

# Vers des évolutions du diagnostic immunologique de la tuberculose ?

---

**Guislaine Carcelain**

Département d'Immunologie, Hôpital Pitié-Salpêtrière  
INSERM 1135, Université Paris VI

**Inserm**  
Institut national  
de la santé et de la recherche médicale



**UPMC**  
PARISUNIVERSITAS

Symposium IGRA -Institut Pasteur- Jeudi 20 Mars

Aucun conflits d'intérêt à déclarer

# Quels enjeux ?

---

## - Améliorer la sensibilité du diagnostique :

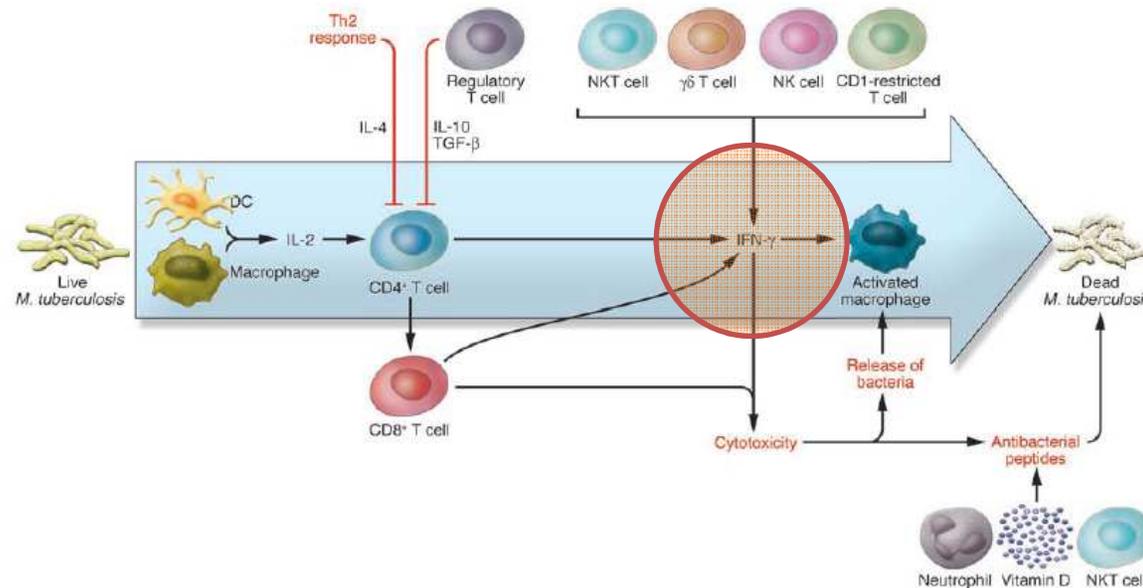
Les tests sont basés sur le système immunitaire  
La tuberculose est favorisée par l'immunodépression  
→ Enfants, sujets âgés, Patients VIH, patients  
sous immunosupresseurs ...

## - Différencier la forme latente de la forme active :

Ou identifier la forme à risque de passage à forme active  
nécessité thérapeutique

à l'aide d'un autre marqueur? Un autre test? Un autre antigène?

# Un autre marqueur que l'IFN- $\gamma$ ?

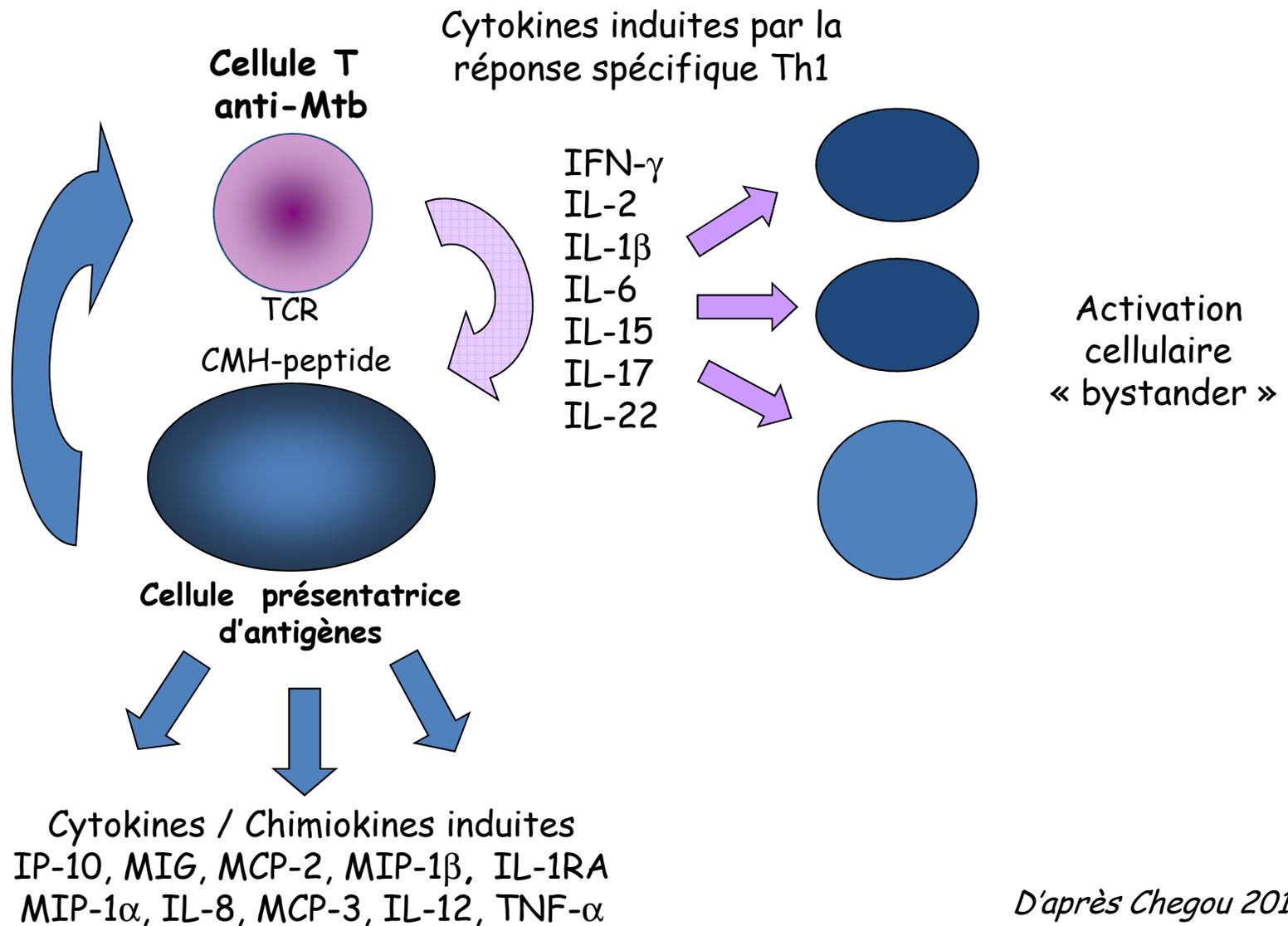


Young JCI 2008

- Plateau 10-72 heures après la stimulation
- activation immunitaire, régulation de la transcription de plus de 200 gènes (voie de signalisation JAK/stat) :
  - bactéricide, présentation antigénique, commutation
  - isotypique, réponses cellulaires, chimiotactisme cellules immunes

Via cytokines / chimiokines Th1

# Cytokines/chimiokines clefs de la réponse immune anti-Mtb



*D'après Chegou 2013*

# Interferon gamma-inducible *protein* 10 (IP10)

- Chimiochine sécrétée par les cellules présentatrices en réponse à de nombreuses cytokines dont l'IFN $\gamma$  et le TNF $\alpha$
- Attraction monocytes et CD4 Th1 sur le site inflammatoire
- Même cinétique que l'IFN $\gamma$  mais **100 fois plus importante** (ARNm)
- Le plus étudié comme marqueur alternatif :
  - . Sensibilité et spécificité # IGRAs (TBM/non exposés/TBL) (revue Ruhwald 2012)
  - . **Patients VIH** : sensibilité augmentée (85.7% vs 60.7% QTF) (Goletti 2010)  
aux dépends d'une **spécificité très diminuée** (13.2% au lieu de 68.4% QTF)
  - . **Enfants** : bon agrément avec QTF, moins dépendant de l'âge (Whittaker 2008)
  - . **Buvar**, performances similaires plasma (luminex) (Aabye 2012)

# Autres ?

## Monocyte chemo-attractant protein 2 (MCP2)

- sécrétée par les présentatrices d'antigène en réponse à  $\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{IFN}\alpha$ ,  $\text{IL1}\beta$
- attraction des monocytes, Pn et  $\text{CD4 Th1}$  sur le site inflammatoire
- même cinétique que l' $\text{IFN}\gamma$  mais 10 fois plus importante
- mais dans quelques études comparatives **sensibilité inférieure** à celles de l' $\text{IFN}\gamma$  ou IP10 (Ruhwald 2008, 2009)

## IL-1 Receptor Antagonist (IL1-RA)

- sécrété par les monocytes, polynucléaires neutrophiles, cellules épithéliales, adipocytes en réponse à  $\text{IL1}\beta$ ,  $\text{TNF}\alpha$ ...
- inhibiteur compétitif de l' $\text{IL1}\alpha$  et  $\text{IL1}\beta$
- Même cinétique que l' $\text{IFN}\gamma$ , taux plus élevé (Ruhwald 2009) mais **variabilités**

## Interleukine 2 (IL2) (Biselli 2010)

- Taux faibles en 20h d'incubation
- 72h d'incubation: sensibilité 90%, spécificité 97.5% (Biselli 2010)

**MCP1** (bruit de fond), **MIP1 $\beta$**  (résultats discordants), **Multiplex** ...

# Différencier TBL / TBM à l'aide des Dosages Multiplex et l'associations de protéines ?

## **EGF/VEGF/sCD40L/ MIP-1 $\beta$ /TGF $\alpha$** (Chegou 2013)

- 23 TBM, 34 contacts, Cape Town, 12 protéines testées
- combinaison la + discriminante TBM/TBL (84% classification correcte):  
IFN $\alpha$ 2, IL1RA, sCD40L, IP10, VEGF

## **IL15/MCP1** (Frahm 2011)

- 76 enfants (29% VIH) : 12 TBM, 32 TBL, 26 sains, 25 protéines testées
- Concentrations d'IL-15 et de MCP-1 significativement plus hautes  
TBM / TBL (p = 0.0006 and 0.0030 respectivement )
- Combinaison qui permet le dg de 83% TBM et 88% TBL

Etc ....

# Un autre test que le dosage de l'IFN- $\gamma$ ?

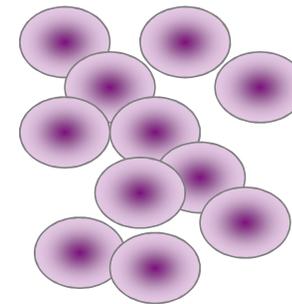
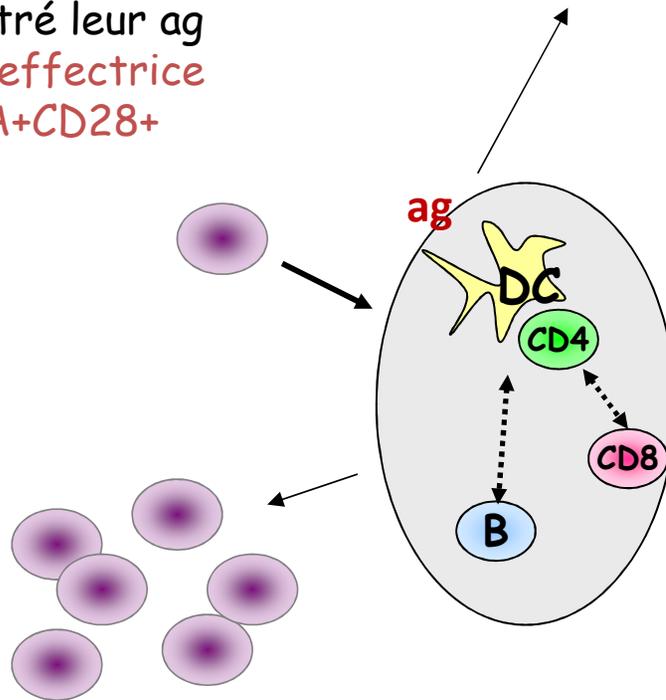
## Diversité fonctionnelle des cellules T mémoires spécifiques en réponse à MTb

### T naïves (N)

organes lymphoïdes secondaires  
jamais rencontré leur ag  
sans fonction effectrice  
CCR7+CD45RA+CD28+

### T mémoires effectrices ( $T_{EM}$ ) / effectrices

Sang, organes lymphoïdes, tissus  
contact récent ag  
fonction effectrice rapide, IFN $\gamma$ /IL2, IFN $\gamma$   
CCR7-CD45RA+/-CD28-



Organes  
Périphériques  
atteints

### T mémoires centrales ( $T_{CM}$ )

organes lymphoïdes secondaires  
prolifération rapide contre ag, IL2  
CCR7+CD45RA- CD28+

	N	$T_{CM}$	$T_{EM}$	TE
TBM	+++	++	++	+
TBL	+++	+++	+	-

D'après M Labalette

# Cytométrie en flux multiparamétrique

- Marqueurs de surface de différenciation des cellules T mémoires centrales, mémoires effectrices :

CD45RA, CCR7, CD27, CD28 ...

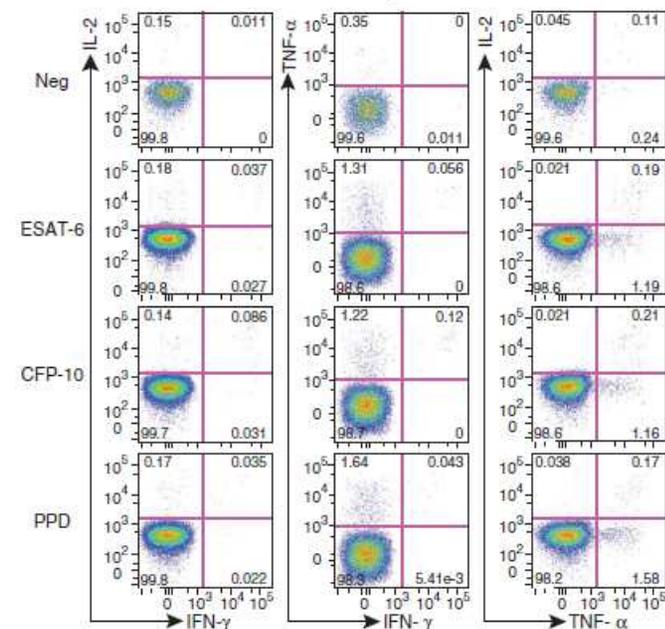
définitions des sous populations T mémoires non consensuelles

- Cytokines Th1 sécrétées en intracellulaire après 6h de stimulation par ag Mtb :

IL2, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$

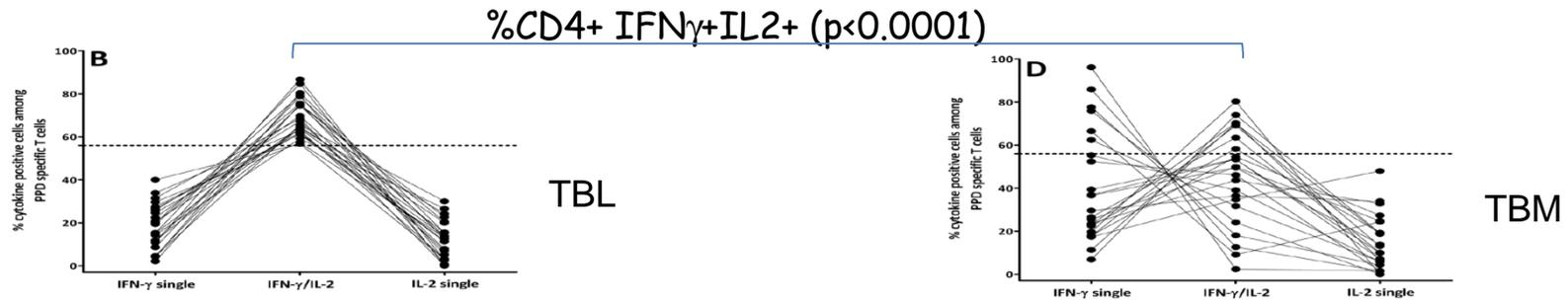
- Technique et analyse complexes

- Différencier TBM / TBL



## CD4+ IFN $\gamma$ +IL2+ (Sester 2011)

- 24 TBM, 28 TBT (temps moyen post traitement efficace 35.5 +/- 20.4 ans)  
25 TBL PPD+RD+ et 25 sujets sains PPD+RD-
- Profil de sécrétion (IFN $\gamma$ , IL2) des cellules CD4 anti-PPD, ESAT6 ou CFP10
- Le % CD4 IL2+ et/ou IFN $\gamma$ + ne permet de différencier TBM/TBT quelque soit l'ag utilisé
- CD4 anti-PPD: prédominance de CD4+ IFN $\gamma$ +IL2+ TBL, de CD4+IFN $\gamma$ +IL2- TBM
- Cellules TCD4 anti-PPD IFN $\gamma$ +IL2+ < 56% permet de différencier TBM / TBL  
(ROC : spécificité 100% (95%IC : 85-100), sensibilité 70% (95% IC: 47-87%), AUC 0.84 (95% IC: 0,72-0.96) )



## CD4+ TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$ -IL2- (Harari 2011)

- 283 patients ELISPOT + = 11 TBM (clinique, RP, bactériologie) 272 TBL
- Profil de sécrétion (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL2) des cellules CD4 anti-Mtb
- Augmentation significative des cellules CD4+ TNF $\alpha$  chez les TBM, meilleur facteur de différenciation d'une TBL d'une TBM
- validation : 101 patients à l'aveugle: sensibilité 67%, spécificité 92%, VPP 80%, VPN 92.4%

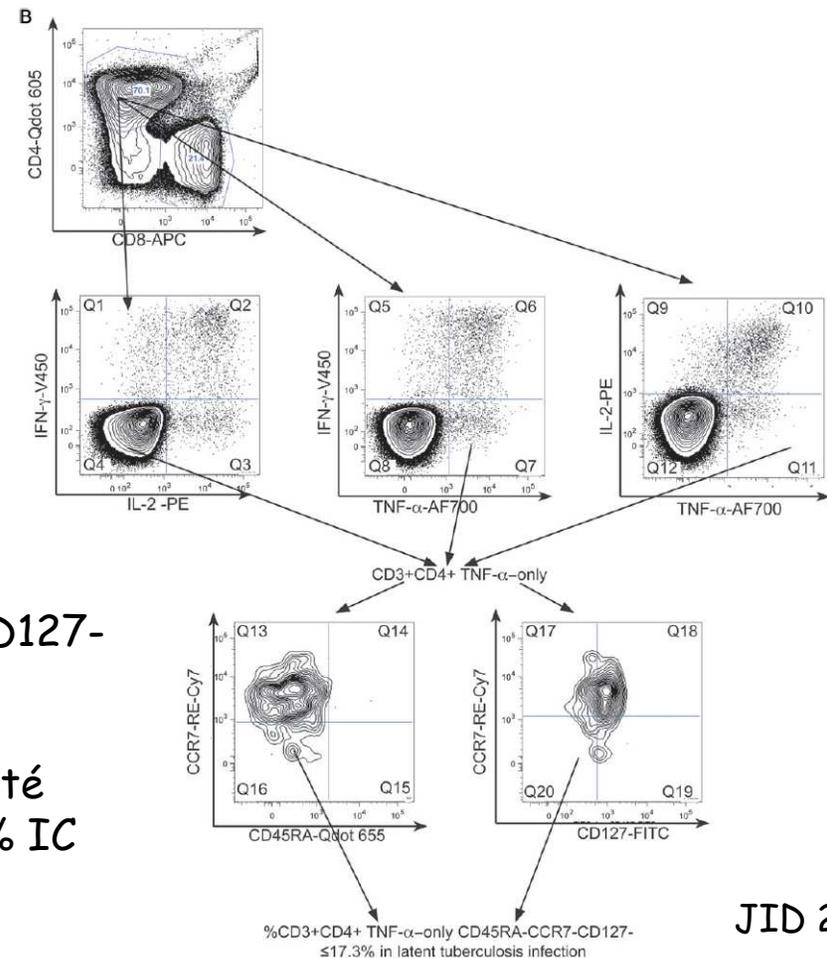
# T-Cell Immunophenotyping Distinguishes Active From Latent Tuberculosis

Katrina M. Pollock,<sup>1</sup> Hilary S. Whitworth,<sup>1</sup> Damien J. Montamat-Sicotte,<sup>1</sup> Lisa Grass,<sup>1</sup> Graham S. Cooke,<sup>2</sup> Moses S. Kapembwa,<sup>3</sup> Onn M. Kon,<sup>4</sup> Robert D. Sampson,<sup>5</sup> Graham P. Taylor,<sup>2</sup> and Ajit Lalvani<sup>1</sup>

	HIV/Tuberculosis		Tuberculosis		HIV/Latent Tuberculosis Infection		Latent Tuberculosis Infection		Total	
	7	(%)	6	(%)	10	(%)	11	(%)	34	(%)
Median (IQR) age	43	(40.5–52.4)	34.5	(28.0–56.0)	36	(24.0–39.0)	33	(31.0–35.5)	35.5	(31.3–40.8)

Stimulation ESAT-6, CFP-10, and EspC  
11 paramètres :

CD3, CD4, CD45RA, CD8, CCR7,  
CD127, PD-1, viabilité, IFN $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$



Le % de CD4+ anti-PPD TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$ -IL2-  
avec un phénotype effecteur CD45RA-CCR7- CD127-  
permet de différencier les TBM des TBL :

Sensibilité 100% (95% IC 73.5-100.0), spécificité  
92.9% (95% IC, 66.1-99.8), ROC AUC 0.99 (95% IC  
0.97-1.01; P < .0001

# D'autres antigènes qu'ESAT-6 et CFP10 ?

---

## **Rv3879c-ELISpotPLUS** (Dosanjh 2008)

- 154 patients TBM confirmée
- RD1 Rv3879c associé à ESAT-6/ CFP10
- Augmente la sensibilité (p 0.02) :  
ELISpotPLUS 89% (95% IC, 84% -93%), ELISpot ESAT6/CFP10 79% (95% IC 72%-85%)

## **HBHA** (Hougardy 2007)

- 51 Sains, 89 TBA, 65 LTB (IDR, BCG-), dosage J4
- TBL: PPD 90% sensibilité -70% spécificité, ESAT 40.7% et 90.9%, HBHA 92% et 94%
- Confirmé patients dialyse (Dessein 2013)

## **Screening de plus de 150 antigènes**

- 37 antigènes de latence (DosR, rpf) (Schuck 2009)
  - . J7 de culture, restimulation J6, CD4 CD8 CD45RO IFN $\gamma$
  - . 1 candidat TBL Rv3407
- 118 antigènes (DosR, rpfs, stress, réactivation ...) (Chagou 2013)
  - . TBM : rpfs (Rv0867c, Rv2389c, Rv2450c, Rv1009 and Rv1884c)
  - . combinaison discriminante candidate (ESAT-6/CFP-10 , Rv2624c and Rv0867c)

# Une incubation plus longue ?

---

Pour augmenter la sensibilité de détection des TBL

## Leyten 2007

- 27 IDR+ notion d'exposition, 4 TBM traitées et 9 contrôles IDR -
- Fréquence positifs :
  - Test incubation longue 7js 92%, QTF-GIT 33%, ELISPOT 46%,  $p= 0.01$
- Concordance faible entre les tests

## Buttera 2009

- 106 IDR+ notion d'exposition, 29 TBM traitées et 13 contrôles IDR-
- même fréquence de réponses TBL entre test QTF et test maison
- 30,6% TBL QTF- sont positifs dans un test maison avec 6js d'incubation

## En conclusions ...

---

- Beaucoup de choses de testées : cytokines/chimiokines, techniques, antigènes ...
- Pas assez de bénéfiques ou trop de complexité ou trop peu de données par rapport aux tests IGRAs de référence
- Une bonne introduction pour Andreas Eckelt et le quantiféron ultrasensible?