



La signature immunologique

Nouvel outil diagnostique de la tuberculose active ?

Virginie Rozot, Matthieu Perreau, Alexandre Harari, Giuseppe Pantaleo

Service d'immunologie et d'allergie,
Centre hospitalier universitaire vaudois,
Université de Lausanne, Suisse.

alexandre.harari@chuv.ch
giuseppe.pantaleo@chuv.ch

> Plus d'un siècle après l'identification par Robert Koch de la bactérie *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) comme agent responsable de la tuberculose (TB), la maladie n'a jamais été aussi prévalente. Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), 2 à 3 millions de personnes en meurent chaque année [1]. Un tiers de la population mondiale serait porteur de façon asymptomatique de la forme latente de la bactérie. L'infection à *Mtb* se manifeste cliniquement de deux manières différentes : l'infection tuberculeuse latente (ITL) [2], au cours de laquelle le pathogène est présent sous forme dormante et n'est pas détectable par les moyens actuels, et la maladie active, au cours de laquelle le pathogène peut être mis en évidence dans les sécrétions biologiques et dont les symptômes sont caractéristiques. La maladie active se développe soit directement après exposition à la bactérie, soit après réactivation d'une ITL. Les symptômes d'une primo-infection à *Mtb* ne sont généralement pas visibles mais peuvent parfois se manifester par une fièvre modérée et une altération de l'état général associées ou non à une atteinte pleurale, une toux, une pharyngite ou un érythème noueux¹. Dans sa forme respiratoire – la plus fréquente – la TB se manifeste par une altération de l'état général associée à des sueurs nocturnes, une fatigue généralisée, mais aussi des signes respiratoires persistants : une

toux non ou peu productive, des expectorations hémoptoïques et des douleurs thoraciques de type pleurétiques. Une radiographie pulmonaire met en évidence, dans la plupart des cas observés, des nodules excavés prédominant au niveau des sommets pulmonaires ainsi que des cavernes et des infiltrats diffus de type miliaire, des adénopathies médiastinales et parfois des atteintes pleurales [3].

Selon l'OMS, qui vise à l'éradication de ce fléau d'ici 2050 (*STOP TB strategy*²), le diagnostic rapide et efficace de la TB active est insuffisant malgré la vaste panoplie de techniques utilisées en clinique courante. En effet, les méthodes actuellement en place ne permettent pas de diagnostiquer rapidement les infections (*Tableau 1*).

Diagnostic de l'infection par *Mtb* : méthodes de dépistage

Le test de dépistage Mantoux

Encore appelé test de sensibilité à la tuberculine ou TST, il s'agit d'un test intradermique : une dose standard de tuberculine – précipité de molécules obtenues par filtration de cultures de *Mtb* – est injectée sous la peau (papule intradermique) ; une lecture du résultat (diamètre de l'induration provoquée par une réponse immunitaire locale) est effectuée 48 à 72 h plus tard. L'inconvénient majeur de ce test est qu'un résultat positif n'est pas toujours un signe d'infection par *Mtb* [4]. Il peut

être la conséquence d'une infection par des mycobactéries non tuberculeuses ou d'une vaccination antérieure avec le bacille de Calmette et Guérin (BCG) [4]. D'autre part, il ne permet pas d'établir un diagnostic définitif de TB active.

Les tests détectant la sécrétion d'interféron

Ils permettent la détection d'IFN- γ produit par les lymphocytes T spécifiques de *Mtb* en réaction à une stimulation avec des antigènes dérivés de *Mtb*. Ces tests, nommés IGRA (*IFN- γ release assays*) sont soit des ELISA³ (tels que le Quantiféron), soit des ELISpots³ (tels que le TB-Spot). Ils représentent une évolution importante dans le domaine du diagnostic de la TB. En particulier, ils sont extrêmement spécifiques de l'infection et ne donnent pas de réactions croisées avec la vaccination par BCG [5]. Néanmoins, les IGRA ne permettent pas de distinguer une ITL d'une maladie active car la fréquence des lymphocytes T spécifiques de *Mtb* sécrétant de l'IFN- γ est comparable dans ces deux manifestations cliniques [2].

Diagnostic de la TB active

Lorsque les symptômes cliniques associés à des résultats positifs de dépistage suggèrent une TB active, la mise en évidence de la mycobactérie est nécessaire. Plusieurs tests microbiologiques ou cliniques sont disponibles (*Tableau 1*) :

¹ L'érythème noueux est une hypodermite nodulaire, caractérisée par l'apparition brutale de noues douloureuses (élévures fermes à la palpation) principalement localisées sur les jambes (source : Université virtuelle Paris 5).

² <http://www.who.int/tb/strategy/en/>

³ ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay. ELISpot : enzyme-linked immunoSpot ; l'ELISpot mesure les réponses cellulaires spécifiques d'un antigène en quantifiant le nombre de cellules T produisant de l'IFN- γ .



	Procédure	Sensibilité	Spécificité	Remarques / limites
Tests de dépistage	Examen clinique	faible	faible	Non suffisant
	Test de sensibilité à la tuberculine (TST) ou Mantoux	73 %	60 %	Réactions croisées avec les réponses vaccinales (BCG)
	Tests interféron (ELISpot ou ELISA)	80 %	96 %	Pas de distinction entre infection latente et tuberculose active
Tests microbiologiques (diagnostic de TB active)	Culture	80 %-85 %	100 %	Test de référence mais nécessitant au minimum 11 jours de culture
	Examen direct des expectorations	35 %-50 %	95 %	3 jours consécutifs pour un diagnostic optimal
	Radiographie pulmonaire	Moyenne	Faible	Non suffisant, symptomatologie atypique chez les patients infectés par le VIH
	PCR	48 %-53 %	95 %-98 %	Faible sensibilité chez les personnes ayant des résultats négatifs à l'examen microscopique direct
Tests non validés pour l'utilisation en clinique	Xpert MTB/RIF [11]	95 % - 80 %	95 %	Applicable uniquement chez l'adulte et en cas de tuberculose pulmonaire, permet l'identification de souches résistantes à la rifampicine
	Signature transcriptionnelle des cellules du sang [12]	94 %	96 %	Analyse techniquement complexe
Nouveau test clinique	Profil fonctionnel des cellules réactives par cytométrie en flux [10]	67 %	92 %	Permet la distinction entre tuberculose active et infection latente en 24h

Tableau I. Méthodes de dépistage de la tuberculose.

- La culture microbiologique, considérée comme la méthode de référence, donne un résultat fiable lisible entre 10 jours et plusieurs semaines après ensemencement de milieux spécifiques par des échantillons de matériels biologiques [6].
- L'observation microscopique de frottis de crachats est la méthode la moins coûteuse. Cependant l'OMS estime qu'elle n'identifie que 35 % des TB actives [7].
- La PCR, méthode fiable, n'est néanmoins que très peu spécifique dans les cas de TB extrapulmonaires ou négatives à la coloration de frottis [8].
- La radiologie pulmonaire est relativement sensible mais ne permet pas systématiquement la visualisation de structures spécifiques, notamment chez les sujets infectés par le VIH (virus de l'immunodéficience humaine), où les formes excavées sont souvent absentes.

Dans l'ensemble, ces tests sont soit peu sensibles, soit longs.

Mise au point d'un nouveau test distinguant infection tuberculeuse latente et tuberculose active

Dans le domaine de l'immunité antivirale, les avancées technologiques telles que l'optimisation de la cytométrie en flux polychromatique ont permis d'associer les profils fonctionnels (par exemple l'ensemble des cytokines produites) des cellules T spécifiques aux différents niveaux d'activité virale [9]. En se basant sur ce paradigme, nous avons formulé l'hypothèse selon laquelle les réponses immunitaires spécifiques à *Mtb* pourraient différer fonctionnellement entre ITL et maladie active. Cette hypothèse a été testée en analysant la capacité des lymphocytes CD4⁺ spécifiques de

Mtb à produire de l'IFN- γ , de l'interleukine (IL)-2 et du TNF (*tumor necrosis factor*)- α . Une cohorte de patients atteints d'ITL et de TB active, sélectionnée sur la base de réponses positives lors de tests de type IGRA contre *Mtb*, a été étudiée et a permis d'identifier des signatures immunologiques différentes pour ces groupes de patients. Chez les patients ITL (*Figure 1A*), la majorité des cellules CD4 spécifiques de *Mtb* produisaient simultanément les trois cytokines mesurées : IFN- γ , IL-2 et TNF- α , et ont été désignées comme cellules multifonctionnelles. Au contraire, chez les patients ayant une TB active (*Figure 1B*), ces cellules multifonctionnelles étaient minoritaires et la majorité des lymphocytes T CD4⁺ spécifiques de *Mtb* produisaient exclusivement du TNF- α (cellules appelées simple TNF- α).

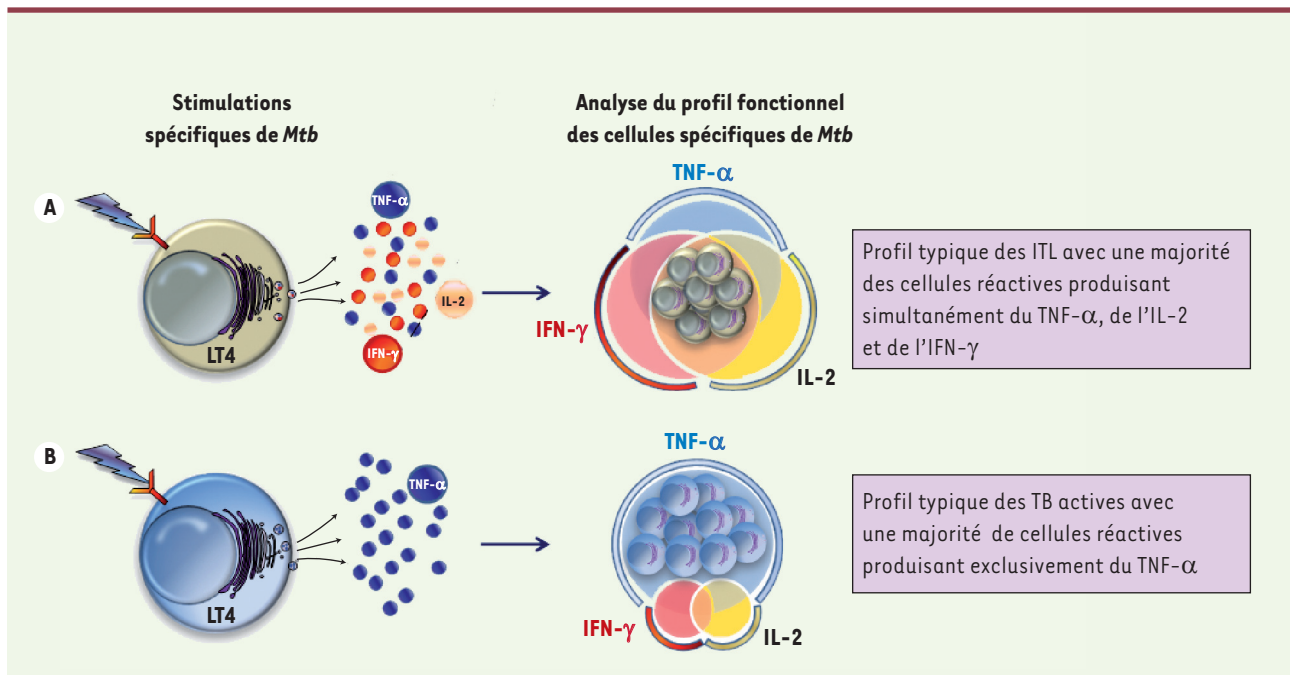


Figure 1. Différences fonctionnelles des LT4 (lymphocytes T CD4⁺) spécifiques de Mtb, observées dans les situations d'infection latente et de tuberculose active. Suite à une stimulation spécifique avec des antigènes dérivés de Mtb, les cytokines produites par les T CD4 sont analysées par cytométrie en flux polychromatique. **A.** Dans le cas d'une ITL, la majorité des cellules réactives produisent simultanément de l'IFN-γ, de l'IL-2 et du TNF-α. On parle de profil multifonctionnel. **B.** Dans le cas d'une TB active, la majorité des cellules T CD4 spécifiques de Mtb produisent exclusivement du TNF-α. On parle de profil simple TNF-α. L'analyse du pourcentage de cellules simple TNF-α est exploitée afin de discriminer ITL et TB dans un but diagnostique.

Une régression logistique des différentes combinaisons fonctionnelles des T CD4⁺ spécifiques de Mtb a identifié la population simple TNF-α comme étant la plus discriminante pour distinguer les patients porteurs d'une ITL de ceux ayant une maladie active et la meilleure mesure prédictive du statut clinique. En particulier, la valeur de 37,4 % de T CD4⁺ de type simple TNF-α a été définie comme valeur seuil. Au-delà de 37,4 %, le test prédit une TB active alors que le diagnostic d'ITL est attribué lorsque le taux des T CD4⁺ spécifiques de Mtb et de type simple TNF-α est inférieur à ce seuil. Cette valeur théorique, ainsi que le réel pouvoir diagnostique du test, ont été validés chez une seconde cohorte de patients (ITL et TB actives) testée en aveugle par les investigateurs et pour laquelle le diagnostic clinique réel a été identifié avec succès dans 90 % des cas. En conclusion, la sensibilité de ce test (66,7 %) est comparable à celle de

la plupart des tests actuels (Tableau 1) mais il est également hautement spécifique (92,4 %) [10].

Conclusion

Il existe un besoin réel de développer de nouveaux outils diagnostiques sensibles, fiables et rapides de détection de la TB. Le test basé sur les signatures immunologiques décrites précédemment remplit ces conditions. Cependant, sa réalisation nécessite une infrastructure et une expertise technologique qui ne sont généralement pas présentes dans tous les centres cliniques. Différents axes de développement sont actuellement en cours avec comme objectifs de rendre le test de cytométrie polychromatique plus accessible mais également d'identifier de nouveaux biomarqueurs de l'infection par Mtb.

Le test de cytométrie polychromatique, qui s'inscrit comme un prolongement des IGRA, renforce l'idée selon laquelle

les signatures immunologiques sont des biomarqueurs sensibles et prometteurs d'infections par des pathogènes. Leur exploitation à des fins diagnostiques représente un outil d'avenir dans la pratique clinique. ♦

Immunological signatures: a new tool to diagnose active tuberculosis disease?

CONFLIT D'INTÉRÊTS

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Koul A, Arnoult E, Lounis N, et al. The challenge of new drug discovery for tuberculosis. *Nature* 2011 ; 469 : 483-90.
2. Jasmer RM, Nahid P, Hopewell PC. Clinical practice. Latent tuberculosis infection. *N Engl J Med* 2002 ; 347 : 1860-6.
3. Washington L, Palacio D. Imaging of bacterial pulmonary infection in the immunocompetent patient. *Semin Roentgenol* 2007 ; 42 : 122-45.
4. Wang L, Turner MO, Elwood RK, et al. A meta-analysis of the effect of bacille Calmette Guerin vaccination on tuberculin skin test measurements. *Thorax* 2002 ; 57 : 804-9.



5. Pai M, Zwerling A, Menzies D. Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update. *Ann Intern Med* 2008 ; 149 : 177-84.
6. Cruciani M, Scarparo C, Malena M, et al. Meta-analysis of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460 TB, with or without solid media, for detection of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 2004 ; 42 : 2321-5.
7. Steingart KR, Henry M, Ng V, et al. Fluorescence versus conventional sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 2006 ; 6 : 570-81.
8. Ling DI, Flores LL, Riley LW, Pai M. Commercial nucleic-acid amplification tests for diagnosis of pulmonary tuberculosis in respiratory specimens: meta-analysis and meta-regression. *PLoS One* 2008 ; 3 : e1536.
9. Pantaleo G, Harari A. Functional signatures in antiviral T-cell immunity for monitoring virus-associated diseases. *Nat Rev Immunol* 2006 ; 6 : 417-23.
10. Harari A, Rozot V, Enders FB, et al. Dominant TNF-alpha⁺ *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD4⁺ T cell responses discriminate between latent infection and active disease. *Nat Med* 2011 ; 17 : 372-6.
11. Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *N Engl J Med* 2010 ; 363 : 1005-15.
12. Berry MP, Graham CM, McNab FW, et al. An interferon-inducible neutrophil-driven blood transcriptional signature in human tuberculosis. *Nature* 2010 ; 466 : 973-7.

NOUVELLE

Modulation du front d'onde pour l'excitation biphotonique en optogénétique

Aurélien Bègue, Francesca Anselmi, Eirini Papagiakoumou, Valentina Emiliani

Wavefront-engineering microscopy group,
Neurophysiology and New Microscopies laboratory,
CNRS UMR 8154, Inserm U603, Université Paris Descartes,
45, rue des Saints Pères,
75270 Paris Cedex 06, France.
valentina.emiliani@parisdescartes.fr

Le développement de l'optogénétique en neurosciences

L'expression ciblée de protéines photosensibles sous contrôle d'un promoteur spécifique, technique que l'on désigne sous l'appellation optogénétique, a connu un essor formidable ces dernières années dans le domaine des neurosciences. La diversité des protéines photosensibles naturelles et leur amélioration par ingénierie génétique ont permis de créer une vaste gamme d'outils optogénétiques qui permettent de contrôler l'activité cérébrale avec la lumière, via la stimulation ou l'inhibition de neurones. L'optogénétique s'est imposée et a pris peu à peu l'avantage sur des méthodes traditionnelles fondées sur la pose d'électrodes et la pharmacologie, en exploitant les avantages des techniques de stimulation optique. En effet, contrairement aux électrodes, la photostimulation ne provoque pas de perturbations mécaniques et permet d'activer plusieurs régions avec une plus grande flexibilité et une meilleure précision spatiale. L'outil optogénétique le plus couramment utilisé est un canal cationique excitateur qui s'insère dans la mem-

brane plasmique, la *channelrhodopsin-2* (ChR2). Grâce au faible niveau d'intensité lumineuse requis pour son excitation (1 mW/mm², lumière bleue), la ChR2 a pu être activée avec une illumination à champ large délivrée, par exemple, par des fibres optiques implantées dans le cerveau d'animaux *in vivo*. La ChR2 a ainsi grandement contribué à notre compréhension des mécanismes responsables de pathologies complexes comme l'anxiété [1], et a permis de relier l'activité de certains types neuronaux à des comportements précis, comme dans le cas des neurones cholinergiques du noyau *accumbens* [2].

Pourtant une illumination à champ large n'est pas suffisante pour répondre à certaines questions, concernant par exemple la connectivité interne des circuits neuronaux, qui demande une résolution cellulaire ou subcellulaire. Un contrôle tridimensionnel de l'illumination permettrait de sélectionner un sous-groupe de neurones parmi ceux qui expriment le promoteur lié aux protéines photosensibles, ou même de cibler un compartiment cellulaire comme une dendrite. Cette précision est nécessaire pour analyser

l'intégration des signaux des différents compartiments cellulaires et comprendre le traitement de l'information par le neurone.

Illumination biphotonique de la ChR2

Une illumination biphotonique [3] permet d'obtenir un contrôle dans les trois dimensions spatiales. En effet, de plus grandes longueurs d'onde améliorent la pénétration du faisceau laser et le confinement axial est obtenu grâce à l'effet non linéaire biphotonique (Figure 1). Néanmoins, l'application de l'illumination biphotonique classique (Figure 1 gauche) à l'activation de la ChR2 présente plusieurs inconvénients qui en ont retardé l'utilisation. Le petit volume d'excitation balayé (environ 3 à 5 μm³) ne permet pas d'activer un nombre suffisant de canaux pour déclencher des potentiels d'action, compte tenu de la faible expression des canaux ioniques photosensibles dans la membrane neuronale et de leur faible conductance. Rickgauer *et al.* ont proposé une première solution pour résoudre ce problème en balayant le volume d'excitation rapidement dans l'échantillon [4]. L'ef-