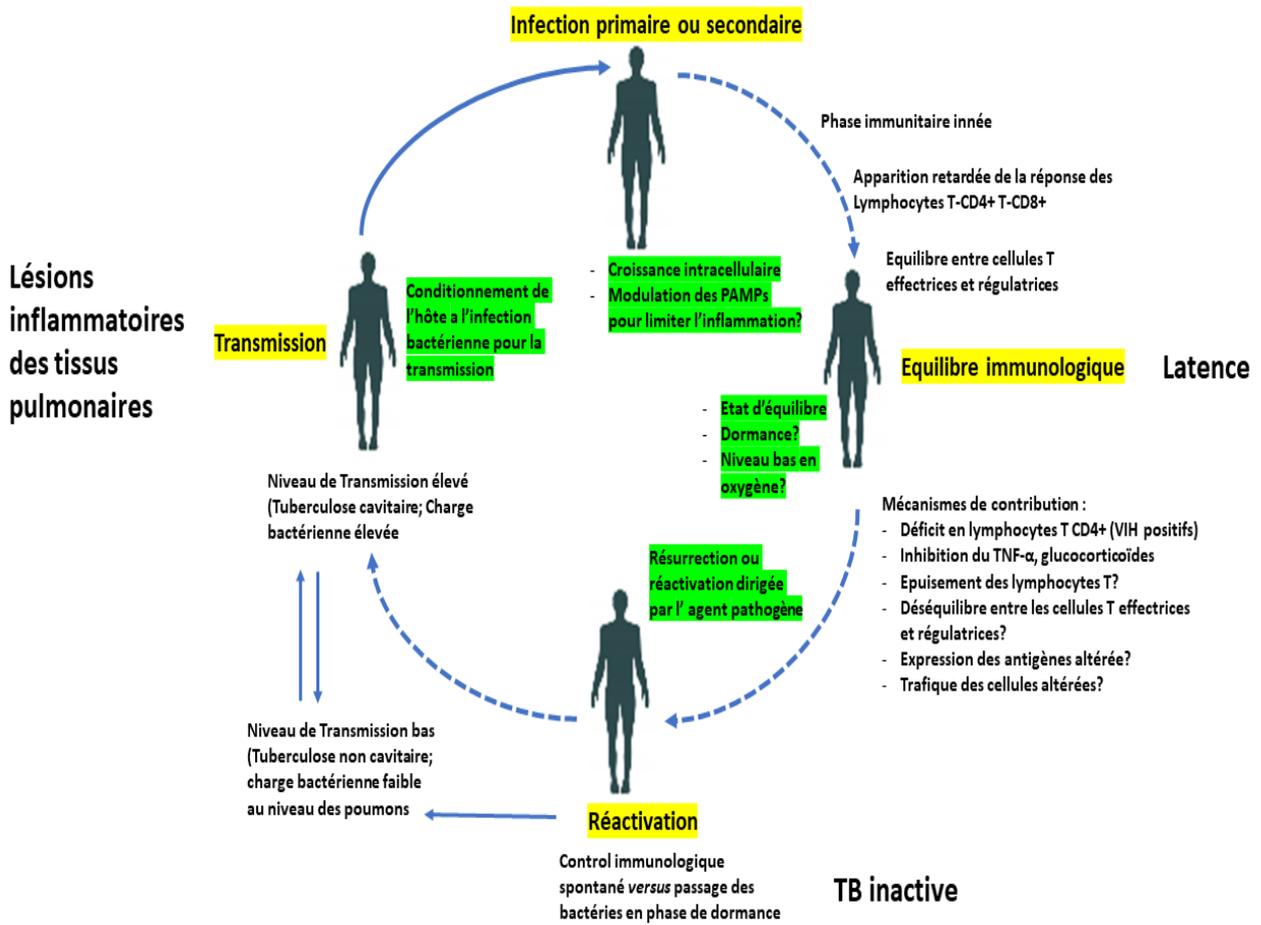


Figure 2. Cycle de transmission du Mycobacterium tuberculosis chez l'homme

Le cycle est basé sur des études cliniques, épidémiologiques et immunologiques chez l'homme.(11)

3.2 Diagnostic de la tuberculose :

De nos jours, il existe plusieurs outils efficaces pour détecter la tuberculose et réaliser un diagnostic fiable, notamment l'examen du prélèvement de crachat au microscope, la culture sur milieu liquide ou solide, les méthodes moléculaires, les tests immunologiques, et l'histologie.

La méthode la plus courante pour diagnostiquer la tuberculose est l'examen microscopique des frottis d'expectorations, au cours duquel on observe au microscope la bactérie dans des échantillons d'expectorations. La culture permet de mettre en évidence les bacilles dans les prélèvements car l'examen direct n'est pas toujours positif. Par contre, les méthodes de biologie moléculaire se concentrent sur le génome (ADN) des mycobactéries à partir d'ADN. En effet, les tests moléculaires rapides sont de plus en plus utilisés pour diagnostiquer la tuberculose maladie et la tuberculose pharmaco-résistante.(12) Tandis que les tests immunologiques tels que les tests IGRA (IFN- γ Released Assay) permettent de détecter la tuberculose latente. Toute fois la culture demeure la référence en matière de diagnostic de la tuberculose.

3.2.1 Examen microscopique :

En cas de suspicion de TB pulmonaire (TBP), à partir des signes cliniques d'un patient ou de la radiographie, des examens bactériologiques sont pratiqués sur l'expectoration du malade. Ils peuvent aussi être pratiqués sur des tubages gastriques (sécrétions bronchiques dégluties) ou des aspirations bronchiques. Pour les patients faisant de la tuberculose avec une localisation extra-pulmonaire soupçonnée, les prélèvements (biopsies) sont faits en fonction de la localisation de la maladie. L'examen microscopique des crachats permet d'identifier de manière rapide et fiable les patients atteints de TB pulmonaire (TBP) si la charge bacillaire est supérieure à 5000 bacilles/ml de crachat.(12) Si le crachat contient moins de 5000 bacilles/ml, il est peu probable que l'examen microscopique détecte une TBP, sa sensibilité est donc faible. De plus, en raison de manque de caractéristiques propre de l'examen, il est difficile de distinguer le MTB des mycobactéries non tuberculeuses (MNT). Toutefois, dans les régions où la prévalence de la TB est très élevée, il est très probable qu'un frottis positif soit dû au MTB. (12)

La fiabilité de l'examen microscopique dépend en général de la qualité de l'échantillon recueilli et de la préparation des lames de lecture. Les crachats émis tôt le matin sont souvent plus riches en bacille. Par conséquent, les techniciens de laboratoire doivent être correctement formés et le laboratoire doit 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.(12) D'où la recommandation et la nécessité de faire au moins 2 examens chez tous les cas suspects de la tuberculose pulmonaire.(12) Lorsqu'il y a une suspicion de TBP chez un patient, habituellement, un premier échantillon est prélevé lors de la consultation. 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.(12)

Il faut noter que l'étape initiale avant de lire les lames avec le microscope est la coloration du culot de crachats. Notamment, la coloration Zeihl Neelsen et Auramine/ Rhodamine. Ces colorations se basent sur le caractère acido-alcool résistants des mycobactéries.(13) Les mycobactéries sont difficiles à colorer en raison de la teneur élevée en lipides de la paroi cellulaire .(7) Le composant phénol des colorants acido-résistants sert à dissoudre suffisamment le lipide permettant la pénétration avec le colorant primaire. Lorsqu'elle est exposée à de l'alcool acide, la paroi cellulaire résiste à la décoloration, d'où le terme « acido-résistant ». Un contre-colorant est ajouté pour fournir un arrière-plan et mettre en évidence la paroi colorée.(14) La méthode décrite ici est utile pour évaluer la contamination bactérienne des échantillons de culture tissulaire ou pour examiner le statut de coloration de Gram et les caractéristiques morphologiques des bactéries isolées de cultures bactériennes mixtes ou isolées.

3.2.2 Culture :

La culture est la méthode de référence pour le diagnostic de la tuberculose car elle est plus sensible que la microscopie.(13) Bien que la croissance des mycobactéries du MTBC soit très lente, le diagnostic de la tuberculose et la culture demeurent indissociables. Associée à une étape préalable de décontamination–fluidification pour les prélèvements provenant de cavités ouvertes, la culture demeure la méthode de référence pour le diagnostic de la tuberculose au laboratoire.(9) Elle permet également d'isoler la souche, support technique nécessaire à l'identification d'espèce et aux tests de sensibilité aux antituberculeux. Contrairement à la microscopie, Il faut 10 à 100 bacilles/ml pour obtenir un résultat positif. Seuls les laboratoires spécialisés avec un grand contrôle de qualité régulier peuvent réaliser des cultures.(12) 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 MTB, les résultats des cultures ne sont obtenus qu'après plusieurs jours. 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 d'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 MNT
- Surveillance et évaluation de la réponse au traitement chez les patients sous antituberculeux de deuxième ligne.(12)

Au laboratoire de tuberculose de l'UCRC, la technique de culture utilisée est la combinaison de deux types de milieux : le milieu liquide et le milieu solide .(7) L'échantillon de crachats est d'abord centrifugé après avoir été décontaminé pour éliminer d'autres micro-organismes. Le sédiment est cultivé sur un milieu de culture liquide ou solide, dans un incubateur 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. 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.

3.2.3 Techniques moléculaires :

Aujourd'hui, de nombreuses techniques moléculaires adaptées au diagnostic de la tuberculose sont utilisées grâce à l'amplification de l'acide désoxyribonucléique (ADN). 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. 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 Polymérase Chain Reaction (PCR) en temps réel, permettant de diagnostiquer une TBP et une résistance à la Rifampicine.(15) 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.(12) La sensibilité peut atteindre 90% si le test est répété 3 fois.(12)

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.(12)

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 multi-résistante (TB-MR) ou une TB méningée est suspectée, aussi bien chez l'adulte que chez l'enfant.(12) 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.(12)

3.2.4 Radiographie :

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.(12) Elle n'est pas systématiquement indiquée chez les patients à frottis positif dans de nombreux pays, en raison d'un manque de ressources.

Compte-tenu de son absence de spécificité, la Rx du thorax est considérée comme un outil de diagnostic complémentaire. En effet, des études comparatives ont montré que le taux d'erreurs commises par des spécialistes – par défaut ou par excès – était d'environ 20% .(12) 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'argument en faveur d'une TB.(12)

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.-à-d. 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.(12) Il existe principalement quatre types de lésions : fibrome, exsudatives, calcifiés et caséuses ou caverneuses.(16, 17)

- 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.

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 coïnfection 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.

Il faut noter que la radiographie du thorax est intéressante pour le diagnostic d'un épanchement pleural ou péricardique, en particulier au stade précoce de la maladie, lorsque les signes cliniques sont minimes. Un élargissement de la silhouette cardiaque est un élément clé du diagnostic de péricardite tuberculeuse.(18) La radiographie est également utilisée en cas de suspicion de TB osseuse ou articulaire. Elle peut être utile, ainsi que la tomodensitométrie, en cas de Mal de Pott.

3.3 Traitement et vaccin :

En l'absence de traitement, le taux de mortalité due à la tuberculose reste élevé. Dans les études sur l'histoire naturelle de la maladie, parmi les sujets VIH négatifs atteints de tuberculose pulmonaire à frottis positif, environ 70 % décèdent dans les 10 ans.(19) De même, parmi les cas à culture positive mais à frottis négatif, 20% décèdent dans les 10 ans.(19) Les modalités du traitement varient en fonction de la sensibilité aux antibiotiques de la bactérie isolée par le laboratoire. Ainsi, selon les recommandations de l'OMS, en cas de souche sensible, le traitement comprend une association de 4

antibiotiques antituberculeux : Isoniazide , Rifampicine , Ethambutol et Pyrazinamide selon deux schémas.(20)

3.3.1 Isoniazide :

L'isoniazide est l'hydrazide de l'acide isonicotinique, un composé chimique synthétisé pour la première fois à Prague en 1912. Son efficacité dans le traitement de la tuberculose n'a été toutefois démontrée qu'en 1952.(21) Depuis, il se classe parmi les agents antituberculeux les plus puissants. L'isoniazide n'est efficace que contre le bacille tuberculeux et n'a pas d'effet sur d'autres bactéries. Il pénètre rapidement dans tous les tissus et toutes les lésions et son activité n'est pas affectée par le pH de l'environnement. En raison de sa puissance, de la rareté de ses effets toxiques, de son faible volume et de son coût réduit, ce médicament est largement utilisé pour traiter la tuberculose. Il est aussi employé à titre prophylactique pour réduire le risque d'évolution de l'infection tuberculeuse vers une tuberculose active.(21) L'isoniazide est administré par voie orale, la posologie pour les schémas thérapeutiques quotidiens étant de 5 (4 à 6) mg/kg, c'est-à-dire une dose de 300 mg généralement. Pour les schémas thérapeutiques trihebdomadaires, la posologie est de 10 (8 à 12) mg/kg, soit environ 450 à 600 mg, administrés sous forme de dose unique pour les patients pesant de 40 à 60 kg et, pour les schémas thérapeutiques bihebdomadaires, la dose est de 15 (13 à 17) mg/kg. Ce médicament ne doit pas être donné sous forme fractionnée. Il a été montré qu'une valeur de pic élevée de la concentration sérique importait plus que la présence d'une concentration inhibitrice en continu.(21)

3.3.2 Rifampicine :

La Rifampicine est un antibiotique semi-synthétique, préparé pour la première fois en 1965 et très active contre les bacilles tuberculeux. Des études *in vitro* et *in vivo* ont fait la preuve de l'action bactéricide exceptionnelle de ce médicament et de sa compatibilité avec un usage intermittent.(22) Comme des doses orales non toxiques permettent de produire des concentrations sériques environ 100 fois plus élevées que la concentration inhibitrice pour le MTB, la Rifampicine a, dès le départ, soulevé l'espoir d'un raccourcissement possible du traitement.(23) Parmi les souches sauvages du bacille, on a constaté que la proportion de mutants résistants à la rifampicine était substantiellement inférieure à celle de mutants résistants à l'isoniazide.(22) La rifampicine est une composante clé des traitements antituberculeux modernes et constitue le seul médicament essentiel dans la chimiothérapie de courte durée. Elle est administrée par voie orale et la posologie usuelle est de 10 (8 à 12) mg/kg (dose maximum 600 mg), deux ou trois fois par semaine. Elle doit être prise de préférence au moins 30 minutes avant un repas, car son absorption diminue lorsqu'elle est ingérée en même temps que des aliments. Comme réactions indésirables, la rifampicine est bien tolérée par la plupart des patients aux

posologies actuellement recommandées. A la différence d'autres antituberculeux, elle déclenche certaines réactions indésirables plus fréquemment dans le cadre d'un schéma intermittent que dans celui d'une prise quotidienne. En outre, le risque d'effets indésirables augmente avec la durée de l'intervalle entre les doses : la toxicité d'un traitement hebdomadaire est donc forte.

3.3.3 Pyrazinamide :

On a montré que le Pyrazinamide exerçait une action stérilisante à l'intérieur des macrophages dans lesquels les bacilles se développent lentement en raison du pH acide du milieu.(22) Ce médicament est ainsi capable de tuer des bacilles tuberculeux qui autrement ne pourraient être attaqués efficacement par les antituberculeux actuellement disponibles. Comme il raccourcit la durée du traitement à appliquer, le Pyrazinamide est un composant indispensable des chimiothérapies de courte durée. Il est administré par voie orale et la dose quotidienne habituelle est de 25 (20 à 30) mg/kg. Dans le cadre des schémas thérapeutiques intermittents, on administre 35 (30 à 40) mg/kg trois fois par semaine ou 50 (40 à 60) mg/kg deux fois par semaine. Comme réactions indésirables Aux doses actuellement recommandées, le Pyrazinamide entraîne rarement une toxicité grave, mais une hépatotoxicité peut se manifester à forte dose.(22) Les douleurs articulaires sont un effet secondaire courant, qui apparaît plus fréquemment avec les schémas thérapeutiques à base de pyrazinamide quotidiens qu'avec les schémas intermittents de ce type. L'arthralgie peut être traitée avec succès par l'acide acétylsalicylique ou par d'autres agents anti-inflammatoires et analgésiques et ne nécessite pas le retrait de l'antituberculeux. La goutte classique se manifeste rarement ; elle peut, le cas échéant, être traitée par la colchicine. Les concentrations d'acide urique sont souvent élevées chez les malades traités par le pyrazinamide ; une augmentation asymptomatique du taux sérique d'acide urique ne requiert aucun traitement.

3.3.4 Ethambutol :

L'Ethambutol est un composé synthétique non apparenté aux autres antituberculeux. Il est efficace contre le MTB et certaines autres mycobactéries, par exemple *M. kansasii*, mais n'agit pas contre les autres bactéries et n'a pas d'effet antifongique.(22) L'Ethambutol a principalement une action bactériostatique. Il est administré par voie orale et sa posologie est habituellement de 15 (15 à 20) mg/kg pour une administration quotidienne, de 30 (25 à 35) mg/kg à raison de trois fois par semaine et de 45 (40 à 50) mg/kg à raison de deux fois par semaine. Comme réactions indésirables, l'Ethambutol peut provoquer une névrite rétrobulbaire, caractérisée par une détérioration de la vision, avec réduction de l'acuité visuelle, cécité au rouge-vert, vision brouillée, scotomes centraux et défauts du champ périphérique. La toxicité ophtalmique semble dose-dépendante et ne se manifeste que

rarement si la dose quotidienne administrée ne dépasse pas 15 mg/kg.(24) Les malades recevant de l'Ethambutol doivent être avertis de la nécessité de pratiquer un examen oculaire si des symptômes ophtalmiques apparaissent. La vision retourne habituellement à la normale en l'espace de quelques semaines lorsqu'on arrête l'Ethambutol, mais le nerf optique peut être définitivement endommagé si l'on poursuit le traitement. Ce médicament ne doit généralement pas être administré à de jeunes enfants, sur lesquels on ne peut compter pour signaler une perte d'acuité visuelle ou chez lesquels une telle perte ne peut être mesurée avec fiabilité. En raison de sa dégradation rapide sous les climats tropicaux, l'Ethambutol doit être fabriqué et entreposé de manière à éviter l'absorption d'humidité.

En plus des antituberculeux de 1ère ligne, présente en haut, les Antituberculeux de deuxième ligne ou intention sont aussi disponible : Les antituberculeux de deuxième intention comprennent des aminoglycosides (kanamycine, amikacine), des polypeptides (capréomycine), des thioamides (éthionamide et protionamide), des fluoroquinolones (ofloxacine et ciprofloxacine), la cyclosérine et le PAS (Acide para-aminosalicylique).(25) Ils peuvent être classés comme suit :

- Activité bactéricide élevée : aminoglycosides, capréomycine et thioamides
- Activité bactéricide faible : fluoroquinolones

- Vaccination au BCG : Effet bactériostatique : cyclosérine et PAS.(26, 27)

3.4 Vaccin :

De nos jours, un seul vaccin contre la tuberculose est reconnu par l'OMS, à savoir le Bacille Calmette Guérin (BCG) qui est un vaccin atténué après plusieurs passages en culture. Il est préparé à base d'une souche atténuée de bacille tuberculeux dérivé d'un isolat de MTB.(19) 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.(19, 28, 29) Les meilleurs résultats de vaccination ont été obtenus chez les jeunes enfants.(19) Spécifiquement, le risque de mortalité des formes graves de la maladie, plus fréquentes à bas âges, sont réduits de 30 à 50% des cas après administration du vaccin jusqu'à 2 ans en Afrique de l'Ouest et s'étendant à 5 ans à Ouganda.(20) Une fois l'effet protecteur du vaccin installé après 5 à 10 semaines, il peut perdurer au moins 10 ans.(30) 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.(31)

Il faudra signaler que la prévention de la tuberculose 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 de la tuberculose.

3.5 Epidémiologie de la tuberculose

3.5.1 Incidence et prévalence :

La tuberculose existe depuis plus de 120 siècles.(7) En 2020, selon les estimations de l'OMS, 9 millions de personnes l'ont contractée et 1,5 millions de personnes en sont décédées, dont 360 000 sujets VIH-positifs.(1) Une des nouvelles caractéristiques de l'épidémie est une augmentation des souches multi-résistantes.(1)

L'Assemblée mondiale de la Santé a adopté la nouvelle stratégie mondiale OMS de lutte contre la tuberculose pour la période 2016-2035, qui vise à réduire de 90% l'incidence de la tuberculose dans le monde et à mettre fin à l'épidémie mondiale de tuberculose.(1) 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)

3.5.2 Cas du Mali :

Au Mali, il a été rapporté en 2019 une incidence estimée à 53 cas pour 100 000 habitants soit exactement 10585 cas de tuberculose pour une population de 20 849 154 d'habitants selon l'OMS.(32) Au total, 6909 cas ont été notifié en 2019 soit un taux de notification de 35 pour 100.000 habitants.(32) Le taux de détection a connu une irrégularité de 58% en 2014 à 65% en 2019.(32, 33) Le niveau de transmission de la maladie et les paramètres épidémiologiques ont été globalement stables ces dernières années. Ainsi, les différentes formes notifiées en 2018 par exemple n'ont pas trop variées par rapport à 2019 et se répartissent comme suit :

- Les nouveaux cas de TBP avec confirmation bactériologique ont passé de 63% en 2018 à 66% en 2019.
- Les formes cliniques pulmonaires représentaient 13% et sont restées stationnaire.
- Le taux de positivité des cas de TB+ a passé de 13% en 2017 à 9% en 2018.

Globalement, le taux de dépistage a évolué, de 71% en 2018 à 78% en 2019 soit une progression de 7%.(32) Le sexe masculin est le plus représenté avec environ deux fois plus d'hommes pour une femme pour toutes les régions sauf Kidal qui n'a mené aucune activité de dépistage.(32)

Une évolution en dents de scie du taux de détection de la maladie a été constatée entre 2010 et 2014, passant de 56% des estimations de l'OMS en 2013 à 58% en 2014, le taux de décès dus à la maladie a diminué très légèrement dans le pays au cours des dernières années. L'incidence est restée stationnaire entre 2009 et 2013 soit 63 pour 100 000 habitants en 2010, 62 en 2011 et 60 de 2012 à 2014. De 2014 à 2018, la tendance générale de la notification a été mitigée. De 35 pour 100 000 habitants en 2014, la notification a augmenté à 39 pour 100 000 en 2015, à partir de cette date elle a décliné constamment pour atteindre 34 en 2017, puis elle s'est améliorée modérément en 2018 et reste stationnaire en 2019 avec 35 pour 100 000 habitants.(32)

3.6 Réponse immunitaire :

3.6.1 Immunité innée et acquise :

L'immunité nécessite la reconnaissance et l'élimination ou le confinement des organismes infectieux. Ces tâches sont effectuées par deux systèmes définis de façon assez large à savoir l'immunité innée et l'immunité acquise.(34) Le système immunitaire inné, considéré comme une première des défenses immunitaires non spécifiques et à action rapide contre les micro-organismes envahisseurs, est composé de molécules et de cellules qui distinguent la cellule de l'hôte de celles d'agents infectieux, en partie par la reconnaissance de motifs conservés chez les micro-organismes.(35) En revanche, le système immunitaire adaptatif a évolué pour être capable de générer une grande diversité de récepteurs d'antigènes, il est donc hautement spécifique mais beaucoup plus lent à répondre que la réponse immunitaire innée.(35) Une caractéristique du système immunitaire adaptatif est sa capacité à « se souvenir ». Lorsque les cellules mémoires T et B reconnaissent l'antigène, elles génèrent des réponses effectrices qui sont quantitativement et qualitativement supérieures à celles des cellules T ou B naïves.(35)

Les composants du système immunitaire inné sont activés dans les heures qui suivent l'exposition et leur efficacité n'est pas augmentée significativement à la suite d'un contact précédent. Par contre les cellules du système immunitaire acquis et les anticorps qu'ils produisent peuvent reconnaître un nombre pratiquement illimité de cibles différents, mais ils ne deviennent efficaces que quelques jours après le premier contact avec un micro-organisme particulier. Toutes fois les lymphocytes et les produits dirigés spécifiquement contre ce micro-organisme persistent sous forme d'une mémoire immunitaire qui assurera une protection rapide lors d'une nouvelle exposition au même agent infectieux. Cette propriété du système

immunitaire acquis ou adaptative constitue la base de l'effet protecteur d'une vaccination.(19) La plupart des mécanismes qui éliminent les organismes infectieux sont fournis par le système immunitaire inné. La réponse immunitaire inflammatoire est un exemple d'immunité innée car elle bloque l'entrée d'agents pathogènes envahissants par la peau, les voies respiratoires ou gastro-intestinales. Si les agents pathogènes peuvent percer les surfaces épithéliales, ils rencontrent des macrophages dans les tissus sous-épithéliaux qui tenteront non seulement de les englober, mais aussi de produire des cytokines pour amplifier la réponse inflammatoire.(36)

Le système immunitaire réagit de manière variée à différents micro-organismes souvent déterminés par les caractéristiques du micro-organisme. Face aux bactéries, la réponse dépend souvent de la pathogénicité de la bactérie et du stade de l'infection.(37) Par exemple, on peut anticiper une :

- Activation du système du complément par les couches lipidiques bactériennes gram-négatifs
- Activation des phagocytes contre les bactéries en utilisant une chimiotaxie positive, une fixation, une absorption et enfin en englobant ces bactéries ;
- Activation des lymphocytes T CD8+ pour tuer les cellules infectées par des bactéries ;
- Production d'anticorps neutralisants si la pathogénicité bactérienne est due à une toxine ;
- Production d'anticorps opsonisants pour la destruction des bactéries extracellulaires

3.6.2 Initiation de la réponse immunitaire dirigée contre les Mycobactéries :

Lorsque le bacille responsable de la tuberculose pénètre dans les alvéoles pulmonaires, il est phagocyté par les macrophages et les cellules dendritiques via certains récepteurs.(34) Les cellules dendritiques subissent un processus de maturation, migrent vers les ganglions où elles stimulent des clones de lymphocytes T. Ces derniers sont activés par les molécules de présentation classique (CMH de type I et II) et d'autres molécules de présentation type CD1. Ces lymphocytes activés prolifèrent et migrent vers le poumon pour s'accumuler sur le site d'infection et former le granulome avec les cellules infectées en leur centre et l'anneau de lymphocyte autour.(34) Ces lymphocytes activés exercent leur activité bactériostatique ou bactéricide par sécrétion entre autres d'interféron- γ (lymphocytes dit Th1), mais aussi d'autres cytokines. Cette inflammation est modulée par des lymphocytes régulateurs qui produisent des molécules anti-inflammatoires. Donc, la réponse immunitaire efficace dirigée contre le *mycobactérium* nécessite la reconnaissance du bacille. Cette reconnaissance du bacille est une interaction très précoce entre le bacille et les phagocytes via certains récepteurs de type « DC-SIGN ». Ce récepteur est une lectine qui reconnaît les sucres dont est particulièrement riche le bacille tuberculeux et son inhibition par des anticorps empêche la fixation du bacille sur les cellules dendritiques, indiquant que cette dernière est le récepteur principal du

bacille sur ces cellules.(38) L'étude anatomo-pathologique du tissu pulmonaire et des ganglions médiastinaux de patients affectés par la tuberculose montre que cette lectine exprimée par les cellules dendritiques du parenchyme pulmonaire a un rôle dans la capture initiale du bacille, mais aussi dans son transport vers les ganglions](12). L'étude en cytométrie de flux de l'expression de DC-SIGN sur différentes populations cellulaires de lavages broncho-alvéolaires (LBA) de patients porteurs de pathologies pulmonaires multiples, montre que jusqu'à 75 % des macrophages alvéolaires des sujets faisant de la tuberculose expriment cette lectine.(12)

3.6.3 Rôle des lymphocytes T CD4+ dans la réponse immunitaire contre le MTB :

L'immunité protectrice contre le MTB ainsi que le contrôle de sa réplication nécessitent une réponse immunitaire adéquate. Parmi les cellules de l'immunité adaptative, les lymphocytes T CD4+ occupent un rôle majeur pour restreindre le développement vers une phase active de la tuberculose. En effet, le rôle des lymphocytes T CD4+ lors de l'infection mycobactérienne a été décrit par plusieurs groupes de recherche travaillant sur les modèles murins mais aussi lors d'investigations transrationnelles sur les sujets faisant une tuberculose pulmonaire active ou latente.(39) Par exemple, chez les souris, les réponses des lymphocytes T CD4+ sont absolument nécessaires pour contrôler la réplication bactérienne et les animaux dépourvus d'une telle réponse succombent rapidement aux mycobactéries.(40, 41) Similairement, les personnes vivantes avec le VIH et qui ont un taux de CD4 bas sont plus susceptibles de développer une tuberculose pulmonaire active comme maladie opportuniste.(40)

Parmi les sous-types de lymphocytes, la qualité et la quantité de la réponse des cellules T CD4+ auxiliaires de type 1 communément appelé T-helper 1 (Th1) semble déterminer le résultat de l'infection tuberculeuse. Spécifiquement, la production d'interféron- γ (IFN- γ) par les cellules Th1 est considérée comme essentielle pour la protection contre les infections mycobactériennes. A titre d'exemple, les souris déficientes en IFN- γ succombent à une infection à faible dose du MTB. (42, 43)De même, les souris dépourvues d'interleukine-12 (IL-12), une autre cytokine clé de la réponse Th1, sont également incapables de contrôler l'infection mycobactérienne.(44, 45) Les effets antimycobactériens de l'IFN- γ dans les modèles murins sont largement liés à l'induction de peptides antimicrobiens, et de cytokines qui activent les macrophages infectés pour restreindre la réplication bactérienne intracellulaire, bien que d'autres mécanismes sous-jacents à l'immunité médiée par l'IFN- γ produite par les lymphocytes T CD4+ contre l'infection à *M. tuberculosis* sont en train d'être élucidés.(46) Dans les études d'immunogénétique humaine, les carences liées à la signalisation IFN- γ chez les jeunes patients porteurs de mutations au niveau des récepteurs IFNGR1 et IFNGR2 confèrent

une sensibilité mortelle aux infections mycobactériennes. (45, 47, 48) Aussi, la susceptibilité mendélienne aux maladies mycobactériennes (MSMD) décrit comme un spectre de mutations génétiques dans cinq gènes autosomiques (IFNGR1, IFNGR2, STAT1, IL12B, IL12RB) et un gène lié au chromosome X, confère une sensibilité aux mycobactéries environnementales généralement avirulentes mais aussi au vaccin Bacille Calmette Guérin (BCG). (47) En plus, les personnes souffrant de rhumatismes inflammatoires et sous traitement avec des anticorps monoclonaux anti-TNF- α ont un risque très élevé de réactivation de leur tuberculose latente. (46) Ensemble, ces données suggèrent que le nombre de lymphocytes T CD4+, leur passage de la périphérie aux poumons, et la qualité des cytokines et d'autres molécules antimicrobiennes semblent être déterminant pour une réponse immunitaire efficace anti-mycobactérienne, d'où l'intérêt porter sur ces cellules pour développer des stratégies vaccinales contre le MTB.

Il faudra noter que bien que la réponse Th1 semble être importante pour l'immunité contre la tuberculose, des études ont également démontré que d'autres sous-populations de lymphocytes T CD4+ tels que les lymphocytes T CD4 secrétant IL-17 (Th17) et ceux exprimant le FoxP3+ contribuent à la réponse contre l'infection à MTB. (39) Le rôle précis des cellules Th17 dans l'immunité protectrice contre le MTB reste cependant à clarifier. Des résultats récents suggèrent leur rôle dans le développement de granulomes moins hypoxiques, dans le recrutement des cellules Th1 (49) ou dans l'induction de CXC- chimiokines et follicules de cellules B. (50) Quant aux lymphocytes T FoxP3 + CD4, ou cellules T régulatrices (T-regs), elles sont suspectées d'altérer les réponses des cellules T anti-mycobactériennes et contribuer à la maladie, mais peuvent également limiter l'inflammation par la sécrétion de cytokine anti-inflammatoire comme l'interleukine-10 (IL-10). (51) L'analyse en cytométrie de flux des lymphocytes porteurs de CD4, CD25 et FOX P3 spécifiques des lymphocytes régulateurs montre qu'ils sont plus augmentés chez les patients faisant de la tuberculose que chez les sujets sains. (38) Une réduction du nombre de lymphocytes T régulateurs par déplétion est associée à une augmentation de la production d'interféron- γ mesuré dans le plasma des patients récemment traités, suggérant le rôle immunomodulateur de ces lymphocytes lors de l'infection mycobactérienne. (5) Aussi, le passage de la tuberculose latente à tuberculose active s'accompagne de l'émergence de lymphocytes régulateurs (5), sans qu'il soit possible de préciser s'il s'agit d'une cause ou d'une conséquence.

3.7 Sexe biologique et Tuberculose :

Au cours des vingt dernières années, les notifications de cas de tuberculose (TB) chez les hommes ont dépassé celles des femmes dans la plupart des contextes.(12) En 2014, 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) L'excès de cas notifiés chez les hommes a souvent été expliqué par les obstacles rencontrés par les femmes pour rechercher des soins et recevoir un diagnostic de TB.(38, 45) 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 tuberculose.

Par contre il est maintenant prouvé que le nombre de cas chez les hommes reste très élevé même dans les pays où il n'existe aucun obstacle apparent d'accès aux soins de santé et de diagnostic de la tuberculose chez les femmes.(51) Une analyse antérieure a révélé que la prévalence de la tuberculose chez les hommes dépassait la prévalence de la tuberculose chez les femmes dans 27 (93%) des 29 enquêtes de prévalence menées dans 14 pays entre 1953 et 1997.(51) 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%).

L'ampleur de la différence 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 de sexe reflète réellement un risque plus élevé de développer la tuberculose pour les hommes que pour les femmes, ou si cela est factice, reste largement non résolue. Cependant, il est reconnu à l'échelle mondiale que, la prévalence du taux de l'infection à la tuberculose chez les garçons demeure comparable à celle des filles jusqu'à l'adolescence après quoi les biais masculins se révèle.(52) 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 est dépendante du sexe. Par exemple, la plupart des maladies auto-immunes et/ou inflammatoires sont prédominantes chez les femmes (53) alors que les hommes développent certain type de cancers qui sont rares chez la femme.(53)

En résumé, ces données épidémiologiques révèlent la nécessité de déterminer l'influence sous-estimée du sexe biologique sur la susceptibilité à la tuberculose et, éventuellement la réponse au traitement.

3.7.1 Influence des hormones sexuelles sur l'immunité :

Les hormones sexuelles sont potentiellement des acteurs clés responsables des différences immunitaires entre homme et femme en raison de la présence de leurs récepteurs sur les cellules immunitaires. (52) Les hormones sexuelles, telles que les œstrogènes, la progestérone, les androgènes et la prolactine peuvent influencer différents aspects du fonctionnement du système immunitaire. 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. Par conséquent, pour comprendre comment le sexe biologique affecte l'immunité en général, il faut élucider les interactions complexes qui se produisent entre les hormones sexuelles, les chromosomes sexuels et les gènes de la réponse immunitaire. Dans le paragraphe suivant, nous discuterons des connaissances actuelles et des nouvelles connaissances sur la relation entre les hormones sexuelles et le système immunitaire.

Des études ont montré que les hormones sexuelles les plus importantes incluant les androgènes (testostérone et di estrogène) les œstrogènes (17 β estradiol) et la progestérone sont susceptibles de moduler le recrutement et la fonction de divers types de cellules immunitaires. (54) Le consensus général est que la testostérone et la progestérone ont des activités immunosuppressives, tandis que l'effet de l'œstrogène est plus nuancé et dépendant de la dose. Par exemple, de faibles doses d'estradiol favorisent la réponse Th1, alors que des taux élevés de 17 β -estradiol favorisent l'immunité Th2. (51). Nous pensons que la capacité de l'œstrogène à agir sur les réponses immunitaires est largement due à sa capacité à réguler 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, 55) Inversement, la testostérone diminue la production d'IFN- γ , de TNF- α et des espèces réactives de l'oxygène par les macrophages. (56-58) 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. (56, 58) Des doses supra-physiologiques de testostérone peuvent également inhiber l'activité des cellules NK cytotoxiques. 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. (59, 60)

Ces données combinées indiquent des hormones sexuelles sont des puissants modulateurs de la réponse immunitaire. A ce jour, on ne sait pas exactement si la même observation est vraie dans un état pathologique tel que la tuberculose pulmonaire active d'où l'intérêt apporté à ce thème de recherche.

3.7.2 Facteurs influençant la différence homme et femme en matière de tuberculose :

Bien que notre question de recherche soit centrée sur le rôle des facteurs biologiques, notamment les hormones, dans la pathogenèse de la tuberculose, nous reconnaissons aussi que conceptuellement, de nombreux facteurs peuvent également avoir des effets additifs et/ou opposés sur les différences entre les sexes. Ces facteurs peuvent être démographiques, comportementaux et ou environnementaux. En effet une étude antérieure a suggéré qu'au moins 30% des différences entre homme et femme au cours de la tuberculose était lie à une consommation plus fréquente de la cigarette chez le sexe masculin.(61) Donc, des recherches futures seront nécessaires pour explorer les contributions et les interactions des facteurs environnementaux, démographiques et comportementaux, en relation avec les facteurs biologiques sur la progression de la maladie ainsi que sur la réponse au traitement et la vaccination.

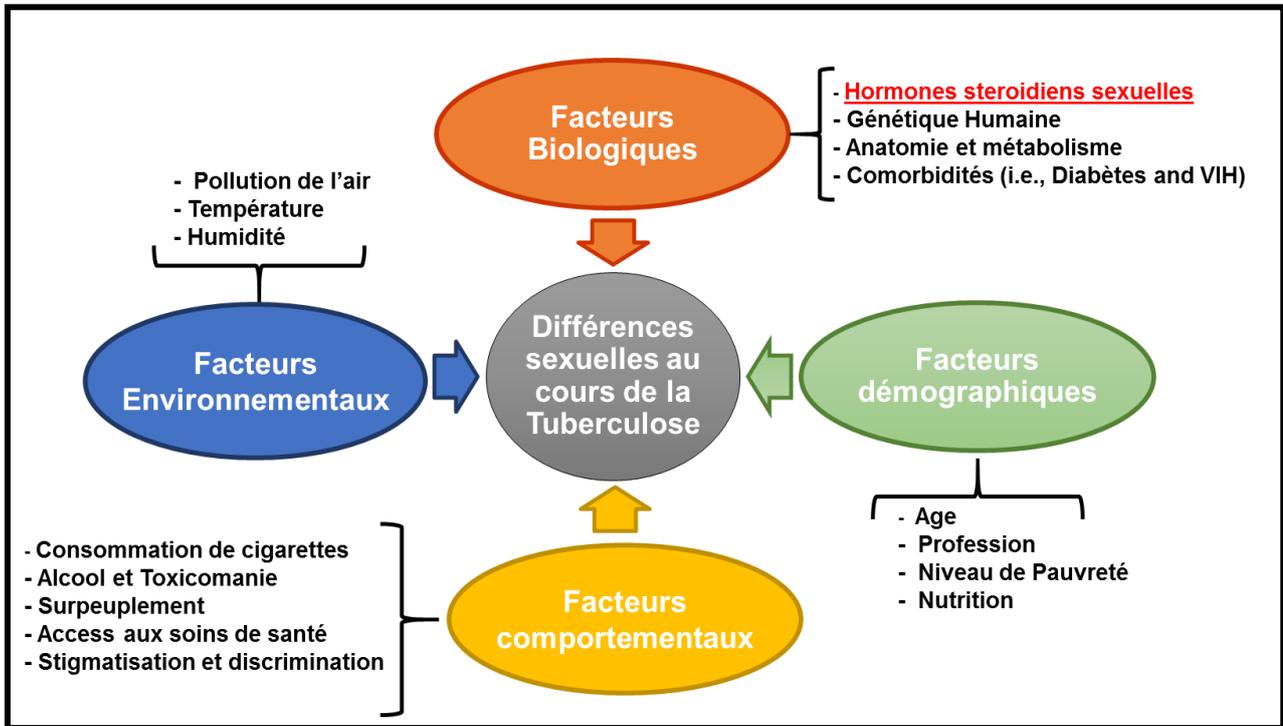


Figure 3: Facteurs potentiels pouvant influencer la différence sexuelle au cours de la tuberculose

(Source : Dabita D, communication personnelle, encours de publication)

4. METHODOLOGIE

4.1 Cadre et type d'étude :

Cette étude s'est déroulée au Centre Universitaire de Recherche Clinique (UCRC) de l'Université des Sciences, des Techniques, et de Technologies de Bamako (USTTB). Nos investigations se sont déroulées en deux phases distinctes. La première phase consistait à faire une analyse rétrospective de la base de données des patients faisant de la tuberculose inclus dans divers protocoles de recherche du programme UCRC avec comme objectif de faire ressortir la différence entre homme et femme en matière de réponses immunitaires. La deuxième phase consistait à mesurer de façon prospective les concentrations de testostérone présentes dans les échantillons de plasma archivés de 2006 à nos jours au sein du laboratoire ImmunoCore de l'UCRC dans le but d'évaluer les variations ou fluctuations hormonales au cours de la tuberculose.

4.2 Sélection des participants pour la phase rétrospective de l'étude :

Nous avons parcouru la base de données disponible au laboratoire afin d'identifier des femmes adultes (âge >18 ans) qui ont été nouvellement diagnostiqué comme faisant une tuberculose active pulmonaire, qui n'avait pas commencé le traitement contre la tuberculose, et qui ont une base de données complète en termes de données en mycobactériologie et en immunologie. Nous avons identifié 20 femmes qui respectaient ce critère. Sur ces 20 femmes, nous avons exclus 10 femmes. Les raisons de ces exclusions étaient la résistance multiple aux antituberculeux, une discordance entre la culture et les résultats de la microscopie directe, une infection par une souche de MTB qui n'a pas été isolée chez aucun des hommes dans la base de données, etc.... De ce fait 10 femmes ont été retenues pour l'analyse finale comme indiqué dans la Figure 4. Ensuite, on a choisi 10 hommes dans la même base de données qui ont les mêmes caractéristiques en termes d'âge, de sérologie VIH, d'abondance des mycobactéries par la microscopie directe, et de souches infectantes de MTB que les 10 femmes sélectionnées. Donc finalement, la taille globale de notre échantillonnage était de 20 personnes dont 10 hommes et 10 femmes faisant de la tuberculose.

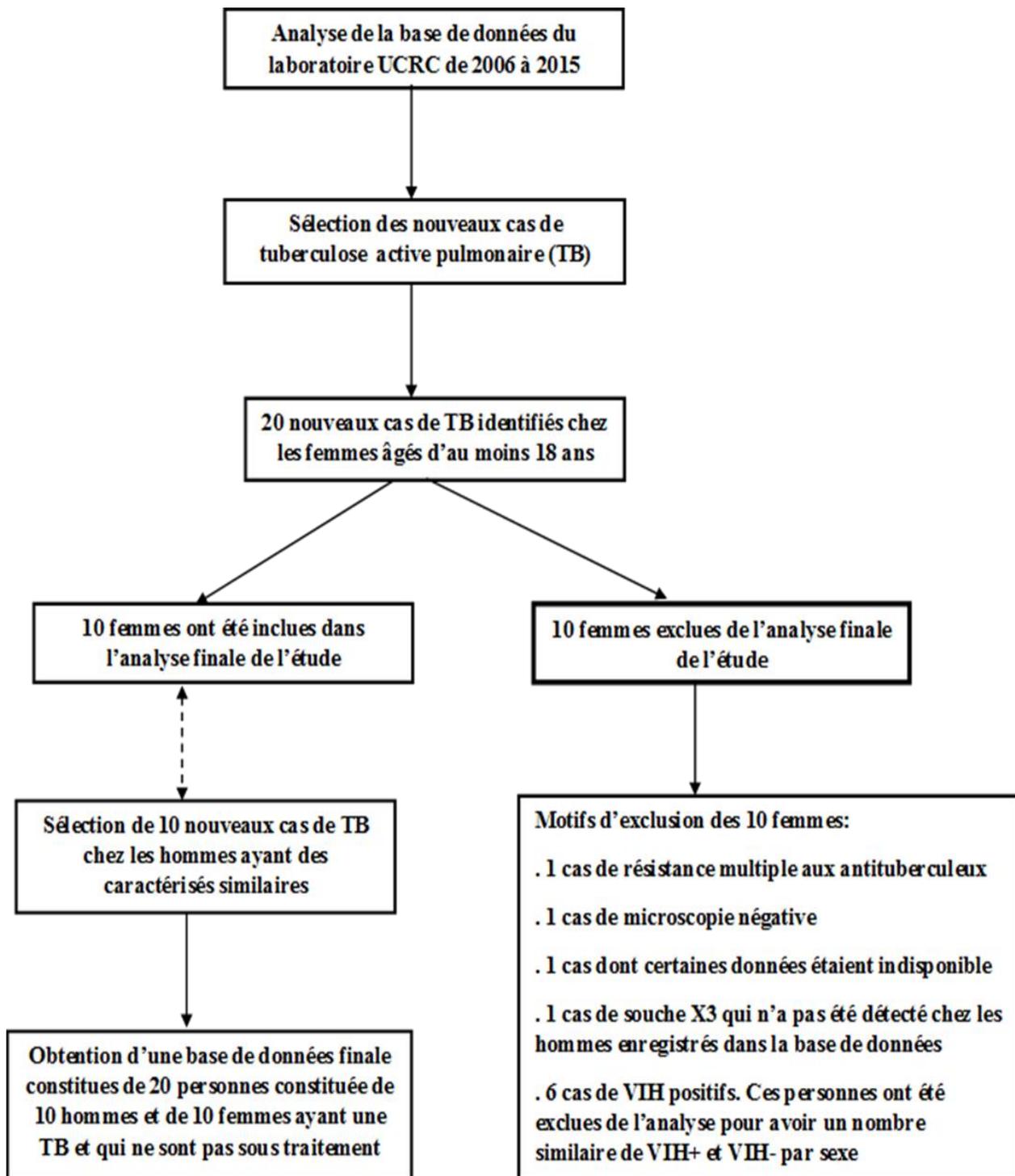


Figure 4. Sélection des participants pour la phase rétrospective de l'étude

4.3 Sélection des participants pour la phase prospective de l'étude :

Pour cette phase, les échantillons de plasma archivés qui ont été collectés chez les hommes uniquement. Notamment, les échantillons collectés chez des hommes testés négatifs pour une infection mycobactérienne par le test intradermo-réaction ($IDR < 15\text{mm}$) et la radiographie pulmonaire ainsi que pour l'infection VIH a été inclus. De même, les échantillons prélevés chez des hommes nouvellement diagnostiqués comme ayant une tuberculose active pulmonaire et naïfs de traitement ont été analysés au laboratoire. Au total, 36 échantillons ont été testés de façon prospective au laboratoire pour cette phase dont 19 hommes sains et 17 hommes faisant de la tuberculose.

4.4 Techniques de laboratoire

4.4.1 Diagnostic des mycobactéries :

Dans le laboratoire de Biosécurité niveau 3 de l'UCRC, communément appelé BSL-3, les échantillons de crachats après leur réception dans les mesures de sécurité étaient mis en culture après digestion, décontamination, centrifugation et concentration à l'aide d'une technique établie faisant appel au N-acétyl-L-cystéine hydroxyde de sodium (NaLC-NaOH) utilisés à volume égal pendant 15 minutes, suivi d'une neutralisation avec une solution tampon de phosphate à pH neutre ($6,8 \pm 0,2$) et une centrifugation à haute vitesse (3000g) pendant 15 minutes à 4°C pour avoir le culot, qui est la forme concentrée de l'échantillon et pour éliminer d'autres micro-organismes.(62) Pour chaque échantillon concentré obtenu par centrifugation, un frottis a été préparé pour la détection des bacilles acido-alcoolo résistants (BAAR) au microscope et une autre fraction était utilisée pour l'ensemencement en milieu liquide ou solide.

Pour la réalisation du frottis, on a utilisé la coloration Auramine/Rhodamine pour la lecture au microscope à fluorescence afin de confirmer le diagnostic (la présence ou l'absence de BAAR dans l'échantillon). Pour la culture en milieu liquide (MGIT), la durée d'incubation allait de deux semaines pour observer le début de la poussée de la culture à 6 semaines ou 42 jours à 37°C avec une concentration de CO_2 à 7% dans un BACTEC. Les cultures étaient examinées au moins une fois par semaine pour voir s'il n'y a pas de croissance qui signifiait la positivité ou une contamination par d'autres germes. Les cultures positives ont été confirmées par les colorations de Kinyoun (Remel Inc. Lenexa, KS 66215, US) et d'Auramine/Rhodamine. Ensuite on procédait à l'identification des mycobactéries du MTBC par le test capilia TB Neo, et le Genprobe. Après identification des mycobactéries, on procédait au spoligotypage pour classer

les sous espèces de mycobactéries tuberculeuses. Le spoligotypage est une nouvelle méthode de détection et de typage simultanés des bactéries de MTB. Le principe est basé sur la PCR (Polymerase Chain Reaction) d'un locus de répétition directe hautement polymorphe dans le génome du MTB.(2) Dans les conditions optimales, le spoligotypage nécessite moins des 24H pour obtenir des résultats d'où son avantage.(63)

4.4.2 Diagnostic du Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) :

Les tests de dépistage de l'infection à VIH fut initié depuis les années 80 au début de la découverte dudit virus comme agent causal du syndrome d'immunodéficience humaine (SIDA).(63) L'utilisation des tests sérologiques simples pour les anticorps anti-VIH utilisant des préparations d'antigènes viraux dérivés de culture ont été développés pour le diagnostic et pour la protection de l'approvisionnement en sang ou en produits sanguins.

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 Determine™ HIV-1/2 (Abott)
- Deuxième test utilisé en cas de positivité au premier test : Genscreen™ ULTRA HIV Ag-Ab (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.

4.4.2.1 Test rapide Alere Determine™ HIV-1/2:

Nous avons utilisé le test Détermine HIV-1/2 qui est un test immunochromatographique pour la détection qualitative des anticorps anti-VIH-1 et VIH-2. L'échantillon de sérum était ajouté au niveau de la zone de dépôt de l'échantillon. Au fur et à mesure que 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.

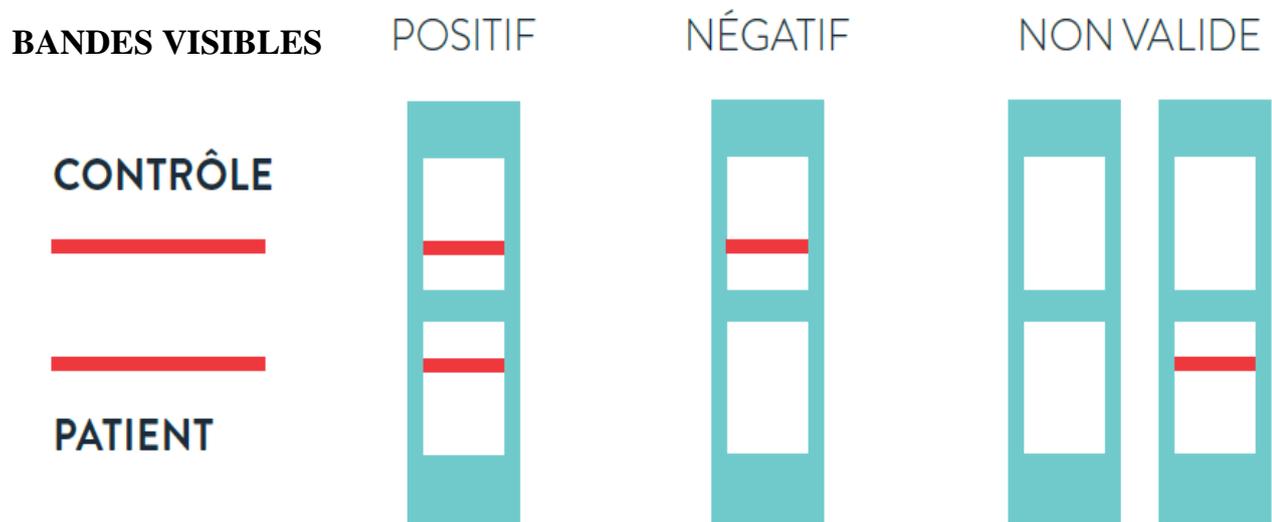


Figure 5. Exemples de résultats obtenus à l'aide du test Alere Determine™ HIV-1/2

4.4.2.2 *Genscreen™ ULTRA HIV Ag-Ab:*

Le Genscreen™ ULTRA HIV Ag-Ab est une technique immuno-enzymatique basée sur le principe d'ELISA (Enzym Linked Immunosorbant Assay) sandwich pour la détection de l'antigène (Ag) du VIH et des différents anticorps (AB) associés aux virus VIH-1 et/ou VIH-2, dans le sérum ou plasma humain. 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 Ab polyclonaux biotinylés contre l'Ag VIH (conjugué 1),
- 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).

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 Versamac 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.

4.4.2.3 New Lav-Blot I/II:

Le New Lav Blot est une technique de Western Blot qui est la méthode de référence pour confirmer l'infection à 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 masses moléculaires 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)

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-VH-2 sont présents, ils se lient aux protéines virales identifiées, présentes sur la bandelette ;
- Après lavage, les anticorps anti-IgG humaines 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.

4.4.3 Analyses immunologiques

4.4.3.1 Immunophénotypage

- **Principe :**

L'immunophénotypage est la technique de base pour faire le tri-cellulaire dans un échantillon de sang total à l'aide d'anticorps marqués par des fluorochromes, qui émettent des signaux fluorescents lorsqu'ils sont excités par le ou les lasers d'un cytomètre. Pour ce travail, nous avons utilisés des anticorps marqués par les fluorochromes suivants : le FITC (fluorescein isothiocyanate), le PE (phycoérythrine), le PercP Cy5.5 (péridinine couplée a la Cyanine), et l'APC (Allophycocyanine).

- **Préparation des réactifs :**

Pour ce protocole nous avons utilisé les solutions suivantes :

- Le BD-Wash est une solution de lavage. Sa composition est la suivante :
 - 500 mL de la solution PBS 1X (Phosphate Buffer Saline) ou Tampon phosphate Saline 1X (Cat# : ABI-102-01 ; ABI American BioInnovation)
 - 7.1 mL de la solution BSA (Bovine Saline Albumin) ou Sérum d'Albumine Bovine (Lot# : SLBG6589; SIGMA)
 - 0,5g d'azide de sodium (Cat# : 034K0234 ; SIGMA)

Ce mélange était filtré à l'aide d'un filtre stérile de 500mL de volume (Cat#: SCGPU05RE, Millipore Express). Le BD-Wash préparé était conservé au réfrigérateur pour une durée maximale d'un mois.

- Le FACS-Lyse (10X) est une solution permettant de faire la lyse des globules rouges dans le sang total. Elle était fournie par BD sous une forme concentrée (10X) qui devait être diluée au dixième (1/10) dans un récipient stérile pour avoir une concentration finale à 1X. Le FACS-Lyse (1X) était conservé à la température ambiante jusqu'à utilisation et pour une durée d'un mois. Pour sa préparation, on a utilisé les éléments suivants :
 - 25 ml de FACS-Lyse (Cat#: 349202 ; BD Biosciences)
 - 225 ml d'eau distillée
- Les anticorps de marquage : Au laboratoire ImmunoCore, les anticorps MultiSet qui sont des cocktails composés de 4 anticorps fluorescents, étaient utilisés. Ces anticorps sont :
 - Panel Cellule T : CD3/CD8/CD45/CD4 (Cat# : 340499, BD)
 - Panel Memoire: CD45RA/CD62L/CD3/CD4 (Cat#: 340977, BD)
 - Panel Activation: CD4/CD38/CD3/HLADR (Cat# 340573, BD)

Le premier panel de MultiSet permettait de distinguer les lymphocytes T CD4+ et CD8+ qui sont des cellules CD3+ des autres lymphocytes qui n'expriment pas le CD3. En revanche, le

deuxième panel de MultiSet servait à différencier les lymphocytes T CD4+ mémoire de ceux qui sont naïves. Quant au troisième panel, il a été utilisé pour différencier les lymphocytes T CD4 + activés exprimant à la fois le CD38 et le HLADR des cellules qui sont au repos. Il faut noter que nous avons utilisés des fluorochromes associés à un anticorps monoclonal anti-CD8 pour les tubes de compensation pour minimiser les chevauchements spectraux lors de l'acquisition, à savoir le CD8-FITC (Cat# : 347313), CD8-PE (Cat#:340046), CD8-PerCP (Cat#:341049), et CD8-APC (Cat#: 340659) de la compagnie BD. En effet, il faudra savoir que lorsqu'on utilise plusieurs fluorochromes ensemble, il peut exister des chevauchements entre les spectres d'émissions de ces fluorochromes qui pourront être à l'origine de « faux positifs». Autrement dit, certaines cellules apparaîtront positives pour deux marqueurs alors qu'elles ne sont réellement positives que pour un seul.

- Consommables : En plus des réactifs, les consommables utilisés pour cette procédure d'immunophénotypage étaient les suivants :
 - Tubes Polystyrène 12 x 75 mm (5 mL)
 - Vortexer Mixer
 - Centrifugeuse Eppendorf (Model 5810R)
 - Pipette Eppendorf pour Combitips
 - Combitips (5ml, 10 ml, et 25 ml)
 - Pipette Aid, Drummond
 - Pipettes Sérologiques (5ml, 10 ml, et 25 ml)
 - Gants stériles

- **Procédures de marquage du sang total :**

La procédure décrite en bas a été mise au point au laboratoire pour l'immunophénotypage des lymphocytes, il y a de cela plusieurs années comme indiquée dans la publication de Siddiqui et collaborateurs.(63)

- Prendre sept tubes polystyrènes de 5 mL pour chaque échantillon à tester
- Nommer les tubes de la façon suivante :
 - Tube 1 : Non-marqué
 - Tube 2 : FTIC
 - Tube 3 : PE
 - Tube 4 : PERCP
 - Tube 5 : APC
 - Tube 6 : Panel Cellule T

- Tube 7 : Panel Mémoire
- Tube 8 : Panel Activation
- Les tubes 1-5 sont les tubes de compensation
- Les tubes 6-8 sont les tubes d'analyses.
- Ajouter 20µl d'anticorps (anti-CD8 FITC, anti-CD8 PE, anti-CD8 PERCP, Panel T, Mémoire, et Activation) dans les tubes indiqués ci-dessus, sauf pour l'anti-CD8 APC qui sera utilisé à un volume de seulement 5µl pour le Tube 5. Le tube non-marqué ne contiendra pas d'anticorps.
- Ajouter 100 µl de sang total dans chaque tube puis vortexer pendant 10 secondes.
- Mettre les tubes en incubation à la température ambiante et à l'abri de lumière pendant 20 min
- Ajouter 2mL de la solution de FACS-Lyse, vortexer pendant 10 secondes, et mettre en incubation à la température ambiante pendant 10 min.
- A la fin de l'incubation, centrifuger à 300g par minutes pendant 5 min.
- Aspirer le surnageant pour conserver le culot au fond du tube.
- Ajouter 2mL de la solution de lavage (BD-Wash), vortexer pendant 10s et centrifuger à 300g pendant 5 min.
- Aspirer le surnageant et refaire le lavage d'en haut une deuxième fois.
- A la fin du lavage, aspirer le surnagent et ajouter 1mL de BD-Wash sur le culot cellulaire, vortexer pendant 10 secondes.
- Couvrir les tubes avec du papier aluminium et conserver les tubes dans le réfrigérateur entre 2-8°C jusqu'au moment de l'analyse sur le cytomètre.

- **Acquisition des échantillons :**

L'acquisition des échantillons a été effectuée sur le BD FACS Calibur à l'aide du logiciel Cellquest Pro selon la procédure standard du fabricant BD Biosciences. Le cytomètre était d'abord soumis à un contrôle de qualité interne en utilisant des billes marquées, notamment les billes Calibrite™ (Catalog N° : 340486) pour vérifier la performance des lasers et du système fluïdique avant de commencer l'acquisition des échantillons. Cette étape était suivie du passage des tubes de compensation dans le but de soustraire les chevauchements spectraux de façon manuelle en jouant sur les geomeans et les voltages. Ensuite, 100,000 lymphocytes étaient collectés pour les tubes 6 et 8 (Panel T, Mémoire, et Activation). A la fin de l'acquisition, les fichiers contenant les données (fichiers de type FSC) étaient exportés pour d'ample analyse.

- **Analyse qualitative des données :**

Cette analyse qualitative permet de générer les pourcentages des différentes sous-populations lymphocytaires dans le sang total. Les données exportées ont été analysées à l'aide du logiciel FlowJo™ version 10 de la compagnie BD. L'approche d'analyse était variée selon le panel d'anticorps utilisé. Pour le tube 6 (Panel T), on a adopté la méthode CD45/SSC qui se déroule comme indiqué dans le texte en bas mais aussi sur la Figure 6. Pour les autres tubes (tubes 7 et 8) les approches d'analyses utilisées sont montrées dans les Figure 7 et 8, respectivement.

- Exclusion des débris par la sélection des lymphocytes viables ;
- Identification des lymphocytes selon la présence du marqueur CD45 (qui est un marqueur pan-lymphocytaire) et leur faible granularité (SSC faible) par rapport aux autres cellules du sang ;
- Séparation des lymphocytes T des non-T par la présence ou l'absence du marqueur CD3 ;
- Classification des lymphocytes CD3+ selon la présence ou l'absence des marqueurs CD4 et/ou CD8
- Calcul de la fréquence des grands-parents qui permet d'avoir le pourcentage des sous-populations CD4 et CD8 en fonction du nombre de lymphocytes total (CD45) et non en fonction des lymphocytes CD3 directement (qui sont considérées comme les parents direct de ces sous-populations) ;
- Export des données sur Excel.

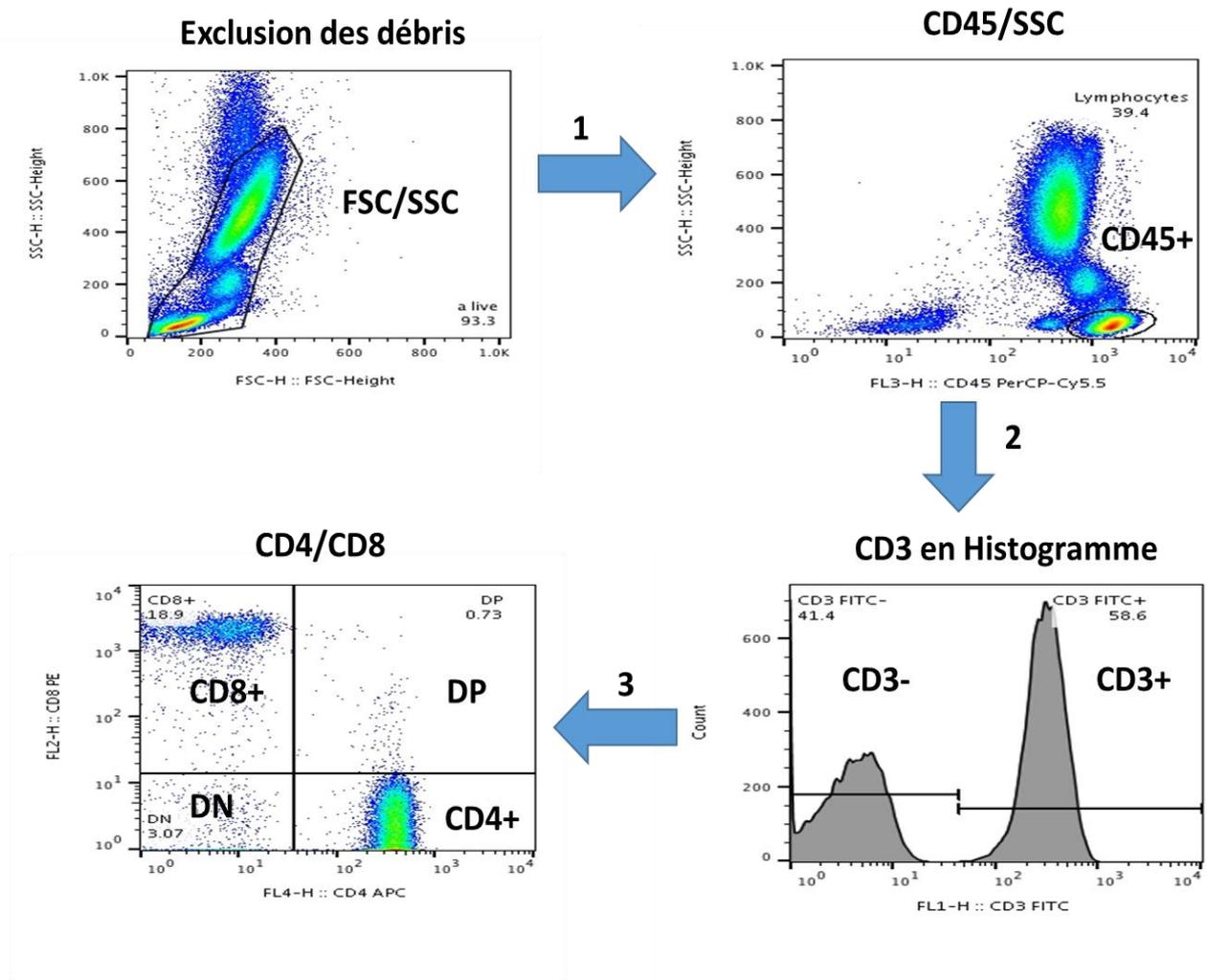


Figure 6. Etapes d'analyse des lymphocytes T CD4+ et CD8+ à l'aide du logiciel FlowJo

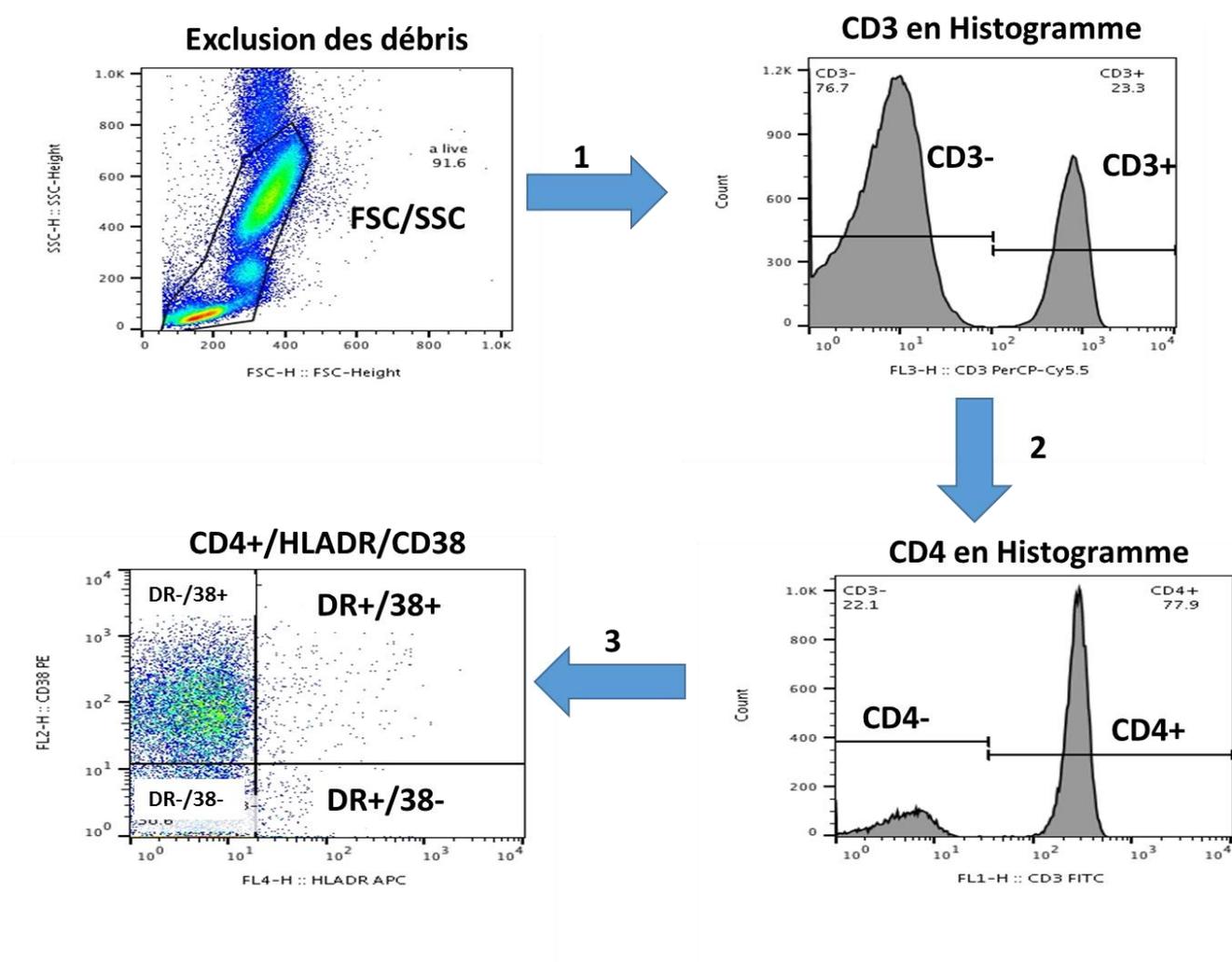


Figure 7. Etapes d'analyse des marqueurs d'activation des lymphocytes T CD4+ sur FlowJo

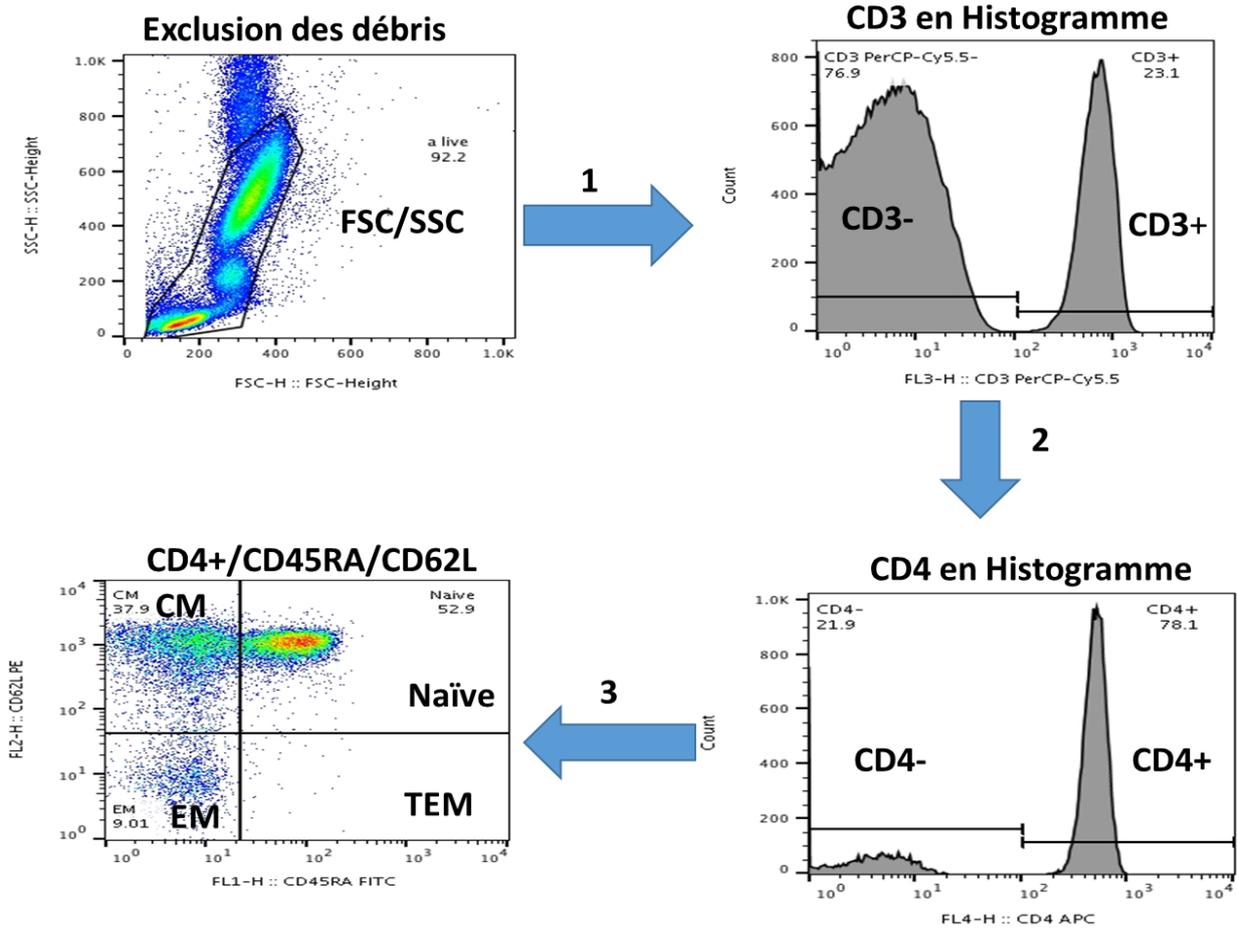


Figure 8. Etapes d'Analyse des lymphocytes T CD4+ naïves et mémoires et naïves sur FlowJo

4.4.3.2 Stimulation antigénique et marquage intracellulaire

- **Principe :**

Le but de cette technique est de quantifier la fréquence de lymphocyte T CD4⁺ sécrétrices de cytokines après stimulation du sang total héparinisé par les antigènes du MTB. La présentation de l'antigène est aidée par l'ajout d'un anticorps monoclonal dénommé CD28/CD49d qui a un effet co-stimulateur en stimulant l'activation, la prolifération, et la différenciation des cellules T CD4⁺ naïves en cellules effectrices. Les cellules T effectrices produisent des cytokines inflammatoires telles que l'IFN- γ et le TNF- α . Ces cellules T CD4⁺ productrices de cytokines en réponse à la stimulation antigénique sont marquées avec des anticorps fluorescents, mesurés, et analysés par la cytométrie en flux.(65)

- **Réactifs utilisés :**

- Anticorps monoclonaux co-stimulants CD28/CD49d (Cat# 347690, BD FastImmune,)
- Antigène pour la stimulation
 - Dérivé de protéine purifiée (PPD : purified protein derivative) (Cat.No. 2391, Stock Conc. 1mg/ml, Statens Serum Institut)
 - Entérotoxine B du Staphylocoque (SEB) (Cat# BT202, Stock conc. 1mg/ml, Toxin Technologies, Inc)
 - Cible antigénique sécrétoire précoce-6 (ESAT-6 : Early Secretory Antigenic Target-6kDa)
 - Filtrat de culture Protéine-10 (CFP-10 : culture filtrate antigen-10 kDa)
- Anticorps monoclonaux utilisés
 - CD69 PE (Cat# 341652, Stock Conc. 0,003 mg/ml, BD Bioscience)
 - CD4 PERCP-Cy 5.5 (Cat# 341654, Stock Conc. 0,0015mg/ml, BD Bioscience)
 - CD3APC (Cat# 340440, concentration de stock 0,05 mg/ml, BD Bioscience)
 - IFN- γ FITC (Cat# 340449, Stock Conc. 0.0125mg/ml, BD Bioscience)
 - IL2 PE (Cat# 340450, Stock Conc.0.00156mg/ml, BD Bioscience)
 - TNF- α APC (Cat# 340534, Stock Conc.0.0125mg/ml, BD Bioscience)
 - CD8 FITC (Cat# 347313, Conc. Non indiqué, BD Bioscience)
 - CD8 PE (Cat# 340046, Stock Conc.0.0125mg/ml, BD Bioscience)
 - CD8 Percp-Cy 5.5 (Cat# 341051, Stock Conc.0.005mg/ml, BD Bioscience)
 - CD8 APC (Cat# 340584, Stock Conc.0.005mg/ml, BD Bioscience)
- Solution de lyse BD FACS Lyse (10X) (Cat# 349202)

- Solution de Perméabilisation BD FACS Perm Solution 2 (10X) (Cat# 340346)
- Sodium Azide (NaN₃) (Cat# S2002, Sigma-Aldrich)
- Brefeldin A (Cat# B6542. Stock Conc. 1mg/ml, Sigma)
- Solution d'albumine bovine 30% (Cat# A9576, Sigma)
- Solution saline tamponnée au phosphate (PBS), sans calcium ni magnésium (Cat# 17-516Q, Biowhittaker)

- **Préparation des réactifs :**

Les réactifs étaient préparés comme suite :

- Solution de FACS Lyse (1X) : pour préparer la solution de travail, diluer la solution mère concentrée à 10X en solution stock de 1X en faisant une dilution 1 :10 avec de l'eau distillée. La solution de travail (1X) est stable pendant 1 mois à la température ambiante.
- Tampon de lavage (BD-Wash) : pour préparer la solution de travail, combiner les réactifs ci-dessus, puis filtrer avec un filtre de 0,2 µm dans un récipient stérile de 500 ml. Une fois préparée, la solution de travail (1X) du tampon de lavage est stable à 2-8°C pendant un mois.
 - 0,5 g d'Azoture de Sodium
 - 7,1 ml de solution d'albumine bovine - 30% (concentration finale 0,426%)
 - Compléter à 500 ml avec du PBS (1X)
- Solution de perméabilisation FACS Perm (1X) : pour préparer la solution de travail, diluer la solution mère concentrée à 10X en solution de travail 1X en faisant une dilution 1 :10 avec de l'eau distillée. La solution de travail est stable pendant 1 mois à température ambiante.
- Antigène PPD du MTB : Préparer des aliquots de 50 µl de l'antigène à une concentration de 1 mg/ml et congeler à -20°C.
- Antigène ESAT-6 du MTB : Préparer des aliquots de 20 µl de l'antigène à une concentration de 1 mg/ml et congeler à -80°C.
- Antigène CFP-10 du MTB : Préparer des aliquots de 20 µl de l'antigène à une concentration de 1 mg/ml et congeler à -80°C.
- Solution de brefeldine A (BFA) : Dissoudre 5 mg de poudre de BFA avec 1 ml d'éthanol à 100 % pour obtenir une concentration de 5 mg/ml. Préparer des aliquots de 10µl et conserver à -20°C.
- Préparation du Staphylococcus Enterotoxin B (SEB) : Il est recommandé que le SEB soit reconstitué à une concentration de 1 mg/ml, aliquoté et congelé à -80°C. La quantité de SEB réceptionné au laboratoire était de 5 mg, donc les directives suivantes ont été suivies :

- À l'intérieur d'un hôte de biosécurité, ouvrir le flacon et ajouter soigneusement 1 ml d'eau filtrée de qualité.
- Fermer le bouchon du flacon et vortexer doucement.
- Transférer le contenu du flacon dans un tube conique de 15 ml.
- Ajouter 4 ml d'eau filtrée au tube. Le volume final dans le tube doit être de 5 ml.
- Assurez-vous que le bouchon est bien fixé sur le tube Falcon de 15 ml et vortexez doucement la suspension pour vous assurer qu'elle est bien mélangée.
- Distribuer des aliquots de 20 µl de la solution dans des flacons cryogéniques marqués. Le cryotube doit être étiqueté comme suite : SEB, numéro de lot, concentration, date de préparation, date d'expiration et volume d'aliquot.
- Conserver les aliquotes étiquetées à -80°C dans une boîte de congélation étiquetée

- **Préparation du cocktail d'anticorps :**

- Ajouter à chaque tube en polystyrène contenant un volume approprié d'échantillon de sang stimulé une quantité spécifique et prédéterminée de cocktail d'anticorps. Les combinaisons de cocktails d'anticorps pour ce test comprenaient :

Cocktail #1 – IFN- γ FITC/ CD69 PE/ CD4 PerCP-Cy5.5/ CD3 APC

Cocktail #2 – IFN- γ FITC/ IL2 PE/ CD4 PerCP-Cy5.5/ TNF- α APC

- Les volumes en gras ci-dessous représentent le volume d'anticorps qu'on a combiné pour préparer les cocktails d'anticorps suivants.

- 10 µl + 20% of CD69 PE
- 10 µl + 20% of CD4 PERCP-Cy 5.5
- 3.0 µl + 20% of CD3 APC
- 20 µl + 20% of IFN- γ FITC
- 20 µl + 20% of IL2 PE
- 5 µl + 20% of TNF- α APC

❖ REMARQUE : IFN- γ FITC, IL-2 PE, TNF α APC, sont utilisés pour la coloration intracellulaire des cytokines. Par conséquent, ils seront préparés et ajoutés après perméabilisation.

- Ensuite, Multiplier le volume « par tube » de chaque anticorps par le nombre de tubes de stimulation en polystyrène à colorer. Cela représente la quantité totale de chaque anticorps à ajouter au cocktail.

❖ EXEMPLE:

CD69 PE = 12µl/tube X _____ tubes = _____(A)_____µl CD69 PE to cocktail

CD4 PERCPy 5.5 = 12 µl/tube X _____ tubes= ___(B)___ µl CD4 PERCP-Cy5.5 to cocktail
 CD3 APC = 3.6 µl/tube X _____ tubes= _____(C)___µl CD3 APC to cocktail

- La somme de A, B et C représente le volume total de cocktail nécessaire pour le dosage.
- Utiliser les mêmes étapes pour préparer le cocktail pour les anticorps intracellulaires.

- **Procédure :** Pour chaque échantillon de sang spécifique, étiqueter une série de tubes en polypropylène de 15 ml comme suit :

<u>TUBE#</u>	<u>VOLUME D'ANTIGEN PAR 500 µl DE SANG</u>
(1) NON STIMULE (NS)	0 µl
(2) COMPENSATION	0 µl
(3) PPD	20 µl (Final Conc. 40µg/ml)
(4) SEB	5 µl (Final Conc. 10 µg/ml)
(5) ESAT-6	5 µl (Final Conc. 10 µg/ml)
(6) CFP-10	5 µl (Final Conc. 10 µg/ml)

- À la base de chaque tube vide et étiqueté, ajouter 5µl d'anticorps monoclonaux CD28/CD49d.
- En procédant le long de la paroi latérale inférieure du tube, ajouter le volume d'antigène indiqué.
- Ajouter 500 µl de sang total dans chaque tube. Vortexer doucement.
- Appliquer les bouchons sans serrer et incuber dans 7,0% de CO₂, 37°C pendant 2 heures.
- Ajouter 5 µl de solution de travail « Brefeldin A » dans chaque tube (concentration finale 5 µg/ml). Vortexer et serrez les bouchons. Jeter le reste de la solution de travail Brefeldin A dans un conteneur pour déchets biologiques. Ne pas recongeler.
- ❖ REMARQUE : le rôle de la brefeldine A dans le dosage est de détruire la fonction normale de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique en pompant l'interféron-g hors des cellules T CD4+. En conséquence, l'interféron-g s'accumule et reste à l'intérieur des cellules T CD4+ pour la coloration et la détection.
- Incuber dans 7% CO₂, 37°C pendant 4 heures.
- Pendant les 4 heures d'incubation, pour chaque échantillon de sang spécifique, étiquetez (15) tubes en polystyrène comme suit (numéro d'échantillon, antigène, numéro de cocktail)
- **Tubes de stimulation**
 1. NS 1 (Non-Stimule-1)
 2. NS 2 (Non-Stimule-2)

3. PPD 1
4. PPD 2
5. SEB 1
6. SEB 2
7. ESAT-6 1
8. ESAT-6 2
9. CFP-10 1
10. CFP-10 2

- **Tubes de compensation**

- a. NM (Non marqué)
 - b. CD8 FITC
 - c. CD8 PE
 - d. CD8 PercP-Cy5.5
 - e. CD8 APC
- Transférer une quantité appropriée de cocktail extracellulaire ou d'anticorps individuel pour les tubes de compensation dans chaque tube en polystyrène, couvrir les tubes avec du papier d'aluminium.
 - Transférer 200 µl de l'échantillon de sang stimulé dans chacun des tubes en polystyrène
 - Couvrir les tubes de papier d'aluminium et incuber à température ambiante pendant 15 minutes.
 - Ajouter 2 ml de solution de FACS-Lyse dans chaque tube. Vortexer doucement.
 - ❖ REMARQUE : FACS Lysing Solution lyse les globules rouges et fixe les globules blancs (WBC). La fixation des GB est nécessaire pour préserver l'intégrité de la membrane cellulaire.
 - Couvrir les tubes de papier d'aluminium et incuber à la température ambiante pendant 15 minutes.
 - Centrifuger les tubes à 1500 rpm pendant 5 minutes.
 - Retirer soigneusement tout le surnageant pour former un culot. Remettre doucement le culot en suspension de préférence en faisant glisser le tube sur un support de tubes à essai plusieurs fois ou en vortexant doucement.
 - À l'aide d'une pipette à répétition Eppendorf et d'un Combitip de 5 ml, ajouter 500 µl de FACSPerm dans chaque tube. Vortexer doucement.
 - Couvrir les tubes de papier d'aluminium et incuber à température ambiante pendant 10 minutes.
 - Ajouter 2 ml de tampon de lavage BD-Wash (1X) dans chaque tube.

- Centrifuger les tubes à 1500 rpm pendant 5 minutes.
- Préparer la quantité de cocktail d'anticorps intracellulaires selon les besoins.
- Retirer soigneusement tout le surnageant.
- Ajouter la quantité appropriée de cocktail intracellulaire ou d'anticorps individuel à chaque tube en polystyrène. Vortexer doucement.

❖ REMARQUE : Les tubes de compensation ne sont pas colorés avec des anticorps intracellulaires.

- Ajouter 400 µl de BD-Wash aux tubes de compensation et conserver à 2-8°C jusqu'à la fin de la coloration.
- Couvrir les tubes de papier d'aluminium et incuber à température ambiante pendant 30 minutes.
- Ajouter 2 ml de tampon de lavage BD-Wash dans chaque tube. Vortexer doucement.
- Centrifuger les tubes à 1500 rpm pendant 5 minutes.
- Retirer soigneusement tout le surnageant.
- Remettre en suspension le culot dans 200 µl de tampon de lavage BD-Wash
- Effectuer l'acquisition des tubes en utilisant un cytomètre en flux (BD FACS Calibur™).
- A la fin de l'acquisition, exporter les données sur un disque et effectuer l'analyse des fichiers d'acquisition à l'aide du logiciel FlowJo™ comme précédemment élaborer dans la section 4.3.a.

4.4.3.3 *Dosage multiplex des cytokines inflammatoires par le test MesoScale Discovery*

- **Principe :**

Le test multiplex MSD est un test immunologique en phase solide dans lequel jusqu'à 10 électrodes revêtues de carbone sont construites en tant que points séparés au fond des puits d'une microplaque à 96 puits.(57) Les cytokines sont capturées par leurs anticorps apparentés qui sont à leur tour détectés par les anticorps de détection marqués avec du Ruthénium. Les anticorps de détection émettent de la lumière par suite du passage des électrodes revêtues de carbone à travers un courant électrique généré dans l'analyseur MSD appelé imageur Sector™. Une courbe de titrage est générée à l'aide d'un cocktail de standards contenant des concentrations fixes de cytokines. Les signaux de sortie sont capturés par une caméra CCD contenu dans l'analyseur. Ces signaux sont mesurés sous forme d'unités lumineuses par rapport à la position de l'électrode particulière.

La particularité du MSD est que le bruit de fond de l'instrument est négligeable grâce au type de caméra utilisé (camera CCD) mais aussi grâce à la présence des électrodes uniquement au bas de la plaque, ce qui réduit les lectures non spécifiques car les anticorps qui ne sont pas liés près des électrodes ne peuvent pas être détectés. Les données sont analysées à l'aide du logiciel Discovery Workbench™ version 3.0. L'imageur Sector™ n'a pas de système fluide et ne nécessite pas de maintenance par l'utilisateur. La lecture est automatisée, rapide et le fichier de sortie est facile à gérer dans les feuilles de calcul Microsoft Excel. (59)

- **Préparation des standards :**

Les cytokines humaines recombinantes utilisées comme standards ont été fournies par le vendeur dans un cocktail de neuf cytokines (c.-à-d., Panel pro-inflammatoire humain : GM-CSF, IFN- γ , IL-10, IL-12p70, IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 et TNF- α) à une concentration de stock de 1 $\mu\text{g/ml}$ pour chaque cytokine. Ce cocktail a été dilué en utilisant un diluant de dosage exclusif appelé diluant de dosage de cytokine sérique humaine (HSCA) pour avoir une solution de travail de 10000 pg/ml . Le fabricant MSD recommande une courbe standard basée sur un étalon à 8 points (y compris le blanc, c.-à-d., 0 pg/ml) avec des concentrations nominales (quantités de cytokines ajoutées) allant de 10000 à 2,4 pg/ml pour chaque cytokine. Les standards ont toujours été dilués pour fournir au moins 60 μl d'échantillon, ce qui est suffisant pour exécuter le test en double. Tous les standards ont été doucement vortexés puis stockés dans de la glace pendant l'expérience.

- **Protocole MSD :**

En bref, une plaque à 96 puits recouvert avec des anticorps de capture spécifiques de la cytokine, comme fourni par le fabricant, a été pré-incubée avec 25 μl par puits de HSCA pendant 30 minutes (min) sous agitation constante à 800 rpm/min à la température ambiante en utilisant un agitateur de plaque (Jitterbug-4, Boekel Scientific). À la fin de cette pré-incubation, 25 μl de chaque standard et d'échantillons inconnus ont été ajoutés en double dans les puits appropriés. La plaque a ensuite été incubée à la température ambiante sous agitation pendant 2 heures. Après cette incubation, la plaque a été lavée trois fois avec 200 μl de solution saline tamponnée au phosphate plus 0,05% de Tween-20 en utilisant un laveur de plaques automatisé (Wellwash®, Thermo Electron Corporation). Ensuite, nous avons ajouté 25 μl d'anticorps de détection fraîchement préparé selon les instructions du fabricant et incubé la plaque pendant une heure d'incubation à la température ambiante sous agitation constante. Cette dernière incubation a été suivie d'une autre étape de lavage et le tampon de lecture a été ajouté. La plaque a été immédiatement lue à l'aide de l'imageur Sector™ 2400. Les concentrations de cytokines ont été déterminées par le Discovery Workbench™ version 3.0, en utilisant des modèles d'ajustement de courbe suggérés par le

fabricant. Les résultats obtenus ont été transférés sur Excel. Toute valeur obtenue qui était en dessous de seuil de détection était considérée comme zéro.

4.4.3.4 *Quantification des hormones*

- **Principe :**

Le kit ELISA de testostérone IBL-AMERICA est un test d'immuno-absorption enzymatique en phase solide (ELISA) basé sur le principe de la liaison compétitive. Les puits de microtitrages sont recouverts d'un anticorps monoclonal de souris dirigé vers un site antigénique unique de la molécule de testostérone. Pendant la première incubation, la testostérone dans l'échantillon ajouté entre en compétition avec le conjugué enzymatique ajouté, qui est la testostérone conjuguée à la peroxydase, 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 d'une solution d'arrêt et la densité optique (DO) du produit jaune résultant est mesurée par un spectrophotomètre. L'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la concentration de testostérone dans l'échantillon.(66)

- **Contenu du kit**

- Microplaque, 12x8 bandes (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 calibré de microplaque
- Micropipettes calibrées à précision variable
- Papier absorbant
- Eau distillée
- Minuteur
- Papier millimétré ou logiciel de réduction des données

- **Préparation des réactifs :**

Laisser tous les réactifs et le nombre de barrettes requises à la température ambiante avant utilisation. Pour préparer la solution de lavage, on a dilué 30 ml de solution de lavage concentrée 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.

- **Procédure de test :**

Le test a été effectué en adoptant la procédure suivante :

- 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, renverser brusquement les puits 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. Il est recommandé de lire les puits dans les 10 minutes suivant l'ajout de la solution d'arrêt.
- Les densités optiques obtenues étaient converties en concentration ng/ml à l'aide du logiciel GraphPad Prism.

4.4.3.5 Saisie et Analyses des données :

Les données ont été transférées à partir des logiciels de base tel que le Flowjo (cytométrie), Discovery WorkbenchTM version 3.0 (dosage des cytokines), SoftMax Pro (dosage de la testostérone) sur un fichier Excel global. La base de données au niveau de ce fichier Excel a servi de support pour faire des comparaisons entre hommes et femmes pour chaque paramètre biologique. Les figures ont été élaborées à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 9. Ce logiciel a été utilisé pour faire les tests statistiques. La comparaison des données entre les hommes et les femmes a été déterminée à l'aide d'un test non paramétrique dénommé le Mann

Whitney test. Les valeurs de probabilité (p) qui étaient inférieures à 0.05 ont été considérées comme indiquant des différences significatives entre les deux sexes.

4.4.3.6 Contrôle de qualité interne et externe :

Le contrôle de qualité (CQ) est un ensemble de procédures mises en œuvre pour assurer la fiabilité des résultats jour après jour et sur une longue période de temps.(67) Il s'applique à tous les types de méthodes, soit quantitatifs, semi-quantitatifs ou qualitatifs. Selon le type de la méthode et la catégorie de matériaux de contrôle utilisés. Le CQ renseigne sur les indicateurs de performance telle que l'exactitude, la fidélité et la justesse.(67) De part cette définition, le contrôle de qualité pour les laboratoires de recherche clinique et d'analyses biomédicales est un outil qui permet d'assurer la fiabilité des résultats générés. Les données collectées sur cette thèse ont été générés par des instruments qui sont enregistrés dans un système de control de qualité interne mais aussi externe.

- **Contrôle de qualité interne :**

Le laboratoire doit concevoir des systèmes de contrôle de qualité interne dans le but de vérifier que la performance des équipements n'est pas altérée du jour au jour et/ou pour valider la qualification technique de l'opérateur. Il permet de surveiller en continue, tel un film, la qualité des résultats produits en évaluant des indicateurs de performance tel que l'exactitude, la fidélité et la justesse des processus analytiques et en validant la calibration des instruments.(67). Les instruments évalués étaient les cytomètres et le spectrophotomètre

- **Cytométrie en Flux :** Nous avons utilisés des billes marquées qui sont commercialisées sous le nom de BD FACS Calibrite™. L'utilisation de ces billes nous a permis de vérifier des paramètres du cytomètre afin d'optimiser la performance de l'instrument. Pour ce faire, les billes étaient passées sur le cytomètre tous les jours ou avant chaque utilisation de façon à calculer les déviations par rapport à des limites de tolérance déterminées tous les six mois. Cette limite de tolérance, communément appelés « Baseline » est unique pour chaque lot de billes et peut varier selon l'instrument
- **ELISA :** Le spectrophotomètre qu'on a utilisé pour le dosage des hormones était calibrer tous les six mois en utilisant une plaque de validation certifiée de la compagnie Molecular Devices. En plus un control positif et négatif étaient ajoutés à chaque plaque ELISA à tester pour s'assurer de la validité des procédures utilisées et de la qualification de l'opérateur.
- **Contrôle de qualité externe :**
 - **Cytométrie en Flux :** Les cytomètres utilisés sont tous enregistrés au niveau d'un programme international de contrôle de qualité dénommé UKNEQAS (United Kingdom National External Quality Assessment Service). Ceci nous permet d'avoir

un suivi indépendant et régulier de la qualité de nos données qui ont été comparés à d'autres laboratoires à travers le monde.

- **ELISA** : Notre spectrophotomètre est enregistré au niveau du programme CAP (College of American Pathologists) pour déterminer la fiabilité des données générés, spécifiquement pour la sérologie VIH.

4.4.3.7 Considérations Ethiques :

Les données et les échantillons traités lors de cette thèse ont tous été collectés à partir de protocoles cliniques ayant été approuvés par le comité d'éthique de la Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie. Ces protocoles sont tous regroupés sous le nom de protocole « Repository » qui a été soumis au comité d'éthique afin de faciliter l'usage à long terme des échantillons collectés dans le passé au sein de notre programme de recherche.

5. RESULTATS

5.1 Résultats Globaux :

Globalement, nous avons trouvé les résultats suivants :

- Les taux de lymphocytes T CD4+ (c.à.d. les valeurs absolues) étaient plus élevés chez les hommes atteints de TBP comparés aux femmes ;
- Les sous-populations de lymphocytes T CD4+, telles que les cellules naïves, les cellules à mémoire centrale (CM), et les cellules effectrices étaient toutes enrichies dans le sang en matière de valeurs absolues chez le sexe masculin relativement au sexe féminin ;
- Le taux des lymphocytes T CD4+ fortement activées, qui expriment à la fois le CD38 et le HLADR, étaient significativement plus élevés chez les hommes que chez les femmes ;
- Trois cytokines inflammatoires majeures, à savoir l'IFN- γ , le TNF- α , et l'IL-6, avaient des concentrations sanguines modérément plus faibles chez les femmes à l'opposé des hommes ;
- Les fréquences des lymphocytes T CD4+ sécrétrices d'IFN- γ et de TNF- α après stimulation par le PPD étaient plus élevés chez les hommes ;
- La concentration de testostérone sanguine était plus faible chez les hommes affectés par la tuberculose comparés aux participants sains du même sexe ;
- Le niveau de testostérone augmentait chez le sexe masculin dès le premier mois du traitement antituberculeux.

5.2 Résultats Analytiques

5.2.1 Phase Rétrospective :

Tableau 1 : Caractéristiques des participants de l'étude

Caractéristiques	Homme	Femme
Age	32 (21-49)	30 (18-43)
Sérologie VIH	5 (50%)	5 (50%)
Microscopie BAARs	10 (100%)	10 (100%)
3X	9 (90%)	9 (90%)
2X	1 (10%)	1 (10%)
Typage (MTBC)	10 (100%)	10 (100%)
T1	3 (30%)	3 (30%)
LAM10	2 (20%)	2 (20%)
Maf	4 (40%)	4 (40%)
Haarlem 1	1(10%)	1 (10%)
Taux des CD4+ (cell/ μ l)	600 (54-1328)	510 (96-828)
Taux des CD8+ (cell/ μ l)	747 (233-1569)	533 (93-1279)

Ce tableau montre les caractéristiques des participants de l'étude. Dix hommes et dix femmes ont été choisis selon la similarité des paramètres démographiques et cliniques tel que l'âge, la sérologie VIH, le nombre de bacilles acido-alcool-résistants (BAAR) détectées par la microscopie (3X ou 2X), et le sous-type de mycobactéries isolées des crachats patient. Les caractéristiques immunologiques tel que le taux des lymphocytes T CD4+ et CD8+ n'ont pas été contrôlé lors de la sélection des participants de l'étude donc feront l'objet d'une analyse plus poussée dans les figures suivantes. Toutefois, on peut signaler à ce niveau, que les médians des taux des lymphocytes T CD4+ et CD8+ étaient supérieurs chez les hommes comparés aux femmes faisant de la tuberculose n'ayant pas commencés le traitement.

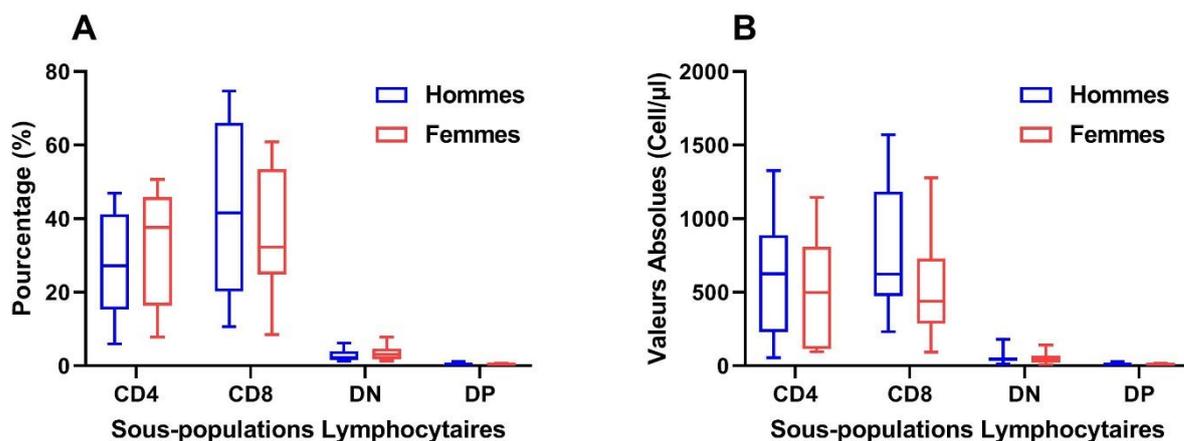


Figure 9. Caractérisation des lymphocytes T selon le sexe chez les patients faisant de la tuberculose

Nous avons comparé les pourcentages (%) et les valeurs absolues de lymphocytes T des CD4+, les CD8+, les DN (Doubles négatives), et les DP (Doubles Positives) chez les hommes et les femmes atteints de la tuberculose pulmonaire active et qui n'ont pas commencé le traitement antituberculeux. Nous avons trouvé que les femmes avaient en moyenne des pourcentages de CD4+ plus élevés que les hommes dans cette cohorte (Figure 9A). Le contraire a été observé en comparant les pourcentages de CD8+ entre les deux sexes (Figure 9A). Contrairement aux pourcentages lymphocytaires, les valeurs absolues des lymphocytes CD4+ et CD8+ étaient plus basses chez les femmes que chez les hommes faisant de la tuberculose (Figure 9B). Nous n'avons pas remarqué de différences majeures entre les pourcentages et les valeurs absolues des DN et DP en comparant les deux sexes. Il est à noter que, malgré cette tendance d'une différence biologique entre le sexe masculin et féminin pour les deux paramètres présentés (CD4+ et CD8+) en Figure 9A et 9B, les tests statistiques effectués pour comparer les données entre les hommes et les femmes n'étaient pas significatives comme indiqué dans le panel en bas.

Paramètre	<i>p</i> (probabilité)
CD4 (%)	0.4813
CD4 (#)	0.6445
CD8 (%)	0.6842
CD8 (#)	0.4043

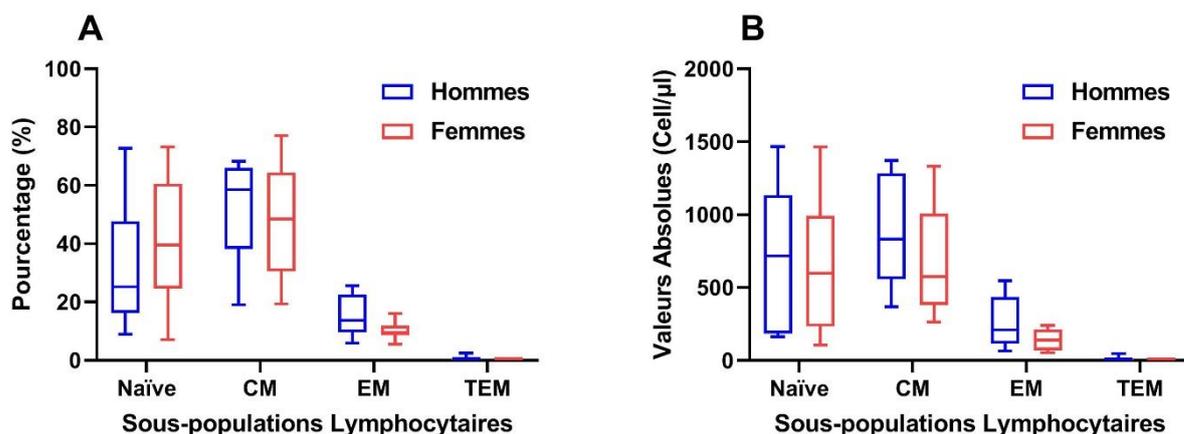


Figure 10. Caractérisation des lymphocytes T CD4+ naïves et mémoires chez les hommes et les femmes au cours de la tuberculose

Au niveau de cette Figure, nous avons comparé les pourcentages (%) et les valeurs absolues de quatre sous-populations de CD4+ à savoir les CD4+ naïves, CD4+ à mémoire centrale (Central memory : CM), les CD4+ à mémoire effectrice (Effector Memory : EM) et les CD4+ à mémoire effectrice terminale (Terminal Effector Memory : TEM) entre les hommes et les femmes de notre cohorte de patients faisant de la tuberculose. Nous avons remarqué que la médiane du pourcentage des cellules naïves était plus élevée chez les femmes que chez les hommes (Figure 10A). Inversement, les hommes avaient plus de CM et EM en termes de pourcentage que le sexe opposé (Figure 10A). En ce qui concerne les valeurs absolues, toutes les sous-populations de CD4+ présentées sur la Figure 10B, à l'exception des TEM, étaient plus enrichies chez le sexe masculin comparé au sexe féminin. Cependant les tests statistiques effectués n'ont pas relevé de différence significative entre les deux sexes comme représenté dans le panel ci-dessous.

Paramètre	<i>p</i> (probabilité)
Naïve (%)	0.3054
Naïve (#)	0.6445
CM (%)	0.6842
CM (#)	0.3245
EM (%)	0.0931
EM (#)	0.1479
TEM (%)	0.9885
TEM (#)	0.6343

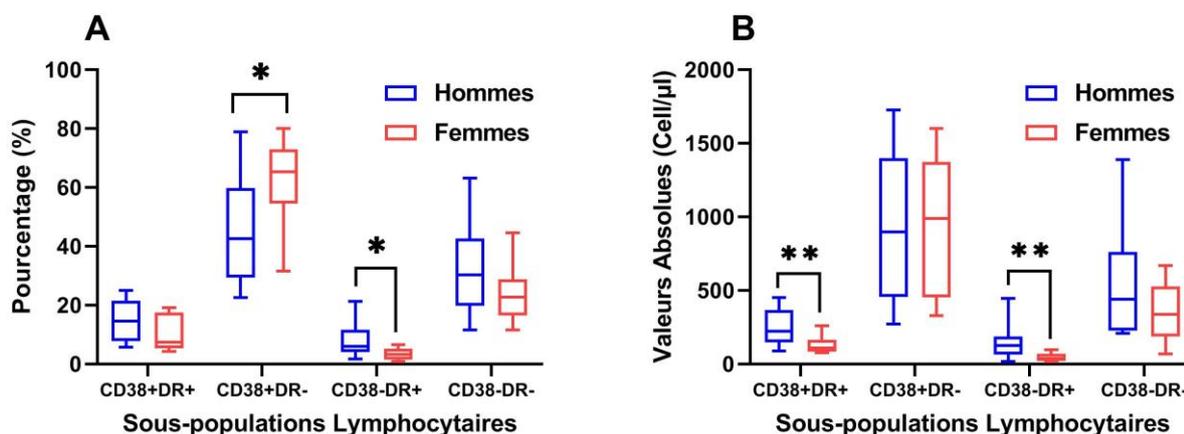


Figure 11. Comparaison du statut d'activation des lymphocytes T CD4+ chez les sujets atteints de tuberculose sur la base du sexe

Pour cette figure, nous avons comparé le niveau d'activation des lymphocytes T CD4+ à l'aide de deux marqueurs de surface (le CD38 et le HLADR). Les cellules CD4+ chez les hommes qui exprimaient à la fois le CD38 et le HLADR, donc qui sont fortement activées, étaient plus nombreuses en termes de pourcentage et de valeurs absolues chez le sexe masculin (Figure 11A et 11B). En effet, une différence statistiquement significative a été trouvée entre les valeurs absolues de CD4+ activées exprimant les deux marqueurs en comparant les deux sexes (Figure 11B). Au contraire, il n'y avait pas de différence liée au sexe en comparant les pourcentages et les valeurs absolues des CD4+ non-activées qui n'expriment ni le CD38, ni le HLADR (CD38-DR-) entre hommes et femmes (Figure 11). Une augmentation significative de la fréquence des CD38+DR- chez les femmes relativement aux hommes a été détectée (Figure 11B). Cependant, cette différence était négligeable pour les valeurs absolues des mêmes sous-types lymphocytaires (Figure 11B). De plus, les lymphocytes T CD4+ activés qui exprimaient le HLADR seulement (CD38-HLADR+) étaient fortement enrichis chez les hommes faisant de la tuberculose comparée aux volontaires malades du sexe opposé à la fois pour les pourcentages que les valeurs absolues (Figure 11A et 11B).

Paramètre	<i>p</i> (probabilité)
CD38+DR+ (%)	0.0753
CD38+DR+ (#)	0.0093
CD38+DR- (%)	0.0174
CD38+DR- (#)	0.9263
CD38-DR+ (%)	0.0232
CD38-DR+ (#)	0.0094
CD38-DR- (%)	0.2556
CD38-DR- (#)	0.2168

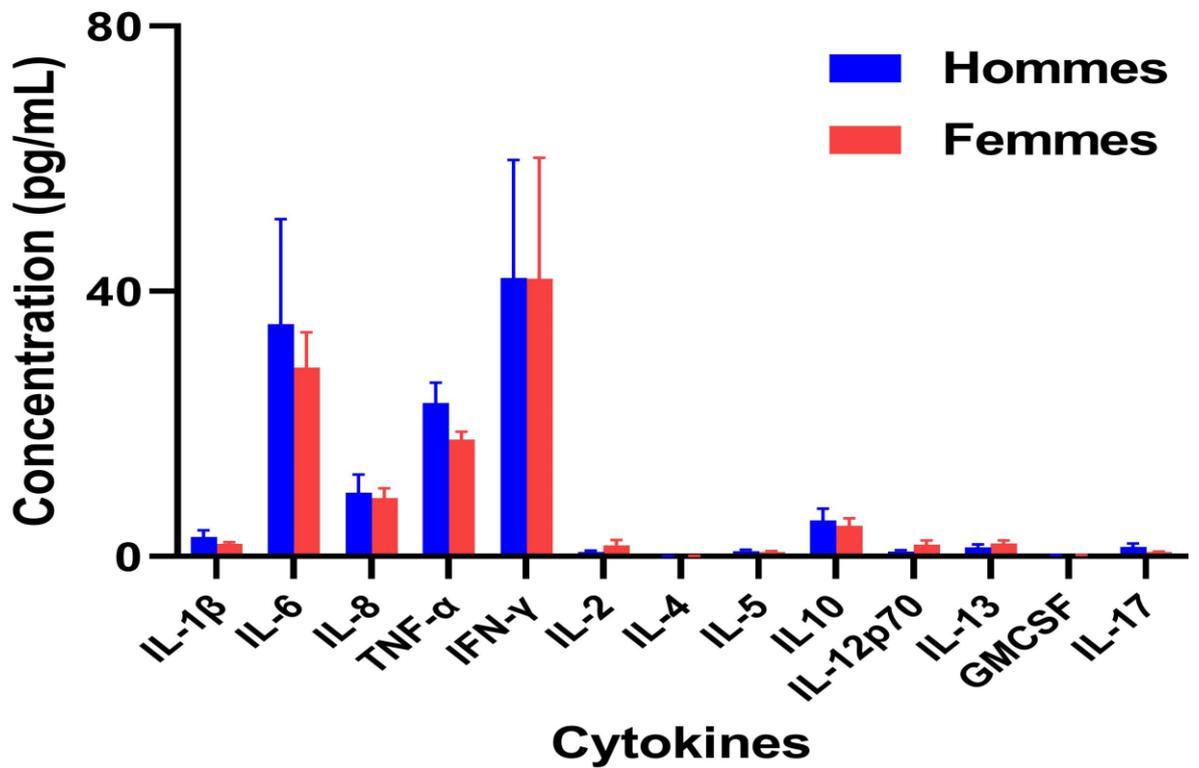


Figure 12. Comparaison des concentrations des cytokines inflammatoires dans le sérum des hommes et des femmes faisant tuberculose

En général, nous n'avons pas observé une différence majeure en matière de concentrations de cytokines circulantes dans le sang entre les deux sexes. Cependant, trois cytokines qui sont connues pour leur rôle dans les processus inflammatoires aigus, tel que le Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α), l'interleukine-6 (IL-6), et l'Interleukin-1 β , semblent avoir des niveaux un peu plus élevés chez le sexe masculin comparé au sexe féminin. Les valeurs P des différents tests statistiques effectués sont indiquées dans le panel en bas.

Paramètre	IL-1 β	IL-6	IL-8	TNF- α	IFN- γ	IL-2	IL-4	IL-5	IL-10	IL-12p70	IL-13	GM-CSF	IL-17
<i>p</i> (probabilité)	0.59	0.57	0.94	0.23	0.64	0.12	0.57	0.74	0.78	0.37	0.37	0.95	0.21

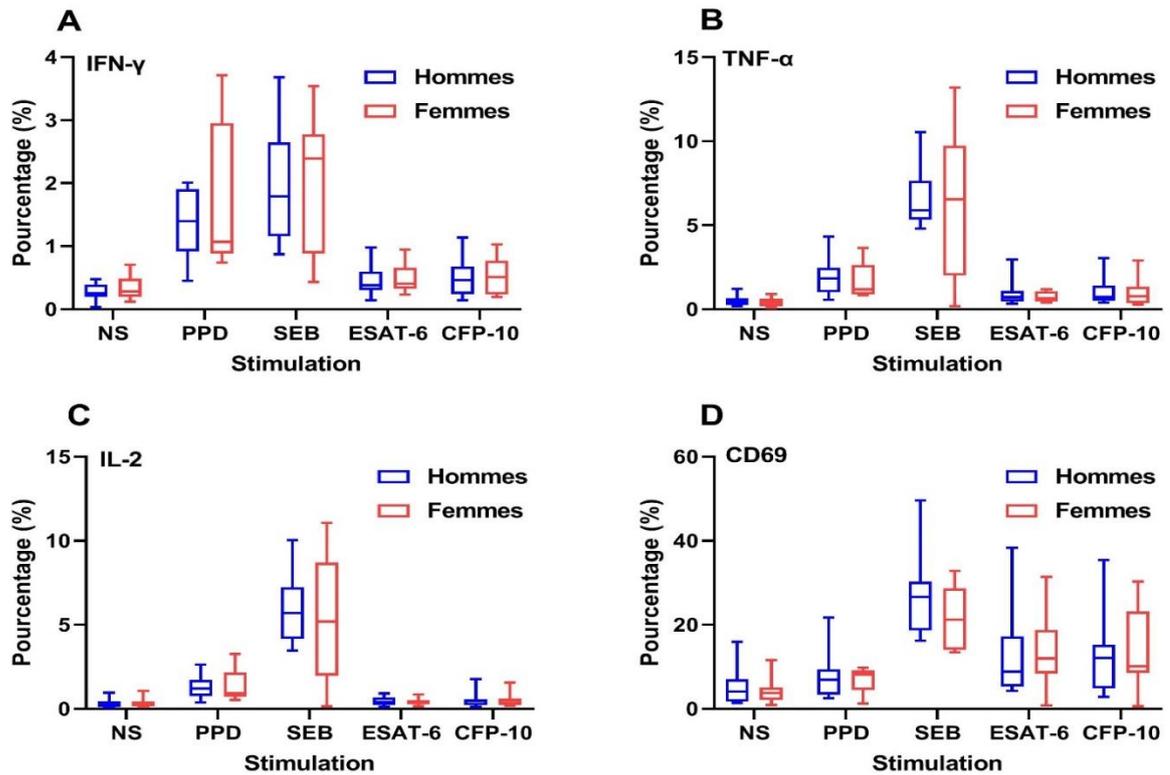


Figure 13. Comparaison de la fréquence des lymphocytes T CD4+ sécrétrices de cytokines après stimulation antigénique selon le sexe du patient faisant tuberculose

Fig 13A: CD4+ IFN- γ + (%)	
Paramètre	<i>p</i> (probabilité)
NS	0.6842
PPD	0.9999
SEB	0.7962
ESAT-6	0.7136
CFP-10	0.9132

Fig 13B: CD4+ TNF- α + (%)	
Paramètre	<i>p</i> (probabilité)
NS	0.6665
PPD	0.7962
SEB	0.7962
ESAT-6	0.9494
CFP-10	0.7304

Fig 13C: CD4+ IL-2+ (%)	
Paramètre	<i>p</i> (probabilité)
NS	0.8138
PPD	0.8633
SEB	0.6048
ESAT-6	0.6665
CFP-10	0.8448

Fig 13D: CD4+ CD69+ (%)	
Paramètre	<i>p</i> (probabilité)
NS	0.8633
PPD	0.7962
SEB	0.2581
ESAT-6	0.4894
CFP-10	0.9999

Cette figure montre le pourcentage de cellules CD4⁺ produisant les cytokines comme l'Interféron- γ (IFN- γ), le Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α), l'Interleukine-2 (IL-2) et ceux qui exprimaient le marqueur d'activation le CD69 après stimulation par les antigènes suivants : 1) le dérivé de protéine purifiée (PPD : purified protein derivative); 2) l'entérotoxine B du Staphylocoque (SEB) ; 3) la cible antigénique sécrétoire précoce-6 (ESAT-6: Early Secretory Antigenic Target-6kDa) ; 4) le filtrat de culture Protéine-10 (CFP-10 : culture filtrate antigen-10 kDa). Les cellules non stimulées (NS) ont été ajoutés comme contrôles négatifs.

Nous remarquons que, lorsque les cellules ne sont pas stimulées (NS) qu'il n'y a pas de différences entre les deux sexes (Figure 5). Cependant, après stimulation avec le mitogène (SEB) qui est considéré comme notre control positif, nous avons observé une variation de fréquences entre les hommes et les femmes. Ces variations étaient en faveur du sexe féminin pour IFN- γ et TNF- α (Figure 13A et 13B). L'opposé a été trouvé pour IL-2 et les CD69 (Figure 13C et 13D). Cependant les analyses statistiques suggèrent que ces variations dépendant du sexe ne sont pas significatives. De même, les cellules T CD4⁺ collectées chez les hommes et qui produisaient soit IFN- γ ou le TNF- α (Figure 13A et 13B) répondaient plus à la stimulation par le PPD relativement à celles prélevées chez les femmes. La sécrétion d'IL-2 ainsi que l'expression du CD69 semblaient ne pas changer en fonction du sexe après stimulation par le PPD (Figure 13C et 13D). Concernant, la stimulation par ESAT-6 et CFP-10, notre analyse n'a pas détectée un changement notable entre les fréquences des lymphocytes T CD4⁺ sécrétant les cytokines inflammatoires (Figure 13A, 13B, 13C). Au contraire, le niveau d'activation de ces cellules après stimulation par ESAT-6 et CFP-10 était variable selon que le patient faisant de la tuberculose soit homme ou femme (Figure 13D). Spécifiquement, les CD4⁺CD69⁺ étaient plus dominant chez le sexe féminin après exposition à l'ESAT-6, tandis que ces mêmes cellules étaient moins enrichies chez les femmes suivant stimulation avec le CFP-10 (Figure 13D). Malgré ces tendances notables entre les deux sexes, les variations calculées n'étaient pas significatives (voir panels en haut).

5.2.2 Phase Prospective :

Tableau 2: Caractéristiques des participants inclus dans la phase prospective de l'étude

Groupe	Nombre d'échantillons	Sexe	Statut VIH	Statut TB
Normal	19	Homme	Négatif	Négatif
TB	17	Homme	Négatif	Positif

Tous les participants inclus dans la phase prospective étaient du sexe masculin dont 19 donneurs sains (Normal) et 17 individus faisant une tuberculose active (TB). Cette approche nous a permis de faire le dosage de la testostérone dans le plasma des différents échantillons archivés. Tous les participants ont été testés négatifs au VIH. Les donneurs sains du groupe "Normal" avaient tous un test IDR négatif.

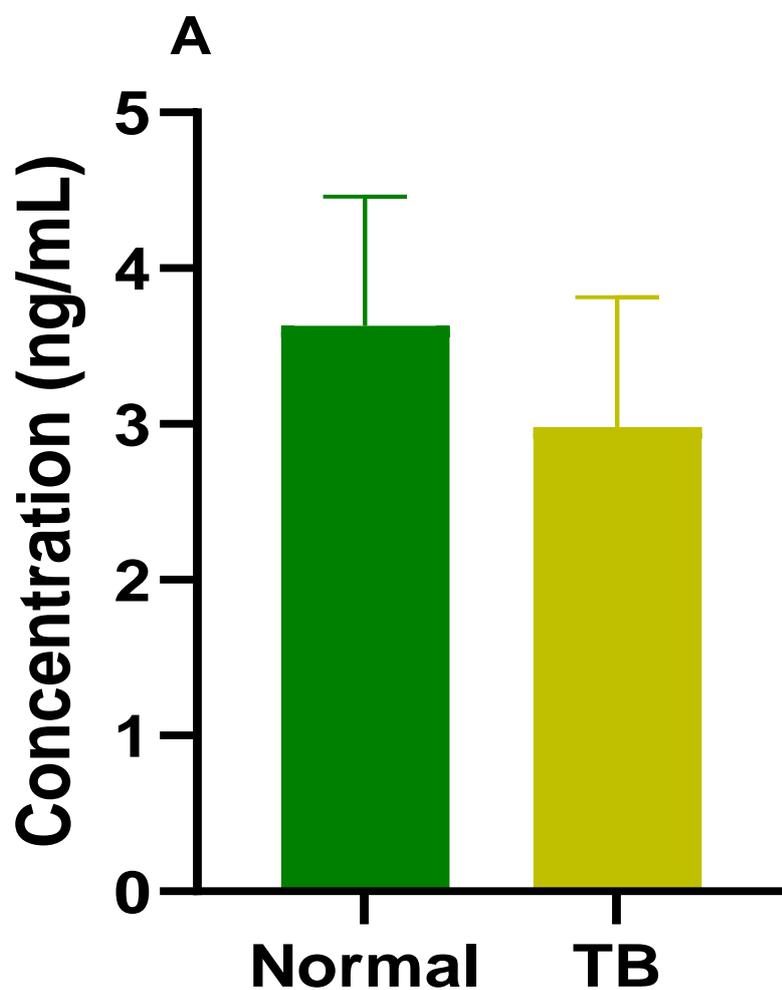


Figure 14. Comparaison de la concentration de testostérone en fonction du statut TB du participant

Cette figure indique qu'en moyenne la concentration de la testostérone est plus basse dans le sang des patients du sexe masculin atteints de la tuberculose pulmonaire comparés aux participants du même sexe ne faisant pas de tuberculose.

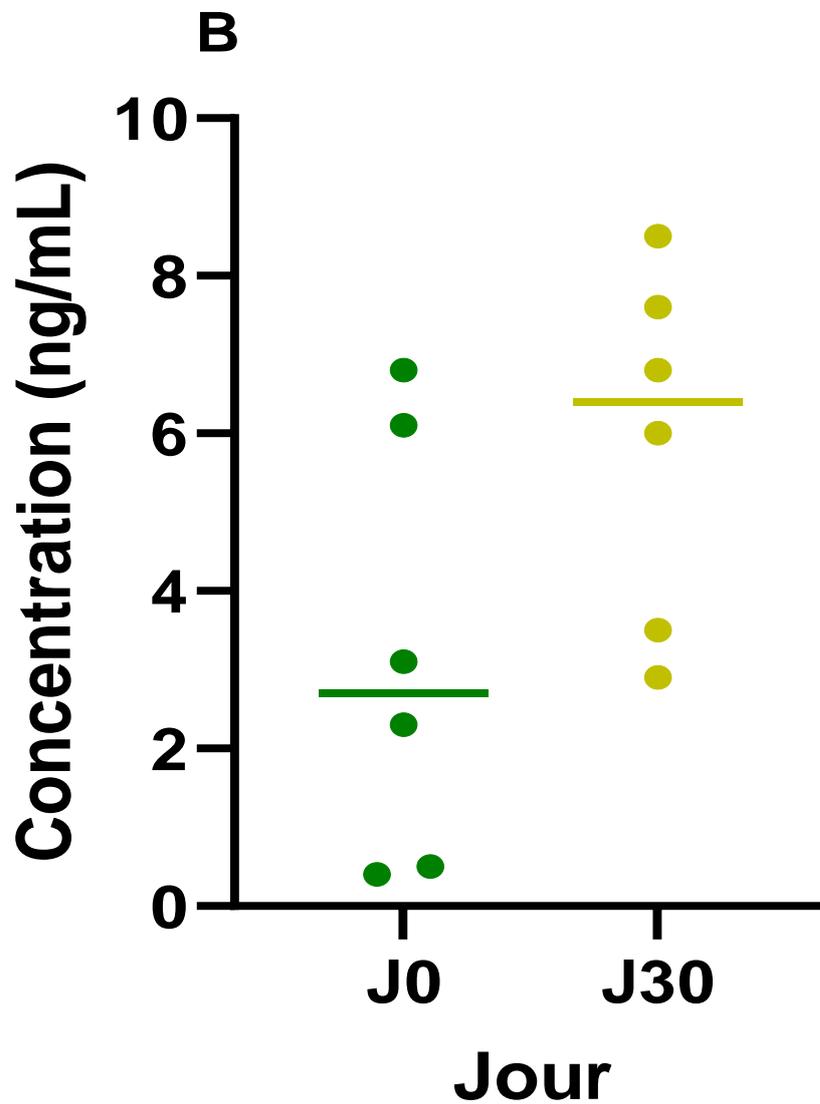


Figure 15. Variation de la concentration de testostérone circulant chez les hommes atteints de tuberculose au cours du traitement

Nous avons observé que la diminution de la testostérone observée avant traitement chez les hommes affectés par la tuberculose (voir Figure 14) est inversée par le traitement au cours du premier mois (J30) comme présenté dans la Figure ci-dessus. En effet, on a noté une augmentation du niveau de testostérone de plus de 2 fois à juste un mois de traitement ce qui dépasse la concentration normale chez les sujets sains (Figure 14A)

6. COMMENTAIRES ET DISCUSSION

Cette thèse nous a permis d'investiguer la présence de différences dans la réponse immunitaire médiée par les lymphocytes T CD4+ entre les hommes et les femmes faisant une tuberculose active pulmonaire et qui sont naïfs de traitement. Notre analyse a révélé que les hommes faisant de la tuberculose avaient plus de lymphocytes CD4+ en termes de valeurs absolues que les femmes. Cet enrichissement des lymphocytes CD4+ chez les hommes était aussi détectable lors de tri cellulaire des sous-populations de CD4+ telles que les cellules mémoires et naïves. De même, nous avons trouvés que le nombre de lymphocytes CD4+ fortement activées, qui exprimaient à la fois le CD38 et HLADR, étaient plus élevés chez le sexe masculin comparé au sexe féminin. L'activation des lymphocytes T CD4+ chez les hommes étaient aussi accompagnée de concentrations plus élevées de cytokines inflammatoires telles que TNF- α , IL-6, et IL1 β dans le sérum de ces volontaires. Aussi, les CD4+ sécrétant IFN- γ et TNF- α après stimulation par l'antigène PPD des mycobactéries, semblaient être plus prédominant chez les hommes relatifs au sexe opposé. Remarquablement, la concentration moyenne de testostérone était plus faible chez les hommes faisant une tuberculose active comparée aux hommes sains. Ce niveau faible de testostérone chez les hommes faisant de la tuberculose augmentait rapidement après la prise de médicaments antituberculeux. Ensemble, nos résultats suggèrent une activité immunitaire plus forte chez les hommes et aussi une intersection entre les fluctuations hormonales et la réponse immunitaire médiée par les lymphocytes T CD4+ pour contrer le MTB.

Nos données montrant, en moyenne, des valeurs absolues plus élevées des lymphocytes T CD4+ chez les hommes comparés aux femmes sont consistantes avec les résultats d'études antérieures. Par exemple, Chen et collaborateurs ont démontré, sur une population de 26,212 hommes et 20,667 femmes, que les hommes avaient un nombre total de leucocytes, incluant les lymphocytes, monocytes, neutrophiles, éosinophiles, et basophiles plus élevé et ceci dans tous les groupes d'âge étudiés.(68) Les facteurs biologiques, notamment hormonaux/ou génétiques, qui pourraient être à la base de cette différence entre hommes et femmes restent à déterminer.

Nos résultats indiquent une forte activation des lymphocytes T CD4+ et une sécrétion plus prononcée des cytokines inflammatoires chez les hommes affectés par la tuberculose. Ceux-ci valident les travaux initiaux qui ont été effectués par d'autres équipes de recherche. En effet, deux groupes indépendants de recherche ont démontré que les souris males avaient une mortalité et une morbidité plus accrues à la tuberculose comparée aux souris femelles.(69) Ce phénotype était associé à une surproduction de cytokines et chemokines pro-inflammatoires, indiquant une inflammation excessive en réponse à

une infection à *Mtb* non-contrôlée chez les hommes.(69) Cette différence de réponse immunitaires ente les deux sexes était indépendante de la race de souris utilisée donc de la génétique, suggérant un rôle majeur des hormones sexuelles dans la susceptibilité des hommes à la tuberculose.

De même, la différence entre les sexes lors des infections mycobactériennes n'est pas seulement observée chez les humains et les animaux de laboratoires mais aussi chez les animaux sauvages. Par exemple, l'infection à *M. bovis* est fréquemment signalée chez les cerfs, où les mâles semblent être plus touchés que les femelles.(70) De plus, le blaireau européen, constitue un réservoir important et une source de tuberculose bovine chez les bovins. En effet, les femelles de ces animaux sauvages sont plus résistantes à *M. bovis* et présentent des durées de survie plus longues après la détection de cette mycobactérie.(70, 71)

En plus de la tuberculose, des résultats similaires de différences immunitaires selon le sexe, ont été récemment trouvés chez les patients affectés par la maladie à coronavirus 2019 (COVID-19), qui comme la tuberculose est une maladie contagieuse qui se caractérise par une forte perturbation de la réponse immunitaire et une grande disparité en matière de sévérité de la maladie entre hommes et femmes(72). Spécifiquement, les hommes malades de COVID-19 ont une concentration plus élevée de cytokines, notamment IL-8 et IL-18, que les femmes(72). Contrairement à nos données, les cellules T CD4+ semblent être plus fortement activées chez les femmes que chez les hommes, suggérant le rôle que joue le sexe biologique dans la réponse immunitaire contre les maladies infectieuses en générale.

En ce qui concerne, la réduction du niveau de testostérone dans le sang au cours de la tuberculose, nos données sont alignées avec celles de Metwally et collègues qui ont trouvés une forte corrélation négative entre le taux de testostérone et la charge mycobacterienne sur les lames des crachats obtenues chez les hommes affectés par la tuberculose naïfs de traitement.(73) Il est bon de noter que les fluctuations des concentrations hormonales au cours du traitement antituberculeux ne sont pas bien connues. Cependant, l'augmentation du niveau de testostérone lors du traitement a été observée chez les souris infectées par le MTB. Plus précisément, Bini et collaborateurs ont montrés une augmentation croissante de la testostérone qui atteignait sa concentration maximale à 21 jour de l'infection et restait élevé jusqu'à 2 mois après infection. Le processus biologique entraînant une diminution du taux de testostérone dans le sang des malades faisant une TB n'est pas très bien connu. D'une part, il se pourrait que le niveau de testostérone augmente en réponse au processus inflammatoire déclenché par la

multiplication mycobactérienne afin de limiter l'apparition des lésions associées à une inflammation incontrôlée au niveau des tissus pulmonaires. La testostérone étant bien connue pour ses propriétés anti-inflammatoires pourrait jouer un rôle bénéfique pour le patient faisant de la tuberculose en faisant diminuer la concentration de cytokines tel que IFN- γ . D'autre part, l'augmentation du niveau de cytokines inflammatoires dans le sang au cours de la maladie pourrait indirectement inhiber la production de testostérone à travers l'induction de la synthèse de glucocorticoïdes. En effet, Bini et collègues ont trouvés que le traitement des cellules de Leyding par les cytokines inflammatoires entraîne une réduction significative de la production de testostérone.(67) Ces résultats sont aussi alignés avec une étude récente qui suggère que la prise de faible dose de dexaméthasone à long terme est associée au développement de l'hypogonadisme chez les hommes adultes.(74)

Ensemble, nos résultats suggèrent une relation intime entre le système immunitaire et les hormones sexuelles dans la pathogenèse de la tuberculose. Ceci pourrait expliquer la forte prédominance de la tuberculose pulmonaire chez le sexe masculin mais aussi la relative résistance du sexe opposé à cette maladie.

7. Limites de l'étude :

Nous ne saurions terminer cette discussion sans parler des limites potentielles de cette étude. A notre connaissance, nous avons été limités dans notre analyse par la taille de l'échantillonnage qui était constitué de 20 personnes au total dont 10 hommes et 10 femmes. De ce fait nous ne pouvons pas exclure la possibilité de trouver des différences statistiquement significatives pour les paramètres biologiques évalués au cours de notre analyse avec un échantillonnage plus large. En plus, cette analyse s'est basée sur les différences immunitaires entre les deux sexes avant traitement. Donc, les changements qui pourraient avoir lieu au cours du traitement et à la fin du traitement n'ont pas été pris en compte dans cette étude cross-sectionnelle. Aussi, comme toutes études rétrospectives, certaines données sur le comportement des volontaires (consommation de cigarette, d'alcool et l'utilisation de contraceptif chez les femmes) n'était pas disponible dans la base de données utilisée. Pour cette raison, ces paramètres qui sont probablement des facteurs confondants n'ont pas peut-être contrôlé lors des analyses statistiques. Enfin, on n'a pas eu les fonds nécessaires pour doser l'estrogène chez les femmes, ce qui aurait pu nous donner une meilleure compréhension de l'interaction entre la réponse immunitaire et hormonale au cours de la tuberculose chez les deux sexes.

8. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS :

8.1 Conclusion :

Cette étude nous a permis de mettre en évidence des différences biologiques réelles entre hommes et femmes atteints de la tuberculose pulmonaire active. Notamment, nous avons démontré que les hommes affectés par la tuberculose et qui étaient naïfs de traitement avaient des lymphocytes T CD4+ fortement activés comparés à ceux du sexe opposé. De plus, nous avons trouvé que la concentration de testostérone dans le sang chez les hommes atteints de tuberculose était plus faible comparés aux volontaires sains du même sexe, suggérant un rôle potentiel de la testostérone dans la pathogenèse de la maladie.

8.2 Recommandations :

Aux termes de notre étude et de nos résultats, nous formulons les recommandations suivantes :

- Initier une étude prospective avec une taille d'échantillonnage plus large en collectant les données sociodémographiques et comportementales chez tous les participants ;
- Initier une étude longitudinale en suivant les hommes et les femmes malades tout au long du traitement (6 mois) pour mieux appréhender les variations immunologiques entre les deux sexes à long terme chez les patients atteints de la tuberculose ;
- Examiner le rôle des hormones féminines (estradiol et progestérone) dans la pathogenèse de la tuberculose ;
- Etendre l'analyse sur d'autres sous-types cellulaires tels que les lymphocytes T CD8+ et les macrophages ;
- Investiguer l'impact de la coïnfection VIH/TB sur les différences biologiques liées aux sexes.

9. REFERENCES

1. Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Rapport Global de la Tuberculose. 2020.
2. Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Tuberculosis-principaux faits. 2020.
3. Danioko D. Evaluation Préliminaire de la PCR Multiplexe dans la detection de *Mycobacterium tuberculosis* chez les patients tuberculeux en echec de traitement ou rechute à Bamako 2020.
4. Bozzano F, Marras F, De Maria A. Immunology of tuberculosis. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2014;6(1):e2014027.
5. Klein SL, Flanagan KL. Sex differences in immune responses. *Nature reviews Immunology*. 2016;16(10):626-38.
6. M.RaberahonaR.-A.Rakotoarivelo M.Ratsarazaka et al. Lymphopénie CD4 dans les différentes formes de tuberculose chez les patients non infectés par le VIH. 2014;44(6):57.
7. Orcau À, Caylà JA, Martínez JA. Present epidemiology of tuberculosis. Prevention and control programs. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;1:2-7.
8. Forrellad MA, Klepp LI, Gioffré A, Sabio y García J, Morbidoni HR, de la Paz Santangelo M, et al. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence*. 2013;4(1):3-66.
9. Gagneux S. Ecology and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Rev Microbiol*. 2018;16(4):202-13.
10. Lewis KN, Liao R, Guinn KM, Hickey MJ, Smith S, Behr MA, et al. Deletion of RD1 from *Mycobacterium tuberculosis* mimics bacille Calmette-Guerin attenuation. *J Infect Dis*. 2003;187(1):117-23.
11. Ernst JD. The immunological life cycle of tuberculosis. *Nature Reviews Immunology*. 2012;12(8):581-91.
12. Francis Varaine MLR. Guide pratique à l'usage des médecins, infirmiers, techniciens de laboratoire et auxiliaires de santé 2017.
13. Crofton J. Tuberculosis case finfing and chemotherapy, questions and answers: K.Toman, Geneva World HEalth Organisation 1978.
14. Kelly W. Stinson KE, Makoto Matsumoto et al. Gli Mycobacteriology laboratory manual 2014. Available from: r : <https://manualzz.com/doc/6775915/mycobacteriology-laboratory-manual>.
15. Zhou Z, Zheng Y, Wang L. Diagnostic accuracy of the Xpert MTB/RIF assay for bone and joint tuberculosis using tissue specimens. *Int J Infect Dis*. 2021;105:224-9.
16. Van Dyck P, Vanhoenacker FM, Van den Brande P, De Schepper AM. Imaging of pulmonary tuberculosis. *European Radiology*. 2003;13(8):1771-85.

17. Bhalla AS, Goyal A, Guleria R, Gupta AK. Chest tuberculosis: Radiological review and imaging recommendations. *Indian J Radiol Imaging*. 2015;25(3):213-25.
18. Ioela TMS. Contribution des Imagers de la Radiographie Standard de la tuberculose Pulmonaire à Microscopie positive sous l'influence de l'infection à VIH. Abidjan: Médecine Université de Cocody 2003.
19. Moorlag S, Arts RJW, van Crevel R, Netea MG. Non-specific effects of BCG vaccine on viral infections. *Clin Microbiol Infect*. 2019;25(12):1473-8.
20. Butkeviciute E, Jones CE, Smith SG. Heterologous effects of infant BCG vaccination: potential mechanisms of immunity. *Future Microbiol*. 2018;13(10):1193-208.
21. TR F. Tuberculose de Toman: traitement de détection des cas et suivi. 2004.
22. Controlled trial of intermittent regimens of rifampin plus isoniazid for pulmonary tuberculosis in Singapore. The results up to 30 months. *Am Rev Respir Dis*. 1977;116(5):807-20.
23. Fox W, Mitchison DA. Short-course chemotherapy for pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis*. 1975;111(6):845-8.
24. Carr RE, Henkind P. Ocular manifestations of ethambutol, Toxic amblyopia after administration of an experimental antituberculous drug. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill : 1960)*. 1962;67:566-71.
25. Crofton SJ, Chaulet P, Maher D, Grosset J, Harris W, Horne N, et al. Guidelines for the management of drug-resistant tuberculosis / by Sir John Crofton, Pierre Chaulet and Dermot Maher; with contributions from Jacques Grosset ... [et al]. Geneva: World Health Organization; 1997.
26. Grosset J. XVII congrès national de la tuberculose et des maladies respiratoires. Paris Masson. 1974.
27. Truffot-Pernot C, Ji B, Grosset J. Activities of pefloxacin and ofloxacin against mycobacteria: in vitro and mouse experiments. *Tubercle*. 1991;72(1):57-64.
28. 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.
29. 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. *Int J Epidemiol*. 2005;34(3):540-7.
30. 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 Technol Assess*. 2017;21(39):1-54.

31. Information Kids Health. BCG Vaccine for TB. 2018.
32. Programme National de Lutte contre la Tuberculose (PNLT). Rapport Annuel de 2019.
33. Programme National de Lutte contre la Tuberculose (PNLT). Rapport Annuel de 2018.
34. Alam U. Immunity: The Immune Response to Infectious and Inflammatory Disease: Yale J Biol Med. 2007 Sep;80(3):137. Epub 2008 Feb.
35. Kirman JR, Henao-Tamayo MI, Agger EM. The Memory Immune Response to Tuberculosis. Microbiol Spectr. 2016;4(6).
36. Justiz Vaillant AA, Sabir S, Jan A. Physiology, Immune Response. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.; 2021.
37. Williamson LE, Flyak AI, Kose N, Bombardi R, Branchizio A, Reddy S, et al. Early Human B Cell Response to Ebola Virus in Four U.S. Survivors of Infection. Journal of virology. 2019;93(8).
38. Weiss MG, Somma D, Karim F, Abouihia A, Auer C, Kemp J, et al. Cultural epidemiology of TB with reference to gender in Bangladesh, India and Malawi. Int J Tuberc Lung Dis. 2008;12(7):837-47.
39. Sia JK, Rengarajan J. Immunology of *Mycobacterium tuberculosis* Infections. Microbiol Spectr. 2019;7(4).
40. Caruso AM, Serbina N, Klein E, Triebold K, Bloom BR, Flynn JL. Mice deficient in CD4 T cells have only transiently diminished levels of IFN-gamma, yet succumb to tuberculosis. J Immunol. 1999;162(9):5407-16.
41. Mogues T, Goodrich ME, Ryan L, LaCourse R, North RJ. The relative importance of T cell subsets in immunity and immunopathology of airborne *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. J Exp Med. 2001;193(3):271-80.
42. Cooper AM, Dalton DK, Stewart TA, Griffin JP, Russell DG, Orme IM. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. J Exp Med. 1993;178(6):2243-7.
43. Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, Dalton DK, Stewart TA, Bloom BR. An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. J Exp Med. 1993;178(6):2249-54.
44. Cooper AM, Magram J, Ferrante J, Orme IM. Interleukin 12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with *mycobacterium tuberculosis*. J Exp Med. 1997;186(1):39-45.
45. Cantini F, Nannini C, Niccoli L, Petrone L, Ippolito G, Goletti D. Risk of Tuberculosis Reactivation in Patients with Rheumatoid Arthritis, Ankylosing Spondylitis, and Psoriatic Arthritis Receiving Non-Anti-TNF-Targeted Biologics. Mediators Inflamm. 2017;2017:8909834.

46. Feng CG, Jankovic D, Kullberg M, Cheever A, Scanga CA, Hieny S, et al. Maintenance of pulmonary Th1 effector function in chronic tuberculosis requires persistent IL-12 production. *J Immunol.* 2005;174(7):4185-92.
47. Jouanguy E, Altare F, Lamhamedi S, Revy P, Emile JF, Newport M, et al. Interferon-gamma-receptor deficiency in an infant with fatal bacille Calmette-Guérin infection. *N Engl J Med.* 1996;335(26):1956-61.
48. Newport MJ, Huxley CM, Huston S, Hawrylowicz CM, Oostra BA, Williamson R, et al. A mutation in the interferon-gamma-receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. *N Engl J Med.* 1996;335(26):1941-9.
49. Ottenhoff TH, Kumararatne D, Casanova JL. Novel human immunodeficiencies reveal the essential role of type-I cytokines in immunity to intracellular bacteria. *Immunol Today.* 1998;19(11):491-4.
50. Domingo-Gonzalez R, Das S, Griffiths KL, Ahmed M, Bambouskova M, Gopal R, et al. Interleukin-17 limits hypoxia-inducible factor 1 α and development of hypoxic granulomas during tuberculosis. *JCI Insight.* 2017;2(19).
51. 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. *J Immunol.* 2011;187(10):5402-7.
52. Long NH, Johansson E, Lönnroth K, Eriksson B, Winkvist A, Diwan VK. Longer delays in tuberculosis diagnosis among women in Vietnam. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1999;3(5):388-93.
53. Jacobson DL, Gange SJ, Rose NR, Graham NM. Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. *Clin Immunol Immunopathol.* 1997;84(3):223-43.
54. Holmes CB, Hausler H, Nunn P. A review of sex differences in the epidemiology of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1998;2(2):96-104.
55. Straub RH. The complex role of estrogens in inflammation. *Endocr Rev.* 2007;28(5):521-74.
56. Fox HS, Bond BL, Parslow TG. Estrogen regulates the IFN-gamma promoter. *The Journal of Immunology.* 1991;146(12):4362.
57. Balthazart J, Foidart A, Absil P, Harada N. Effects of testosterone and its metabolites on aromatase-immunoreactive cells in the quail brain: relationship with the activation of male reproductive behavior. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1996;56(1-6 Spec No):185-200.

58. 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. *Mol Immunol*. 2007;44(7):1808-14.
59. Gold SM, Voskuhl RR. Estrogen and testosterone therapies in multiple sclerosis. *Prog Brain Res*. 2009;175:239-51.
60. Ysraelit MC, Correale J. Impact of sex hormones on immune function and multiple sclerosis development. *Immunology*. 2019;156(1):9-22.
61. Smith GS, Van Den Eeden SK, Baxter R, Shan J, Van Rie A, Herring AH, et al. Cigarette smoking and pulmonary tuberculosis in northern California. *Journal of epidemiology and community health*. 2015;69(6):568-73.
62. Bactériologie-Virologie-Hygiène CdEd. Demarche du diagnostic Microbiologique d'une tuberculose. Université médicale virtuelle Francophone. 2013.
63. Siddiqi K, Lambert ML, Walley J. Clinical diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis in low-income countries: the current evidence. *Lancet Infect Dis*. 2003;3(5):288-96.
64. Lav-blot B-rN. Confirmation Kit for anti-hiv-2 antibodies detection in serum/plasma. Available from: https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/en/883573_EN.pdf.
65. Assay GHC. Test Qualitatif pour la Confirmation et la Différenciation d'Anticorps distincts contre le vih-1 et vih-2 dans les échantillons de sang total, de sérum ou de Plasma. 2013:
66. IBL-América. Testosterone ELISA Enzyme Immunoassay for the quantitative measurement of Testosterone in serum and plasma. 2020.
67. 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.
68. Chen Y, Zhang Y, Zhao G, Chen C, Yang P, Ye S, et al. Difference in Leukocyte Composition between Women before and after Menopausal Age, and Distinct Sexual Dimorphism. *PLOS ONE*. 2016;11(9):e0162953.
69. Dibbern J, Eggers L, Schneider BE. Sex differences in the C57BL/6 model of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Sci Rep*. 2017;7(1):017-11438.
70. Shury TK, Bergeson D. Lesion Distribution and Epidemiology of *Mycobacterium bovis* in Elk and White-Tailed Deer in South-Western Manitoba, Canada. *Veterinary Medicine International*. 2011;2011:591980.

71. López-Olvera JR, Fernández-de-Mera IG, Serrano E, Vidal D, Vicente J, Fierro Y, et al. Sex-related differences in body condition and serum biochemical parameters in red deer (*Cervus elaphus*) naturally infected with *Mycobacterium bovis*. *Vet J*. 2013;198(3):702-6.
72. Scully EP, Haverfield J, Ursin RL, Tannenbaum C, Klein SL. Considering how biological sex impacts immune responses and COVID-19 outcomes. *Nature Reviews Immunology*. 2020;20(7):442-7.
73. Metwally A, Magdy D, Ahmed R. Erectile dysfunction in pulmonary tuberculosis: Is there an association? *European Respiratory Journal*. 2019;54(suppl 63):PA2967.
74. Mohammed AG, Mansour AA, Ahmed JH. Effect of exogenous glucocorticoids on male hypogonadism. *Biomed Rep*. 2020;13(3):12.

FICHE SIGNALÉTIQUE

Nom : KOLOMA

Prénom : Isaac

Nationalité : Malienne

Courriel : isaacdenisk@gmail.com

Année universitaire : 2020-2021

Ville de soutenance : Bamako

Secteur d'intérêt : Biologie et Santé

Publique

Section : Pharmacie

Contact Tel : (+223) 74 00 07 31

Lieu de dépôt : Bibliothèque de la Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie et de la Faculté de Pharmacie, Bamako, Mali.

Titre de la thèse : Rôle du Sexe Biologique dans la Réponse Immunitaire contre le Complexe *Mycobacterium tuberculosis*

RESUME

La tuberculose est une maladie contagieuse qui touche plus d'hommes que de femmes dans le monde. Les bases biologiques de cet excès de mortalité et de morbidité due à la tuberculose chez le sexe masculin restent méconnues. Nous avons initié cette étude au niveau du Centre Universitaire de Recherche Clinique (UCRC) de l'Université des Sciences, des Techniques, et des Technologies de Bamako (USTTB) pour déterminer la présence de différences réelles dans la réponse immunitaire dirigée contre le Complexe *Mycobacterium tuberculosis* entre les hommes et les femmes faisant une tuberculose pulmonaire active. Nous avons combiné une analyse rétrospective focalisée sur la base de données des volontaires faisant de la tuberculose qui étaient recrutés dans divers protocoles de recherche du programme UCRC à une analyse prospective basée sur le dosage des concentrations de testostérone présente dans les échantillons de plasma archivés dans le but d'évaluer les variations ou fluctuations hormonales au cours de la tuberculose chez les hommes. Nous avons trouvé que les hommes avaient des lymphocytes T CD4+ fortement activés comparés au sexe opposé. Cette élévation des marqueurs d'activation sur les T CD4+ était accompagnée d'une augmentation des concentrations de cytokines inflammatoires circulantes telles que, le TNF- α , l'IL-6, et l'IL-1 β . Nous avons trouvé que la concentration de testostérone diminuait dans le sang des hommes atteints de tuberculose comparés aux volontaires sains. La prise des antituberculeux était associée à une augmentation du niveau de testostérone total dans le sang. Nos données suggèrent la présence de différences biologiques significatives entre les deux sexes au cours de la tuberculose. Ces différences basées sur le sexe du patient pourraient s'expliquer en partie par l'impact des hormones sexuelles, notamment la testostérone, sur la réponse immunitaire pour contrôler l'infection par le *Mycobacterium tuberculosis*

Mots clés : Sexe, Réponse Immunitaire, Tuberculose, Hormones Sexuelles, Bamako (Mali).

Academic year: 2020-2021

IDENTIFICATION SHEET

Last Name: KOLOMA

First name: Isaac

Nationality: Malian

E-mail: isaacdenisk@gmail.com

Defense city: Bamako

Primary interest: Biology and Public Health

Section: Pharmacy

Contact Tel: (+223) 74 00 07 31

Deposit Place: Library of the Faculty of Medicine and Odonto-Stomatology and of the Faculty of Pharmacy, Bamako, Mali.

Thesis Title: Role of Biological Sex in Immune Responses against *Mycobacterium tuberculosis Complex*

SUMMARY

Tuberculosis is a contagious infectious disease that affects more men than women worldwide. However, the biological basis of this excess in mortality and morbidity due to tuberculosis in males is not known. Therefore, we initiated this study at the University Center for Clinical Research (UCRC) of the University of Sciences, Techniques, and Technologies of Bamako (USTTB) to determine the presence of real differences in immune responses against *Mycobacterium tuberculosis* complex between men and women with active pulmonary tuberculosis. To do this, we combined a retrospective analysis focused on the database of volunteers recruited in various research protocols of the UCRC program with a prospective analysis which was based on quantification of testosterone in archived plasma samples in order to assess hormonal fluctuations in tuberculosis in men. We found that the men had higher activated CD4 + T cells compared to the opposite sex. This rise in CD4 + T activation markers was accompanied by an increase in the concentrations of circulating inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-6, and IL-1 β . Remarkably, we found that the concentration of testosterone decreased in the blood of men with tuberculosis compared to healthy volunteers. Anti-tuberculosis treatment was also associated with an increase in the level of total testosterone in the blood. Our data suggest the presence of significant biological differences between the two sexes during active pulmonary tuberculosis. The sex-specific differences in CD4+ T cells responses could be explained in part by the impact of sex hormones, in particular testosterone, on the immune responses controlling *Mycobacterium tuberculosis* infection.

Keywords: Sex, Immune Response, Tuberculosis, Sex Hormones, Bamako, Mali

10. 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 !!!

