



UNIVERSITÉ DE LILLE
FACULTÉ DE MÉDECINE HENRI WAREMBOURG
Année : 2021

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN MÉDECINE

**Mise en place du test T-SPOT.TB® automatisé
pour le dépistage de la tuberculose latente :
expérience de l'Institut d'Immunologie du CHU de Lille**

Présentée et soutenue publiquement le 4 juin 2021 à 16h
au Pôle Formation
par Doriane DECHAUX-BLANC (ép. LEZIER)

JURY

Présidente :

Madame le Professeur Myriam LABALETTE

Assesseures :

Madame le Professeur Guislaine CARCELAIN

Madame le Professeur Sophie CANDON

Directrice de thèse :

Madame le Docteur Julie DEMARET

La Faculté n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses : celles-ci sont propres à leurs auteurs.

Liste des figures

Figure 1 : Estimation de l'Incidence mondiale de la tuberculose en 2018	19
Figure 2 : Estimation de la prévalence du VIH chez les cas incidents de tuberculose en 2018	20
Figure 3 : Taux d'incidence de la tuberculose dans le monde en 2018	21
Figure 4 : Cas déclarés de tuberculose maladie, France entière, 2000-2018	22
Figure 5 : Cas déclarés de tuberculose maladie par région, France entière, 2018.....	23
Figure 6 : Filiation taxonomique des mycobactéries.	24
Figure 7 : <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	25
Figure 8 : Représentation schématique de la membrane cellulaire de <i>M. tuberculosis</i>	26
Figure 9 : Gènes constituant la région de différence 1 (RD1) de <i>M. tuberculosis</i>	28
Figure 10 : Fonctionnement du système de sécrétion ESX-1	29
Figure 11 : Histoire naturelle de la tuberculose.....	32
Figure 12 : Radiographie thoracique d'un patient atteint de tuberculose maladie dans sa forme pulmonaire	36
Figure 13 : Déformation rachidienne consécutive à une tuberculose touchant la région thoraco-lombaire chez un patient atteint de tuberculose ostéoarticulaire	38
Figure 14 : Miliare tuberculeuse sur une radiographie thoracique de face	40
Figure 15 : Physiopathologie de l'infection à <i>M. tuberculosis</i>	47
Figure 16 : Structure et composition du granulome tuberculeux.	49
Figure 17 : Principaux PRRs et voies de signalisations intracellulaires au sein du phagocyte en réponse à une infection par <i>M. tuberculosis</i>	52
Figure 18 : Voies d'activation de l'inflammasome induites par <i>M. tuberculosis</i>	55
Figure 19 : Réponse immunitaire adaptative dans l'infection à <i>M. tuberculosis</i>	66
Figure 20 : Bases immunologiques des tests de dépistages de l'ITL	71
Figure 21 : Etapes de la réalisation du test Quantiferon®-TB Gold in-tube (QFT®-GIT).....	76
Figure 22 : Principe de l'ELISpot pour la réalisation du test T-SPOT.TB®	78
Figure 23 : Interprétation des résultats d'un test T-SPOT.TB®	79
Figure 24 : Circuits d'acheminement des échantillons depuis le site de prélèvement jusqu'à l'Institut d'Immunologie	89
Figure 25 : Frise chronologique illustrant les périodes d'intérêts étudiées pour l'analyse du changement de méthode de première intention pour la réalisation des tests IGRAs au laboratoire d'immunologie du CHU de Lille	90
Figure 26 : Segmentation du processus d'un test IGRA réalisé au laboratoire d'immunologie cellulaire du CHU de Lille selon les trois phases de l'examen de biologie médicale : pré-analytique, analytique et post-analytique	93
Figure 27 : Composition du préparateur d'échantillons Microlab Nimbus & Presto	95
Figure 28 : Composition du cytomètre en flux Guava® EasyCyte system 5HT	97
Figure 29 : Composition du lecteur Elispot CTL reader.....	98
Figure 30 : Fonctionnement de la plateforme ELISpot automatisée.....	99
Figure 31 : kit réactif T-SPOT.TB TB8. Oxford Immunotec.	100
Figure 32 : Principe du tri magnétique réalisé par le module Presto et utilisant le kit T-Cell Select™	101
Figure 33 : Disposition des consommables sur la plateforme Nimbus-Presto pour réalisation du test T-SPOT.TB®	103

Figure 34 : Exemple de disposition des plaques et contenants sur le Microlab Nimbus-Presto pour une série de 24 échantillons de sang, présentée par l'interface « Run Hamilton Control »	103
Figure 35 : Emplacement de la plaque contenant les suspensions de CMN et le réactif Guava ViaCount ainsi que les différents consommables sur le cytomètre en flux Guava® ..	106
Figure 36 : Exemple de résultat de tests T-SPOT.TB® sur des barrettes observées à l'œil nu, correspondant à un test négatif, un test positif et un test indéterminé	110
Figure 37 : Exemple de numérisation de plaque par le lecteur CTL reader pour réalisation du test T-SPOT.TB®	111
Figure 38 : Les différents modes d'affichage pour la validation analytique des tests T-SPOT.TB® sur le lecteur CTL reader	113
Figure 39 : Exemple de dossier MOLIS d'un test T.SPOT-TB® au résultat positif.	115
Figure 40 : Algorithme de validation biologique des tests T-SPOT.TB® paramétré dans le logiciel MOLIS au laboratoire d'immunologie cellulaire	116
Figure 41 : Tubes spécifiques à prélever pour la réalisation du test QuantiFERON®-TB Gold Plus	118
Figure 42 : Composantes interne de la station ELISA automatique DS2	124
Figure 43 : Courbes de Levey-Jennings pour les trois niveaux de CQI du test sur le logiciel URT	126
Figure 44 : Exemple de dossier MOLIS d'un test QFT®-Plus au résultat négatif pour un patient anonymisé.	127
Figure 45 : Algorithme de validation biologique du test QFT®-Plus paramétré dans le logiciel MOLIS au laboratoire d'immunologie	128
Figure 46 : Principales étapes de la réalisation du test T-SPOT.TB® au laboratoire d'immunologie cellulaire avant l'automatisation	132
Figure 47 : Isolement des CMN par centrifugation en gradient de densité (Ficoll®)	133
Figure 48 : Lecteur ELISpot CTL Immunoscan, utilisé pour la lecture du test T-SPOT.TB® à l'Institut d'Immunologie avant la mise en place de l'automatisation	134
Figure 49 : Exemple de validation analytique de l'un des puits d'un test T-SPOT.TB® via le logiciel TB SCAN après lecture par le lecteur ELISpot CTL Immunoscan	135
Figure 50 : Périodes d'intérêts et données générales concernant l'ensemble des tests IGRAs réalisés du 17/02/2020 au 31/05/2020 à l'Institut d'Immunologie du CHU de Lille	138
Figure 51 : Distribution des demandes de tests IGRAs prises en charge au laboratoire d'immunologie cellulaire au CHU de Lille selon l'origine du service prescripteur et le type de test réalisé sur la période du 17/02/2020 au 31/05/2020.	139
Figure 52 : Répartition des tests IGRAs réalisés au laboratoire d'immunologie cellulaire du CHU de Lille par semaine sur la période du 17/02/2020 au 31/05/2020	140
Figure 53 : Répartition des demandes de tests IGRAs entre les différents pôles du CHU de Lille sur la période du 17/02/2020 au 31/05/2020.	142
Figure 54 : Sites extérieurs prescripteurs des tests IGRAs réalisés au laboratoire d'immunologie cellulaire du CHU de Lille du 17/02/2020 au 31/05/2020, situés dans les départements du Nord et du Pas-de-Calais	144
Figure 55 : Sites extérieurs prescripteurs des tests IGRAs réalisés au laboratoire d'immunologie du 17/02/2020 au 31/05/2020, situés en région Hauts-de-France (hors Nord et Pas-de-Calais) et en région Grand-Est	144
Figure 56 : Répartition des demandes de tests IGRAs des sites extérieurs prises en charges au laboratoire d'immunologie cellulaire du CHU de Lille entre le 17/02/2020 et le 31/05/2020, selon l'origine géographique du prélèvement et le type de test réalisé	145

Figure 57 : Répartition des demandes de tests IGRAs des sites extérieurs selon le site préleveur, prises en charges au laboratoire d'immunologie entre le 17/02/2020 et le 31/05/2020.	146
Figure 58 : Déroulement de la phase pré-analytique d'un test IGRA réalisé au laboratoire d'immunologie du CHU de Lille	147
Figure 59 : Périodes d'intérêts et données étudiées concernant la phase pré-analytique des tests T-SPOT.TB® dans le cadre du passage à l'automatisation à l'Institut d'Immunologie du CHU de Lille	148
Figure 60 : Chronologie des actions menées par le laboratoire d'immunologie du CHU de Lille dans le cadre de la phase pré-analytique du test T-SPOT.TB® automatisé en amont du 17/02/2020 : communication auprès des prescripteurs, gestion logistique des échantillons	149
Figure 61 : Stratégie de prise en charge des prélèvements de tests IGRAs définie avec les cadres du RTE/AE début février 2020	154
Figure 62 : Evolution du nombre et de la proportion de prélèvements T-SPOT.TB® concernés par une non-conformité pré-analytique par semaine sur la période du 17/02/2020 au 31/05/2020.	155
Figure 63 : Répartition des prélèvements T-SPOT.TB® non conformes par service (prélèvements du CHU de Lille) sur la période du 17/02/2020 au 31/05/2020.	156
Figure 64 : Distribution des causes de non conformités pré-analytiques pour les prélèvements T-SPOT.TB® reçus au laboratoire d'immunologie cellulaire du CHU de Lille entre le 17/02/2020 et le 31/05/2020	157
Figure 65 : Répartition des prélèvements T-SPOT.TB® réceptionnés au RTE/AE le vendredi à partir de 16h, le week-end et les jours fériés sur la période du 17/02/2020 au 31/05/2020.	158
Figure 66 : Evolution du nombre de prélèvements T-SPOT.TB® transférés en tubes QuantiFERON et proportion de ces prélèvements par rapport au total des tests QFT®-Plus par semaine sur la période du 17/02/2020 au 31/05/2020.	164
Figure 67 : Déroulement de la phase analytique d'un test T-SPOT.TB® réalisé au laboratoire d'immunologie du CHU de Lille	165
Figure 68 : Périodes d'intérêts et données étudiées concernant la phase analytique des tests T-SPOT.TB® dans le cadre du passage à l'automatisation à l'Institut d'Immunologie du CHU de Lille.....	166
Figure 69 : Etapes de la mise en place de la plateforme ELISpot pour le passage à l'automatisation du test T-SPOT.TB® au laboratoire d'immunologie du CHU de Lille.	167
Figure 70 : Plan de la salle "Evaluation cellulaire" de l'Institut d'immunologie du CHU de Lille, avant (en haut) et après (en bas) installation de la plateforme ELISpot pour la réalisation du test T.SPOT-TB® automatisé.....	168
Figure 71 : Numération cellulaire des CMN isolées par le Nimbus-Presto (à droite) versus isolement par technique Ficoll (à gauche).	172
Figure 72 : Régression linéaire sur les numérations de CMN obtenues après une série de dilutions.....	173
Figure 73 : Régression linéaire entre le lecteur ELISpot CTL reader (test) et le lecteur CTL contrôle CTL, pour les puits comprenant ≥ 25 spots	174
Figure 74 : Numération cellulaire des CMN isolées par le Nimbus-Presto (à droite) versus isolement par technique Ficoll (à gauche)	176

Figure 75 : Evaluation de l'exactitude du décompte des spots par comparaison de la plateforme ELISpot testée avec les techniques de références utilisées au laboratoire d'immunologie cellulaire	177
Figure 76 : Schéma récapitulatif de l'étude du rendement du tri cellulaire par le Nimbus-Presto sur les échantillons T-SPOT.TB® traités entre le 18/02/2020 et le 13/03/2020 au laboratoire d'immunologie cellulaire du CHU de Lille.	179
Figure 77 : Comparaison du nombre de CMN attendu (= nombre de CMN théorique) dans les échantillons de 3,5 mL de sang au nombre de CMN obtenu après tri cellulaire par le Nimbus-Presto et numération par le cytomètre en flux Guava®	180
Figure 78 : Echantillons T-SPOT.TB® traités mensuellement par le Nimbus-Presto de février 2020 à janvier 2021	181
Figure 79 : Déroulement de la phase post-analytique d'un test T-SPOT.TB® réalisé au laboratoire d'immunologie du CHU de Lille	183
Figure 80 : Périodes d'intérêts et données étudiées concernant la phase post-analytique des tests T-SPOT.TB® dans le cadre du passage à l'automatisation à l'Institut d'Immunologie du CHU de Lille	184
Figure 81 : Répartition des résultats des tests T-SPOT.TB® réalisés pour la médecine du travail du CHU de Lille (UF 0619) sur la période du 30/07/2020 au 11/09/2020 et correspondant à l'utilisation d'un même lot de réactifs.	189
Figure 82 : Revue des contrôles demandés au service de Médecine du travail du CHU de Lille pour les tests T-SPOT.TB® aux résultats positifs (a), limites au seuil (b) et indéterminés (c) réalisés entre le 30/07/2020 et le 11/09/2020.	190
Figure 83 : Tests T-SPOT.TB® issus de la plaque 2006080942a lue le 07/08/2020, après validation analytique	192
Figure 84 : Tests T-SPOT.TB® issus de la plaque 2007081313a lue le 11/08/2020, après validation analytique	193
Figure 85 : Evolution de la température extérieure à Lille et à Arras au cours du mois d'août 2020	212

Liste des tableaux

Tableau 1 : Conduite à tenir suite à la réalisation d'un test IGRA dans le cadre du dépistage de l'ITL au diagnostic de l'infection à VIH.....	42
Tableau 2 : Interprétation d'un résultat d'IDR à la tuberculine	73
Tableau 3 : Interprétation d'un test QuantiFERON	77
Tableau 4 : Taux de progression vers la TM en cas de test positif ou négatif selon les populations	82
Tableau 5 : Répartition des tests IGRAs réalisés au laboratoire d'immunologie cellulaire du CHU de Lille sur la période d'intérêt du 17/02/2020 au 31/05/2020, en fonction du test réalisé et de la provenance de la demande.....	138
Tableau 6: Caractéristiques des patients dont sont issus les prélèvements correspondant aux tests IGRA réalisés au laboratoire d'immunologie du CHU de Lille sur la période du 17/02/2020 au 31/05/2020	141
Tableau 7 : Demandes de tests IGRAs provenant des services du CHU de Lille : répartition par pôle et par test réalisé sur la période du 17/02/2020 au 31/05/2020	143
Tableau 8 : Gestion des prélèvements T-SPOT.TB® contenant un volume de sang insuffisant sur la période du 17/02/2020 au 31/05/2020.	159
Tableau 9 : Gestion des prélèvements T-SPOT.TB® comprenant plusieurs tubes héparinate de Li 5 mL sur la période du 17/02/2020 au 31/05/2020.....	161
Tableau 10 : Gestion des prélèvements T-SPOT.TB® correspondant à un type de tube non conforme pour la réalisation du test sur la période du 17/02/2020 au 31/05/2020.....	162
Tableau 11 : Gestion des prélèvements T-SPOT.TB® réceptionnés le vendredi après 16h, le week-end et les jours fériés sur la période du 17/02/2020 au 31/05/2020 ...	163
Tableau 12 : Evaluation de la numération cellulaire avant normalisation des concentrations de CMN	171
Tableau 13 : Répétabilité du lecteur ELISpot CTL reader utilisé au laboratoire d'immunologie du CHU de Lille.....	175
Tableau 14 : Evaluation de l'exactitude du décompte des spots par comparaison de la plateforme ELISpot testée avec les techniques de références utilisées au laboratoire d'immunologie cellulaire.....	177
Tableau 15 : Statistiques sur le rendement de l'isolement des CMN réalisé par le Nimbus-Presto sur la période du 18/02/2020 au 13/03/2020.....	180
Tableau 16 : Commentaires d'interprétation du test T-SPOT.TB® en fonction du résultat et code MOLIS correspondant.	185
Tableau 17 : Gestion des difficultés liées à l'absence d'identification des tests à valider sur le lecteur ELISpot CTL reader au cours des premiers mois d'utilisation de la plateforme ELISpot pour la réalisation des tests IGRAs au laboratoire d'immunologie cellulaire.	187

Tableau 18 : Tests T-SPOT.TB® réalisés entre le 30/07/2020 et le 11/09/2020 et pour lesquels une vérification sur un nouveau prélèvement a été réalisée ultérieurement pour le service de MT du CHU de Lille (n=14).....	191
Tableau 19 : Résultats des tests QFT®-Plus réalisés sur la période du 14/09/2019 au 09/10/2019 et des tests T-SPOT.TB® réalisés sur la période du 12/09/2020 au 07/10/2020 à l'Institut d'Immunologie du CHU de Lille.	194
Tableau 20 : Résultats des tests T-SPOT.TB® réalisés en seconde intention sur l'ensemble de l'année 2019 à l'Institut d'Immunologie du CHU de Lille	195

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

AE : Analyses extérieures (service des)

AIM2 : Absent in melanoma 2

BAAR : Bacille acido-alcool-résistant

BCG : Bacilles de Calmette-Guérin

Bcl2 : B-cell lymphoma 2

BK : Bacille de Koch

CADD : Computer assisted design and drafting

CARD : *Caspase activation and recruitment domain*

CD : Cellule dendritique

CD1 : Cluster de différenciation 1

CDC : Center for disease control

CFP-10 : Culture filtrate protein of 10 kDa

CLAT : Centre de lutte contre la tuberculose

CLR : C-lectin receptor

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CMN : cellule mononucléée du sang

CN : Contrôle négatif

CNR-MyRMA: Centre national de référence des mycobactéries et de la résistance des mycobactéries aux antituberculeux

CH : Centre hospitalier

CHU : Centre hospitalier universitaire

CP : Contrôle positif

CPA : Cellule présentatrice d'antigènes

CQI : Contrôle de qualité interne

CRP : C-reactive protein

DIM : Dimycocérosates de phthiocérol

DPP : Dérivé protéique purifié

DO : Déclaration obligatoire

EDTA : Acide éthylène diamine tétra-acétique

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay

ELISpot : Enzyme-linked immunospot

ESAT-6 : Early secreted antigenic target of 6 kDa

HAS : Haute autorité de santé

HCSP : Haut conseil de la santé publique

IDR : Intradermoréaction à la tuberculine

IFN γ : Interféron gamma

INH : Isoniazide

IGRA : Interferon gamma release assay

ITL : Infection tuberculeuse latente

IRF : interferon regulatory factor

LNKT : Lymphocyte Natural killer T

LTCD4 : Lymphocyte T CD4+

LTCD8 : Lymphocyte T CD8+

LTmem : Lymphocyte T mémoire
LTreg : Lymphocyte T régulateur
LT $\gamma\delta$: Lymphocyte T $\gamma\delta$
Man-LAM : Mannose-capped lipoarabinomannan
MGIT : Mycobacteria growth indicator tube
NF- κ B : Nuclear factor κ B
NLRP-3 : NLR pyrin domain containing 3
NOD : nucleotide oligomerization domain
NK : Natural killer
OMS : Organisation mondiale de la Santé
PAMP : Pathogen-associated molecular pattern
PCR : Polymerase chain reaction
PHA : Phytohémmagglutinine
PIM : Phosphalidyl-myo-inositol
PIT : Primo infection tuberculeuse
PMI : Protection maternelle et infantile
PNN : polynucléaire neutrophile

PRR : Pattern recognition receptor
PVVIH : Personne vivant avec le VIH
QFT[®]-G : QuantiFERON[®]-TB Gold
QFT[®]-GIT: Quantiferon[®]-TB Gold in-tube
QTF[®]-Plus : QuantiFERON[®]-TB Gold Plus
RD1 : Région de différence 1
RTE : Réception – Tri – Enregistrement (centre de)
SPF : Santé publique France
SR : scavengers receptors
TAL : Transport automatique léger
TCR : T cell receptor
TEP : Tuberculose extrapulmonaire
TIR : Toll-like IL-1 receptor
TLR : Toll-like receptor
TM : Tuberculose maladie
UI : Unité internationale
URT : Unity Real Time
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

Sommaire

Introduction	17
Première partie : La tuberculose : aspects cliniques et physiopathologiques, méthodes diagnostiques	19
A. Données épidémiologiques sur la tuberculose.....	19
1. Dans le monde	19
2. En France.....	21
B. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , l'agent de la tuberculose	23
1. Taxonomie et génétique de <i>M. tuberculosis</i>	23
2. Caractéristiques morphologiques des mycobactéries	25
3. Structure de la membrane de <i>M. tuberculosis</i>	25
4. Génétique : intérêt de la région de différence 1 (RD1).....	27
5. Les protéines ESAT-6 et CFP-10	29
C. Aspects cliniques et thérapeutiques de la tuberculose.....	30
1. Les différentes entités cliniques de la tuberculose	30
a. Modes de transmission.....	30
b. Histoire naturelle de la maladie.....	31
2. Prise en charge de l'ITL en France.....	41
a. Indications du dépistage de l'ITL et population cibles	41
b. Modalités thérapeutiques de l'ITL	43
3. Prévenir l'infection à <i>M. tuberculosis</i> : la vaccination par le BCG.....	45
D. Mécanismes immunologiques mis en jeu dans l'infection à <i>M. tuberculosis</i>	46
1. Du contagé à la formation du granulome : résumé des étapes physiopathologiques menant à l'infection tuberculeuse	46
a. Réponse cellulaire T efficace : situation d'ITL	48
b. Infection non contrôlée par l'immunité cellulaire : situation de TM	49
2. Réponse immunitaire innée	50
a. Les cellules épithéliales	51
b. Les récepteurs de la réponse immunitaire innée intervenant dans la reconnaissance de <i>M. tuberculosis</i>	51
c. Le macrophage.....	57
d. Les cellules dendritiques	62
e. Les polynucléaires neutrophiles.....	64
f. Les cellules <i>Natural killer</i>	64
3. Réponse immunitaire adaptative	65
a. Les lymphocytes T CD4+	67
b. Les lymphocytes T CD8+	67

c. Les lymphocytes T $\gamma\delta$	68
d. Les lymphocytes Natural killer T	68
e. Les lymphocytes T régulateurs	69
f. Les lymphocytes T mémoires	69
E. Méthodes diagnostiques de l'ITL	70
1. L'intradermoréaction à la tuberculine	71
a. Principe du test.....	72
b. Interprétation	72
2. Les tests IGRAs	73
a. Le test QuantiFeron.....	74
b. Le test T-SPOT.TB®	77
3. Performances cliniques des tests de dépistage de l'ITL	80
4. Avantages et limites des différents tests de dépistage de l'ITL	83
a. L'IDR.....	83
b. Les tests IGRAs	84
Deuxième partie : Matériels et méthodes	87
A. Le laboratoire d'immunologie cellulaire du CHU de Lille : présentation générale et organisation	87
B. Périodes d'intérêts.....	90
C. Les trois phases de l'examen de biologie médicale : application aux tests IGRAs réalisés au laboratoire d'immunologie du CHU de Lille	92
D. Processus des différents tests IGRAs au laboratoire d'immunologie du CHU de Lille...93	
1. T-SPOT.TB® (Oxford Immunotec) avec extraction automatisée des CMN du sang ...93	
a. Exigences pré-analytiques.....	94
b. La plateforme ELISpot pour la réalisation en première intention des tests T-SPOT.TB® : présentation des différents automates et du système informatique.....	95
c. Matériel, réactifs et consommables.....	99
d. Réalisation du test : jour 1	101
e. Révélation du test : jour 2.....	108
f. Lecture des spots	109
g. Validation biologique du test T-SPOT.TB®	114
2. QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT®-Plus)	117
a. Matériel, réactifs et consommables	117
b. Exigences pré-analytiques.....	118
c. Réalisation du test QFT®-Plus	123
d. Validation biologique du test QFT®-Plus	125
3. T-SPOT.TB® (Oxford Immunotech) avec extraction manuelle des CMN du sang	131
a. Exigences pré-analytiques.....	132

b. Matériel et consommables.....	132
c. Réalisation et lecture du test.....	132
E. Recueil et analyse des données	136
1. Recueil des données.....	136
2. Analyse des données	136
Troisième partie : Résultats.....	137
A. Description des tests IGRAs réalisés sur la période d'intérêt du 17/02/2020 au 31/05/2020.....	137
1. Répartition globale et évolution des tests IGRAs réalisés sur la période du 17/02/2020 au 31/05/2020	138
2. Demandes de tests IGRAs provenant des services du CHU de Lille sur la période du 17/02/2020 au 31/05/2020.....	141
3. Demandes de tests IGRAs provenant des sites extérieurs au CHU de Lille sur la période du 17/02/2020 au 31/05/2020	143
B. Phase pré-analytique.....	146
1. Avant le changement de méthode : actions entreprises par le laboratoire d'immunologie cellulaire jusqu'au 17/02/2020.	148
a. Communication auprès des services prescripteurs de tests IGRAs du CHU de Lille et des sites extérieurs	149
b. Organisation logistique	151
c. Modification de l'organisation au niveau du RTE et des AE	153
2. Problématiques rencontrées au niveau de la phase pré-analytique des tests T-SPOT.TB® sur la période du 17/02/2020 au 31/05/2020.....	154
a. Origine des prélèvements concernés par une non-conformité pré-analytique.....	155
b. Causes des non conformités pré-analytiques des prélèvements T-SPOT.TB®	156
c. Prélèvements réceptionnés le vendredi après 16h, les week-end et jours fériés...	158
3. Stratégies et actions mises en œuvre par le laboratoire face à ces problématiques	159
a. Echantillon contenant une quantité de sang insuffisante (< 5 mL)	159
b. Utilisation par les services de plusieurs tubes héparine de Li 5 mL	160
c. Utilisation par les services d'un type de tube non conforme.....	162
d. Gestion des prélèvements T-SPOT.TB® réceptionnés le vendredi après-midi, le week-end et les jours fériés.....	162
C. Phase analytique.....	165
1. Installation et validation de la plateforme ELISpot au laboratoire d'immunologie cellulaire.....	166
2. Résumé des performances analytiques de la plateforme ELISpot	171
a. Préparation des échantillons par le Microlab® Nimbus & KingFisher Presto	171
b. Numération des CMN par le cytomètre en flux Guava®	172
c. Lecture des spots par le lecteur ELISpot CTL reader.....	173
d. Evaluation du processus analytique complet (incluant l'interface Excel MAPP)	175

3. Principale problématique rencontrée au niveau de la phase analytique des tests T-SPOT.TB® sur la période du 17/02/2020 au 31/05/2020.....	177
a. Description de la problématique : rendement de l'isolement des CMN par le Nimbus-Presto	177
b. Conséquences et stratégie mise en œuvre	181
D. Phase post-analytique.....	183
1. Actions entreprises en amont du passage à l'automatisation des tests T-SPOT.TB® pour la gestion du post-analytique.....	184
2. Principales problématiques rencontrées au niveau de la phase post-analytique des tests T-SPOT.TB® après le passage à l'automatisation	186
a. Erreurs de facturation des tests T-SPOT.TB®	186
b. Difficulté d'identification des patients lors de la validation sur le lecteur ELISpot CTL reader.....	187
c. Bruit de fond sur des tests T-SPOT.TB® réalisés au cours de l'été 2020 : étude de cas de la Médecine du travail du CHU de Lille	188
3. Comparaison des résultats de tests IGRAs rendus sur un mois à un an d'intervalle : aperçu d'un avant/après.....	194
4. Comparaison des résultats des tests T-SPOT.TB® avant et après le passage à l'automatisation	195
Quatrième partie : Discussion	197
1. Le choix de la plateforme ELISpot pour le dépistage de l'ITL en routine.....	197
2. Concernant l'analyse descriptive des tests IGRAs réalisés les semaines suivant le changement de méthode.....	200
3. Concernant la phase pré-analytique	202
4. Concernant la phase analytique	205
5. Concernant la phase post-analytique	209
Conclusion	215
Références bibliographiques	217
Annexes.....	233

Introduction

La tuberculose est une maladie aussi vieille que l'Homme ; dès l'Antiquité, Hippocrate réalise une première observation de la « *phthisie* », qu'il décrit comme « une infection pulmonaire se manifestant par un amaigrissement, une toux et du sang dans les crachats, et qui conduit progressivement à la mort ». Ce n'est qu'en 1882 que le médecin allemand Robert Koch parvient à isoler et identifier l'agent infectieux responsable de la tuberculose : *Mycobacterium tuberculosis*, aussi dénommé bacille de Koch (BK) en l'honneur de son découvreur. Jusqu'au début du XX^{ème} siècle, les hommes ont été relativement dépourvus de moyen efficace pour lutter contre la tuberculose, les seuls remèdes étant les cures en sanatorium (1,2). De grandes avancées ont été faites par la suite : la mise au point du vaccin BCG dans les années 1920 par Calmette et Guérin à l'Institut Pasteur de Lille, la découverte en 1943 d'une première antibiothérapie active contre *M. tuberculosis*, la streptomycine, puis le développement dans les années 1950 et 1960 des thérapeutiques antituberculeuses telles qu'elles sont encore utilisées aujourd'hui : l'isoniazide, le pyrazinamide, l'éthambutol et la rifampicine. De nos jours, loin d'être éradiquée, la tuberculose constitue une véritable problématique de santé publique, notamment avec la progression des formes pharmacorésistantes. La maladie est responsable du décès d'environ 1,5 millions de personnes chaque année et demeure la première cause de mortalité liée à un agent infectieux (3). L'infection tuberculeuse latente (ITL), quant à elle, affectait près d'un quart de la population mondiale en 2014, soit 1,7 milliard de personnes ; elle constitue un réservoir important de cas émergents dans les pays à faible incidence (4). A l'heure actuelle, être en mesure de dépister efficacement l'ITL s'avère être une nécessité ; les enjeux étant, entre autres, de garantir l'accès à un traitement préventif chez les patients présentant des facteurs de risque de progression vers une forme active et de contribuer à répondre à la stratégie mondiale de l'OMS, visant à mettre fin à la tuberculose d'ici 2035 (3,5).

Pendant près de cent ans, l'intradermoréaction à la tuberculine (IDR) a été le seul moyen disponible pour le dépistage de la tuberculose latente. Ce test, bien que peu coûteux et largement utilisé à travers le monde, présente certaines limites, notamment l'obtention de résultats faussement positifs chez les sujets préalablement vaccinés par

le BCG ou ayant été infectés par une mycobactérie non tuberculeuse atypique (5,6). Les deux dernières décennies ont vu apparaître l'émergence de tests fonctionnels basés sur la détection de la production spécifique d'interféron gamma (IFN γ) par les lymphocytes T en réponse à une stimulation par des antigènes spécifiques de *Mycobacterium tuberculosis*. Ces immunodiagnostic, nommés tests IGRAs pour *Interferon Gamma Release Assays*, sont devenus la référence pour le diagnostic de l'ITL en France (7). Ils possèdent de très bonnes performances cliniques et présentent l'avantage de ne pas être influencés par le BCG (7–9). Deux types de tests IGRAs sont actuellement disponibles sur le marché, se distinguant par la technique utilisée pour la mesure de l'IFN γ . Le test QuantiFERON (dans sa dernière version : QuantiFERON[®]-TB Gold Plus, Qiagen) utilise la technique ELISA (*Enzyme-Linked Immuno Assay*) ; le test T-SPOT.TB[®] (Oxford Immunotec) utilise l'ELISpot (*Enzyme-Linked Immunospot*). En travaillant sélectivement sur les cellules mononucléées (CMN) isolées à partir du sang périphérique, le test T-SPOT.TB[®] permet le décompte individuel de chaque cellule T productrice d'IFN γ en réponse à la stimulation antigénique. Cette technique a fait preuve d'une bonne sensibilité dans les situations d'immunodépression, telles qu'elles existent chez le sujet infecté par le VIH (virus de l'immunodéficience humaine) présentant une lymphopénie sévère (10,11), ou dans les formes de diagnostic difficile comme la tuberculose miliaire et les formes extra-pulmonaires (12,13). Néanmoins, l'ELISpot reste encore peu répandu en France et reste une technique de seconde intention pour le diagnostic de l'ITL, utilisé notamment chez le patient lymphopénique.

Depuis le 17 février 2020, l'Institut d'Immunologie du CHU de Lille a fait le choix de remplacer la technique ELISA par l'ELISpot pour le dépistage de l'ITL en première intention. Ce changement de technique a été rendu possible par l'installation au sein du laboratoire d'une plateforme complète permettant l'automatisation de l'extraction des CMN, la préparation d'échantillons contenant une concentration normalisée de cellules ainsi que l'identification et le décompte des spots lors de l'étape de révélation du test. L'institut d'Immunologie du CHU de Lille est le premier centre en France à avoir opté pour cette technologie innovante, jusqu'alors uniquement utilisé au Royaume Uni. Ce travail de thèse a pour objectif de fournir un retour d'expérience sur le passage à l'automatisation du test T-SPOT.TB[®] au laboratoire d'immunologie cellulaire, en décrivant le déroulement du changement de méthode et en analysant les difficultés rencontrées ainsi que les solutions apportées par l'ensemble de l'équipe.

Première partie

La tuberculose : aspects cliniques et physiopathologiques, méthodes diagnostiques

A. Données épidémiologiques sur la tuberculose

1. Dans le monde

La tuberculose demeure l'une des dix premières causes de mortalité à l'échelle mondiale, et constitue la première cause de décès due à un unique agent infectieux. L'Organisation mondiale de la Santé (OMS) publie chaque année depuis 1997 un rapport mondial sur cette pathologie, proposant un état des lieux actualisé de l'épidémie et évaluant les avancées de chaque pays en matière de lutte antituberculeuse. Dans son dernier rapport publié en octobre 2019 (3), l'OMS estime qu'environ un quart de la population mondiale est infectée par le bacille *Mycobacterium tuberculosis*, et de ce fait porteuse d'une ITL. Environ 10 millions de personnes ont contracté la tuberculose au cours de l'année 2018, ce qui reste stable par rapport aux années précédentes.

La maladie touche les deux sexes et n'épargne aucune tranche d'âge. Les hommes adultes (âge >15 ans) représentent la population la plus touchée, soit 57% des cas de tuberculose en 2018 (Figure 1). Les femmes représentaient quant à elles 32% des cas et les enfants, 11% (3).

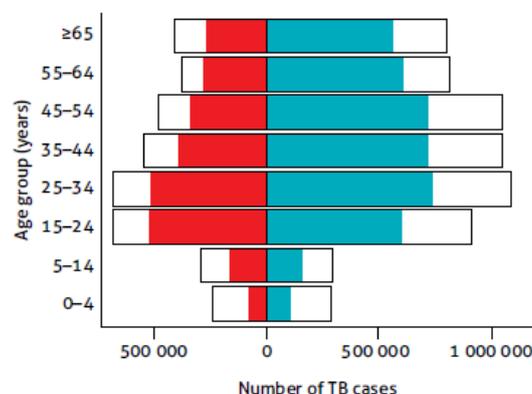


Figure 1 : Estimation de l'incidence mondiale de la tuberculose en 2018 : par tranche d'âge (rectangles noirs) et cas notifiés selon l'âge et le sexe (rouge : femmes, turquoise : hommes) (1)

La prévalence de la tuberculose est particulièrement élevée chez les personnes infectées par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), qui constituent une population à risque de développer une tuberculose évolutive (Figure 2). En 2018, 8,6% des sujets atteints de tuberculose étaient VIH-positifs. La maladie a causé sur cette même année la mort de 1,5 millions de personnes à travers le monde, dont 251 000 patients porteurs du VIH. De surcroît, la tuberculose multirésistante (tuberculose-MR) constitue un réel problème de santé publique, avec notamment 500 000 nouveaux cas de tuberculose résistante à la Rifampicine enregistrés en 2018.

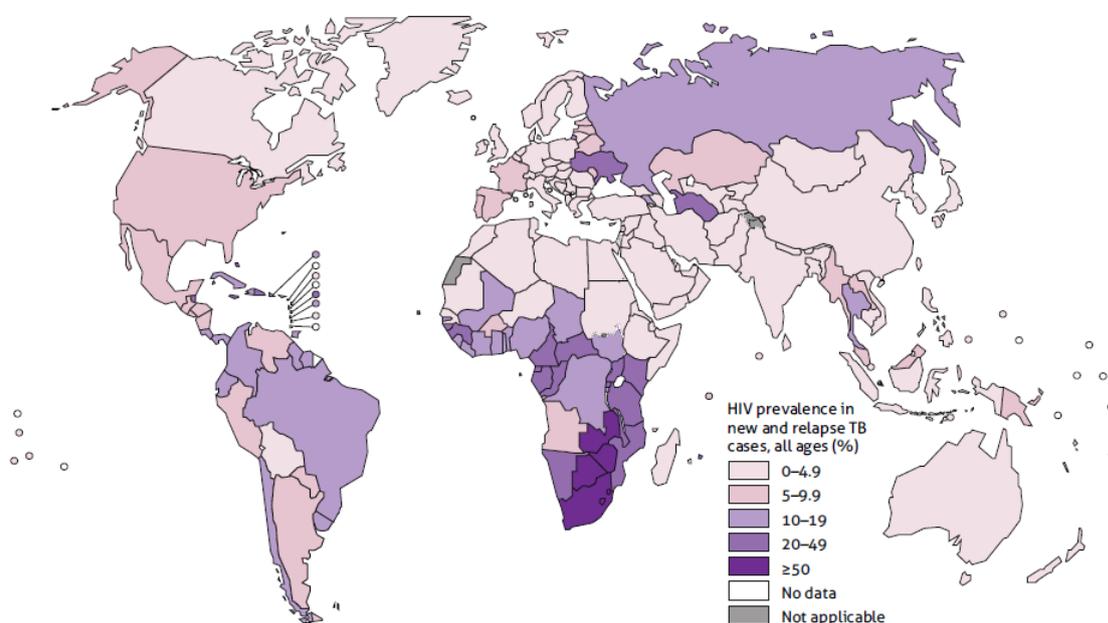


Figure 2 : Estimation de la prévalence du VIH chez les cas incidents de tuberculose en 2018 (1)

Bien que la tuberculose soit présente dans toutes les parties du globe, la majorité des cas incidents sont regroupés dans quelques zones géographiques : 44% dans la région d'Asie du Sud-Est, 24% sur le continent africain et 18% dans le Pacifique Occidental (Figure 3). L'OMS a établi la liste des 30 pays à lourde charge de tuberculose ; l'ensemble de ces pays totalisait 87% du total des nouveaux cas en 2018, et seulement huit pays représentaient les deux tiers du total mondial : l'Inde (27 %), la Chine (9 %), l'Indonésie (8 %), les Philippines (6 %), le Pakistan (6 %), le Nigéria (4 %), le Bangladesh (4 %) et l'Afrique du Sud (3 %).

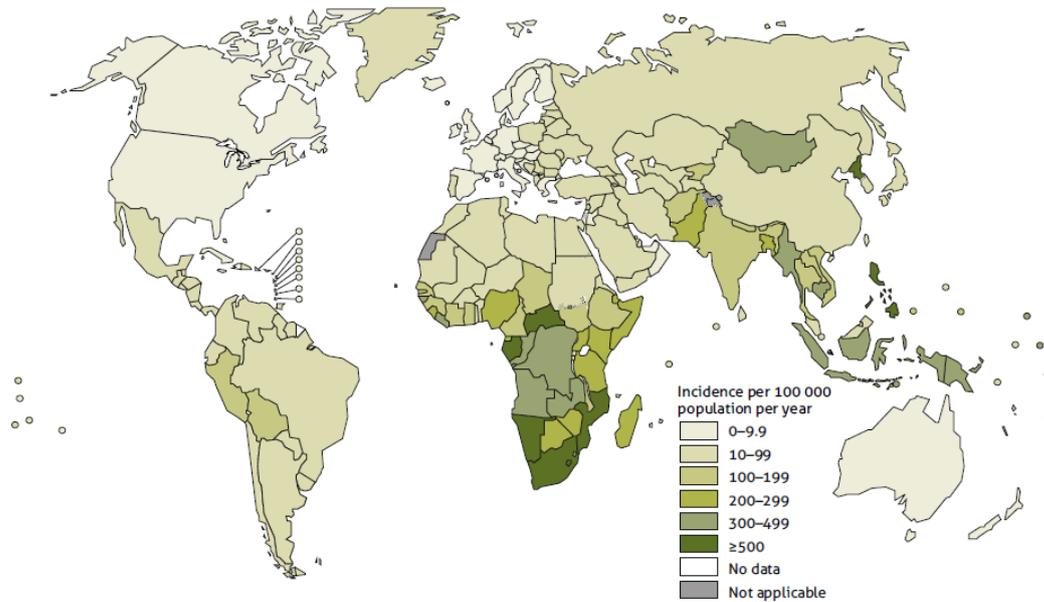


Figure 3 : Taux d'incidence de la tuberculose dans le monde en 2018 (1)

D'après l'OMS, l'incidence globale de la tuberculose dans le monde diminue d'environ 2% par an, en lien avec l'amélioration de l'hygiène et d'un meilleur accès aux traitements antituberculeux et aux services de prévention. La Stratégie de l'OMS a défini des objectifs précis visant à éradiquer l'épidémie de tuberculose d'ici 2030, avec des cibles intermédiaires en 2020 et 2025. Pour y parvenir, il faudrait que la diminution du taux d'incidence soit comprise entre 4 et 5% par an.

2. En France

Comme dans la plupart des pays occidentaux, le nombre de cas de tuberculose a nettement diminué en France au cours du dernier siècle. Cela est à attribuer à l'amélioration globale des conditions de vie et à l'essor des traitements antituberculeux depuis les années 1950, réduisant à la fois la mortalité et la transmission de la maladie.

La tuberculose maladie est soumise à la déclaration obligatoire (DO) depuis 1964 en France. Ce n'est que plus récemment que doivent être déclarées les ITL chez les enfants âgés de moins de 15 ans et les infections à *M. tuberculosis* issues de traitements (en 2003 et 2005 respectivement). Ces données issues des DO sont précieuses et, en confrontant le taux de déclarations au nombre de cas annuels, permettent de suivre l'évolution de la maladie à l'échelle nationale. D'après les études menées par Santé publique France (SPF), plus de 5 000 cas de tuberculose maladie

ont été déclarés en France en 2018, soit un taux de déclaration de 7,6 cas/100 000 habitants (14). Ces chiffres confirment la tendance en légère hausse depuis l'année 2016 (Figure 4).

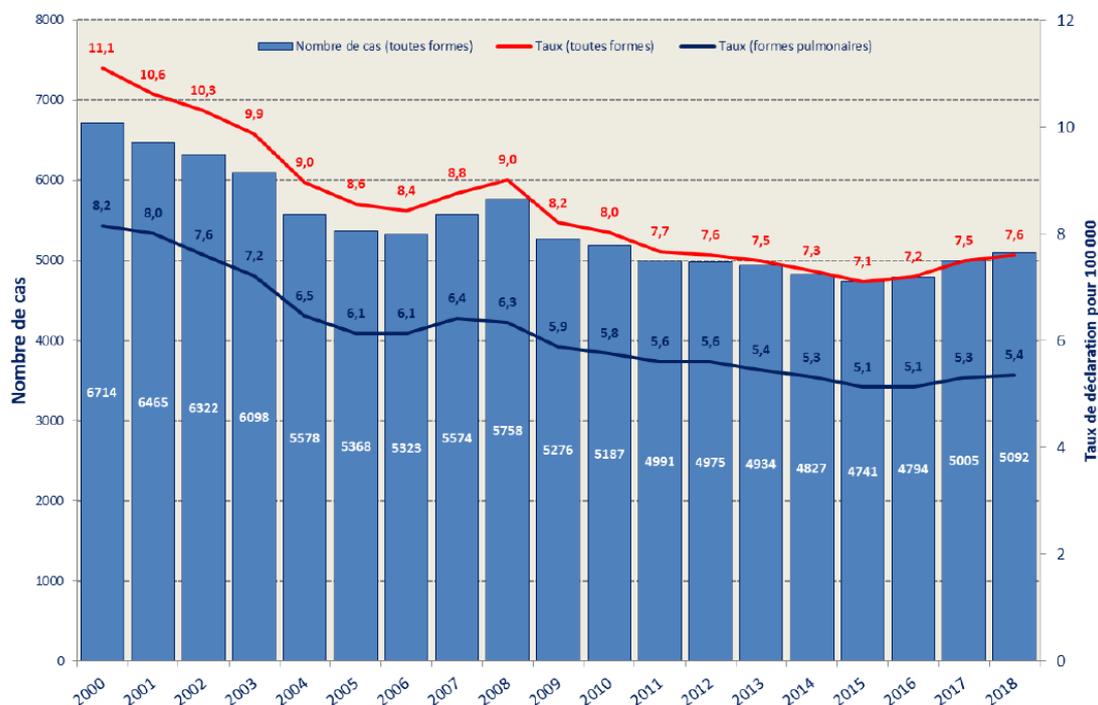
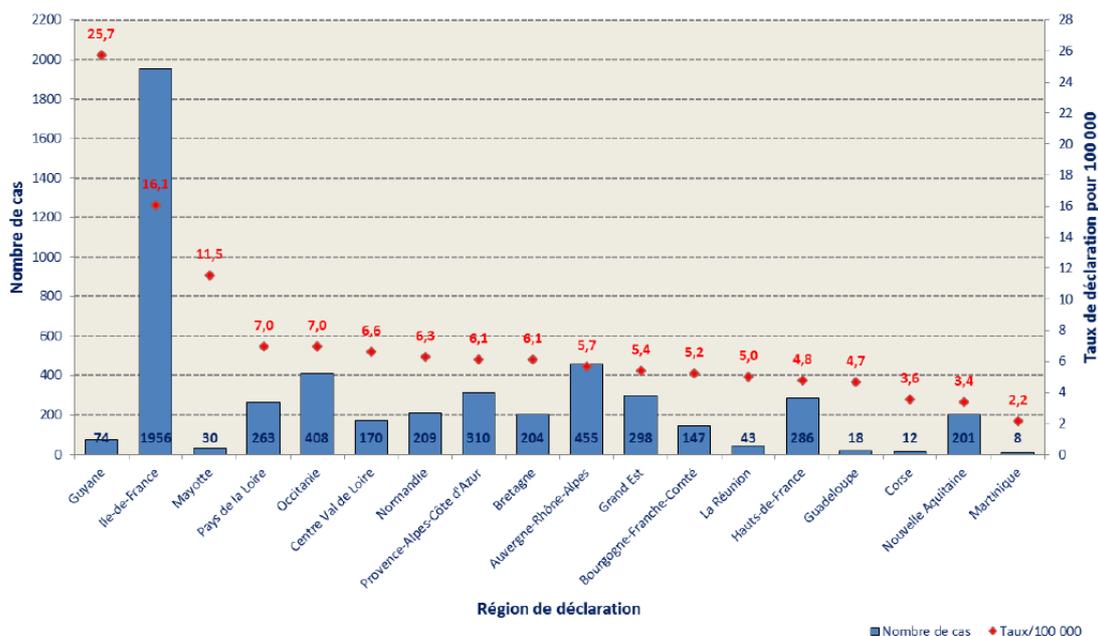


Figure 4 : Cas déclarés de tuberculose maladie, France entière, 2000-2018 (nombre de cas et taux de déclaration). Source : Santé publique France.

Il existe cependant de fortes disparités entre les régions. Les taux de déclaration étaient supérieurs au seuil de 10 nouveaux cas pour 100 000 habitants fixé par l'OMS et définissant une région de faible endémie tuberculeuse dans trois territoires : la Guyane (25,7/100 000), l'Île-de France (16,1/100 000) et Mayotte (11,5/100 000) (Figure 5).



* Région de déclaration

Figure 5 : Cas déclarés de tuberculose maladie par région, France entière, 2018 (nombre de cas et taux de déclaration). Source : Santé publique France.

Les disparités ne sont pas seulement géographiques, mais aussi sociales et économiques. Selon SPF, le taux de déclaration de la maladie était important chez les personnes sans domicile fixe (249/100 000) et chez les détenus (76/100 000) par rapport à la population générale. Le nombre de cas est également substantiel chez les migrants provenant d'une zone de forte endémie tuberculeuse, notamment en provenance d'Afrique subsaharienne (150/100 000).

Enfin, d'après les données recueillies par le Centre national de référence des mycobactéries et de la résistance des mycobactéries aux antituberculeux (CNR-MyRMA), 6.2% des cas de tuberculose confirmés en France en 2017 étaient infectés par le VIH, chiffre stable depuis ces dernières années (15).

B. *Mycobacterium tuberculosis*, l'agent de la tuberculose

1. Taxonomie et génétique de *M. tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis, aussi nommé bacille de Koch (BK), est le principal pathogène responsable de la tuberculose chez l'Homme. Il s'agit d'une mycobactérie appartenant à l'ordre des *Actinomycetales*, sous-ordre des *Corynebacterinae*, famille

des *Mycobacteriaceae* (16). La famille des *Mycobacteriaceae* contient uniquement le genre *Mycobacterium*.

On peut distinguer trois groupes au sein du genre *Mycobacterium* (Figure 6). Le complexe *M. tuberculosis* comprend les espèces suivantes : *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG (Bacille de Calmette-Guérin, souche vaccinale dérivée de *M. bovis*), *M. africanum*. Ces espèces sont des pathogènes obligatoires et peuvent être responsables de la tuberculose ou de BCGite. *Mycobacterium leprae* n'est retrouvée que chez l'homme et est responsable de la lèpre. Enfin, les mycobactéries « atypiques » sont des germes présents dans l'environnement et peuvent être la cause d'infections opportunistes chez le sujet immunodéprimé.

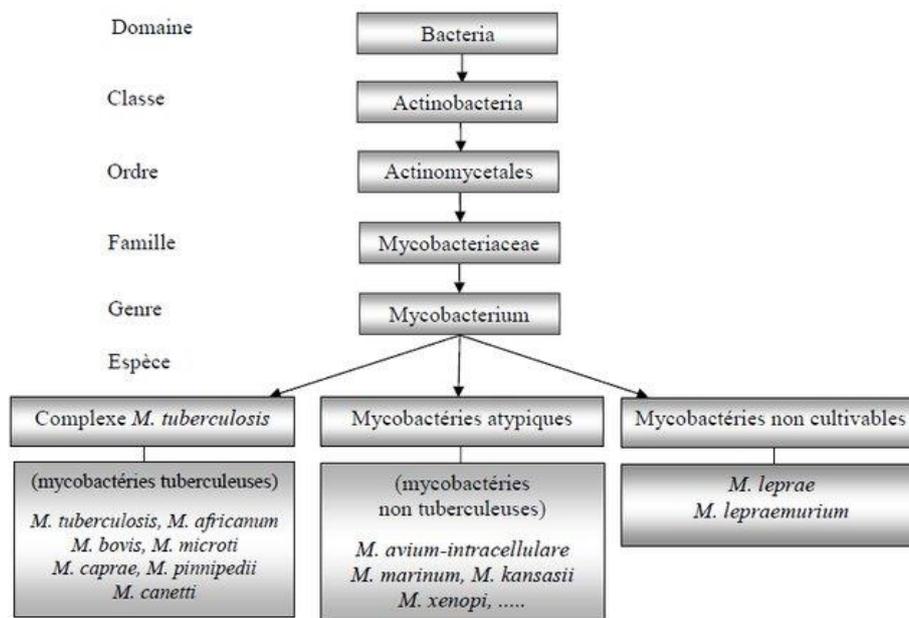


Figure 6 : Filiation taxonomique des mycobactéries. (17)

Isolée en 1905 à partir d'un poumon humain, la souche H37Rv de *M. tuberculosis* est la souche de référence mondialement utilisée dans le domaine de la recherche biomédicale. Elle est déposée à l'American Type Culture Collection sous la dénomination « *Mycobacterium tuberculosis* (Zopf) Lehmann and Neumann, TMC 102 [H37Rv], ATCC® 27294™ ». Cette souche a l'avantage de présenter une virulence complète dans les modèles animaux de tuberculose, est sensible aux médicaments et peut subir des manipulations de son génome (18).

2. Caractéristiques morphologiques des mycobactéries

Les mycobactéries sont des bacilles fins ou légèrement incurvés mesurant 1 à 10 μm de longueur et de 0.2 à 0.6 μm de diamètre, immobiles, non capsulés et ne produisant pas de spores (Figure 7). Elles sont parfois assemblées en filaments ou pseudo-mycélium. Leur mode respiratoire aérobie strict ou micro aérophile explique leur tropisme préférentiel pour le parenchyme pulmonaire.

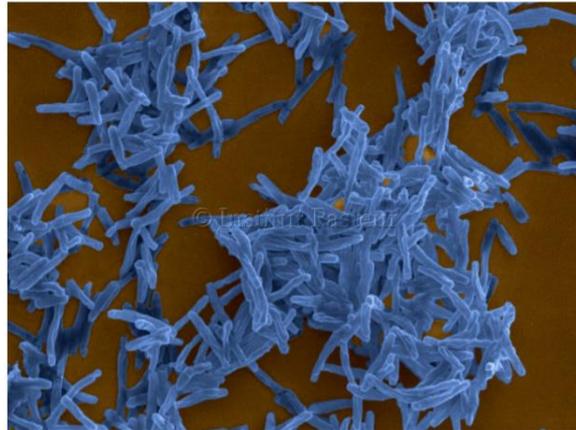


Figure 7 : *Mycobacterium tuberculosis*. Image de microscopie électronique à balayage colorisée. Institut Pasteur/S. Guadagnini et M. Jackson, 2011.

Leur membrane très riche en lipides, dont la structure sera détaillée dans le paragraphe suivant, les rend imperméables aux techniques de coloration usuelles ; cela leur vaut l'appellation de Bacilles Acido-Alcool-Résistants (BAAR). Elles sont cependant considérées comme des bactéries Gram positives, bien que très faiblement colorées par cette technique de coloration.

M. tuberculosis a la particularité d'être un bacille à croissance lente (2 à 6 semaines), et dont la culture exige des milieux spécifiques. Un des milieux de culture les plus utilisés est le milieu solide de Lowenstein-Jensen, mais le développement des mycobactéries est aussi possible en milieu liquide (Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) et en système automatisé. Leur croissance est optimale pour des températures situées entre 25°C et 45°C.

3. Structure de la membrane de *M. tuberculosis*

Une représentation schématique de la membrane cellulaire de *M. tuberculosis* a été proposée par Abdallah et *al.* dans des travaux de 2015 (Figure 8) (19). La membrane

mycobactérienne se compose essentiellement d'acides mycoliques liés entre eux de manière covalente, lui conférant un caractère hautement hydrophobe ainsi qu'une faible fluidité (20). Cette couche d'acides mycoliques, mesurant entre 8 et 10 nm d'épaisseur, est aussi dénommée « mycomembrane ». Son hydrophobicité ralentit l'entrée des nutriments, contribuant à la croissance lente des mycobactéries, mais augmentant également sa résistance à la dégradation par les enzymes lysosomales des phagocytes (20).

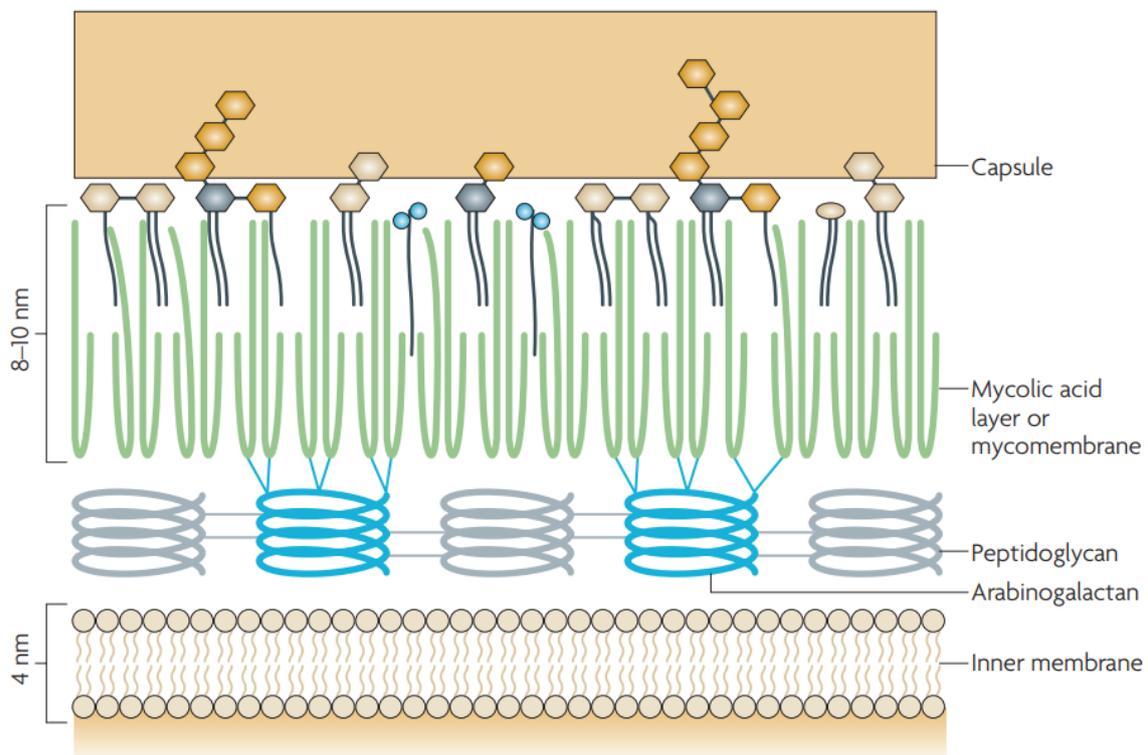


Figure 8 : Représentation schématique de la membrane cellulaire de *M. tuberculosis*. La paroi cellulaire est composée de trois structures différentes reliées entre elles par des liaisons covalentes : les acides mycoliques (en vert), le peptidoglycane (en gris) et l'arabinogalactane (en bleu). Les acides mycoliques sont responsables de son caractère très hydrophobe et peu fluide. La mycomembrane contient également divers lipides libres intercalés entre les acides mycoliques (glycolipides phénoliques, dimycocérosates de phthiocérol, mannosides de phosphatidylinositol...). La couche la plus externe de la membrane de *M. tuberculosis* est la capsule ; elle est principalement constituée de polysaccharides (glucane et arabino-mannane) (19).

La mycomembrane contient également plusieurs types de lipides libres intercalés entre les acides mycoliques ; il a été montré que certains d'entre eux, tels que les dimycocérosates de phthiocérol (DIM), ont un rôle crucial dans les interactions avec le macrophage et se révèlent être des facteurs de virulence importants de *M. tuberculosis*, notamment par potentialisation de l'activité membranolytique de la

protéine ESAT-6 (21). Les acides mycoliques sont répartis en couche épaisse principalement aux faces externes de la paroi cellulaire. La capsule bactérienne, partie la plus externe de la membrane, contient principalement des polysaccharides (glucane, mannane, arabinomannane) tandis que les couches internes de la paroi sont principalement constituées d'arabinogalactane, de mannosides de phosphatidyl-myoinositol (PIM), et de peptidoglycanes. Le Man-LAM (mannose-capped lipoarabinomannan) en particulier, un des plus abondants mannanes présents à la surface cellulaire, est un facteur de virulence important de *M. tuberculosis*. Il s'agit d'un lipoglycane hétérogène recouvert de divers motifs mannose, caractéristiques des mycobactéries pathogènes ; ils ne sont pas présents sur les souches mycobactériennes à croissance rapide nettement moins pathogènes (22).

4. Génétique : intérêt de la région de différence 1 (RD1)

Les connaissances sur la génétique des mycobactéries ont beaucoup évolué à partir des années 1990 avec le développement de nouveaux outils permettant d'en étudier le génome et les facteurs de virulence. Parmi ces innovations, on peut citer les transferts de gènes de souches virulentes à des souches de virulence atténuée par l'intermédiaire de cosmides, des techniques d'hybridation soustractive ou encore de fusion de gènes (23,24). Le génome de la souche H37Rv *M. tuberculosis* a été intégralement séquencé en 1998. Il est constitué d'un unique chromosome circulaire comprenant 4 411 529 paires de bases et contenant près de 4 000 gènes. Le génome de *M. tuberculosis* H37Rv est riche en guanine et en cytosine et code en grande partie pour des protéines (environ 91% des régions codantes), notamment pour des enzymes impliquées dans la lipogénèse et la lipolyse. Cet équipement enzymatique particulier permet au bacille d'utiliser les lipides, comme ceux composant les membranes cellulaires de l'hôte qu'il infecte, comme source d'énergie indispensable à son métabolisme. Il possède également le matériel génétique nécessaire à la synthèse des acides aminés, vitamines et cofacteurs enzymatiques et peut métaboliser divers glucides, hydrocarbures, alcools, cétones et acides carboxyliques (18).

L'analyse du génome de *M. tuberculosis* H37Rv et sa comparaison avec le génome de souches de virulence atténuée telles que *M. bovis* BCG a permis de mettre en évidence plusieurs régions génétiques impliquées dans la pathogénicité du bacille tuberculeux et dénommées régions de différence. Dans leurs travaux menés en 1999,

Behr et *al.* ont étudié et comparé la composition des génomes de *M. tuberculosis*, *M. bovis* et des différentes souches du BCG grâce à l'utilisation de puces à ADN (25). Ils ont notamment montré que plusieurs régions de différences, dont la région de différence 1 (RD1) contenues dans le génome de la souche H37Rv de *M. tuberculosis* étaient absentes du génome de *M. bovis* BCG. Plusieurs études ont par la suite permis de confirmer que la région RD1 était absente de l'ensemble des souches vaccinales de *M. bovis* BCG. Cela suggère que la délétion de RD1 pourrait constituer l'un des premiers évènements dans l'atténuation de *M. bovis* au fur et à mesure des mises en cultures successives entre 1908 et 1920, aboutissant à la souche vaccinale obtenue par Calmette et Guérin (26,27). D'autres travaux ont souligné que certaines régions présentes au sein du génome de *M. tuberculosis* et non retrouvées dans des souches virulentes de *M. bovis* seraient responsables de la spécificité de chacune des mycobactéries pour son hôte (28,29).

Le locus RD1, 9,5 kilo-bases, est donc indispensable à la virulence de *M. tuberculosis* et à sa pathogénicité chez l'Homme. RD1 comprend neuf gènes, de Rv3872 à Rv3879c (Figure 9). Il code pour le système de sécrétion spécialisé ESX-1, utilisé par *M. tuberculosis* pour le transport extracellulaire des protéines au travers de sa membrane hydrophobe et hautement imperméable. Les protéines ESAT-6 (*early secreted antigenic target of 6 kDa*) et CFP-10 (*culture filtrate protein of 10 kDa*) appartenant à ESX-1, sont également codée par le locus RD1.

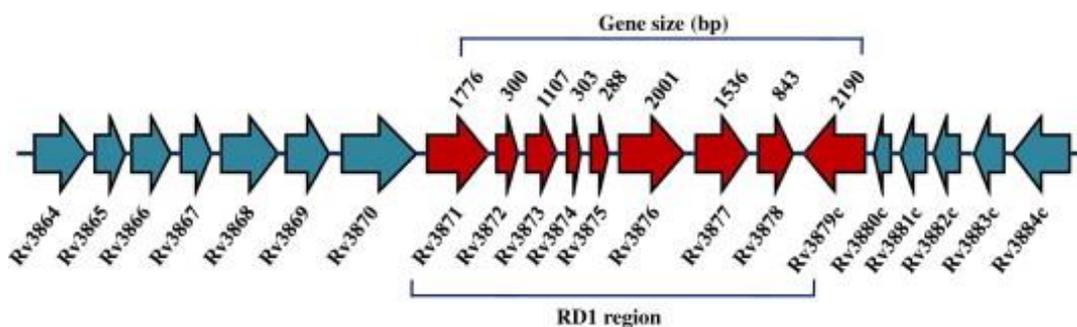


Figure 9 : Gènes constituant la région de différence 1 (RD1) de *M. tuberculosis*. Les gènes du locus RD1 sont numérotés de Rv3872 à Rv3879c. Le gène Rv3874 code pour la protéine CFP-10 et le gène adjacent Rv3875 code pour la protéine ESAT-6. Ces deux protéines appartiennent au système de sécrétion ESX-1. La région RD1 est absente des souches BCG utilisées pour la vaccination (30).

Le système de sécrétion ESX-1 est reconnu comme un facteur de virulence majeur de *M. tuberculosis*, et est indispensable dans l'export extracellulaire d'ESAT-6 et CFP-10

(19). Il a été montré que la perte de l'activité cytolytique médiée par la protéine ESAT-6 sécrétée via ESX-1 est liée à une atteinte réduite du parenchyme pulmonaire dans un modèle murin infecté par le BCG (31). De même, la délétion de la région RD1 chez *M. tuberculosis* a pour conséquence de reproduire le caractère atténué du BCG en abolissant la multiplication rapide du bacille dans le poumon et la rate chez la souris. (32). A contrario, l'intégration du locus RD1 au sein du génome de *M. microti* et de *M. bovis* BCG permet de restaurer leur virulence et leur pathogénicité (27).

5. Les protéines ESAT-6 et CFP-10

Les protéines ESAT-6 et CFP-10 sont codées par les gènes Rv3874 et Rv3875 du locus RD1. Ces deux protéines sont synthétisées et sécrétées de manière concomitante sous forme d'un complexe hétérodimérique 1 :1 de structure hélicoïdale régulière. C'est dans cette conformation qu'elles sont biologiquement actives *in vivo* (33). Comme l'illustre ci-dessous le modèle montrant le fonctionnement du système de sécrétion ESX-1 élaboré par Abdallah et *al.*, le complexe ESAT-6/CFP-10 est reconnu par l'ATPase Rv3871 au niveau de l'extrémité C-terminale de CFP-10. Rv3871 est elle-même liée à la membrane interne mycobactérienne via la protéine Rv3870. Ces interactions permettent le transfert de ESAT-6/CFP-10 à travers la membrane bactérienne grâce à la protéine canal Rv3877 et à une ou plusieurs protéines encore inconnue(s) formant un pore dans la mycomembrane (Figure 10).

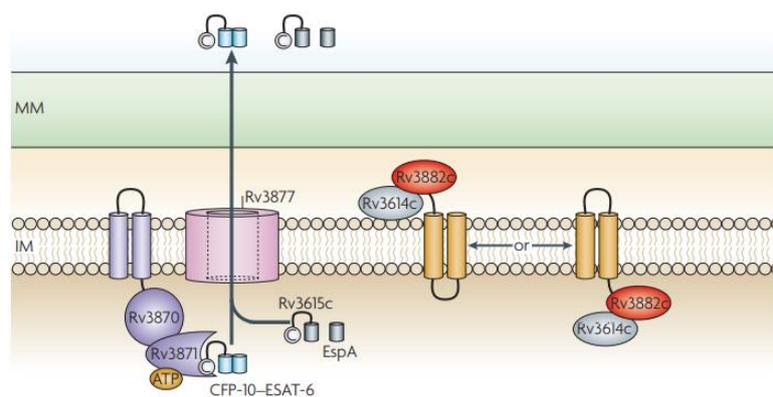


Figure 10 : Fonctionnement du système de sécrétion ESX-1. Le complexe ESAT-6/CFP-10 est reconnu par l'ATPase Rv3871, qui interagit avec la protéine Rv3870 au niveau de la membrane interne. Le complexe est ensuite transféré à travers la membrane bactérienne grâce à la protéine canal Rv3877. D'autres éléments non codés par le locus RD1, tel que le régulateur de transcription EspR, sont également requis pour le fonctionnement du complexe ESX-1 (19).

De nombreux travaux ont démontré le rôle de ces protéines dans la pathogénèse de la tuberculose, agissant comme des facteurs de virulence à différents niveaux dans les macrophages et cellules dendritiques infectés. En voici quelques exemples :

- Le complexe ESAT-6/CFP-10 altère la réponse innée de l'hôte via l'interaction d'ESAT-6 avec le récepteur TLR2 (cf. partie D), inhibant notamment la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-12 et TNF α (tumor necrosis factor α) par les macrophages infectés (34) ;
- La protéine ESAT-6 perméabilise les membranes en y formant des pores. Dans un modèle in vitro de 2003, Hsu et *al.* ont montré que la mise en contact d'une protéine ESAT-6 purifiée avec une membrane artificielle en bicouche provoquait des flux ioniques au travers de cette membrane, et aboutissait même à sa destruction (31). Ainsi, ESAT-6 participe activement à la dégradation du phagosome et à l'échappement de *M. tuberculosis* du phagosome vers le compartiment cytosolique de la cellule infectée ;
- Le complexe ESAT-6/CFP-10 exerce une action inhibitrice sur la production d'espèces réactives de l'oxygène (reactive oxygen species, ROS) par les macrophages. CFP-10, particulièrement, déphosphoryle un grand nombre de protéines macrophagiques dont celles intervenant dans la production de ROS. Cela provoque une diminution du pouvoir bactéricide des macrophages (26).

Ainsi, les protéines ESAT-6 et CFP-10, associées au complexe de sécrétion ESX-1 codé par la région RD1, permettent à *M. tuberculosis* d'inactiver les cellules phagocytaires, d'y subsister dans un état quiescent et de garantir sa survie à long terme chez l'hôte infecté.

C. Aspects cliniques et thérapeutiques de la tuberculose

1. Les différentes entités cliniques de la tuberculose

a. Modes de transmission

La transmission de la tuberculose est interhumaine directe, essentiellement par voie aérienne. Les sujets contaminants sont principalement les malades atteints de tuberculose pulmonaire (atteinte du parenchyme pulmonaire, de la plèvre, des ganglions médiastinaux) et bronchique. Les malades atteints de tuberculose touchant

la sphère oro-pharyngée, notamment le larynx, sont plus rarement contagieux (35). Lors d'un épisode de toux, d'éternuement ou d'expectoration, un sujet infecté projette de fines particules dans l'air, dénommées « gouttelettes de Flügge », et contenant un grand nombre de bacilles tuberculeux. Ces gouttelettes mesurant entre 0,5 et 3 µm de diamètre peuvent rester en suspension dans l'air pendant plusieurs heures et sont susceptibles d'être inhalées par un ou plusieurs sujets contacts (36). Chez l'Homme, on estime qu'une centaine de germes est nécessaire pour entraîner une primo infection tuberculeuse (PIT); néanmoins, le pouvoir pathogène serait déjà présent pour un faible nombre de bacilles, de l'ordre d'une dizaine (37). Cette pathogénicité est également influencée par d'autres facteurs, tels que la virulence de la mycobactérie ou la réceptivité et l'état d'immunocompétence du sujet contact. La transmission de l'infection tuberculeuse est hautement favorisée par le confinement de l'air et les conditions de promiscuité. Si le risque de transmission se majore avec la durée d'exposition aux gouttelettes de Flügge, il n'existe pas de seuil en-dessous duquel ce risque serait nul (6,36).

D'autres modes de contamination ont été rapportés dans la littérature mais demeurent exceptionnels. On peut citer parmi eux les contaminations par voie digestive ou cutanéomuqueuse (6). Deux cas de transmission de tuberculose par injection percutanée avec du matériel contaminé ont également été décrits par le Center for disease control (CDC) de la ville d'Atlanta à la fin des années 1980 (36,38).

b. Histoire naturelle de la maladie

L'histoire naturelle de la tuberculose se décompose en plusieurs étapes, illustrées et résumées par la Figure 11. Ces différents stades dans le développement de la maladie correspondent à des entités cliniques distinctes et seront détaillés successivement dans les paragraphes suivants.

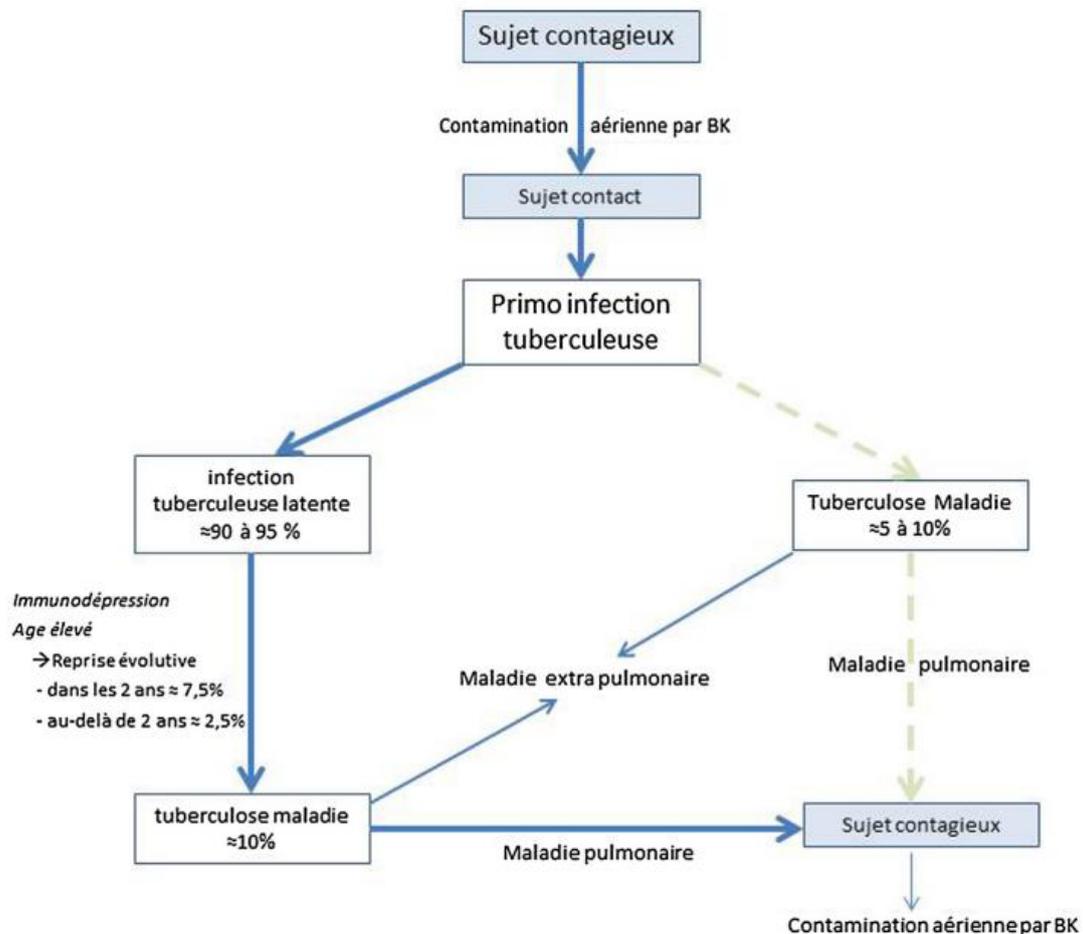


Figure 11 : Histoire naturelle de la tuberculose. De Laroche et al. 2020 (28).

b.1. La primo-infection tuberculeuse

La primo-infection tuberculeuse (PIT) débute avec la contamination d'un sujet sain par des aérosols de fines gouttelettes en suspension dans l'air dans lesquelles sont véhiculés les bacilles ; s'en suit la période d'incubation, pour une durée allant de 1 à 3 mois. Si, dans la grande majorité des cas, la PIT est asymptomatique, elle peut aussi se manifester par une discrète altération de l'état général avec une asthénie et une hyperthermie modérée. Peuvent également être retrouvés une toux, un érythème noueux, une kératoconjonctivite phlycténulaire ou encore un épanchement pleural (35). Les complications sont rares à ce stade et sont essentiellement marquées par des troubles ventilatoires et/ou des bronchectasies. Les explorations paracliniques sont marquées par un virage des réactions tuberculiques cutanées ou une positivité d'un test IGRA. Des anomalies biologiques non spécifiques peuvent être présentes,

reflétant un syndrome inflammatoire (élévation de la protéine C-réactive (*C-reactive protein*, CRP), discrète leucocytose). La radiographie thoracique peut également retrouver des anomalies au stade de PIT, comme des adénopathies hilaires unilatérales associées à un chancre d'inoculation au niveau du parenchyme pulmonaire (lésion constituant ultérieurement la « cicatrice radiologique », d'aspect calcifié, témoignant d'une PIT ancienne) (6). L'évolution est spontanément favorable dans la grande majorité des cas chez les patients non immunodéprimés et aboutit à l'infection tuberculeuse latente (ITL). Dans 5 à 10% des cas, les réponses immunitaires de l'hôte sont insuffisantes pour contenir l'infection ; le bacille va proliférer et la PIT évoluera d'emblée vers une tuberculose maladie (TM). C'est notamment le cas aux âges extrêmes de la vie (enfants de moins de cinq ans et sujets âgés de plus de 75 ans) et/ou immunodéprimés.

b.2. L'infection tuberculeuse latente

L'ITL peut se définir comme la persistance de *M. tuberculosis* à l'état quiescent chez un sujet ayant contracté une PIT. Il s'agit d'un portage chronique et asymptomatique du bacille, sans signe radiologique. Les bacilles vivants demeurent dans un état de dormance au sein des granulomes. On peut ainsi considérer l'ITL comme un état dynamique au cours duquel le pathogène et le système immunitaire de l'hôte sont en interaction permanente et se modulent réciproquement, dans un équilibre instable. Des examens directs qui seraient réalisés sur des prélèvements issus de sujets avec une ITL reviendraient négatifs. L'ITL n'est pas une forme contaminante de tuberculose.

Le diagnostic de l'ITL est immunologique, ou indirect. Il repose sur la mise en évidence d'une réponse immunitaire plus ou moins spécifique contre le bacille tuberculeux en fonction du test diagnostique utilisé : l'intradermoréaction à la tuberculine (IDR) ou les tests IGRAs (cf. Partie E).

Près de 10% des sujets ayant une ITL développeront une tuberculose maladie (TM). Celle-ci peut survenir dans les mois ou dans les années après la contamination. Une étude publiée en 2011 par Borgdorff et *al.* et portant sur 1095 cas secondaires de TM a montré que le risque de développer une TM est le plus élevé dans les deux années suivant la contamination, avec 62% des cas déclarés (39).

La probabilité qu'une ITL progresse vers une TM active dépend de plusieurs facteurs, liés au bacille, à l'hôte et à son environnement. La charge bactérienne initiale, pouvant être corrélée à la gravité de la maladie chez un cas index et à la proximité du contact, est directement associée au risque de développement de la maladie. La TM se développe aussi davantage chez les nourrissons et les jeunes enfants avec une ITL (40). D'autres facteurs de risque d'évolution d'une ITL vers une TM ont été rapportés dans la littérature ; on peut citer la déficience de l'immunité cellulaire suite à une infection à VIH (41), les traitements par anti-TNF α (42) et par glucocorticoïdes (43), la greffe d'organe (44) ou de cellules souches hématopoïétiques (45), l'insuffisance rénale terminale (46) ou encore la silicose et l'exposition à la poussière de silice (47). La consommation chronique de toxiques tels que le tabac et l'alcool est également associée à un surrisque de passage à une TM (48).

Le dépistage de l'ITL est crucial pour les populations présentant ces facteurs de risque, tant à visée individuelle (indication à un traitement antituberculeux préventif) qu'à visée épidémiologique (génération de données nationales pour la surveillance de l'ITL et la lutte contre la tuberculose).

b.3. La tuberculose maladie : forme pulmonaire

La TM dans sa forme pulmonaire constitue la forme d'infection tuberculeuse la plus fréquente. Elle résulte de la dissémination des bacilles par voie bronchique à partir du foyer de primo-infection. Le diagnostic est généralement évoqué devant un faisceau d'arguments : contexte épidémiologique, signes cliniques respiratoires et/ou extra-respiratoires, et la présence de lésions radiologiques évocatrices.

La tuberculose pulmonaire se manifeste classiquement par des symptômes d'installation progressive sur plusieurs semaines, persistants, alliant altération de l'état général et atteinte respiratoire. La chronicité et l'absence de spécificité de la symptomatologie occasionne bien souvent un retard diagnostic, exposant de ce fait l'entourage du malade à un risque accru de contamination (6,49). Les signes généraux comprennent une fièvre d'intensité modérée et à prédominance nocturne, parfois fluctuante et accompagnée de frissons ; les sueurs nocturnes sont classiques et marquent les formes évoluées de tuberculose pulmonaire. Des signes d'altération de l'état général moins spécifiques tels qu'un amaigrissement, une asthénie ou des malaises récurrents sont également souvent présents. Les signes pulmonaires sont

principalement marqués par la toux. Celle-ci peut être absente ou discrète dans la phase initiale de la maladie, à prédominance matinale, puis s'intensifie progressivement. Les hémoptysies sont moins fréquentes ; elles révélaient 10 à 15% des cas de tuberculose au début des années 2000, d'après les travaux de May et *al.* (49). Les expectorations de sang alertent toutefois davantage le malade et son médecin. Une dyspnée et une douleur thoracique peuvent être observées dans les formes très étendues, et sont souvent rattachées à une atteinte pleurale.

Le diagnostic de certitude de la tuberculose pulmonaire repose sur recherche des bacilles tuberculeux dans les expectorations du malade. L'examen direct utilise classiquement la coloration de Ziehl-Nielsen pour la mise en évidence des BAAR. S'en suit une mise en culture en milieu solide (Loewenstein-Jensen), nécessitant une incubation prolongée de 3 à 4 semaines, ou en milieu liquide, permettant une détection du germe plus précoce (de l'ordre d'une semaine) et automatisée. La détection directe du génome de *M. tuberculosis* en PCR (*polymerase chain reaction*) est moins sensible que la culture, mais a l'avantage d'être très spécifique ; son intérêt est de pouvoir facilement différencier le BK d'une autre mycobactérie, ou d'exclure le diagnostic en cas de négativité (35).

La radiographie thoracique reste l'un des examens incontournable dans la démarche diagnostique autour d'un cas de tuberculose pulmonaire. En effet, la sémiologie radiologique de cette pathologie est riche et des anomalies peuvent être visibles avant l'apparition de signes cliniques évocateurs. Les régions pulmonaires préférentiellement atteintes sont les lobes les mieux ventilés : les sommets et les segments postérieurs des lobes apicaux (35). Les lésions radiologiques les plus typiques regroupent les opacités nodulaires pouvant être confluentes, les infiltrats et les cavernes (Figure 12).



Figure 12 : Radiographie thoracique d'un patient atteint de tuberculose maladie dans sa forme pulmonaire. Présence de lésions nodulaires confluentes et de deux cavernes au niveau du lobe supérieur gauche. Toujani et *al.* 2015 (6)

Une étude menée en Californie entre 1984 et 1985 par Barnes et *al.* visait à évaluer l'utilité de la radiographie thoracique systématique lors de l'admission des patients aux urgences, notamment pour la détection de la tuberculose pulmonaire et la relation entre les lésions radiographiques et la probabilité de retrouver des bacilles tuberculeux à l'examen bactériologique des crachats (ECBC). Parmi 58 patients dont la plainte principale n'évoquait pas en premier lieu une tuberculose, la radiographie thoracique montrait des lésions évocatrices de la pathologie pour 52 d'entre eux. L'ECBC des patients dont les radiographies révélaient une cavitation ou un infiltrat alvéolaire étendu montrait des BAAR dans 98% des cas (50).

Le bilan biologique montre fréquemment une élévation de la CRP à laquelle peuvent être associées une hyperleucocytose ou une anémie normocytaire pour les formes évoluées de la maladie. Plus rarement, un syndrome de sécrétion inappropriée d'hormone antidiurétique (SIADH) peut être responsable d'hyponatrémie (51). Dans les pays à forte prévalence d'infection par le VIH, une sérologie VIH est recommandée dans le bilan de la tuberculose afin de détecter les cas de co-infections (3).

b.4. Les formes extra-pulmonaires

La tuberculose extra-pulmonaire (TEP) connaît un regain d'intérêt depuis plusieurs années, du fait d'une augmentation de sa fréquence relative dans plusieurs régions du globe (52). Il s'agit d'un groupe de pathologies variées de diagnostic difficile, les prélèvements étant majoritairement paucibacillaires et leur réalisation souvent complexe. Les formes les plus fréquentes sont les suivantes :

- La tuberculose ganglionnaire : elle représente environ la moitié des formes de TEP. Les ganglions cervicaux sont les plus touchés, suivis des ganglions médiastinaux, axillaires, inguinaux, épitrochléens et mésentériques (52). Dans un premier temps indolores et fermes, les adénopathies se ramollissent au fil des semaines et peuvent parfois fistuliser à la peau. Elles peuvent être uniques ou multiples et/ou confluentes. Chez le sujet infecté par le VIH, le tableau est volontiers sévère avec des signes généraux prononcés et une atteinte ganglionnaire profonde et disséminée (53). La tomodensitométrie est une aide précieuse pour le diagnostic des adénopathies profondes. Le diagnostic de certitude est réalisé par la mise en évidence du BK à l'examen direct d'un produit d'aspiration ou d'une biopsie d'exérèse ganglionnaire. En cas d'examen direct négatif, une PCR permet d'obtenir un diagnostic avant le résultat de la mise en culture des bacilles.
- La tuberculose pleurale : elle peut se déclarer dans les suites d'une PIT ou à l'occasion d'une réactivation ; elle est alors souvent satellite d'une atteinte pulmonaire. Cette forme de TEP découle de la rupture d'une caverne ou d'une adénopathie dans la cavité pleurale, ou d'une dissémination par voie hématogène (52). Le tableau clinique est volontiers bruyant, associant toux, fièvre et douleur latérothoracique. L'épanchement est souvent unilatéral et isolé sur la radiographie thoracique. La présence d'adénosine-désaminase (ADA) à taux élevé (> 40 UI/L) dans le liquide pleural est un argument fort en faveur du diagnostic de tuberculose pleurale (54). Le dosage de l'IFN γ dans le liquide pleural a également de bonnes performances diagnostiques (87% de sensibilité et 97% de spécificité d'après une méta-analyse de 2007 (13)), mais demeure moins utilisé du fait de son coût et de l'absence de valeur seuil standard.

- Tuberculose ostéoarticulaire : elle représente jusqu'à 15% des formes de TEP. Elle résulte le plus souvent d'une dissémination des bacilles par voie hématogène. L'atteinte des zones osseuses sous-chondrales précède l'invasion de la poche synoviale et l'atteinte articulaire. Une extension vers les tissus environnants avec la formation d'abcès en leur sein est fréquemment observée (52). Le rachis est la localisation la plus courante, avec une atteinte préférentielle des vertèbres thoraciques basses et lombaires hautes (Figure 13).



Figure 13 : Déformation rachidienne consécutive à une tuberculose touchant la région thoraco-lombaire chez un patient atteint de tuberculose ostéoarticulaire (à gauche). Image de l'IRM montrant l'atteinte des vertèbres thoraciques basses (T10 à T12). Garg et Somvanshi, 2011 (55)

Les douleurs lombaires sont d'abord mécaniques puis deviennent progressivement inflammatoires. Les signes généraux sont inconstants. Un syndrome de compression médullaire est présent 25 à 75% des cas (55). Les ostéo-arthrites sont typiquement mono-articulaires et concernent les grosses articulations telles que la hanche ou les genoux.

- La tuberculose uro-génitale : la maladie se déclare chez l'adulte, généralement de nombreuses années après la PIT et est deux fois plus fréquente chez le sujet de sexe masculin. Après sa dissémination par voie hématogène, le bacille tuberculeux infecte l'un des deux reins puis se propage progressivement dans l'arbre urinaire. Contrairement à ce qu'on observe chez la femme, les organes génitaux sont souvent simultanément atteints chez l'homme du fait de l'étroitesse de leurs rapports anatomiques avec les organes urinaires (52,56).

Outre les signes fonctionnels urinaires non spécifiques, elle peut être responsable d'un tableau d'orchite-épididymite chronique chez l'homme et de salpingite ou d'endométrite chez la femme. La tuberculose uro-génitale peut également constituer une cause d'infertilité (52).

- La tuberculose abdominale : elle représente environ 10 % des TEP et concerne principalement le péritoine et le tractus gastro-intestinal. L'atteinte d'autres organes intra-abdominaux s'observe davantage en association à une tuberculose miliaire (57). L'atteinte péritonéale est la plus courante et se manifeste classiquement comme un épanchement d'ascite avec fièvre et altération de l'état général. Comme pour les formes pleurales, le dosage de l'ADA dans le liquide d'ascite montre de très bonnes performances diagnostiques (58).

Les autres formes de TEP sont plus rares ; parmi elles, la péricardite tuberculeuse ainsi que les formes touchant le système nerveux central telles que la méningite tuberculeuse sont particulièrement graves. Dans une étude menée en Turquie sur 12 centres hospitaliers entre 1985 et 1997, Hosoglu et *al.* rapportent près d'un quart de décès sur une population de 434 patients âgés entre 13 et 83 ans et hospitalisés pour méningite tuberculeuse (n=101 soit 23.3%). A 6 mois, des séquelles neurologiques persistaient chez 27% des survivants (n=67) (59). La mise en route sans délai du traitement antituberculeux associé à une corticothérapie permet d'améliorer le pronostic vital et le risque de séquelles neurologiques.

b.5. La tuberculose miliaire

La tuberculose miliaire est une forme grave d'infection tuberculeuse, causée par la dissémination du bacille par voie lymphatique ou hématogène. Elle touche principalement les âges extrêmes de la vie et les personnes en situation d'immunodépression, au décours d'une PIT ou d'une TM (6). Si la clinique est non spécifique (altération de l'état général d'installation aiguë ou chronique), la radiographie thoracique revêt un aspect typique en montrant de nombreux nodules de répartition homogène et diffuse au sein du parenchyme pulmonaire (aspect dit « en grain de mil ») (Figure 14).



Figure 14 : Miliaire tuberculeuse sur une radiographie thoracique de face. Toujani et al. 2015 (6)

Le diagnostic bactériologique est difficile, la recherche de BAAR à l'examen direct n'étant fructueuse que dans un tiers des cas et les cultures positives pour 50 à 80% des malades (6). Des formes extrapulmonaires associées doivent être systématiquement recherchées et confortent le diagnostic lorsqu'elles sont retrouvées. La miliaire tuberculeuse est urgence thérapeutique, et le traitement antituberculeux doit être démarré sans retard en tenant compte des signes cliniques, des examens paracliniques et du contexte épidémiologique.

b.6. La tuberculose du patient présentant une co-infection au VIH

Les manifestations cliniques d'une infection tuberculeuse chez le sujet atteint par le VIH sont variées, et sont corrélées au taux de lymphocytes T CD4+. Lorsqu'il existe une lymphopénie T CD4+ sévère $< 200/\text{mm}^3$, les formes extrapulmonaires sont plus fréquentes, notamment l'atteinte ganglionnaire. Les formes pulmonaires sont caractérisées par une atteinte préférentielle des lobes moyens et inférieurs, et les excavations sont plus rares (6). Pour des lymphopénies profondes avec des lymphocytes T CD4+ $< 50/\text{mm}^3$, la tuberculose est volontiers extensive, généralisée et sans nécrose caséuse (60). Les formes cliniques sont plus classiques lorsque le taux de lymphocyte T CD4+ est plus élevé ($> 300/\text{mm}^3$).

2. Prise en charge de l'ITL en France

Le dépistage et le traitement de l'ITL constituent actuellement des enjeux cruciaux de santé publique. On sait que le traitement des patients ayant un immunodiagnostic positif permet de réduire l'incidence de la tuberculose de 50 à 75% par rapport à l'administration d'un placebo ou à l'absence de traitement (4,61) ; néanmoins, l'observance est souvent mise à mal chez les patients asymptomatiques, en lien avec la durée prolongée et la fréquence des effets indésirables des thérapeutiques antituberculeuses. Le bénéfice individuel du traitement est le plus important chez les sujets présentant des facteurs de risque d'évolution vers une TM, les sujets contacts récemment infectés et les sujets jeunes présentant moins de risques de toxicité du traitement. A l'échelle de la population française, le traitement de l'ITL semble être une mesure efficace pour diminuer l'incidence de la tuberculose pulmonaire par rapport au BCG ou au traitement des formes de TM (4).

En mai 2019, le Haut Conseil de la Santé Publique (HCSP) a émis un rapport détaillant les modalités de détection, de prise en charge et de surveillance de l'ITL en France (4). Des recommandations pour le dépistage et le traitement de l'ITL y sont formulées, et certains points revus par rapports aux anciennes recommandations de 2011 et 2013.

a. Indications du dépistage de l'ITL et population cibles

Concernant les populations cibles du dépistage de l'ITL, le rapport de 2019 de l'HCSP précise notamment :

- **Enfants et adolescents** : les jeunes de moins de 18 ans ayant été en contact étroit et prolongé ou répété avec un sujet contact justifient d'un dépistage de l'ITL (tranche d'âge élargie de 15 à 18 ans par rapport aux anciennes recommandations). Un contact occasionnel est suffisant pour les enfants de moins de 5 ans ou immunodéprimés quel que soit leur âge. La possibilité de remplacer la réalisation de l>IDR par un test IGRA chez les moins de 5 ans exposés à un cas de TM de forme pulmonaire y est ajoutée dans la version de 2019.
- **Personnes migrantes** : le dépistage de l'ITL chez les jeunes migrants provenant de pays avec une incidence importante de tuberculose (> 40/100000) dans les 5 ans suivant l'arrivée en France est maintenu, en élargissant la

tranche d'âge de 15 à 18 ans. Les migrants de 18 à 40 ans provenant d'un pays avec forte incidence de tuberculose (> 100/100000) et vivant en France depuis moins de 5 ans sont toujours concernés par le dépistage s'ils vivent avec un enfant de moins de 18 ans, travaillent en présence de jeunes enfants, travaillent dans une unité de soins ou présentent un état d'immunodépression.

- **Professionnels de santé** : les soignants et étudiants dans le domaine de la santé doivent bénéficier d'un dépistage de l'ITL à l'embauche ou lors de l'affectation dans un nouvel établissement. Il doit avoir lieu le plus tôt possible pour les agents provenant d'un pays à forte endémie de tuberculose. Pour les personnels en cours d'activité, le dépistage de l'ITL est indiqué selon l'avis du médecin du travail en fonction des données de l'interrogatoire, de l'examen clinique et du niveau de risque de contamination du service de soin. Les tests IGRAs sont à privilégier chez les personnes vaccinées par le BCG.
- **Personnes vivant avec le VIH (PVIH)** : le dépistage de l'ITL est recommandé avant l'instauration du traitement antirétroviral, quel que soit le taux de lymphocytes T CD4+. Le rapport de 2019 précise que la réalisation d'un test IGRA est à privilégier dans ce contexte. La conduite à tenir pour la prise en charge de du patient en fonction du résultat du test est résumé dans le Tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1 : Conduite à tenir suite à la réalisation d'un test IGRA dans le cadre du dépistage de l'ITL au diagnostic de l'infection à VIH. Tableau issu rapport du Haut Conseil de la Santé Publique sur l'infection tuberculose latente (4).

Nombre de CD4/mm ³	Test IGRA	Interprétation et CAT
> 150/mm ³	- test positif - test négatif	- infection tuberculeuse affirmée. Eliminer une TM. Traiter une ITL - infection tuberculeuse écartée. Pas de traitement
50-150/mm ³	- test positif - test négatif ou indéterminé	- infection tuberculeuse affirmée. Eliminer une TM. Traiter une ITL - faire un autre IGRA en changeant de test. Si 2 tests IGRA négatifs ou indéterminés, pas de traitement d'ITL et surveillance clinique après mise en route du traitement ARV
< 50/mm ³	Ne pas faire de test IGRA	Analyse de la situation au cas par cas, en fonction de l'origine géographique, des facteurs d'exposition et des manifestations cliniques

- **Avant l'instauration d'un traitement immunosuppresseur** : l'indication d'un dépistage de l'ITL systématique avant la mise sous traitement anti-TNF α , préférentiellement par un test IGRA, est maintenue par rapports aux

recommandations précédentes. Il est ajouté qu'un avis spécialisé est requis pour le choix des modalités thérapeutiques.

- **Avant transplantation d'organe** : la réalisation d'un dépistage de l'ITL au cours du bilan pré-greffe, par un test IGRA ou une IDR, est maintenue par rapport aux recommandations précédentes. Il est ajouté qu'un avis spécialisé est requis pour le choix des modalités thérapeutiques.
- **Sujet présentant une insuffisance rénale chronique sévère et sujet dialysé** : l'indication d'un dépistage de l'ITL systématique par un test IGRA est maintenue par rapport aux recommandations précédentes. Il est ajouté qu'un avis spécialisé est requis pour le choix des modalités thérapeutiques.
- **Personnes vulnérables (usagers de drogues, incarcérées, sans domicile fixe)** : il n'existait pas de recommandations spécifiques pour cette population avant 2019. Le rapport du HCSP préconise de ne pas procéder à un dépistage systématique de l'ITL pour ces personnes. Il doit être envisagé au cas par cas, en fonction des facteurs de risques individuels associés et peut se faire par test IGRA ou IDR.
- **Voyageurs et expatriés** : il n'existait pas de recommandations spécifiques pour cette population avant 2019. Le rapport du HCSP préconise de ne pas dépister l'ITL chez les voyageurs effectuant des séjours de moins de 3 mois dans les zones de fortes endémie de tuberculose. Pour les adultes et enfants expatriés dans ces zones (séjour > 6 mois), le dépistage de l'ITL doit être envisagé au cas par cas au retour. La réalisation d'un test IGRA est recommandée, et doit être effectuée dans les 8 semaines après le retour.

b. Modalités thérapeutiques de l'ITL

Concernant les modalités du traitement antituberculeux préventif dans le cadre de l'ITL, le rapport de 2019 de l'HCSP émet les recommandations suivantes :

- **Le traitement de première intention de l'ITL chez l'adulte et l'enfant repose sur l'association de deux molécules antituberculeuses : l'isoniazide (INH) et la rifampicine, pour une durée de 3 mois.** Les alternatives possibles sont la monothérapie par isoniazide pendant 6 mois ou la monothérapie par rifampicine pendant 4 mois (indiquée en cas de bacilles résistants à l'INH), en

accord avec les recommandations émises par l’OMS pour les pays à faible incidence de la tuberculose.

- Lorsque l’on dispose de l’antibiogramme de la souche du contaminateur supposé, la sensibilité de la souche est prise en compte à l’initiation du traitement (35). Le contexte clinique du patient (pathologie hépatique, immunodépression) et les interactions médicamenteuses potentielles avec son traitement habituel doivent également être considérées.
- Le traitement antituberculeux préventif n’est pas exempt d’effets indésirables. L’isoniazide est une molécule hépatotoxique (douleurs abdominales, vomissements, ictère cutanéomuqueux, élévation des transaminases) et neurotoxique (neuropathie périphérique). La rifampicine, quant à elle, est un puissant inducteur enzymatique et peut interférer avec les autres traitements du patient (62). Une information éclairée doit être délivrée au patient quant à la conduite à tenir en cas de survenue de ces effets indésirables.
- Un suivi clinique régulier est préconisé pendant toute la durée du traitement, permettant de détecter les éventuels effets indésirables et de s’assurer de la bonne observance du traitement préventif.
- Cas d’un sujet contact d’une tuberculose pharmaco-résistante : il peut s’agir de la tuberculose multirésistante (tuberculose MDR, possédant une résistance simultanée à l’INH et à la rifampicine) ou de la tuberculose ultrarésistante (tuberculose XDR, possédant une résistance simultanée à l’INH et à la rifampicine ainsi qu’aux fluoroquinolones et au moins à un aminoside injectable parmi la capréomycine, la kanamycine ou l’amikacine). Dans ce cas, le choix du traitement antituberculeux relève d’un avis d’expert et le suivi clinique devra être poursuivi au-delà de 2 ans.

Avant de débiter une thérapeutique dans le cadre d’une ITL, il est nécessaire d’éliminer au préalable le diagnostic de TM par la recherche de signes cliniques évocateurs et par la réalisation d’un bilan paraclinique complet. Ce dernier doit comporter une recherche du BK sur un prélèvement respiratoire et un bilan radiologique.

3. Prévenir l'infection à *M. tuberculosis* : la vaccination par le BCG

Le BCG est l'un des premiers vaccins vivants atténués utilisé par l'homme, et demeure le vaccin le plus couramment utilisé à travers le monde depuis les années 1920 avec environ 120 millions de doses administrées chaque année (63). Il s'agit d'une souche vivante de *Mycobacterium bovis* dont la virulence a été atténuée par les mises en culture successives (cf. Partie B). L'efficacité du BCG pour la prévention de la TM a été évaluée par de nombreux travaux; elle a été prouvée chez l'enfant pour la prévention des formes graves telles que la méningite tuberculeuse et la tuberculose miliaire, avec une réduction du risque variant entre 75-85% (64,65). En outre, chez l'enfant, le BCG pourrait jouer un rôle protecteur contre l'ITL (66). Le vaccin est moins efficace lorsqu'il est administré à l'âge adulte ; des méta-analyses réalisées dans les années 1990-2000 retrouvent une réduction de 50% du risque de TM chez l'adulte après vaccination (67,68).

En France, la vaccination par le BCG n'est plus obligatoire pour les enfants et adolescents depuis 2007 (69). Néanmoins, le calendrier des vaccinations et recommandations vaccinales 2020 publié par le Ministère des Solidarités et de la Santé rappelle que « la vaccination par le BCG est fortement recommandée pour les enfants exposés à un risque élevé de tuberculose dans leur entourage et leur environnement » (70). Les enfants considérés à risque élevé sont les suivants (70) :

- Enfant né dans un pays de forte endémie tuberculeuse ;
- Enfant dont au moins l'un des parents est originaire de l'un de ces pays ;
- Enfant devant séjourner au moins un mois d'affilée dans l'un de ces pays ;
- Enfant ayant un antécédent familial de tuberculose (collatéraux ou ascendants directs) ;
- Enfant résidant en Île-de-France, en Guyane ou à Mayotte ;
- Enfant dans toute situation jugée par le médecin à risque d'exposition au bacille tuberculeux (logement précaire ou surpeuplé, contexte socio-économique précaire, contacts réguliers avec des adultes originaires d'un pays de forte endémie).

La vaccination est alors recommandée à partir de l'âge de 1 mois, ou dès les premiers jours de vie pour les enfants né à Mayotte, en Guyane ou ayant un cas de tuberculose dans leur entourage proche. Elle peut être réalisée jusqu'à l'âge de 15 ans. L'obtention

d'une IDR négative avant injection n'est plus nécessaire, hormis pour les enfants revenant d'un séjour prolongé dans un pays de forte incidence de la tuberculose (70).

Le vaccin BCG utilisé en France est le vaccin BCG AJVaccines®, et subit actuellement des tensions d'approvisionnement sur le territoire. Il est disponible uniquement dans les centres de vaccinations, les sites de la Protection maternelle et infantile (PMI) et les Centres de lutte contre la tuberculose (CLAT), et priorisé pour les enfants les plus à risque d'évolution vers une TM (70).

La principale complication de la vaccination par le BCG est la BCGite. Il s'agit d'une suppuration locale transitoire, parfois associée à une adénite axillaire satellite, survenant au décours de l'injection intradermique (35). Les formes généralisées, favorisées par un état d'immunodépression, sont exceptionnelles mais graves. Le BCG est un vaccin vivant atténué, et de ce fait strictement contre-indiqué chez les sujets présentant un déficit de l'immunité cellulaire, inné ou acquis, dont les PVVIH.

D. Mécanismes immunologiques mis en jeu dans l'infection à *M. tuberculosis*

1. Du contagé à la formation du granulome : résumé des étapes physiopathologiques menant à l'infection tuberculeuse

Chez l'Homme, la tuberculose est principalement responsable d'une atteinte des voies respiratoires. L'infection à *M. tuberculosis* débute par l'inhalation des bacilles, contenus dans de fines gouttelettes en suspension dans l'air, dénommées gouttelettes de Flügge. Ces gouttelettes sont expulsées par un sujet malade lors d'un épisode de toux ou de crachat. Une fois inhalés, les germes vont parcourir les voies aériennes ; un certain nombre parvient à échapper au tapis muco-ciliaire et transite jusqu'à leurs extrémité distale : les alvéoles pulmonaires (Figure 15 a).

En plus du réflexe de toux et de l'action de clairance des germes exercé par le tapis muco-ciliaire, les cellules épithéliales bordant les voies respiratoires constituent l'une des premières défenses de l'hôte. Les fines parois alvéolaires sont constituées de cellules épithéliales nommées pneumocytes ; les pneumocytes de type I ont un rôle structural dans la paroi de l'alvéole, tandis que le type II sécrète le surfactant. Entre ces cellules réside un interstitium contenant les capillaires à partir desquels vont pouvoir se faire les échanges gazeux avec le sang. L'espace interstitiel contient

également des cellules de l'immunité innée, telles que les macrophages ou les cellules dendritiques, et des lymphocytes T CD4+ et CD8+ impliquées dans la réponse adaptative de type cellulaire (Figure 15 b).

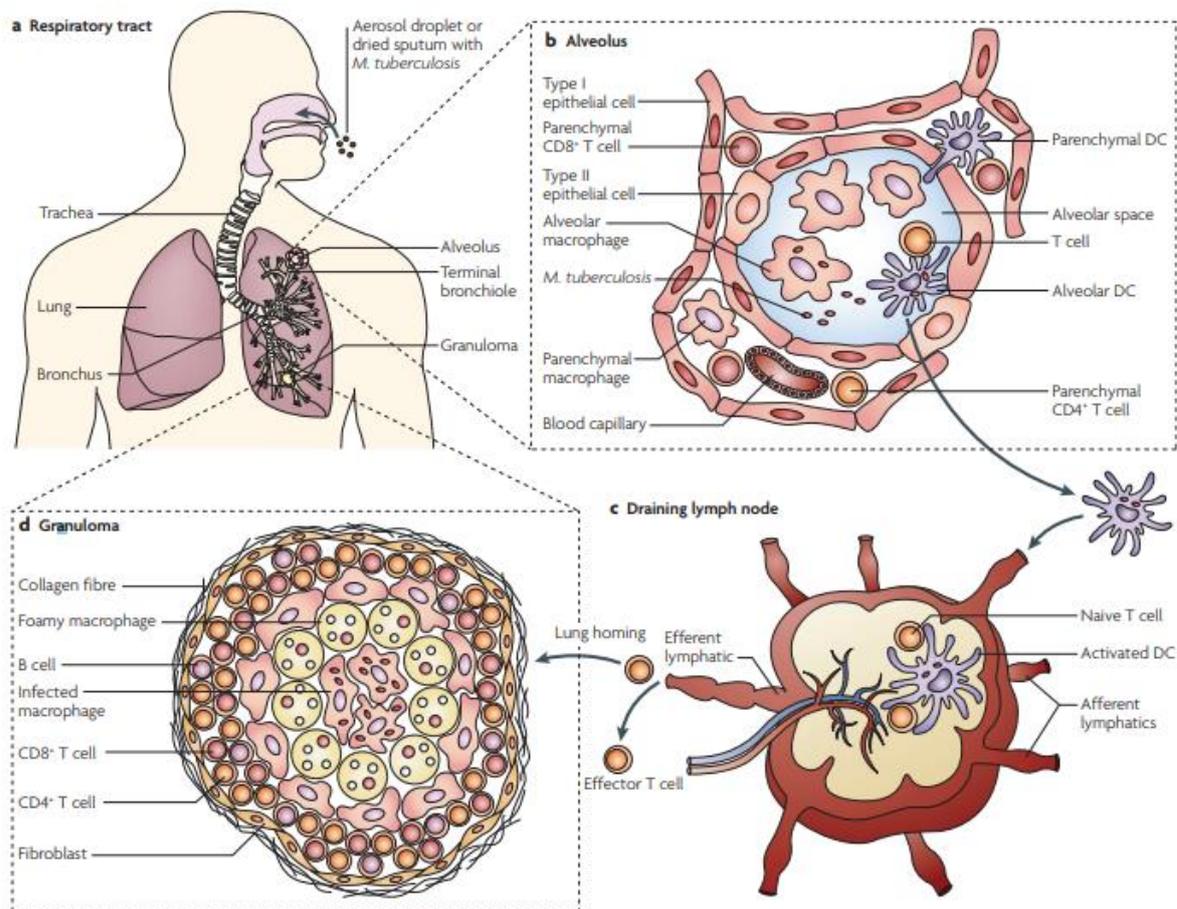


Figure 15 : Physiopathologie de l'infection à *M. tuberculosis*. D'après Griffiths et al, 2010 (71)

Dans les alvéoles, les bacilles sont reconnus et captés par les cellules dendritiques et les macrophages via les récepteurs de l'immunité innée, et vont s'y multiplier. Les cellules dendritiques transportent ensuite les antigènes mycobactériens au niveau des tissus lymphoïdes périphériques tels que les ganglions lymphatiques. Dans les ganglions de drainage, grâce à la présentation antigénique et la sécrétion de molécules de costimulation, elles permettent le déclenchement de la prolifération des lymphocytes T naïfs et leur différenciation en cellules effectrices (Figure 15 c). En parallèle, une partie des cellules dendritiques peut migrer au niveau du parenchyme pulmonaire, induisant des foyers inflammatoires locaux (71).

Les cellules T effectrices, divisées en plusieurs sous-populations en fonction de leur profil cytokinique, ont une fonction commune : l'éradication des germes intracellulaires. Sous l'influence de chimiokines et grâce à l'expression de molécules d'adhérence à l'endothélium vasculaire, elles quittent le ganglion via les vaisseaux lymphatiques efférents et le canal thoracique afin de rejoindre la circulation sanguine puis le foyer infectieux. Cette dissémination hématogène peut survenir dans les semaines suivant la contamination, ou plus tardivement (60). L'accumulation de cellules mononucléées au niveau du site infectieux donne lieu à la formation de la lésion élémentaire de l'infection : le granulome. Il est classiquement constitué d'une zone de nécrose centrale, appelée nécrose caséuse ou caséum, constituée des macrophages contenant les mycobactéries et de débris cellulaires ; cette zone est bordée d'une série de cellules organisées en palissade, comprenant des macrophages alvéolaires activés et des lymphocytes T effecteurs CD4+ et CD8+. Le granulome est circonscrit en périphérie par une matrice extracellulaire synthétisée par les fibroblastes (Figure 15 d). Le granulome tuberculeux est ainsi une structure hautement organisée, dont la formation est régulée par le recrutement ordonné de cellules immunitaires présentant une relation spatiale distincte les unes avec les autres (72). Par la suite, en fonction du statut immunitaire du malade et des éventuels facteurs de risque présentés, l'infection pourra être contenue dans les granulomes et demeurer au stade d'ITL, ou bien échapper au contrôle du système immunitaire et évoluer vers une forme de TM.

a. Réponse cellulaire T efficace : situation d'ITL

Chez le patient immunocompétent, *M. tuberculosis* est contenu au sein des cellules infectées dans les structures granulomateuses sans être complètement éradiqué ; cela correspond à l'ITL, soit un état d'infection persistante et chronique sans manifestation clinique (73). Lorsque la réponse T de l'hôte est efficace, l'architecture du granulome est optimale, permettant le confinement des bacilles (Figure 16).

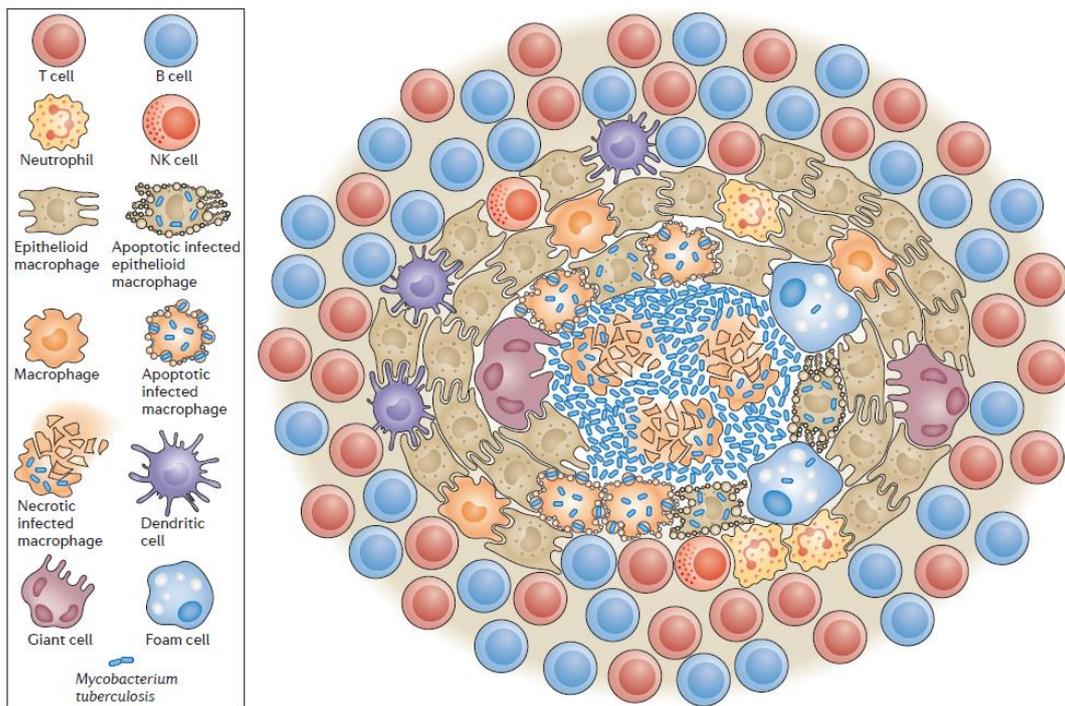


Figure 16 : Structure et composition du granulome tuberculeux. D'après Ramakrishnan et al., 2009 (147)

Dans le cas de l'ITL, le granulome est constitué d'un agrégat compact et organisé de cellules épithélioïdes, à savoir des macrophages ayant subi des transformations aboutissant à des membranes interdigitées permettant des liaisons étroites entre elles (74). Les cellules épithélioïdes sont phagocytaires ou non. Au sein du granulome, les macrophages peuvent également se différencier en cellules spumeuses, caractérisées par une accumulation de lipides dans leur cytoplasme. Ces cellules sont le plus souvent situées au bord de la zone centrale du granulome, correspondant à la nécrose caséuse, où persistent les mycobactéries. Le caséum contient en général peu de bacilles, et la proportion de germes vivants et capables de se multiplier décroît progressivement au cours du temps (60). Dans une grande majorité des cas, ces lésions n'évoluent pas au fil des années, voire régressent et se calcifient. Dans environ 10% des cas, le tubercule pulmonaire ne permet plus de contenir les germes en croissance ; l'ITL évolue alors secondairement vers une TM (cf. Partie C).

b. Infection non contrôlée par l'immunité cellulaire : situation de TM

L'altération acquise de l'immunité cellulaire, dont l'infection par le VIH en représente l'archétype, constitue la principale menace au confinement du bacille tuberculeux au sein des granulomes. Dans des travaux publiés en 2008 et visant à évaluer les

caractéristiques immunohistopathologiques des tissus pulmonaires d'individus coinfectés par la tuberculose et le VIH-1, Noronha et *al.* ont montré que les lésions de ces sujets contenaient une nécrose étendue, des granulomes mal formés et une présence marquée de granulocytes. Les auteurs constataient l'absence de nécrose caséuse typique observée classiquement dans granulome tuberculeux, et suggèrent que l'infection par le VIH-1 modifie l'organisation des granulomes pulmonaires en modulant la voie du TNF, conduisant à une altération de la réponse antituberculeuse (75). D'autres travaux évoquent que la réaction granulomateuse, au moins chez la souris, pourrait être le reflet d'une réponse immunitaire exagérée au bacille tuberculeux et pourrait jouer un rôle dans le développement de l'infection (72).

Les mécanismes immunologiques de l'infection à *M. tuberculosis*, ainsi que les interactions des différentes cellules immunitaires impliquées dans son contrôle seront détaillés dans les paragraphes suivants.

2. Réponse immunitaire innée

L'immunité innée, aussi dénommée immunité naturelle ou native, est présente chez l'ensemble des organismes multicellulaires et a été conservée au cours de l'évolution. Elle constitue une première étape cruciale dans la défense contre les infections et l'élimination des cellules et tissus endommagés ou nécrotiques. La réponse immunitaire innée est rapide, non spécifique et n'induit pas de mémoire immunitaire (76).

Les différentes cellules intervenant dans la réponse immunitaire innée contre *M. tuberculosis* sont les suivantes :

- Les cellules épithéliales des voies respiratoires et des alvéoles pulmonaires ;
- Les cellules phagocytaires : macrophages, cellules dendritiques (CD), polynucléaires neutrophiles (PNN) ;
- Les cellules Natural Killer (NK).

Leur rôle dans la pathogénèse de la tuberculose pulmonaire sera détaillé dans les paragraphes ci-dessous. Le caractère pathogène redoutable de *M. tuberculosis* vis-à-vis de l'espèce humaine résulte de sa capacité à échapper aux mécanismes effecteurs innés des cellules phagocytaires (macrophages, CD et neutrophiles) et à utiliser l'environnement intracellulaire comme niche de réplication (77).

a. Les cellules épithéliales

Les voies respiratoires constituent l'un des sites d'entrée des germes dans l'organisme les plus fréquents. A l'instar du système digestif ou de la peau, elles sont bordées par un épithélium continu composé de cellules fortement adhérentes entre elles, constituant une première barrière physique contre les pathogènes de l'environnement. Les cellules épithéliales exercent de surcroît une action microbicide en synthétisant des molécules antibiotiques telles que les cathélicidines. Enfin, l'épithélium alvéolaire contient des lymphocytes T dits « non-conventionnels », exprimant des récepteurs de diversité limitée et reconnaissant en général des structures microbiennes partagées par des germes d'une même catégorie, comme les lipides (76).

b. Les récepteurs de la réponse immunitaire innée intervenant dans la reconnaissance de *M. tuberculosis*

La réponse immunitaire de l'hôte face à *M. tuberculosis* débute par la reconnaissance du bacille par les cellules de l'immunité innée. Les mycobactéries expriment sur leur membrane un ensemble de molécules dénommées PAMPS (pathogen-associated molecular patterns). Ces motifs sont constitués de glycolipides, lipoprotéines ou encore de carbohydrates, et sont représentatifs de pathogènes microbiens du même type. Il s'agit en général de motifs essentiels à la survie ou au pouvoir infectieux du germe, expliquant qu'ils aient été relativement préservés au cours de l'évolution (76). Les récepteurs reconnaissant ces structures sont les PRRs (pattern recognition receptors) et sont exprimés par les phagocytes. Il existe une variété importante de PRRs, selon la nature des PAMPs qu'ils sont capables de reconnaître et leur localisation au sein de la cellule phagocytaire (Figure 17).

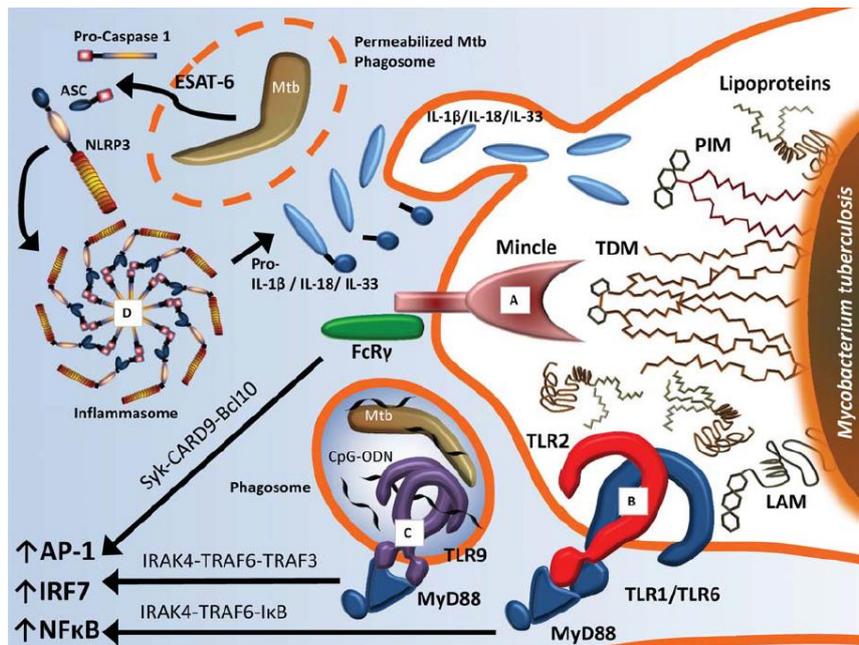


Figure 17 : Principaux PRRs et voies de signalisations intracellulaires au sein du phagocyte en réponse à une infection par *M. tuberculosis*. Goldberg et al. 2014 (78)

- **Les récepteurs de type Toll (*Toll-like receptor*, TLR)** : il en existe différents types selon la composante microbienne reconnue. Les TLRs exprimés à la membrane cellulaire reconnaissent les éléments exprimés au niveau de la membrane des pathogènes, tels que les lipopeptides, peptidoglycanes et polysaccharides (TLR1 et TLR2 par exemple). Les TLRs spécifiques des acides nucléiques sont quant à eux situés dans les endosomes (TLR9). Tous les TLRs contiennent un site de liaison au ligand, comprenant des motifs riches en leucines, ainsi qu'un domaine cytoplasmique TIR (Toll-like IL-1 receptor). L'engagement des TLRs entraîne le recrutement de protéines adaptatrices via le domaine TIR, aboutissant à l'activation de facteurs de transcription et à l'expression de gènes codant pour des cytokines, molécules d'adhérence et de costimulation (telles que le CD80 et le CD86 interagissant avec le CD28 des lymphocytes T). Les TLRs, via l'activation de la protéine adaptatrice MyD88, sont notamment impliqués dans la voie du NF-κB (*nuclear factor κB*), responsable de l'expression accrue de cytokines et de molécules d'adhérence. Ils activent aussi les IRF (*interferon regulatory factors*), facteurs de transcription induisant la production d'interféron de type I (76). Dans la famille des TLRs, il est reconnu que les TLR1, TLR2, TLR4, et TLR9 en particulier ainsi que leurs

voies de signalisation intracellulaires jouent un rôle critique dans l'initiation de la réponse immunitaire innée à l'infection à *M.tuberculosis* (22,79,80). Le TLR2 forme des hétérodimères avec le TLR1 ou le TLR6. Ces hétérodimères reconnaissent des glycolipides de la membrane cellulaire des bacilles (LAM), le PIM, des glycoprotéines ou encore des lipoprotéines (81). La littérature rapporte que l'engagement du TLR2 par *M. tuberculosis* stimulerait la production de TNF α par le macrophage infecté et serait de ce fait particulièrement crucial dans le développement de la réponse immunitaire innée de l'hôte (82,83). Le TLR9 est exprimé au niveau des endosomes et reconnaît les motifs CpG non méthylés de l'ADN bactérien. Des études *in vitro* ont montré que la production d'IL-12 induite par *M. tuberculosis* était dépendante du TLR9 pour les cellules dendritiques (84,85). Enfin, le rôle du TLR4 dans la pathogénèse de la tuberculose est plus controversé ; dans un modèle murin, Reiling et *al.* ont montré une susceptibilité similaire à *M. tuberculosis* chez des souris déficientes en TLR4 comparée à des *souris wild-type* (86). D'autres travaux suggèrent a contrario un rôle important du TLR4 dans la reconnaissance du bacille, avec une survie plus faible après infection des souris déficientes en TLR4 (87).

- **Les récepteurs de type NOD (*nucleotide oligomerization domain receptors*, NLRs) :** sont des protéines cytosoliques reconnaissant les DAMPs (*damage associated molecular patterns*, correspondent à des débris et cellules endommagées suite à une blessure stérile) et les PAMPs accédant au compartiment intracellulaire. Comme vu précédemment, *M. tuberculosis* a la capacité de s'échapper du compartiment phagosomal vers le cytoplasme du macrophage par l'action du complexe de sécrétion ESX-1 et de la protéine ESAT-6. Il n'est donc pas surprenant que des PRRs cytosoliques interviennent dans la reconnaissance du bacille. Tous les NLRs contiennent un domaine central NOD (*nucleotide oligomerization domain*) mais ont des domaines N-terminaux différents. La partie C-terminale, riche en leucine, serait impliquée dans la reconnaissance de l'agent pathogène et initierait l'activation de la protéine (22). Parmi les différents NLRs connus, les récepteurs NOD1 et NOD2 possèdent un domaine N-terminal de type CARD (*caspase activation and recruitment domain*) spécifique des peptidoglycanes bactériens, composants communs des membranes cellulaires bactériennes. Ils activent la voie pro-

inflammatoire du NF- κ B (76). Divangahi et *al.* ont montré que des souris déficientes en NOD2 avaient une charge plus élevée bactérienne 6 mois après infection par BCG et ont succombé plus tôt à la maladie par rapport aux témoins de type sauvage ; le recrutement des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ était également diminué pour ce modèle murin, suggérant un rôle important de NOD2 dans la réponse immunitaire globale de l'hôte contre *M. tuberculosis* (88). La famille des NLRs comprend également le récepteur NLRP-3 (*NLR pyrin domain containing 3*) qui réagit à de nombreuses structures microbiennes non apparentées et à d'autres signaux non spécifiques de phénomènes infectieux tels que les changements de concentration intracellulaire d'ions potassium (K⁺) ou la présence de substances résultant de dommages cellulaires (76). La reconnaissance d'une de ces molécules entraîne l'oligomérisation de NLRP-3 avec une protéine adaptatrice ASC et la forme inactive de la caspase-1 ; cette dernière devient alors active et clive les précurseurs de l'IL-1 β et de l'IL-18 pour sécréter de l'IL-1 β et de l'IL-18 actives (89,90). Ces cytokines sont connues pour jouer un rôle important dans la réponse immunitaire de l'hôte contre *M. tuberculosis* (91); plusieurs études ont notamment montré une susceptibilité accrue à l'infection tuberculeuse chez des souris knock-out pour les gènes des récepteurs de l'IL-18, de l'IL-1 β et de l'IL-1 (92–95). Ce complexe dénommé inflammasome peut être initié par NLRP-3 mais également par la protéine AIM2 (cf. paragraphe suivant). Il aboutit à la synthèse de cytokines pro-inflammatoires en réponse à des stimuli intracellulaires et joue un rôle central dans le développement d'une réponse immunitaire innée efficace et dans l'instauration de la réponse adaptative (Figure 18).

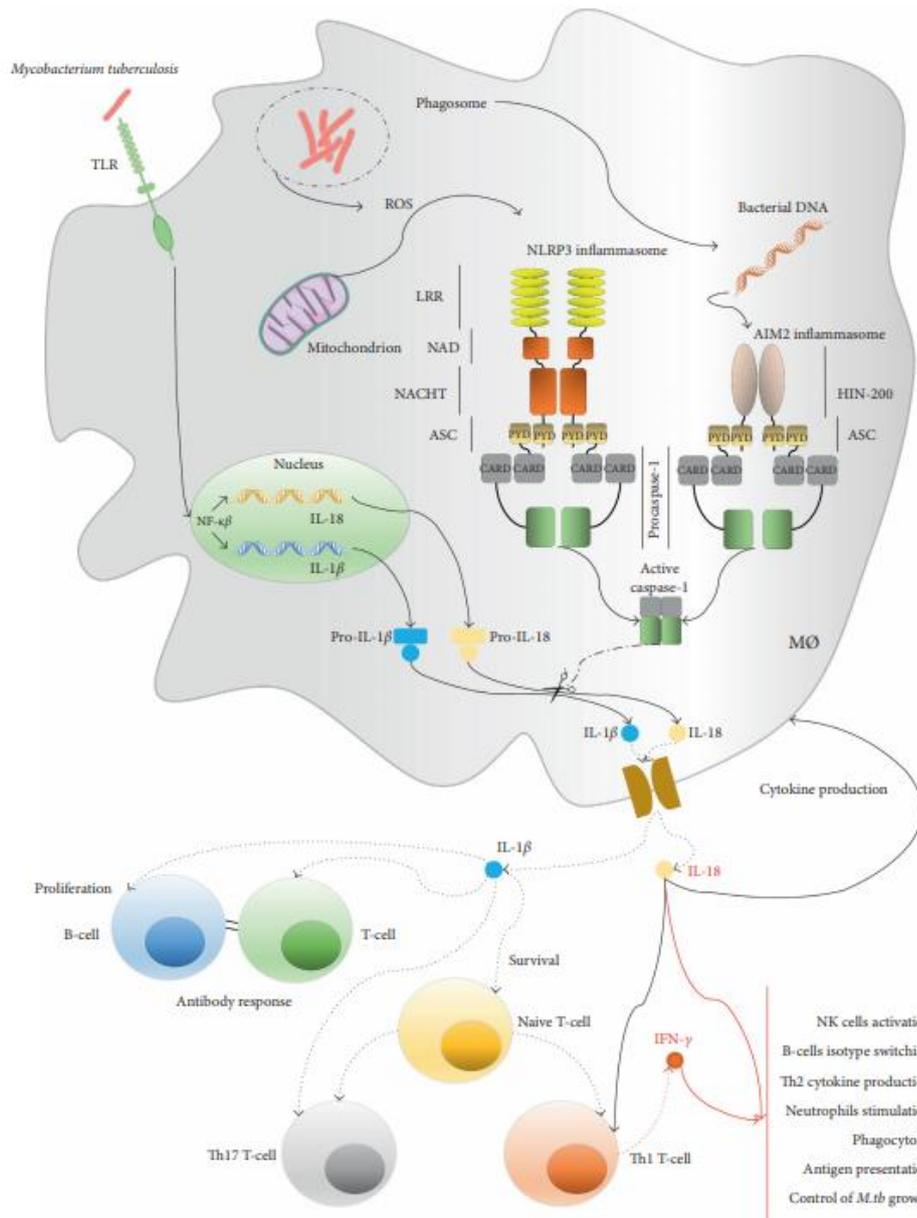


Figure 18 : Voies d'activation de l'inflammasome induites par *M. tuberculosis*. Wawrocki et al., 2017 (91)

- **Le récepteur AIM2 (*absent in melanoma 2*)** : comme les NLRs, le récepteur AIM2 détecte l'ADN cytosolique des bactéries intracellulaires et des virus. Il possède un domaine C-terminal HIN-200 capable de lier des oligonucléotides et un domaine N-terminal pyrine (PYR) (96). De la même façon que le récepteur NLRP-3, AIM2 est impliqué dans la formation d'un complexe inflammasome suite à la liaison d'une protéine adaptatrice ASC à son domaine N-terminal, provoquant la synthèse des cytokines inflammatoires IL-1 et IL-18 (96,97). L'interaction d'AIM2 avec ASC conduit également à la formation du

pyroptososome ASC, qui induit la mort cellulaire par pyroptose dans les cellules contenant de la caspase-1 (96).

- **Les récepteurs de type lectine (C-lectin receptors, CLR)** : les CLR sont une grande classe de récepteurs membranaires exprimés principalement par les cellules myéloïdes et reconnaissant des motifs glucidiques bactériens et les glycans fongiques. De nombreux CLR ont été associés aux réponses immunitaires contre les mycobactéries, telles que les collectines, le récepteur du mannose MR (*Mannose receptor*), DC-SIGN (*dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin*), Mincle, Dectin-1 ou Dectin-2 (80). Il a notamment été montré que le MR et Dectin-2 contribuent à l'immunité innée contre *M. tuberculosis* en interagissant directement avec les motifs ManLAM exprimés par les mycobactéries (98,99). A contrario, la liaison du ManLAM par le récepteur DC-SIGN exprimé à la membrane des cellules dendritiques stimulerait la production d'IL-10 aux propriétés anti-inflammatoires, induisant ainsi une inhibition de la synthèse d'IL-12 par les macrophages et cellules dendritiques, une réduction de l'expression des molécules de costimulation et de la présentation d'antigènes aux lymphocytes T par les molécules du CMH de classe II (100,101). Ceci est un exemple de la diversité des facteurs immunomodulateurs que peut présenter le bacille tuberculeux influençant de manière globale la réponse immunitaire de l'hôte.
- **Les récepteurs scavenger (scavengers receptors, SR)** : ces récepteurs ne sont pas spécifiques des cellules de l'immunité innée et sont retrouvés entre autres à la surface des cellules endothéliales (leur rôle dans la pathogénèse de l'athérosclérose est bien décrit dans la littérature). Concernant l'infection tuberculeuse, il a été démontré que les SR étaient préférentiellement utilisés par *M. tuberculosis* pour pénétrer dans les macrophages lors d'un blocage des MRs et des CRs (complement receptors) de type 1, 3 et 4 (102).
- **Les récepteurs du complément (complement receptors, CR)** : le système du complément est composé d'un ensemble de protéines circulantes, dont de nombreuses possèdent une activité protéolytique. Il existe trois voies d'activation du complément : la voie alterne, appartenant à l'immunité innée, est

déclenchée lorsque certaines protéines du complément se fixent directement à la surface du pathogène (intervention de la fraction C3, des facteurs B, D et P (la properdine), de la C3 convertase alterne membranaire, de la C5 convertase alterne) ; la voie classique est mise en jeu après liaison du germe à un anticorps et fait partie à ce titre de la réponse immunitaire adaptative humorale. Enfin, la voie des lectines se déclenche lorsque la lectine liant le mannose (*mannose-binding lectin*, MBL) se fixe aux résidus mannoses des glycoprotéines des enveloppes microbiennes ; elle rejoint la voie classique par la synthèse de fraction C2 et C4 mais, n'étant pas dépendante de la liaison à un anticorps, elle reste associée à l'immunité innée (76). Ces trois voies d'activation ont pour finalité commune la production de C3b, molécule permettant l'opsonisation et la phagocytose du pathogène, et la formation du complexe d'attaque membranaire formant un pore transmembranaire au travers des germes à paroi fine et aboutissant à leur lyse. Il a été montré que les mycobactéries pathogènes telles que *M. tuberculosis* sont reconnues par les macrophages par l'intermédiaire des CRs, notamment le CR1 et le CR3, après leur opsonisation par la fraction C3b (103,104).

D'autres molécules ont été décrites comme intervenant dans la reconnaissance du bacille par les cellules de l'immunité innée, comme le récepteur du fragment Fc des immunoglobulines, le cholestérol ou encore les récepteurs de protéines liées à un complexe glycosylphosphatidylinositol (GPI) (105,106,106). La mise en jeu de ces différents récepteurs par *M. tuberculosis* provoque une activation graduelle des macrophages présents dans les alvéoles pulmonaires.

c. Le macrophage

Le macrophage alvéolaire est un élément central dans la physiopathologie de la tuberculose et constitue, hormis la cellule épithéliale alvéolaire, le premier type cellulaire en contact avec le bacille. En plus de leur fonction de phagocyte et de cellule présentatrice d'antigène, les macrophages ont un rôle clé dans la réponse immunitaire contre *M. tuberculosis* via la synthèse de cytokines et leur activité costimulatrice, qui dépendent de leur degré d'activation (91).

c.1. Activation des macrophages

Les macrophages inactifs n'ont qu'une capacité limitée à inhiber la croissance des mycobactéries ingérées. L'IFN γ sécrété par les lymphocytes T et les cellules NK activent les macrophages, qui acquièrent alors un fort potentiel bactéricide leur permettant de tuer les bacilles et de limiter leur croissance intracellulaire. Il existe deux voies d'activation des macrophages:

- La voie d'activation classique (M1) : elle a un rôle clé dans la lutte contre les bactéries à développement intracellulaire et la production de cytokines pro-inflammatoires. Elle est induite par les signaux immunitaires innés (liaisons de produits microbiens aux TLRs, IFN γ) et orientée par les lymphocytes T CD4+Th1 ; les cellules auxiliaires CD4+, après reconnaissance des antigènes microbiens, expriment le CD40L. Le CD40L se lie à son récepteur, le CD40, exprimé principalement par les macrophages ainsi que les cellules dendritiques et les lymphocytes B. Cette liaison stimule les macrophages, qui synthétisent en réponse de l'IFN γ . Cet ensemble de signaux a pour conséquence l'acquisition par le macrophage d'une bactéricidie vis-à-vis du germe phagocyté, principalement par l'activation de facteurs de transcription induisant l'expression de gènes codant pour des protéines lysosomales et des enzymes qui stimulent la production de dérivés réactifs de l'oxygène (*reactive oxygen species*, ROS) et d'oxyde nitrique (NO) (107).
- La voie d'activation alternative (M2) : les macrophages activés par cette voie présentent peu l'antigène et régulent la réponse Th1. Elle ne dépend pas des signaux déclenchés via les TLRs mais est induite par différentes cytokines, comme les interleukines 4, 13, 10 et le TGF β . Cette population de macrophages acquérant un phénotype "M2" aurait un rôle important en maintenant un équilibre entre progression de la pathologie et contrôle de la croissance des mycobactéries (80,108).

L'activation du macrophage permet l'initiation de la synthèse de cytokines ou chimiokines pro-inflammatoires, mais est aussi à l'origine d'une cascade d'évènements cellulaires accroissant sa bactéricidie tels que la production d'espèces réactives de l'azote, la phagocytose, l'autophagie, l'apoptose ou encore l'activation du

complexe inflammasome (78,80). La finalité pour le système immunitaire inné étant d'une part l'élimination précoce du pathogène et d'autre part de promouvoir la présentation d'antigènes de *M. tuberculosis* aux lymphocytes et de permettre ainsi la mise en place de la réponse adaptative.

Des molécules telles que la vitamine D jouent un rôle important dans la réponse immunitaire et l'homéostasie cellulaire. Des études in vitro ont révélé que la 1,25-dihydroxyvitamine D3 accroît l'immunité innée en augmentant l'expression de différents peptides antimicrobiens, incluant la cathélicidine, et l'induction de l'autophagie des cellules infectées, ce qui restreint alors la croissance intracellulaire de *M. tuberculosis* dans les macrophages (109). A contrario, il a été montré que la vitamine D supprime la réponse des cytokines pro-inflammatoires et accroît la réponse anti-inflammatoire. La supplémentation en vitamine D en association au traitement antituberculeux pourrait être bénéfique en minimisant les dommages tissulaires excessifs au cours des TM actives (110).

L'induction de l'apoptose par les macrophages infectés est une stratégie alternative pour la défense de l'hôte contre *M. tuberculosis*. Il a été montré que ce processus de mort cellulaire programmée entraîne la suppression de la réplication bactérienne au sein des macrophages (111). En outre, les vésicules apoptotiques libérées par ces macrophages jouent un rôle important en véhiculant des antigènes mycobactériens vers les cellules présentatrices d'antigènes (CPA), telles que les cellules dendritiques immatures. Cela facilite notamment l'activation des lymphocytes T CD8+ via la présentation d'antigènes par le CMH de classe I et CD1 (112). L'apoptose participe ainsi à l'activation de l'immunité adaptative contre *M. tuberculosis*.

c.2. Aperçu des mécanismes d'échappement élaborés par M. tuberculosis vis-à-vis des macrophages

Une fois captées par les macrophages alvéolaires, les mycobactéries ont la capacité d'y persister et de s'y multiplier, utilisant l'environnement intracellulaire comme niche de réplication et échappant ainsi au contrôle de l'immunité innée (77). Les mécanismes d'échappement du bacille tuberculeux au système immunitaire sont largement étudiés dans la littérature depuis de nombreuses années. Leur compréhension constitue un enjeu majeur dans l'élaboration de nouvelles thérapeutiques antituberculeuses.

Concernant l'échappement aux macrophages, les principaux mécanismes élaborés par *M. tuberculosis* sont les suivants :

- **Le blocage de la maturation et de l'acidification du phagosome.** Sur la membrane du phagosome, des pompes à protons V-ATPase génèrent un stress acide qui a pour finalité la lyse bactérienne. Le bacille a la capacité de résister à ce stress acide en libérant de l'ammoniac (NH_3) ; ces molécules, en se complexant à des protons H^+ , vont permettre la synthèse d'ammonium (NH_4^+). Cela favorise le maintien d'un pH élevé et permet ainsi la croissance du germe, jusqu'à destruction du phagosome et envahissement du macrophage (113).
- **La modification de la composition de la membrane mycobactérienne pour résister au stress acide.** Suite à la phagocytose par les macrophages, *M. tuberculosis* est capable d'appréhender les conditions de l'environnement intracellulaire et de moduler son expression génique pour favoriser sa croissance dans le phagosome. La détection d'un pH bas dans le phagosome, en induisant l'expression du locus *aprABC*, conduit à la modulation de la synthèse et de la séquestration des lipides dans la paroi mycobactérienne, permettant ainsi la survie du bacille en milieu acide (114).
- **L'obstacle à la fusion phagosome-lysosome et altération du processus d'autophagie.** L'adhésion du bacille sur la membrane cellulaire entraîne son internalisation dans un phagosome; ces phagosomes contenant les bacilles vivants vont exprimer spécifiquement à leur surface une protéine TACO. Cette protéine empêche la fusion phagosome-lysosome et permet à *M. tuberculosis* d'échapper au processus normal de lyse bactérienne par le macrophage (115). *M. tuberculosis* altère également le processus d'autophagie via le système ESX-1. En 2012, Romagnoli et *al.* ont montré que la souche virulente H37Rv altère l'autophagie à l'étape de fusion phagosome-lysosome dans un modèle utilisant des cellules dendritiques humaines. En revanche, ni la souche non virulente (H37Ra) ni la souche BCG n'étaient capables d'empêcher la maturation de l'autophagosome (116).

- **L'échappement du phagosome vers le cytoplasme.** L'altération progressive du phagosome par le complexe ESAT-6/CFP-10 est l'un des principaux facteurs de virulence de *M. tuberculosis* (cf. Partie B). Elle aboutit, d'une part, à la rupture de la membrane phagosomale, et d'autre part à une absence de fusion phagosome-lysosome ; cela permet *in fine* la migration du bacille vers le compartiment cytoplasmique du macrophage infecté. Des travaux utilisant des souches de *Mycobacterium marinum* comportant des mutations inactivatrices du complexe ESX-1 ont montré une augmentation de la fusion phagosome-lysosome dans les macrophages THP-1 étudiés ; à l'inverse, les souches possédant un complexe ESX-1 intact provoquent une rupture des phagolysosomes, suivie d'une mort cellulaire nécrotique des macrophages infectés. Ce concept de "phagosomal disruption" a été proposé par différents auteurs comme un mécanisme à part entière dans la pathogénèse de l'infection à *M. tuberculosis* (117–119).

Les macrophages sont pourvus de systèmes de surveillance cytosoliques capables de déclencher la réponse immunitaire innée. L'ADN mycobactérien transloqué dans le cytosol suite à la dégradation progressive de la membrane phagosomale peut initier l'un de ses systèmes de surveillance, la voie STING-TBK1-IRF3. Cela entraîne la synthèse d'IFN de type I par le macrophage (120). Dans leurs travaux de 2010, Mayer-Barber et *al.* ont démontré qu'une production accrue d'IFN de type I et des réponses réduites à l'IL-1 β sont associées à une exacerbation de la maladie (92). Ces données sont corroborées par Sha et *al.* en 2013, qui montrent que *M. tuberculosis*, contrairement à d'autres mycobactéries non virulentes, a la capacité d'inhiber l'activation de l'inflammasome via AIM2 et ainsi la production d'IL-1 β (121). L'importance de l'activation de l'inflammasome dans l'immunité innée antituberculeuse a également été souligné dans des travaux utilisant un modèle murin muté pour le gène *zmp1*, autre facteur de virulence identifié du bacille ; chez la souris infectée par *M. tuberculosis* via aérosolisation, la délétion de ce gène permet de préserver l'activation de l'inflammasome, entraînant une augmentation de la sécrétion d'IL-1 β , une maturation améliorée des phagosomes contenant les bacilles et une clairance supérieure des mycobactéries par les macrophages (122). Toutefois, les interactions du

bacille tuberculeux avec le complexe inflammasome et leurs conséquences restent débattues dans la littérature. D'autres travaux ont par exemple souligné que le processus de pyroptose, déclenché via NLRP-3 et le complexe inflammasome, serait bénéfique à sa survie à long terme (123).

- **La modulation de l'apoptose.** *M. tuberculosis* a la capacité d'utiliser les voies de signalisation intracellulaires de la cellule hôte et de moduler précisément l'issue de l'apoptose afin d'améliorer sa survie et favoriser sa pathogénicité. Dhiman et *al.* ont utilisé un modèle de cellules THP-1 infectées par l'une ou l'autre des souches H37Rv et H37Ra de *M. tuberculosis*. Au bout de 48h, seule la souche virulente H37Rv avait activé NF-κB, conduisant à une régulation positive de bfl-1/A1, protéine anti-apoptotique de la famille de Bcl2 (124). D'autres auteurs ont montré, en utilisant la PCR temps réel, que l'expression de Bcl-2 est augmentée dans les macrophages infectés par H37Rv alors qu'elle se trouve diminuée dans les macrophages infectés par H37Ra ; pour les deux souches, on observe une diminution de l'expression de l'ARNm du récepteur Fas, impliqué dans la voie extrinsèque de l'apoptose (125). Ces résultats soulignent l'importance de l'échappement à l'apoptose, notamment via l'activation de la voie de NF-κB, dans la survie des mycobactéries virulentes au sein des macrophages.

Néanmoins, le rôle précis de l'apoptose au cours de l'infection à *M. tuberculosis* est sujet à débat et demeure incertain. Aguilo and *al.* décrivent en 2013 que l'induction de l'apoptose de la cellule hôte est retreinte aux souches virulentes du bacille, et serait associée à sa capacité à sécréter la protéine ESAT-6, que ce soit *in vitro* ou *in vivo* (126). De manière intéressante, cette étude montre que seules les souches induisant l'apoptose sont capables de se propager dans d'autres cellules, suggérant que l'apoptose pourrait être utilisée par *M. tuberculosis* comme mécanisme de colonisation et de propagation.

d. Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (CDs) jouent un rôle essentiel en assurant la présentation des antigènes aux lymphocytes T CD4⁺ naïfs au sein des organes lymphoïdes secondaires et permettent la mise en place d'une réponse immunitaire spécifique.

Elles font ainsi le lien entre immunité innée et adaptative. Il existe deux populations principales de CD, se différenciant par leur localisation et leurs fonctions (76) :

- Les CDs conventionnelles représentent la grande majorité des CD présentes dans les tissus et organes lymphoïdes. Elles se caractérisent par une expression élevée à leur surface des marqueurs CD11c et Cd11b, ainsi que par l'expression préférentielle des TLR4, TLR5 et TLR8. Leur fonction principale est l'induction de la réponse cellulaire T contre de nombreux antigènes. Elles produisent des cytokines de type TNF, l'IL-6 et l'IL-12.
- Les CDs plasmacytoïdes sont présentes dans le sang et les tissus. Leur phénotype est caractérisé par une absence du marqueur Cd11b, une expression basse de CD11c et une expression élevée de B220 (76). Elles sont impliquées dans la synthèse d'interférons de type 1 et exercent un rôle important dans l'immunité innée et l'induction de la réponse T contre les virus.

Les CD sont présentes à l'état immature dans les tissus comportant des épithéliums, dont le parenchyme pulmonaire, et agissent comme sentinelles en détectant les signaux de dangers émis localement, lors de processus inflammatoires ou de nécrose. Sous l'effet de ces signaux, perçus par l'intermédiaire des TLRs et des récepteurs aux cytokines, les CD perdent leur propriété d'adhérence aux pneumocytes et expriment la molécule CCR7, récepteur aux chimiokines produites par l'endothélium des vaisseaux lymphatiques et dans les zones T ganglionnaires. La liaison des chimiokines à CCR7 permet la migration des CD vers les ganglions lymphatiques. C'est au cours de cette migration que les cellules deviennent des CPA « professionnelles » matures, exprimant fortement CMH et des molécules de costimulation nécessaires à l'activation des lymphocytes T.

Ainsi, les antigènes mycobactériens vont se trouver concentrés au niveau des ganglions lymphatiques drainant le segment pulmonaire infecté ; c'est à ce niveau qu'ils ont la plus grande probabilité d'être mis au contact des lymphocytes T naïfs, qui expriment eux aussi le récepteur CCR7, et d'induire une réponse cellulaire spécifique de *M. tuberculosis*.

e. Les polynucléaires neutrophiles

Les polynucléaires neutrophiles (PNNs) représentent la majorité des leucocytes circulants (environ 60%). Ces phagocytes ont un rôle primordial dans la défense contre les pathogènes ; ils ont une courte demi-vie dans la circulation sanguine, de l'ordre d'une dizaine d'heures (127), qui se voit prolongée en réponse aux signaux pro-inflammatoires dans les tissus endommagés (128). Chez le patient souffrant d'une TM de forme pulmonaire, la production d'IL-8 entraîne un afflux massif des PNNs vers le site infectieux (129,130). Ainsi, les PNNs sont les éléments les plus nombreux retrouvés à l'ECBC et à l'examen direct du liquide bronchoalvéolaire ; ils constituent un des principaux types cellulaires infectés par le bacille, qui semble s'y répliquer activement et rapidement (131). Des modèles murins ont montré que les PNNs font partie des premières cellules de l'immunité innée à parvenir au foyer infectieux, mais que leur nombre décline assez vite, entre deux et trois semaines après le début de l'infection (72). Bien que leur implication dans l'infection à *M. tuberculosis* soit évidente, le rôle des PNNs dans la physiopathologie de la tuberculose demeure mal connu dans la littérature. Cortois et *al.* ont démontré que les souches virulente de *M. tuberculosis* sont capable de survivre au sein des PNNs humains ; cette survie s'accompagne de la mort cellulaire par nécrose des cellules infectées (129). Cette étude montre également qu'une souche de virulence atténuée n'est pas capable d'induire cette nécrose, rendant le bacille vulnérable à l'action des espèces oxygénées réactives des PNNs. Ces résultats suggèrent que les PNNs seraient concernés, au même titre que les macrophages et les CDs, par les mécanismes d'échappement à l'immunité innée développés par *M. tuberculosis*.

f. Les cellules *Natural killer*

Les cellules *Natural killer* (NK) sont des lymphocytes cytotoxiques intervenants dans l'immunité innée. Ils expriment le CD16, un récepteur au fragment Fc des immunoglobulines, et le CD56, molécule appartenant à la famille des NCAMs (*neural cell adhesion molecules*) (132). Elles interviennent au stade précoce de l'infection et leur cytotoxicité n'est pas conditionnée par la reconnaissance du CMH sur la cellule cible (73). Leur activité est stimulée par des cytokines telles que l'IL-2 et l'IL-12 ; l'IL-2 favorise leur activité cytolytique, tandis que l'IL-12, sécrétée par les macrophages, CDs et PNNs en réponse à l'infection, promeut la synthèse et la sécrétion d'IFN γ et d'IL-22. Ainsi, des travaux ont montré que les cellules NK activées par l'IL-12 étaient capables

d'inhiber la croissance de *M. tuberculosis* et de *M. avium* (133,134). Le glutathion est également une molécule importante dans l'activation des cellules NK. Associé à l'IL-2 et l'IL-12, il favorise ses fonctions et le contrôle de l'infection (135).

Ainsi, bien que n'exerçant pas d'activité phagocytaire, les cellules NK occupent une place centrale dans la réponse innée contre *M. tuberculosis* ; elles conduisent à la destruction des mycobactéries intracellulaires par la lyse directe des phagocytes infectés (134) et l'induction de leur apoptose, et soutiennent la réponse immunitaire innée par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'FN γ (135,136).

3. Réponse immunitaire adaptative

La mise en place d'une réponse immunitaire innée de qualité est critique pour le contrôle de l'infection *M. tuberculosis* à la phase précoce; la réponse adaptative, quant à elle, se révèle indispensable pour contenir l'infection au stade chronique et freiner son évolution. L'immunité adaptative, dénommée aussi immunité acquise ou spécifique, nécessite l'expansion et la différenciation de lymphocytes en réaction à l'agent pathogène avant de pouvoir assurer une défense efficace (76). Il existe deux types d'immunité adaptative. L'immunité humorale, s'exerçant par l'intermédiaire des anticorps synthétisés par les lymphocytes B, est destinée à neutraliser les germes extracellulaires. L'immunité cellulaire constitue la ligne de défense contre les germes intracellulaires, qui ne peuvent être atteints par les anticorps. Les cellules impliquées dans l'immunité adaptative de type cellulaire sont les lymphocytes T ; ils agissent en activant les cellules phagocytaires ou en lysant directement toute cellule contenant un pathogène infectieux dans son cytoplasme (76).

Dans l'infection tuberculeuse, la mise en place de la réponse adaptative s'initie au sein des ganglions lymphatiques ; les CD_s matures présentent les antigènes spécifiques de *M. tuberculosis* aux lymphocytes T CD4⁺ (LTCD4) et T CD8⁺ (LTCD8) naïfs via leur CMH de classe II et de classe I, respectivement. Cette interaction induit la production de cytokines par les lymphocytes activés et l'expression à leur surface de récepteurs membranaires à ces cytokines. Cela conduit à une prolifération cellulaire par voie autocrine, et à une expansion clonale des lymphocytes T spécifiques de *M. tuberculosis*. Une partie des cellules filles se différencie en cellules T effectrices qui migreront dans les tissus périphériques : les LTCD4 auxiliaires seront impliqués dans l'activation des macrophages et des lymphocytes B ; les LTCD8 auront une action

cytolytique directe sur les phagocytes infectés, et participeront à l'activation des macrophages (Figure 19).

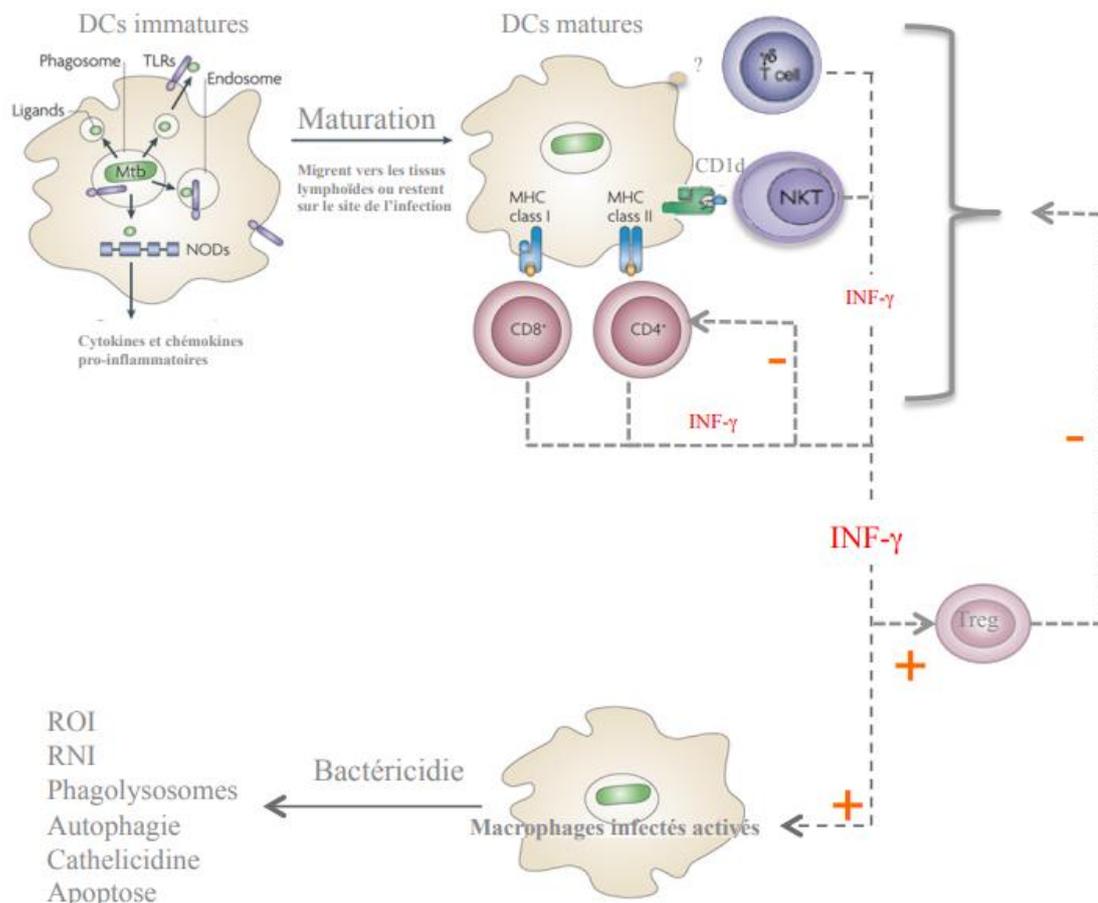


Figure 19 : Réponse immunitaire adaptative dans l'infection à *M. tuberculosis*. Figure réalisée par M. Friedling (127) et inspiré de Kaufmann et *al.*,2001 (128).

Les autres populations lymphocytaires intervenant dans la réponse adaptative spécifique sont les lymphocytes T $\gamma\delta$ (LT $\gamma\delta$) et les lymphocytes T NK (LTNK). Cette diversité de cellules T favorise la reconnaissance d'un grand nombre d'antigènes mycobactériens. Les lymphocytes T spécifiques migrent environ quinze jours après le début de l'infection. Dans la TM de forme pulmonaire, ils s'accumulent au niveau du foyer infectieux où ils rencontrent les phagocytes infectés et participent à leur activation grâce à la synthèse et la sécrétion de grandes quantités de cytokines pro-inflammatoires, dont les principales sont l'IFN γ et le TNF α (137). Des études réalisées

chez la souris et utilisant la déplétion de gènes ont démontré l'importance de l'IFN γ dans l'acquisition de propriétés bactéricides par le macrophage, la formation du granulome tuberculeux et le contrôle de la croissance des mycobactéries (138,139). Un autre contingent de cellules T donnera les lymphocytes T mémoires, qui permettra l'acquisition d'une immunité spécifique à long terme.

a. Les lymphocytes T CD4+

La démonstration du rôle fondamental endossé par les lymphocytes T dans la tuberculose, et de surcroît par les LTCD4, a été apportée chez l'Homme par l'infection par le VIH (60). Le développement d'une infection tuberculeuse est un indice de l'évolution de la maladie chez les personnes infectées par le VIH, et apparait pour des taux relativement élevés de LTCD4 par rapport à ceux observés dans d'autres infections opportunistes (140,141). L'arrivée des LTCD4 effecteurs au niveau du foyer infectieux est associée à une diminution puis un arrêt de la croissance des mycobactéries, en lien avec la production d'IFN γ (141). L'importance de cette lignée cellulaire dans l'immunité antituberculeuse a été mise en évidence par différentes équipes, notamment grâce à des modèles murins déficients en LTCD4 (142).

b. Les lymphocytes T CD8+

Les LTCD8 exercent leurs fonctions effectrices par la lyse des phagocytes infectés, la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (IFN γ , TNF α) et la lyse directe des mycobactéries (143,144). L'activation des LTCD8 naïfs et leur différenciation en cellules effectrices cytotoxiques est déclenchée par la reconnaissance via leur TCR des antigènes mycobactériens présentés par le CMH de classe I et requiert une costimulation par les lymphocytes T auxiliaires. Les LTCD4 et les LTCD8 sont activés par les CD8 ayant ingéré des cellules infectées et exprimant à la fois le CMH de classe I et de classe II. Ainsi, chez les sujets infectés par le VIH et présentant une lymphopénie T CD4+, la réponse T CD8+ cytotoxique peut se trouver fortement altérée (76). Des travaux montrant une survie réduite chez la souris mutée pour des séquences spécifiques du CMH de type I, notamment pour la β 2-microglobuline, ont permis de souligner l'importance des LTCD8 dans l'immunité antituberculeuse (145).

c. Les lymphocytes T $\gamma\delta$

En conditions physiologiques, les LT $\gamma\delta$ représentent environ 5% des lymphocytes présents au niveau des organes lymphoïdes, et jusqu'à 2% des lymphocytes circulants (60) ; ils sont également abondants dans les épithéliums. Il s'agit de cellules T exprimant le CD3+ mais présentant un récepteur antigénique différent de celui des LTCD4 et LTCD8 ; leur TCR est formé de chaînes γ et δ au lieu des chaînes α et β classiques. Les molécules intervenants dans la présentation des peptides microbiens à ces lymphocytes sont encore mal identifiées (60,146). Les LT $\gamma\delta$ jouent un rôle important en intervenant au stade précoce de l'infection tuberculeuse, et sont recrutés par l'action des chimiokines CXCL2 et CXCL10 produites par les CDs et les macrophages au niveau du foyer infectieux (147). Dans des travaux publiés en 2019, Guerra-Maupome et *al.* étudient l'immunogénicité de la vaccination BCG par aérosol et le profil phénotypique des cellules T $\gamma\delta$ périphériques et muqueuses en réponse à la vaccination. Ils observent une forte production locale et systémique d'IFN γ et d'IL-17 spécifique de *M. bovis* par les LT $\gamma\delta$ et les LTCD4. Ils montrent également que la vaccination par le BCG induit une différenciation des cellules T $\gamma\delta$ en cellules effectrices et mémoires, à la fois dans les voies respiratoires inférieures et dans le sang périphérique (148).

d. Les lymphocytes Natural killer T

Les LNKT sont un sous-groupe de lymphocytes T dont le TCR reconnaît les antigènes microbiens présentés par les molécules CD1 (cluster de différenciation 1), une classe hautement conservée de molécules exprimées par les CPAs et impliquées dans la présentation d'antigènes non peptidiques. Ils sont CD3+ CD16+ et CD56+, et représentent moins de 5% de l'ensemble des lymphocytes T. Ils demeurent peu étudiés dans la tuberculose. Néanmoins, il a été montré que CD1 jouait un rôle dans l'immunité antituberculeuse par la présentation d'éléments lipidiques constituant la membrane de *M. tuberculosis* (149). L'activation des cellules NKT est grandement augmentée par le glycolipide-galactosyl céramide (GalCer). Il a été montré que les cellules NKT activées par GalCer via CD1d limitent la croissance intracellulaire de *M. tuberculosis*, notamment via la synthèse de granulozymes (149).

e. Les lymphocytes T régulateurs

Les lymphocytes T régulateurs (LTreg) se développent dans le thymus et les organes lymphoïdes périphériques suite à la rencontre avec des autoantigènes. Ils expriment les marqueurs de surface CD25, CD4 ainsi que le facteur de transcription FoxP3 ; des mutations inactivatrices de FoxP3 chez l'Homme conduisent à une maladie auto-immune systémique, démontrant l'importance des Lc Treg dans la tolérance du soi (76). Ils sont responsables de la synthèse de cytokines immunosuppressives telles que l'IL-10 et le TGF β . La survie et la fonction des LTreg dépendent principalement de l'IL-2, cytokine produite par les lymphocytes activés, et aussi du TGF β . *M. tuberculosis* serait capable de promouvoir l'expansion des LTreg, retardant la mise en place de l'immunité adaptative médiée par les cellules T effectrices et favorisant sa croissance à la phase précoce de l'infection (150) ; *a fortiori*, leur inhibition permettrait un meilleur contrôle de l'infection (151). D'autres travaux suggèrent que les LTreg permettraient d'éviter un emballement de l'inflammation et de mieux contrôler la réponse immunitaire (152).

f. Les lymphocytes T mémoires

Suite à une infection, les lymphocytes effecteurs disparaissent progressivement après l'élimination du pathogène. Une partie des lymphocytes activés se différencie en cellules mémoires. Ce contingent lymphocytaire persiste longtemps après l'éradication du pathogène par le système immunitaire, notamment grâce à des cytokines synthétisées par les tissus (IL-7, IL-15) (76). Ils sont présents dans les organes lymphoïdes, dans les tissus périphériques et dans la circulation. Les lymphocytes T mémoires (LTmem) n'exercent pas de fonction effectrice à l'état basal ; mais lors d'une seconde rencontre avec l'antigène, ils ont le potentiel de s'activer et d'induire une réponse spécifique beaucoup plus rapide que les cellules T naïves. Les Lc Tmem sont divisés en plusieurs sous-populations, notamment :

- Les LTmem centraux résident au sein des organes lymphoïdes et expriment le CCR7 et le CD62L (146). Ils sont responsables de l'expansion clonale rapide des cellules T spécifiques après un nouveau contact avec l'antigène.
- Les LTmem effecteurs expriment le CD45RO, et ont perdu l'expression du CCR7 et du CD62L (153). Ils se situent principalement dans les muqueuses et

autres tissus périphériques, où ils sont responsables de l'ascension rapide des cellules effectrices après un nouveau contact avec l'antigène.

Du fait de la persistance des antigènes mycobactériens après infection (état d'ITL) ou après une vaccination par le BCG, l'étude de la mémoire immunitaire spécifique s'avère difficile dans le cadre de la tuberculose ; on peut imaginer que l'activation chronique de l'immunité spécifique s'oppose au développement des LTmem (154). Des travaux comparant la production d'IFN γ par les LTCD4 chez des individus naïfs vis-à-vis de la tuberculose et des sujets vaccinés par le BCG ont montré que les taux d'IFN γ sont plus élevés chez les sujets vaccinés, bien qu'elle ne soit pas protectrice (155). Dans un modèle murin, Scanga et *al.* montrent que la suppression des Lc TCD4 chez des souris préalablement infectées entraîne une réactivation de la maladie, mais n'est pas associée à une diminution de la synthèse d'IFN γ (156). Ainsi, il semble que l'IFN γ joue un rôle non négligeable dans l'instauration de la mémoire immunitaire contre *M. tuberculosis*, bien que d'autres facteurs protecteurs dépendant des LTCD4 soient également impliqués (143).

E. Méthodes diagnostiques de l'ITL

Les tests de dépistage de l'ITL sont basés sur la mise en évidence de la réponse immunitaire cellulaire spécifique d'un individu vis-à-vis de *Mycobacterium tuberculosis*. Les deux méthodes immunodiagnostiques disponibles sont l'intradermoréaction à la tuberculine, ou IDR, et les tests utilisant la détection de l'IFN γ produite par les cellules T mémoires spécifique du bacille tuberculeux : les tests IGRAs. Les étapes et les bases immunologiques de ces tests sont résumées dans la Figure 20.

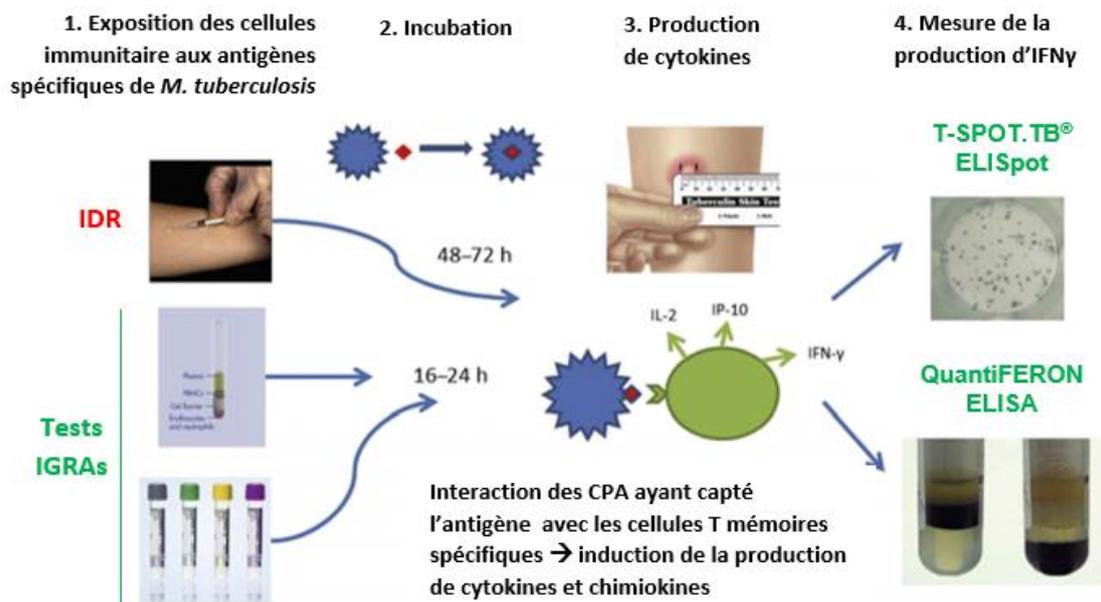


Figure 20 : Bases immunologiques des tests de dépistages de l'ITL. IDR: Intradermoréaction; IGRAs: Interferon gamma release assays; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; Elispot: enzyme-linked immunospot. Adapté de Haas et Bleknap, 2019 (5).

Il est important de considérer que ces tests ne permettent pas de faire un diagnostic de TM, comme rappelé dans les recommandations émises en 2019 par le HCSP (4). En outre, ce sont des tests « surrogate » de l'ITL ; ils ne permettent pas d'évaluer la persistance de bacilles vivants dans l'organisme après traitement antituberculeux ni de prédire l'évolution vers une TM. Enfin, ces tests sont dépendants du statut immunitaire du patient ; leur résultat devrait toujours être interprété en connaissance des éléments cliniques et biologiques pertinents.

1. L'intradermoréaction à la tuberculine

L'IDR ou test Mantoux est la plus ancienne méthode diagnostique de l'ITL, et a été pendant près de 100 ans le seul test existant, jusqu'à l'avènement des tests IGRAs. Peu après avoir découvert le bacille tuberculeux en 1882, Robert Koch identifia une substance protéique responsable de réactions cutanées à partir d'une culture de *M. tuberculosis* : la tuberculine (157). Au début du XX^{ème} siècle, cette protéine a été utilisée par Charles Mantoux en injection intradermique pour la mise au point d'un test diagnostique de la tuberculose. Actuellement, la molécule injectée pour la réalisation d'une IDR est un dérivé protéique purifié (DPP) obtenue à partir de souches de *M.*

tuberculosis (5). Cet extrait antigénique présente un grand nombre de peptides communs avec *M. bovis* et le BCG (6).

a. Principe du test

L'IDR consiste en l'injection strictement intradermique de 0.1 mL de l'extrait antigénique contenant les DPP mycobactériens à la face antérieure de l'avant-bras, afin de déclencher une réaction d'hypersensibilité retardée (l'hypersensibilité de type IV selon la classification de Gell et Coombs). Cette réaction met en jeu une réponse cellulaire T avec production de cytokines de la voie Th1 et se produit 24 à 48h après inoculation d'un antigène protéique à un individu préalablement sensibilisé (76). Un témoin de la bonne réalisation de l'injection est l'apparition immédiate d'une papule par soulèvement du derme au niveau du site d'injection (157). S'en suit une période d'incubation de 24 à 72h durant laquelle la réponse immunitaire cellulaire se déroule *in vivo* (voir les étapes concernant l'IDR en Figure 21).

Dans le cas d'un sujet sensibilisé, les CPA présentes au niveau du derme vont capter et présenter l'antigène via le CMH exprimé à leur surface. Les LTmem parvenus au site de provocation antigénique reconnaissent le peptide présenté et sécrètent en réponse des cytokines (IFN γ , IL2, TNF α ...) et chimiokines. La production de cytokines par les LTCD4 ainsi que les dommages tissulaires induits par les macrophages activés entraînent un accroissement local de la perméabilité vasculaire, favorisant l'œdème et le recrutement de cellules T et de monocytes au site d'injection (76). Il en résulte une induration localisée de la peau, qui peut être observée et mesurée.

b. Interprétation

La lecture d'une IDR est réalisée dans l'idéal 72h après l'injection, mais peut être différée jusqu'à 5 jours pour les sujets âgés pour lesquels l'activation des cellules T mémoires peut être plus tardive (5). L'interprétation repose sur la mesure de l'induration à l'aide d'une règle graduée. Le résultat est exprimé en millimètres (mm). L'érythème ne doit pas être pris en compte pour la mesure. Les critères d'interprétation d'une IDR ont été définis par l'arrêté du 13 juillet 2004 relatif à la pratique de la

vaccination par le BCG et aux tests tuberculiques, et sont résumés dans le Tableau 2 ci-dessous (158).

Tableau 2 : Interprétation d'un résultat d'IDR à la tuberculine. D'après l'argumentaire de la Haute autorité de santé (HAS) de juin 2015 sur les tests *in vitro* de dépistage de l'infection tuberculeuse latente par détection de production d'interféron gamma (158).

Chez une personne de plus de 15 ans	
0-4 mm	IDR négative. Infection tuberculeuse peu probable.
5-9 mm	IDR positive. Réaction due à une vaccination BCG ancienne ou à une infection tuberculeuse latente, mais non en faveur d'une infection récente.
10-14 mm	IDR positive. Infection tuberculeuse latente probable, le contexte aide à définir l'ancienneté.
≥ 15 mm	IDR positive. Infection tuberculeuse latente probablement récente.
Chez un enfant de moins de 15 ans	
Si aucune vaccination BCG : une IDR ≥ 5 mm évoque une infection tuberculeuse latente.	
Si BCG datant de dix ans ou plus : une IDR ≥ 10 mm évoque une infection tuberculeuse latente (entre 5 et 9 mm, il peut s'agir d'une réaction due au BCG ou d'une infection tuberculeuse latente).	
Si BCG datant de moins de dix ans : une IDR ≥ 15 mm évoque une infection tuberculeuse latente. Entre 10 et 14 mm, il peut s'agir d'une réaction due au BCG ou d'une infection tuberculeuse latente. Entre 5 et 9 mm, il s'agit plutôt d'une réaction due au vaccin.	

D'après l'Institut national de prévention et d'éducation pour la santé, 2009 (18)

Afin de faciliter l'interprétation correcte du test, un interrogatoire exhaustif précisera le statut du patient vis-à-vis de la vaccination par BCG, une notion de contagement tuberculeux ou encore l'existence d'un état d'immunodépression.

2. Les tests IGRAs

Au début des années 2000, de nouveaux tests ont été développés pour le dépistage de l'ITL dans l'objectif de s'affranchir des limites de l'intradermoréaction. Alors que l'IDR réalise une mesure indirecte de la lymphoprolifération liée à l'hypersensibilité retardée, les tests IGRAs sont basés sur la détection *in vitro* de la production de cytokines par les LTmem après l'incubation avec des antigènes spécifiques de *Mycobacterium tuberculosis*. La cytokine mesurée par ces tests est l'IFN γ , choisi en raison de son rôle majeur dans l'immunité antituberculeuse (143,159). Les antigènes utilisés sont les protéines ESAT-6 et CFP-10, codées par la région RD1 (cf. Partie B), ainsi que TB7.7. Ils ont pour caractéristique d'être absents des souches vaccinales composant le BCG et de la majorité des mycobactéries non tuberculeuses, hormis *M. marinum*, *M. kansasii*, *M. szulgai* et *M. flavescens* (160). Ces tests ont apporté l'avantage considérable de ne pas être influencés par la vaccination par le BCG ni par le contact avec la plupart des mycobactéries environnementales.

Il existe deux types de tests IGRAs à l'heure actuelle, se différenciant par la technique utilisée pour la mesure de l'IFN γ : le test QuantiFERON, utilisant la technique ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), et le test T-SPOT.TB[®], qui utilise la technique ELISpot (Enzyme-linked immunospot) (158).

a. Le test QuantiFERON

a1. Evolution de la technologie QuantiFERON

Les premiers tests QuantiFERON ont été développés par la société australienne Cellestis ; ils sont à l'heure actuelle commercialisés par la société Qiagen (Hilden, Allemagne), après rachat de Cellestis par cette dernière en 2011. Alors que le premier test de ce type, le QuantiFERON[®]-TB PDD, utilisait encore les DPP, les générations ultérieures (QuantiFERON[®]-TB Gold (QFT[®]-G) et QuantiFERON[®]-TB Gold in-tube (QFT[®]-GIT) ont été formulées avec les antigènes spécifiques de *M. tuberculosis* afin d'en améliorer les performances diagnostiques (161) . Le test de troisième génération, le QFT[®]-GIT, fut le premier à utiliser un kit de trois tubes spécifiques (un contrôle positif, un tube « Antigènes » et un contrôle négatif). Les parois du tube « Antigènes » sont coatées avec substrats antigéniques ESAT-6, CFP-10 et TB7.7. L'antigène TB7.7, très spécifique de *M. tuberculosis*, est un ajout par rapport à la génération précédente de test QuantiFERON afin d'en améliorer la sensibilité globale (143). La quatrième et dernière génération de tests commercialisés par Qiagen est le QuantiFERON[®]-TB Gold Plus (QTF[®]-Plus). Il se différencie de la version précédente par deux éléments :

- La suppression de l'antigène TB7.7 ;
- L'ajout d'un deuxième tube « Antigènes » contenant les antigènes tuberculeux ; le test comprend alors un tube « TB1 », semblable au tube du test QFT-GIT et contenant de longs fragments peptidiques de ESAT-6 et CFP-10 (> 15 acides aminés (aa)), présentés par le CMH II et activant les lymphocytes T CD4+ . Le deuxième tube « TB2 » contient en plus des peptides courts (entre 8 et 13 aa) d'ESAT-6 et CFP-10. Ces fragments sont présentés par le CMH I et activent par conséquent les lymphocytes T CD8+. Les populations lymphocytaires stimulées dans le tube « TB2 » sont donc les lymphocytes T CD4+ et CD8+.

L'étude de la réponse lymphocytaire T CD8+ pour le dépistage de l'ITL revêt un intérêt majeur car elle permet d'augmenter la sensibilité du test chez les sujets immunodéprimés avec une lymphopénie T CD4+ importante (162), comme les sujets infectés par le VIH. Dans une étude réalisée en 2014, Chiacchio et *al.* comparent les réponses lymphocytaires T après stimulation par des antigènes de la région RD1 de *M. tuberculosis* chez des sujets VIH+ présentant une TM versus des sujets VIH+ présentant une ITL. Il est montré que la production spécifique d'IFN γ en lien avec la réponse T CD8+ est détectable dans les deux groupes, avec une fréquence toutefois moins importante que la réponse T CD4+ (163). D'autres intérêts potentiels à l'étude de la réponse T CD8+ ont été mis en exergue dans la littérature, notamment :

- Pour la distinction entre une tuberculose active et une ITL (la réponse T CD8+, plus importante lors des TM, serait corrélée à la charge mycobactérienne) (164) ;
- Comme marqueur d'infection récente lorsque la différence entre les taux obtenus en TB2 et TB1 est supérieur à 0,6 UI/mL (165,166) bien qu'il existe des discordances pour les valeurs proches du seuil de positivité;
- Comme marqueur de suivi thérapeutique (Nyendak et *al.* rapportent une diminution de 58% de la réponse T CD8+ spécifique à 24 semaines de traitement antituberculeux) (167).

Des études comparant le QFT[®]-GIT et le QFT[®]-Plus dans différentes populations (soignants, immunodéprimés...) ont montré une bonne corrélation entre les deux générations de tests dans les populations à risque de TM (5,162,168,169).

a2. Principe du test et interprétation

Les tests QuantiFERON se basent sur la détection en technique ELISA de l'IFN γ produit par les cellules T après leur mise en contact avec les antigènes. Les principales étapes en sont résumées ci-dessous, en prenant l'exemple du test QFT[®]-GIT (Figure 21).

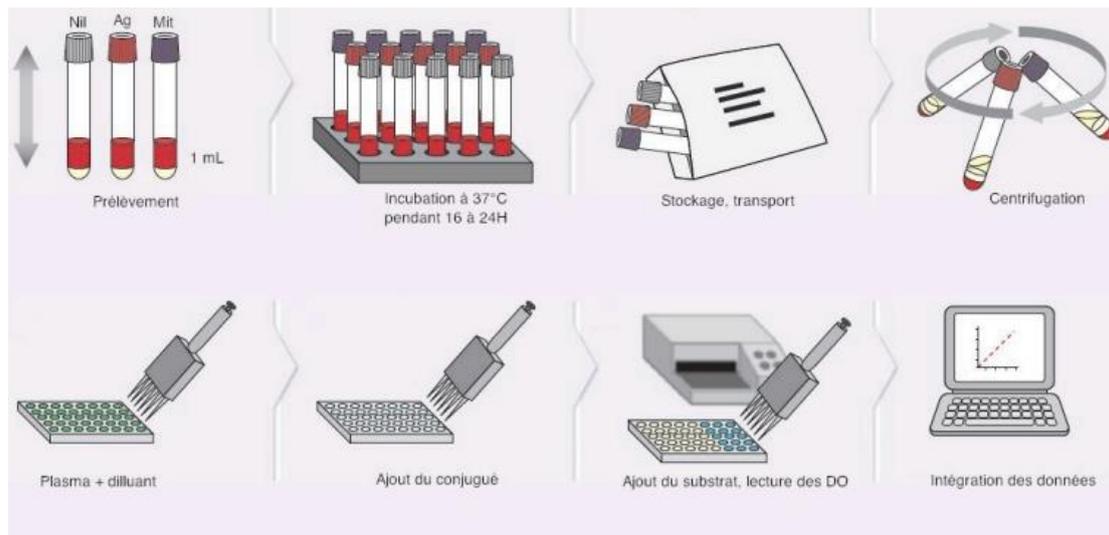


Figure 21 : Etapes de la réalisation du test Quantiferon®-TB Gold in-tube (QFT®-GIT) (143). Tiré de www.quantiferon.com.

Un volume de 1 mL de sang est prélevé dans trois tubes (concernant le test QFT®-GIT):

- un tube contrôle négatif « Nil », permettant de détecter une d'IFN γ en l'absence de toute stimulation ;
- un tube « Antigènes » contenant les antigènes spécifiques de *M. tuberculosis* (ESAT-6, CFP-10 et TB7.7) ;
- un tube contrôle positif contenant de la phytohémagglutinine (PHA), activateur non spécifique des lymphocytes T, permettant de s'assurer de leur capacité à synthétiser de l'IFN γ .

Les trois tubes sont placés à étuve à 37°C dans les 16h suivant le prélèvement, pour une durée de 16 à 24h. Ils sont ensuite centrifugés. Le taux d'IFN γ est mesuré de façon automatisée par technique ELISA, et exprimé en unités internationales (UI) après conversion de la densité optique (DO) obtenue grâce à une courbe d'étalonnage.

L'interprétation du test suit les règles indiquées dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Interprétation d'un test QuantiFERON (170).

Nul [UI/mL]	Antigène TB moins Nul [UI/mL]	Mitogène moins Nul [UI/mL] ¹	Résultat QFT	Rapport/Interprétation
≤ 8,0	< 0,35	≥ 0,5	Négatif	Infection au <i>M. tuberculosis</i> Improbable
	≥ 0,35 et < 25% de la valeur nulle	≥ 0,5		
	≥ 0,35 et ≥ 25% de la valeur nulle	n'importe lequel	Positif ²	Infection au <i>M. tuberculosis</i> probable
	< 0,35	< 0,5	Indéterminé ³	Résultats sont indéterminés pour la réponse à l'antigène TB
≥ 0,35 et < 25% de la valeur nulle	< 0,5			
> 8,0 ⁴	n'importe lequel	n'importe lequel		

La valeur obtenue en contrôle négatif est retranchée à celles des tubes « Antigènes » et du contrôle positif pour obtenir le résultat final, exprimé en UI/mL (158). Le résultat pourra être de trois ordres : négatif, positif ou indéterminé du fait de valeurs non interprétables dans les tubes contrôles. Le seuil de positivité est fixé à 0,35 UI/mL. Il existe une zone grise, entre 0,2 et 0,7 UI/mL, autour de laquelle un contrôle à distance sur un nouveau prélèvement est préférable.

b. Le test T-SPOT.TB®

b1. Principe du test et interprétation

Le test T-SPOT.TB® est commercialisé par la société Oxford Immunotec (Abingdon, Royaume-Uni). Il utilise la technologie ELISpot pour la détection de l'IFN γ à partir d'une suspension de cellules mononucléées (CMN) du sang périphérique. Les différentes étapes aboutissant à l'obtention des spots sont résumées en Figure 22 ci-dessous.

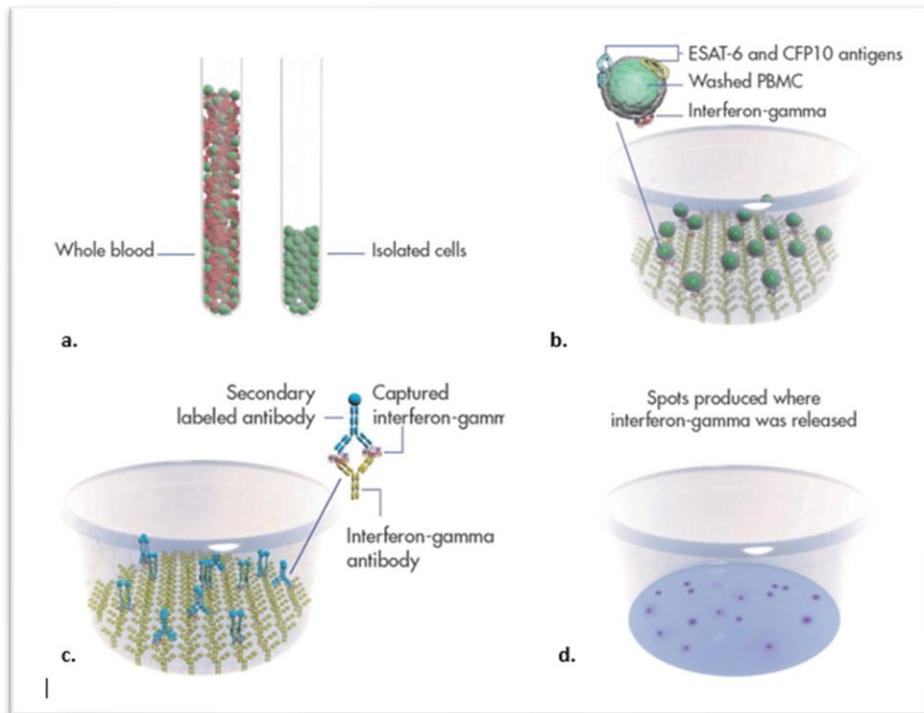


Figure 22 : Principe de l'ELISpot pour la réalisation du test T-SPOT.TB®. Image Issu du site internet d'Oxford immunotec® (www.tspot.com)

Les CMN sont isolées à partir d'un prélèvement de sang réalisé sur tube héparinate de Lithium (**a**). Après isolement, les CMN sont lavées et comptées afin de standardiser le nombre de cellules qui sera présent dans chaque puits du test. Une barrette d'un test T-SPOT.TB® utilise 4 puits recouverts d'anticorps anti-IFN γ :

- Un puits « contrôle négatif » servant à déceler la production d'IFN γ en dehors de toute stimulation ;
- Un puits « Panel A » dans lequel est ajouté l'antigène ESAT-6 ;
- Un puits « Panel B » dans lequel est ajouté l'antigène CFP-10 ;
- Un puits « contrôle positif » dans lequel est ajouté de la PHA.

Au cours de la culture cellulaire à 37°C +/- 5% CO $_2$ pendant 16 à 24h, l'IFN γ produit par chaque lymphocyte T mémoire spécifique de *M. tuberculosis* est capté par les anticorps coâtés au fond des puits (**b**). Après incubation, un deuxième anticorps anti-IFN γ et couplé à une phosphatase alcaline est ajouté (**c**). L'ajout d'un substrat coloré de l'enzyme permet la révélation du test sous la forme de spots (**d**). Le nombre de spots est compté pour chacun des quatre puits du test, de façon manuelle ou automatisée. Le nombre de spots présents dans le puits « contrôle négatif » est

retranché à celui obtenu pour chacun des panels A et B (5,158). Le résultat du test est ainsi exprimé en nombre de cellules T sensibles au bacille tuberculeux (formant des spots) pour 250 000 cellules (Figure 23).

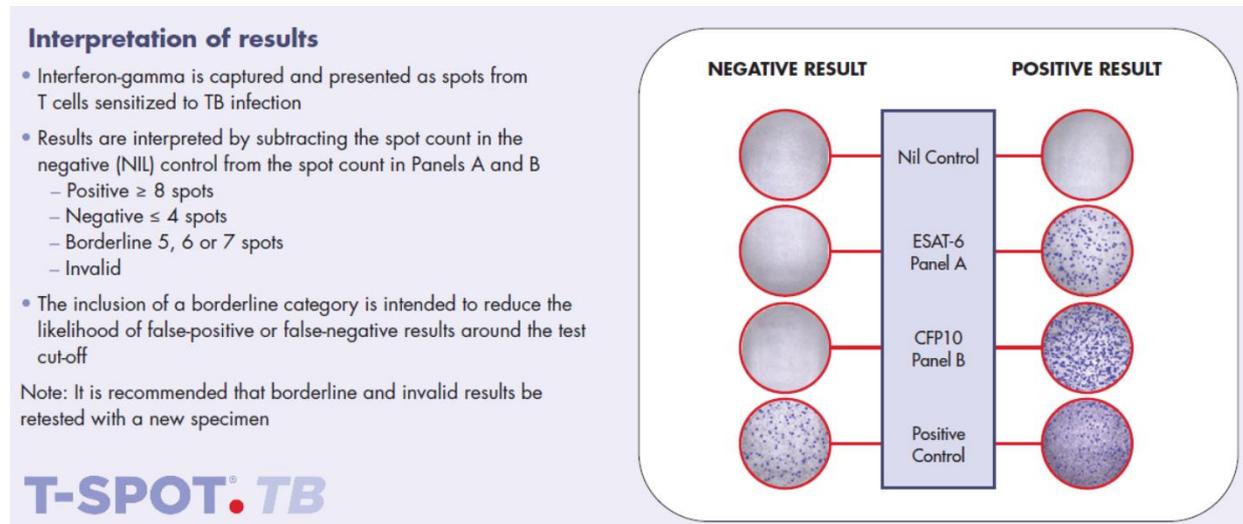


Figure 23 : Interprétation des résultats d'un test T-SPOT.TB®. Issu du site internet d'Oxford immunotec (www.tspot.com)

Le résultat du test pourra être : négatif, positif ou limite au seuil selon les critères définis en Figure 24, si les contrôles négatif et positif sont interprétables. Dans le cas contraire, le test sera indéterminé. Un résultat indéterminé est observé dans 2 à 20% des cas, principalement chez les jeunes enfants et chez les sujets infectés par le VIH avec une lymphopénie T CD4+ importante (171).

b2. Vers une approche automatisée de l'ELISpot

Bien que l'ELISpot fasse preuve de très bonnes performances pour le diagnostic de l'ITL (cf. paragraphes suivants), le recours à cette technique reste minoritaire à l'heure actuelle en France. Sa principale contrainte est le temps technique important imposé par l'isolement manuel des CMN par gradient de densité. De plus, afin d'assurer la viabilité des cellules, le sang prélevé pour le test doit être utilisé dans les 8 heures suivant le prélèvement. Ces éléments en font une technique lourde à mettre en place en routine pour l'immense majorité des laboratoires, et, lorsqu'elle s'applique, reste ponctuelle et limitée à de petites séries.

Une approche automatisée du test T-SPOT.TB® a été développée récemment par la société Oxford Immunotec. Elle consiste en l'utilisation du kit T-cell *Select*™, permettant la réalisation automatisé de l'isolement des CMN par tri magnétique. Cela permet d'augmenter de diminuer considérablement le temps technique habituellement nécessaire à l'isolement manuel classique des CMN par gradient de densité. Cette technologie est encore très peu répandue à l'heure actuelle; la principale plateforme ELISpot est située à Abingdon, au siège de la société Oxford Immunotec, et réalise les immunodiagnostic de la tuberculose pour l'ensemble du Royaume-Uni. On ne dispose malheureusement pas encore de données bibliographiques détaillant les processus utilisés par Oxford Immunotec pour l'automatisation de leur test T-SPOT.TB®, et présentant les résultats obtenus avec cette méthode ; notamment, on ne sait pas à l'heure actuelle si l'automatisation du processus d'isolement des CMN apporte une meilleure constance et reproductibilité des résultats par rapport à un isolement manuel par gradient de densité.

3. Performances cliniques des tests de dépistage de l'ITL

Il n'existe pas de *gold standard* permettant de déterminer si un individu est véritablement porteur de bacilles vivants et capables d'entraîner une forme active de tuberculose. La détermination des performances diagnostiques des tests de dépistages de l'ITL est donc difficile et ne peut être réalisé que par des méthodes indirectes. Des alternatives sont utilisées dans la littérature. La sensibilité est couramment évaluée dans une population atteinte de TM biologiquement confirmée, en prenant garde d'inclure des patients immunocompétents ; ou bien elle peut être évaluée spécifiquement dans une catégorie particulière (par exemple, chez les sujets VIH+). La spécificité est quant à elle déterminée, dans l'idéal, dans des populations en bonne santé issues de pays à faible incidence de la maladie, ne présentant pas de facteurs de risque et n'ayant pas été exposée au bacille (158).

Comme évoqué précédemment, l'IDR possède des performances diagnostiques limitées pour le diagnostic de l'ITL, d'autant plus dans les pays à faible incidence de la tuberculose et avec une bonne couverture vaccinale par le BCG. Une méta-analyse de 2010 évalue la sensibilité de l'IDR à 0,7 (IC à 95 %, 0,67-0,72). Sa spécificité varie selon la population étudiées entre 0,55 (IC 95% 0,38 – 0,7) à 0,95 (IC 95% 0,87 – 0,97) (172).

Concernant les tests IGRAS, le test QuantiFERON® s'avère être très spécifique de l'infection à *M. tuberculosis* et possède également une bonne sensibilité. D'après une étude de 2004 évaluant les performances du test de deuxième génération à l'aide d'une combinaison des réponses CFP-10 et ESAT-6, la spécificité du test estimée dans un groupe de sujet vacciné par le BCG et sans facteur de risque d'exposition au bacille était de 98,1% (IC 95% 0,95 à 0,99), et la sensibilité déterminée chez les patients atteints de TM était de 89,0% (IC 95% 0,82 – 0,94) (161). Plus récemment, une méta-analyse de 2019 évaluant le test QuantiFERON®-TB Gold Plus (QTF®-Plus) et analysant les résultats de 15 études montre une sensibilité de 0.94 (IC 95% 0,89-0,95) ainsi qu'une spécificité de 0.96 (IC 95% 0,94-0,97) (173). La technique ELISpot, tout en gardant une excellente spécificité, semble avoir une plus grande sensibilité que l'ELISA, notamment dans les contextes d'immunodépression. En 2020, la société Oxford Immunotec annonce une sensibilité de 96,5% et une spécificité de 97,1% pour le test T-SPOT.TB® (174). Ces résultats sont concordants avec les données de la littérature (8,9). En raison de sa très bonne sensibilité, le test T-SPOT.TB® constitue également une aide au diagnostic intéressante dans les cas de tuberculose disséminée (175) et les formes extra-pulmonaires (12,176). La technique ELISpot, grâce à la normalisation de la concentration des CMN et du comptage individuel de chaque cellule T productrice d'IFN γ , a une meilleure sensibilité que le QFT®-GIT chez le sujet infecté par le VIH avec une maladie avancée ; elle est toutefois plus faible que chez l'immunocompétent (10,11). Dans leurs travaux de 2016, Huo and *al.* montrent qu'une lymphopénie T CD4+ < 200/mm³ est associée à un taux de résultats indéterminés supérieur dans la population VIH+ dépistée par un test IGRA; il est légèrement plus élevé pour le test T-SPOT.TB® par rapport au test QFT®-GIT : respectivement 0.19 (IC 95 % 0.15-0.24 et 0,07 (IC 95 % 0.06-0.09). Lorsque la lymphopénie T CD4+ est moins importante, les performances sont similaires à celles obtenues chez les sujets immunocompétents (11,177). En population pédiatrique, la performance des tests IGRAs a longtemps été débattue en raison d'une fréquence plus importante de résultats indéterminés (178) et d'une sensibilité diminuée chez les enfants de moins de deux ans (179). Plusieurs études multicentriques suggèrent néanmoins que les performances de ces tests chez le nourrisson sont aussi bonnes que chez l'enfant plus âgé, et équivalentes à celles de l>IDR (sensibilité du QTF®-GIT et de l>IDR de 91.1% vs. 85.1% et spécificité de 98.1% vs. 97.9% respectivement d'après une étude italienne de 2014 portant sur 616 enfants de moins de 2 ans (180)).

Si l'âge jeune demeure un facteur prédictif de résultat d'IGRA indéterminé, le taux de tests indéterminés reste bas en pratique : moins de 4% avant l'âge de 5 ans et 1% au-delà d'après des travaux analysant de vastes données européennes, sans différence significative entre les tests QTF®-GIT et T-SPOT.TB® (181).

Les valeurs prédictives positives (VPP) et négatives (VPN) des tests diagnostiques sont déterminantes, entrant dans les prises de décisions de santé publique. Ces valeurs pronostiques sont difficiles à déterminer pour l'immunodiagnostic de la tuberculose car elles varient selon de nombreux facteurs, tels que le test utilisé, la population ciblée par le dépistage, la prévalence de l'infection dans la population générale et la durée du suivi (4). Le Tableau 4 ci-dessous, élaborée à partir des données de la littérature par le Haut Conseil de la Santé Publique dans son rapport de 2019 sur la prise en charge de l'ITL, expose les taux de progression vers la TM dans les principales populations à risque selon le résultat du test de dépistage.

Tableau 4 : Taux de progression vers la TM en cas de test positif ou négatif selon les populations.
Tableau issu du rapport du Haut Conseil de la Santé Publique : Infections tuberculeuses latentes. Détection, prise en charge et surveillance, 2019 (4)

Immunodiagnostic	Populations	Pourcentages de progressions si test positif	Pourcentages de progressions si test négatif
IDR à la tuberculine (seuil à 10 ou 15 mm)	Sujets contact	1,25% à 4,8%	0,17% à 0,84%
	Contacts même toit	4% à 13%	0,001%
	Contacts enfants	37% à 67%	0,002%
	Migrants	1,9% à 15,8%	0% à 1,23%
	Immunodéprimés	3,9 à 14,3%	0,59% à 8,57%
	Atteints du VIH	7,61 à 14,3%	0,59 à 0,9%
Tests IGRA	Sujets contact	1,96% à 12,9%	0,56%
	Contacts enfants	2,7% à 12%	0,1% à 0,3%
	Migrants	0,9% à 5,2%	0,17% à 3,3%
	Immunodéprimés	0% à 14,5%	0% à 3,3%
	Atteints du VIH	8,3% à 14,5%	0 à 0,9%

4. Avantages et limites des différents tests de dépistage de l'ITL

a. L'IDR

Depuis quelques années, les tests IGRAs sont devenus la référence pour la détection de l'ITL; en France, ils sont majoritairement recommandés en première intention (4). Néanmoins, l'IDR n'a pas été totalement supplantée, et continue d'être utilisée à travers le monde en raison de son faible coût et de la simplicité de sa mise en œuvre, permettant de dépister rapidement et simultanément un grand nombre de personnes lorsque le suivi à 2 ou 3 jours peut être assuré (5). En outre, son interprétation, basée sur de vastes données de la littérature, ne pose pas de difficultés.

Bien que l'IDR ait longtemps été le test de référence pour le dépistage des ITL, il ne peut être considéré comme un *gold standard* du fait de ses nombreuses limites. Une des principales est son manque de spécificité. Un grand nombre d'antigènes contenus dans les DDP de l'IDR sont partagés par *M. bovis* et des mycobactéries atypiques (6) ; ainsi, des résultats faussement positifs peuvent être obtenus chez les sujets vaccinés par le BCG ou exposés à des mycobactéries non impliquées dans la TM. Les résultats d'une revue de la littérature publiée en 2006 et visant à évaluer la spécificité de l'IDR montre que lorsque la vaccination est réalisée après l'âge de un an, elle entraîne un plus grand nombre de fausse réaction sur l'IDR (41.8% des sujets étudiés (n=5314)). En revanche, le BCG a peu d'impact sur l'interprétation de l'IDR lorsque la vaccination est réalisée dans les jours ou semaines suivant la naissance et l'IDR réalisé à 10 ans ou plus de l'acte vaccinal (182).

L'IDR possède également des limites en termes de sensibilité. Le risque de faux négatif est présent dans de nombreuses situations où l'hypersensibilité retardée est diminuée, telles que les contextes d'immunodépression, les TM évoluées ou de forme grave (miliaire), les néoplasies, certaines maladies virales (mononucléose...) ou bactériennes sévères (158). Cela est d'autant plus préjudiciable qu'il concerne des populations particulièrement à risque de développer une TM. Concernant les patients infectés par le VIH, les travaux de Graham et *al.* ont montré qu'un seuil de positivité de l'IDR à 2 mm serait plus pertinent pour réduire le nombre de faux négatifs par rapport au seuil de 5 mm défini pour ces patients (183).

Un effet « booster » peut être observé chez les personnes ayant déjà eu une plusieurs IDR (souvent des professionnels de santé), et peut compliquer l'interprétation du test.

Il s'agit d'une augmentation de l'induration lors d'une deuxième IDR, alors que le test précédent était négatif ; cela correspond à une réactivation de l'hypersensibilité retardée chez une personne ayant une ITL et ne doit pas être confondu avec un virage tuberculinique lié à une infection récente. Le contexte épidémique et les antécédents du patient seront alors indispensables à l'interprétation (183)

Enfin, l'IDR est un test peu standardisé, dont la lecture et l'interprétation restent opérateur-dépendantes. L'injection intradermique d'une dose précise peut être difficile pour une personne peu entraînée. La nécessité de deux visites à 48-72h d'intervalle peut constituer une contrainte pour les patients, entraînant de nombreux perdus de vue.

b. Les tests IGRAs

Les tests IGRAs présentent plusieurs avantages par rapport à l'IDR. Ils possèdent une excellente spécificité et ne sont pas influencés par une vaccination antérieure du patient par le BCG. En outre, leur réalisation ne nécessite pas de seconde visite pour la lecture du test, limitant la problématique des perdus de vue (158). Leur réalisation est standardisée, plus ou moins automatisée en fonction du test réalisé. Ils n'occasionnent pas d'effet booster. Leur interprétation est plus aisée et objective par rapport à la lecture d'une IDR ; l'intégration d'un contrôle positif à chaque test permet notamment une meilleure fiabilité du résultat dans les contextes d'immunodépression. Enfin, les résultats étant édités sous la forme d'un compte rendu imprimables ou transférés informatiquement, ils sont faciles à transmettre et à archiver dans le dossier du patient (5).

Comme décrit précédemment, les tests IGRAs trouvent leur limite lorsqu'ils sont réalisés chez l'immunodéprimé ; dans ce contexte, leur sensibilité est fortement altérée. Ces tests manquent également de sensibilité lorsqu'ils sont réalisés de manière trop précoce, soit moins de trois mois par rapport au contage infectieux ; ce délai est nécessaire à l'instauration de la réponse immunitaire spécifique et détectable contre *M. tuberculosis*. A contrario, un contage tuberculeux trop ancien peut s'associer à une diminution de la fréquence des LTmem effecteurs dans le sang, pouvant occasionner des tests faussement négatifs (160). Des faux négatifs ont aussi été décrits chez certaines ethnies dont les gènes du CMH diffèrent de la population étudiée pour la mise au point des tests et pour lesquelles les antigènes ESAT-6 et CFP-10

seraient mal présentés (4). Bien que la spécificité des tests IGRAs soit très élevée, des réactions croisées existent lors des infections à mycobactéries atypiques : *M. marinum*, *M. kansasii* et *M. szulgai*. De faux positifs peuvent également être obtenus si le patient est sous thérapeutique contenant de l'IFN γ , comme cela peut être le cas lors de la granulomatose septique chronique (184).

A l'inverse de l'IDR qui est un test diagnostique simple, peu coûteux et ne nécessitant que très peu de matériel, la mise en œuvre d'un test IGRA par un laboratoire requiert l'acquisition d'un équipement conséquent et nécessite un personnel formé. Un des paramètres critiques dans la réalisation des tests IGRAs est le non-respect des critères pré-analytique ; cela constitue une des principales sources de variabilité des résultats (185). Les sources de variabilités rapportées dans la littérature concernant les tests QuantiFERON sont notamment :

- **l'heure de prélèvement** : les réponses aux antigènes sont diminuées sur les échantillons prélevés le matin (186) ;
- **le délai entre le prélèvement sanguin et l'incubation** : par rapport à une incubation immédiate, un délai de 6 à 12h avant l'incubation est à l'origine de taux de conversions positif-négatif de 19% et 22% respectivement chez des patients à risque d'ITL, et d'une augmentation du taux de résultats indéterminés (187) ;
- **le volume de sang prélevé** : il existe une relation inverse entre le volume de sang et la proportion de résultats positifs (185).
- **L'agitation des tubes** : une agitation vigoureuse du tube est à l'origine d'une augmentation de la production d'IFN γ en réponse à la stimulation antigénique (185) ;

La durée de l'incubation n'a pas été rapportée comme source de variabilité pour le test QTF[®]-GIT, même lorsqu'elle est prolongée jusqu'à 24h (185) ; il en est de même lorsque le plasma de l'échantillon testé a été conservé 4 semaines à 4°C ou -20°C ou lorsque les PBMC ont été conservées à -80°C pour le test T-SPOT.TB[®] (186). Au niveau de la phase analytique, une forte variabilité des résultats quantitatifs inter-laboratoires a pu être rapportée, pour des séries différentes ; cela donne lieu à des résultats discordants pour des valeurs proches du seuil de positivité (188). Dans une étude de 2013 visant à évaluer la répétabilité du test QTF[®]-GIT et portant sur 1086

tests issus de 543 patients, Metcalfe et *al.* montrent une concordance élevée des résultats ($\kappa = 0,84$; IC 95%, 0,79-0,90). La variabilité globale était de +0,6 UI/ml avec un coefficient de variation (CV) à 14% ; la variabilité dans zone 0,25 à 0,8 UI/ml était de + 0,24 UI/ml, avec un CV à 27% (189). La reconnaissance de ces sources de variabilités ont conduit à la définition d'une zone grise comprise entre 0,2 UI/ml à 0,70 ou 1 UI/ml. Un résultat situé dans cette zone devra être interprété avec prudence et un contrôle à distance est habituellement préconisé (5). Des facteurs de variabilité ont également été décrit dans les étapes du processus de fabrication des réactifs par le fournisseur (par exemple, des températures extrêmes lors de la livraison ou la contamination d'un lot de réactifs) (190). Des précautions devraient être prises pour s'affranchir de ces différentes sources de variabilité, à chacune des étapes de la prise en charge du test ; s'assurer d'un temps d'acheminement limité à température ambiante, d'un volume de sang conforme dans chaque tube et du respect de l'ordre de prélèvement des tubes au niveau de la phase pré-analytique sont autant de points cruciaux. Avec le suivi des résultats positifs et indéterminés, l'automatisation d'un maximum d'étapes du processus analytique s'avère être une stratégie pour minimiser la variabilité des tests IGRAs au sein d'un laboratoire.

Deuxième partie

Matériels et méthodes

A. Le laboratoire d'immunologie cellulaire du CHU de Lille : présentation générale et organisation

L'Institut d'Immunologie du CHU de Lille appartient au pôle Biologie-Pathologie-Génétique, pôle dirigé par le Pr. Thierry Brousseau. Il se situe au 2^{ème} étage du centre de Biologie-Pathologie-Génétique (CBP). Depuis 2007, le CBP regroupe les différents laboratoires du CHU de Lille, hormis la génétique, la biologie de la reproduction et le laboratoire d'immuno-hématologie de l'Etablissement Français du Sang (EFS).

L'Institut d'Immunologie est dirigé par le Pr. Myriam Labalette, et s'articule autour de quatre unités fonctionnelles (UF) (191) :

- **HLA – Transplantation (UF 9874).** Cette unité s'articule en trois grands domaines : transplantation d'organes, allogreffe de cellules souches hématopoïétiques et typages HLA dans le cadre des associations HLA-maladies.
- **Déficits immunitaires et immunothérapies (UF 9879).** C'est au sein de cette unité qu'est explorée la réponse immunitaire de type cellulaire, et que sont réalisés les tests immunologiques pour le dépistage de l'ITL étudiés dans ce travail de thèse. L'activité de l'UF est également partagée avec le dosage des immunosuppresseurs et la réalisation de phénotypages lymphocytaires post-greffe pour le suivi des patients transplantés, en lien avec l'UF HLA-Transplantation, ainsi que l'exploration des déficits immunitaires primitifs ou secondaires. Les techniciens et ingénieurs du laboratoire partagent ainsi leur temps sur les automates d'immuno-analyse, la cytométrie en flux, la spectrométrie de masse et le plateau de culture cellulaire (192). Cette unité est dénommée « laboratoire d'immunologie cellulaire » dans ce travail.
- **Maladies autoimmunes, allergies et HES (syndromes hyperéosinophiliques) (UF 8825).** L'unité assure l'exploration des maladies

autoimmunes, de l'allergie et des pathologies en lien avec le système du complément.

- **Gestion commune et innovations en immunologie (UF 8828).**

En plus de la réalisation des différentes analyses de biologie médicale, l'Institut d'Immunologie est activement impliqué dans des missions d'enseignement et de recherche.

Le laboratoire d'immunologie cellulaire prend en charge des prélèvements provenant des services du CHU de Lille, mais aussi des centres hospitaliers (CH) et des laboratoires extérieurs. L'acheminement des prélèvements et leur parcours jusqu'au laboratoire sont différents selon leur provenance (Figure 24) :

- Les échantillons prélevés dans l'un des services du CHU de Lille sont transmis au CBP directement via le système de Transport Automatique Léger (TAL). Ils parviennent au centre de Réception – Tri – Enregistrement (RTE), où les agents les enregistrent via leur étiquette code-barres sur le logiciel MOLIS (système d'information du laboratoire (SIL) utilisé au CBP) et effectuent un tri afin de les attribuer au secteur réalisant les analyses prescrites.
- Les échantillons prélevés dans un service de CH ou dans un laboratoire extérieur sous-traitant une partie ou la totalité des analyses sont acheminés au CBP par l'intermédiaire d'une navette ou transporteur. Ils sont pris en charge par le service des analyses extérieures (AE) ; les agents effectuent un enregistrement manuel des échantillons sur MOLIS, leur attribuent une étiquette code-barres « interne », les trient en fonction du laboratoire exécutant l'analyse enregistrée et les déposent au niveau du RTE.

Les prélèvements, toutes origines confondues, sont ensuite envoyés régulièrement par les agents du RTE dans les différents laboratoires du CBP via un système de Télébac. Le Télébac véhiculant les tubes pour l'Institut d'Immunologie est situé au 2^{ème} étage, à proximité des laboratoires. Une alarme sonore et visuelle se déclenche lorsque des prélèvements ont été acheminés. Ils sont alors réceptionnés et pris en charge par les des techniciens du laboratoire dans les plus brefs délais, durant les heures ouvrables.

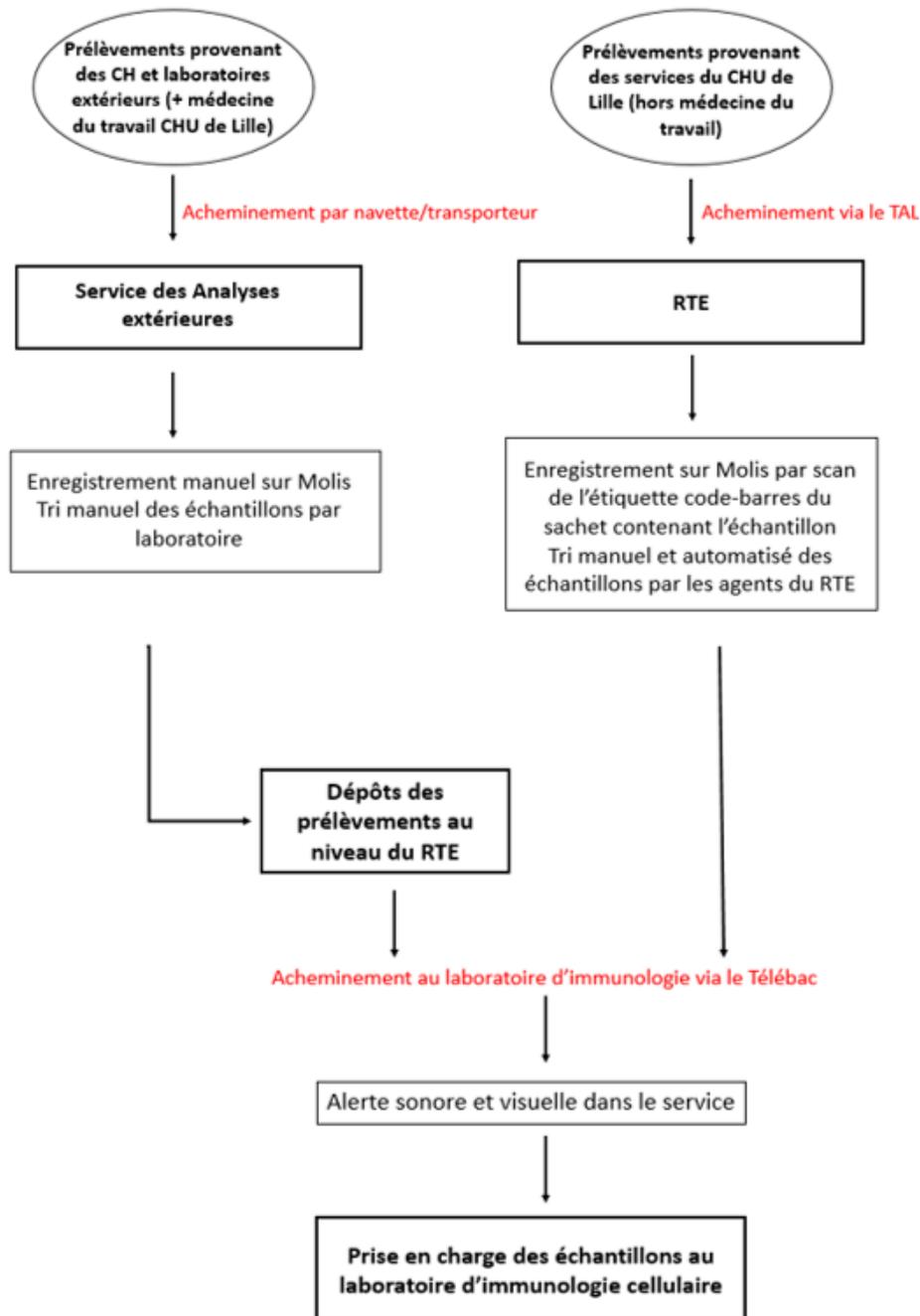


Figure 24 : Circuits d'acheminement des échantillons depuis le site de prélèvement jusqu'à l'Institut d'Immunologie. TAL : Transport automatique léger ; RTE : Réception - Tri – Enregistrement. Inspiré de la procédure interne du laboratoire d'immunologie, déficits immunitaires et immunothérapies (UF 9879), CHU de Lille - ANA-MO-IMC-003 : Prise en charge des échantillons au laboratoire d'immunologie cellulaire. Applicable au 24/01/2019.

Les heures ouvrées du laboratoire d'immunologie cellulaire s'étendent de 8h30 à 17h30, du lundi au vendredi. Les prélèvements y sont pris en charge par les techniciens en poste. En dehors des heures ouvrées, les prélèvements parvenant au RTE ou aux AE sont enregistrés et stockés sur des portoirs dédiés aux différents

secteurs en attendant leur prise en charge ultérieure, dans le respect des conditions pré-analytiques requises pour chacune des analyses (par exemple : centrifugation après réception, conservation au réfrigérateur entre +2 et +8°C, incubation à 37°C ...).

B. Périodes d'intérêts

Ce travail s'intéresse aux tests IGRAs réalisés au laboratoire d'immunologie cellulaire du CHU de Lille dans le cadre du diagnostic de la tuberculose latente et au passage de la technique ELISA à la technique ELISpot automatisée en première intention. Cette transition a eu lieu dans un contexte sanitaire très particulier : celui de la crise sanitaire liée à la Covid-19 et le confinement national mis en place tout juste un mois après le lancement des tests T-SPOT.TB® en routine. Afin de comparer les deux méthodes et pour permettre une analyse pertinente des résultats, il est nécessaire de définir différentes périodes, correspondant d'une part à des enjeux et actions précis au sein de l'Institut d'Immunologie, et d'autre part s'adaptant à l'évolution de la crise sanitaire. Les différentes périodes d'études sont figurées ci-dessous (Figure 25).

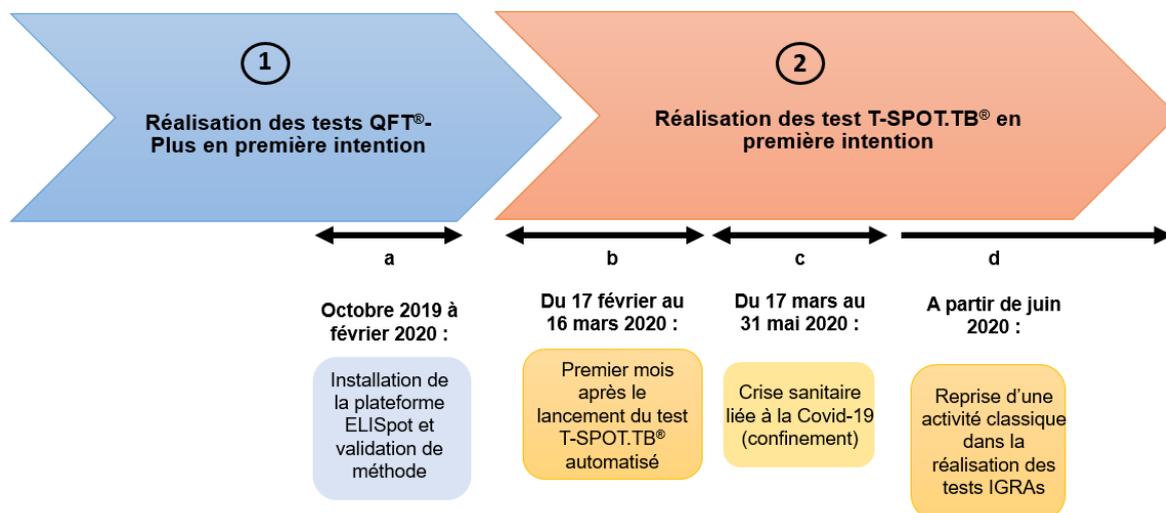


Figure 25 : Frise chronologique illustrant les périodes d'intérêts étudiées pour l'analyse du changement de méthode de première intention pour la réalisation des tests IGRAs au laboratoire d'immunologie du CHU de Lille. Les flèches noires représentent les différentes sous-périodes englobant le changement de méthode.

Période n°1 : correspond à la période durant laquelle le test QFT®-Plus était la technique réalisée en première intention. Le test T-SPOT.TB® pouvait être réalisé en seconde intention dans des cas précis, après isolement manuel des cellules mononucléées du sang (CMN) (cf. paragraphes suivants). Les données analytiques et

post-analytiques sur les tests QFT®-Plus utilisées dans ce travail correspondent aux tests réalisés entre septembre et octobre 2019. Ces données ont été recueillies rétrospectivement.

La sous-période **a** : correspond à la période durant laquelle la plateforme ELISpot a été installée au laboratoire d'immunologie, suivie de la validation de méthode. Cette période débute en octobre 2019 et s'achève en février 2020 avec le lancement du test T-SPOT.TB® en routine. Elle est incluse dans la période n°1, le test QFT®-Plus étant le test IGRA de première intention jusque février 2020.

Période N°2 : correspond à la période durant laquelle le test T-SPOT.TB® devient la technique réalisée en première intention. Cette période commence en février 2020 avec le lancement du test T-SPOT.TB® en routine, et peut être segmentée en plusieurs sous-parties :

- Sous-période **b** : débute le 17 février 2020, soit le jour du lancement de la technique ELISpot en routine, et s'achève le 16 mars 2020, date à laquelle furent prononcées les mesures gouvernementales instaurant le confinement de la population sur le territoire français en lien avec la Covid-19 (d'après le Décret n° 2020-260 du 16 mars 2020 portant réglementation des déplacements dans le cadre de la lutte contre la propagation du virus Covid-19).
- Sous-période **c** : s'étend du 17 mars 2020 au 31 mai 2020. Cette période correspond à la durée des mesures de confinement national strict consécutives à la crise sanitaire, en raison de la pandémie de Covid-19. Bien que les mesures de confinement aient pris fin à la date du 10 mai 2020, cette période est définie jusqu'à la fin du mois de mai, le laboratoire d'immunologie n'ayant retrouvé une activité de routine classique qu'à cette date.
- Sous-période **d** : débute en juin 2020 et correspond à la reprise d'une activité classique du laboratoire concernant la réalisation des tests IGRAs, hors période de confinement liée à la Covid-19. Les données analytiques et post-analytiques sur les tests T-SPOT.TB® et QFT®-Plus réalisés en septembre 2020 et octobre 2020 ont été recueillies de manière rétrospective, et seront comparées aux données sur les tests IGRAs recueillies en septembre et octobre 2019 sur la période 1.

Cette frise chronologique sera reprise plusieurs fois dans la partie « Résultats », en mettant en évidence la ou les périodes concernées au début de chaque sous-partie. Les périodes non concernées seront grisées. Les données sur les tests IGRAs recueillies et analysées dans ce travail seront également ajoutées à cette occasion.

C. Les trois phases de l'examen de biologie médicale : application aux tests IGRAs réalisés au laboratoire d'immunologie cellulaire du CHU de Lille

Comme défini dans l'article L6211-2 du code de santé publique, tout examen de biologie médicale (EBM) se déroule en trois phases (193):

1. La phase pré-analytique : elle comprend le prélèvement de l'échantillon biologique, le recueil des éléments cliniques pertinents, le transport et la conservation de l'échantillon jusqu'au lieu où il sera analysé ;
2. La phase analytique : est définie comme le processus technique permettant l'obtention du résultat d'analyse biologique ;
3. La phase post-analytique : elle comprend la validation des résultats ainsi que leur interprétation contextuelle, la communication appropriée des résultats au prescripteur et, dans certains cas, au patient (selon les modalités fixées à l'article L. 1111-2).

Les tests IGRAs étudiés dans ce travail de thèse, les tests QFT®-Plus et T-SPOT.TB®, sont des EBM et sont intégralement concernés par les trois phases décrites précédemment. La Figure 26 représente, de manière schématique, l'application des différentes phases de l'EBM à un test IGRA réalisé au laboratoire d'immunologie cellulaire du CHU de Lille.

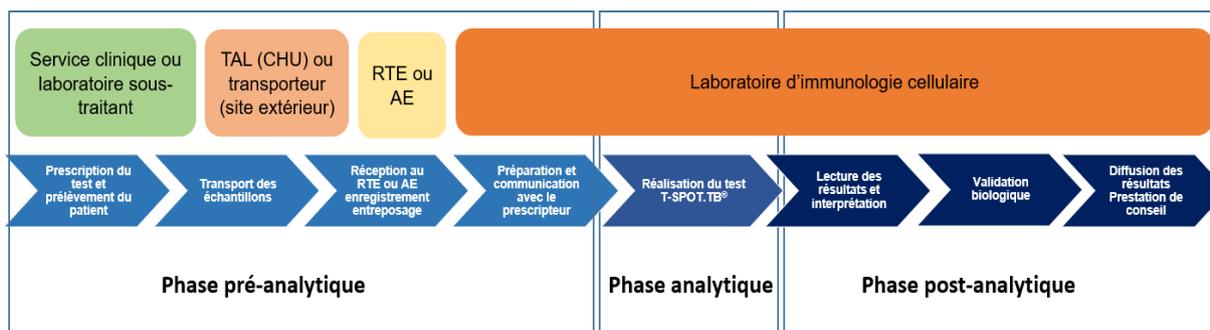


Figure 26 : Segmentation du processus d'un test IGRA réalisé au laboratoire d'immunologie cellulaire du CHU de Lille selon les trois phases de l'examen de biologie médicale : pré-analytique, analytique et post-analytique. De haut en bas : lieux, étapes et intitulés de chaque phase. AE : service des Analyses extérieures ; RTE : service de Réception-Tri-Enregistrement ; IDE : Infirmière diplômée d'état ; TAL : Transport automatique léger. Inspiré d'une figure publiée par Hofman et al. (194)

Cette figure sera utilisée à plusieurs reprises dans la partie « Résultats », au début de chaque sous-parties des résultats correspondant à la phase étudiée. Il y sera ajouté les différents acteurs entrant en jeu dans chacune des phases.

D. Processus des différents tests IGRAs au laboratoire d'immunologie du CHU de Lille

1. T-SPOT.TB® (Oxford Immunotec) avec extraction automatisée des cellules mononucléées du sang

Le test T-SPOT.TB® (Oxford Immunotec) permet de détecter les lymphocytes T effecteurs répondant à une activation par des antigènes spécifiques des mycobactéries du complexe *tuberculosis*, dont *M. tuberculosis* : les protéines ESAT-6 et CFP-10. Ce test permet de quantifier individuellement les cellules T activées par ces antigènes en utilisant la technique ELISpot. Une quantité définie de cellules est incubée avec ou sans les antigènes spécifiques de *M. tuberculosis* dans les puits d'une plaque dont le fond est recouvert d'anticorps de capture de l'IFN γ . L'ensemble des étapes nécessaires à la réalisation du test T-SPOT.TB® est détaillé dans la procédure interne du laboratoire d'immunologie cellulaire ANA-FI-IMC-053, applicable au 24 juillet 2020 (195).

a. Exigences pré-analytiques

Le test T-SPOT.TB® est effectué sur une préparation de CMN à partir d'un prélèvement sanguin devant respecter les critères pré-analytiques suivants :

- Prélèvement sur tube héparine de lithium de 7mL BD Vacuitainer® Heparin PST. Les tubes héparine de lithium avec gel (type BARRICOR®) ne sont pas conformes pour la réalisation du test. L'utilisation de tubes EDTA (acide éthylène diamine tétra-acétique) n'est pas recommandée.
- Un volume minimum de 5 ml de sang est nécessaire pour la réalisation du test d'après les recommandations du fabricant.
- Immédiatement après le prélèvement, le tube doit être retourné 8 à 10 fois pour s'assurer de la bonne mise en contact du sang avec l'anticoagulant.
- La date et l'heure de prélèvement doivent être impérativement renseignées par le service prescripteur (via le logiciel de prescription CIRUS pour les services du CHU de Lille, ou précisé sur le bon de demande d'examen pour les laboratoires et hôpitaux extérieurs au CHU.
- Acheminement au laboratoire à température ambiante. Les échantillons ne doivent pas être réfrigérés ou congelés.
- Le vendredi, le prélèvement doit pouvoir être réceptionné au laboratoire avant 16h pour être pris en charge le jour même.

L'utilisation du kit de réactifs T-Cell *Select*™ (Oxford Immunotec) pour la préparation automatisée des échantillons permet d'utiliser le test T-SPOT.TB® avec des échantillons de sang conservés jusqu'à 54 heures à température ambiante (18 à 25°C) (d'après <https://www.tspot.com/uk/>). Les échantillons sont acheminés au CBP à température ambiante par le TAL (Transport automatique léger) pour les services du CHU de Lille ou par navette pour la médecine du travail du CHU de Lille et les laboratoires et services extérieurs).

En cas de non-respect des critères pré-analytiques, une non-conformité est saisie sur MOLIS par ajout du code « INCPRE » sur le dossier correspondant. La raison de la non-conformité, l'analyse concernée et des explications complémentaires seront renseignées (utilisation de codes pré-enregistrés).

b. La plateforme ELISpot pour la réalisation en première intention des tests T-SPOT.TB® : présentation des différents automates et du système informatique

La plateforme ELISpot automatisée ayant permis le passage à la réalisation des tests T-SPOT.TB® en première intention à l'Institut d'Immunologie du CHU de Lille est composée de trois appareils :

- **le préparateur d'échantillons Microlab® Nimbus & Presto** : il est composé du Hamilton Microlab® NIMBUS et du Thermo Fisher scientific KingFisher Presto (Figure 27).

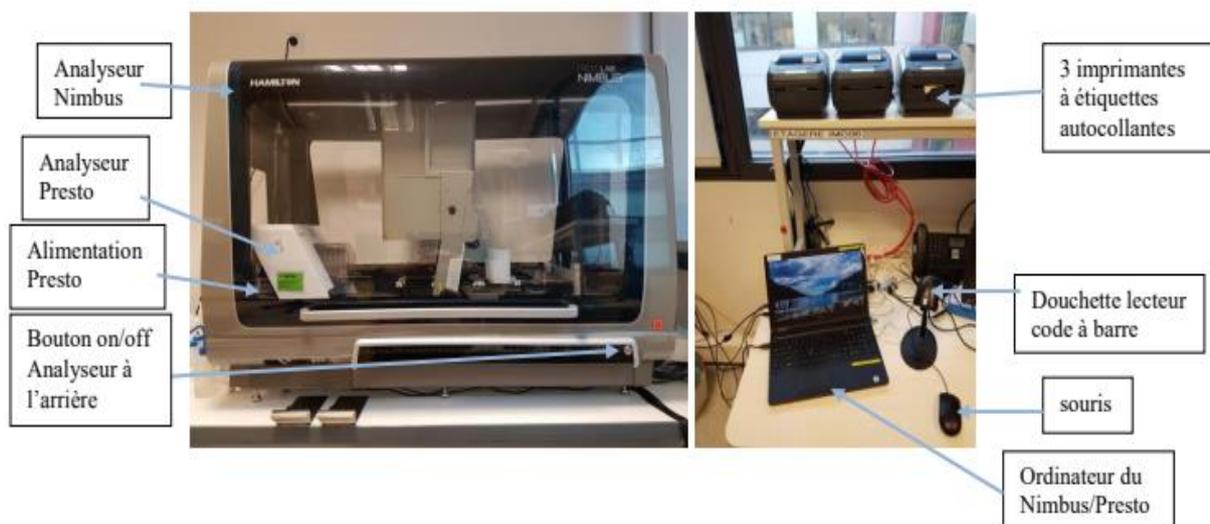


Figure 27 : Composition du préparateur d'échantillons Microlab Nimbus & Presto (196).

- Le Microlab® Nimbus est un système automatisé de manipulation de liquides. Ce préparateur d'échantillons est modulable et possède quatre canaux différents, permettant la préparation de quatre échantillons sanguins simultanément. Des emplacements sont dédiés sur l'automate pour le positionnement des tubes de sang, des plaques, des flacons de réactifs et autres consommables. L'automate est piloté par le logiciel « Hamilton Run control », dans lequel sont enregistrés les paramètres concernant les plaques, réactifs et consommables utilisés. Il peut être couplé en interne à différents modules permettant divers traitements d'échantillons et réactifs (par exemple : extracteur d'ADN, plaque magnétique, bloc chauffant). Au laboratoire d'immunologie cellulaire, c'est un module trieur magnétique « Presto » qui a été ajouté à l'appareil.

- Le module KingFisher Presto permet la purification d'éléments à partir du sang total. Le module est programmable à partir du logiciel du Nimbus et est intégré à part entière dans le processus de préparation cellulaire. Il est utilisé dans les étapes de préparation des échantillons pour réalisation du test T-SPOT.TB[®], et permet de réaliser l'isolement des cellules mononucléées (CMN) à partir d'un échantillon de sang total de façon automatisée.

Lors du processus de préparation cellulaire pour la réalisation du test T-SPOT.TB[®], le Nimbus réalise la dilution de l'échantillon de sang avec un mélange de réactifs (Master Mix) provenant du coffret T-Cell *Select*[™] (Oxford Immunotec) pour la réalisation d'une sélection positive des CMN par tri magnétique.

Les préparations ainsi obtenues sont contenues dans une plaque et sont redirigées sur le Nimbus. Ce dernier utilise une plaque de 96 puits pour mettre en contact les suspensions de CMN de chaque patient avec un marqueur de viabilité, en vue de la réalisation de la numération des CMN viables par le cytomètre Guava[®] (voir ci-dessous). Une fois la numération cellulaire des CMN effectuée, les résultats sont envoyés dans le logiciel MAPP à partir duquel sera calculée la dilution nécessaire pour chacune des suspensions afin de normaliser le nombre de cellules qui sera distribué avec les antigènes dans la plaque à incuber.

- **Le cytomètre en flux Guava[®] EasyCyte system 5HT** (Luminex) (Figure 28): est utilisé dans les étapes de préparation cellulaire des échantillons. Selon le principe général de la cytométrie en flux, la suspension cellulaire circule dans une veine liquide, permettant le passage de chaque cellule devant un faisceau laser. L'appareil possède un laser bleu permettant d'exciter les fluorochromes à 488 nm et cinq détecteurs permettant de détecter différentes intensités de fluorescence. Les échantillons peuvent être analysés sur des plaques de 96 puits ou dans des godets de 1,2 à 1,5 mL. Le cytomètre réalise également le comptage de cellules afin de déterminer les concentrations cellulaires dans les échantillons. L'appareil possède son propre logiciel : « guavasoft 3.3. », dont il existe différents modules : ViaCount pour la numération cellulaire et les marqueurs de viabilité, InCyte pour la cytométrie en flux trois couleurs, easyCheck pour le contrôle qualité interne (CQI) de l'appareil et Cleaning pour la maintenance quotidienne. Son mode opératoire est décrit dans la procédure

interne du laboratoire d'immunologie « ANA-MO-IMC-012 – cytomètre en flux guava – mode opératoire », applicable au 17/02/2020 (197).

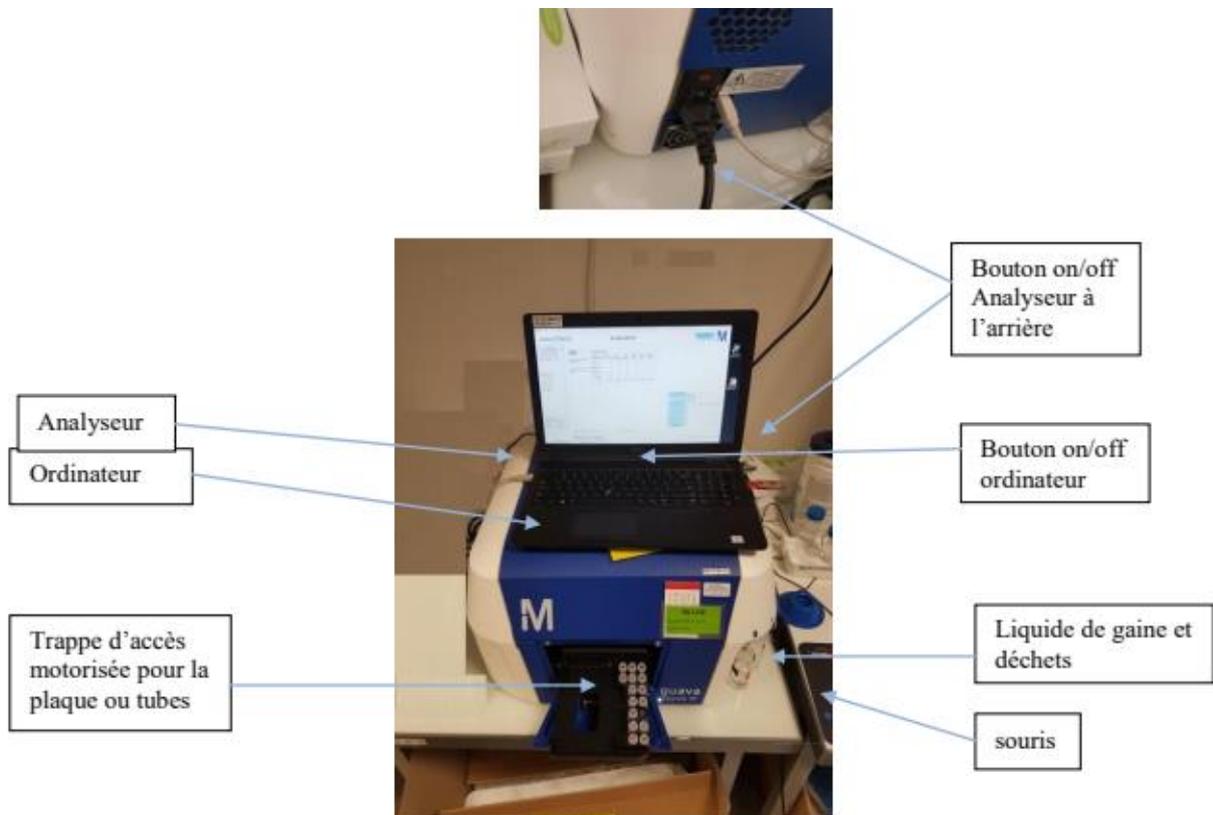


Figure 28 : Composition du cytomètre en flux Guava® EasyCyte system 5HT (195).

- **Le lecteur de plaque ELISpot CTL reader Série 6 TATC Analyzer** (Cellular Technology Limited CTLSigma) (Figure 29). Il est utilisé lors de l'étape de révélation du test T-SPOT.TB®. L'appareil possède une caméra HD et un système robotisé permettant de faire défiler devant celle-ci les puits des plaques dans lesquels les CMN du malade auront été incubées après mise en contact avec les antigènes. La révélation s'effectue par la coloration des molécules d'IFN γ sur le support, permettant d'obtenir des spots sur une membrane placée au fond des puits testés. Chaque spot obtenu correspond à une cellule T sécrétrice d'IFN en réponse à la présence d'antigènes spécifiques de *M. tuberculosis*. Le lecteur CTL réalise le comptage de ces spots de couleur sur le fond des puits de la plaque. Deux paramètres peuvent être lus simultanément par l'utilisation de deux systèmes de coloration distincts (bleu et rose). L'appareil possède un logiciel dédié au test T-SPOT.TB® : immunospot TATC.

Le logiciel est paramétré pour analyser quatre puits pour chaque test : un contrôle positif, un contrôle négatif, et deux puits contenant les antigènes. Les différents réglages de l'appareil (sensibilité, bruit de fond, forme des spots...) sont réalisés par le fabricant. Un CQI par lecture d'une plaque de référence possédant deux types de coloration de spots est réalisé de façon hebdomadaire.

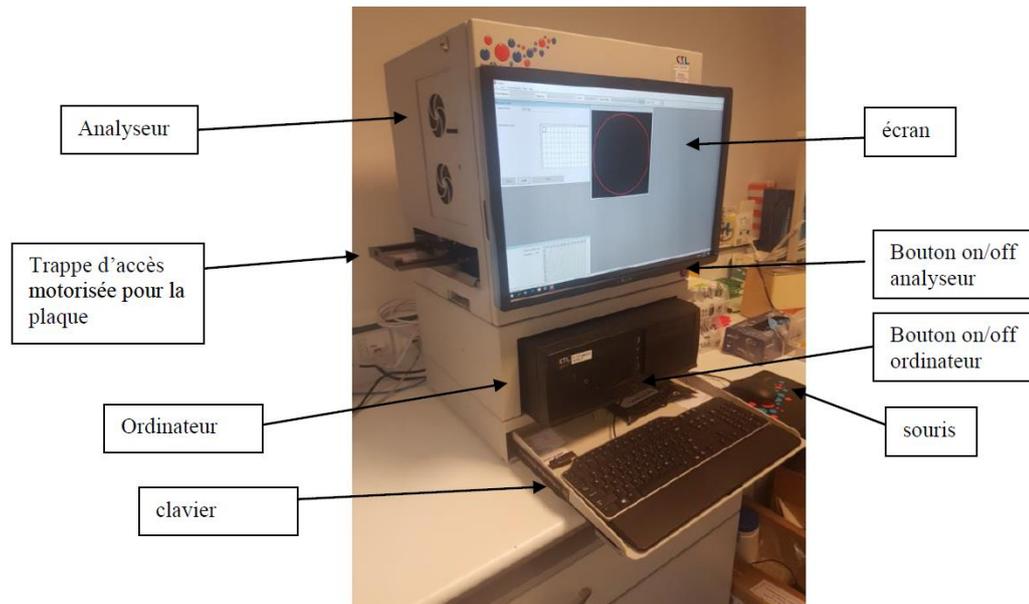


Figure 29 : Composition du lecteur Elispot CTL reader (198).

Chacun des automates possède son propre ordinateur relié via un réseau local Ethernet à l'ordinateur sur lequel est installé le logiciel Asclépios-PGP (middleware). Ce réseau permet la connexion des automates entre eux, une transmission des résultats automatisée vers PGP puis vers le logiciel MOLIS à partir duquel s'effectue la validation biologique.

L'interface Excel MAPP développée par Oxford Immunotec joue un rôle central dans le fonctionnement de la plateforme (Figure 30).

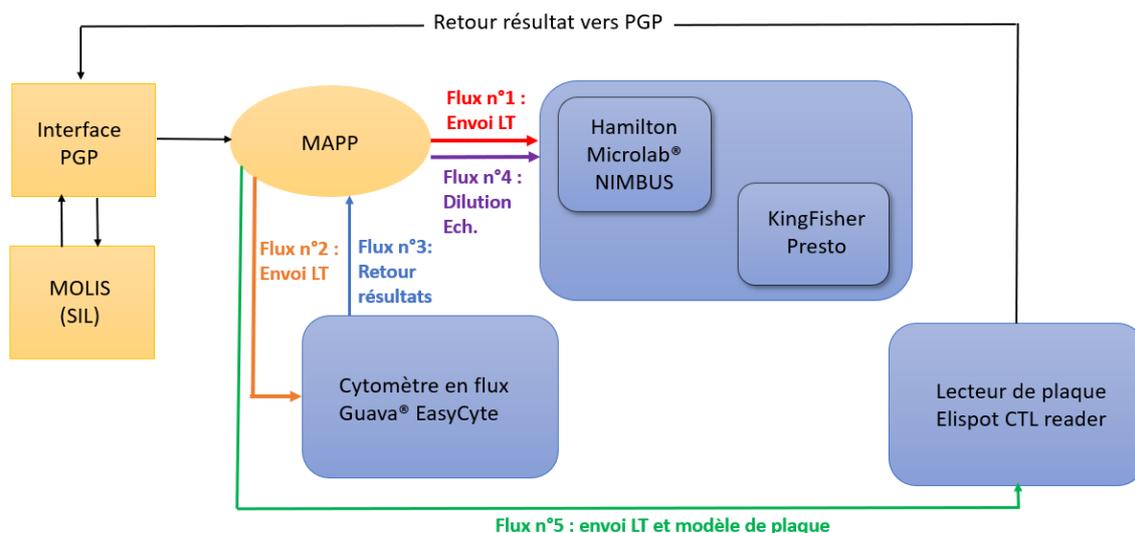


Figure 30 : Fonctionnement de la plateforme ELISpot automatisée. Le logiciel MAPP (Oxford Immunotec) permet la coordination de quatre appareils : le Microlab® Nimbus, le module Presto, le cytomètre en flux Guava® et le lecteur CTL. **Flux n°1** : envoi de la liste de travail (LT) créée par le technicien après enregistrement des échantillons vers le Nimbus-Presto. **Flux n°2** : envoi de la LT vers le Guava®. **Flux n°3** : intégration par le logiciel MAPP des résultats des numérations cellulaires réalisées par le cytomètre Guava®. **Flux n°4** : envoi au Nimbus-Presto des dilutions à effectuer calculées par le logiciel MAPP pour la normalisation de la concentration en CMN. **Flux n°5** : envoi de la LT et du modèle de plaque au lecteur de plaque CTL reader.

L'interface MAPP permet la gestion des listes de travail pour le Nimbus-Presto, le cytomètre en flux Guava® et pour le lecteur CTL reader. Elle réalise l'intégration des fichiers contenant les résultats de numération cellulaire provenant du Guava et leur transmission vers le logiciel PGP. Elle assure également les fonctions utilisateurs primaires suivantes :

- Saisie des échantillons (scan des étiquettes code-barres)
- Traitement des échantillons (calcul de la dilution nécessaire pour la normalisation des CMN)
- Etiquetage (impression des étiquettes requises tout au long du processus)

c. Matériel, réactifs et consommables

Le matériel (hormis les automates constituant la plateforme T-SPOT.TB® déjà décrits), les réactifs et les consommables suivant sont utilisés pour la réalisation du test T-SPOT.TB® :

Matériel :

- Incubateur à 5% de CO₂ 37°C +/- 1°C
- Réfrigérateur
- Pipettes

Réactifs et consommables :

- **Kit réactif T-SPOT.TB[®]** : T-SPOT.TB8 kit réactif pour 24 tests (Figure 31).
Comprend :
 - 1 plaque microtitrée de 96 puits (sous la forme de 12x8 puits, barrettes intégrées dans un cadre), revêtue d'un anticorps monoclonal murin dirigé contre l'IFN γ ;
 - 2 flacons (0.8 mL) Panel A : contenant les antigènes ESAT-6, de l'albumine sérique bovine et des agents antimicrobiens ;
 - 2 flacons (0.8 mL) Panel B : contenant les antigènes CFP-10, de l'albumine sérique bovine et des agents antimicrobiens ;
 - 2 flacons (0.8) mL Contrôle positif : contenant la phytohémagglutinine (PHA), utilisé comme activateur mitogène indicateur de la fonctionnalité cellulaire, de l'albumine sérique bovine et des agents antimicrobiens ;
 - 1 flacon (50 μ L) de réactif conjugué concentré x200 : anticorps monoclonal murin anti- l'IFN γ conjugué à la phosphatase alcaline.



Figure 31 : kit réactif T-SPOT.TB TB8. Oxford Immunotec. Image issue du site internet <http://www.oxforddiagnosticlaboratories.eu>

- **Kit réactif T-Cell Select[™]** : chaque kit comprend jusqu'à 144 tests. Contient :

- Concentré de tampon 1×50 mL
- Anticorps 1 3×2 mL
- Anticorps 2 3×2 mL
- Réactif à billes 1×10 mL

Le coffret T-Cell *Select*[™] (Oxford Immunotec), composés d'anticorps couplés à des billes magnétiques permet la réalisation d'une sélection positive des CMN par tri magnétique (Figure 33).

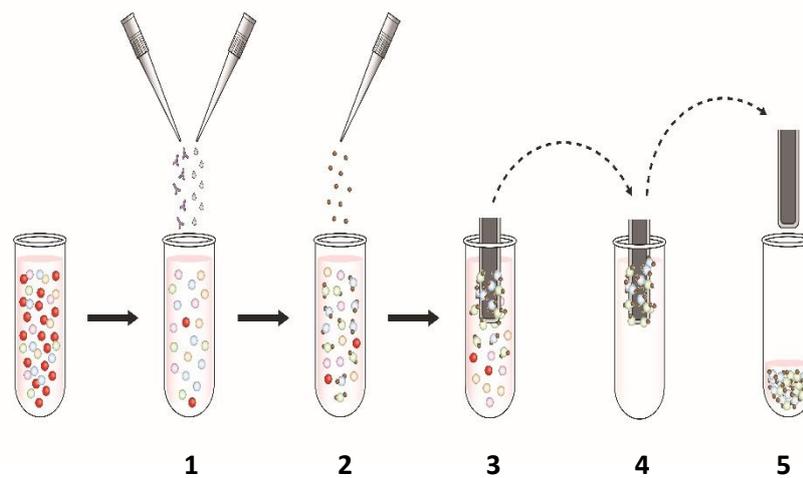


Figure 32 : Principe du tri magnétique réalisé par le module Presto et utilisant le kit T-Cell Select[™]. D'après le site www.oxfordimmunotec.com. **1.** Une solution de tampon et les anticorps sont ajoutés au sang total contenu dans le tube primaire. Les anticorps se lient aux CMN. **2.** Les billes magnétiques sont ensuite ajoutées. Il se forme un complexe entre les billes magnétiques et les CMN par l'intermédiaire des anticorps qui y sont fixés. **3.** L'échantillon est exposé à un aimant, sur lequel vont se fixer les billes magnétiques liées aux CMN. **4.** Le retrait de l'aimant permet ainsi d'extraire sélectivement les CMN. **5.** Les cellules isolées sont ensuite lavées et remises en suspension dans un autre tube : c'est un processus de sélection positive

La liste des autres consommables nécessaires à la réalisation du test est disponible en Annexe 3.

d. Réalisation du test : jour 1

Le jour 1 du test T-SPOT.TB[®] a pour finalité l'obtention d'une suspension cellulaire de CMN. Cette étape est réalisée de manière automatisée par le préparateur d'échantillon Nimbus-Presto, permettant une sélection des cellules d'intérêt par tri magnétique. Une numération des suspensions obtenues est réalisée par le cytomètre en flux Guava[®], puis diluées en vue d'une normalisation du nombre de cellules pour le test T-SPOT.TB[®]. Une quantité définie et connue de cellules sera ainsi mise en contact avec ou sans antigènes spécifiques de *M. tuberculosis* dans les puits d'une plaque dont le fond est recouvert d'anticorps de capture d'IFN γ , selon le principe de l'ELISpot.

Les réactifs et consommables nécessaires aux différentes étapes du jour 1 du test ont été détaillés ci-dessus (Cf c. Liste des réactifs et consommables nécessaires à la réalisation du test T-SPOT.TB®).

Précautions particulières :

Le kit réactif T-SPOT.TB®, les milieux de culture AIM V et RPMI sont à placer à température ambiante 20 à 30 minutes avant leur utilisation. Il est préconisé de placer les billes magnétiques du kit T-Cell *Select*™ sur un agitateur pour garantir leur mise en suspension avant emploi. Le tampon de lyse du kit T-Cell *Select*™ est à diluer avec de l'eau distillée.

Un total de 24 échantillons peut être analysé lors d'une série par le Nimbus-Presto. L'automate a la capacité de traiter deux séries consécutivement (de 25 à 48 échantillons de patients).

Etapas analytiques :

- 1. Démarrage du système Nimbus-Presto.**
- 2. Réalisation de la maintenance journalière de l'automate.**
- 3. Lancement d'une nouvelle série sur le Nimbus-Presto** via le logiciel « Hamilton Run Control », en renseignant le nombre d'échantillons à analyser (de 1 à 48). Le Nimbus-Presto calculera et affichera à l'écran les quantités de réactifs nécessaires pour la préparation de la solution « Master Mix ». L'opérateur doit prendre note de ces quantités afin de préparer la solution.
- 4. Préparation du réactif de tri cellulaire « Master Mix »** à partir du kit T-Cell *Select*™ dans un tube Falcon® de 50 mL en suivant les indications données par le Nimbus-Presto. La solution « Master Mix » ainsi préparée peut être conservée entre 2°C et 8°C et doit être utilisée dans un délai de 24h. Le flacon la contenant doit porter une étiquette mentionnant le volume préparé et la date de la préparation. Le tube conique doit être retourné 5 à 6 fois pour s'assurer d'un mélange uniforme des réactifs.
- 5. Préparation des autres réactifs et consommables et chargement sur le plateau de travail du Nimbus-Presto.** Tous les contenants doivent être identifiés par une étiquette imprimée. Les plaques et réservoirs ont une position précise sur le plateau de travail du Nimbus (Figure 33). Le logiciel « Hamilton

Run Control » donne à l'opérateur les instructions nécessaires à la bonne disposition des contenants sur l'automate à l'aide d'une liste à cocher et d'un plan schématique de la plateforme Nimbus-Presto (Figures 33 et 34). Les instructions données par le logiciel doivent être suivies progressivement afin de positionner correctement les réactifs avec les volumes indiqués et les consommables en respectant leur format. Les cases correspondant aux différents consommables sur le logiciel « Hamilton Run Control » sont cochées par l'opérateur au fur et à mesure qu'il équipe l'automate.

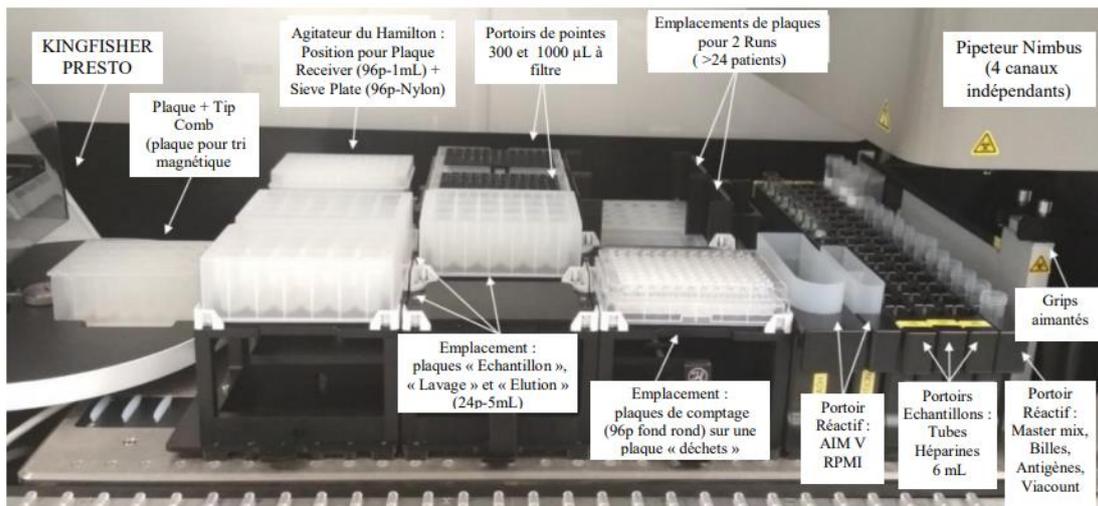


Figure 33 : Disposition des consommables sur la plateforme Nimbus-Presto pour réalisation du test T-SPOT.TB® (192).

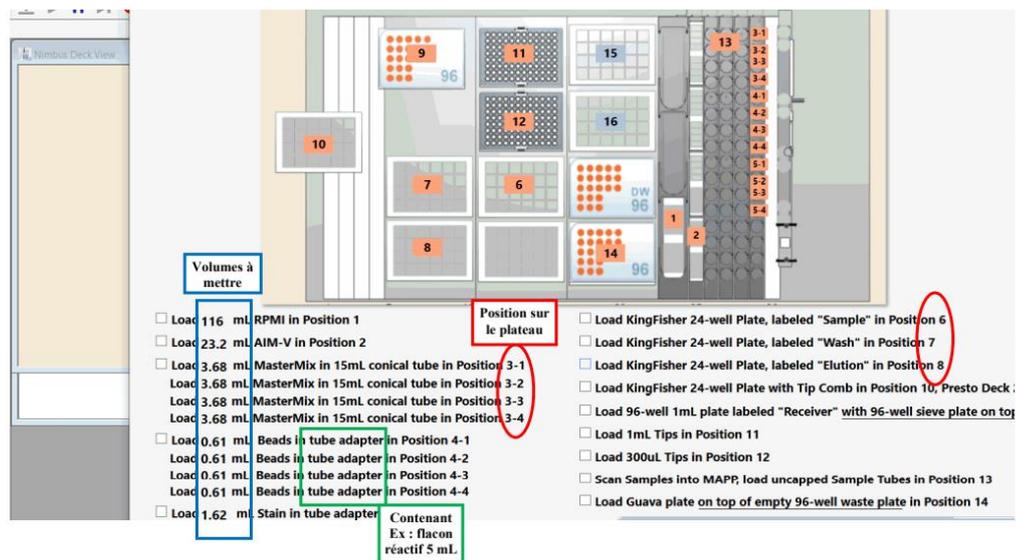


Figure 34 : Exemple de disposition des plaques et contenants sur le Microlab Nimbus-Presto pour une série de 24 échantillons de sang, présentée par l'interface « Run Hamilton Control » (192).

L'intégrité des différentes plaques doit être contrôlée avant leur mise en place sur l'automate. Les plaques doivent être correctement positionnées et dans la bonne orientation (un repère aidant au positionnement des plaques est visible dans le coin supérieur gauche). Le portoir à embouts doit être complet avant le démarrage d'un cycle. Les réservoirs de réactifs, tubes ou autres contenants de liquide ne doivent pas être excessivement remplis.

- 6. Enregistrement des échantillons sur le logiciel MAPP.** L'opérateur entre ses identifiants personnels, sélectionne le nombre d'échantillons traités (entre 1 et 48) puis scanne les codes-barres des tubes héparinés de 7 mL de la série à l'aide d'une douchette. Le numéro de la plaque apparaît dans le champ « Plaque 1 » et les codes-barres s'incrémentent automatiquement à la position définie sur la plaque de 24 puits. Si la série comporte deux runs, le logiciel MAPP crée automatiquement un code pour la deuxième plaque au moment de l'incrémentation du patient 25.
- 7. Sauvegarde de la liste de travail sur le logiciel MAPP.** Une fois le scan des échantillons et les fichiers correspondants créés dans le logiciel MAPP, il est préférable d'en faire une sauvegarde à la date du jour. Cela sera utile si le logiciel est fermé de façon intempestive ou si un problème informatique se produit, en permettant de retrouver les plans des plaques en cours de traitement.
- 8. Lancement du protocole de préparation.** L'opérateur introduit le portoir contenant les échantillons de patients sur la plateforme Nimbus (Figure 34). L'automate indiquera que des portoirs ont été ajoutés par rapport au démarrage. A cette étape, l'opérateur doit vérifier que les plaques utilisées au niveau du module Presto sont bien positionnées. La préparation débute, pour une durée d'environ 1h45 à 2h pour une première plaque de 24 échantillons. La distribution de sang doit être contrôlée régulièrement par l'opérateur. La présence de caillots dans les échantillons peut entraîner des erreurs de distribution ; la conduite à tenir devant une telle situation sera décrite plus loin. Le module KingFisher Presto procède à l'isolement des CMN par tri magnétique.

A la fin de la préparation, l'appareil aura préparé une plaque de 96 puits à fonds ronds avec dans chacun des puits : 10 µL de suspension de CMN et 190 µL du réactif Guava ViaCount. Si la série comprend plus de 24 échantillons de patients (soit deux plaques), la préparation de la seconde plaque doit être lancée avant d'effectuer la numération cellulaire des suspensions de la première plaque. Après une incubation de 7 minutes, l'acquisition des numérations cellulaires sur le cytomètre Guava® devra s'effectuer dans un délai de 15 à 20 minutes.

- 9. Démarrage et maintenance du cytomètre en flux Guava®.** Cette étape doit être effectuée de manière concomitante à la préparation des suspensions de CMN sur la plateforme Nimbus-Presto. Les CQI doivent être passés sur le cytomètre après la maintenance journalière en utilisant le module easyCheck. L'opérateur prépare ensuite la liste de travail. Le cytomètre doit être opérationnel avant la fin de la préparation cellulaire.
- 10. Numération cellulaire sur le cytomètre en flux Guava®.** La liste de travail ayant été créée sur le logiciel MAPP à partir du scan des échantillons est chargée sur le logiciel du cytomètre « guavasoft 3.3 ».
- 11. Acquisition des échantillons.** La plaque contenant les suspensions d'échantillons après tri magnétique et le réactif Guava ViaCount est placée sur le chargeur de plaque du cytomètre, en s'assurant que le puits A1 est bien dans le coin supérieur droit. Sont également placés les tubes contenant les solutions de lavage du capillaire et du mélangeur et des tubes vides pour le rinçage, la centrifugation et le séchage du mélangeur (Figure 35).

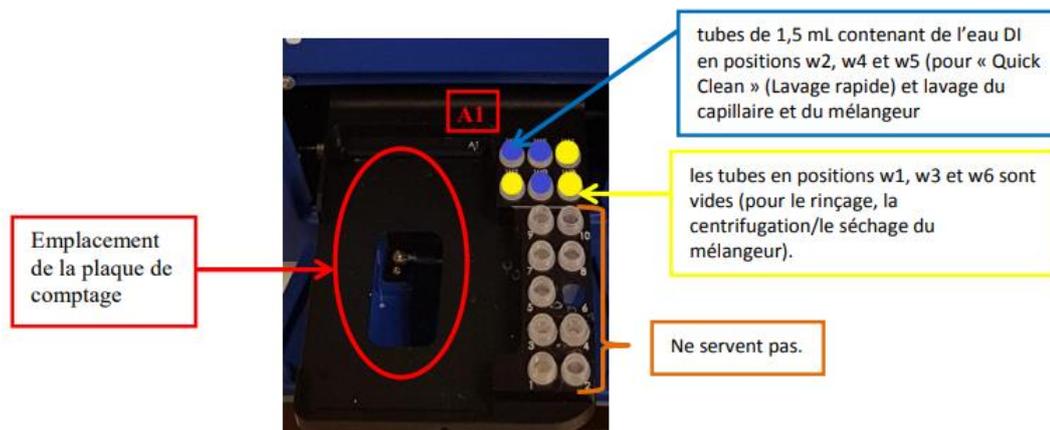


Figure 35 : Emplacement de la plaque contenant les suspensions de CMN et le réactif Guava ViaCount ainsi que les différents consommables sur le cytomètre en flux Guava® (195).

L'opérateur lance l'acquisition des numérations cellulaires à partir du logiciel du cytomètre. La numération des différents échantillons peut être suivie en temps réel. L'appareil passe à un nouvel échantillon après avoir compté 2000 cellules ou après 2 minutes d'acquisition. Pour que le test T-SPOT.TB® puisse être réalisé, la numération cellulaire obtenue doit être $\geq 1.95 \times 10^6$ cellules/mL. En-dessous de ce seuil, le nombre de CMN isolé est insuffisant pour obtenir 1 million de cellules nécessaire pour la réalisation du test (250 000 cellules par puits \times 4).

12. Intégration des résultats de numération dans le logiciel MAPP. Cette étape permet au logiciel de générer un fichier « .xls » qui regroupera les volumes calculés de suspension cellulaire et de milieu de culture AIM-V à mélanger pour chaque échantillon, afin d'obtenir une normalisation de du nombre de cellules distribuées dans les puits pour réalisation du test T-SPOT.TB®. La concentration cible à atteindre est de 2.5×10^6 cellules/mL.

13. Dilution des échantillons et préparation de la plaque de test: si une seule plaque est traitée (24 patients ou moins). Les instructions de réinitialisation de la plateforme pour les dilutions des suspensions cellulaires et la préparation de la plaque de test sont obtenues à partir du logiciel « Hamilton Run Control ». Sont placées sur la plateforme : la plaque de 96 puits profonds étiquetée « dilution », la plaque de dosage T-SPOT.TB®, le volume d'AIM-V indiqué par le logiciel et les réactifs de stimulation nécessaires au test : panel A, panel B, PHA, contrôle négatif (AIM-V). Les actions sont cochées sur le logiciel

« Hamilton Run Control » au fur et à mesure de leur réalisation. L'automate procède à la dilution des échantillons avec de l'AIM-V et les échantillons, ainsi que les réactifs de stimulation, seront déposés dans la plaque de test en 25 à 30 minutes.

14. Dilution des échantillons et préparation de la plaque de test: si deux plaques sont traitées (25 à 48 patients). Les instructions de réinitialisation de la plateforme pour les dilutions des suspensions cellulaires et la préparation de la plaque de test sont obtenues à partir du logiciel « Hamilton Run Control ». Toutes les plaques de 24 puits doivent être retirées de la plateforme (les plaques « échantillons 1 », « lavage 1 » « élution 1 » et la plaque à peigne « tip comb 1 »). La plaque à filtre nylon (sieve plate) doit être remplacée sur la plaque « receiver » (figure x). Les échantillons supplémentaires seront distribués à la suite. Une nouvelle plaque pour la numération cellulaire et les lavages doit être placée pour les échantillons supplémentaires. Les actions sont cochées sur le logiciel « Hamilton Run Control » au fur et à mesure de leur réalisation. L'opérateur lance la préparation de la deuxième plaque ; ainsi, la numération cellulaire de la plaque n°1 est réalisée par le cytomètre Guava® pendant le traitement des échantillons du Run 2 par le Nimbus-Presto (cf. Annexe 1 : organigramme du JOUR 1 de la réalisation du test T-SPOT.TB® avec extraction automatisée des CMN du sang à l'Institut d'Immunologie du CHU de Lille). Une fois le tri magnétique et la préparation la plaque n°2 achevée, l'opérateur la récupère pour la placer sur le cytomètre et procéder à la numération des CMN ; il procède également au chargement des réactifs et consommables nécessaires pour la dilution et la préparation de la plaque n°1 de test T-SPOT.TB®, comme décrit précédemment (cf. paragraphe D.1.4.3.13). La plateforme Nimbus-Presto effectue alors la dilution des échantillons du Run 1 et distribue les antigènes dans leurs puits respectifs. Dans chaque puits est distribué 100 µL de la préparation de CMN élaborée de chaque échantillon. Une fois la numération cellulaire du Run 2 effectuée, les mêmes étapes sont à répéter pour la dilution et la réalisation de la plaque de test n°2.

15. Incubation de la plaque ou des plaques de test T-SPOT.TB®. Des étiquettes sont éditées à partir du logiciel MAPP et collées sur la ou les plaques : une étiquette « couvercle » et une étiquette « code-barre ». Sur l'étiquette « couvercle » sont indiquées la date et l'heure d'impression, correspondant au

début de l'incubation, ainsi que la date et la fenêtre des heures durant lesquelles la révélation du test devra être réalisée. Les plaques doivent être incubées avec le couvercle dans un incubateur humidifié à 37+/- 1°C avec un apport à 5% de CO2 pendant une durée de 16 à 20h. Les plaques ne doivent pas être empilées, au risque d'obtenir une répartition inégale de la température et de la ventilation.

16. Export des listes de travail vers le lecteur CTL. Le logiciel MAPP génère un ou plusieurs fichiers qui seront utilisés lors de la lecture du test le lendemain, et identifiés avec le numéro de code-barre des plaques. L'export des listes de travail à partir du logiciel MAPP est à faire impérativement à la fin de la préparation des plaques.

17. Déchargement de la plateforme Nimbus-Presto et élimination des déchets.

e. Révélation du test : jour 2

Le jour 2 du test T-SPOT.TB® consiste à révéler l'IFN γ fixé au fond des puits, permettant le dénombrement de spots correspondants aux cellules productrices d'IFN γ stimulées par les antigènes ESAT-6 et CFP-10 pendant la phase d'incubation. La révélation du test a habituellement lieu le lendemain et peut être réalisée sur une paillasse classique. En cas de retard inévitable obligeant à différer cette étape (par exemple, le week-end), les plaques pourront être retirées de l'incubateur et conservées entre 2°C et 8°C. La durée maximale de conservation préconisée à ces températures est de 72h. Les plaques doivent être couvertes pendant la conservation.

Etapas analytiques :

- 1. Préparation d'une dilution au 1/200^{ème} du conjugué avec de la solution tampon PBS.** Une plaque de 24 échantillons de patients nécessite l'utilisation de 40 μ L du conjugué et de 8 mL de PBS. Le mélange du conjugué avec le PBS est réalisé dans un tube Falcon® puis est transféré dans un réservoir ; cela permet la distribution dans les différents puits à l'aide d'une pipette multicanaux.
- 2. Retrait de la plaque de l'incubateur.**
- 3. Lavage des puits.** Les puits doivent être lavés vigoureusement à quatre reprises avec 250 μ L de solution tampon PBS (peigne-distributeur branché directement sur le flacon de PBS). La persistance de trace de cellules ou de billes au fond des puits doit être contrôlée par l'opérateur. Si tel est le cas, le

lavage peut être répété jusqu'à deux reprises. La plaque doit être ensuite bien asséchée en la frappant vigoureusement sur du papier absorbant.

- 4. Distribution de la dilution du conjugué.** Une quantité de 50 µL est ainsi distribuée dans chacun des puits.
- 5. Incubation de la plaque pendant 1h entre 2°C et 8°C.**
- 6. Retrait de la plaque du réfrigérateur.**
- 7. Second lavage des puits.** L'ensemble des puits correspondants aux échantillons est à nouveau lavés à quatre reprises avec 250 µL de PBS afin d'éliminer l'excédent de conjugué non fixé. La plaque est ensuite asséchée en la frappant vigoureusement sur du papier absorbant.
- 8. Distribution de la solution de substrat.** La solution de substrat est prête à l'emploi. Un volume de 50 µL de substrat est distribué dans chacun des puits à l'aide d'une pipette multicanaux.
- 9. Incubation de 7 minutes à température ambiante.** Elle peut être prolongée pour une durée de 8 à 9 minutes si la coloration des spots est jugée faible par l'opérateur.
- 10. Arrêt du processus de coloration des puits par un lavage abondant à l'eau distillée.** Ce lavage est réalisé à l'aide d'une pissette.
- 11. Séchage de la plaque avant la lecture des spots.** En fonction de l'organisation du laboratoire, la plaque peut être séchée soit par mise à l'étuve à 37°C +/- 1°C pendant 1 à 2 heures, soit en restant une nuit à température ambiante dans un tiroir dédié.

La coloration des spots sur les barrettes reste stable dans le temps si celles-ci sont conservées à l'abri de la lumière ; cela permet de différer l'étape de lecture des spots si l'organisation du laboratoire le nécessite.

f. Lecture des spots

L'étape de lecture des plaques et de quantification des spots du test T-SPOT.TB® s'effectue sur le lecteur de plaque ELISpot CTL reader. La coloration des spots sur les puits des barrettes est visible à l'œil nu et donne un premier aperçu des résultats des tests (Figure 36).

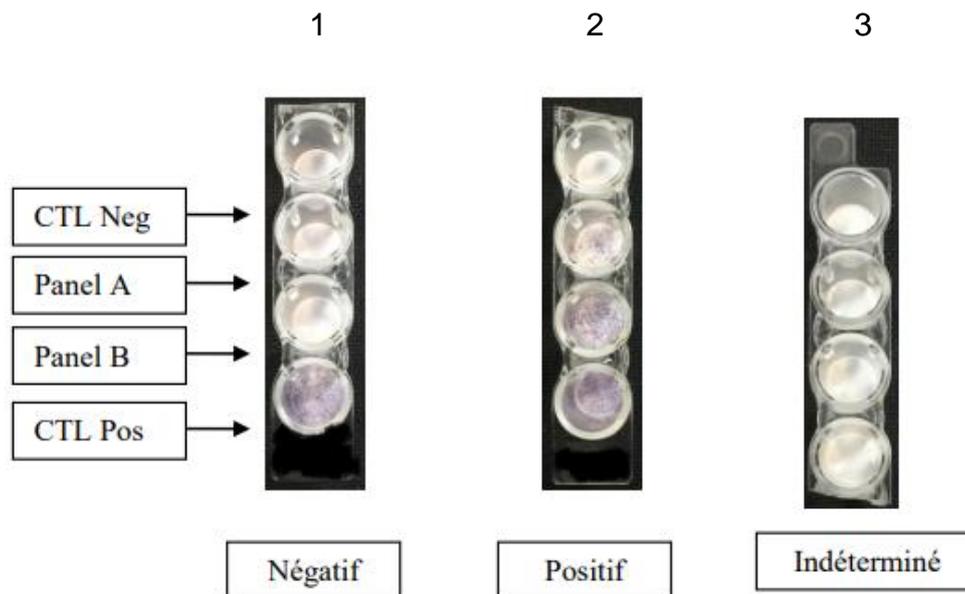


Figure 36 : Exemple de résultat de tests T-SPOT.TB® sur des barrettes observées à l'œil nu, correspondant à un test négatif, un test positif et un test indéterminé. De très nombreux spots sont visibles au niveau du puits « contrôle positif » des tests 1 et 2, contrairement au test 3 correspondant à un résultat indéterminé. Les puits « contrôle négatif » des trois tests ne semblent pas marqués de spot. Des spots sont visibles sur les puits « Panel A » et « Panel B » du test 2, indiquant un résultat probablement positif. La quantification précise des spots permettant l'interprétation des tests se fera après lecture des spots par le lecteur de plaque CTL reader (195)

Un CQI est à effectuer de manière hebdomadaire sur le lecteur CTL ; les jours où il doit être réalisé sont indiqués sur un planning de maintenance. Il s'agit d'une plaque de référence possédant deux types de coloration de spots, conservée à l'abri de la lumière. Avant de réaliser la lecture des plaques, l'opérateur doit s'assurer que les listes de travail correspondantes ont bien été exportées à partir du logiciel MAPP vers le lecteur CTL.

Etapes analytiques :

- 1. Planification de la plaque.** Cette étape correspond à la création de la liste des échantillons et du plan de plaque sur le logiciel « immunospot TATC » du lecteur CTL. L'opérateur accède à l'interface en renseignant ses identifiants personnels. La plaque à lire est identifiée par les numéros de son code-barre, rentrés manuellement dans le logiciel. Une fois la plaque créée, le fichier de la liste de travail issue du logiciel MAPP doit être récupéré dans le dossier partagé de la plateforme. Une fois ce fichier importé, un message apparaît,

avertissant de la réussite de l'import et indiquant le nombre de plaques chargées et le nombre d'échantillons de patients analysés.

- 2. Numérisation de la plaque planifiée.** Sur le menu principal du logiciel « immunospot TATC », le module « Capture » pour la numérisation de la plaque est accessible à partir de l'onglet « Scan and count ». Une fois la trappe d'accès ouverte, la plaque est insérée dans l'appareil sans le couvercle et dans le bon sens. Le lecteur CTL lit le code-barre de la plaque et charge automatiquement le plan de plaque qu'il devra numériser. L'opérateur lance la numérisation en sélectionnant « Start ». Les puits défilent un à un à l'écran, permettant de visualiser l'avancement de la plaque en temps réel (Figure 37). Une plaque de 24 puits est lue en une quinzaine de minutes.

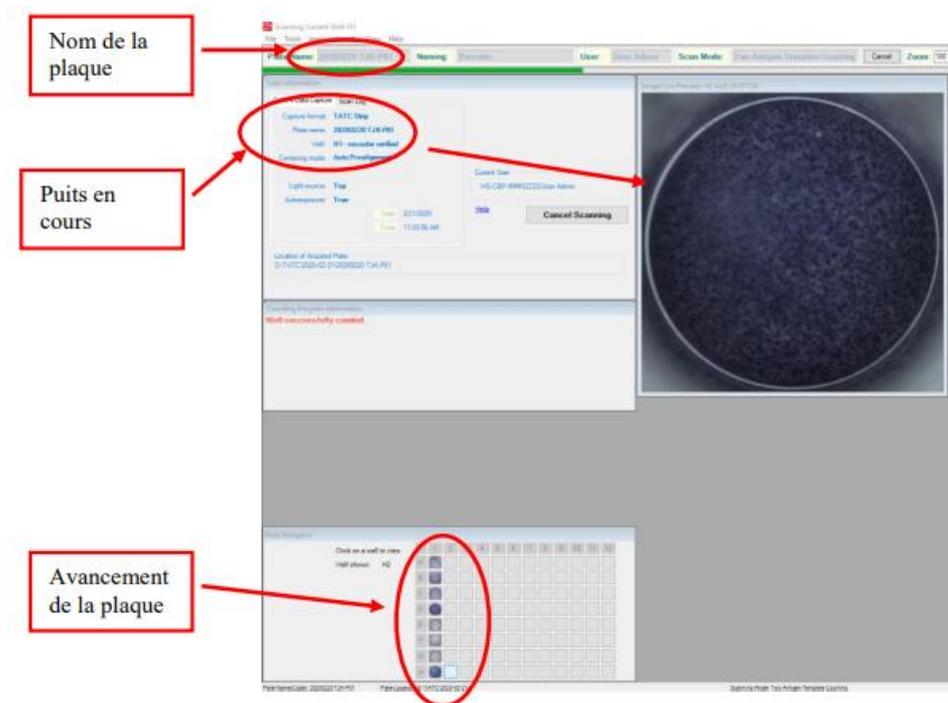


Figure 37 : Exemple de numérisation de plaque par le lecteur CTL reader pour réalisation du test T-SPOT.TB®. Le numéro de code-barre identifiant la plaque apparaît en haut à gauche de l'écran. Les puits en cours de numérisation défilent un à un pour chaque test. Le plan de plaque et l'avancement de la numérisation est visible en bas à gauche (195)

- 3. Validation analytique de la plaque planifiée (= contrôle qualité).** Cette étape doit être réalisée par une personne habilitée pour la validation biologique des tests ELISpot, et fait ainsi partie intégrante de la validation biologique du test T-SPOT.TB®. Elle consiste en une analyse de la numérisation des puits pour chaque test réalisé. Les paramètres suivants doivent être analysés :

- le niveau de bruit de fond des puits,
- la qualité des spots obtenus,
- le comptage des spots, avec la possibilité à ce niveau d'ajouter ou de retirer des spots,
- l'identification d'artefacts liés aux manipulations (fibres collées sur le fond des puits, impact de cône de pipette, trou dans la membrane, agrégats de billes résiduels...) et leur élimination,
- L'adéquation entre les moyennes des spots des contrôles positifs pour les deux rangées de patients, reflétant la bonne distribution et homogénéisation des réactifs.

Cette étape est accessible en sélectionnant «QC last scanned plate» juste après la numérisation de la plaque, ou à partir de de l'onglet « Quality Control » pour une plaque numérisée antérieurement. Il est alors possible d'ouvrir la dernière plaque numérisée ou de choisir une plaque de la base de données. Plusieurs affichages sont disponibles (Figure 38) :

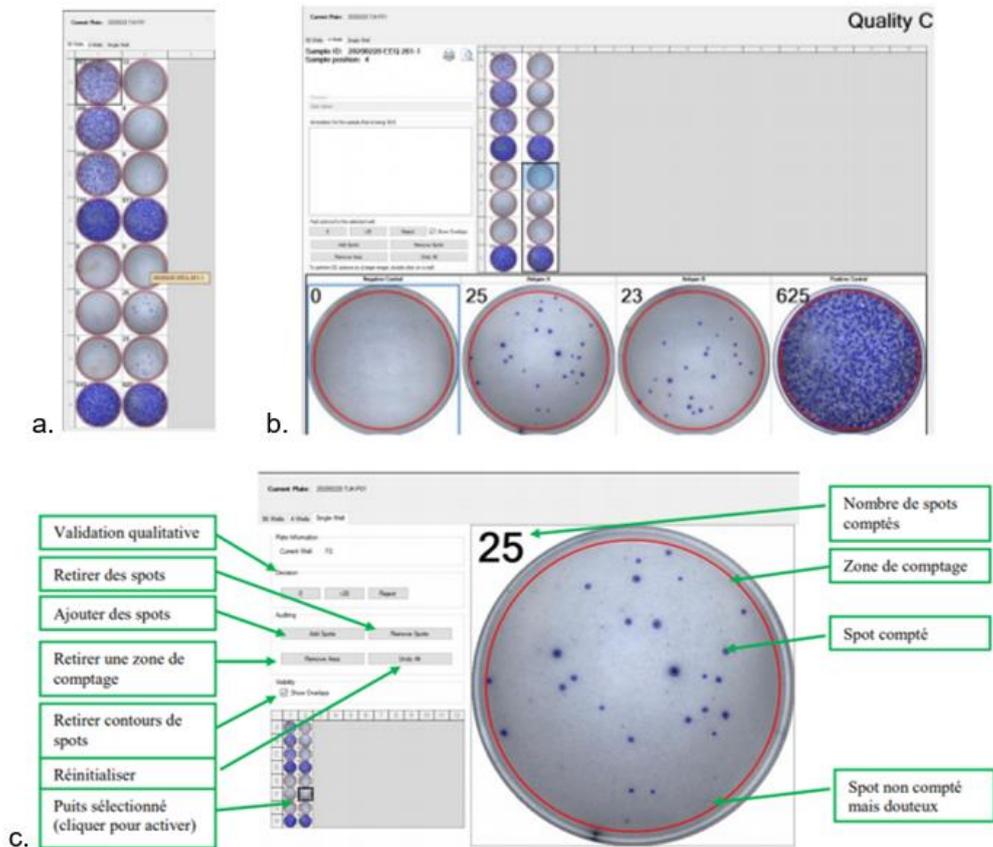


Figure 38 : Les différents modes d'affichage pour la validation analytique des tests T-SPOT.TB® sur le lecteur CTL reader. a. Vue « plaque entière » (96 wells), donnant une vue d'ensemble sur les différents tests de la série. Passer la souris devant un puits permet d'avoir l'identifiant de l'échantillon. Cliquer sur un puits permet de passer en vue « Patient ». b. Vue « Patient ». En haut à gauche figure l'identifiant de l'échantillon. Il est possible d'ajouter ou de retirer des spots ou des zones de comptage. Double-cliquer sur un puits permet de passer en vue « Zoomer ». c. Vue « Zoomer » (single well). Cette vue permet l'analyse précise des spots en affichant un seul puits. Le nombre de spots comptés par le lecteur CTL apparaît en gras à côté du puits numérisé. Les spots comptés par le lecteur CTL sont entourés d'un cercle bleu. Les éléments considérés comme douteux par l'automate et non comptés comme des spots sont entourés d'un cercle blanc. La zone de comptage est cerclée d'un trait rouge. Il est possible de retirer ou d'ajouter des spots ou des zones de comptage. Le puits sélectionné apparaît encadré sur le plan de plaque dans la fenêtre en bas à gauche (195)

L'analyse de la plaque est ensuite validée en sélectionnant l'icône « Finish QC ». Une fois la validation analytique effectuée, le nombre de spots est fixé pour chacun des puits de la plaque et il n'est plus possible d'effectuer de nouvelles modifications. S'il s'avère nécessaire de réanalyser la plaque, elle devra être numérisée à nouveau et sous un autre nom.

4. Transfert des résultats du logiciel « immunospot TATC » vers le logiciel PGP. La validation technique des résultats peut alors être effectuée sur le

logiciel PGP, puis les résultats sont transmis de PGP vers le logiciel MOLIS en vue de la validation biologique.

- 5. Impression des résultats.** La liste des résultats des tests T-SPOT.TB® est imprimée à partir de PGP, où figurent pour chaque patient : le nom et le prénom, le numéro MOLIS correspondant à la demande, le numéro de séjour, le nombre de CMN isolées, les nombres de spots comptés pour les quatre puits ainsi que le numéro de plaque et la position de la barette sur la plaque. En cas d'un nombre insuffisant de CMN isolées, la mention « NRCI » remplace le nombre de spots.
- 6. Elimination des déchets.** Les barrettes correspondant aux tests validés biologiquement sont conservées au minimum 6 mois puis sont éliminées dans des emballages spécifiques au traitement des déchets d'activités de soins à risques infectieux (DASRI).

g. Validation biologique du test T-SPOT.TB®

Cette étape est réalisée par les biologistes ou les internes de l'Institut d'Immunologie habilités à la validation des tests IGRAs. Comme décrit précédemment, la première étape de la validation biologique du test T-SPOT.TB® consiste à analyser la numérisation des puits de chacun des tests de la série (cf. ci-paragraphe D.1.f.3. Validation analytique de la plaque planifiée). La validation biologique est réalisée à partir du logiciel MOLIS (Figure 39), avec en parallèle la liste des résultats de la série imprimée à partir de PGP. La validation des tests T-SPOT.TB® est disponible dans l'action de validation « IMQTF2 ».

The screenshot displays the MOLIS software interface for a T.SPOT-TB test. It is divided into three main sections:

- Section 1 (Top):** Patient and collection information.

Número alias	020470575498	Dt.récept.	08.11.20	10:55	Date prélèvement	17.11.20	10:00	Número de	20 TEST 1490
Demandeur	9879	IMMUNO CELLULAIRE			Référence externe	1234567879		Prescripteur	
Patient	TESTORFI_PGP	M	08.06.1978		Enceinte			Site	CIB
Pat. hosp.	Age 42	Número de séjour			N° patient externe			Número de patient	
Rem.CR					Remarque interne				
- Section 2 (Middle Left):** A table of test results.

S	Ana	* Res.	Comm	Res-1	Unité	Ve
6	DAHE	17/11 14h				
0	QTFRS	En cours				
2	TSPOTN	1			Spots	
2	TSPOTP	36			Spots	
2	TSPOTA	235			Spots	
2	TSPOTB	78			Spots	
2	TSPOT	Positif.				
0	COMTBS	En cours				
4	TBSLOC	201811110				
- Section 3 (Middle Right):** A detailed report from the 'POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE'.

DEMANDEUR : 9879
 POLE BIO-PATHOLOGIE GENETIQUE
 INSTITUT IMMUNOLOGIE DEFICITS IMMUNITAIRES & IMMUNOTHERAPIES
 PROFESSEUR LABALETTE
 DIRECTION DES LABORATOIRES

Cotation :
 Prélève le 17/11/20 à 10:00 Enregistré le 18/11/20 à 10:55 Ecrit le 21/11/20 à 11:22 Panel

Test T-SPOT TB
 Nature du prélèvement : Sang/Héparine de lithium.
 Date et heure de prélèvement : 17/11 14h00

Contrôle négatif
 Nombre de spots obtenus en l'absence de stimulation : 1 spots

Contrôle positif
 Nombre de spots obtenus en présence de mitogène : 36 spots

Réponse aux antigènes du complexe tuberculeux (ESAT-6, CFP-10)
 Nombre de spots obtenus en présence de l'antigène ESAT-6 (panel A) : 235 spots
 Nombre de spots obtenus en présence de l'antigène CFP-10 (panel B) : 78 spots

Figure 39 : Exemple de dossier MOLIS d'un test T.SPOT-TB® au résultat positif. 1. Dans la partie supérieure de l'écran apparaissent les renseignements concernant le patient (identité du patient : nom de naissance et prénom, sexe, date de naissance et âge) et le prélèvement (intitulé et code UF du service prescripteur, date et heure de réception et de prélèvement). 2. A gauche de l'écran figurent les différentes lignes correspondant aux date et heure du prélèvement (« DAHE »), aux résultats individuels des panels et des contrôles (« TSPOTN », « TSPOTP », « TSPOTA », « TSPOTB »), à l'interprétation globale du test (« TSPOT »), et au commentaire biologique (« COMTBS »). Dans la ligne « QTFRS » figure le motif de prescription renseigné par le médecin prescripteur ou l'infirmier ayant réalisé le prélèvement. Dans la ligne « TBSLOC » figure le numéro de plaque et la position du patient sur la plaque. 3. Un aperçu du compte-rendu du test est visible dans la partie droite de l'écran.

Le test s'interprète en soustrayant le nombre de spots du contrôle négatif (CN) au nombre de spots compté dans chacun des panels. Un algorithme de validation a été paramétré dans le logiciel Molis et s'applique automatiquement à tous les dossiers (Figure 40).

- Le résultat du test est **positif** si : spots en panel A - spots en contrôle négatif **et/ou** spots en panel B – spots en contrôle négatif ≥ 10 .
- Le résultat du test est **négatif** si : spots en panel A - spots en contrôle négatif **et** spots en panel B – spots en contrôle négatif ≤ 4 .
- Le résultat du test est **à la limite du seuil de positivité** si : le nombre de spots le plus élevé en : panel A - spots en contrôle négatif **ou** en : panel B - spots en contrôle négatif est égal à 5, 6 ou 7 spots. Le résultat

se situe dans une zone grise et nécessite un contrôle à distance (délai de six semaines minimum) sur un nouveau prélèvement.

- Le résultat du test est **indéterminé** dans deux situations : s'il y a plus de 10 spots comptés au niveau du contrôle négatif ou si le contrôle positif comporte moins de 20 spots.

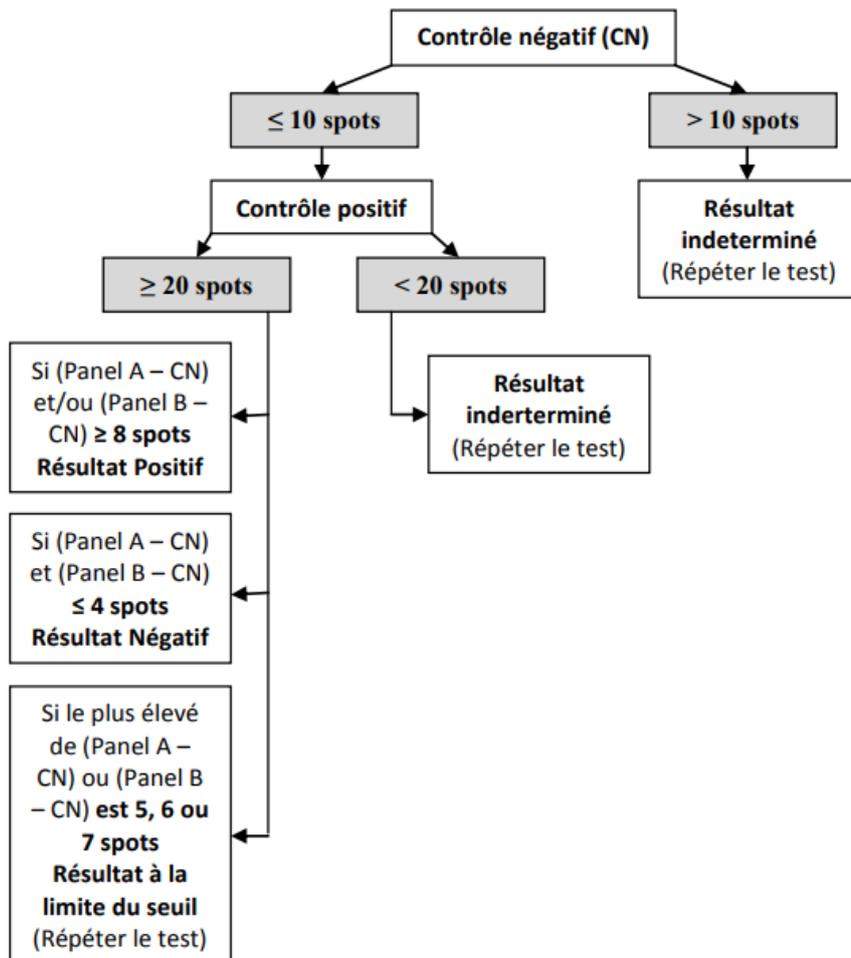


Figure 40 : Algorithme de validation biologique des tests T-SPOT.TB® paramétré dans le logiciel MOLIS au laboratoire d'immunologie cellulaire (199)

Pour chacun des tests, les résultats sont à interpréter en fonction des éventuelles antécédents, des autres paramètres biologiques disponibles et du contexte clinique du patient (s'il est connu). Un commentaire biologique adapté au résultat est ajouté par le biologiste ou l'interne habilité selon l'algorithme de validation défini ci-dessus. Dans le cas où le résultat du test est négatif, le commentaire correspondants s'incrémente

automatiquement. Différents codes d'interprétation correspondant à des commentaires précis ont été paramétrés dans le logiciel MOLIS (cf. Partie 3 : Résultats).

La liste des résultats est à émarger au fur et à mesure de la validation des tests sur Molis. Le biologiste ou l'interne habilité signe cette liste et la dépose dans une bannette dédiée aux tests IGRAs.

2. *QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT®-Plus)*

Le test QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT®-Plus, Qiagen) permet la détection de l'IFN γ par les lymphocytes T mémoires spécifiques en réponse à une stimulation ou non par les antigènes ESAT-6 et CFP-10 des mycobactéries du complexe *tuberculosis*. Ce test IGRA utilise un kit de dosage permettant de doser le taux d'IFN γ dans les surnageants par méthode immuno-enzymatique ELISA à l'aide d'une microplaque dont les puits sont coatés avec des anticorps ciblant l'IFN γ . L'ensemble des étapes relatives à la réalisation du test QFT®-Plus à l'Institut d'Immunologie du CHU de Lille sont détaillées dans les procédures internes du laboratoire d'immunologie cellulaire (200–202).

Sont détaillées dans les paragraphes ci-dessous l'organisation et les procédures pour la réalisation du test QFT®-Plus comme test IGRA de première intention, avant le passage à l'automatisation des tests T-SPOT.TB® à l'Institut d'Immunologie.

a. Matériel, réactifs et consommables

Le test QFT®-Plus repose sur le prélèvement de quatre tubes différents et spécifiques à la réalisation de ce test (Figure 41) :

- **Un tube « Nil »** (bouchon gris), ne contenant pas d'agent stimulant, permettant de détecter la présence d'IFN γ dans le plasma du patient en dehors de toute stimulation antigénique (conditions *in vivo*). Il correspond au contrôle négatif du test.
- **Un tube « Mitogen »** (bouchon violet), contenant la phytohémagglutinine-P (PHA), un agent mitogène dont la fonction est d'activer les lymphocytes T indépendamment de leur spécificité. Il correspond au contrôle positif du test.

- **Les tubes « TB1 »** (bouchon vert) et **« TB2 »** (bouchon jaune), contenant un mélange d'antigènes capables d'activer les lymphocytes T mémoires spécifiques des mycobactéries du complexe *tuberculosis* : ESAT-6 et CFP-10. Les antigènes du tube « TB1 » stimulent spécifiquement les lymphocytes T CD4+ ; les antigènes présents dans le tube « TB2 » stimulent les lymphocytes T CD4+ et T CD8+.



Figure 41 : Tubes spécifiques à prélever pour la réalisation du test QuantiFERON®-TB Gold Plus. De gauche à droite : tube « Nil » correspondant au contrôle négatif du test ; tubes « TB1 » et « TB2 » contenant les antigènes spécifiques de *M. tuberculosis* et stimulant respectivement les LTCD4 et LTCD4 + LTCD8 mémoires du patient ; tube « Mitogen » correspondant au contrôle positif de test. D'après <https://www.quantiferon.com/fr/>.

Le matériel et les consommables utilisés pour la réalisation du test QFT®-Plus sur la station ELISA automatique DS2® au laboratoire d'immunologie cellulaire du CHU de Lille est listé en Annexe 3.

b. Exigences pré-analytiques

Les prélèvements sanguins pour le test QFT®-Plus doivent être réalisés autant que possible durant les jours ouvrés du laboratoire. Un volume de 1 mL de sang doit être prélevé dans chacun des quatre tubes présentés précédemment (volume acceptable : entre 0.8 et 1.2 mL ; un repère est présent sur le tube pour aider le préleveur). Chaque tube doit comporter une étiquette identifiant le patient. Les échantillons doivent être mélangés par retournements successifs immédiatement après le prélèvement afin de garantir la bonne mise en contact du sang et des antigènes ou du mitogène (8 à 10

retournements sont préconisés). En cas d'utilisation par le préleveur d'aiguille épicroânienne, la tubulure doit être préalablement purgée en utilisant un tube sec.

Selon la notice du fournisseur, le sang peut également être prélevé dans un seul tube contenant de l'héparine de lithium puis transféré dans un second temps dans chacun des 4 tubes. L'héparine de lithium est le seul anticoagulant pouvant être utilisé, l'EDTA et le citrate interférant avec le test. Le tube hépariné devra être préalablement retourné manuellement à plusieurs reprises afin de garantir une bonne dissolution de l'héparine.

Le délai entre le prélèvement et le traitement pré-analytique au laboratoire doit être le plus court possible (dans l'idéal < 4h, au maximum < 16h). Les échantillons sont acheminés au CBP à température ambiante par le TAL (services du CHU de Lille) ou par navette (médecine du travail du CHU de Lille, laboratoires et autres sites extérieurs).

La réalisation du test QFT®-Plus nécessite un **prétraitement des échantillons**, comprenant plusieurs étapes :

1. Incubation des quatre tubes à 37°C +/- 1°C pendant 16 à 24h, et ce dans les 16h suivant le prélèvement ;
2. Centrifugation des échantillons afin de séparer les cellules du plasma ;
3. Stockage des échantillons entre 2 et 8°C jusqu'à la réalisation de l'analyse (jusqu'à 28 jours).

La procédure de prise en charge des prélèvements non prétraités doit impérativement respecter un délai avant incubation < 16h, pendant lequel les tubes sont conservés à température ambiante. Les prélèvements pour réalisation du test QFT®-Plus peuvent provenir :

- D'un service du CHU de Lille : les échantillons ne sont pas prétraités ;
- D'un site extérieur : les échantillons peuvent être prétraités ou non.

De ce fait, les étapes pré-analytiques réalisées au laboratoire seront variables selon la provenance des échantillons.

b.1. Processus de prise en charge des échantillons QFT®-Plus parvenant au CBP sans prétraitement analytique

➤ **Prélèvements acheminés au service de réception et tri des échantillons (RTE) ou au service des analyses extérieures (AE) aux heures ouvrées :**

Durant les heures ouvrées du laboratoire, comme décrit précédemment, les échantillons sont réceptionnés par l'une des techniciennes au niveau du Télébac, puis localisés au laboratoire d'immunologie cellulaire par un tracking « immuno » sur MOLIS. La prise en charge des prélèvements comprend alors trois étapes :

1. **Vérifications.** La technicienne procède à plusieurs vérifications :

- Présence d'une étiquette identifiant le patient sur chaque tube ;
- Respect du délai d'acheminement < 16h par le contrôle de la date et de l'heure du prélèvement ;
- Présence d'un volume conforme de sang dans chacun des tubes (entre 0,8 et 1,2 mL). Pour ce faire, il est possible de se référer à la marque repère présente sur le tube ou d'utiliser un tube témoin « volume QTF » prérempli de façon conforme.

En cas de non-respect ces critères pré-analytiques, le prélèvement est refusé et une non-conformité est saisie. Les échantillons conformes sont placés sur un portoir jaune spécifique « Quantiférons en attente d'incubation ».

2. **Début de l'incubation.** Trois horaires différents de début d'incubation sont définis en fonction de l'arrivée des tubes via le Télébac : 10h30, 14h00 et 17h00. Un portoir différent est étiqueté et dédié à chaque horaire. Un tracking informatisé des échantillons intitulé « début d'incubation » est réalisé sur le logiciel MOLIS (scan du tube Nil), permettant le suivi du traitement pré-analytique. Les tubes sont placés sur le portoir correspondant à l'horaire de début d'incubation et sont placés dans une étuve à 37°C pour une durée de 16 à 24h. Une ardoise sur laquelle doivent être inscrits le nombre de tubes incubés et l'heure correspondante est présente sur la porte de l'étuve.

3. **Fin de l'incubation.** Les prélèvements sont retirés de l'incubateur puis un tracking « fin d'incubation » est réalisé sur MOLIS (scan du tube Nil). Les tubes sont ensuite centrifugés à température ambiante à une vitesse de 2900g (entre 2000 et 3000g selon la notice fournisseur) pendant 15 minutes. Les échantillons centrifugés sont placés sur un portoir métallique au réfrigérateur (entre 2°C et 8°C) pour y être stockés jusqu'à la réalisation de l'analyse.

➤ **Prélèvements acheminés au RTE ou aux AE après 17h20 du lundi au jeudi :**

Les prélèvements parvenant au RTE ou aux AE jusqu'à 21h sont placés à l'étuve à 37°C sur un portoir identifié « début d'incubation entre 17h20-21h » après réalisation du track « début d'incubation ». Le tracking « immuno » et la suite du prétraitement (fin d'incubation, centrifugation, réfrigération) auront lieu le lendemain et seront effectués par une technicienne du laboratoire d'immunologie cellulaire.

Les prélèvements parvenant au RTE ou aux AE après 21h sont conservés à température ambiante et seront envoyés au laboratoire d'immunologie cellulaire le lendemain matin via le Télébac. L'ensemble du prétraitement (vérifications, début d'incubation, fin d'incubation, centrifugation, réfrigération) sera réalisé par une technicienne du laboratoire d'immunologie cellulaire.

➤ **Prélèvements acheminés au RTE ou aux AE après 17h20 le vendredi ou le samedi, dimanche et jours fériés :**

Les prélèvements parvenant au RTE ou aux AE jusqu'à 21h sont placés à l'étuve à 37°C sur un portoir identifié « début d'incubation entre 17h20-21h » après réalisation du track « début d'incubation ». Le tracking « immuno » et la suite du prétraitement (fin d'incubation, centrifugation, réfrigération) auront lieu le lendemain vers 12h et seront effectués par l'interne habilité aux astreintes d'immunologie réalisées en période de week-end et les jours fériés.

Les prélèvements parvenant au RTE ou aux AE après 21h et jusqu'à 12h30 le lendemain sont conservés à température ambiante et seront récupérés par l'interne entre 8h30 et 9h30, qui procédera à l'ensemble du prétraitement (vérifications, début

d'incubation, fin d'incubation, centrifugation, réfrigération) au laboratoire d'immunologie cellulaire.

Les prélèvements parvenant au RTE ou aux AE après 12h30 et jusqu'à 17h20 sont placés à l'étuve 37°C sur un portoir identifié « début d'incubation entre 12h30-17h20 » après réalisation du track « début d'incubation ». Le tracking « immuno » et la suite du prétraitement (fin d'incubation, centrifugation, réfrigération) est effectué le lendemain à 12h par l'interne habilité.

b.2. Processus de prise en charge des échantillons QFT®-Plus parvenant au CBP avec prétraitement analytique

➤ **Prélèvements acheminés RTE ou aux AE aux heures ouvrées :**

Pendant les heures ouvrables du laboratoire, les prélèvements sont envoyés par les agents du RTE ou des AE au laboratoire d'immunologie cellulaire via le Télébac. La prise en charge des échantillons est ensuite réalisée par une des techniciennes du laboratoire d'immunologie cellulaire qui procède à plusieurs vérifications :

- Présence d'une étiquette identifiant le patient sur chaque tube ;
- Réalisation d'un étiquetage correct des tubes au niveau du RTE ou des AE : étiquette « CTL Nul » collée sur le tube à bouchon gris, étiquette « Antigène TB1 » sur le tube à bouchon vert, étiquette « Antigène TB2 » sur le tube à bouchon jaune, étiquette « Mitogène » sur le tube à bouchon violet ;
- Réalisation de la centrifugation : le culot sanguin doit être visible au fond de chaque tube ;

Les tubes sont ensuite localisés au laboratoire d'immunologie cellulaire par un tracking « immuno » puis placés sur un portoir métallique entre 2°C et 8°C au réfrigérateur.

➤ **Prélèvements acheminés RTE ou aux AE en dehors des heures ouvrées :**

En dehors des heures ouvrables du laboratoire, le stockage des prélèvements au réfrigérateur est assuré par un agent des AE. Les tubes sont localisés par tracking aux AE et sont transférés au laboratoire d'immunologie cellulaire en période ouvrée via le Télébac.

En cas de non-respect des critères pré-analytiques, une non-conformité est saisie sur MOLIS par ajout du code « INCPRE » sur le dossier correspondant. La raison de la non-conformité, l'analyse concernée et des explications complémentaires seront renseignés (utilisation de codes pré-enregistrés).

c. Réalisation du test QFT®-Plus

L'ensemble des étapes analytiques et post-analytiques pour la réalisation du test QFT®-Plus au laboratoire d'immunologie cellulaire détaillée dans les paragraphes suivants est résumé en Annexe 2.

Une série de test correspond à une plaque pouvant contenir les échantillons de 21 patients (soit 84 tubes). Une à deux séries sont réalisées quotidiennement en routine.

Etapes analytiques :

- 1. Préparation des réactifs et des échantillons.** Le kit réactif est sorti du réfrigérateur pour reconstitution de la solution mère par ajout d'un volume défini d'eau distillée. La concentration standard à atteindre est de 8 UI/mL. Le volume de reconstitution de la solution mère pouvant varier d'un lot à l'autre, il est nécessaire se référer à l'étiquette du flacon pour connaître le volume d'eau distillée à ajouter. De la même façon, le conjugué est reconstitué par ajout de 0,3 mL d'eau distillée. Ces solutions ainsi reconstituées sont placées sur agitateur pour une durée de 20 minutes avant la première utilisation. Elles peuvent se conserver jusqu'à 3 mois entre 2°C et 6°C. Dans le même temps, les pools de CQI sont sortis du congélateur. Tous les échantillons et réactifs doivent être amenés à température ambiante avant de procéder à l'analyse.
La technicienne en charge de l'analyse réalise ensuite une gamme standard par dilutions successives à partir de la solution mère de 8 UI/mL, visant à obtenir une gamme de 4 tubes « standard » de concentration décroissante (4 UI/mL, 1 UI/mL, 0,25 UI/mL, 0 UI/mL). Cette étape comprend également la préparation du tampon de lavage, du conjugué par dilution à partir de la solution préalablement reconstituée. Le substrat et la solution de blocage d'enzyme sont individuellement transvasés dans un flacon réactif de 25 mL.
- 2. Utilisation et programmation de l'automate DS2.** L'ordinateur et la Station ELISA automatique DS2® sont mis sous tension. La technicienne lance le

logiciel « DS-Matrix », propre au DS2, ainsi que la liste de travail du jour sur le logiciel PGP. Les échantillons de patients sont chargés sur l'automate dans des racks en respectant un **ordre précis** : « **Nil-TB1-TB2-Mitogen** ». L'étiquette doit être visible et placée côté lecteur. Les réactifs, les CQI, la gamme d'étalonnage et les cônes sont disposés dans l'automate à l'emplacement prévu (Figure 42).

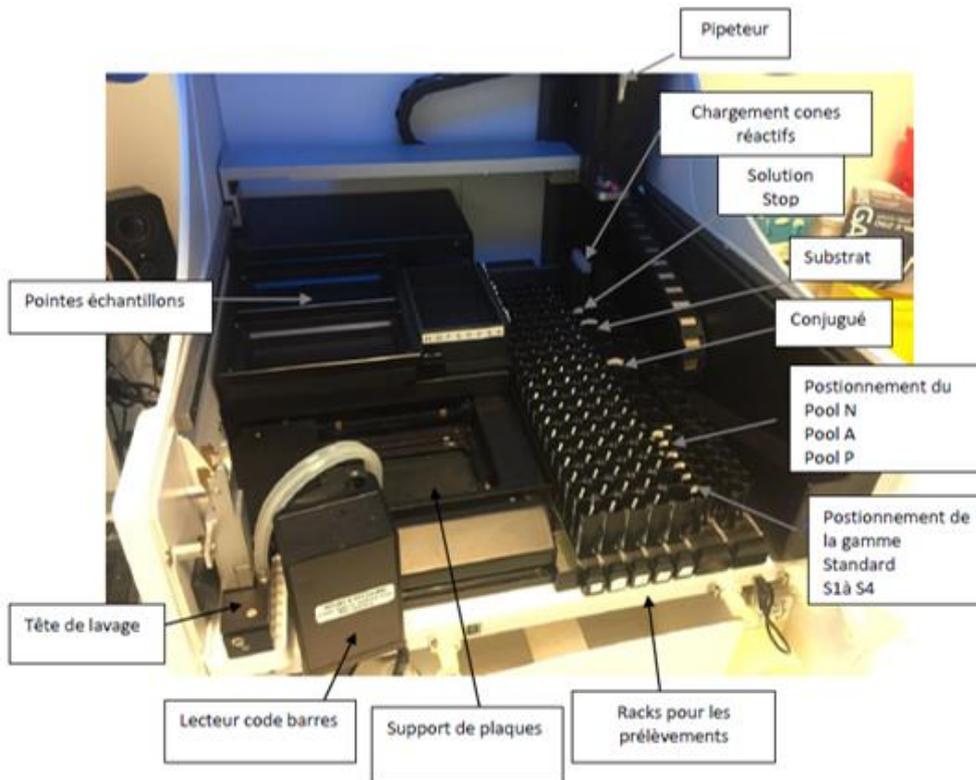


Figure 42 : Composantes interne de la station ELISA automatique DS2 (202)

Le nombre d'échantillons à tester est renseigné par la technicienne sur le logiciel DS-Matrix, qui active ensuite la lecture des codes-barres par l'automate. Les numéros de chacun des tubes s'incrémentent au fur et à mesure. Lorsque tous les échantillons ont été lus et validés, le dosage « 2017 QTF PLUS » est sélectionné et ajouté. La barre de test apparaît avec le dosage sélectionné pour les patients de la série. A cette étape, il sera vérifié que le nombre de demandes envoyées sur le logiciel PGP correspond bien au nombre de tubes dosés (équivalent au nombre de patient multiplié par 4). La technicienne valide les tests programmés via un planificateur, puis procède au chargement des réactifs et consommables en suivant les indications fournies par l'automate. La plaque doit

être identifiée comme telle : « année mois jour_initiales du technicien_numéro de lot réactif ». Une fois le planificateur de tests complété, le dosage est lancé. Il est souhaitable que la technicienne vérifie la bonne qualité du pipetage par l'automate. Si une erreur de pipetage survient, une alarme se déclenche et plusieurs alternatives seront proposées : accepter l'échantillon (variation minimale par rapport à la courbe étalon), changement d'embout, réalisation d'un pipetage manuel de l'échantillon (si présence d'un caillot par exemple). A la fin du dosage, le rapport de l'automate est sélectionné et imprimé.

- 3. Validation technique des CQI et des résultats.** Les CQI sont des pools « maison » constitués à partir d'un sérum humain AB auquel est ajouté de l'IFNy à trois concentrations. Ils sont passés dans chaque série de test QFT®-Plus, et sont distribués en dernier par l'automate. Cela permet de valider le fonctionnement du DS2 pour une série donnée, dès lors que la série précédente était conforme. Les valeurs des densités optiques (DO) des points de la gamme sont vérifiés sur le rapport du DS2, ainsi que la mention « CQ passés » en haut à droite du rapport. Les résultats des CQI sont basculés sur le logiciel PGP, où ils sont validés puis transmis sur le logiciel Unity Real Time (URT). Sur URT, la technicienne procède à la vérification et à la validation des CQI ; cela correspond à la révision initiale. Des commentaires ou actions sont saisis si besoin. Pour le suivi des CQI est utilisée une moyenne flottante avec un coefficient de variation (CV) fixé (la fixation du CV est réalisée après 30 à 50 dosages). Si les CQI sont conformes, les résultats des patients peuvent être transférés du DS2 vers le logiciel PGP. La liste complète des patients triés selon leur numéro de dossier MOLIS est imprimée, associée au rapport du DS2 préalablement édité et signée par la technicienne ayant réalisé la phase analytique. Ces documents seront ensuite utilisés pour la validation biologique.

d. Validation biologique du test QFT®-Plus

Cette étape est réalisée par les biologistes ou les internes de l'Institut d'Immunologie habilités à la validation des tests IGRAs.

La première étape de la validation biologique du test QFT®-Plus est la validation des CQI dans le logiciel URT. Suite à la révision initiale réalisée par la technicienne, l'interne ou le biologiste habilité analyse et valide à son tour les CQI de la série sur

URT. Cette étape de révision superviseur permet de s'assurer que l'étape de validation technique de CQI répond bien aux règles de Westgard (cf. document interne du laboratoire d'immunologie cellulaire CQL-FI-IMM-120 : CQI Mise en place des règles de Westgard dans Unity Real Time). Le validateur vérifie également qu'il n'existe pas de dérive systématique des CQI en se référant aux courbes de Levey-Jennings (Figure 43).



Figure 43 : Courbes de Levey-Jennings pour les trois niveaux de CQI du test sur le logiciel URT. Niveau 1 : contrôle bas ; niveau 2 : contrôle medium ; niveau 3 : contrôle haut (199).

Pour valider une série, au moins deux CQI sur les trois doivent être conformes. En cas de violation d'une règle de Westgard sur plus d'un des CQI de la série, les échantillons de patients sont repassés dans une prochaine série. Plusieurs cas de figures peuvent alors se présenter :

- **Les CQI sont conformes** : validation biologique des résultats pour les patients de la série.
- **les CQI sont à nouveau non conformes et il n'y a pas eu de changement de lot de réactifs** : un contrôle de l'automate et une éventuelle action de maintenance seront effectués, puis les échantillons repassés ultérieurement. Si lors de ce repassage, les CQI restent non conformes, il sera nécessaire de

contacter le fournisseur, de rejeter la série et d'appliquer une procédure dégradée (cf. Procédure interne du laboratoire d'immunologie cellulaire).

- **Les CQI sont à nouveau non conforme et il y a eu un changement de lot de réactifs** : il est nécessaire de contacter le fournisseur afin de l'informer de ce dysfonctionnement. La série sera rejetée et une procédure dégradée sera mise en place.

Une fois la révision superviseur des CQI achevée sur le logiciel URT, les résultats peuvent être validés sur le logiciel MOLIS. De même que pour les tests T-SPOT.TB®, la validation des tests QFT®-Plus est disponible dans l'action de validation « IMQTF2 » (Figure 44). Après validation technique, les résultats y sont transmis automatiquement via PGP par connexion informatique. Le biologiste ou l'interne habilité dispose de la feuille de résultats de l'automate et des données brutes. Il vérifie la courbe de calibration et la cohérence des résultats sur la feuille de résultat automate.

The screenshot displays the MOLIS software interface for a patient's test results. It is divided into three main sections:

- Top Section (1):** Patient and test details. Fields include: Numéro alias (019500539798), Dt. récept. (12.12.19 13:35), Date prélèvement (12.12.19 08:45), Numéro de (19 504M 599), Demandeur (E190 ANALYSES EXTERIEURES CBP), Référence externe (6912120184), Prescripteur (CIB), Patient (MT19271 JJ), M (01.01.1987), Site (CIB), Pat. hosp. (?), Age (32), Numéro de séjour (?), N° patient externe (X1096917), and Remarque CR.
- Left Section (2):** Test results and biological commentary. It lists various test codes and their results:
 - 5 NATQTF Sang/ Tubes spéciaux Quantiféron®-TB Gold Plus.
 - 5 QTFR Pas d'indication sur la demande
 - 5 QTFFN 0,18
 - 5 QTFFP >10
 - 5 TITQTF
 - 5 QTFTB1 0
 - 5 QTFTB2 0
 - 5 REQTFP **NEGATIF.**
 - 5 TQTFP Réactif et méthode: Dosages obtenus par méthode ELISA, la société Qiagen et réalisés sur un automate DSII.
 - 5 QTFTB Facturation HORS NOMENCLATURE.
 - 5 COMQTF Dans le cadre d'un test Quantiféron réalisé pour contrôler le délai de six semaines à trois mois nécessaire à la *Mycobacterium tuberculosis*.
- Right Section (3):** A PDF preview of the test report. The report title is "Test Immunologique de dépistage de l'infection tuberculeuse latente par Quantification de la production d'interféron-γ". It shows the nature of the sample (Sang/ Tubes spéciaux Quantiféron®-TB Gold Plus), quantitative results for IFN-γ production (0.18 U/ml for non-stimulated cells, >10 U/ml for stimulated cells), and a final result of "NEGATIF".

Figure 44 : Exemple de dossier MOLIS d'un test QFT®-Plus au résultat négatif pour un patient anonymisé. Prélèvement provenant d'un CH extérieur (CH de Lens, médecine préventive). **1.** On retrouve dans la partie supérieure de l'écran les renseignements concernant le patient et le prélèvement. **2.** Dans la partie gauche de l'écran figurent les lignes correspondant à la nature du prélèvement (« NATQTF »), au motif de prescription renseigné par le service prescripteur (« QTFR »), aux résultats individuels des panels et des contrôles (contrôle négatif : « QTFFN », contrôle positif : « QTFFP », panels antigènes TB1 : « QTFTB1 » et TB2 : « QTFTB2 »), à l'interprétation globale du test (« REQTFP »), et au commentaire biologique (« COMQTF »). **3.** Un aperçu du compte-rendu au format pdf du test est visible dans la partie droite de l'écran.

Les résultats quantitatifs du test sont obtenus en soustrayant la valeur du taux d'IFN γ dosé pour le contrôle négatif au taux d'IFN γ mesuré après stimulation par les antigènes (pour les panels TB1 et TB2) et par le mitogène (pour le contrôle positif). Cette soustraction s'opère automatiquement lors du transfert des résultats ; les valeurs apparaissant dans le logiciel Molis sont ainsi interprétables telles quelles par le valideur. Le seuil de positivité du test est fixé à **0,35 UI/mL**. Un algorithme de validation biologique a été paramétré dans le logiciel Molis et sert de base à l'interprétation des résultats (Figure 45).

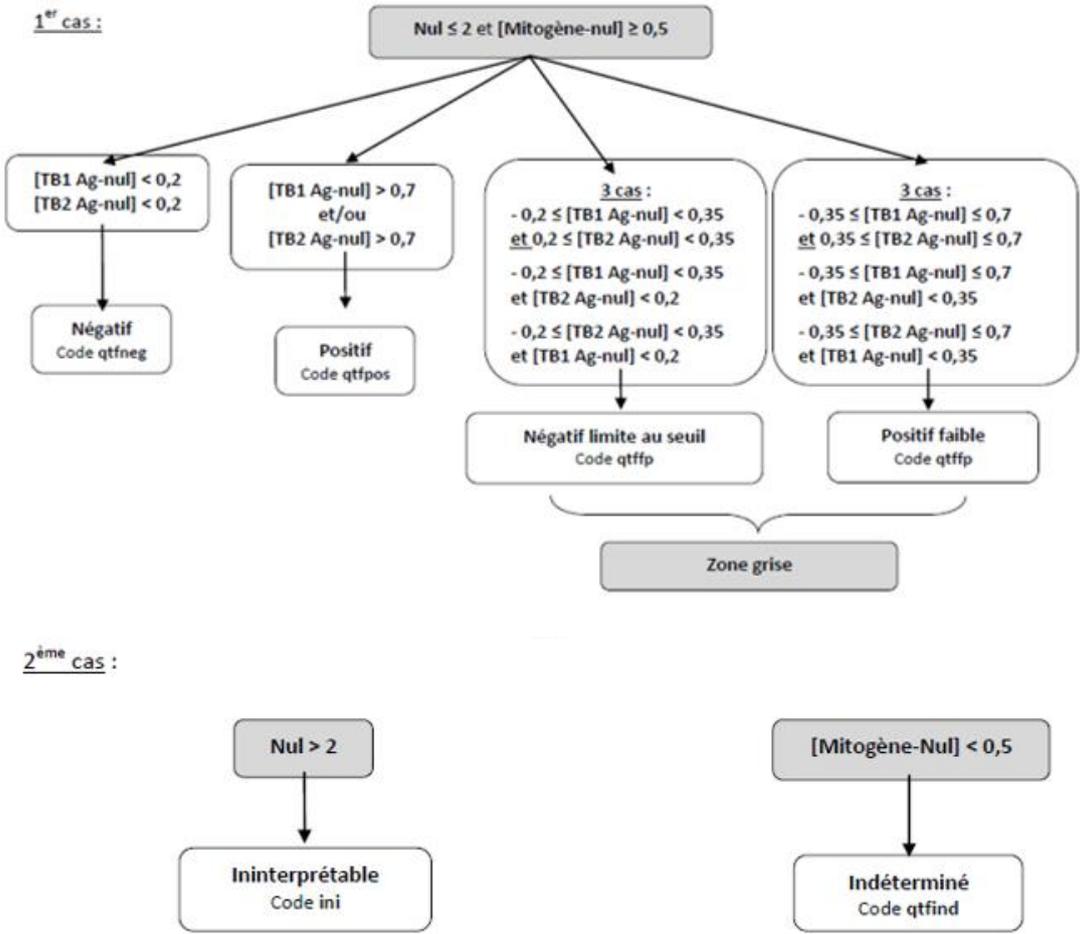


Figure 45 : Algorithme de validation biologique du test QFT®-Plus paramétré dans le logiciel MOLIS au laboratoire d'immunologie cellulaire (199)

Selon cet algorithme, deux cas de figure peuvent se présenter, en fonction du taux d'IFN γ retrouvé pour le contrôle positif et le contrôle négatif de chaque test. Les valeurs des

- Dans le premier cas : **le test est interprétable**. Le taux d'IFN γ au niveau du contrôle négatif du test est ≤ 2 UI/MI et le taux retrouvé pour le contrôle positif est $\geq 0,5$ UI/mL. Le résultat du test pourra être :
 - **Négatif** : taux d'IFN γ en TB1 et en TB2 $< 0,2$ UI/mL. Le code MOLIS du commentaire biologique correspondant est **qtfneg** : « *Dans le cadre d'un test Quantiféron réalisé pour contagé tuberculeux, l'interprétation d'un résultat négatif doit intégrer le délai de six semaines à trois mois nécessaire pour la mise en place chez le sujet d'une réaction immunitaire vis-à-vis de Mycobacterium tuberculosis.* ». Ce code est incrémenté automatiquement dans le logiciel MOLIS.
 - **Positif** : taux d'IFN γ en TB1 et/ou en TB2 $> 0,7$ UI/mL. Le code MOLIS du commentaire biologique correspondant est **qtfpos** : « *Ce résultat évoque une infection tuberculeuse ancienne ou récente. Il ne peut, à lui seul, être considéré comme une base unique et définitive pour déterminer une infection à Mycobacterium tuberculosis.* ». Ce code est à ajouter manuellement par le l'interne ou le biologiste valideur.
 - **Négatif limite au seuil** : trois cas de figure sont possibles :
 - taux d'IFN γ en TB1 **et** en TB2 compris entre 0,2 et 0,35 UI/mL ;
 - taux d'IFN γ en TB1 compris entre 0,2 et 0,35 UI/mL **et** taux d'IFN γ en TB2 $< 0,2$ UI/mL ;
 - taux d'IFN γ en TB2 compris entre 0,2 et 0,35 UI/mL **et** taux d'IFN γ en TB1 $< 0,2$ UI/mL.

Le code MOLIS du commentaire biologique correspondant est **qtffp** : « *Résultat à contrôler. Dans le cadre d'un test Quantiféron réalisé pour contagé tuberculeux, l'interprétation d'un résultat négatif doit intégrer le délai de six semaines à trois mois nécessaire pour la mise en place chez le sujet d'une réaction immunitaire vis-à-vis de Mycobacterium tuberculosis.* ».

- **Positif faible** : trois cas de figure sont possibles
 - taux d'IFN γ en TB1 et en TB2 compris entre 0,35 et 0,7 UI/mL ;
 - taux d'IFN γ en TB1 compris entre 0,35 et 0,7 UI/mL **et** taux d'IFN γ en TB2 < 0,35 UI/mL ;
 - taux d'IFN γ en TB2 compris entre 0,35 et 0,7 UI/mL **et** taux d'IFN γ en TB1 < 0,35 UI/mL.

Comme précédemment, le code MOLIS du commentaire biologique correspondant est **qtffp** : « *Résultat à contrôler. Dans le cadre d'un test Quantiféron réalisé pour contage tuberculeux, l'interprétation d'un résultat négatif doit intégrer le délai de six semaines à trois mois nécessaire pour la mise en place chez le sujet d'une réaction immunitaire vis-à-vis de Mycobacterium tuberculosis.* ».

Les résultats « négatifs limites au seuil » et « positifs faibles » se situent dans une zone grise, autour de la valeur du seuil de positivité de 0,35 UI/mL ; leur interprétation est délicate. Ces résultats imposent un contrôle à distance (délai de six semaines minimum) sur un nouveau prélèvement. S'il persiste un résultat équivoque lors de ce contrôle il sera préconisé au prescripteur de réaliser un contrôle sur un test T-SPOT.TB®. Cette analyse nécessitant un temps technique important pour l'extraction manuelle des CMN (cf. paragraphe suivant), le prescripteur devra au préalable prendre rendez-vous avec le laboratoire d'immunologie cellulaire.

- Dans le deuxième cas : **le test n'est pas interprétable**. Cela peut correspondre à deux situations :
 - **Le taux d'IFN γ au niveau du contrôle négatif du test est > 2**, indiquant une activation lymphocytaire en dehors de la stimulation antigénique par les protéines ESAT-6 et CFP-10. Le code MOLIS du commentaire biologique correspondant est **ini** : « *Résultat ininterprétable en raison d'un taux d'IFN- γ élevé en l'absence de toute stimulation (contrôle négatif du test > 2 UI/mL).* ». »
 - **Le taux d'IFN γ au niveau du contrôle positif du test est < 0,5 UI/mL**, signant une synthèse insuffisante d'IFN γ après stimulation de l'ensemble des lymphocytes du patient par la PHA. . Le code MOLIS du

commentaire biologique correspondant est **qtfind** : « *Le résultat est indéterminé en raison d'une production d'IFN γ par les lymphocytes T stimulés en présence de mitogène en-dessous du seuil de positivité (contrôle positif du test < 0,5 UI/mL).* ».

De la même façon que pour les tests T-SPOT.TB[®], les résultats sont à interpréter en fonction d'éventuelles antécédents, des autres paramètres biologiques pertinents et du contexte clinique du patient (s'il est connu). La liste des résultats est à émarger au fur et à mesure de la validation des tests sur Molis. Le biologiste ou l'interne habilité signe cette liste et la dépose dans la bannette dédiée aux tests IGRAs.

3. T-SPOT.TB[®] (Oxford Immunotech) avec extraction manuelle des cellules mononucléées du sang

Depuis le mois de février 2020, la technologie d'extraction automatisée des CMN du sang par la plateforme Nimbus-Presto a permis le passage à la réalisation du test T-SPOT.TB[®] en première intention. Avant cette date, l'ELISpot était la technique de seconde intention pour la réalisation des tests IGRAs à l'Institut d'Immunologie du CHU de Lille. Comme pour le test dans sa version automatisée, le kit réactif T-SPOT.TB[®] est fourni par la société Oxford Immunotec.

Les indications retenues pour détecter une infection tuberculeuse par technique ELISpot sont les suivantes :

- Obtention d'un premier résultat indéterminé par technique ELISA, signant une production insuffisante d'IFN γ par les lymphocytes stimulés en présence de mitogène (contrôle positif du test <0,5 UI/mL). Ce cas de figure est plus fréquent chez les patients lymphopéniques (immunodéprimés) ainsi que chez les enfants.
- Persistance d'un résultat équivoque (taux d'IFN γ en TB1 **et** en TB2 compris entre 0,2 et 0,7 UI/mL) lors d'un bilan de contrôle.

L'une des solutions pour parvenir à rendre un résultat de test IGRA consiste à travailler sur les CMN seules, permettant d'ajuster la concentration de lymphocytes.

a. Exigences pré-analytiques

Le test T-SPOT.TB® est effectué sur une préparation de CMN isolées manuellement à partir d'un prélèvement sanguin. Les critères pré-analytiques suivants sont requis :

- Prélèvement de trois tubes héparinate de lithium de 7mL.
- Immédiatement après le prélèvement, le tube doit être retourné 8 à 10 fois pour s'assurer de la bonne mise en contact du sang avec l'anticoagulant.
- Acheminement au laboratoire à température ambiante dans un délai de 8h au maximum.

b. Matériel et consommables

Le test utilise le kit réactif T-SPOT.TB® (Oxford immunotec), dont la composition a été décrite précédemment. Le matériel et les consommables complémentaires utilisés pour les différentes étapes de la réalisation du test T-SPOT.TB® avec extraction manuelle des CMN sont listés en Annexe 3.

c. Réalisation et lecture du test

Les principales étapes de la réalisation du test T-SPOT.TB® avec extraction manuelle des CMN au laboratoire d'immunologie cellulaire sont résumées dans les paragraphes suivants et en Figure 46. Elles sont détaillées dans les procédures internes du laboratoire d'immunologie cellulaire, applicables avant février 2020 et le passage à la technique ELISpot en première intention (203–205).

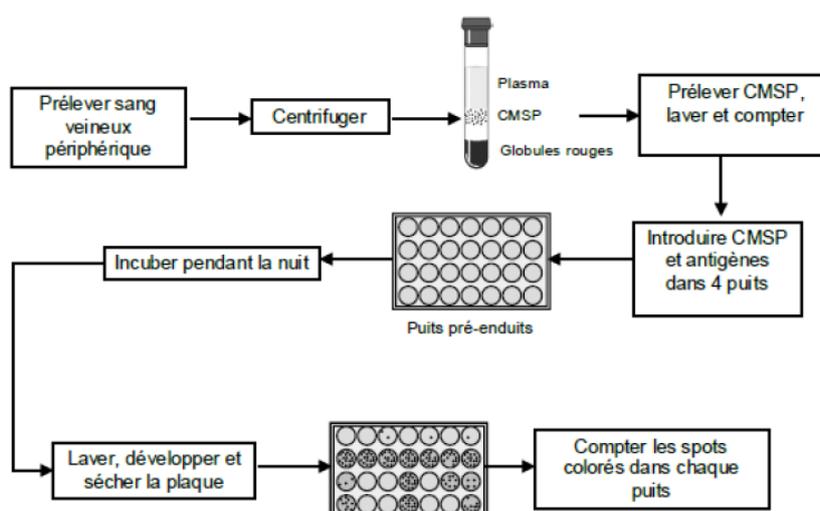


Figure 46 : Principales étapes de la réalisation du test T-SPOT.TB® au laboratoire d'immunologie cellulaire avant l'automatisation. Schéma extrait de la notice <http://www.oxfordimmunotec.com/96-France>.

1. **Isolement des CMN.** Il se réalise dans un tube Falcon® de 50 mL. Les CMN sont séparées du sang total par centrifugation en gradient de densité. L'utilisation du Ficoll® comme milieu de séparation permet de séparer les différents éléments du sang par utilisation de la différence de densité entre les CMN et les hématies et PNN (Figure 47) :

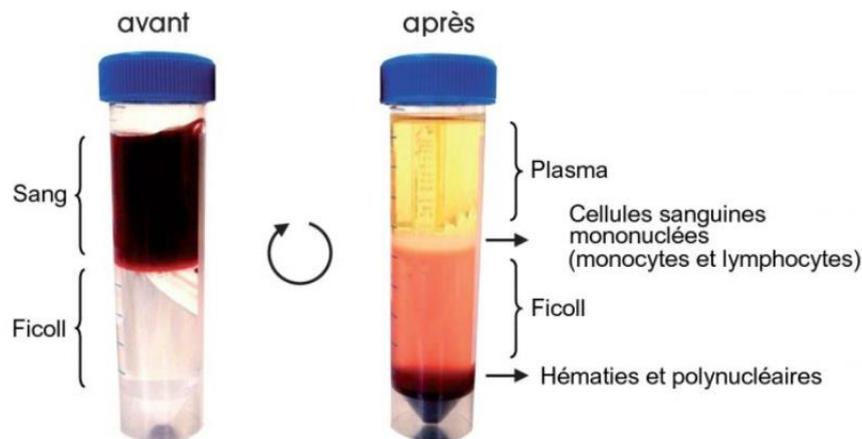


Figure 47 : Isolement des CMN par centrifugation en gradient de densité (Ficoll®). Aspect avant (à gauche) et après centrifugation (à droite). D'après la page « Diagnostic indirect de la tuberculose : tests de sécrétion d'IFN γ du site internet <https://microbiologiemedicale.fr>.

Les érythrocytes et les PNN, de densité supérieure au Ficoll®, passent au travers et sont regroupés au fond du tube. Les lymphocytes et les monocytes, de densité inférieure au Ficoll®, restent entre le plasma et le milieu de séparation. Les CMN sont ainsi récupérées à l'aide d'une pipette de transfert puis lavées à deux reprises dans du RPMI préalablement réchauffé à 37°C. Après lavage et assèchement du culot, les CMN sont prêtes à être numérées.

2. **Numération des CMN.** La suspension cellulaire est homogénéisée et transférée dans un tube à cytométrie dans lequel est ajouté le mix d'anticorps T4T8. L'acquisition de la numération des CMN est réalisée par le cytomètre en flux Navios.
3. **Normalisation de la suspension cellulaire.** Préparation d'une suspension de $2,5 \times 10^6$ cellules/mL.
4. **Préparation de la plaque et incubation.** Pour chaque patient l'opérateur distribue dans le puits n°1 : 50 μ L d'AIM-V (contrôle négatif), dans les puits

n°2 et 3 : 50 μ L des panels A et B respectivement, et dans le puits n°4 : 50 μ L de PHA. La suspension normalisée est distribuée dans les 4 puits du test pour chaque patient ; chaque puits contient ainsi 100 μ L soit 250 000 cellules. La plaque est incubée à 37 \pm 1 $^{\circ}$ C à 5% de CO₂ pendant 16 à 20h. Cette étape correspond au Jour 1 du test.

5. **Révélation du test** : La plaque est sortie de l'incubateur et lavée à 6 reprises avec 250 μ L de PBS. Les étapes conduisant au développement des spots sont similaires à celles détaillées précédemment pour le test T-SPOT.TB[®] automatisé, et correspondent au Jour 2 du test.
6. **Lecture des spots et interprétation du test**. La lecture des barrettes est réalisée sur le lecteur ELISpot CTL Immunoscan. Le lecteur est un scanner classique, auquel est ajouté un masque en plastique développé spécifiquement par la société CTL pour le test T-SPOT.TB[®] et le logiciel TB SCAN. Ce masque permet le positionnement des barrettes ou demi-barrettes de tests, permettant leur lecture (Figure 48).

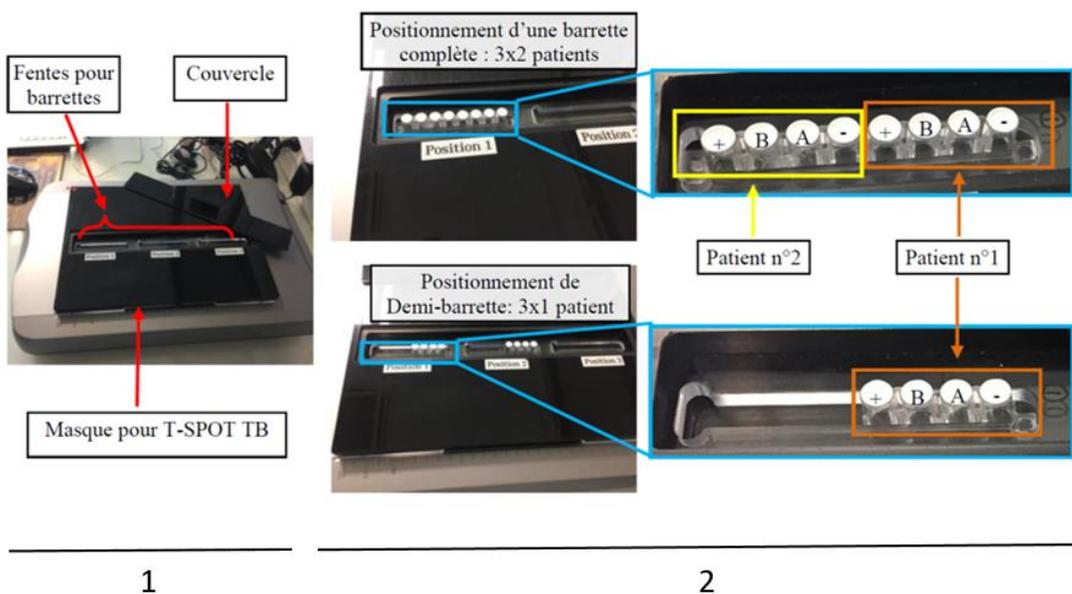


Figure 48 : Lecteur ELISpot CTL Immunoscan, utilisé pour la lecture du test T-SPOT.TB[®] à l'Institut d'Immunologie avant la mise en place de l'automatisation. 1 : 3 emplacements pour barrettes de test sont présents sur le masque et permettent la prise en charge de 6 tests de patient. 2 : exemples de positionnement des barrettes ou demi-barrettes sur le masque du lecteur (205)

Une fois le scan des barrettes effectué, le binôme biologiste-technicienne procède à la lecture des spots sur le logiciel TB SCAN. Le résultat de chaque puits est validé avec ou sans modification des paramètres de détection des spots (Figure 49).

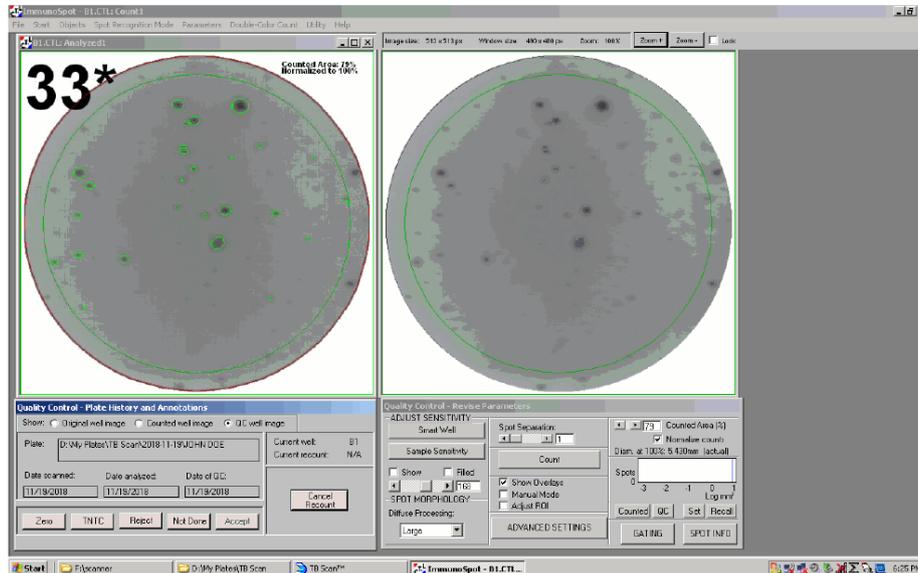


Figure 49 : Exemple de validation analytique de l'un des puits d'un test T-SPOT.TB® via le logiciel TB SCAN après lecture par le lecteur ELISpot CTL Immunoscanner. A gauche : les spots comptés par le logiciel pour le puits sélectionnés apparaissent en vert, leur nombre figure en noir en haut à gauche. A droite : fenêtre de révision des paramètres de détection des spots (en bas). Les éventuelles modifications font évoluer le nombre et/ou la qualité (taille et forme) des spots (en haut) (205)

Les paramètres ont été définis par le fournisseur afin d'assurer une lecture optimale des spots dans la majorité des cas. Cependant, il est parfois nécessaire de les modifier afin d'améliorer le décompte (par exemple, diminution de la sensibilité en cas de bruit de fond important, retirer la prise en compte d'artefact de coloration).

Une fois la lecture effectuée, le compte-rendu des résultats créé par le logiciel est édité et les résultats sont saisis manuellement par le biologiste dans le dossier MOLIS de chaque patient. L'interprétation du test T-SPOT.TB® avec extraction manuelle des CMN du sang suit le même algorithme que celui détaillé précédemment pour les tests réalisés de façon automatisée (cf. D.g. Validation biologique du test T-SPOT.TB®).

E. Recueil et analyse des données

1. Recueil des données

Les différentes périodes d'étude dont sont issues les données sur les tests IGRAs analysées sont décrites dans le chapitre précédent (cf. B. Périodes d'intérêt). L'ensemble des données a été recueillies à l'aide d'extractions réalisées avec le logiciel Molis selon les modalités suivantes :

1. sélection de l'onglet « interrogation des demandes »
2. renseignement de la période souhaitée +/- de l'UF prescriptrice ciblée
3. ajout d'une sélection supplémentaire en sélectionnant l'option « accéder au détail »
4. dans l'onglet « spécifique », renseignement d'un code correspondant à l'analyse étudiée (par exemple, « TSPOTA ») et de la valeur ou des bornes de la valeur du résultat dont on souhaite extraire les données (par exemple >8).
5. Sélectionner « exécuter ».

Les échantillons correspondant aux critères d'extraction apparaissent, au choix, sous forme de tableau dans le logiciel Excel ou sur une liste dans MOLIS.

Les images des spots présentées en Résultats sont issues des tests lus sur le lecteur ELISpot CTL du laboratoire et sauvegardées dans la base de données de l'ordinateur associé au lecteur.

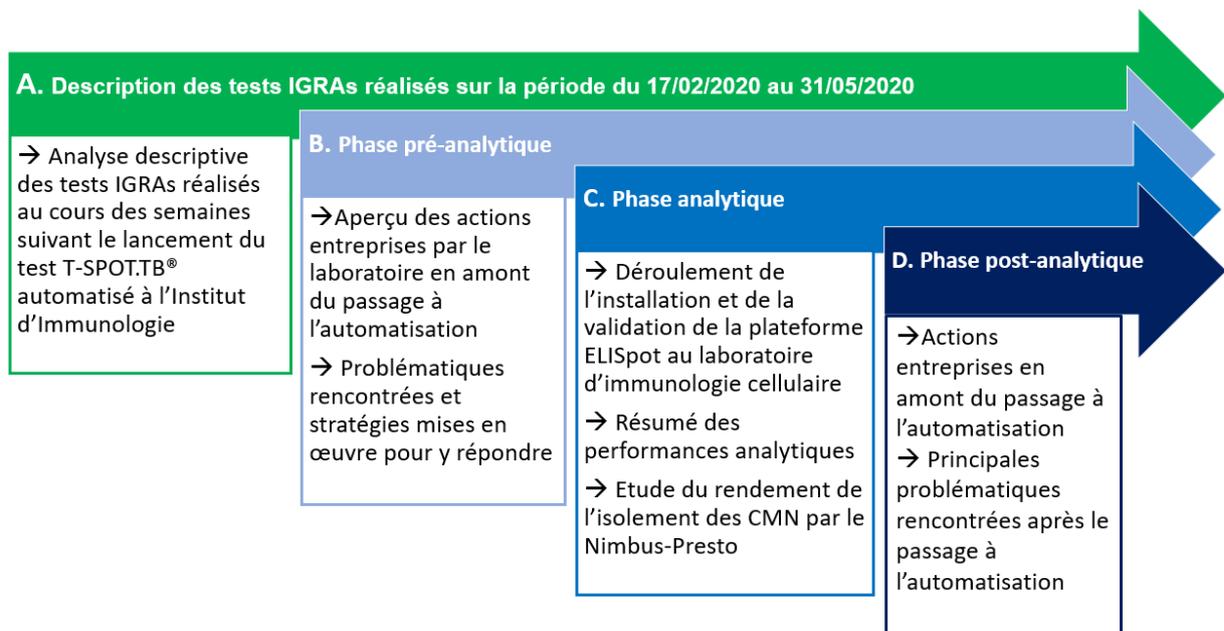
2. Analyse des données

L'analyse statistique des données générales sur les tests IGRAs pris en charge à l'Institut d'immunologie sur les périodes d'études a été réalisée sur le logiciel Microsoft Excel. L'analyse statistique sur les performances analytiques de la plateforme ELISpot a été réalisée par la société Oxford Immunotec (rapport « T-SPOT A50 Platform P626 Performance Summary »).

Troisième partie

Résultats

Les résultats détaillés dans ce travail de thèse seront présentés de la façon suivante :



Dans un premier temps, sera réalisée une vue d'ensemble sur les tests IGRAs réalisés à l'Institut d'Immunologie du CHU de Lille, depuis le lancement des tests T-SPOT.TB® en routine au laboratoire permise par l'installation de la plateforme Nimbus-Presto. Nous décrirons ensuite les différentes problématiques rencontrées dans le cadre du changement de méthode, ainsi que les actions menées par le laboratoire, pour chacune des trois phases de l'EBM définies précédemment.

A. Description des tests IGRAs réalisés sur la période d'intérêt du 17/02/2020 au 31/05/2020

Les données générales sur l'ensemble des demandes de tests IGRAs provenant des services du CHU de Lille et des sites extérieurs ont été collectées de manière prospective depuis le jour du passage à l'automatisation du test T-SPOT.TB® au 17/02/2020 et jusqu'à la fin de la première vague épidémique de la Covid-19 en France, définie dans ce travail au 31/05/2020. Cela correspond aux périodes b et c (Figure 50).

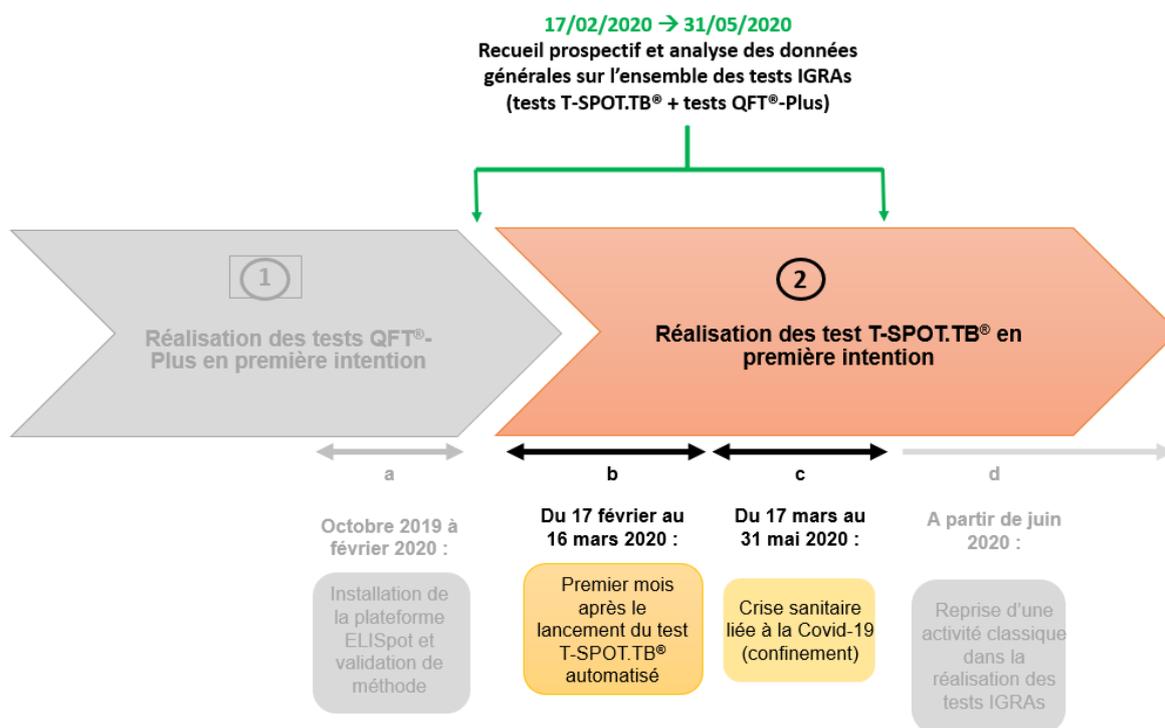


Figure 50 : Périodes d'intérêts et données générales concernant l'ensemble des tests IGRAs réalisés du 17/02/2020 au 31/05/2020 à l'Institut d'Immunologie du CHU de Lille. Adaptation de la Figure 26 présentée en Matériel et Méthodes.

1. Répartition globale et évolution des tests IGRAs réalisés sur la période du 17/02/2020 au 31/05/2020

Sur cette période, un total de 1623 demandes de tests IGRAs a été traité par le laboratoire d'immunologie cellulaire. La majorité des demandes provient de l'extérieur : 928 prescriptions (58%) contre 685 (42%) émanant des services du CHU de Lille (Tableau 5).

Tableau 5 : Répartition des tests IGRAs réalisés au laboratoire d'immunologie cellulaire du CHU de Lille sur la période d'intérêt du 17/02/2020 au 31/05/2020, en fonction du test réalisé et de la provenance de la demande.

Demandes de tests IGRA prises en charge au laboratoire du 17/02/2020 au 31/05/2020			
	CHU de Lille	CH et laboratoires extérieurs	total
tests T-SPOT.TB®	544	418	962
tests QFT®-Plus	141	520	661
	685	938	1623

L'intégralité des services du CHU de Lille et des CH et laboratoires extérieurs prescripteurs des tests IGRAs analysés ci-après sont répertoriés en Annexe 4. Sur l'ensemble des tests IGRAs pris en charge sur cette période de transition, un peu plus de la moitié sont des tests T-SPOT.TB® (59% contre 41% de tests QFT®-Plus) (Figure 51).

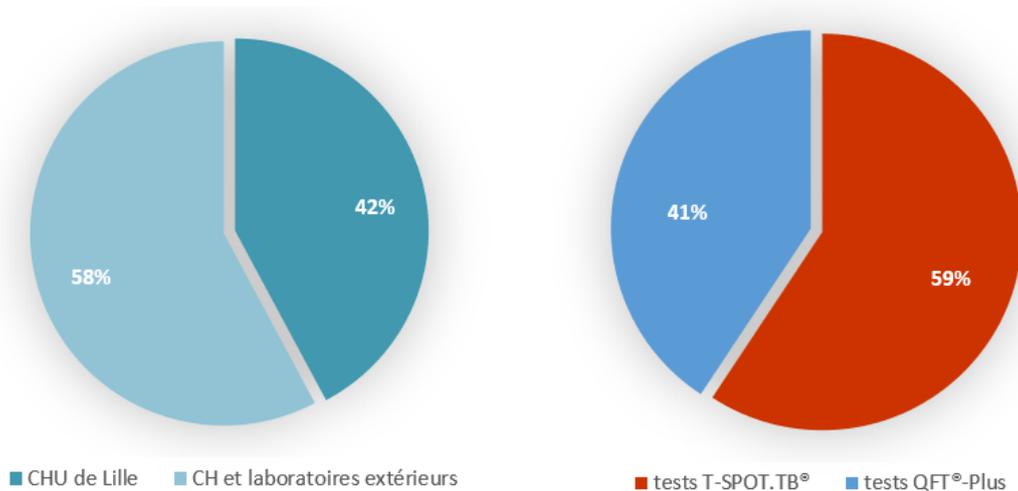


Figure 51 : Distribution des demandes de tests IGRAs prises en charge au laboratoire d'immunologie cellulaire au CHU de Lille selon l'origine du service prescripteur et le type de test réalisé sur la période du 17/02/2020 au 31/05/2020.

On observe que le nombre de tests IGRAs réalisés au laboratoire n'est pas linéaire au cours de cette période. La Figure 52 permet de suivre l'évolution de l'activité du laboratoire semaine après semaine. Sur la période **b**, correspondant au premier mois après le passage au test T-SPOT.TB® en première intention, le nombre de demandes gérées par le laboratoire demeure stable : entre 160 et 180 demandes par semaine, avec une proportion croissante de tests T-SPOT.TB® par rapport aux tests QFT®-Plus.

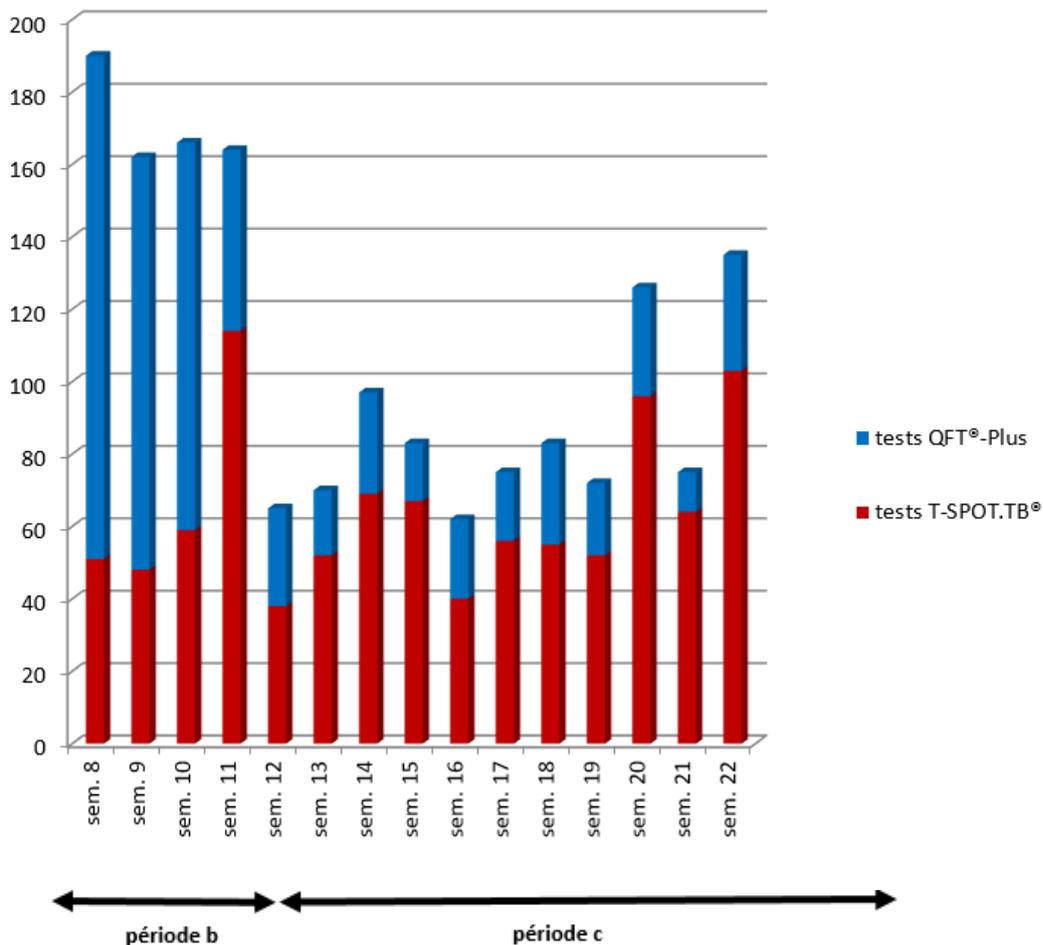


Figure 52 : Répartition des tests IGRAs réalisés au laboratoire d'immunologie cellulaire du CHU de Lille par semaine sur la période du 17/02/2020 au 31/05/2020. Semaine 8 : semaine du passage effectif aux tests T-SPOT.TB® en première intention (semaine du 17/02/2020 au 23/02/2020).

Le nombre de tests effectués diminue de manière importante à partir de la semaine 12, correspondant à la semaine du 16 mars 2020 qui voit l'entrée en vigueur des mesures gouvernementales instaurant le confinement de la population en France en lien avec la crise sanitaire liée à la Covid-19. Sur la période **c**, le nombre de tests réalisés par semaine reste globalement stable jusqu'à la semaine 19. Le nombre de demandes traitées repart à la hausse à partir de la semaine 20, semaine du 11 mai 2020, marquant le début du déconfinement en France. Au début de la période **c**, la majorité des tests IGRAs réalisés sont des tests T-SPOT.TB®.

Parmi les patients dont sont issus les prélèvements pris en charge au laboratoire entre le 17/02/2020 et le 31/05/2020, 557 sont des femmes (58%) et 387 sont des hommes (42%) (Tableau 6).

Tableau 6: Caractéristiques des patients dont sont issus les prélèvements correspondant aux tests IGRA réalisés au laboratoire d'immunologie cellulaire du CHU de Lille sur la période du 17/02/2020 au 31/05/2020.

Demandes de tests IGRAs prises en charge au laboratoire du 17/02/2020 au 31/05/2020					
	Femmes (n= 944)	Hommes (n=679)	Age min - max (années)	Age médian (années)	moyenne d'âge (années)
tests T-SPOT.TB®	557	405	0 - 100	39	43
tests QFT®-Plus	387	274	1 - 97	36	40
%	58	42			

Les tranches d'âges des patients pour lesquels sont prescrits les tests IGRAs sont variables et étendues, que ce soit pour les tests T-SPOT.TB® ou QFT®-Plus. Les plus jeunes patients sont des nourrissons de quelques mois à 1 an ; le plus âgé a 100 ans. L'âge médian des patients est assez similaire pour les deux tests, et est compris entre 35 et 40 ans.

2. Demandes de tests IGRAs provenant des services du CHU de Lille sur la période du 17/02/2020 au 31/05/2020

Selon les données recueillies pendant la période d'intérêt, un total de 685 demandes de tests IGRAs a été comptabilisé pour les services du CHU de Lille. Le premier pôle prescripteur de tests IGRAs sur cette période est le pôle « Santé publique, pharmacie et pharmacologie », dont est issu le service de Médecine du travail (MT), avec 184 tests prescrits, soit 27% des tests prélevés au sein du CHU de Lille (Figure 53 et Tableau 7). Il est suivi du pôle « Spécialités médicales » (cf. Annexe 4) qui totalise 165 tests (24%) ; les pôles « Médico-chirurgical » et « Spécialités médico-chirurgicales », regroupés dans ce travail pour l'analyse des données, sont les troisièmes prescripteurs de tests IGRAs du CHU de Lille avec 134 demandes, soit 20% des tests (Tableau 7).

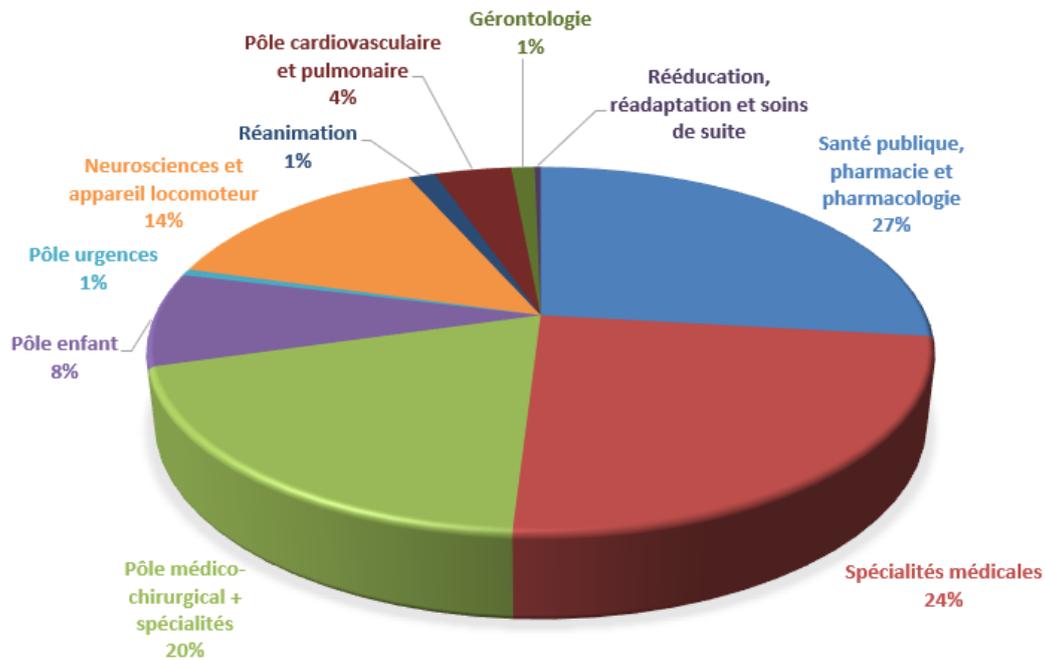


Figure 53 : Répartition des demandes de tests IGRAs entre les différents pôles du CHU de Lille sur la période du 17/02/2020 au 31/05/2020.

Le pôle « Neurosciences et appareil locomoteur » totalise 14% des demandes, représentant près d'une centaine de tests. Les différents services de pédiatrie, regroupés dans le pôle « Enfant », ont prélevé 8% des tests IGRAs étudiés dans ce travail, soit 57 tests. Le pôle « Cardiovasculaire et pulmonaire », avec 26 tests prescrits (4%), est le 6^{ème} pôle prescripteur. Enfin, les pôles les moins pourvoyeurs de tests IGRAs sont les pôles « Réanimation » (9 demandes), « Gérontologie » (8 demandes), « Urgences (4 demandes) » et « Rééducation, réadaptation et soins de suite » (2 demandes).

Tableau 7 : Demandes de tests IGRAs provenant des services du CHU de Lille : répartition par pôle et par tests réalisés sur la période du 17/02/2020 au 31/05/2020 (périodes b + c de l'étude).

Tests IGRA prescrits par les pôles du CHU de Lille (périodes b et c)			
Pôles	IGRA totaux	tests T-SPOT.TB®	tests QFT®-Plus
Santé publique, pharmacie et pharmacologie	184	111	73
Spécialités médicales	165	148	17
Pôle médico-chirurgical + spécialités	134	114	20
Pôle enfant	57	44	13
Pôle urgences	4	3	1
Neurosciences et appareil locomoteur	96	84	12
Réanimation	9	9	0
Pôle cardiovasculaire et pulmonaire	26	21	5
Gérontologie	8	8	0
Rééducation, réadaptation et soins de suite	2	2	0
Total	685	544	141
%	100	79	21

Près de 80% des tests réalisés sur les échantillons provenant de l'ensemble des services prescripteurs du CHU de Lille sont des tests T-SPOT.TB® (Tableau 3). Cette proportion est applicable à la majorité des pôles, pour lesquels le pourcentage de tests QFT®-Plus réalisés oscille entre 10 et 15%. Ce n'est pas le cas pour le pôle « Santé publique, pharmacie et pharmacologie ». Pour ce pôle, sur les 184 tests IGRA prescrits au cours des périodes **b** et **c**, 73 tests QFT®-Plus ont été réalisés, ce qui représente 40% des tests prescrits, soit le double de ce que l'on observe pour l'ensemble des pôles. A l'inverse, pour les pôles « Gérontologie » et « Rééducation, réadaptation et soins de suite », l'intégralité des tests réalisés sont des tests T-SPOT.TB®.

3. Demandes de tests IGRAs provenant des sites extérieurs au CHU de Lille sur la période du 17/02/2020 au 31/05/2020

L'Institut d'Immunologie draine des prélèvements provenant de nombreux centres hospitaliers, laboratoires et structures médico-sociales extérieurs au CHU de Lille. Les différents sites adressant leurs demandes de tests IGRAs au sein des départements du Nord et du Pas-de-Calais apparaissent sur la Figure 54 ci-dessous.



Figure 54 : Sites extérieurs prescripteurs des tests IGRAs réalisés au laboratoire d’immunologie cellulaire du CHU de Lille du 17/02/2020 au 31/05/2020, situés dans les départements du Nord et du Pas-de-Calais. CBNA : Centre Biologie Nord Artois ; COL : Centre Oscar Lambret ; CH : Centre hospitalier ; GCS : Groupement de coopération sanitaire.

Le laboratoire prend également en charge un certain nombre de demandes provenant de sites plus éloignés, comme le département de la Somme, appartenant à la région Hauts-de-France, ainsi que plusieurs villes de la région Grand-Est (Figure 55).

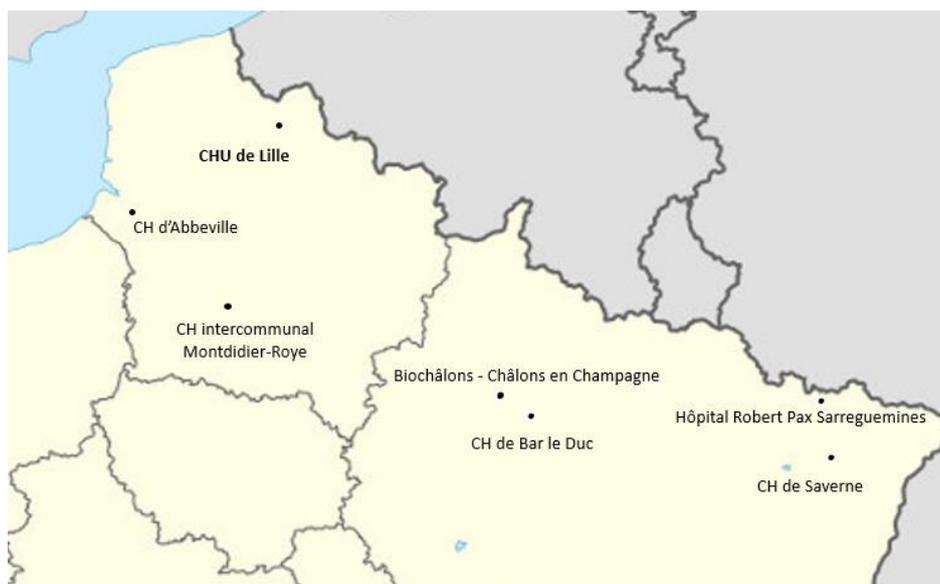


Figure 55 : Sites extérieurs prescripteurs des tests IGRAs réalisés au laboratoire d’immunologie du 17/02/2020 au 31/05/2020, situés en région Hauts-de-France (hors Nord et Pas-de-Calais) et en région Grand-Est.

La grande majorité des prélèvements est issue de sites de la région Hauts-de-France : 54% des échantillons ont été prélevés dans le département du Nord (503 tests), 38% dans le département du Pas-de-Calais (397 tests), 2% dans la Somme (21 tests). Les demandes provenant de la région Grand-Est représentent 6% des tests analysés (Figure 56).

De manière générale, davantage de tests QFT®-Plus ont été réalisés sur les prélèvements provenant des départements de la région Hauts-de-France, en comparaison aux tests T-SPOT.TB® (Figure 57); la répartition entre les deux tests est plutôt équilibrée pour le Nord et le Pas-de-Calais. En revanche, on note que sur les 21 échantillons issus des départements de la Somme (CH intercommunal de Montdidier – Roye et CH d’Abbeville), ce sont uniquement des tests QFT®-Plus qui ont été réalisés. La situation est différente pour les 54 prélèvements reçus de la région Grand-Est : un test T-SPOT.TB® a été réalisé sur la moitié d’entre eux.

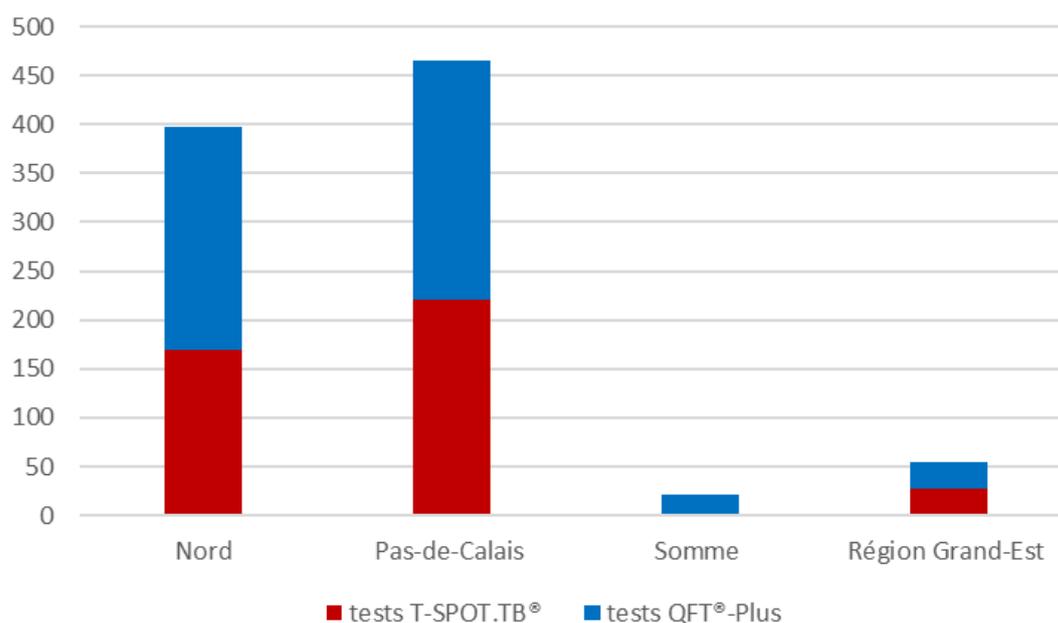


Figure 56 : Répartition des demandes de tests IGRAs des sites extérieurs prises en charges au laboratoire d’immunologie cellulaire du CHU de Lille entre le 17/02/2020 et le 31/05/2020, selon l’origine géographique du prélèvement et le type de test réalisé.

Les CH et sites appartenant à un groupement de coopération sanitaire (GCS) sont, de loin, les premiers établissements extérieurs dont proviennent les demandes de tests IGRAs étudiées sur la période du 17/02/2020 au 31/05/2020 (Figure 57). Les laboratoires privés représentent moins de 10% du total des demandes hors CHU ; ce

sont les différents sites Biocentre de la métropole Lilloise, les laboratoires Centre Biologie Nord Artois (CBNA) d'Hénin-Beaumont et de Douai, et le site Biochâlons de Châlons-en-Champagne.

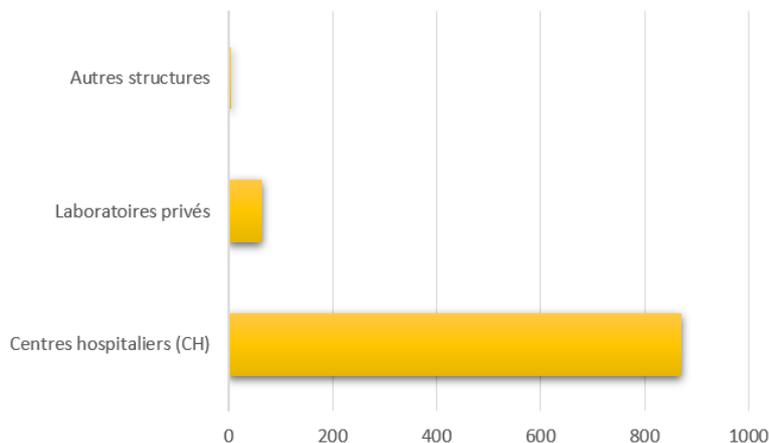


Figure 57 : Répartition des demandes de tests IGRAs des sites extérieurs selon le site préleveur, prises en charges au laboratoire d'immunologie cellulaire entre le 17/02/2020 et le 31/05/2020.

Une minorité de prélèvement, représentant moins de 1% du total des demandes de l'extérieur, est issue d'autres structures que l'on pourrait qualifier de médico-sociales ; il s'agit des associations Médecin Solidarité Lille (MSL) et abej SOLIDARITES. Que ce soit pour les CH, les laboratoires privés ou les autres structures, la majorité des tests réalisés sont des tests QFT®-Plus, correspondant à la tendance générale pour les prélèvements des sites extérieurs au CHU.

B. Phase pré-analytique

Le passage à la technique ELISpot en première intention pour la réalisation des tests IGRAs entraîne deux principaux changements pour les services et laboratoires préleveurs au niveau de la phase pré-analytique de l'analyse :

- le prélèvement du patient sur un unique tube héparine de Lithium de 7 mL au lieu des 4 tubes spécifiques du test QFT®-Plus.
- le délai avant prise en charge de l'échantillon : de 4 à 16h maximum pour le test QFT®-Plus (reçu sans traitement pré-analytique), il passe à 54h avec le test T-SPOT.TB®, et l'utilisation du kit T-cell *Select*™.

Contrairement aux phases analytique et post-analytique, qui se déroulent intégralement au sein du laboratoire et dont les acteurs sont les personnes y travaillant quotidiennement, la phase pré-analytique des tests IGRAs comprend de multiples intervenants (Figure 58):

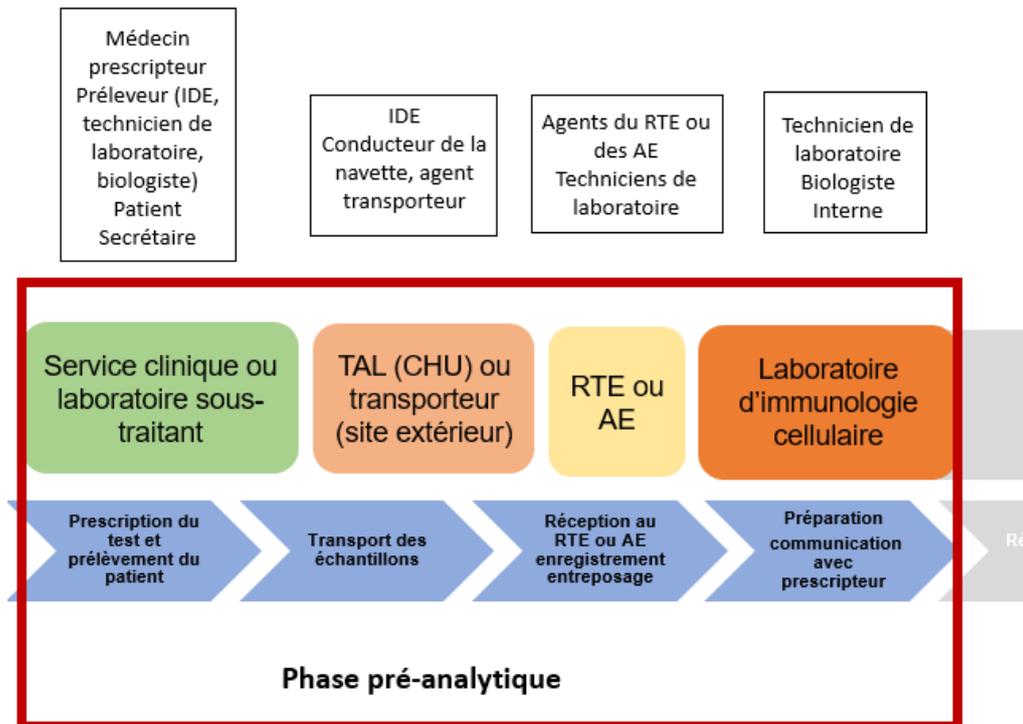


Figure 58 : Déroulement de la phase pré-analytique d'un test IGRA réalisé au laboratoire d'immunologie cellulaire du CHU de Lille. Détail de la Figure 26 présentée en Matériel et Méthodes. De bas en haut : étapes du processus pré-analytique, lieu et intervenants. AE : service des Analyses extérieures ; IDE : Infirmière diplômée d'état ; RTE : service de Réception-Tri-Enregistrement ; TAL : Transport automatique léger.

Les actions menées au niveau du laboratoire d'immunologie cellulaire pour accompagner cette transition se sont déroulées les semaines précédant le changement de méthode, au cours de la période **a** définie précédemment. Le recueil prospectif des données sur les non-conformités pré-analytiques des tests T-SPOT.TB® et le suivi des interventions menées auprès des services prescripteurs et au sein du laboratoire a eu lieu durant les périodes **b** et **c** (Figure 59).

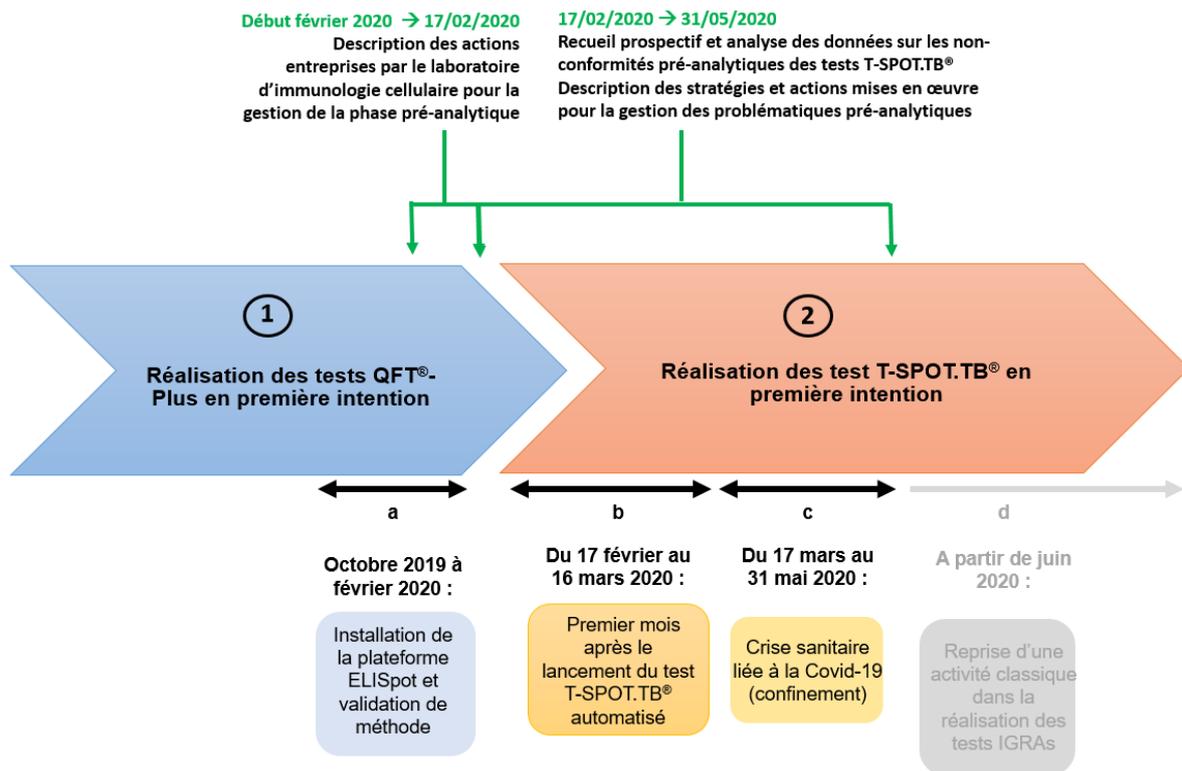


Figure 59 : Périodes d'intérêts et données étudiées concernant la phase pré-analytique des tests T-SPOT.TB® dans le cadre du passage à l'automatisation à l'Institut d'Immunologie du CHU de Lille. Adaptation de la Figure 25 présentée en Matériel et Méthodes.

1. Avant le changement de méthode : actions entreprises par le laboratoire d'immunologie cellulaire jusqu'au 17/02/2020.

Les actions entreprises pour la gestion des enjeux pré-analytiques des tests T-SPOT.TB® en amont du passage à l'automatisation sont résumées sur la frise chronologique en Figure 60 ci-dessous.

Au début du mois de février 2020, la validation du processus analytique de la plateforme ELISpot est achevée (cf. Résultats, partie C : Phase analytique) et l'objectif est le suivant : **réalisation des tests IGRAs en technique ELISpot en première intention opérationnelle au 17/02/2020.**

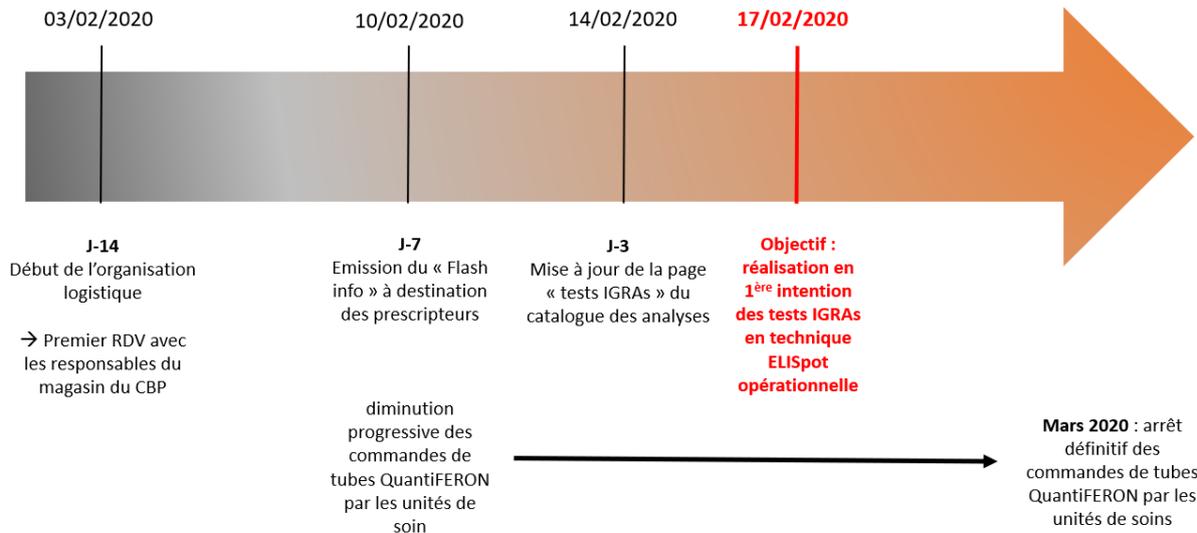


Figure 60 : Chronologie des actions menées par le laboratoire d'immunologie cellulaire du CHU de Lille dans le cadre de la phase pré-analytique du test T-SPOT.TB® automatisé en amont du 17/02/2020 : communication auprès des prescripteurs, gestion logistique des échantillons. CBP : Centre de Biologie Pathologie. RDV : rendez-vous.

a. Communication auprès des services prescripteurs de tests IGRAs du CHU de Lille et des sites extérieurs

L'ensemble des services du CHU de Lille et des sites extérieurs réalisant des envois d'échantillons de sang à l'Institut d'Immunologie pour réalisation de tests IGRAs a été informé du prochain passage à la technique ELISpot. Les changements concernant la phase pré-analytique ont des conséquences directes pour leur organisation.

La communication à ce sujet a été menée de la façon suivante :

- Le 10/02/2020 (J-7 avant le passage au test T-SPOT.TB® en première intention) : émission d'un « flash info », courrier explicatif et succinct à l'intention de l'ensemble des prescripteurs visant à faire ressortir les messages clés :
 - ✓ L'ELISpot devient la technique de première intention pour la réalisation des tests IGRA.
 - ✓ Date du passage à la technique ELISpot : le 17/02/2020
 - ✓ Simplification des modalités de prélèvement : 1 tube héparine de lithim 7 mL
 - ✓ Envoi à température ambiante

- ✓ Demande aux unités de soin de ne plus prélever de tubes QuantiFERON.
- ✓ Pour le CHU : changement du code à utiliser sur le logiciel CIRUS pour la prescription d'un test IGRA : « TBSPOT ».

Ce flash info, signé par les biologistes référents pour l'analyse au laboratoire d'immunologie cellulaire (Pr M. LABALETTE, Dr J. DEMARET) a été diffusé aux prescripteurs par l'intermédiaire de Mme C. Sosnowski, chargée de clientèle en lien avec les unités de soins du CHU, et le Dr M. TROTIN, biologiste responsable des AE. Le courrier est disponible en Annexe 4.

- Le 14/02/2020 (J-3 avant le passage au test T-SPOT.TB® en première intention) : **mise à jour de la page « tests IGRAs » du catalogue des analyses**. Cette page est accessible pour tout public depuis le site internet du Pôle de Biologie Pathologie Génétique du CHU de Lille. Cette mise à jour à nécessité :
 - ✓ **La fusion des pages pour les tests QFT®-Plus et T-SPOT.TB®**, jusqu'à présent distinctes, en une seule intitulée « IGRAs ».
 - ✓ **La mise à jour des mots clés permettant de retrouver l'analyse dans la barre de recherche**. Ont été inclus les synonymes : « IGRA », « TBSPOT », « TB SPOT », « T-SPOT.TB », « Quantiféron », « Quantiferon », « QTF Plus. ».
 - ✓ **La modification des conditions pré-analytiques requises**, adaptées pour le test T-SPOT.TB® et déjà citées dans ce travail. Bien que le délai acceptable avant traitement de l'échantillon soit de 54h, un délai de 48h suivant le prélèvement a été indiqué au prescripteur dans un souci de simplification. Mise en évidence de l'impératif de noter heure et la date de prélèvement sur la demande. Acheminement avant 16h le vendredi (test T-SPOT.TB® non réalisé le week-

end). Prise de rendez-vous obligatoire auprès du laboratoire en cas de contage tuberculeux.

- ✓ **Mise à jour du coût et de la tarification des tests IGRA :**
 - ELISpot : 60.75
 - ELISA : 40.50
 - Cotation ELISpot : B225 ou BHN225 selon les indications fournies pour la tarification
 - Cotation ELISA : B150 ou BHN150 selon les indications fournies pour la tarification
 - Identifiant (NABM ou HN) : ELISPOT : 4103 + 4104. ELISA : 4103.
 - Libellé(s) NABM ou HN (RIHN ou LC). ELISPOT : Test de détection de la production d'interféron gamma + Supplément en cas d'isolement préalable de cellules mononucléées circulantes. ELISA : Test de détection de la production d'interféron gamma.

Cette page fait figurer les coordonnées du laboratoire et des interlocuteurs privilégiés à contacter par les services prescripteurs. Elle est accessible à l'adresse suivante : <http://biologiepathologie.chru-lille.fr/catalogue-analyses/Detail.php?codeCatalogueAnalyses=2926>.

b. Organisation logistique

Dès le 3 février 2020, des contacts répétés avec les responsables du magasin du CBP ont été nécessaires, notamment pour organiser l'approvisionnement des unités de soin en tubes héparine de lithium 7 mL et gérer les stocks et commandes de tubes QuantiFERON.

Les enjeux et les actions menées ont été les suivants :

- **Evaluation de la quantité de tubes héparine de lithium 7 mL déjà utilisés par les unités de soin avant le changement de méthode = stock déjà disponible au magasin.**

- ✓ **Sondage auprès des responsables du magasin :**
utilisation très restreinte de ces tubes jusqu'à présent, utilisés principalement pour les analyses de génétique. Très peu de stock disponible.
- ✓ **Sondage auprès des cadres de services cliniques « grands prescripteurs » de tests IGRAs** (consultation d'hépatogastro-entérologie, de rhumatologie et médecine du travail) : pas ou peu de tubes disponibles dans les unités de soin.
 - ➔ Nécessité pour le magasin de s'approvisionner pour constituer des stocks avant le lancement du T-SPOT.TB® en routine au 17/02/2020. Démarches réalisées en collaboration avec la cadre du laboratoire d'immunologie, Mme E. BOUCLY.
- **Anticipation du nombre de tests qui seront réalisés les premières semaines pour adapter la commande de tubes héparine de lithium 7 mL.**
 - ✓ **Estimation de la volumétrie actuelle des tests IGRAs réalisés au laboratoire :**
 - ➔ Environ 150 prélèvements de tests IGRAs par semaine pris en charge en janvier 2020.
 - ➔ Commande en conséquence d'un stock de tubes héparine de lithium 7 mL.
- **Gestion des stocks de tubes QFT®-Plus restants.**
 - ✓ **A partir du 10 février 2020 : diminution progressive des commandes de tubes QuantiFERON par les unités de soin, jusqu'à un arrêt définitif en mars 2020.**
 - ✓ **Poursuite des commandes uniquement par le laboratoire d'immunologie cellulaire.** le test QFT®-Plus restant la technique de seconde intention.
 - ➔ Nécessité de conserver la technique ELISA comme technique « back-up », en cas de panne de la

plateforme Nimbus-Presto en l'absence de solution back-up ELISpot dans l'immédiat.

→ Organisation de la gestion des prélèvements de tests IGRAs qui parviendront au RTE/AE le vendredi après 16h et le week-end : transfert du sang des tubes héparinés 7 mL en tubes QuantiFERON à envisager au moins les premières semaines.

✓ **Questionnement sur le lieu de stockage des tubes QuantiFERON utilisés par le laboratoire** : point sur les conditions de conservation des tubes avec les responsables du magasin.

→ Un monitoring de la température ambiante est nécessaire pour la conservation des tubes.

→ Décision prise : conservation des tubes à poursuivre au magasin. Récupération et conservation au sein du laboratoire d'un kit de tubes QuantiFERON pour faciliter l'organisation (tubes utilisés en grande majorité le week-end : doivent être facilement accessibles).

→ Point de vigilance : attention à la date de péremption des kits stockés et utilisés au laboratoire.

c. Modification de l'organisation au niveau du RTE et des AE

Comme décrit dans la partie Matériel et méthodes, plusieurs étapes pré-analytiques des tests QFT®-Plus sont susceptibles d'être réalisées au RTE et aux AE, en fonction du jour et de l'heure de réception du prélèvement :

- incubation à 37°C, centrifugation pour les tests prélevés au CHU de Lille ;
- conservation entre 2 et 8°C pour les prélèvements issus de sites extérieurs déjà centrifugés (le reste du traitement pré-analytique étant réalisé sur site).

Une rencontre avec les cadres du RTE et du service des AE a eu lieu le 04/02/2020 afin de réorganiser le circuit et la prise en charge des échantillons, aboutissant à la conduite à tenir suivante (Figure 61) :

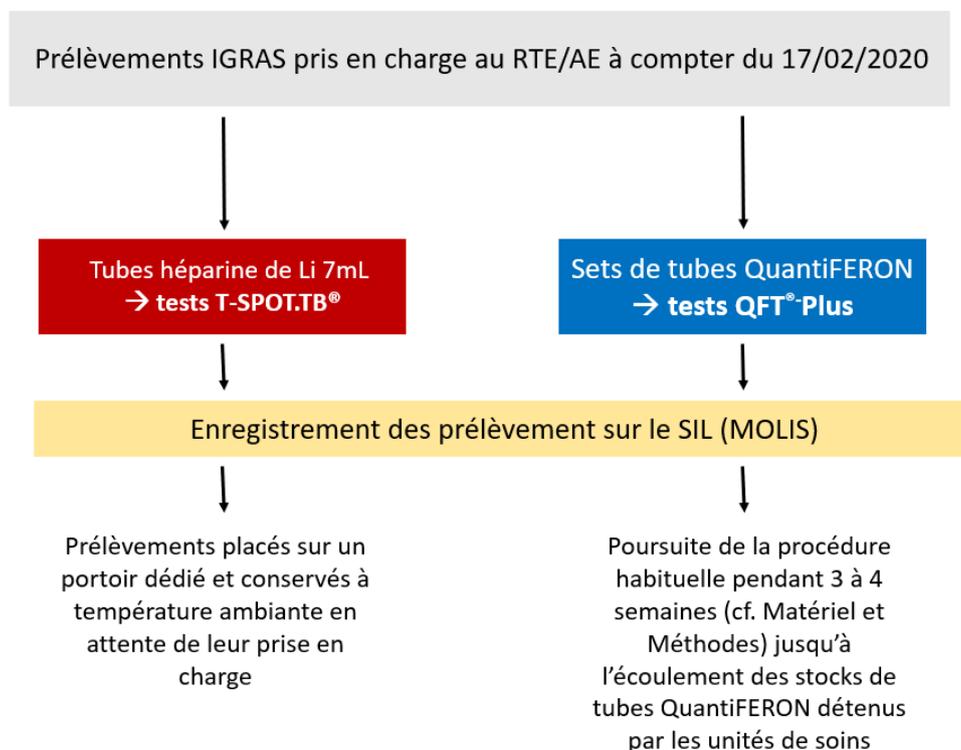


Figure 61 : Stratégie de prise en charge des prélèvements de tests IGRAs définie avec les cadres du RTE/AE début février 2020. AE : Analyses extérieures ; RTE : Réception – Tri – Enregistrement ; SIL : Systèmes de gestion de l'Information de Laboratoire.

2. Problématiques rencontrées au niveau de la phase pré-analytique des tests T-SPOT.TB® sur la période du 17/02/2020 au 31/05/2020

Du 17/02/2020, jour effectif du changement de méthode, au 31/05/2020, près de 16% des demandes de tests IGRAs prises en charge par l'Institut d'Immunologie du CHU de Lille sont concernées par un problème pré-analytique. La proportion de prélèvements non conformes est plus importante les premières semaines après le changement de méthode : elle concerne environ un tiers des demandes gérées par le laboratoire la semaine 8, puis oscille autour de 20% les trois semaines suivantes (Figure 62).

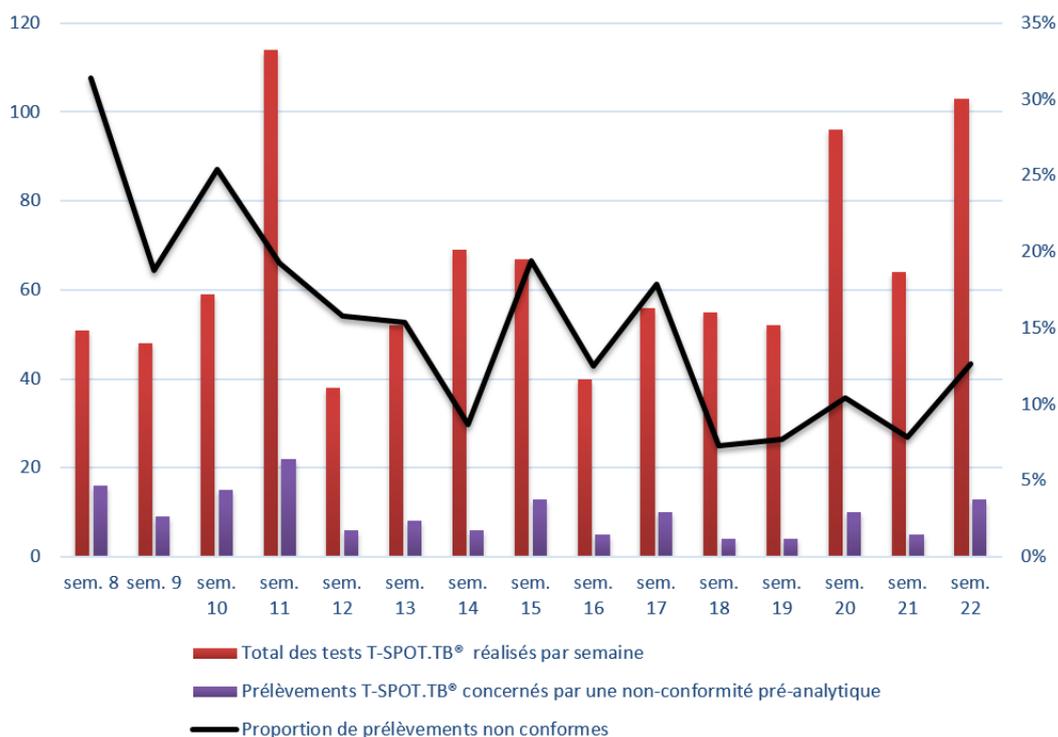


Figure 62 : Evolution du nombre et de la proportion de prélèvements T-SPOT.TB® concernés par une non-conformité pré-analytique par semaine sur la période du 17/02/2020 au 31/05/2020.

La proportion de non-conformités atteint son niveau le plus bas depuis le lancement de l'ELISpot en routine la semaine 14 (du 30 mars au 6 avril 2020). Elle reste assez variable au long de la période de confinement liée à la Covid-19, puis a tendance à se stabiliser autour de 10% à la fin de la période d'intérêt.

a. Origine des prélèvements concernés par une non-conformité pré-analytique

78% des prélèvements concernés par une anomalie pré-analytique proviennent d'unités de soin du CHU de Lille (n=119). Une étude de la répartition des non-conformités par service du CHU a été réalisée et est illustrée ci-dessous (Figure 63).

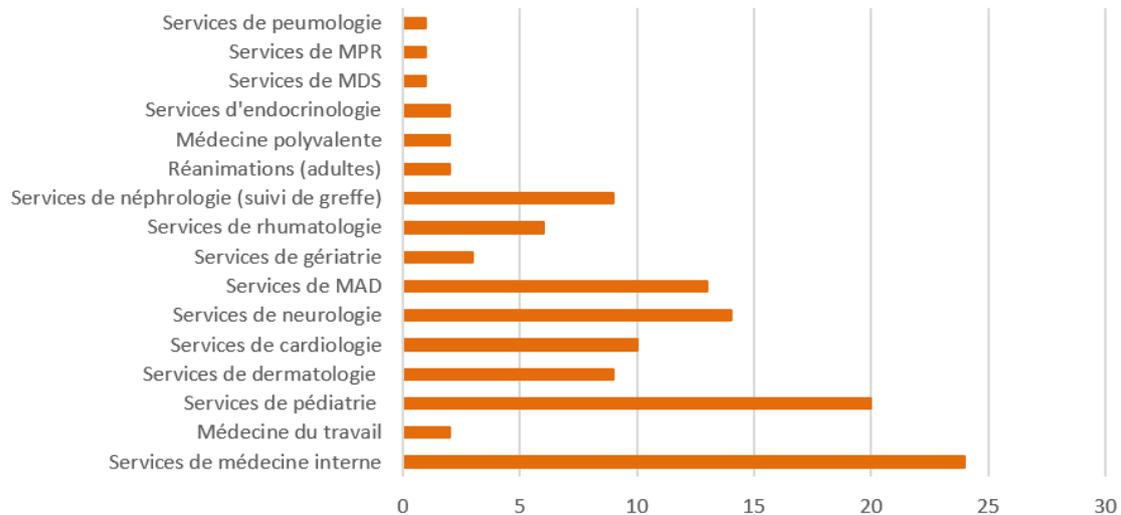


Figure 62 : Répartition des prélèvements T-SPOT.TB® non conformes par service (prélèvements du CHU de Lille) sur la période du 17/02/2020 au 31/05/2020.

Les services dont proviennent le plus grand nombre de demandes de tests T-SPOT.TB® non conformes sont la médecine interne et les services d'immunologie clinique (n=24) : ils regroupent 1/5^{ème} des échantillons ne répondant pas aux critères pré-analytiques et prélevés au CHU de Lille. Les services de pédiatrie (n=20) se situent en deuxième position. Les services de neurologie, de MAD, et de cardiologie sont chacun pourvoyeur de 10 à 15 prélèvements non-conformes.

Les tubes provenant des sites extérieurs représentent 22% des échantillons non-conformes pris en charge par le laboratoire.

b. Causes des non conformités pré-analytiques des prélèvements T-SPOT.TB®

La grande majorité des problèmes pré-analytiques rencontrés correspond à des échantillons contenant une quantité de sang insuffisante (soit < 5 mL d'après les critères requis pour le fonctionnement de la plateforme Nimbus-Presto définis par Oxford Immunotec) : il s'agit de 75% des prélèvements non conformes (Figure 64). Parmi eux, 27 (22%) correspondent à un tube héparine de Lithium 5 mL, en général peu rempli.

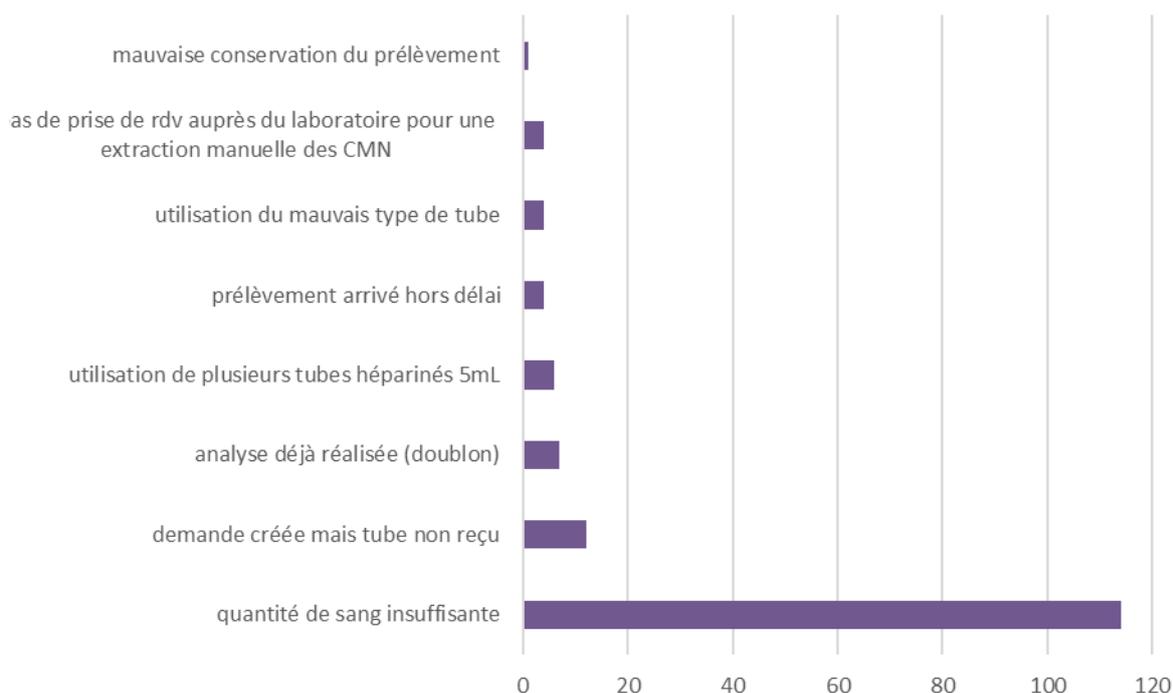


Figure 63 : Distribution des causes de non conformités pré-analytiques pour les prélèvements T-SPOT.TB® reçus au laboratoire d'immunologie cellulaire du CHU de Lille entre le 17/02/2020 et le 31/05/2020. CMN : cellules mononucléées du sang.

Viennent ensuite les demandes pour lesquelles aucun prélèvement n'a été réceptionné plus de 24h après leur création (n=12, soit 8% des demandes). Les doublons (test déjà réalisé les jours précédents) représentent 5% des tubes reçus. Dans 6 cas, le service a procédé à l'envoi de plusieurs tubes héparine de lithium 5mL au lieu d'un seul tube de 7mL bien rempli. Quatre tubes sont arrivés hors délai pré-analytique et n'ont pu être pris en charge dans les 54h suivant le prélèvement. Le laboratoire a reçu un tube non conforme pour l'analyse à 4 reprises : 3 tubes héparinés avec gel type BARRICOR® et 1 tube appartenant au set de tubes QuantiFERON (tube à bouchon vert « TB1 »). L'absence de prise de rendez-vous auprès du laboratoire concerne des échantillons issus de patients lymphopéniques ou avec une antériorité de test non réalisable du fait d'une extraction insuffisante de CMN sur un prélèvement conforme ; dans ce cas, un isolement manuel sur une plus grande quantité de sang est nécessaire (3 tubes héparinés de 7 mL requis). Enfin, un prélèvement a subi une mauvaise conservation et n'a pu être pris en charge (placé au réfrigérateur entre 2 et 8°C au niveau des AE).

c. Prélèvements réceptionnés le vendredi après 16h, le week-end et les jours fériés

Un total de 161 prélèvements T-SPOT.TB® a été réceptionné par les agents du RTE et des AE après 16h le vendredi, le samedi, le dimanche et les jours fériés entre le 17/02/2020 et le 31/05/2020.

On distingue trois catégories parmi ces échantillons (Figure 65) :

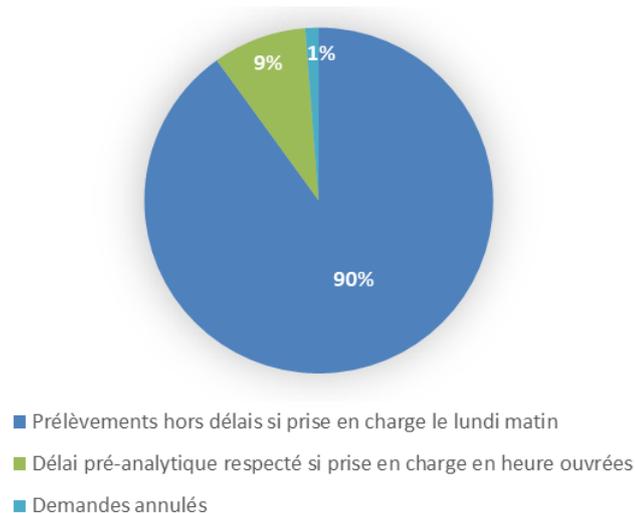


Figure 64 : Répartition des prélèvements T-SPOT.TB® réceptionnés au RTE/AE le vendredi à partir de 16h, le week-end et les jours fériés sur la période du 17/02/2020 au 31/05/2020.

- 1. Prélèvements qui seraient hors délai au moment de leur prise en charge au laboratoire (n = 145 soit 90%).** Il s'agit des tubes réceptionnés au RTE/AE le vendredi après 16h jusqu'au samedi 9h. Le délai pré-analytique de 54h ne serait pas respecté en cas de prise en charge le lundi matin.
- 2. Prélèvements réceptionnés en dehors des heures ouvrées mais respectant le délai pré-analytique de 54 au moment de leur prise en charge au laboratoire (n = 14, soit 9%).** Il s'agit des tubes réceptionnés au RTE/AE le samedi après 9h et le dimanche jusqu'au lundi. Le délai pré-analytique de 54h est respecté si prise en charge le lundi matin.
- 3. Demandes annulées (n = 2, soit 1%).** Il s'agit de deux échantillons T-SPOT.TB® prélevés par le service de Médecine du travail et acheminés aux

AE le vendredi 10/04/2020 par navette après 17h. Les demandes correspondantes ont été annulées par un agent des AE.

3. Stratégies et actions mises en œuvre par le laboratoire face à ces problématiques

Face au nombre important de prélèvements T-SPOT.TB[®] ne respectant pas les critères pré-analytiques dès les premiers jours du passage à l'ELISpot en première intention, les différents acteurs du laboratoire d'immunologie cellulaire ont dû réagir rapidement pour limiter les impacts des non-conformités sur la prise en charge des patients.

a. Echantillon contenant une quantité de sang insuffisante (< 5 mL)

La problématique concerne la réception au laboratoire d'un prélèvement avec un volume de sang insuffisant, sur tube hépariné 5 mL ou 7 mL. Ces prélèvements représentant 75% des non conformités, constituant un enjeu important pour le laboratoire. Les actions menées et leurs conséquences sont répertoriées dans le tableau ci-dessous (Tableau 8).

Tableau 8 : Gestion des prélèvements T-SPOT.TB[®] contenant un volume de sang insuffisant sur la période du 17/02/2020 au 31/05/2020. Description des actions menées et des conséquences sur l'organisation du laboratoire et la prise en charge des prélèvements.

ACTIONS ET INTERVENTIONS MISES EN OEUVRE	CONSEQUENCES
<p>→ Mise en place dès J1 d'un tableau Excel pour le suivi des échantillons à problèmes, dont défaut de remplissage.</p> <p>Pour chaque prélèvement non conforme sont tracés : le numéro de dossier MOLIS, l'identité du patient (nom, prénom, date de naissance), le service, la date et l'heure de prélèvement/de réception de l'échantillon, le type de problème rencontré, l'action réalisé, le résultat du test.</p> <p>→ Communication avec les services prescripteurs : appel systématique suite à la réception d'un échantillon en situation de non-conformité pré-analytique. Rappel sur le récent passage à la technique ELISpot en routine.</p>	<p>→ Visualisation objective et au jour le jour des prélèvements et des services concernés.</p> <p>Adaptation de la communication auprès des prescripteurs.</p> <p>→ Education des services prescripteurs sur le changement de méthode et les nouvelles conditions pré-analytiques à respecter.</p> <p>Obtention d'un nouveau prélèvement conforme.</p>

<p>Demande d'un nouveau prélèvement conforme quand c'est possible (patient hospitalisé).</p> <p>→ Recherche de stratégies pour pallier au volume sanguin insuffisant :</p> <p>1) Application du protocole Oxford Immunotec : ajout de RPMI au sang total pour atteindre le volume de 6 mL</p> <p>2) Vérification du volume mort nécessaire pour le fonctionnement de l'automate et la quantité de sang prélevé par l'automate pour chaque échantillon → passage d'échantillons tests de volumes croissants entre 4 et 6 mL</p> <p>→ Mise en place avec l'équipe technique d'une CAT le 20/02/20 :</p> <p>Evaluation du volume de sang à l'aide d'un tube hépariné 7mL gradué.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Volume de sang \geq 4mL : passage sans ajout de RPMI. - Volume de sang compris entre 3 et 4 mL : ajout de RPMI jusqu'à 4 mL pour minimiser la dilution. - Volume de sang < 3 mL : demande d'un nouveau prélèvement auprès du service et réalisation d'une non-conformité pré-analytique. 	<p>→ Entraîne une dilution +/- importante de l'échantillon, exposant à des difficultés pour le recueil et la numération des CMN. Persistance d'un volume mort de sang dilué inexploitable après utilisation par le Nimbus-Presto.</p> <p>→ Le Nimbus-Presto utilise 3.5mL de sang : il faudrait en réalité un minimum de 4 mL de sang pour que le prélèvement soit pris en charge. Confirmation par passage des prélèvements de patients contenant entre 4 et 6 mL de sang sans ajout de RPMI dès le 19/02/2020.</p> <p>→ Réduction progressive de la proportion de prélèvements non conformes au fil des semaines pour se stabiliser autour de 10% des échantillons.</p> <p>Projet d'intervention sur place auprès des équipes de médecine interne et d'immunologie clinique pour sensibiliser sur le pré-analytique.</p>
--	--

b. Utilisation par les services de plusieurs tubes héparine de Li 5 mL

La problématique concerne la réception de plusieurs tubes héparinate de lithium pour un même patient au lieu d'un seul tube hépariné de 7 mL. Plusieurs causes ont pu être identifiées :

- défaut d'information des services prescripteurs au début du lancement de l'ELISpot en routine malgré la communication réalisée en amont (flash info...);
- défaut en approvisionnement de tubes héparinate de Li 7 mL : pas de stock dans les services au 17/02/2020.

Cela pose deux problèmes pour la prise en charge :

- Le format des tubes de 5 mL ne permet pas leur prise en charge par le Nimbus-Presto ; leur contenu doit être réuni dans un seul tube de 7 mL pour être passé sur l'automate. La société Oxford Immunotec n'ayant pas défini de protocole adapté à cette situation, se pose la question du type de tube à utiliser au laboratoire pour regrouper le sang des tubes héparinés 5 mL :
 - Tube hépariné 7 mL : risque de surdosage en héparine du sang analysé ?
 - Tube sec 7 mL : contient un activateur de la coagulation : risque d'interférence avec le tri des cellules réalisé par le module KingFisher Presto ?

- Les prélèvements sont parfois associés à des dossiers MOLIS distincts, créant des doublons.

Les actions menées et leurs conséquences sont répertoriées dans le tableau ci-dessous (Tableau 9).

Tableau 9 : Gestion des prélèvements T-SPOT.TB® comprenant plusieurs tubes héparinate de Li 5 mL sur la période du 17/02/2020 au 31/05/2020. Description des actions menées et des conséquences sur l'organisation du laboratoire et la prise en charge des prélèvements.

ACTIONS ET INTERVENTIONS MISES EN OEUVRE	CONSEQUENCES
<p>→ Communication accrue avec les services prescripteurs du CHU et les biologistes des sites extérieurs : appel téléphonique à chaque fois que possible à réception de tubes 5 mL les premières semaines après le changement de technique de première intention. Objectif : identifier l'origine du problème (défaut de stock ? d'informations ?)</p> <p>→ Nouvelle rencontre avec les responsables du magasin et les cadres des AE après le 17/02/2020.</p> <p>→ Pour le choix du tube 7 mL à utiliser pour le transfert du sang : réalisation d'essais sur le Nimbus-Presto avec tube sec et avec tube hépariné sur quelques échantillons de patient le 20/02/2020.</p>	<p>→ Prise en compte des difficultés des services et des sites extérieures. Education sur le changement de méthode et les nouvelles conditions pré-analytiques à respecter.</p> <p>→ Approvisionnement en tubes héparinate de Li 7 mL la semaine 8 puis attribution des tubes aux différents services.</p> <p>→ résultat des essais : pas de différence. Décision néanmoins de ne pas utiliser de tube sec (activateur de coagulation : risque théorique d'interférence avec l'isolement magnétique des CMN). Transfert du sang des</p>

<p>→ Réalisation d'une non-conformité « analyse déjà réalisée » sur le ou les dossiers doublons lorsque plusieurs demandes ont été créées. Si plusieurs tubes reçus mais une seule demande associée : choix de ne pas établir de non-conformité, la quantité de sang étant suffisante pour l'analyse.</p>	<p>tubes 5 mL dans un tube hépariné 7mL depuis le 20/02/2020.</p>
--	---

c. Utilisation par les services d'un type de tube non conforme

La problématique concerne la réception de tubes non conformes et ne pouvant être pris en charge tels quels par la plateforme Nimbus-Presto. Durant la période du 17/02/2020 au 31/05/2020, 4 prélèvements sont concernés : 3 tubes héparinés avec gel BARRICOR® 5 mL et 1 tube TB1 5 mL du set QuantiFERON. Les actions menées et leurs conséquences sont répertoriées dans le tableau ci-dessous (Tableau 10).

Tableau 10 : Gestion des prélèvements T-SPOT.TB® correspondants à un type de tube non conforme pour la réalisation du test sur la période du 17/02/2020 au 31/05/2020. Description des actions menées et des conséquences sur l'organisation du laboratoire et la prise en charge des prélèvements.

ACTIONS ET INTERVENTIONS MISES EN OEUVRE	CONSEQUENCES
<p>→ Réalisation de non-conformité « type de tube non conforme » ; pas de prise en charge des échantillons concernés. Pas de transfert du sang en tube hépariné 7 mL : présence de gel séparateur (n = 3) ou d'antigène TB1 (n = 1) dans le tube primaire : risque d'interférence majeure en phase analytique.</p> <p>→ Communication avec les services par appel téléphonique pour les informer de l'erreur pré-analytique. Information sur les ressources disponibles pour l'aide au prélèvement (catalogue des analyses accessible depuis le site du CBP).</p>	<p>→ Résultat non rendu pour 4 patients sur la période étudiée. Les patients ont dû être reprélevés.</p> <p>→ Faible occurrence de ce type de non-conformité par la suite.</p>

d. Gestion des prélèvements T-SPOT.TB® réceptionnés le vendredi après-midi, le week-end et les jours fériés

La problématique concerne les prélèvements réceptionnés par les agents du RTE et des AE après 16h le vendredi, le samedi, le dimanche et les jours fériés. Comme vu précédemment, 90% des prélèvements T-SPOT.TB® acheminés au RTE/AE pendant cette période se retrouveraient en situation de non-conformité pré-analytique au moment de leur prise en charge en heures ouvrées le lundi matin, car dépassant le délai de 54h autorisé par le kit T-Cell *Select*™.

Les actions menées par le laboratoire et leurs conséquences sont répertoriées dans le tableau ci-dessous (Tableau 11).

Tableau 11 : Gestion des prélèvements T-SPOT.TB® réceptionnés le vendredi après 16h, le week-end et les jours fériés sur la période du 17/02/2020 au 31/05/2020. Description des actions menées et des conséquences sur l'organisation du laboratoire et la prise en charge des prélèvements.

ACTIONS ET INTERVENTIONS MISES EN OEUVRE	CONSEQUENCES
<p>→ Dès la semaine 8 : recours à la technique ELISA pour les prélèvements parvenant au RTE/AE le vendredi après-midi jusqu'au samedi 9h. Implique un transfert du sang des tubes héparinés 7 mL dans des tubes QuantiFERON.</p> <p>- Formation du personnel concerné à la réalisation correcte des transferts (techniciennes et internes réalisant les astreintes au laboratoire les week-end et jours fériés).</p> <p>- La répartition du sang dans les 4 tubes QuantiFERON doit respecter un ordre précis pour qu'il n'y ait pas de contamination d'un tube à l'autre : Contrôle neg. Nil > TB1 > TB2 > Contrôle pos. Mitogen.</p> <p>- Utilisation d'une pipette P1000 avec changement de cône entre TB1 et TB2 et TB2 et Mitogen.</p>	<p>→ Révision de l'organisation de l'équipe technique le vendredi :</p> <ul style="list-style-type: none"> - lancement d'une éventuelle deuxième série de tests T-SPOT.TB® à 13h au plus tard ; - Transfert du sang des tubes héparinate de Li en tubes QuantiFERON par les techniciennes à partir de 13h jusqu'à la fin de la journée (env. 17h). <p>→ Révision des procédures de prise en charge de la phase pré-analytique des tests IGRAs par l'interne d'astreinte au laboratoire le samedi, dimanche et jour fériés :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pour les échantillons prélevés jusqu'au samedi matin 9h : transfert du sang des tubes héparinate de Li en tubes QuantiFERON et début de l'incubation à 37°C pour les prélèvements parvenus au RTE/AE depuis le vendredi en fin d'après-midi. Fin d'incubation, centrifugation et stockage entre 2 et 8°C 16 à 24h plus tard. - Stockage sur la pailleuse à température ambiante des prélèvements parvenant le samedi après 16h, en s'assurant que l'heure et la date de prélèvement soient compatibles avec le délai pré-analytique de 54h.

La Figure 66 ci-dessous permet de suivre le nombre de prélèvements T-SPOT.TB® transférés en tubes QuantiFERON chaque semaine depuis le lancement de l'ELISpot en routine, ainsi que l'évolution de la proportion des tests QFT®-Plus issus de transferts à partir d'un tube hépariné par rapport au total des tests QFT®-Plus réalisés au laboratoire.

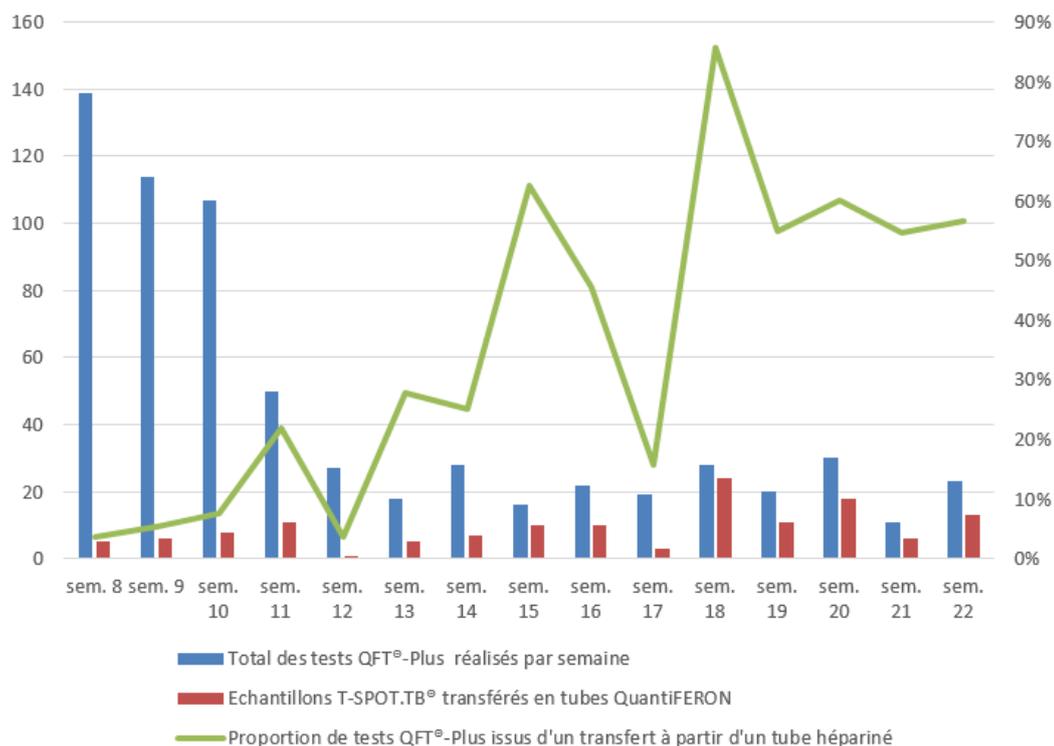


Figure 65 : Evolution du nombre de prélèvements T-SPOT.TB® transférés en tubes QuantiFERON et proportion de ces prélèvements par rapport au total des tests QFT®-Plus par semaine sur la période du 17/02/2020 au 31/05/2020.

Les échantillons T-SPOT.TB® transférés en tubes QuantiFERON représentent une minorité des tests QFT®-Plus réalisés les 5 premières semaines, variant entre 5% des tests la semaine 8 et 25% des tests la semaine 11. Cette proportion augmente progressivement au fil des semaines pour se stabiliser autour de 60% en mai 2020. Ainsi, ces données reflètent le caractère progressif du changement de technique de première intention.

Concernant les deux demandes T-SPOT.TB® du service de Médecine du travail du CHU de Lille annulées le vendredi 10/04/2020 : il s'agit d'une erreur de prise en charge de la part d'un agent des AE par défaut d'information sur le changement de méthode.

Le Dr. N. LABERENNE, une des biologistes responsables des AE, a été contactée par mail, aboutissant à l'affichage d'une note de service à destination des équipes concernant la prise en charge de ces prélèvements au niveau des AE.

C. Phase analytique

Contrairement à la phase pré-analytique, la phase analytique du test T-SPOT.TB® se déroule en intégralité au sein de l'Institut d'immunologie et fait uniquement intervenir les techniciennes du laboratoire d'immunologie cellulaire (hors gestion d'incident technique pouvant faire intervenir un biologiste ou l'ingénieur du laboratoire) (Figure 67).

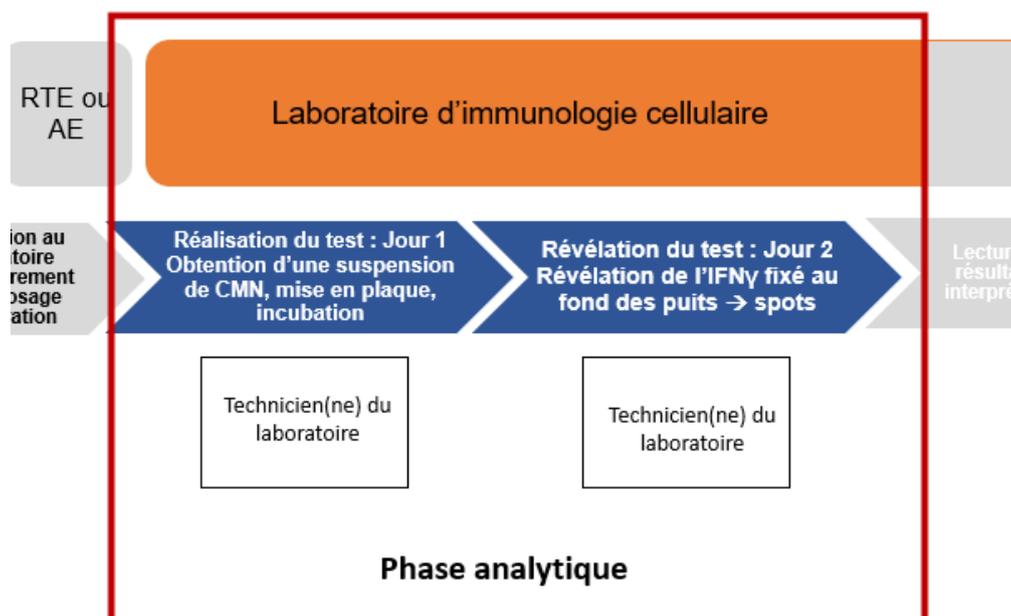


Figure 66 : Déroulement de la phase analytique d'un test T-SPOT.TB® réalisé au laboratoire d'immunologie cellulaire du CHU de Lille. Détail de la Figure 26 présentée en Matériel et Méthodes. De bas en haut : intervenants, étapes du processus post-analytique et lieu.

L'utilisation du Nimbus-Presto est au cœur de la phase analytique. Il est utilisé le jour 1 du test et permet l'obtention d'une suspension de CMN à concentration normalisée de façon automatisée. Dans la suite de cette partie seront détaillés le déroulement de l'installation et de la validation de la plateforme au laboratoire, les résultats de la vérification de l'ensemble du processus analytique et les problématiques rencontrées à ces différentes étapes. Les périodes étudiées dans cette partie sont les périodes **a**,

b et **d** ; les données recueillies et utilisées dans l'étude de la phase analytique concernent ces mêmes périodes (Figure 68).

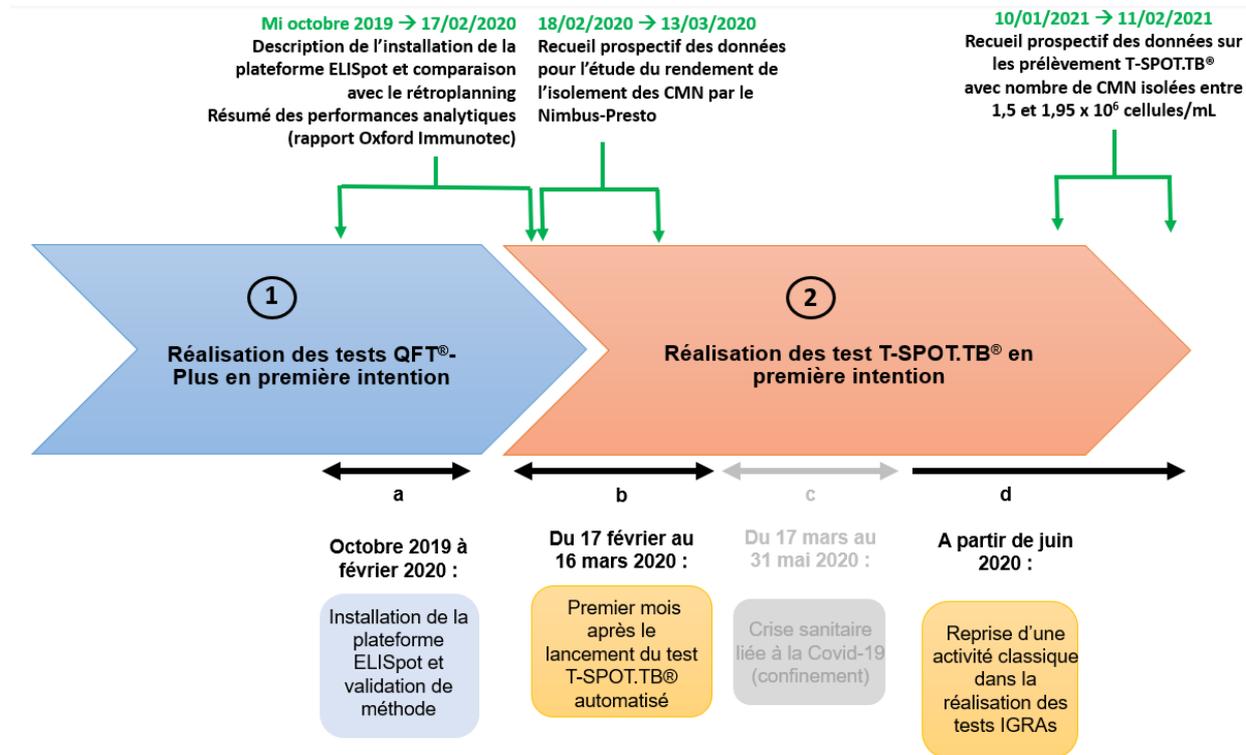


Figure 67 : Périodes d'intérêts et données étudiées concernant la phase analytique des tests T-SPOT.TB® dans le cadre du passage à l'automatisation à l'Institut d'Immunologie du CHU de Lille. Adaptation de la Figure 25 présentée en Matériel et Méthodes.

1. Installation et validation de la plateforme ELISpot au laboratoire d'immunologie cellulaire

La société Oxford Immunotec a établi un rétroplanning planifiant l'ensemble des étapes jusqu'à l'intégration de la plateforme ELISpot dans l'activité de routine du laboratoire d'immunologie. La Figure 69 compare la chronologie des événements prévue par le rétroplanning et les faits tels qu'ils se sont déroulés en réalité.



Figure 68 : Etapes de la mise en place de la plateforme ELISpot pour le passage à l'automatisation du test T-SPOT.TB® au laboratoire d'immunologie cellulaire du CHU de Lille. Comparaison du rétroplanning établi avec la société Oxford Immunotec à la chronologie des évènements tels qu'ils se sont déroulés. **A gauche** : rétroplanning prévisionnel Oxford Immunotec. **A droite** : étapes et dates auxquelles elles se sont déroulées.

La date initialement prévue pour le lancement du test T-SPOT.TB® automatisé était le 13 janvier 2020. Chaque automate constituant la plateforme ELISpot a été validé individuellement par son fabricant. La réception des automates à l'Institut d'Immunologie, leur installation ainsi que leur qualification sur place se sont déroulées dans les délais prévus par le rétroplanning.

Le 29/11/2019, la plateforme est intégralement installée au laboratoire d'immunologie cellulaire. Elle se situe dans la salle « Evaluation cellulaire » du laboratoire ; l'agencement de la salle a également été revu pour optimiser l'ergonomie de travail (Figure 70).

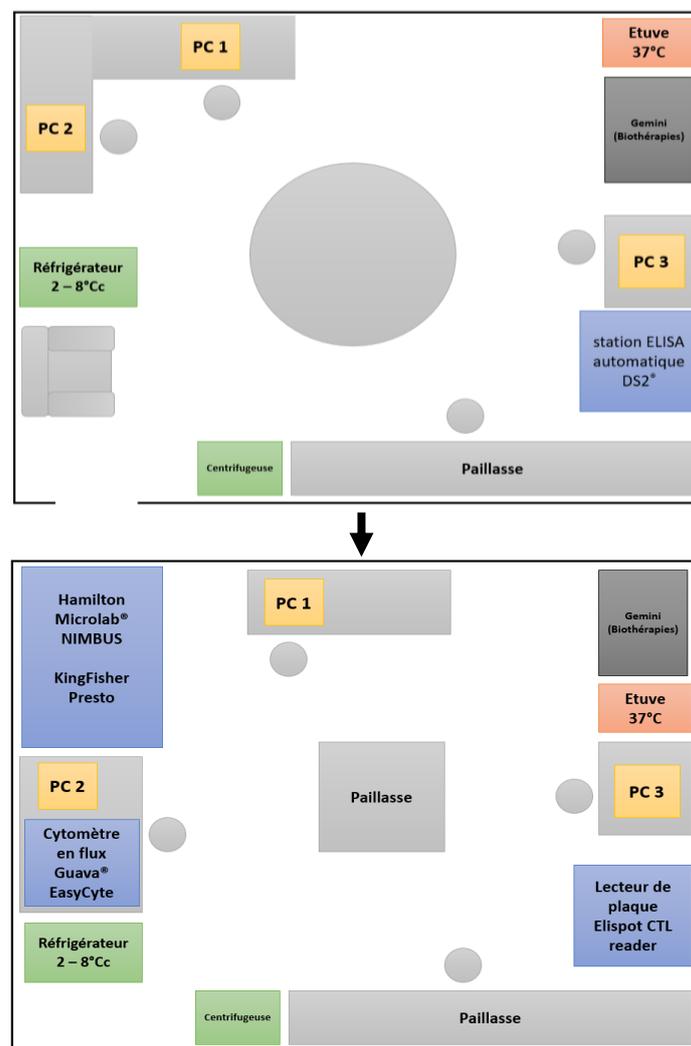


Figure 69 : Plan de la salle "Evaluation cellulaire" de l'Institut d'immunologie du CHU de Lille, avant (en haut) et après (en bas) installation de la plateforme ELISpot pour la réalisation du test T.SPOT-TB® automatisé. En bleu : automates constituant la plateforme ELISpot ou impliqués dans la réalisation des tests IGRAs ; en noir : automate de l'Institut d'immunologie hors tests IGRAs ; en jaune : ordinateurs ; en orange : étuve à 37°C +/- 1°C sans CO2 ; en vert : autre matériel ; en gris : mobilier. PC1 : accès à l'interface Excell MAPP, au logiciel « Hamilton Run Control » et au SIL (MOLIS). PC2 : accès au logiciel « guavasoft ». PC3 : accès au logiciel PGP.

Les modifications suivantes ont été réalisées par rapport à la configuration préexistante :

- Déplacement de la station ELISA DS2[®] dans la pièce technique consacrée au dosage des immunosuppresseurs et à la cytométrie en flux ; à la place, installation du lecteur CTL ;
- Installation du Nimbus-Presto et du cytomètre en flux Guava[®] ;
- Remplacement de la table ronde centrale volumineuse par une paillasse de laboratoire surélevée. Cette paillasse sert à la manipulation et à l'entreposage des racks et des échantillons de patients des séries en cours ou passées.

La validation du processus analytique a débuté la semaine suivante, le 02/12/2019. Une durée de 2 semaines était initialement programmée pour la validation des protocoles créés pour la réalisation du test T-SPOT.TB[®]. Deux protocoles à valider :

- Protocole 24 échantillons (process avec une plaque)
- Protocole 24 + 8 échantillons (process avec deux plaques)

Du fait de la difficulté d'obtenir des échantillons positifs en lien avec la faible prévalence de l'infection tuberculeuse dans la population générale, la validation du processus analytique complet a été réalisée vis-à-vis du cytomégalovirus (CMV) et en utilisant les réactifs appropriés à sa détection.

Courant décembre, quelques jours après le début de la validation du processus analytique, la validation du protocole 24 + 8 échantillons est interrompue suite à la survenue de problèmes techniques. La société Hamilton est intervenue et a procédé à de multiples vérifications sur le Nimbus-Presto. Le problème a pu être identifié : il s'agissait d'un décalage du centre de gravité de l'appareil entraînant une modification de ses coordonnées (axes x ; y ; z). Parmi les quatre pipeteurs du Nimbus- Presto, ceux qui étaient programmés n'étaient plus en adéquation et ne pouvaient plus fonctionner correctement. L'appareil se retrouvait en échec.

Une modification de la programmation a été effectuée par la société Hamilton début janvier 2020, aboutissant à un changement des pipeteurs utilisés et une remise en fonction de l'automate pour le protocole à 2 plaques. En parallèle, le protocole à une plaque a été validé sans difficulté particulière.

La validation du processus analytique s'est achevée le 27/01/2020, soit plus d'un mois après la date initialement prévue sur le rétroplanning (Figure 70).

Les 11 et 12 février 2020 ont eu lieu une formation organisée par Oxford Immunotec à destination de l'ensemble de l'équipe du laboratoire d'immunologie cellulaire. L'objectif était l'acquisition des compétences nécessaires pour la réalisation du test T-SPOT.TB® automatisé. Les participants étaient divisés en plusieurs groupes afin de favoriser les échanges et la pratique. La formation s'est déroulée de la façon suivante :

➤ Journée 1 :

1. Présentation du kit réactif T-Cell *Select*™, MAPP et introduction au Nimbus-Presto ;
2. Utilisation du Nimbus-Presto sur 8 échantillons ;
3. Réalisation des numérations cellulaires sur le cytomètre en flux Guava® ;
4. Mise en plaque du test T-SPOT.TB® par le Nimbus-Presto ;
5. Utilisation du Nimbus-Presto sur 28 échantillons.

➤ Journée 2 :

1. Développement des spots pour les échantillons de la veille, interprétation des résultats : utilisation du lecteur ELISpot CTL reader ;
2. Formation à la lecture des spots (utilisation du tutoriel T-SPOT.Tutor) ;
3. Récapitulatif sur l'utilisation du cytomètre en flux Guava®.
4. Atelier final : réponses aux questions et pratique sur les automates de la plateforme.

Un document attestant de la participation à la formation et de l'acquisition des compétences techniques visées a été remis par Oxford Immunotec à chaque participant.

Le lancement des tests IGRAs par technique ELISpot automatisée, initialement prévu le 13/01/2020, a finalement eu lieu le 17/02/2020. Un ingénieur d'Oxford Immunotec est resté sur place les deux premières semaines d'utilisation de la plateforme pour accompagner l'équipe technique et s'assurer de son bon fonctionnement en routine.

2. Résumé des performances analytiques de la plateforme ELISpot

Un rapport sur les performances analytiques de la plateforme ELISpot et des automates la constituant a été fourni à l'Institut d'Immunologie par la société Oxford Immunotec. Les résultats de cette évaluation sont présentés ci-après.

a. Préparation des échantillons par le Microlab® Nimbus & KingFisher Presto

Un total de 57 échantillons a été traité à la fois de façon automatisée par le Nimbus-Presto (bras Test) et manuellement par technique de gradient de densité (Ficoll®). La technique Ficoll® est la technique de référence utilisée au laboratoire d'immunologie cellulaire pour la réalisation du test T-SPOT.TB® avant le passage à l'automatisation. Lors des tests, la version 1.50.0.6 du protocole paramétré pour le Nimbus-Presto a été utilisée et fonctionnait de manière optimale.

➤ Evaluation de la numération cellulaire avant normalisation des concentrations de CMN.

Les CMN issues des échantillons traités par le Nimbus-Presto ont été comptées par le cytomètre en flux Guava®. Le seuil en-dessous duquel le nombre de CMN dénombrées est défini comme insuffisant est $1,95 \times 10^6$ cellules/mL. La moyenne (\pm écart-type) du nombre de CMN isolées par le Nimbus-Presto et comptées par le Guava® est de $5,3 (\pm 1,8) \times 10^6$ cellules/mL, avec deux échantillons en-dessous du seuil de $1,95 \times 10^6$ cellules/mL. La moyenne du nombre de CMN isolées par technique Ficoll et comptées sur le cytomètre de référence utilisé au laboratoire d'immunologie cellulaire (Navios, Beckman Coulter) est de $8,5 (\pm 3,1) \times 10^6$ cellules/mL (Tableau 12, Figure 71).

Tableau 12 : Evaluation de la numération cellulaire avant normalisation des concentrations de CMN. Comparaison des échantillons traités par Nimbus-Presto + cytomètre en flux Guava® aux échantillons traités par Ficoll + cytomètre en flux Navios. Tableau adapté des données fournies par la société Oxford immunotec suite à la validation du processus analytique réalisée à l'Institut d'Immunologie du CHU de Lille en décembre 2019 et janvier 2020

	Isolement des CMN par Ficoll Numération par le cytomètre Navios	Isolement des CMN par le Nimbus-Presto Numération par le cytomètre Guava®
Echantillons traités (n)	57	57
Echantillons avec nombre de CMN insuffisant (% du total)	0 (0%)	2 (4%)
Moyenne des CMN obtenues (million/mL)	8,5	5,3
Ecart type	3,1	1,8

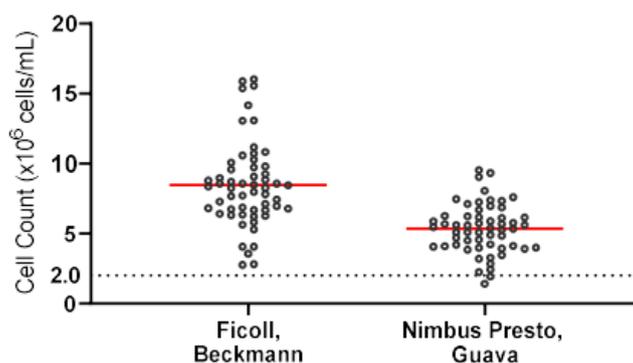


Figure 70 : Numération cellulaire des CMN isolées par le Nimbus-Presto (à droite) versus isolement par technique Ficoll (à gauche). Les lignes rouges indiquent les valeurs moyennes. La ligne en pointillés indique le seuil de $1,95 \times 10^6$ cellules/mL. Données et figure issues du rapport fourni par la société Oxford Immunotec suite à la validation du processus analytique réalisée à l'Institut d'Immunologie du CHU de Lille en décembre 2019 et janvier 2020.

Parmi les échantillons traités par le Nimbus-Presto, 96% sont au-dessus du seuil minimal attendu de $1,95 \times 10^6$ cellules/mL. L'intégralité des échantillons traités par Ficoll® se trouvent au-dessus de ce seuil.

- Evaluation de la numération cellulaire après normalisation des concentrations de CMN.

Une fois les comptages cellulaires initiaux terminés, les échantillons du bras Test ont été normalisés à la concentration cible de $2,5 \times 10^6$ cellules/mL par le Nimbus-Presto. Les opérateurs ont interrompu l'automate immédiatement après la dilution du dernier échantillon, c'est-à-dire avant la mise en plaque. L'acquisition des 57 échantillons dilués a été réalisée sur le cytomètre en flux Guava®. La totalité des échantillons se situe au-dessus du seuil de $1,95 \times 10^6$ cellules/mL et répond ainsi aux critères d'acceptation pour la normalisation de la concentration cellulaire.

b. Numération des CMN par le cytomètre en flux Guava®

Un isolement des CMN par tri magnétique a été réalisé sur 16 échantillons par le Nimbus-Presto. Les CMN issues de ces échantillons ont été comptées par le cytomètre en Flux Guava® (test) et par le cytomètre de référence du laboratoire (Navios, Beckman Coulter).

➤ Exactitude

Parmi les 16 échantillons, 12 sont passés sur le cytomètre Navios avec un décompte de CMN $> 2 \times 10^6$ cellules/mL ont une numération $> 2 \times 10^6$ cellules/mL après passage sur le cytomètre Guava®.

➤ Répétabilité

La répétabilité a été évaluée sur 10 échantillons. Le CV moyen acceptable est défini comme étant inférieur à 10%. Le coefficient de variation (CV) moyen pour la numération des CMN réalisée par le cytomètre Guava® est de 7%. Sur les 10 échantillons testés, 8 montrent un CV individuel $< 10\%$. Le cytomètre en flux Guava® répond aux critères d'acceptabilité.

➤ Linéarité

Deux échantillons ont été testés, avec réalisation d'une série de 5 dilutions successives (Figure 72).

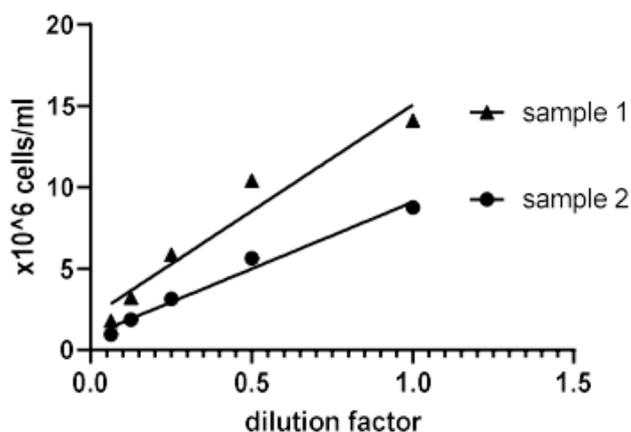


Figure 71 : Régression linéaire sur les numérations de CMN obtenues après une série de dilutions. Données et figure issues du rapport fourni par la société Oxford Immunotec suite à la validation du processus analytique réalisée à l'Institut d'Immunologie du CHU de Lille en décembre 2019 et janvier 2020.

c. Lecture des spots par le lecteur ELISpot CTL reader

Trois plaques contenant des barrettes de tests T-SPOT.TB® ont été lues par le lecteur ELISpot CTL reader (OI 1173, test) et sur un lecteur ELISpot contrôle validé par la société Oxford Immunotec (CTL Core, OI 0504). La lecture a été évaluée sur les spots obtenus tels quels, sans ajustement (ajout ou retrait de spot) par l'opérateur.

➤ Exactitude

D'après les données fournies par Oxford Immunotec, sur 165 puits comprenant entre 0 et 25 spots (contrôles négatifs et panels A et B), 156 montrent une différence ≤ 3 spots entre les deux lecteurs ELISpot. Cela équivaut à 94,5% des puits, soit supérieur au critère d'acceptabilité de 94,5%. Hors contrôles positifs, 50 puits présentent ≥ 25 spots. La régression linéaire a été calculée (utilisation du logiciel GraphPad Prism v8.). La pente de la droite de régression est de 1,06. Elle diverge de la ligne d'identité de moins de 10%, satisfaisant les critères d'acceptabilité (Figure 73).

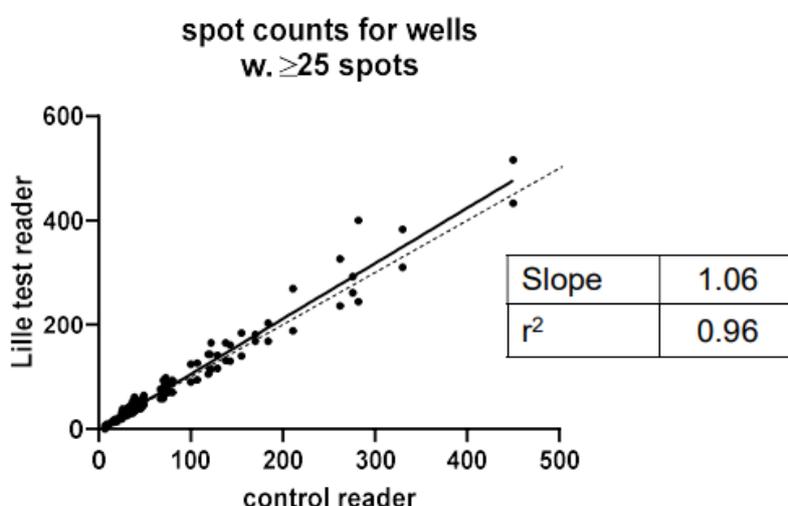


Figure 72: Régression linéaire entre le lecteur ELISpot CTL reader (test) et le lecteur CTL contrôle CTL, pour les puits comprenant ≥ 25 spots. Données et figure issues du rapport fourni par la société Oxford Immunotec suite à la validation du processus analytique réalisée à l'Institut d'Immunologie du CHU de Lille en décembre 2019 et janvier 2020.

➤ Répétabilité

Deux plaques ont été lues 10 fois chacune sur le lecteur ELISpot CTL reader testé. Les puits ont été regroupés en trois catégories selon le nombre de spots qu'ils présentaient (nombre faible, moyen et élevé de spots). Les puits correspondant aux contrôles positifs ont été exclus. La moyenne des spots comptés par le lecteur CTL a été calculée pour chacune des trois catégories, ainsi que le CV moyen (Tableau 13).

Tableau 13 : Répétabilité du lecteur ELISpot CTL reader utilisé au laboratoire d'immunologie cellulaire du CHU de Lille. Evaluation réalisée par Oxford Immunotec. Tableau adapté des données fournies par Oxford Immunotec suite à la validation du processus analytique réalisée à l'Institut d'Immunologie du CHU de Lille en décembre 2019 et janvier 2020.

	Echantillons requis (n)	Echantillons testé (n)	moyenne des spots comptés	CV moyen	Critère d'acceptabilité
Faible de nombre de spots (5-25)	25	28	12,9	6%	CV < 10%
Nombre moyen de spots (25-100)	10	18	54,6	2%	CV < 5%
Nombre élevé de spots (>100)	10	13	170,4	2%	CV < 5%

Le CV moyen pour les 3 catégories de puits satisfait aux critères d'acceptabilités établis par la société Oxford Immunotec.

Dans son rapport sur les performances analytiques de la plateforme ELISpot, Oxford Immunotec mentionne avoir réalisé un calcul du CV après 10 lectures de la même plaque. Ces résultats ne figurent pas dans le rapport et ne peuvent être explicités dans ce travail.

d. Evaluation du processus analytique complet (incluant l'interface Excel MAPP)

Une fois la validation de chaque automate effectuée, le processus analytique complet de la plateforme ELISpot comprenant la préparation des échantillons et l'isolement des CMN par le Nimbus-Presto, la numération cellulaire par le cytomètre Guava®, la lecture des spots par le lecteur ELISpot CTL ainsi que le fonctionnement du logiciel MAPP a été évaluée par Oxford Immunotec. Les résultats de cette évaluation portent sur la numération des CMN isolées et la lecture des spots, correspondant aux deux subdivisions du processus analytique complet.

L'isolement des CMN par tri magnétique a été comparé à la technique manuelle par Ficoll®. La numération cellulaire et la lecture des spots ont été comparées aux techniques jusqu'alors utilisées au laboratoire d'immunologie cellulaire, les techniques « contrôles » (cytomètre en flux Navios, Beckman Coulter ; lecteur ELISpot CTL Scanner + logiciel TB SCAN).

➤ Isolement des CMN

Un total de 137 échantillons a été testé, à la fois sur le Nimbus-Presto et par technique Ficoll. Le seuil en-dessous duquel le nombre de CMN dénombré est défini comme insuffisant est 1.95×10^6 cellules/mL. Moins de 1% des CMN issues des échantillons

traités par le Nimbus-Presto étaient en-dessous de ce seuil (n=1). La totalité des échantillons traités par technique Ficoll ont une numération de CMN au-dessus de ce seuil (Figure 74).

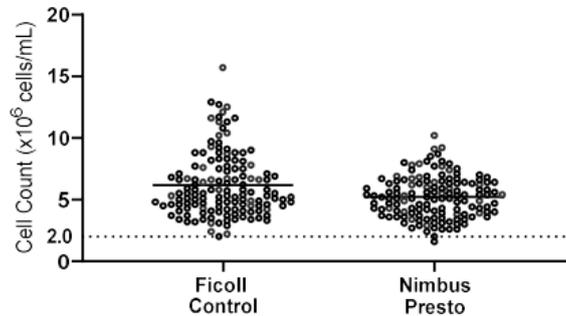


Figure 73: Numération cellulaire des CMN isolées par le Nimbus-Presto (à droite) versus isolement par technique Ficoll (à gauche). Les lignes noires indiquent les valeurs moyennes. La ligne en pointillés indique le seuil de 1.95×10^6 cellules/mL. Données et figures issues du rapport fourni par la société Oxford Immunotec suite à la validation du processus analytique réalisée à l'Institut d'Immunologie du CHU de Lille en décembre 2019 et janvier 2020.

➤ Lecture des spots

- **Résultat indéterminé (> 10 spots au niveau du contrôle négatif) :** aucun contrôle négatif des tests effectués avec les techniques « contrôles » n'a présenté un nombre de spots > 10 (0/137 échantillons), versus 1 test réalisé avec la plateforme ELISpot (1/137 échantillons). Cela représente moins de 1% des tests et n'est pas retenu comme une différence significative par Oxford Immunotec.
- **Résultat indéterminé car (< 20 spots au niveau du contrôle positif) :** aucun contrôle positif des tests effectués avec les techniques « contrôles » (0/137) et avec la plateforme ELISpot (0/137) n'a présenté un nombre de spots < 20.
- **Exactitude et concordance des résultats :** Parmi les 137 échantillons, 48 tests interprétables et avec un nombre de spots en panel A et/ou panel B entre 5 et 100 ont été analysés. La moyenne des spots dénombrés pour les échantillons traités par la plateforme testée est de 28,34 et est comprise dans une plage de 6% autour de la valeur moyenne du nombre de spots dans les panels A et/ou B des tests réalisés avec les techniques de référence (Tableau

14 et Figure 75). Elle répond au critère d'acceptabilité de +/- 30% fixé par Oxford Immunotec.

Tableau 14 : Evaluation de l'exactitude du décompte des spots par comparaison de la plateforme ELISpot testée avec les techniques de références utilisées au laboratoire d'immunologie cellulaire. Les échantillons testés dont le test T-SPOT.TB® réalisé est interprétable et avec un nombre de spots en panel A et/ou panel B entre 5 et 100. Tableau adapté d'après les données fournies par Oxford Immunotec.

	Plateforme ELISpot testée	Techniques de référence	Respect du critère d'acceptabilité (+/- 30% autour de la moyenne)
Echantillons traités	48	48	
Moyenne des spots comptés	28,34	30,03	OUI 19,84-36,85 soit +/- 6%
Médiane des spots comptés	20	17	

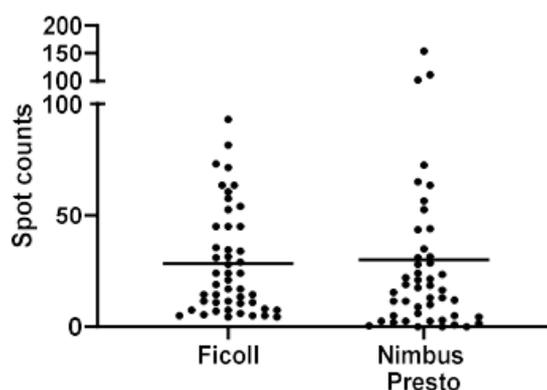


Figure 74: Evaluation de l'exactitude du décompte des spots par comparaison de la plateforme ELISpot testée avec les techniques de références utilisées au laboratoire d'immunologie cellulaire. Echantillons testés : test T-SPOT.TB® interprétable avec un nombre de spots en panel A et/ou panel B entre 5 et 100. Les lignes noires indiquent les valeurs moyennes des spots comptés. Données et figures issues du rapport fourni par la société Oxford Immunotec suite à la validation du processus analytique réalisée à l'Institut d'Immunologie.

3. Principale problématique rencontrée au niveau de la phase analytique des tests T-SPOT.TB® sur la période du 17/02/2020 au 31/05/2020

a. Description de la problématique : rendement de l'isolement des CMN par le Nimbus-Presto

La principale problématique rencontrée lors de la phase analytique du test T-SPOT.TB® automatisé porte sur le rendement de l'isolement des CMN par le Nimbus-Presto. Dès la semaine 8 (semaine de lancement de l'ELISpot en routine), l'équipe

technique et les biologistes constatent un nombre conséquent de prélèvements avec un nombre de CMN isolées insuffisant (correspondant à une numération cellulaire par le cytomètre en flux Guava® < 1,95 x 10⁶ cellules/mL ne permettant pas d'obtenir 1 x 10⁶ cellules nécessaires à la réalisation du test).

Un recueil des données sur les échantillons de patients analysés entre le 18/02/2020 et le 13/03/2020 a été réalisé par J. TRAUET, ingénieur au laboratoire d'immunologie cellulaire. Les informations suivantes ont été recueillies :

- date et heure de prélèvement ;
- numérations lymphocytaires et monocytaires concomitantes quand disponibles (Numération-formule sanguine (NFS) réalisée le même jour au laboratoire d'hématologie cellulaire) ;

La numération des CMN par le cytomètre en flux Guava® après tri par le Nimbus-Presto (cellules/mL) est comparée à la numération théorique des CMN que l'on devrait recueillir par addition des numérations lymphocytaires et monocytaires issues de la NFS (G/L). Pour les patients dont on ne dispose pas de NFS au jour du prélèvement du tube T-SPOT.TB®, la numération des CMN par le cytomètre en flux Guava® après tri par le Nimbus-Presto est comparée à la numération sur sang obtenue avec le cytomètre Navios à l'aide des billes Flow Count (cellules/mL).

A partir de ces données ont été calculés :

- Le nombre théorique de CMN contenues dans 3,5 mL de sang (volume de sang utilisé par le Nimbus-Presto) pour chaque échantillon;
- Le nombre de CMN obtenues dans 0,5 mL d'AIM-V après le tri magnétique effectué par le Nimbus-Presto (numération donnée par le cytomètre Guava® (cellules/mm³) x 500).

Un total de 134 échantillons T-SPOT.TB® a été analysé du 18/02/2020 au 13/03/2020 (Figure 76).

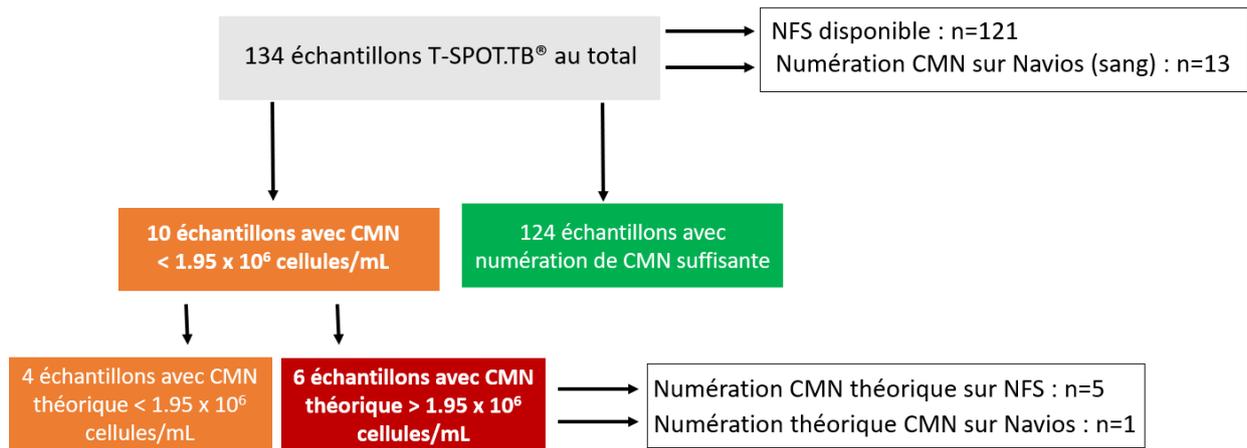


Figure 75 : Schéma récapitulatif de l'étude du rendement du tri cellulaire par le Nimbus-Presto sur les échantillons T-SPOT.TB® traités entre le 18/02/2020 et le 13/03/2020 au laboratoire d'immunologie cellulaire du CHU de Lille.

La numération des CMN sur Navios a été réalisée pour 13/134 patients, pour lesquels on ne disposait pas de NFS concomitante. 10/134 échantillons (soit 7.5%) sont en-dessous du seuil de $1,95 \times 10^6$ cellules/mL nécessaire pour la réalisation du test T-SPOT.TB®. Sur ces 10 échantillons, 6 ont une numération de CMN théorique $> 1,95 \times 10^6$ cellules/mL et n'auraient pas dû se retrouver en-dessous du seuil après tri cellulaire par le Nimbus-Presto et passage sur le Guava®.

La Figure 77 montre une forte dispersion des valeurs des CMN théoriques et mesurées et une faible adéquation entre les valeurs de CMN attendues et les valeurs obtenues (coefficient de détermination $R^2 = 0,2355$ soit proche de 0).

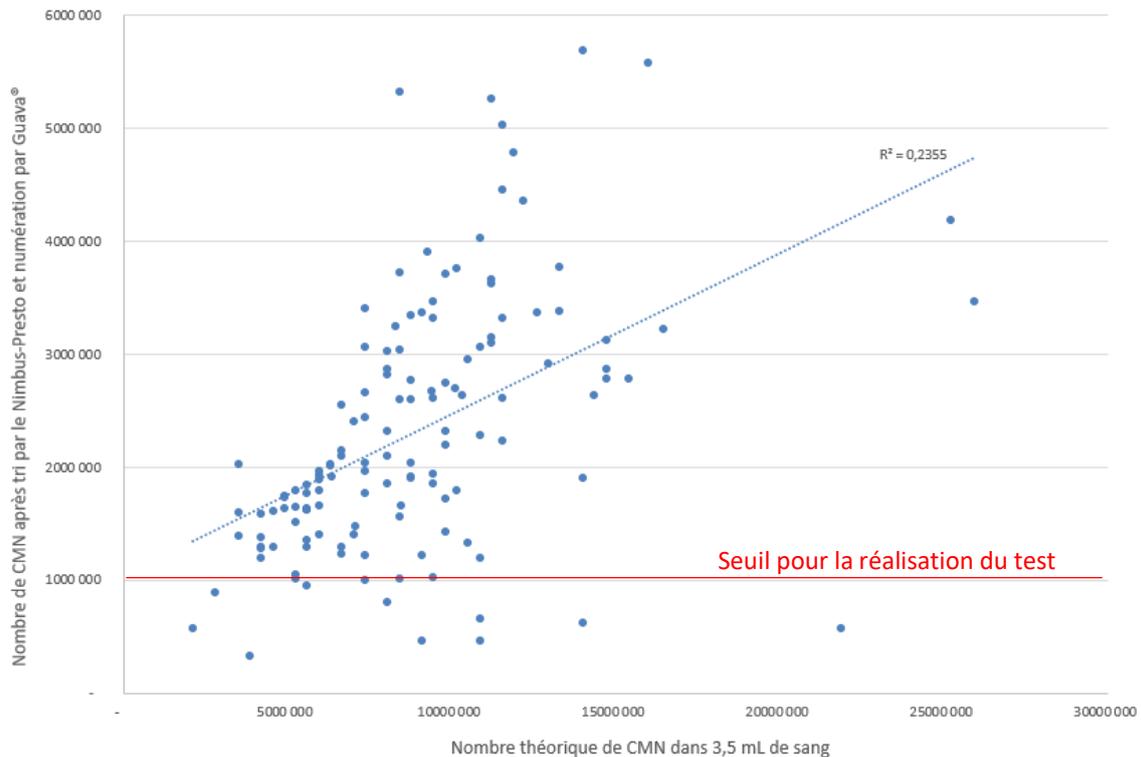


Figure 76: Comparaison du nombre de CMN attendu (= nombre de CMN théorique) dans les échantillons de 3,5 mL de sang au nombre de CMN obtenu après tri cellulaire par le Nimbus-Presto et numération par le cytomètre en flux Guava®. Figure réalisée à partir des données recueillies sur les échantillons T-SPOT.TB® pris en charge entre le 18/02/2020 et le 13/03/2020 au laboratoire d'immunologie cellulaire du CHU de Lille.

Le rendement de l'isolement des CMN par le Nimbus-Presto a été calculé pour chaque échantillon (Tableau 15).

Tableau 15 : Statistiques sur le rendement de l'isolement des CMN réalisé par le Nimbus-Presto sur la période du 18/02/2020 au 13/03/2020

Etude du rendement du tri des CMN effectué par le Nimbus-Presto	
Nombre d'échantillons analysés	134
Rendement moyen	27,5%
Ecart-type	10,4%
Coefficient de variation	37,7%

Le rendement moyen du tri cellulaire obtenu sur l'ensemble des 134 échantillons est faible, de l'ordre de 27,5% (\pm 10,4%). Ces données confirment l'impression générale

de l'équipe du laboratoire d'immunologie cellulaire. Ces statistiques ont été adressées à la société Oxford Immunotec le 18/03/2021.

Le suivi des tests T-SPOT.TB® non réalisés par défaut d'isolement des CMN sur 11 mois révèle que le problème persiste longtemps après l'installation de la plateforme ; ils représentent entre 5 et 10% des prélèvements traités par le Nimbus-Presto selon les mois (Figure 78).

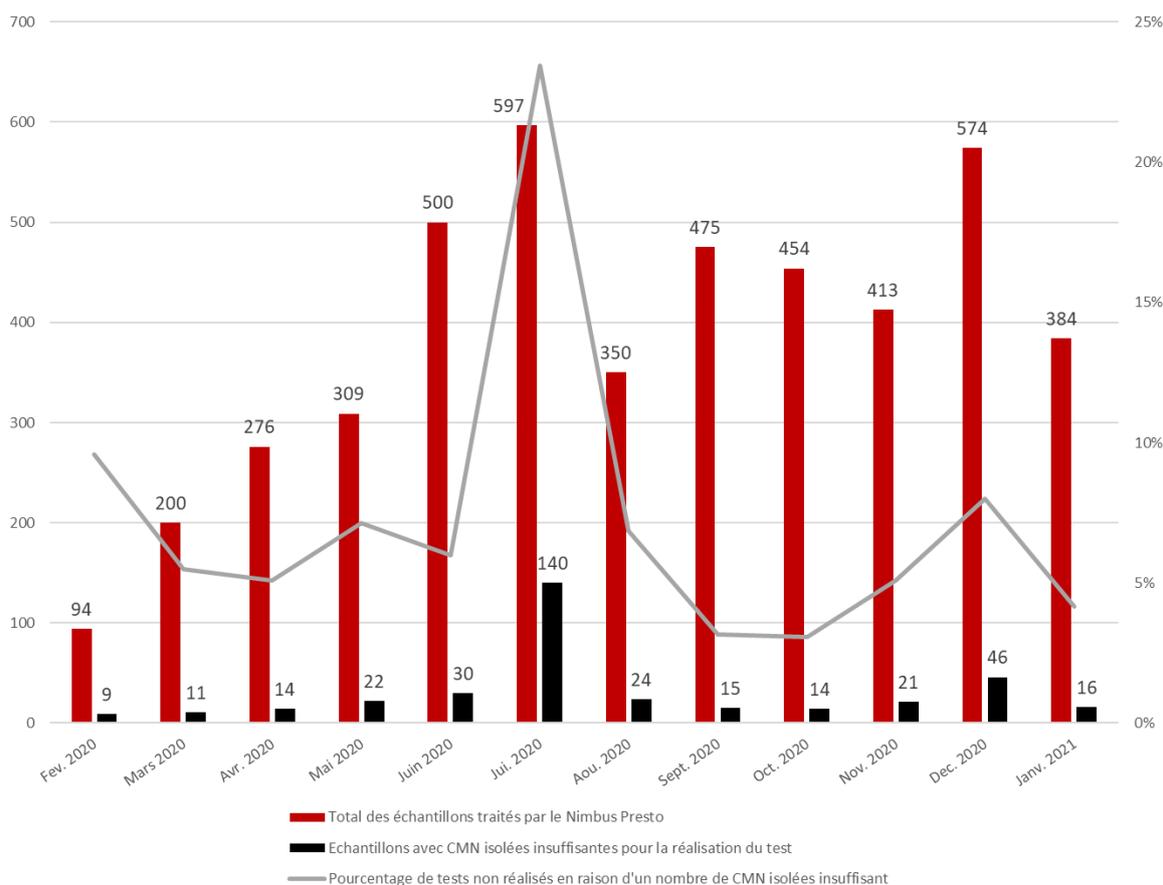


Figure 77 : Echantillons T-SPOT.TB® traités mensuellement par le Nimbus-Presto de février 2020 à janvier 2021. Total des échantillons (en rouge) et échantillons avec un défaut d'isolement des CMN entraînant une impossibilité de réaliser le test (en noir). Pourcentage de tests non réalisés en raison d'un nombre de CMN isolé insuffisant parmi le total des échantillons pris en charge par le Nimbus-Presto (en gris)

b. Conséquences et stratégie mise en œuvre

Ainsi, un nombre conséquent de prélèvements est concerné par une numération de CMN $< 1,95 \times 10^6$ cellules/mL. Pour ces prélèvements, aucun résultat ne peut être rendu au patient et la consigne est de répéter le prélèvement sur 3 tubes héparine de

Li de 7 mL afin de réaliser une extraction manuelle des CMN sur un plus grand volume de sang. Cela pose plusieurs problèmes :

- si le patient a été prélevé lors d'une consultation, cela impose de le faire revenir pour le prélever ;
- Diffère le rendu de résultat, parfois relativement urgent (ex. mise sous anti-TNF α) ;
- \pm difficulté d'obtenir un prélèvement de 3 tubes de 7 mL conforme (enfants, patients difficiles à prélever).

Afin de pallier à ce problème, pour les numérations cellulaires $> 1,7 \times 10^6$ cellules/mL rendues par le cytomètre en flux Guava[®], **les techniciennes réalisant le JOUR 1 des tests T-SPOT-TB[®] modifient manuellement la numération des CMN rendue par l'automate pour la passer à 2×10^6 cellules/mL.** Cette manœuvre entraînant inévitablement une dilution des CMN, les précautions suivantes sont prises :

- ➔ La numération de CMN initiale avant passage à 2×10^6 cellules/mL doit être noté par la technicienne sur la feuille de travail correspondant à la série de tests T-SPOT.TB[®] en cours d'analyse ;
- ➔ Pour les échantillons concernés, le biologiste et la technicienne réalisant la lecture des spots vérifient le nombre de spots au niveau des contrôles positif et négatifs pour évaluer l'impact de la dilution des CMN sur le résultat du test :
 - Si le contrôle négatif contient un ou plusieurs spots : le résultat ne doit pas être rendu.
 - Si le nombre de spots du contrôle positif est nettement inférieur à ceux du reste de la série, le résultat ne sera pas rendu et un contrôle sur 3 tubes héparine de Li sera demandé au prescripteur.

La numération est ainsi modifiée est acceptée par le logiciel « guavasoft » et l'interface MAPP peut générer les dilutions à effectuer pour la normalisation de la concentration des CMN et la réalisation du test T-SPOT.TB[®].

D. Phase post-analytique

Les étapes de la phase post-analytique du test T-SPOT.TB® ont lieu au sein de l'Institut d'Immunologie et ont pour finalité la validation biologique du test et le rendu d'un résultat assorti d'une interprétation pour le prescripteur et le patient (Figure 79).

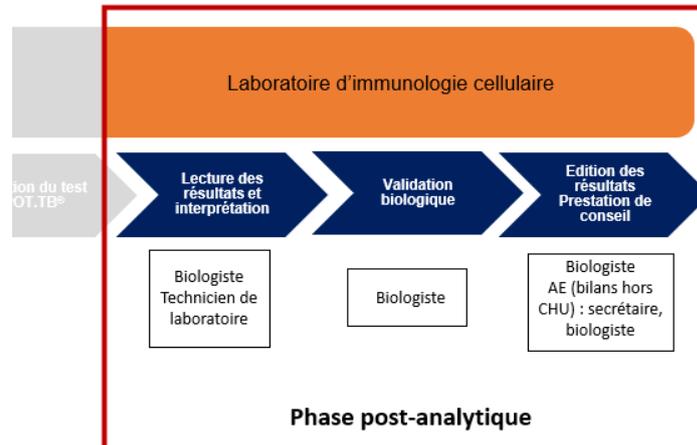


Figure 78 : Déroulement de la phase post-analytique d'un test T-SPOT.TB® réalisé au laboratoire d'immunologie cellulaire du CHU de Lille. Détail de la Figure 26 présentée en Matériel et Méthodes. De bas en haut : intervenants, étapes du processus post-analytique et lieu.

L'intégralité des périodes ① et ② englobe les résultats relatifs à la phase post-analytique. Les informations et les données recueillies et utilisées dans l'étude de la phase post-analytique sont également résumées sur la Figure 80.

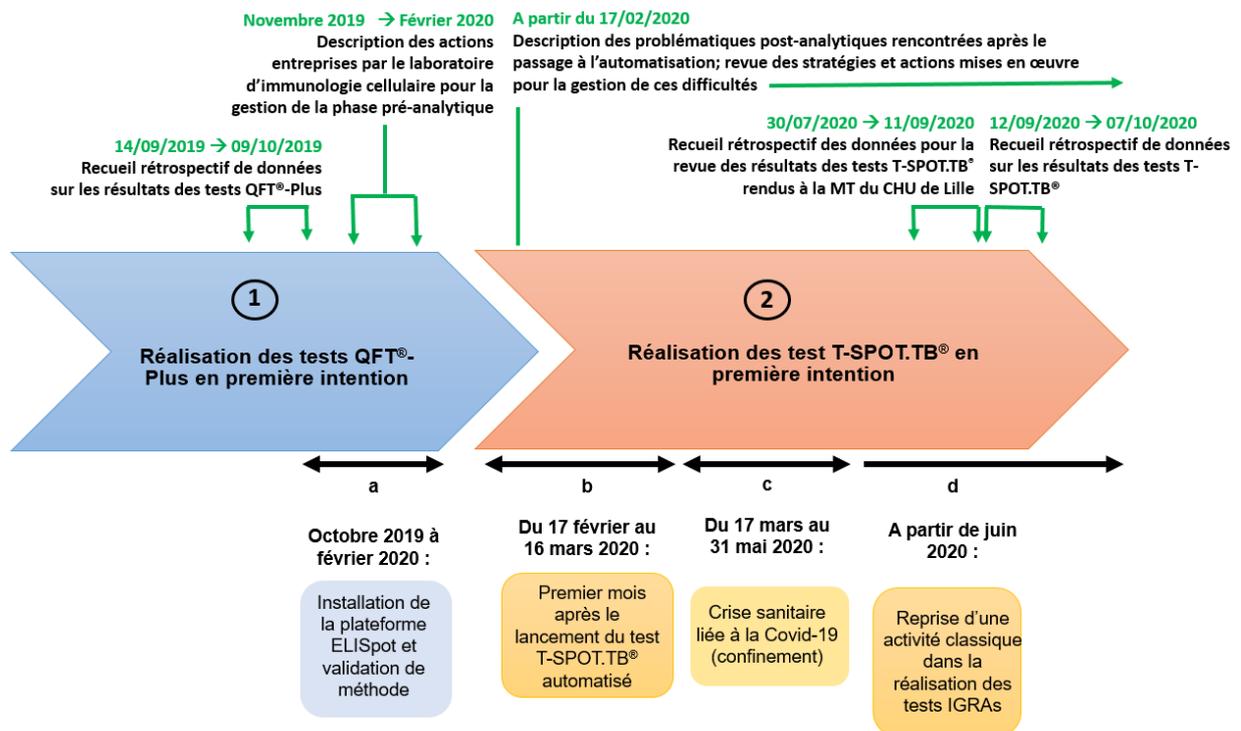


Figure 79 : Périodes d'intérêts et données étudiées concernant la phase post-analytique des tests T-SPOT.TB® dans le cadre du passage à l'automatisation à l'Institut d'Immunologie du CHU de Lille. Adaptation de la Figure 25 présentée en Matériel et Méthodes.

1. Actions entreprises en amont du passage à l'automatisation des tests T-SPOT.TB® pour la gestion du post-analytique.

Les actions entreprises pour la gestion des enjeux post-analytiques des tests T-SPOT.TB® en amont du passage à l'automatisation (période **a**) sont les suivantes :

- Novembre 2019 : paramétrage des algorithmes de validation des tests T-SPOT.TB® dans le SIL par M. B. VEINAND (technicien de l'exploitation du SIL, TESIL) de l'Institut d'Immunologie). Installation dans le même temps d'un logiciel d'aide à la maintenance permettant une prise en main à distance par la société Hamilton en cas de problème technique sur le Nimbus-Presto. Paramétrage de la tarification du test dans le SIL.
- Janvier 2020 : travail sur les comptes-rendus d'examen :
 - Elaboration par les biologistes des commentaires d'interprétation des tests T-SPOT.TB® à destination du clinicien et du patient (Tableau 16).
 -

Tableau 16 : Commentaires d'interprétation du test T-SPOT.TB® en fonction du résultat et code MOLIS correspondant.

Résultat du test T-SPOT.TB®	Code MOLIS	Commentaire d'interprétation
Test <u>négatif</u>	tbsneg	Dans le cadre d'un contage, l'interprétation d'un résultat négatif doit intégrer le délai de six semaines à trois mois nécessaire à la mise en place chez le sujet d'une réaction immunitaire vis-à-vis de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .
Test <u>positif</u>	tbspos	Ce résultat évoque une infection tuberculeuse ancienne ou récente. Il ne peut, à lui seul, être considéré comme une base unique et définitive pour déterminer une infection à <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .
Test à la <u>limite du seuil</u> de positivité	tbsfp	Résultat à contrôler. Dans le cadre d'une analyse réalisée pour contage tuberculeux, réaliser le deuxième prélèvement à 3 mois (délai de mise en place chez le sujet d'une réaction immunitaire vis-à-vis de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>).
test <u>indéterminé</u> (>10 spots en contrôle négatif)	tbsblc	Résultat ininterprétable en raison d'un taux d'IFN γ élevé en l'absence de toute stimulation. A contrôler sur un nouveau prélèvement.
Test <u>indéterminé</u> (<20 spots en contrôle positif)	tbsind	Le résultat est indéterminé en raison d'une production d'IFN γ par les lymphocytes T stimulés en présence de mitogène en-dessous du seuil de positivité.
Test <u>non réalisable</u> (nombre de CMN isolées insuffisant à partir d'un prélèvement conforme)	cmnlow	Le test n'a pas pu être réalisé en raison de l'isolement d'un nombre insuffisant de cellules mononucléées du sang obtenues à partir du prélèvement de 6 mL réceptionné. Un nouveau prélèvement de trois grands tubes héparinés de 6 mL est nécessaire pour une nouvelle réalisation de l'analyse. Merci de prendre rendez-vous avec le laboratoire au 03.20.44.65.76 (du lundi au jeudi).
Test <u>non réalisable</u> (nombre de CMN isolées insuffisant chez un patient avec une lymphopénie connue , à partir d'un prélèvement conforme)	lylow	Le test n'a pas pu être réalisé en raison de l'isolement d'un nombre insuffisant de lymphocytes obtenus à partir du prélèvement, en lien avec la lymphopénie du patient. Un nouveau prélèvement (trois grands tubes héparinés de 6 mL) est nécessaire pour une nouvelle réalisation de l'analyse. Merci de prendre rendez-vous avec le laboratoire au 03.20.44.65.76 (du lundi au jeudi).

- Elaboration d'un commentaire spécifique pour les non-conformités pré-analytiques type prélèvement en quantité insuffisante : « Le test

n'a pas pu être réalisé en raison d'une quantité de sang prélevé insuffisante. Un prélèvement de 6 mL sur un grand tube héparinate de Lithium est nécessaire ».

- Modification de l'affichage des résultats par rapport au test T-SPOT.TB® avant automatisation : ajout du détail du nombre de spots contenus dans chacun des puits sur le compte-rendu. Auparavant, seul le résultat global et le commentaire étaient rendus.

- Février 2020 : formation des biologistes du laboratoire d'immunologie cellulaire à la lecture des spots sur le lecteur ELISpot CTL à l'occasion de la session de formation organisée par Oxford Immunotec. Utilisation du logiciel tutoriel « T-SPOT.Tutor ».

2. Principales problématiques rencontrées au niveau de la phase post-analytique des tests T-SPOT.TB® après le passage à l'automatisation

a. Erreurs de facturation des tests T-SPOT.TB®

Des erreurs concernant la tarification des tests T-SPOT.TB® ont été constatées à la fin du mois de mars 2020, soit plus d'un mois après le lancement du test dans sa version automatisée. **Après analyse des tests réalisés depuis le 17/02/2020, un total de 77 dossiers de patients a été concerné au 31 mars 2020.** Pour ces tests, des lignes de tarification aberrantes se sont automatiquement ajoutées lors de la validation biologique dans MOLIS. Ces erreurs ont concerné des bilans de sites extérieurs au CHU et non gérés via l'interface OpenLab et ont donc généré des frais supplémentaires pour les patients et les sites prescripteurs

Des échanges ont eu lieu à plusieurs reprises entre les biologistes du laboratoire et M. VEINAND afin de déterminer l'origine du problème. L'erreur découle du paramétrage du code « nabm », renseigné dans la ligne « QTFRS » et correspondant à la prise en charge du test par l'assurance maladie pour les bilans des sites extérieurs. Ce code n'existait pas initialement dans le programme CADD (Computer Assisted Design and Drafting) s'exécutant en « QTFRS » et a été ajouté dans un second temps afin de garantir un remboursement des bilans provenant de l'extérieur. Ne reconnaissant pas

le code « nabm », le programme ajoutait automatiquement un ou plusieurs codes de tarification après la validation des tests concernés.

- Actions mises en œuvre pour la gestion du problème de tarification :
 - Modification des paramètres de tarification du test T-SPOT.TB® ;
 - Vérification de la bonne application des nouveaux paramètres de tarification à l'aide de dossiers « TEST » dans MOLIS;
 - Pour les 77 dossiers de patients concernés, la tarification a été corrigée individuellement par le TESIL.

Ce type d'erreur touchant la facturation des tests ne s'est pas reproduite par la suite.

b. Difficulté d'identification des patients lors de la validation sur le lecteur ELISpot CTL reader

Au cours des premiers mois d'utilisation de la plateforme ELISpot pour la réalisation des tests IGRAs à l'Institut d'Immunologie, le paramétrage du logiciel PGP ne permettait pas l'affichage du nom et du prénom des patients de la série à valider, à la fois sur PGP et sur le lecteur ELISpot CTL. Seul le numéro alias de chaque patient était visible, rendant plus laborieuse leur identification lors de la lecture des spots. Ce point a posé différents problèmes, identifiés et gérés comme résumé dans le Tableau 17.

Tableau 17 : Gestion des difficultés liées à l'absence d'identification des tests à valider sur le lecteur ELISpot CTL reader au cours des premiers mois d'utilisation de la plateforme ELISpot pour la réalisation des tests IGRAs au laboratoire d'immunologie cellulaire.

Problématiques liées à la difficulté d'identifier le patient sur PGP et le lecteur CTL	Actions mises en œuvre pour pallier aux problématiques
<p>Difficulté d'identifier les tests concernés par une action particulière au niveau de la phase analytique et importante à prendre en compte lors de la validation.</p> <p><i>→ par exemple, si modification manuelle de la numération cellulaire des CMN sur guavasoft : important à prendre en compte pour l'interprétation des puits contrôles positif et négatif.</i></p>	<p>Organisation des roulements au poste des tests IGRAs pour les techniciennes du laboratoire : au mieux, la même personne réalise les jours 1 et 2 du test, et a ainsi connaissance des difficultés analytiques qui ont pu survenir lors de la lecture de la plaque en binôme avec le biologiste. Mais pas toujours réalisable.</p> <p>Annotation des particularités liées aux prélèvements de la série sur la plaque, en regard de la position du test concerné et/ou sur la liste de travail MOLIS éditée.</p>

<p>Difficulté de confronter le résultat du test à une éventuelle antériorité pour le patient au moment de la lecture des spots, et pouvant positivement influencer l'interprétation du test. → par exemple, pour un test au résultat négatif d'un patient pour lequel on aurait un antécédent récent de test positif</p> <p>Problème lié à l'enregistrement des dossiers dits « pluridisciplinaires » (comportant des analyses réalisées au sein de différents laboratoires), provenant de sites extérieurs. L'enregistrement de toutes les analyses est fait à partir d'un seul prélèvement. Si l'enregistrement du dossier patient n'a pas été fait à partir du tube hépariné pour le test IGRA : celui-ci n'est pas reconnu lors du transfert des données sur PGP et une ligne blanche remplace le numéro alias du patient. → par exemple, si plusieurs dossiers sont dans ce cas lors d'une même série : on ne peut pas les distinguer sur le lecteur CTL ni sur PGP : risque d'erreur d'identité.</p>	<p>→ par exemple, ajout de la numération cellulaire avant passage manuel à 2×10^6 cellules/mL.</p> <p>Mise à disposition de la liste de travail MOLIS au biologiste lors de la lecture des spots. Le valideur a ainsi connaissance de l'âge du patient, du service prescripteur et des éventuels résultats antérieurs de tests T-SPOT.TB® (nombres de spots antérieurs en CN, Panel A, Panel B, CP). → si discordance de résultats, il peut être utile de comparer la lecture du test à valider avec les résultats du test antérieur.</p> <p>Mise à disposition de la liste de travail MOLIS au binôme technicienne-biologiste. Permet de connaître la liste des patients attendus et de retrouver plus facilement les patients à dossier pluridisciplinaire manquant sur PGP. → si plusieurs dossiers sont dans ce cas lors d'une même série : on comparera le numéro alias des patients identifiés sur la liste de travail MOLIS avec ceux figurant sur PGP pour attribuer manuellement la bonne identité aux tests. Cela reste néanmoins fastidieux, une double vérification par la technicienne et le biologiste est souhaitable.</p>
---	---

A partir de la fin du mois de novembre 2020, suite à une demande émanant du laboratoire, un re-paramétrage du middleware par un intervenant de la société PGP a permis l'intégration du nom et du prénom des patients. Chaque test est désormais identifié sur PGP et sur le lecteur CTL lors de la validation analytique des plaques.

c. Bruit de fond sur des tests T-SPOT.TB® réalisés au cours de l'été 2020 : étude du cas de la Médecine du travail du CHU de Lille

A partir du début du mois d'août 2020, les IDE du service de Médecine du Travail (MT) du CHU de Lille (UF 0619) ont été interpellées par un nombre particulièrement important de patients pour lesquels des tests T-SPOT.TB® positifs, à la limite du seuil ou indéterminés ont été rendus depuis la fin du mois de juillet. Ces résultats contrastaient par rapport aux résultats habituels dans la population de patients suivie par la MT et ne semblaient pas cohérents, la majorité des patients concernés étant jeune, sans comorbidité et ne présentant pas de facteur de risque d'infection

tuberculeuse. L'équipe du laboratoire d'immunologie cellulaire a été contactée à ce sujet au mois d'août, et un travail a débuté pour objectiver et comprendre ces résultats.

Un unique lot de réactif T-SPOT.TB® a été utilisé sur les tests concernés, du 30/07/2020 au 11/09/2020 (lot TEC0341903). Sur cette période, un total de 90 tests T-SPOT.TB® a été réalisé pour le service de MT du CHU de Lille. Les tests positifs et limite au seuil de positivité représentent près d'un tiers des résultats rendus ($n=34$); on dénombre également 12% de tests non réalisables par insuffisance de CMN isolées à partir du prélèvement (Figure 81).

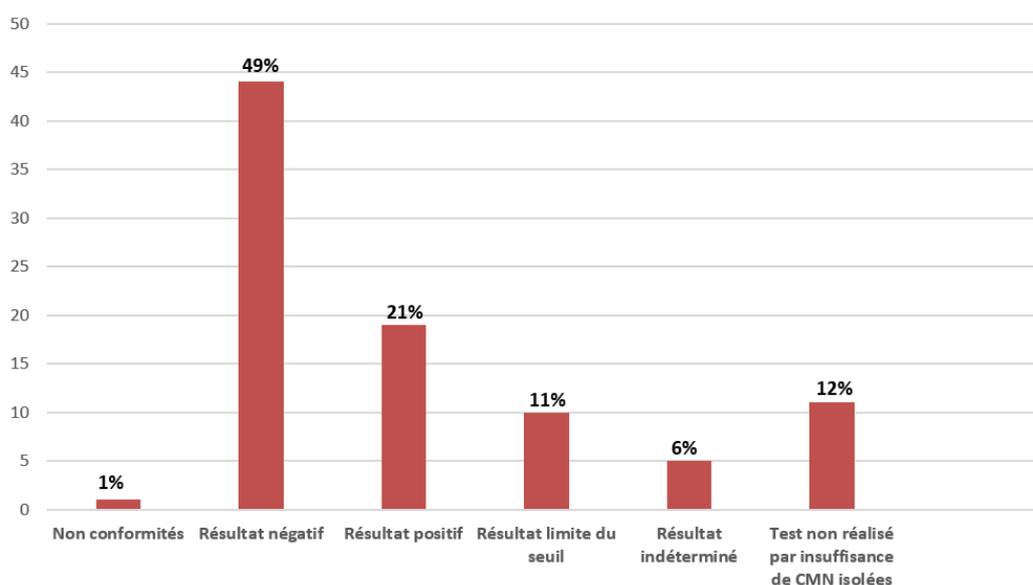


Figure 80 : Répartition des résultats des tests T-SPOT.TB® réalisés pour la médecine du travail du CHU de Lille (UF 0619) sur la période du 30/07/2020 au 11/09/2020 et correspondant à l'utilisation d'un même lot de réactifs.

Suite à ces résultats et en réponse aux échanges avec les IDE de la MT, un contrôle sur un nouveau prélèvement a été préconisé pour les patients avec un résultat de test positif, limite au seuil ou indéterminé sur la période du 30/07/2020 au 11/09/2020. Cela représente 34 tests : 19 tests positifs, 10 limites au seuil et 5 indéterminés. Un état des lieux sur les contrôles réalisés pour ces patients a été effectué en mars 2021 (Figure 82).

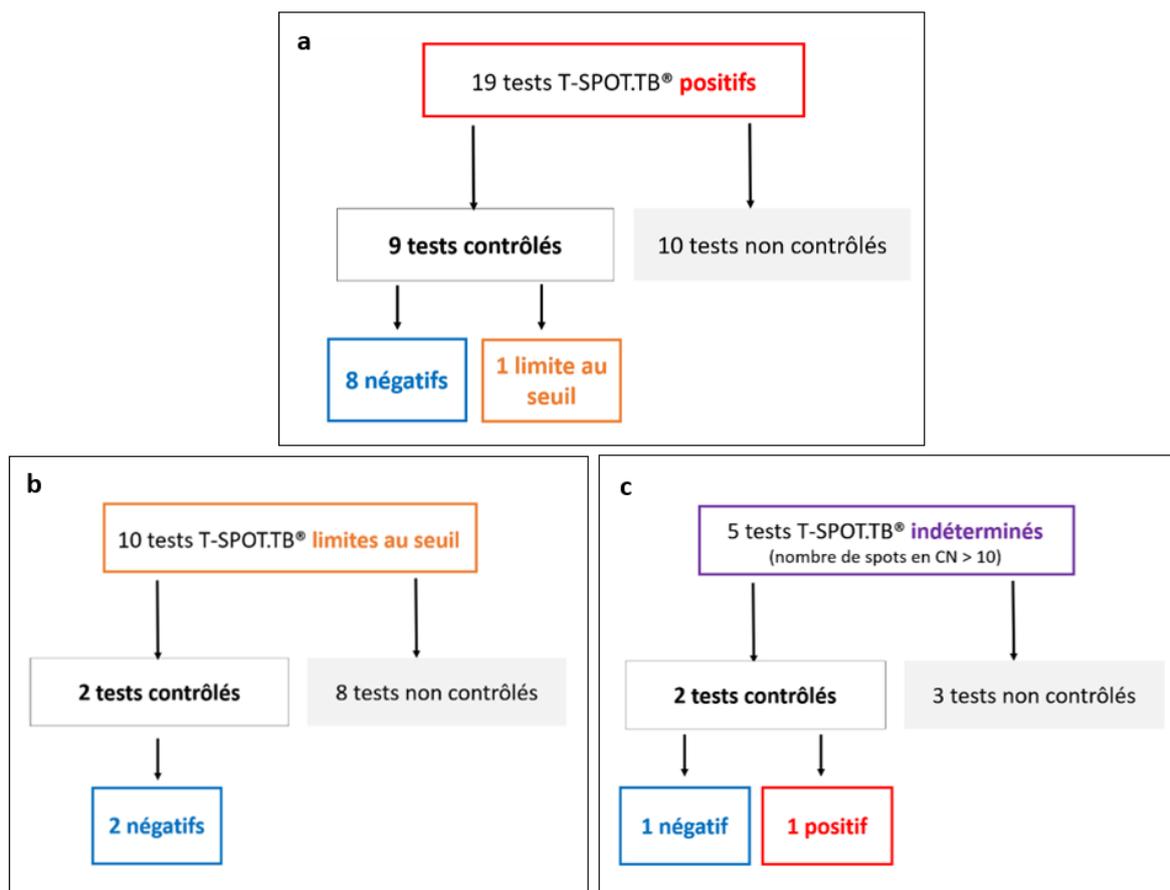


Figure 81 : Revue des contrôles demandés au service de Médecine du travail du CHU de Lille pour les tests T-SPOT.TB® aux résultats positifs (a), limites au seuil (b) et indéterminés (c) réalisés entre le 30/07/2020 et le 11/09/2020.

Sur les 34 tests T-SPOT.TB® concernés par une demande de contrôle sur un nouveau prélèvement, 13 ont été vérifiés au 17 mars 2021. La majorité des vérifications réalisées pour les tests positifs et limites au seuil de positivité a abouti à un résultat négatif (8/9 contrôles pour les tests initialement positifs et 2/2 pour les tests initialement limite au seuil). Le détail des résultats de ces 13 tests et de leur contrôle est résumé dans le Tableau 18.

Tableau 18 : Tests T-SPOT.TB® réalisés entre le 30/07/2020 et le 11/09/2020 et pour lesquels une vérification sur un nouveau prélèvement a été réalisée ultérieurement pour le service de MT du CHU de Lille (n=14). CN : contrôle négatif ; CP : contrôle positif.

Test n°	Date de prélèvement du premier test T-SPOT.TB®	Age du patient (ans)	Délai avant PEC	Nombre de spots par puits					Premier résultat rendu	date du prélèvement de contrôle	Nombre de spots par puits				Deuxième résultat rendu
				CN	CP	PANEL A	PANEL B				CN	CP	PANEL A	PANEL B	
1	04/08/2020	26	19h	2	645	14	6	POSITIF	12/08/2020	1	518	1	0	NEGATIF	
2	05/08/2020	24	17h	2	653	12	13	INDETERMINE*	17/12/2020	0	609	0	0	NEGATIF	
3	05/08/2020	27	16h	109	703	339	310	INDETERMINE	14/09/2020	0	677	10	4	POSITIF	
4	06/08/2020	23	17h	6	626	70	71	POSITIF	16/11/2020	1	592	1	2	NEGATIF	
5	07/08/2020	37	2h30	5	420	58	34	POSITIF	19/08/2020	0	222	2	6	LIMITE AU SEUIL	
6	19/08/2020	30	16h	1	680	1	8	LIMITE AU SEUIL	30/09/2020	0	935	2	1	NEGATIF	
7	19/08/2020	21	23h	0	600	6	3	LIMITE AU SEUIL	21/10/2020	1	585	1	2	NEGATIF	
8	20/08/2020	30	17h	6	825	17	8	POSITIF	04/09/2020	Test QTF®-plus réalisé			NEGATIF		
9	20/08/2020	36	22h	1	779	8	11	POSITIF	26/08/2020	Test QTF®-plus réalisé			NEGATIF		
10	01/09/2020	26	23h	1	595	9	10	POSITIF	20/10/2020	1	578	0	1	NEGATIF	
11	03/09/2020	49	21h	0	514	155	56	POSITIF	16/09/2020	3	559	142	39	POSITIF	
12	03/09/2020	31	21h	3	588	11	40	POSITIF	14/09/2020	0	638	0	2	NEGATIF	
13	07/09/2020	30	18h	3	646	15	18	POSITIF	19/02/2021	Test QTF®-plus réalisé			NEGATIF		

*rendu « indéterminé » par le biologiste sur MOLIS du fait d'un bruit de fond important au niveau du CN rendant l'interprétation du test délicate.

Pour les patients n°8, n°9 et n°13, la vérification a été réalisée sur un test QFT®-Plus, le prélèvement étant parvenu au laboratoire au cours du week-end. Détail des résultats des tests QFT®-Plus :

- patient n°8 : CN : 0,03 UI/mL ; CP : 6,70 UI/mL ; Panel A et B : 0 UI/mL.
- patient n°9 : CN : 0,02 UI/mL ; CP : > 10 UI/mL ; Panel A et B : 0 UI/mL.
- patient n°13 : CN : 0,02 UI/mL ; CP > 10 UI/mL ; Panel A et B : 0 UI/mL.

Pour ces patients, sur les premiers tests réalisés en août et septembre 2020, un bruit de fond important est présent sur l'ensemble des puits. Ce bruit de fond est visible sur la plaque 2006080942a lue le 07/08/2020 (comprenant les tests des patients n° 2 et n°3) (Figure 83) ainsi que sur la plaque 2007081313a (comprenant les tests des patients n°4 et n°5) (Figure 84). Il se présente comme un tapis de spots d'intensité plus ou moins forte, créant une interférence avec l'identification des spots et leur décompte.

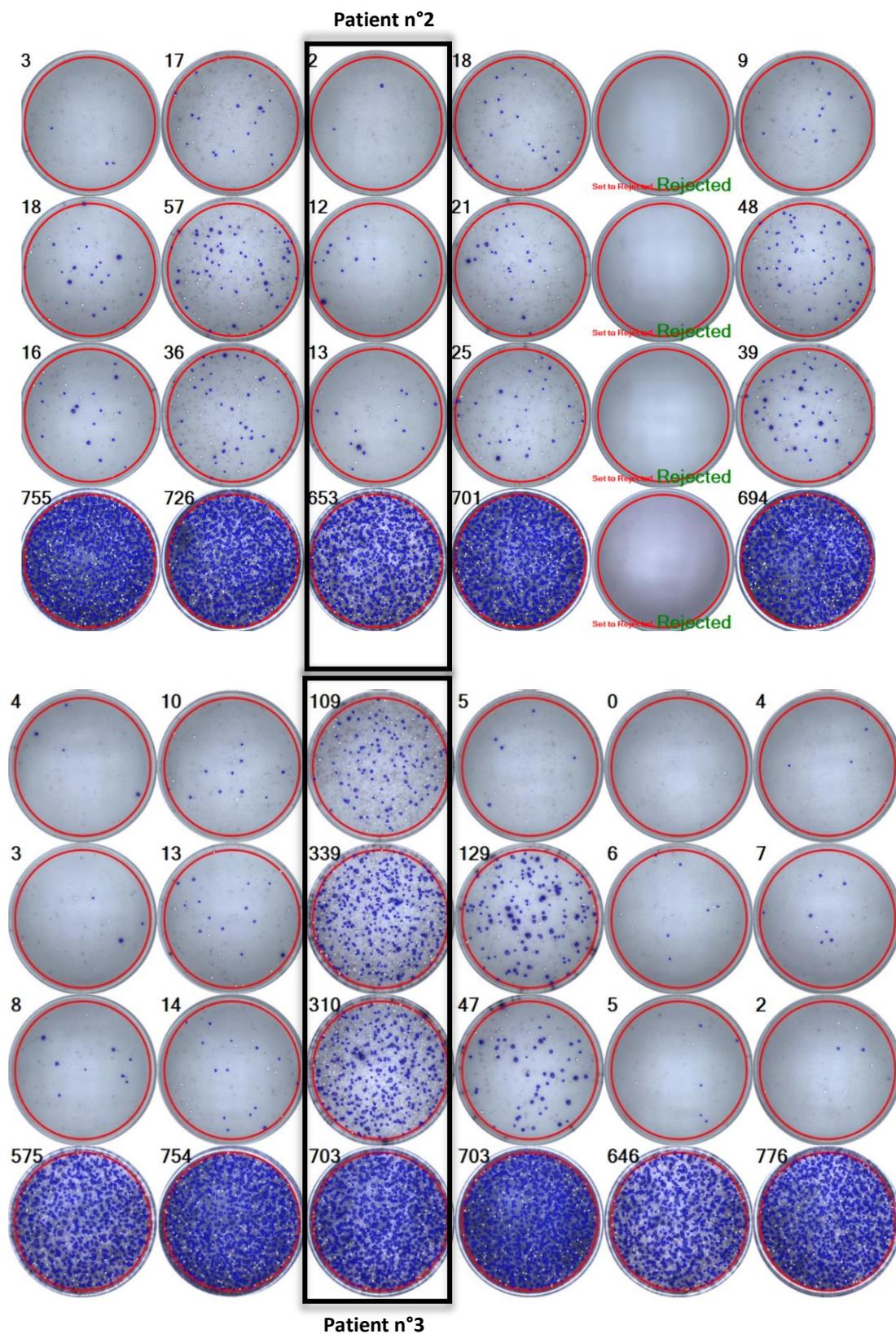


Figure 82 : Tests T-SPOT.TB® issus de la plaque 2006080942a lue le 07/08/2020, après validation analytique. Les spots décomptés par le lecteur CTL figurent en bleu et le nombre de spot figure en haut à gauche de chaque puits. Les spots non comptés mais considérés comme douteux sont en blanc.

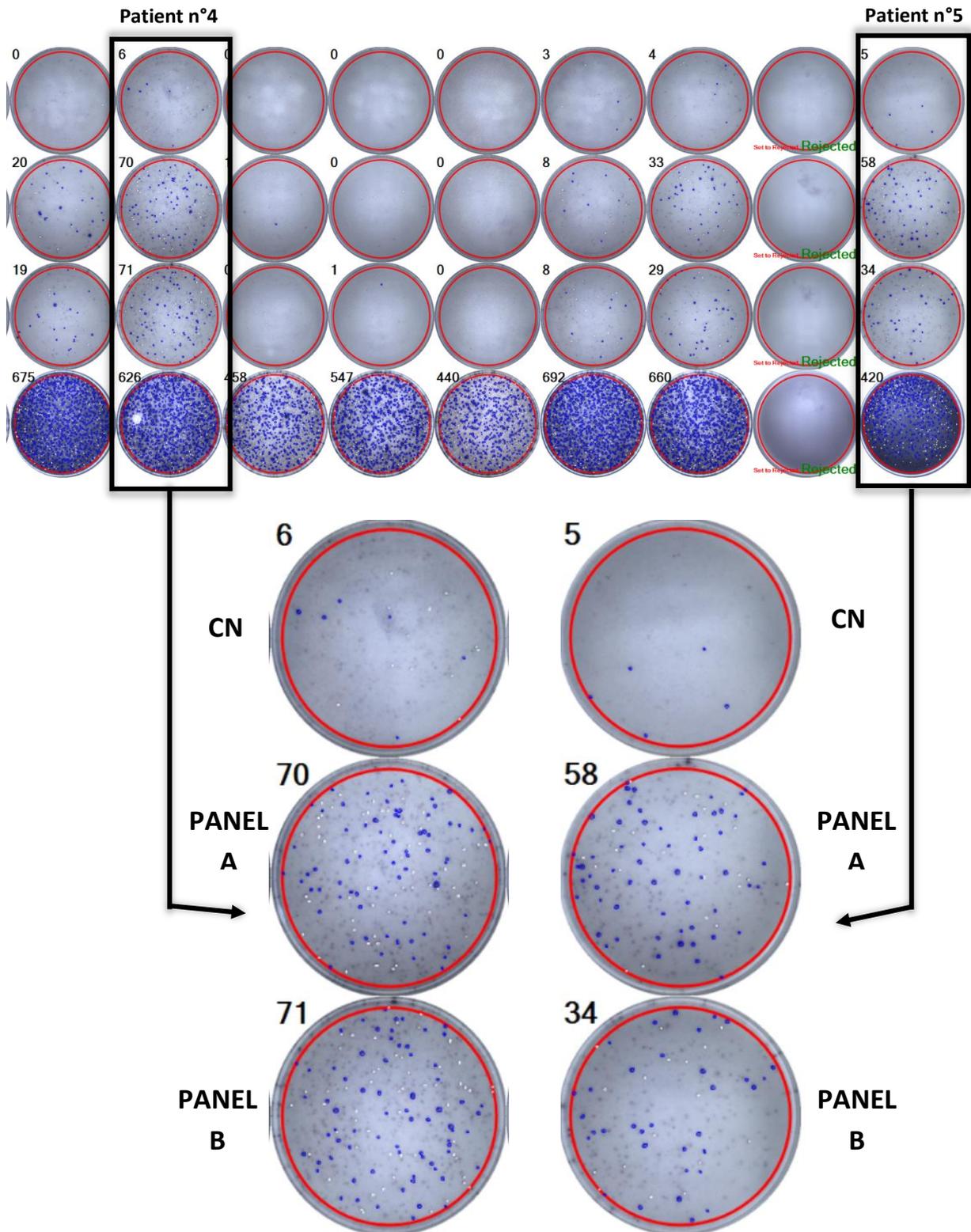


Figure 83 : Tests T-SPOT.TB® issus de la plaque 2007081313a lue le 11/08/2020, après validation analytique. Les spots décomptés par le lecteur CTL figurent en bleu et le nombre de spot figure en haut à gauche de chaque puits. Les spots non comptés mais considérés comme douteux sont en blanc. Partie inférieure : détail des puits CN, PANEL A et PANEL B pour les patients n°4 et n°5.

Un bruit de fond similaire est observé pour les autres patients dont les résultats des tests sont détaillés dans le Tableau 18. Le même problème a été rencontré pour des

tests réalisés sur des prélèvements issus du service de Médecine de travail du CH d'Arras, sur la même période au cours de l'été 2020. A l'inverse, très peu de prélèvement provenant des unités de soin du CHU de Lille (hors MT) ont été concernés.

3. Comparaison des résultats de tests IGRAs rendus sur un mois à un an d'intervalle : aperçu d'un avant/après.

Plus de 6 mois après le passage à l'automatisation du test T-SPOT.TB® à l'Institut d'Immunologie du CHU de Lille, les résultats des tests IGRAs réalisés sur la même période à un an d'intervalle ont été comparés. Les résultats des tests QTF-plus® réalisés entre le 14/09/2019 et le 09/10/2019 sont mis en parallèle des résultats des demandes de T-SPOT.TB® prises en charges entre le 14/09/2020 et le 09/10/2020 (Tableau 19).

Tableau 19 : Résultats des tests QFT®-Plus réalisés sur la période du 14/09/2019 au 09/10/2019 et des tests T-SPOT.TB® réalisés sur la période du 12/09/2020 au 07/10/2020 à l'Institut d'Immunologie du CHU de Lille. CN : contrôle négatif ; CP : contrôle positif.

Etat de la demande / Résultat du test IGRA	tests QFT®-Plus		tests T-SPOT.TB®	
	n	%	n	%
Non conforme	6	0,9	25	4,1
dont : - Tube non reçu au laboratoire	2		1	
- Défaut de remplissage	3		18	
- Excès de remplissage	1		0	
- Doublet	0		2	
- Type de tube non conforme	0		2	
- Prélèvement coagulé	0		1	
- Prélèvement arrivé hors délai	0		1	
Résultat négatif	556	84,8	454	74,7
Résultat positif	36	5,5	58	9,5
Résultats limites au seuil (zone grise)	33	5,0	31	5,1
- Résultat positif faible	17		/	
- Résultat négatif limite au seuil	16		/	
Résultat indéterminé	25	3,8	15	2,5
dont : - CN ininterprétable	9		15	
- CP ininterprétable	16		0	
Test non réalisé par insuffisance de CMN isolées	/	/	24	3,9
Demande annulée	0	0	1	0,2
total	656	100	608	100

Le volume de demandes traité par le laboratoire est similaire : 656 tests QTF-plus® contre 608 tests T-SPOT.TB®. Le pourcentage de demandes non conformes est plus

important pour les tests T-SPOT.TB® et représente 4.1% des demandes (n=25) ; la majorité correspond à des prélèvements contenant un volume de sang insuffisant, confirmant la tendance remarquée les premières semaines après l'automatisation des tests ELISpot à l'Institut d'Immunologie (cf. Résultats B. Phase pré-analytique). La proportion des résultats négatifs, positifs et limites au seuil sont plutôt similaires entre les deux techniques ; en particulier, le nombre de tests avec un résultat d'interprétation difficile car situés dans la « zone grise » est quasiment identique sur ces deux périodes (33 tests en technique ELISA en 2019 contre 31 tests en ELISpot en 2020). Concernant les tests indéterminés, on observe que le contrôle positif est plus souvent mis en défaut pour les tests QTF-plus®. A l'inverse, l'intégralité des résultats indéterminés rendus pour les tests T-SPOT.TB® sont causés par un nombre de spots trop élevé au niveau du contrôle négatif. Enfin, près de 4% des tests T-SPOT.TB® réalisés entre mi-septembre et le 09/10/2020 n'ont pu être réalisés du fait d'un nombre de CMN isolées insuffisant à partir du prélèvement réceptionné. (n=24).

4. Comparaison des résultats des tests T-SPOT.TB® avant et après le passage à l'automatisation

Le Tableau 20 décrit les résultats des demandes T-SPOT.TB® prises en charge sur l'ensemble de l'année 2019, avant la mise en place de la plateforme ELISpot.

Tableau 20 : Résultats des tests T-SPOT.TB® réalisés en seconde intention sur l'ensemble de l'année 2019 à l'Institut d'Immunologie du CHU de Lille. CN : contrôle négatif ; CP : contrôle positif.

Résultat du test T-SPOT.TB®	n	%
Non conforme	14	25,9
dont : - Tube non reçu au laboratoire	2	
- Prélèvement arrivé hors délai	2	
- Absence de prise de rendez-vous par le service	4	
- Erreur d'enregistrement de la prescription	3	
- Analyse déjà réalisée (doublon)	1	
- Défaut de remplissage	1	
- Prélèvement coagulé	1	
Résultat négatif	29	53,7
Résultat positif	6	11,1
Résultat équivoque (zone grise)	2	3,7
Résultat indéterminé	2	3,7
dont : - CN du test non interprétable	1	
- CP du test non interprétable	1	
Demande annulée	1	1,9
Total	54	100

Un total de 54 demandes de tests T-SPOT.TB® a été traité au cours de l'année 2019 (hors tests internes au laboratoire en vue du passage à l'automatisation) : c'est 11 fois moins que le nombre de demandes prises en charge en un mois entre septembre et octobre 2020. Dans plus d'un quart des cas, aucun résultat n'a été rendu au prescripteur du fait d'une non-conformité pré-analytique (n=14). La répartition des résultats des tests réalisés est par ailleurs plutôt comparable à celle des résultats des tests T-SPOT.TB® après l'automatisation. Enfin, on n'observe pas de test non réalisé du fait d'un nombre de CMN isolées insuffisant.

Quatrième partie

Discussion

1. Le choix de la plateforme ELISpot pour le dépistage de l'ITL en routine

L'Institut d'Immunologie du CHU de Lille est hautement impliqué dans le dépistage de l'ITL. Environ 8000 tests IGRAs sont réalisés chaque année par le laboratoire d'immunologie cellulaire pour un large bassin de population, comprenant les patients pris en charge au CHU de Lille mais également au sein des CH et laboratoires privés des régions Hauts-de-France et Grand-Est. Après plusieurs années d'utilisation du test QFT®-Plus en première intention au laboratoire, un appel d'offre a été émis à la fin de l'année 2018. La société Qiagen ayant perdu récemment le monopole dans le domaine des immunodiagnosics de la tuberculose, la solution T-SPOT.TB® automatisée n'était alors pas la seule technique envisagée à l'époque. Deux autres options ont été étudiées :

- Le test **TB-Feron®** (TBF, SD Biosensor - Orgentec) : commercialisé depuis 2018, ce nouveau test IGRA utilise, comme les tests QuantiFERON avant lui, la technique ELISA pour la détection de l'IFN γ . La principale différence réside dans la structure des antigènes spécifiques de *M. tuberculosis* ; contrairement aux fragments peptidiques utilisés dans la trousse QFT®-Plus, le TBF emploie des protéines recombinantes entières d'ESAT-6, CFP-10 et TB7.7 stimulant l'ensemble des lymphocytes T (206). Le test se compose de trois tubes (Nil, Antigen, Mitogen) dans lesquels sont prélevés puis incubés 1 mL de sang. Les étapes pré-analytiques sont similaires à celles déjà mises en place pour le test QFT®-Plus.

Une étude visant à comparer les trousse TB-Feron® et QFT®-Plus sur 64 patients suivis au CHU de Lille a été menée à l'Institut d'Immunologie en avril 2018. L'IFN γ produit par les cellules T en réponse à la stimulation antigénique a été dosé sur l'automate GEMINI (Diatron), avec un seuil de positivité à 0,35 UI/mL. Ce travail a permis de conclure à une concordance satisfaisante dans l'interprétation qualitative des dosages (Test de McNemar, $p=1$), ainsi qu'à une

excellente corrélation des résultats du TBF avec ceux des tubes TB1 et TB2 du test QFT®-Plus ($r = 0.9607$ ($p < 0.001$) et $r = 0.9638$ ($p < 0.001$) respectivement). La reproductibilité, évaluée dans 2 séries indépendantes avec le même lot de réactifs pour le même échantillon, était également très bonne ($r = 0.9974$, ($p < 0.001$) ($n = 12$)) (207). Une comparaison sur 29 patients a montré qu'un stockage à température ambiante des tubes TBF avant analyse est possible. Ces résultats concordent avec les données récentes de la littérature, montrant des performances similaires pour la détection de l'ITL chez les professionnels de santé (206) et les patients concernés par des soins tertiaires (208) Enfin, une criticité similaire a été constatée quant aux sources de variabilité pré-analytiques pour les deux tests.

- Le test **DiaSorin LIAISON® QuantiFERON-TB Gold Plus** : version améliorée du test QFT®-Plus de Qiagen, développée dans le cadre d'un partenariat avec la société DiaSorin. Cette solution combine la technologie de chimiluminescence utilisée par l'automate LIAISON XL pour la détection de l'IFN γ au kit de quatre tubes QuantiFERON commercialisé par Qiagen. Contrairement au DS2, le format du LIAISON XL permet entre autres l'intégration des kits réactifs dans l'automate ; l'intérêt avancé par Qiagen étant de réduire le temps technique ainsi que le délai d'obtention des résultats (premier résultat obtenu au bout de 46 minutes, analyse de 25 échantillons par heure) (209). En outre, cette option aurait permis de ne pas changer les habitudes des prescripteurs en conservant le recours aux tubes QuantiFERON. Des essais comparant le DiaSorin LIAISON® QuantiFERON-TB Gold Plus avec le QFT®-Plus ont également pu être réalisés à l'Institut d'Immunologie, grâce à une mise à disposition du LIAISON XL ; ils ont révélé une bonne corrélation entre les deux méthodes de dosage de l'IFN γ ($r^2 = 0,9112$, évaluation sur 40 échantillons de patients).

L'appel d'offre a finalement été remporté par la solution d'automatisation du test T-SPOT.TB® proposée par Oxford Immunotec. La technologie apportée par le préparateur d'échantillons Microlab® Nimbus & Presto confère en effet plusieurs avantages dans le processus d'un test IGRA, intéressants pour le laboratoire et son

organisation. Les arguments ayant conduit à l'adoption de cette solution complète d'extraction automatisée sont notamment :

- **La simplification des étapes pré-analytiques.** La stabilité des échantillons à température ambiante jusqu'à 54h après le prélèvement permise par l'utilisation du kit T-Cell *Select*[™] est un apport particulièrement adapté pour les prélèvements parvenant des sites les plus éloignés du laboratoire. Comme vu au cours de ce travail, dans le processus de prise en charge des tests QFT[®]-Plus, plusieurs étapes devaient être impérativement réalisées par les sites extérieurs pour garantir l'intégrité de la phase pré-analytique : l'incubation de 16h à 24h, la centrifugation puis le maintien de l'échantillon entre 2 et 8°C, y compris durant son transport. Notre revue de la littérature a souligné la criticité de ces étapes comme sources de variabilités pré-analytiques (185–187). Le prélèvement d'un seul échantillon de sang acheminé à température ambiante devrait théoriquement permettre un meilleur contrôle de la phase pré-analytique de l'analyse, de s'affranchir en partie des sources de variabilité et ainsi garantir un résultat plus fiable pour le patient, indépendamment de la provenance de l'échantillon.
- **L'optimisation de la phase analytique.** La préparation des échantillons, l'isolement des CMN, la préparation de la plaque de comptage, la normalisation de la concentration des cellules et la préparation de la plaque de tests : faire en sorte que toutes ces étapes aient lieu dans une même pièce dédiée aux tests IGRAs au sein du laboratoire, participe à une meilleure ergonomie pour l'équipe technique et vise à réduire le temps de manipulation. En outre, on peut imaginer que l'automatisation d'un maximum d'étapes du processus analytique pourrait minimiser les sources de variabilité observées avec le test QFT[®]-Plus ou le test T-SPOT.TB[®] dans sa version « manuelle ».
- **La présence à l'Institut d'Immunologie d'une technologie innovante telle que la plateforme ELISpot.** Au-delà du diagnostic de l'ITL, on peut imaginer que l'automatisation du processus d'isolement des CMN et la capacité de détecter une réponse cytokinique spécifique en ELISpot pour de grandes séries de patients pourra avoir de multiples applications au sein du laboratoire, tant en recherche qu'en pratique clinique. Un an après son installation, elle aura déjà été mise à profit dans des travaux de recherche sur l'immunité cellulaire induite

par le virus SARS-CoV-2. Des perspectives s'ouvrent également sur l'immunomonitoring de l'infection à CMV dans les greffes d'organes solides et de cellules souches hématopoïétiques ; dans ces contextes, l'utilisation systématisée de l'ELISpot permettrait d'aboutir à une décision thérapeutique personnalisée et adaptée au statut immunitaire de chaque patient greffé vis-à-vis du CMV. Un projet de recherche clinique à ce sujet est actuellement en cours au CHU de Rouen.

2. Concernant l'analyse descriptive des tests IGRAs réalisés les semaines suivant le changement de méthode

Le défi représenté par le passage de l'ELISA à l'ELISpot en technique IGRA de première intention a été relevé avec succès par l'Institut d'Immunologie. Avant février 2020, environ une cinquantaine de tests T-SPOT.TB® était réalisés par an dans le cadre du dépistage de l'ITL ; au cours des trois premiers mois suivants l'installation de la plateforme ELISpot au laboratoire, ce sont 962 demandes qui ont été prises en charge par l'équipe du laboratoire d'immunologie cellulaire (Tableau 5). La crise sanitaire liée à la Covid-19 n'a pas été sans répercussion sur l'organisation du laboratoire ; la nette diminution du flux d'échantillons à traiter entre la semaine 11 et la semaine 12 (Figure 52), en lien avec l'instauration du confinement sur le territoire français, a permis à l'équipe technique de se familiariser progressivement avec le fonctionnement de la plateforme ELISpot, de s'approprier les procédures et de pouvoir gérer au jour le jour le nombre conséquent, durant cette période, d'échantillons concernés par une non-conformité pré-analytique.

Les informations concernant la provenance des échantillons et l'unité de soin prescriptrice, l'âge et le sexe des patients prélevés, le temps d'acheminement des prélèvements, les résultats des tests et les non-conformités saisies sont tracés dans le logiciel MOLIS et sont aisément disponibles et exploitables. A contrario, le motif de prescription est une donnée difficile à étudier ; l'indication du test devrait être théoriquement renseignée lorsqu'elle entre dans les critères de remboursement par l'assurance maladie (journal officiel du 22 juin 2017 (210)) :

- Enfants migrants de moins de 15 ans provenant d'une zone de forte endémie tuberculeuse ;
- Patients infectés par le VIH (dépistage systématique intégré au bilan initial) ;

- Avant la mise en route d'un traitement par anti-TNF ;
- Dans un contexte de prise en charge pluridisciplinaire, aide au diagnostic de tuberculose paucibacillaire en cas de diagnostic difficile chez l'enfant ou de tuberculose extrapulmonaire.

Pour les tests prescrits hors de ces indications mais médicalement justifiés, comme le dépistage des professionnels exposés à l'embauche ou l'enquête autour d'un cas index, le mode de remboursement « hors nomenclature » devrait être sélectionné par le prescripteur. En pratique, les indications des tests sont plutôt bien documentées pour les services du CHU de Lille, qui renseignent le motif de prescription pour la tarification au moment de l'acte de prescription connectée. Cela est beaucoup plus flou pour les sites extérieurs. La fiche de tarification des tests IGRAs est retournée dans une minorité de cas ; lorsque l'information est présente, sa saisie dans MOLIS, réalisée au niveau des AE, est occasionnellement oubliée ou erronée. Bien que l'indication puisse être déduite du service prescripteur dans certains cas (par exemple, dépistage à l'embauche pour les bilans provenant des services hospitaliers de médecine du travail, ou avant mise en route d'un traitement par anti-TNF chez les patients hospitalisés en gastro-entérologie), cela reste imprécis et fastidieux à étudier. Il serait néanmoins intéressant d'avoir une vision objective des contextes dans lesquels le laboratoire mène le dépistage de l'ITL, et si les modalités de remboursement des tests sont réellement appropriées.

La MT, incluse dans le pôle « Santé publique, pharmacie et pharmacologie », est le premier prescripteur de tests IGRAs du CHU de Lille (Figure 53), en lien avec le dépistage des agents du CHU à l'embauche. A l'inverse de ce qui est observé pour les autres pôles du CHU, pour lesquels L'ELISpot est la technique réalisée en grande majorité, le Tableau 7 souligne une répartition assez équilibrée des tests T-SPOT.TB® et QFT®-Plus réalisés les semaines suivantes le 17/02/2020. Cela peut s'expliquer par l'arrivée tardive de la navette acheminant les prélèvements de la MT le vendredi soir, occasionnant leur transfert en tubes QuantiFERON le samedi matin (cf. paragraphes suivants).

On constate que la transition vers le test T-SPOT.TB® a été un peu plus longue à se mettre en place pour les sites extérieurs, avec une majorité d'échantillons traités en technique ELISA sur les semaines suivant l'installation de la plateforme. Dans un souci

d'économie, ces sites ont probablement souhaité écouler leur stock de tubes QuantiFERON avant de passer aux tubes héparinés.

Plus d'un an après le changement de méthode, que ce soit pour le CHU ou les sites extérieurs, le test QFT®-Plus est réalisé uniquement pour les prélèvements parvenant au laboratoire le vendredi soir, pendant le week-end et les jours fériés, représentant une faible minorité des résultats de tests IGRAs rendus.

3. Concernant la phase pré-analytique

L'Institut d'Immunologie a débuté sa communication sur le changement de méthode pour les tests IGRAs début février 2020, soit deux semaines avant le passage effectif à l'ELISpot en première intention (Figure 60). Ce délai, pouvant paraître assez bref, a été impacté par le retard de la validation analytique de la plateforme ELISpot ; les actions de communication ainsi que les diverses rencontres avec le magasin du CBP et les cadres du RTE/AE ne pouvaient avoir lieu qu'avec l'assurance d'une plateforme opérationnelle et avec une date de lancement clairement définie. En outre, l'objectif était d'avertir le prescripteur ni trop tôt, ni trop tard, afin de ne pas créer de confusion et assurer une bonne transition entre les deux techniques.

Le document « flash info » émis par le laboratoire le 07/02/2020 (Annexe 5) insistait sur la simplification des étapes pré-analytiques, soulignant l'avantage apporté par le changement de méthode pour les unités de soins ; à savoir, le prélèvement d'un seul échantillon de sang au lieu des quatre tubes QuantiFERON utilisés jusqu'à présent. Le remplacement du test QFT®-Plus par le test T-SPOT.TB® a été majoritairement bien accueilli par les prescripteurs. Toutefois, l'Institut d'Immunologie a perdu la sous-traitance de certains sites extérieurs qui souhaitaient conserver l'ELISA. C'est le cas du CH de Valenciennes, dont le laboratoire avait pour projet de mettre en place la réalisation des tests QFT®-Plus dans ses locaux; dans cette perspective, ils n'ont pas jugé pertinent de changer de technique.

Les unités de soin étaient globalement bien pourvues en tube héparine de Li. 7 mL au 17/02/2020; en revanche, le laboratoire a dû faire face à un nombre très important de prélèvements non-conformes le premier mois d'utilisation de la plateforme. Ils représentaient entre 20 et 30% des demandes (Figure 62), soit 5 à 10 fois plus que ce que l'on observe actuellement au laboratoire. Les services de médecine interne et de pédiatrie sont les unités du CHU qui totalisent le plus d'envoi d'échantillons non

conformes (Figure 63) ; la première cause de non-conformité pré-analytique est un remplissage insuffisant des tubes (Figure 64). Cela peut s'expliquer par la population de patients pris en charge dans ces secteurs. Les patients suivis en médecine interne et immunologie clinique présentent fréquemment des atteintes vasculaires et cutanées (sclérodermies...), rendant les prélèvements difficiles. De surcroît, le bilan sanguin de ces patients comprend généralement un grand nombre d'analyses ; le grand tube hépariné pour le test T-SPOT.TB® est prélevé plutôt à la fin (après les tubes citratés et secs), conformément à l'ordre à respecter pour le prélèvement successif de plusieurs échantillons. On comprend que le débit sanguin peut être alors moins important ou que l'aiguille de ponction puisse plus volontiers se déplacer, occasionnant un défaut de remplissage du tube. On peut également concevoir qu'un prélèvement de 6 mL de sang soit difficilement réalisable chez les jeunes enfants, voire impossible chez le nourrisson ; en outre, l'utilisation de grands tubes comme ceux requis pour le test T-SPOT.TB® ne correspond pas aux habitudes des soignants en pédiatrie. Les prélèvements en quantité insuffisante sont toutefois moins problématiques pour l'isolement des CMN chez l'enfant et le nourrisson, qui présentent un taux de lymphocytes physiologiquement plus élevé que l'adulte (entre 1500 et 9500/mm³ entre 2 et 6 ans par exemple, contre 1500 et 4000/mm³ chez l'adulte).

Deux actions principales ont permis de réduire progressivement le nombre de demandes non conformes au fil des semaines (Tableau 8) :

- **La prise en charge des échantillons contenant jusqu'à 3 mL de sang, rendu possible par l'ajout de RPMI pour atteindre un volume de 4 mL.** La première semaine d'utilisation de la plateforme, devant la quantité de tubes contenant un volume de sang inférieur aux 6 mL préconisés par Oxford Immunotec, des tests ont été réalisés et ont révélé que 4 mL de sang (comprenant le volume utilisé par l'automate et le volume mort) sont suffisant pour le fonctionnement du Nimbus-Presto et n'impactent pas les résultats en ELISpot. L'ajout de RPMI pour un échantillon donné est tracé systématiquement sur la liste de travail, permettant sa prise en compte lors de la validation biologique de la série.
- **Le suivi des non-conformités pré-analytiques et l'intervention au jour le jour auprès des services par appel téléphonique.** Ce travail a fait partie intégrante de la communication auprès des unités de soins sur cette période de

transition du changement de méthode. Les appels ont été réalisés pour chaque prélèvement contenant moins de 4 mL de sang, même si le tube aura finalement été pris en charge avec une dilution par RPMI. On a pu constater au décours de ces échanges que les IDE n'ont pas toujours été aussi bien informés sur le changement de méthode par comparaison aux médecins prescripteurs ; or, les IDE prélèvent les patients et jouent un rôle crucial dans la phase pré-analytique du test.

Afin de sensibiliser le personnel préleveur au remplissage correct des tubes, un projet d'intervention dans les services a été étudié vers le début du mois de mars 2020. Malheureusement, cette initiative n'a pu être mise en œuvre du fait de la crise sanitaire.

Malgré les recommandations indiquées aux prescripteurs sur la page « tests IGRAs » du catalogue des analyses du CBP, un nombre non négligeable de prélèvements parviennent au laboratoire le vendredi après 16h, le week-end et les jours fériés ; 161 tests sont concernés du 17/02/2020 au 31/05/2020, dont 90% sortiraient du délai pré-analytique s'ils restaient au RTE/AE jusqu'à leur prise en charge en heures ouvrées le lundi matin (Figure 65). Avant le lancement de l'ELISpot en routine, l'idée de procéder à des non-conformités systématiques pour ces prélèvements a été évoquée, en vue de faciliter l'organisation du laboratoire. Néanmoins, cette option a rapidement été écartée ; il a paru difficilement acceptable et dommageable pour les patients qu'un laboratoire de référence comme l'Institut d'Immunologie du CHU de Lille soit contraint de refuser les prélèvements pour le dépistage de l'ITL en période de week-end. Comme aperçu précédemment avec les données du Tableau 7, le service de MT regroupe une grande partie des prélèvements T-SPOT.TB® réceptionnés au laboratoire le vendredi soir. Cela est lié à l'organisation de ce service, considéré comme extérieur au CHU pour la gestion des prélèvements ; les échantillons ne sont pas acheminés par le TAL mais par l'intermédiaire d'une navette faisant des trajets à horaires fixes. Ainsi, les prélèvements effectués lors des consultations de MT de l'après-midi arrivent aux AE avec la navette de 17h-17h15, après les heures ouvrées. Un an plus tard, les tests T-SPOT.TB® sont toujours pris en charge les samedi et dimanche matins et jours fériés par les internes du laboratoire pour leur transfert en tubes QuantiFERON, amenant à la réalisation d'une série de tests QFT®-Plus chaque semaine. Actuellement, la technique ELISA demeure une alternative de seconde intention intéressante à conserver pour le laboratoire d'immunologie cellulaire.

4. Concernant la phase analytique

L'installation et la validation de la plateforme ELISpot à l'Institut d'Immunologie n'auront pas été sans obstacles. Comme retracé en Figure 69, le lancement du test T-SPOT.TB® automatisé était initialement prévu pour le 13/01/2020 ; il aura finalement lieu un mois plus tard. Si l'installation des automates au sein des locaux ainsi que leur validation individuelle n'a pas posé de difficultés, c'est la validation du processus analytique complet pour deux plaques (protocole 24 + 8 échantillons) qui a été mis en défaut. Un mois aura été nécessaire aux ingénieurs d'Oxford Immunotec présents sur place pour identifier le problème (le décalage du centre de gravité de l'appareil) et reparamétrer le Nimbus-Presto en conséquence. Cette anomalie trouve probablement son origine au cours du transport du Nimbus-Presto, géré par Oxford Immunotec, d'Angleterre jusqu'à Lille, bien que cela soit difficilement démontrable. L'automate avait été qualifié sur le site d'Oxford Immunotec à Abingdon, et aucun dysfonctionnement n'a été mentionné, notamment avec le processus pour deux plaques.

Du fait de la difficulté d'obtenir des échantillons positifs en lien avec la faible prévalence de l'infection tuberculeuse dans la population générale, la validation du processus analytique complet a été réalisée vis-à-vis du cytomégalovirus (CMV) et en utilisant les réactifs appropriés à sa détection. Le but étant la validation du fonctionnement de la plateforme, l'utilisation d'un germe différent de *M. tuberculosis* ne posait pas de problème d'un point de vue méthodologique. Les résultats concernant les performances analytiques de la plateforme ELISpot sont issus d'un rapport fourni par Oxford Immunotec, élaboré au décours de la validation des automates et du processus analytique global en décembre 2019 et janvier 2020 (Figures 71 à 75, Tableaux 12 à 14). Ce rapport est un résumé ; le laboratoire dispose également d'un document contenant, entre autres, les différents critères d'acceptabilité ainsi que les données brutes issues de la validation individuelle de chaque automate.

Une fois la plateforme installée et validée, l'équipe du laboratoire d'immunologie cellulaire a pu bénéficier d'une session de formation organisée par Oxford Immunotec les 11 et 12 février 2020. Cette formation a manqué de pertinence à plusieurs égards. Le contenu de la présentation réalisée le premier jour s'assimilait malheureusement davantage à du marketing (par exemple, présentation de matériel non adapté avec

l'équipement installé au laboratoire). Les formateurs étaient anglophones ; bien qu'une traduction ait été assurée au cours des ateliers pratiques, la barrière de la langue était bien présente et rendait laborieuse la compréhension des termes techniques. A contrario, la formation à la lecture des spots sur le tutoriel T-SPOT.Tutor a été appréciée par l'équipe et constituait une bonne base d'entraînement à l'interprétation du test. Cet outil n'a pas pu être mis à disposition du laboratoire ; il pourrait cependant s'avérer utile pour la formation initiale du personnel (exemple des nouveaux internes) ou le maintien d'habilitation. D'après de récents échanges avec Oxford Immunotec, un nouveau logiciel dédié à la lecture des tests T-SPOT.TB[®] serait en cours d'élaboration et pourrait prochainement être disponible pour le laboratoire.

A l'installation de la plateforme en février 2020, le laboratoire d'immunologie cellulaire ne disposait pas de solution « back-up » automatisée pour la prise en charge des prélèvements T-SPOT.TB[®] en cas de problème technique sur la plateforme ELISpot, cette option n'ayant pas été prévue par le fournisseur. Compte tenu de la quantité d'échantillons gérés par le laboratoire chaque semaine, le recours à un isolement manuel des CMN par les techniciennes en cas de panne du Nimbus-Presto n'a pas paru une solution envisageable ; l'ancienne technique ELISA constituait alors temporairement l'unique technique de recours pour prendre en charge de grandes séries de tests. La société Oxford Immunotec a été sollicitée à ce sujet début mars 2020 ; un premier protocole « back-up », consistant en un programme de rattrapage en cas de panne du Nimbus-Presto, a pu être rapidement installé. Une deuxième programmation devait suivre le 16 mars 2020 ; cette date coïncidant avec le début du confinement sur le territoire français, les protocoles de rattrapage complémentaires ont finalement été installés deux mois plus tard, en mai et début juin 2020. Il faudra attendre le 15 juin 2020 pour que le laboratoire dispose d'une solution « back-up » adaptée à son activité, avec l'installation d'un KingFisher supplémentaire permettant un isolement automatisé des CMN en cas de panne du Nimbus-Presto, et la fin du mois de juillet 2020 pour que l'équipe technique soit pleinement formée à son utilisation. Ce retard n'a pas été sans conséquences ; par défaut de formation de l'équipe technique sur l'utilisation des programmes « back-up », une série de tests a été perdue à l'occasion d'une panne du Nimbus-Presto courant juillet. Les techniciennes ont aussi rapporté des difficultés quant au maniement des programmes de rattrapages installés par Oxford Immunotec (interface en anglais, nombreuses

abréviations...); à l'avenir, il serait intéressant pour le laboratoire d'élaborer un workflow et une procédure indiquant les programmes à utiliser spécifiquement pour un problème donné.

La principale problématique rencontrée lors de la phase analytique du test T-SPOT.TB® dans sa version automatisée est le faible rendement de l'isolement des CMN par le Nimbus-Presto. Ce souci a été très rapidement constaté par l'équipe, et a pu être objectivé par le travail de recueil de données réalisé dès les prémices de l'utilisation de l'automate par J. TRAUET, ingénieur du laboratoire d'immunologie cellulaire (Figure 77, Tableau 15); le rendement calculé sur 134 échantillons était de 27,5 % ($\pm 10,4\%$). Ce problème reste constant dans le temps, et concerne entre 5 et 10% des prélèvements traités par le Nimbus-Presto selon les mois entre février 2020 et janvier 2021 (Figure 78). Le pourcentage exceptionnellement haut de 23% obtenu en juillet 2020 est en réalité surestimé par des résultats rendus non-conformes du fait d'une panne sur le Nimbus-Presto (cf. paragraphes précédents); les tests de cette série ont été décomptés avec les tests non réalisés par défaut d'isolement de CMN. In fine, il en découle qu'un résultat de test IGRA peut être rendu, hors non-conformité pré-analytique majeure, pour 90 à 95% des patients à l'aide de la plateforme ELISpot. La problématique du rendement du Nimbus-Presto, appuyée par les données chiffrées présentées dans ce travail, a été exposée à Oxford Immunotec le 18 mars 2020. Dans sa réponse, la société avançait que le faible rendement de l'automate pourrait être à rapprocher de l'utilisation courante d'un volume de sang inférieur à ce qui est recommandé pour son fonctionnement optimal (cas des tubes de sang rempli à 4 mL passés sans ajout de RPMI, contre les 6 mL préconisés) (Tableau 8). Elle soulignait également que le rendu d'un résultat pour plus de 90% des patients prélevés avec une technique automatisée semblait très correct. Ce dernier point est discutable; contrairement au site Oxford Immunotec d'Abingdon qui draine plus de 95% des demandes de tests IGRAs pour l'ensemble du Royaume-Uni, l'Institut d'immunologie du CHU de Lille a un nombre de clients plus limité. De plus, il a pu être constaté au fil des mois que les difficultés d'isolement des CMN concernent fréquemment les mêmes patients, malgré un respect des critères pré-analytiques et une numération lymphocytaire normale. Même si ce problème concerne quelques patients seulement, il est très ennuyeux de ne pas parvenir à rendre de résultats; cela entrave la prise en charge correcte des patients d'une part et génère une insatisfaction du prescripteur

vis-à-vis du laboratoire d'autre part. Dans ces cas, comme pour les patients très lymphopéniques, il est proposé au prescripteur de réaliser un nouveau prélèvement comprenant trois tubes héparinés de 6 mL et de prendre rendez-vous avec le laboratoire afin de pouvoir réaliser une extraction manuelle des CMN et d'assurer potentiellement un meilleur rendement de l'extraction. Dans les faits, les unités de soins respectent bien la consigne de prélever trois échantillons mais ne contactent que très rarement le laboratoire pour la prise de rendez-vous. La gestion de ces prélèvements demande un temps technique supplémentaire non anticipé et parfois compliqué à intégrer aux tâches des techniciennes. Afin d'alléger ces contraintes, une piste pourrait être l'automatisation des étapes de préparation des échantillons pour qu'il ne reste que l'isolement des CMN à réaliser manuellement.

Pour ces patients présentant des numérations lymphocytaire et monocytaire normales et pour lesquels on ne parvient pas à isoler assez de cellules à plusieurs reprises, on peut se poser la question de l'existence d'un effet de matrice du sang, interférant avec une ou plusieurs étapes de la sélection positive des CMN par le module Presto. Aucune donnée n'a été rapportée par Oxford Immunotec à ce sujet. La réalisation d'une étude multivariée évaluant plusieurs paramètres pouvant impacter la phase analytique (par exemple, la liaison des billes et des anticorps...) pourrait être intéressante à mettre en œuvre au laboratoire.

Une des stratégies mises en œuvre pour pallier à la problématique du rendement insuffisant du Nimbus-Presto est la surestimation de la numération des CMN rendue par le Guava pour les échantillons contenant plus de $1,7 \times 10^6$ cellules/mL. Des tests ont été réalisés ultérieurement au laboratoire, et ont permis d'abaisser ce seuil à $1,5 \times 10^6$ cellules/mL. Ce procédé, loin d'être majoritairement utilisé, permet de « sauver » quelques prélèvements pour lesquels aucun résultat n'aurait pu être rendu sans cela ; il demeure cependant en inadéquation avec la validation analytique réalisée par Oxford Immunotec à l'installation de la plateforme. Sa validation de méthode est actuellement en cours afin de pouvoir l'intégrer officiellement aux procédures internes de qualité du laboratoire d'immunologie cellulaire. Il faut insister sur l'importance d'identifier les prélèvements concernés par cette manipulation dans une série de tests, et de tracer systématiquement la numération de CMN initiale avant passage à 2×10^6 cellules/mL sur la feuille de travail. Ces exigences sont indispensables à la validation biologique, particulièrement pour l'interprétation des contrôles négatif et positif.

Au cours des derniers mois, des discordances ont parfois été constatées pour certains patients, dont les cellules ne répondaient pas suffisamment à la stimulation antigénique (résultat indéterminé) malgré une numération cellulaire obtenue nettement supérieure à 2×10^6 cellules/mL. Ce décalage semble s'expliquer par la composition du réactif ViaCount utilisé pour le marquage des cellules pour leur numération sur le cytomètre Guava ; le ViaCount utilise un marqueur de viabilité de l'ADN (en plus du marqueur Iodure de propidium (IP)), qui marque toutes les cellules nucléées perméabilisées. Ainsi, ce réactif ne permet pas de faire de distinction entre les cellules CD45+, les monocytes, les granuleux résiduels et les débris cellulaires. Dans certains cas, des PNN ayant été isolés avec les CMN sont donc comptés par le cytomètre, aboutissant à une surestimation de la numération. Il semble laborieux d'identifier directement les PNN et débris cellulaires indésirables directement sur le Guava, la présence de billes sur les cellules isolées interférant fortement avec le gating taille-structure. Un marquage CD45+ CD3+ CD4+ CD8+ systématique des échantillons pour quantifier les cellules T en amont de la phase de révélation demanderait de revoir une grande partie du process de la plateforme et un re-paramétrage du logiciel MAPP ; ce n'est pas envisageable à l'heure actuelle, d'autant plus que de telles discordances restent tout à fait minoritaires parmi le volume de tests réalisés au laboratoire. Il serait toutefois intéressant, lorsque de tels cas se présentent, de procéder à un immunophénotypage lymphocytaire sur les CMN restantes dans la plaque « receiver » afin de voir si le nombre de spots est en rapport avec le nombre de cellules T réellement isolées par le Nimbus-Presto.

5. Concernant la phase post-analytique

Avant l'installation de la plateforme ELISpot à l'Institut d'Immunologie, la lecture des barettes de tests T-SPOT.TB® était réalisée à l'aide du lecteur CTL Immunoscan, conjointement à l'utilisation du logiciel TB SCAN pour leur validation (Figures 48 et 49). Du ressenti de l'équipe qui travaillait avec ce matériel à l'époque, l'interprétation était assez subjective et nécessitait fréquemment quelques ajustements des paramètres de détection des spots de la part de l'opérateur. De ce fait, une appréhension existait initialement quant à l'automatisation cette étape cruciale dans la réalisation du test T-SPOT.TB®, et à la bonne intégration du lecteur ELISpot CTL au sein de la plateforme gérée par le MAPP, bien que la précision avec laquelle les spots sont identifiés par l'appareil ainsi que la reproductibilité interlaboratoire des résultats

aient d'ailleurs été bien démontrées dans la littérature (211). Les principaux critères définissant un véritable spot lié à une production spécifique d'IFN γ par une cellule T ont été paramétrés par le fournisseur : il s'agit de la forme, la couleur, l'intensité ou encore l'homogénéité du spot (212). A partir de ces données, un algorithme (dont la formule nous est inconnue) réalise un calcul de probabilité sur chaque élément analysé, permettant leur identification. Avec plus d'un an de recul sur son utilisation, force est de constater que le lecteur ELISpot CTL reader apporte un réel bénéfice en terme d'aide à l'interprétation et de reproductibilité.

Le Tableau 19 réalise un comparatif entre les tests IGRAs réalisés sur une même période à un an d'intervalle, par technique ELISA en 2019, et grâce à la plateforme ELISpot en 2020. Il en ressort une proportion de résultats indéterminés assez similaire pour les deux techniques, même un peu plus faible pour l'ELISpot (3,8% contre 2,5% respectivement) ; il est intéressant de constater que c'est à chaque fois le contrôle négatif qui a été mis en défaut pour les 15 tests T-SPOT.TB $^{\text{®}}$ rendus indéterminés, ce qui n'est pas observé pour les tests QTF-plus $^{\text{®}}$. Bien que ces données se limitent à une période assez restreinte dans le temps, on peut s'interroger sur la pertinence du seuil minimum de 20 spots défini pour l'interprétation du contrôle positif (CP) du test T-SPOT.TB $^{\text{®}}$. La PHA exerce une stimulation puissante et non spécifique des lymphocytes T, indépendante de la présentation par le CMH, et de ce fait peu comparable à la situation des cellules stimulées par ESAT-6 et CFP-10 dans les puits « Panel A » et « Panel B ». L'avantage est de pouvoir rendre un résultat de test IGRA chez les patients même sévèrement immunodéprimés ; mais la présence de 25 ou 30 spots au niveau du CP permet-elle vraiment de conclure à une bonne fonctionnalité des CMN isolées et à la garantie d'un résultat interprétable, alors que l'immense majorité des tests réalisés au laboratoire présentent un CP comportant plusieurs centaines de spots ? Du côté d'Oxford Immunotec, la révision des seuils pour les contrôles du test T-SPOT.TB $^{\text{®}}$ ne semble pas à l'étude.

Concernant la problématique du bruit de fond interférant avec l'interprétation des tests T-SPOT.TB $^{\text{®}}$ prélevés par la médecine du travail au cours de l'été 2020 (Figures 81 à 84, Tableau 18), différentes hypothèses ont été émises :

- 1. Utilisation d'un lot de réactif défectueux sur cette période ?** Plusieurs arguments sont en défaveur de cette hypothèse :

- ➔ Le kit réactif T-SPOT.TB® TEC0341903 utilisé du 30/07/2020 au 11/09/2020 a été conservé entre +2 et +8°C et a été utilisé conformément aux procédures du laboratoire et aux recommandations du fournisseur.
- ➔ Seuls certains tests provenant d'un nombre limité de services sont concernés. On peut imaginer qu'un défaut du kit réactif impacterait une nette majorité sinon l'intégralité des tests réalisés sur cette période, sans distinction sur la provenance des échantillons ;
- ➔ Deux vérifications pour la MT du CHU de Lille ont été faites sur la période d'utilisation de ce lot de réactif : pour le patient n°1 (prélèvement de contrôle le 12/08/2020) et pour le patient n°5 (prélèvement de contrôle le 19/08/2020). Aucun bruit de fond n'a entravé la lecture des spots pour les contrôles malgré l'utilisation du même lot de réactif.
- ➔ Suite à des échanges à ce sujet au cours de l'été 2020, Oxford Immunotec a indiqué ne pas avoir reçu de plaintes d'autres clients utilisant le même lot de réactifs. De plus, des tests supplémentaires réalisés à notre demande à Abingdon sur ce lot n'ont pas montré d'anomalie.

2. Problème lors de l'acheminement et/ou de la conservation des échantillons ? Selon les instructions d'Oxford Immunotec, les échantillons de sang doivent être testés dans les 54h maximum suivant le prélèvement du patient et maintenus à température ambiante, soit entre 18°C et 25°C. L'intégralité des prélèvements de la MT du CHU de Lille répertoriés dans le Tableau 11 ont été traités dans un délai < 24h. Cependant, du fait d'un épisode de canicule touchant la région Hauts-de-France, la température extérieure était particulièrement élevée entre le 5 et le 15 août 2020 (Figure 85).

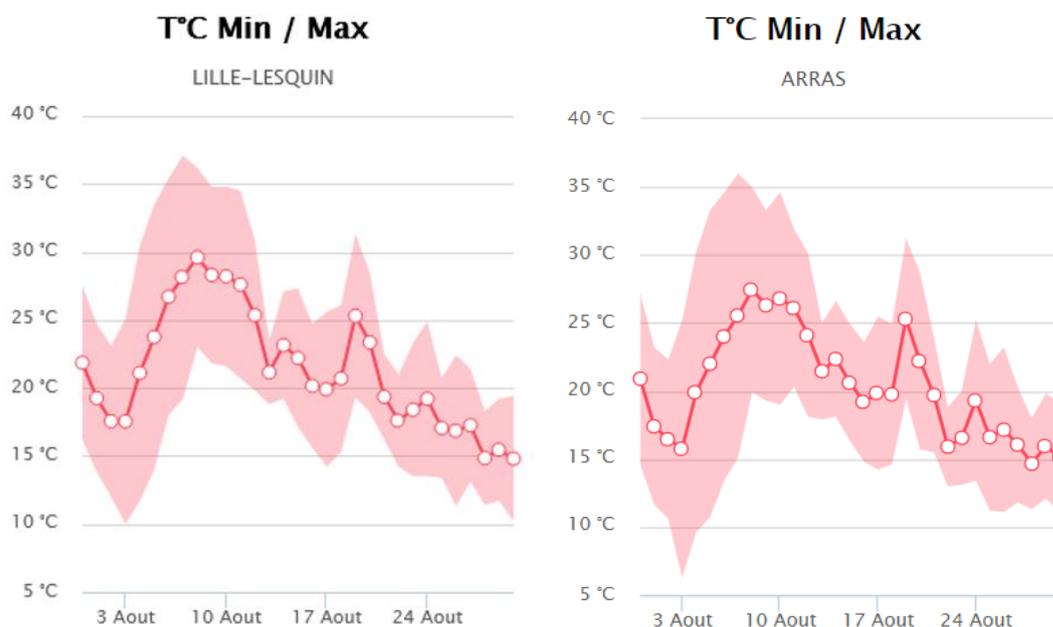


Figure 84 : Evolution de la température extérieure à Lille et à Arras au cours du mois d'août 2020 (température quotidienne minimale, maximale et moyenne). Relevés de températures et graphiques issus du site <https://www.terre-net.fr/meteo-agricole/historique-consultation/lille/2998324>.

Compte tenu des températures caniculaires, les échantillons prélevés à cette période étaient susceptibles d'être conservés à une température ambiante nettement supérieure à 25°C. De telles conditions de conservation des échantillons ont pu être constatées au sein du service de MT du CHU de Lille. Il est également possible que les prélèvements aient été soumis à une température inadaptée durant leur acheminement par navette jusqu'au CBP.

Les IDE de la MT du CHU de Lille ont rapidement été alertées par la proportion élevée de résultats positifs ou limites au seuil, ayant permis une bonne réactivité du laboratoire et du service. Cela n'est pas étonnant quand on sait qu'un résultat de test IGRA positif chez un agent déclenche systématiquement la réalisation d'un bilan paraclinique complémentaire, comprenant des explorations biologiques (NFS et CRP) et radiologiques (radiographie thoracique). Une IDR peut également être indiquée en fonction des antécédents. En revanche, nous avons été interpellés par le faible nombre de tests vérifiés : sur les 34 échantillons pour lesquels un contrôle à distance avait été demandé à la MT, 24 restaient encore non vérifiés en mars 2021. L'IDE du service de MT du CHU de Lille ayant participé à la gestion du problème à l'été 2020 a été recontactée fin mars 2021 à ce sujet ; il a été défini que les prélèvements de contrôle

pour les tests T-SPOT.TB® seront réalisés lors de la prochaine visite des agents concernés à la MT.

De telles difficultés à l'interprétation du test liées à la température des prélèvements n'ont pas été rencontrées par Oxford Immunotec sur leur site d'Abingdon. Le laboratoire d'immunologie cellulaire pourrait anticiper ces difficultés, en lien avec les unités de soins, pour les étés prochains (monitoring de la température des locaux en MT, limitation du temps d'acheminement et de stockage à température ambiante dans la mesure du possible) avec une vigilance supplémentaire à apporter lors de la validation biologique des tests réalisés en période de canicule. Cela est d'autant plus important que de nombreux bilans sont susceptibles d'être impactés, la MT étant le premier prescripteur de test IGRA du CHU de Lille (Figure 53).

Conclusion

L'Institut d'Immunologie du CHU de Lille est le premier laboratoire de biologie médicale en France à avoir fait le choix du test T-SPOT.TB® pour le diagnostic de l'ITL en routine. Il s'agissait d'un challenge majeur et inédit pour le laboratoire d'immunologie cellulaire, qui utilisait jusqu'alors très majoritairement le test QFT®-Plus et la technique ELISA. Le passage en routine à l'ELISpot, technique offrant notamment une meilleure sensibilité dans les contextes d'immunodépression ou les tuberculoses extrapulmonaires de diagnostic complexe, a été rendu possible par l'installation d'une plateforme intégrée et automatisée, développée par la société anglaise Oxford Immunotec.

Entre la qualification des automates par le fournisseur, leur acheminement au laboratoire, la validation de chaque appareil et du processus analytique complet, la formation du personnel à son utilisation et la gestion du pré et post-analytique, sans omettre la gestion de problèmes techniques imprévus, il aura fallu quatre mois pour que la plateforme, l'équipe et les unités de soins soient opérationnelles, permettant le changement de technique au 17 février 2020.

Cette première année d'utilisation de l'ELISpot en première intention pour la réalisation des tests IGRAs aura comporté son lot de difficultés, à chaque étape de la réalisation du test. La gestion des prélèvements non-conformes pour la phase pré-analytique, le défaut de rendement de l'isolement des CMN par le Nimbus-Presto concernant la phase analytique et la problématique du bruit de fond lors de la lecture des spots constatée au cours de l'été 2020 ont représenté autant de défis pour le laboratoire, relevés grâce à des solutions adaptées.

Au-delà du diagnostic de l'ITL, la technologie apportée par la plateforme ELISpot et son automatisation promet l'ouverture vers de nouvelles perspectives de recherche clinique pour l'Institut d'Immunologie dans les mois et les années à venir.

Références bibliographiques

1. Locht C. La tuberculose, une histoire toujours d'actualité. *médecine/sciences*. 2016 Jun;32(6–7):535–6.
2. Grandvoininnet P. Histoire des sanatoriums en France (1915-1945). Une architecture en quête de rendement thérapeutique. :551.
3. World Health Organization (W.H.O.). Global tuberculosis report 2019. 2019 p. 297.
4. Haut Conseil de la Santé Publique. Infections tuberculeuses latentes. Détection, prise en charge et surveillance. 2019;88.
5. Haas MK, Belknap RW. Diagnostic Tests for Latent Tuberculosis Infection. *Clin Chest Med*. 2019;40(4):829–37.
6. Toujani S, Ben Salah N, Cherif J, Mjid M, Ouahchy Y, Zakhama H, et al. Primary infection and pulmonary tuberculosis. *Rev Pneumol Clin*. 2015 Jun;71(2–3):73–82.
7. Haute Autorité de Santé. Test de détection de la synthèse d'interféron gamma pour le diagnostic des infections tuberculeuses. 2006.
8. Bae W, Park KU, Song EY, Kim SJ, Lee YJ, Park JS, et al. Comparison of the Sensitivity of QuantiFERON-TB Gold In-Tube and T-SPOT.TB According to Patient Age. *PloS One*. 2016;11(6):e0156917.
9. Chee CBE, Gan SH, Khinmar KW, Barkham TM, Koh CK, Liang S, et al. Comparison of sensitivities of two commercial gamma interferon release assays for pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol*. 2008 Jun;46(6):1935–40.
10. Clark SA, Martin SL, Pozniak A, Steel A, Ward B, Dunning J, et al. Tuberculosis antigen-specific immune responses can be detected using enzyme-linked immunospot technology in human immunodeficiency virus (HIV)-1 patients with advanced disease: Immune responses to TB antigens in HIV. *Clin Exp Immunol*. 2007;150(2):238–44.
11. Huo Z-Y, Peng L. Accuracy of the interferon- γ release assay for the diagnosis of active tuberculosis among HIV-seropositive individuals: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis*. 2016 Jul 22;16:350.
12. Kim S-H, Song K-H, Choi S-J, Kim H-B, Kim N-J, Oh M, et al. Diagnostic usefulness of a T-cell-based assay for extrapulmonary tuberculosis in immunocompromised patients. *Am J Med*. 2009 Feb;122(2):189–95.
13. Jiang J, Shi H-Z, Liang Q-L, Qin S-M, Qin X-J. Diagnostic value of interferon-gamma in tuberculous pleurisy: a metaanalysis. *Chest*. 2007 Apr;131(4):1133–41.
14. Guthmann J-P. La tuberculose maladie en France en 2018. Faible incidence nationale, forte incidence dans certains territoires et groupes de population. *Bull Epidémiol Hebd*. 2020;196–203.

15. CNR-MyRMA. Centre national de référence des mycobactéries et de la résistance des mycobactéries aux antituberculeux. Rapport d'activité pour l'année 2018. Paris; 2019 p. 108.
16. Stackebrandt E, Rainey FA, Ward-Rainey NL. Proposal for a New Hierarchic Classification System, Actinobacteria classis nov. *Int J Syst Bacteriol*. 1997 Apr 1;47(2):479–91.
17. Ndishimye P. Tuberculose en Roumanie : Contribution à la mise en évidence des facteurs de risque et des caractéristiques cliniques et biologiques des patients hospitalisés dans la région de Cluj-Napoca [Internet]. [Rabat, Maroc]: Université Mohammed V Faculté des sciences; 2016 [cited 2021 Apr 26]. Available from: https://www.researchgate.net/publication/310620695_Tuberculose_en_Roumanie_Contributio_n_a_la_mise_en_evidence_des_facteurs_de_risque_et_des_caracteristiques_cliniques_et_biolo_giques_des_patients_hospitalises_dans_la_region_de_Cluj-Napoca
18. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 1998 Jun 11;393(6685):537–44.
19. Abdallah AM, Gey van Pittius NC, Champion PAD, Cox J, Luirink J, Vandenbroucke-Grauls CMJE, et al. Type VII secretion--mycobacteria show the way. *Nat Rev Microbiol*. 2007;5(11):883–91.
20. Brennan PJ, Nikaido H. The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem*. 1995;64:29–63.
21. Augenstreich J. Rôle et mécanismes moléculaires d'action des lipides de l'enveloppe de *Mycobacterium tuberculosis* dans la virulence. Université Paul Sabatier - Toulouse III; 2018.
22. Kleinnijenhuis J, Oosting M, Joosten LAB, Netea MG, Van Crevel R. Innate immune recognition of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Dev Immunol*. 2011;2011:405310.
23. Pelicic V, Reyrat JM, Gicquel B. Genetic advances for studying *Mycobacterium tuberculosis* pathogenicity. *Mol Microbiol*. 1998 May;28(3):413–20.
24. Mahairas GG, Sabo PJ, Hickey MJ, Singh DC, Stover CK. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J Bacteriol*. 1996 Mar;178(5):1274–82.
25. Behr MA, Wilson MA, Gill WP, Salamon H, Schoolnik GK, Rane S, et al. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science*. 1999 May 28;284(5419):1520–3.
26. Ganguly N, Siddiqui I, Sharma P. Role of *M. tuberculosis* RD-1 region encoded secretory proteins in protective response and virulence. *Tuberc Edinb Scotl*. 2008 Nov;88(6):510–7.
27. Pym AS, Brodin P, Brosch R, Huerre M, Cole ST. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. *Mol Microbiol*. 2002 Nov;46(3):709–17.
28. Gordon SV, Eiglmeier K, Garnier T, Brosch R, Parkhill J, Barrell B, et al. Genomics of *Mycobacterium bovis*. *Tuberc Edinb Scotl*. 2001;81(1–2):157–63.
29. Behr MA. BCG--different strains, different vaccines? *Lancet Infect Dis*. 2002 Feb;2(2):86–92.
30. Chandra Rai R, Dwivedi VP, Chatterjee S, Raghava Prasad DV, Das G. Early secretory antigenic target-6 of *Mycobacterium tuberculosis*: enigmatic factor in pathogen-host interactions. *Microbes Infect*. 2012 Nov;14(13):1220–6.

31. Hsu T, Hingley-Wilson SM, Chen B, Chen M, Dai AZ, Morin PM, et al. The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette-Guerin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Oct 14;100(21):12420–5.
32. Lewis KN, Liao R, Guinn KM, Hickey MJ, Smith S, Behr MA, et al. Deletion of RD1 from *Mycobacterium tuberculosis* mimics bacille Calmette-Guérin attenuation. *J Infect Dis*. 2003 Jan 1;187(1):117–23.
33. Renshaw PS, Panagiotidou P, Whelan A, Gordon SV, Hewinson RG, Williamson RA, et al. Conclusive evidence that the major T-cell antigens of the *Mycobacterium tuberculosis* complex ESAT-6 and CFP-10 form a tight, 1:1 complex and characterization of the structural properties of ESAT-6, CFP-10, and the ESAT-6*CFP-10 complex. Implications for pathogenesis and virulence. *J Biol Chem*. 2002 Jun 14;277(24):21598–603.
34. Pathak SK, Basu S, Basu KK, Banerjee A, Pathak S, Bhattacharyya A, et al. Direct extracellular interaction between the early secreted antigen ESAT-6 of *Mycobacterium tuberculosis* and TLR2 inhibits TLR signaling in macrophages. *Nat Immunol*. 2007 Jun;8(6):610–8.
35. Collège des universitaires de Maladies infectieuses et tropicales. E. PILLY. *Maladies infectieuses et tropicales*. 27ème édition. Paris: Alinéa plus; 2020. 720 p.
36. Riley RL. The contagiousity of tuberculosis. *Schweiz Med Wochenschr*. 1983 Jan 22;113(3):75–9.
37. van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol*. 1993 Feb;31(2):406–9.
38. Centers for Disease Control (CDC). *Mycobacterium tuberculosis* transmission in a health clinic--Florida, 1988. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 1989 Apr 21;38(15):256–8, 263–4.
39. Borgdorff MW, Sebek M, Geskus RB, Kremer K, Kalisvaart N, van Soolingen D. The incubation period distribution of tuberculosis estimated with a molecular epidemiological approach. *Int J Epidemiol*. 2011 Aug;40(4):964–70.
40. Getahun H, Matteelli A, Chaisson RE, Raviglione M. Latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *N Engl J Med*. 2015 May 28;372(22):2127–35.
41. Selwyn PA, Hartel D, Lewis VA, Schoenbaum EE, Vermund SH, Klein RS, et al. A prospective study of the risk of tuberculosis among intravenous drug users with human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med*. 1989 Mar 2;320(9):545–50.
42. Keane J, Bresnihan B. Tuberculosis reactivation during immunosuppressive therapy in rheumatic diseases: diagnostic and therapeutic strategies. *Curr Opin Rheumatol*. 2008 Jul;20(4):443–9.
43. Jick SS, Lieberman ES, Rahman MU, Choi HK. Glucocorticoid use, other associated factors, and the risk of tuberculosis. *Arthritis Rheum*. 2006 Feb 15;55(1):19–26.
44. Sidhu A, Verma G, Humar A, Kumar D. Outcome of latent tuberculosis infection in solid organ transplant recipients over a 10-year period. *Transplantation*. 2014 Sep 27;98(6):671–5.
45. Al-Anazi KA, Al-Jasser AM, Alsaleh K. Infections Caused by *Mycobacterium tuberculosis* in Recipients of Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front Oncol*. 2014;4:231.

46. Christopoulos AI, Diamantopoulos AA, Dimopoulos PA, Goumenos DS, Barbalias GA. Risk factors for tuberculosis in dialysis patients: a prospective multi-center clinical trial. *BMC Nephrol.* 2009 Nov 7;10:36.
47. Corbett EL, Churchyard GJ, Clayton TC, Williams BG, Mulder D, Hayes RJ, et al. HIV infection and silicosis: the impact of two potent risk factors on the incidence of mycobacterial disease in South African miners. *AIDS Lond Engl.* 2000 Dec 1;14(17):2759–68.
48. Dheda K, Barry CE, Maartens G. Tuberculosis. *Lancet Lond Engl.* 2016 Mar 19;387(10024):1211–26.
49. May T, Bevilacqua S, Dailloux M. Dans quels cas penser à la tuberculose chez l'adulte ? When to think tuberculosis in adults? *Médecine Mal Infect.* 2003;5.
50. Barnes PF, Verdegem TD, Vachon LA, Leedom JM, Overturf GD. Chest roentgenogram in pulmonary tuberculosis. New data on an old test. *Chest.* 1988 Aug;94(2):316–20.
51. Lee P, Ho KKY. Hyponatremia in pulmonary TB: evidence of ectopic antidiuretic hormone production. *Chest.* 2010 Jan;137(1):207–8.
52. Ketata W, Rekiq WK, Ayadi H, Kammoun S. Extrapulmonary tuberculosis. *Rev Pneumol Clin.* 2015 Jun;71(2–3):83–92.
53. Hochedez P, Zeller V, Truffot C, Ansart S, Caumes E, Tubiana R, et al. Lymph-node tuberculosis in patients infected or not with HIV: general characteristics, clinical presentation, microbiological diagnosis and treatment. *Pathol Biol (Paris).* 2003 Oct;51(8–9):496–502.
54. Shaw JA, Diacon AH, Koegelenberg CFN. Tuberculous pleural effusion. *Respirol Carlton Vic.* 2019 Oct;24(10):962–71.
55. Garg RK, Somvanshi DS. Spinal tuberculosis: a review. *J Spinal Cord Med.* 2011;34(5):440–54.
56. Figueiredo AA, Lucon AM. Urogenital tuberculosis: update and review of 8961 cases from the world literature. *Rev Urol.* 2008;10(3):207–17.
57. Kapoor VK. Abdominal tuberculosis. *Postgrad Med J.* 1998 Aug;74(874):459–67.
58. Riquelme A, Calvo M, Salech F, Valderrama S, Pattillo A, Arellano M, et al. Value of adenosine deaminase (ADA) in ascitic fluid for the diagnosis of tuberculous peritonitis: a meta-analysis. *J Clin Gastroenterol.* 2006 Sep;40(8):705–10.
59. Hosoglu S, Geyik MF, Balik I, Aygen B, Erol S, Aygencel TG, et al. Predictors of outcome in patients with tuberculous meningitis. *Int J Tuberc Lung Dis Off J Int Union Tuberc Lung Dis.* 2002 Jan;6(1):64–70.
60. Mège J-L, Revillard J-P, Raoult D. Immunité et infection : concepts immunopathologiques et perspectives thérapeutiques. 1997. 448 p. (Arnette).
61. Pease C, Hutton B, Yazdi F, Wolfe D, Hamel C, Quach P, et al. Efficacy and completion rates of rifapentine and isoniazid (3HP) compared to other treatment regimens for latent tuberculosis infection: a systematic review with network meta-analyses. *BMC Infect Dis.* 2017 Apr 11;17(1):265.

62. Perriot J, Chambonnet E, Eschalié A. Managing the adverse events of antitubercular agents. *Rev Mal Respir.* 2011 Apr;28(4):542–55.
63. Ritz N, Hanekom WA, Robins-Browne R, Britton WJ, Curtis N. Influence of BCG vaccine strain on the immune response and protection against tuberculosis. *FEMS Microbiol Rev.* 2008 Aug;32(5):821–41.
64. Puvacić S, Dizdarević J, Santić Z, Mulaomerović M. Protective effect of neonatal BCG vaccines against tuberculous meningitis. *Bosn J Basic Med Sci.* 2004 Feb;4(1):46–9.
65. Trunz BB, Fine P, Dye C. Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliary tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of cost-effectiveness. *Lancet Lond Engl.* 2006 Apr 8;367(9517):1173–80.
66. Soysal A, Millington KA, Bakir M, Dosanjh D, Aslan Y, Deeks JJ, et al. Effect of BCG vaccination on risk of *Mycobacterium tuberculosis* infection in children with household tuberculosis contact: a prospective community-based study. *Lancet Lond Engl.* 2005 Oct 22;366(9495):1443–51.
67. Colditz GA, Brewer TF, Berkey CS, Wilson ME, Burdick E, Fineberg HV, et al. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature. *JAMA.* 1994 Mar 2;271(9):698–702.
68. Brewer TF. Preventing tuberculosis with bacillus Calmette-Guérin vaccine: a meta-analysis of the literature. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2000 Sep;31 Suppl 3:S64-67.
69. Direction Générale de la Santé, Sous-direction prévention des risques infectieux Bureau risques infectieux et politique vaccinale. Circulaire N° DGS/RI1/2007/318 du 14 août 2007 relative à la suspension de l'obligation de vaccination par le BCG des enfants et adolescents. 2007.
70. Ministère des solidarités et de la santé. Calendrier des vaccinations et recommandations vaccinales 2020. 2020.
71. Griffiths G, Nyström B, Sable SB, Khuller GK. Nanobead-based interventions for the treatment and prevention of tuberculosis. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(11):827–34.
72. Tsai MC, Chakravarty S, Zhu G, Xu J, Tanaka K, Koch C, et al. Characterization of the tuberculous granuloma in murine and human lungs: cellular composition and relative tissue oxygen tension. *Cell Microbiol.* 2006 Feb;8(2):218–32.
73. Allen M, Bailey C, Cahatol I, Dodge L, Yim J, Kassissa C, et al. Mechanisms of Control of *Mycobacterium tuberculosis* by NK Cells: Role of Glutathione. *Front Immunol.* 2015;6:508.
74. Ramakrishnan L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(5):352–66.
75. de Noronha ALL, Báfica A, Nogueira L, Barral A, Barral-Netto M. Lung granulomas from *Mycobacterium tuberculosis*/HIV-1 co-infected patients display decreased in situ TNF production. *Pathol Res Pract.* 2008;204(3):155–61.
76. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique. Elsevier Masson. 2016. 307 p. (Campus référence).

77. Moraco AH, Kornfeld H. Cell death and autophagy in tuberculosis. *Semin Immunol.* 2014 Dec;26(6):497–511.
78. Goldberg MF, Saini NK, Porcelli SA. Evasion of Innate and Adaptive Immunity by *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol Spectr.* 2014 Oct;2(5).
79. Mortaz E, Adcock IM, Tabarsi P, Masjedi MR, Mansouri D, Velayati AA, et al. Interaction of Pattern Recognition Receptors with *Mycobacterium Tuberculosis*. *J Clin Immunol.* 2015 Jan;35(1):1–10.
80. Liu CH, Liu H, Ge B. Innate immunity in tuberculosis: host defense vs pathogen evasion. *Cell Mol Immunol.* 2017 Dec;14(12):963–75.
81. Means TK, Jones BW, Schromm AB, Shurtleff BA, Smith JA, Keane J, et al. Differential effects of a Toll-like receptor antagonist on *Mycobacterium tuberculosis*-induced macrophage responses. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2001 Mar 15;166(6):4074–82.
82. Drennan MB, Nicolle D, Quesniaux VJF, Jacobs M, Allie N, Mpagi J, et al. Toll-like receptor 2-deficient mice succumb to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Am J Pathol.* 2004 Jan;164(1):49–57.
83. Underhill DM, Ozinsky A, Smith KD, Aderem A. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Dec 7;96(25):14459–63.
84. Pompei L, Jang S, Zamlynny B, Ravikumar S, McBride A, Hickman SP, et al. Disparity in IL-12 release in dendritic cells and macrophages in response to *Mycobacterium tuberculosis* is due to use of distinct TLRs. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2007 Apr 15;178(8):5192–9.
85. Bafica A, Scanga CA, Feng CG, Leifer C, Cheever A, Sher A. TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med.* 2005 Dec 19;202(12):1715–24.
86. Reiling N, Hölscher C, Fehrenbach A, Kröger S, Kirschning CJ, Goyert S, et al. Cutting edge: Toll-like receptor (TLR)2- and TLR4-mediated pathogen recognition in resistance to airborne infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2002 Oct 1;169(7):3480–4.
87. Abel B, Thieblemont N, Quesniaux VJF, Brown N, Mpagi J, Miyake K, et al. Toll-like receptor 4 expression is required to control chronic *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2002 Sep 15;169(6):3155–62.
88. Divangahi M, Mostowy S, Coulombe F, Kozak R, Guillot L, Veyrier F, et al. NOD2-deficient mice have impaired resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection through defective innate and adaptive immunity. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2008 Nov 15;181(10):7157–65.
89. Inohara N, Nuñez G. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol.* 2003 May;3(5):371–82.
90. Man SM, Karki R, Kanneganti T-D. Molecular mechanisms and functions of pyroptosis, inflammatory caspases and inflammasomes in infectious diseases. *Immunol Rev.* 2017;277(1):61–75.

91. Wawrocki S, Druszczynska M. Inflammasomes in Mycobacterium tuberculosis-Driven Immunity. *Can J Infect Dis Med Microbiol J Can Mal Infect Microbiol Medicale*. 2017;2017:2309478.
92. Mayer-Barber KD, Barber DL, Shenderov K, White SD, Wilson MS, Cheever A, et al. Caspase-1 independent IL-1 β production is critical for host resistance to mycobacterium tuberculosis and does not require TLR signaling in vivo. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2010 Apr 1;184(7):3326–30.
93. Cooper AM, Mayer-Barber KD, Sher A. Role of innate cytokines in mycobacterial infection. *Mucosal Immunol*. 2011 May;4(3):252–60.
94. McElvania Tekippe E, Allen IC, Hulseberg PD, Sullivan JT, McCann JR, Sandor M, et al. Granuloma formation and host defense in chronic Mycobacterium tuberculosis infection requires PYCARD/ASC but not NLRP3 or caspase-1. *PLoS One*. 2010 Aug 20;5(8):e12320.
95. Briken V, Ahlbrand SE, Shah S. Mycobacterium tuberculosis and the host cell inflammasome: a complex relationship. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013;3:62.
96. Fernandes-Alnemri T, Yu J-W, Datta P, Wu J, Alnemri ES. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature*. 2009 Mar 26;458(7237):509–13.
97. Hornung V, Ablasser A, Charrel-Dennis M, Bauernfeind F, Horvath G, Caffrey DR, et al. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature*. 2009 Mar 26;458(7237):514–8.
98. Kang PB, Azad AK, Torrelles JB, Kaufman TM, Beharka A, Tibesar E, et al. The human macrophage mannose receptor directs Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis. *J Exp Med*. 2005 Oct 3;202(7):987–99.
99. Yonekawa A, Saijo S, Hoshino Y, Miyake Y, Ishikawa E, Suzukawa M, et al. Dectin-2 is a direct receptor for mannose-capped lipoarabinomannan of mycobacteria. *Immunity*. 2014 Sep 18;41(3):402–13.
100. Gagliardi MC, Teloni R, Giannoni F, Pardini M, Sargentini V, Brunori L, et al. Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin infects DC-SIGN- dendritic cell and causes the inhibition of IL-12 and the enhancement of IL-10 production. *J Leukoc Biol*. 2005 Jul;78(1):106–13.
101. Geurtsen J, Chedammi S, Mesters J, Cot M, Driessen NN, Sambou T, et al. Identification of mycobacterial alpha-glucan as a novel ligand for DC-SIGN: involvement of mycobacterial capsular polysaccharides in host immune modulation. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2009 Oct 15;183(8):5221–31.
102. Zimmerli S, Edwards S, Ernst JD. Selective receptor blockade during phagocytosis does not alter the survival and growth of Mycobacterium tuberculosis in human macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1996 Dec;15(6):760–70.
103. Schlesinger LS, Bellinger-Kawahara CG, Payne NR, Horwitz MA. Phagocytosis of Mycobacterium tuberculosis is mediated by human monocyte complement receptors and complement component C3. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1990 Apr 1;144(7):2771–80.
104. Schorey JS, Carroll MC, Brown EJ. A macrophage invasion mechanism of pathogenic mycobacteria. *Science*. 1997 Aug 22;277(5329):1091–3.

105. Gatfield J, Pieters J. Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages. *Science*. 2000 Jun 2;288(5471):1647–50.
106. Russell DG. *Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001 Aug;2(8):569–77.
107. Zuñiga J, Torres-García D, Santos-Mendoza T, Rodriguez-Reyna TS, Granados J, Yunis EJ. Cellular and humoral mechanisms involved in the control of tuberculosis. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:193923.
108. Sica A, Erreni M, Allavena P, Porta C. Macrophage polarization in pathology. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2015 Nov;72(21):4111–26.
109. Jo E-K. Innate immunity to mycobacteria: vitamin D and autophagy. *Cell Microbiol*. 2010 Aug;12(8):1026–35.
110. Selvaraj P, Harishankar M, Afsal K. Vitamin D: Immuno-modulation and tuberculosis treatment. *Can J Physiol Pharmacol*. 2015 May;93(5):377–84.
111. Sly LM, Hingley-Wilson SM, Reiner NE, McMaster WR. Survival of *Mycobacterium tuberculosis* in host macrophages involves resistance to apoptosis dependent upon induction of antiapoptotic Bcl-2 family member Mcl-1. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2003 Jan 1;170(1):430–7.
112. Schaible UE, Winau F, Sieling PA, Fischer K, Collins HL, Hagens K, et al. Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC-I and CD1 in tuberculosis. *Nat Med*. 2003 Aug;9(8):1039–46.
113. Gouzy A, Poquet Y, Neyrolles O. Amino acid capture and utilization within the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome. *Future Microbiol*. 2014;9(5):631–7.
114. Abramovitch RB, Rohde KH, Hsu F-F, Russell DG. aprABC: a *Mycobacterium tuberculosis* complex-specific locus that modulates pH-driven adaptation to the macrophage phagosome. *Mol Microbiol*. 2011 May;80(3):678–94.
115. Ferrari G, Langen H, Naito M, Pieters J. A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. *Cell*. 1999;97(4):435–47.
116. Romagnoli A, Etna MP, Giacomini E, Pardini M, Remoli ME, Corazzari M, et al. ESX-1 dependent impairment of autophagic flux by *Mycobacterium tuberculosis* in human dendritic cells. *Autophagy*. 2012 Sep;8(9):1357–70.
117. Vance RE, Isberg RR, Portnoy DA. Patterns of pathogenesis: discrimination of pathogenic and nonpathogenic microbes by the innate immune system. *Cell Host Microbe*. 2009 Jul 23;6(1):10–21.
118. Simeone R, Sayes F, Song O, Gröschel MI, Brodin P, Brosch R, et al. Cytosolic access of *Mycobacterium tuberculosis*: critical impact of phagosomal acidification control and demonstration of occurrence in vivo. *PLoS Pathog*. 2015 Feb;11(2):e1004650.
119. Simeone R, Bobard A, Lippmann J, Bitter W, Majlessi L, Brosch R, et al. Phagosomal rupture by *Mycobacterium tuberculosis* results in toxicity and host cell death. *PLoS Pathog*. 2012 Feb;8(2):e1002507.

120. Manzanillo PS, Shiloh MU, Portnoy DA, Cox JS. Mycobacterium tuberculosis activates the DNA-dependent cytosolic surveillance pathway within macrophages. *Cell Host Microbe*. 2012 May 17;11(5):469–80.
121. Shah S, Bohsali A, Ahlbrand SE, Srinivasan L, Rathinam VAK, Vogel SN, et al. Cutting edge: Mycobacterium tuberculosis but not nonvirulent mycobacteria inhibits IFN- β and AIM2 inflammasome-dependent IL-1 β production via its ESX-1 secretion system. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2013 Oct 1;191(7):3514–8.
122. Master SS, Rampini SK, Davis AS, Keller C, Ehlers S, Springer B, et al. Mycobacterium tuberculosis prevents inflammasome activation. *Cell Host Microbe*. 2008 Apr 17;3(4):224–32.
123. Koo IC, Wang C, Raghavan S, Morisaki JH, Cox JS, Brown EJ. ESX-1-dependent cytolysis in lysosome secretion and inflammasome activation during mycobacterial infection. *Cell Microbiol*. 2008 Sep;10(9):1866–78.
124. Dhiman R, Raje M, Majumdar S. Differential expression of NF-kappaB in mycobacteria infected THP-1 affects apoptosis. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Apr;1770(4):649–58.
125. Zhang J, Jiang R, Takayama H, Tanaka Y. Survival of virulent Mycobacterium tuberculosis involves preventing apoptosis induced by Bcl-2 upregulation and release resulting from necrosis in J774 macrophages. *Microbiol Immunol*. 2005;49(9):845–52.
126. Aguilo JI, Alonso H, Uranga S, Marinova D, Arbués A, de Martino A, et al. ESX-1-induced apoptosis is involved in cell-to-cell spread of Mycobacterium tuberculosis. *Cell Microbiol*. 2013 Dec;15(12):1994–2005.
127. Laskay T, van Zandbergen G, Solbach W. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor. *Immunobiology*. 2008;213(3–4):183–91.
128. Koedel U, Frankenberg T, Kirschnek S, Obermaier B, Häcker H, Paul R, et al. Apoptosis is essential for neutrophil functional shutdown and determines tissue damage in experimental pneumococcal meningitis. *PLoS Pathog*. 2009 May;5(5):e1000461.
129. Corleis B, Korbelt D, Wilson R, Bylund J, Chee R, Schaible UE. Escape of Mycobacterium tuberculosis from oxidative killing by neutrophils. *Cell Microbiol*. 2012 Jul;14(7):1109–21.
130. Pokkali S, Das SD. Augmented chemokine levels and chemokine receptor expression on immune cells during pulmonary tuberculosis. *Hum Immunol*. 2009 Feb;70(2):110–5.
131. Eum S-Y, Kong J-H, Hong M-S, Lee Y-J, Kim J-H, Hwang S-H, et al. Neutrophils are the predominant infected phagocytic cells in the airways of patients with active pulmonary TB. *Chest*. 2010 Jan;137(1):122–8.
132. Hercend T, Griffin JD, Bensussan A, Schmidt RE, Edson MA, Brennan A, et al. Generation of monoclonal antibodies to a human natural killer clone. Characterization of two natural killer-associated antigens, NKH1A and NKH2, expressed on subsets of large granular lymphocytes. *J Clin Invest*. 1985 Mar;75(3):932–43.
133. Bermudez LE, Wu M, Young LS. Interleukin-12-stimulated natural killer cells can activate human macrophages to inhibit growth of Mycobacterium avium. *Infect Immun*. 1995 Oct;63(10):4099–104.

134. Denis M. Interleukin-12 (IL-12) augments cytolytic activity of natural killer cells toward *Mycobacterium tuberculosis*-infected human monocytes. *Cell Immunol.* 1994 Jul;156(2):529–36.
135. Millman AC, Salman M, Dayaram YK, Connell ND, Venketaraman V. Natural killer cells, glutathione, cytokines, and innate immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Interferon Cytokine Res Off J Int Soc Interferon Cytokine Res.* 2008 Mar;28(3):153–65.
136. Sia JK, Rengarajan J. Immunology of *Mycobacterium tuberculosis* Infections. *Microbiol Spectr.* 2019;7(4).
137. Cavalcanti YVN, Brelaz MCA, Neves JK de AL, Ferraz JC, Pereira VRA. Role of TNF-Alpha, IFN-Gamma, and IL-10 in the Development of Pulmonary Tuberculosis. *Pulm Med.* 2012;2012:745483.
138. 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 Dec 1;178(6):2249–54.
139. Cooper AM, Dalton DK, Stewart TA, Griffin JP, Russell DG, Orme IM. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. *J Exp Med.* 1993 Dec 1;178(6):2243–7.
140. Havlir DV, Barnes PF. Tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med.* 1999 Feb 4;340(5):367–73.
141. Cooper AM. Cell-mediated immune responses in tuberculosis. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:393–422.
142. Orme IM. The kinetics of emergence and loss of mediator T lymphocytes acquired in response to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1987 Jan 1;138(1):293–8.
143. Friedling M. Etude des performances du QuantiFERON-TB Gold In-Tube : phase pré-analytique, répétabilité, sensibilité, spécificité [Biologie médicale]. *Limoges*; 2010.
144. Woodworth JSM, Behar SM. *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD8+ T cells and their role in immunity. *Crit Rev Immunol.* 2006;26(4):317–52.
145. Rolph MS, Raupach B, Köbernick HH, Collins HL, Pérarnau B, Lemonnier FA, et al. MHC class Ia-restricted T cells partially account for beta2-microglobulin-dependent resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Immunol.* 2001 Jun;31(6):1944–9.
146. Kaufmann SH. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nat Rev Immunol.* 2001 Oct;1(1):20–30.
147. Ferrero E, Biswas P, Vettoretto K, Ferrarini M, Ugucioni M, Piali L, et al. Macrophages exposed to *Mycobacterium tuberculosis* release chemokines able to recruit selected leucocyte subpopulations: focus on gammadelta cells. *Immunology.* 2003 Mar;108(3):365–74.
148. Guerra-Maupome M, McGill JL. Characterization of local and circulating bovine $\gamma\delta$ T cell responses to respiratory BCG vaccination. *Sci Rep.* 2019 Nov 5;9(1):15996.
149. Beckman EM, Porcelli SA, Morita CT, Behar SM, Furlong ST, Brenner MB. Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted alpha beta+ T cells. *Nature.* 1994 Dec 15;372(6507):691–4.

150. Larson RP, Shafiani S, Urdahl KB. Foxp3(+) regulatory T cells in tuberculosis. *Adv Exp Med Biol.* 2013;783:165–80.
151. Scott-Browne JP, Shafiani S, Tucker-Heard G, Ishida-Tsubota K, Fontenot JD, Rudensky AY, et al. Expansion and function of Foxp3-expressing T regulatory cells during tuberculosis. *J Exp Med.* 2007 Sep 3;204(9):2159–69.
152. Garlanda C, Di Liberto D, Vecchi A, La Manna MP, Buracchi C, Caccamo N, et al. Damping excessive inflammation and tissue damage in Mycobacterium tuberculosis infection by Toll IL-1 receptor 8/single Ig IL-1-related receptor, a negative regulator of IL-1/TLR signaling. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2007 Sep 1;179(5):3119–25.
153. Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature.* 1999 Oct 14;401(6754):708–12.
154. Goldsack L, Kirman JR. Half-truths and selective memory: Interferon gamma, CD4(+) T cells and protective memory against tuberculosis. *Tuberc Edinb Scotl.* 2007 Nov;87(6):465–73.
155. Elias D, Akuffo H, Britton S. PPD induced in vitro interferon gamma production is not a reliable correlate of protection against Mycobacterium tuberculosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2005 May;99(5):363–8.
156. Scanga CA, Mohan VP, Yu K, Joseph H, Tanaka K, Chan J, et al. Depletion of CD4(+) T cells causes reactivation of murine persistent tuberculosis despite continued expression of interferon gamma and nitric oxide synthase 2. *J Exp Med.* 2000 Aug 7;192(3):347–58.
157. L'intradermoréaction à la tuberculine (IDR) ou test à la tuberculine. *Médecine Mal Infect.* 2004 Aug;34(8–9):358–63.
158. Haute Autorité de santé. Tests in vitro de dépistage de l'infection tuberculeuse latente par détection de production d'interféron gamma - Argumentaire. 2015;80.
159. Kaplan G, Luster AD, Hancock G, Cohn ZA. The expression of a gamma interferon-induced protein (IP-10) in delayed immune responses in human skin. *J Exp Med.* 1987 Oct 1;166(4):1098–108.
160. Lalvani A, Pareek M. Interferon gamma release assays: principles and practice. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010 Apr;28(4):245–52.
161. Mori T, Sakatani M, Yamagishi F, Takashima T, Kawabe Y, Nagao K, et al. Specific detection of tuberculosis infection: an interferon-gamma-based assay using new antigens. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004 Jul 1;170(1):59–64.
162. Barcellini L, Borroni E, Brown J, Brunetti E, Codecasa L, Cugnata F, et al. First independent evaluation of QuantiFERON-TB Plus performance. *Eur Respir J.* 2016 May;47(5):1587–90.
163. Chiacchio T, Petruccioli E, Vanini V, Cuzzi G, Pinnetti C, Sampaolesi A, et al. Polyfunctional T-cells and effector memory phenotype are associated with active TB in HIV-infected patients. *J Infect.* 2014 Dec;69(6):533–45.
164. Day CL, Abrahams DA, Lerumo L, Janse van Rensburg E, Stone L, O'rie T, et al. Functional capacity of Mycobacterium tuberculosis-specific T cell responses in humans is associated with mycobacterial load. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2011 Sep 1;187(5):2222–32.

165. Nikolova M, Markova R, Drenska R, Muhtarova M, Todorova Y, Dimitrov V, et al. Antigen-specific CD4- and CD8-positive signatures in different phases of Mycobacterium tuberculosis infection. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013 Mar;75(3):277–81.
166. Pieterman ED, Liqui Lung FG, Verbon A, Bax HI, Ang CW, Berkhout J, et al. A multicentre verification study of the QuantiFERON®-TB Gold Plus assay. *Tuberc Edinb Scotl*. 2018 Jan;108:136–42.
167. Nyendak MR, Park B, Null MD, Baseke J, Swarbrick G, Mayanja-Kizza H, et al. Mycobacterium tuberculosis specific CD8(+) T cells rapidly decline with antituberculosis treatment. *PLoS One*. 2013;8(12):e81564.
168. Moon H-W, Gaur RL, Tien SS-H, Spangler M, Pai M, Banaei N. Evaluation of QuantiFERON-TB Gold-Plus in Health Care Workers in a Low-Incidence Setting. *J Clin Microbiol*. 2017 Jun;55(6):1650–7.
169. Ryu MR, Park M-S, Cho EH, Jung CW, Kim K, Kim SJ, et al. Comparative Evaluation of QuantiFERON-TB Gold In-Tube and QuantiFERON-TB Gold Plus in Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection in Immunocompromised Patients. *J Clin Microbiol*. 2018 Nov;56(11).
170. Bergot DE. Interprétation et signification d'un test IGRA en pratique quotidienne.
171. Le Palud P, Herrmann J-L, Bergot E. [Interferon gamma release assay (IGRA) tests]. *Rev Mal Respir*. 2018 Oct;35(8):862–5.
172. Diel R, Loddenkemper R, Nienhaus A. Evidence-based comparison of commercial interferon-gamma release assays for detecting active TB: a metaanalysis. *Chest*. 2010 Apr;137(4):952–68.
173. Sotgiu G, Saderi L, Petruccioli E, Aliberti S, Piana A, Petrone L, et al. QuantiFERON TB Gold Plus for the diagnosis of tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *J Infect*. 2019 Nov;79(5):444–53.
174. Oxford Immunotec, Abingdon, UK. The T-SPOT.TB test brochure. 2020.
175. Yu SN, Jung J, Kim Y-K, Lee JY, Kim S-M, Park SJ, et al. Diagnostic Usefulness of IFN-Gamma Releasing Assays Compared With Conventional Tests in Patients With Disseminated Tuberculosis. *Medicine (Baltimore)*. 2015 Jul;94(28):e1094.
176. Jia H, Pan L, Qin S, Liu F, Du F, Lan T, et al. Evaluation of interferon- γ release assay in the diagnosis of osteoarticular tuberculosis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013 Jul;76(3):309–13.
177. Telisinghe L, Amofa-Sekyi M, Maluzi K, Kaluba-Milimo D, Cheeba-Lengwe M, Chiwele K, et al. The sensitivity of the QuantiFERON®-TB Gold Plus assay in Zambian adults with active tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis Off J Int Union Tuberc Lung Dis*. 2017 Jun 1;21(6):690–6.
178. Bergamini BM, Losi M, Vaienti F, D'Amico R, Meccugni B, Meacci M, et al. Performance of commercial blood tests for the diagnosis of latent tuberculosis infection in children and adolescents. *Pediatrics*. 2009 Mar;123(3):e419-424.
179. Grinsdale JA, Islam S, Tran OC, Ho CS, Kawamura LM, Higashi JM. Interferon-Gamma Release Assays and Pediatric Public Health Tuberculosis Screening: The San Francisco Program Experience 2005 to 2008. *J Pediatr Infect Dis Soc*. 2016 Jun;5(2):122–30.

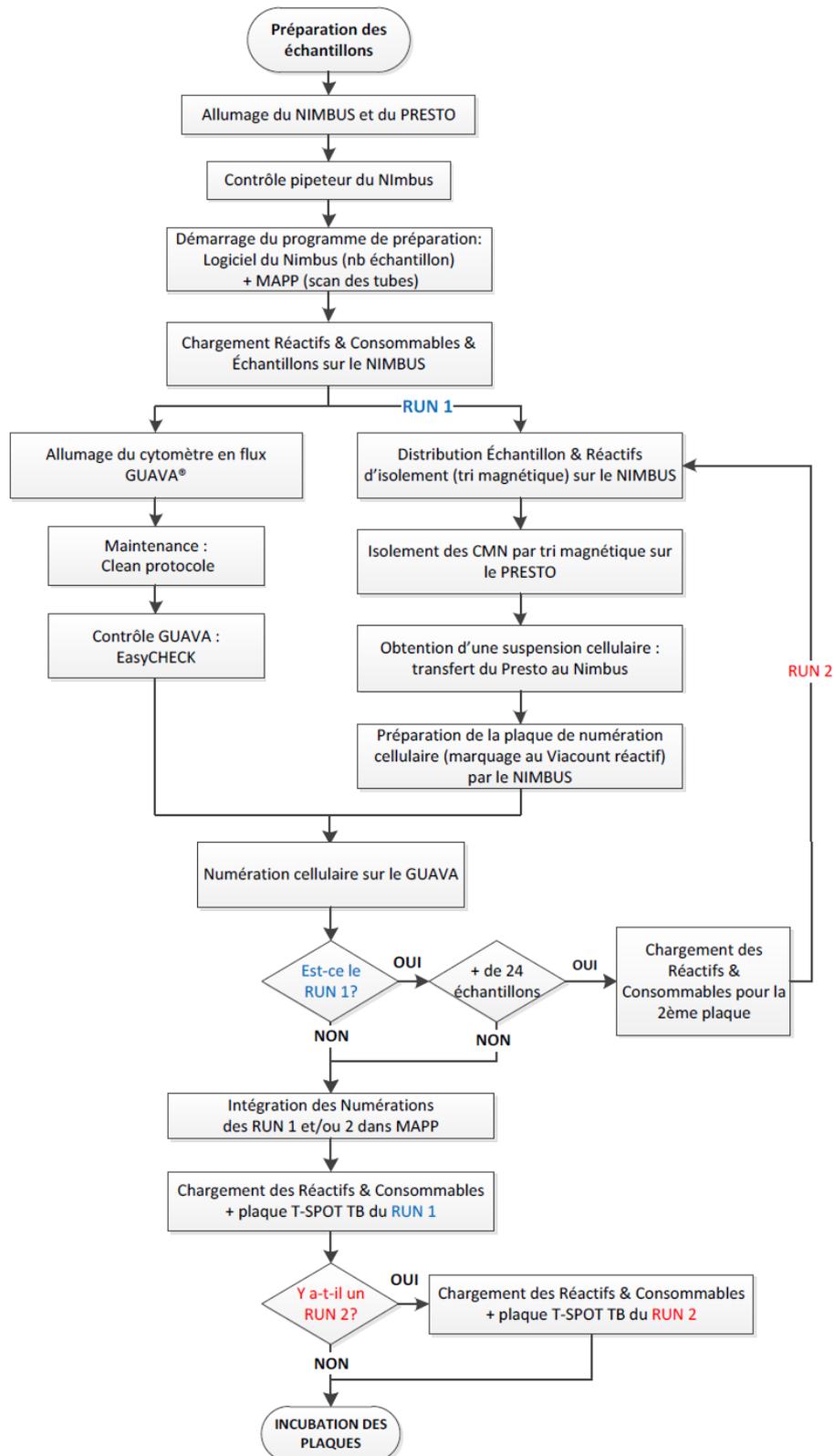
180. Garazzino S, Galli L, Chiappini E, Pinon M, Bergamini BM, Cazzato S, et al. Performance of interferon- γ release assay for the diagnosis of active or latent tuberculosis in children in the first 2 years of age: a multicenter study of the Italian Society of Pediatric Infectious Diseases. *Pediatr Infect Dis J*. 2014 Sep;33(9):e226-231.
181. Basu Roy R, Sotgiu G, Altet-Gómez N, Tsolia M, Ruga E, Velizarova S, et al. Identifying predictors of interferon- γ release assay results in pediatric latent tuberculosis: a protective role of bacillus Calmette-Guerin?: a pTB-NET collaborative study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012 Aug 15;186(4):378–84.
182. Farhat M, Greenaway C, Pai M, Menzies D. False-positive tuberculin skin tests: what is the absolute effect of BCG and non-tuberculous mycobacteria? *Int J Tuberc Lung Dis Off J Int Union Tuberc Lung Dis*. 2006 Nov;10(11):1192–204.
183. Graham NM, Nelson KE, Solomon L, Bonds M, Rizzo RT, Scavotto J, et al. Prevalence of tuberculin positivity and skin test anergy in HIV-1-seropositive and -seronegative intravenous drug users. *JAMA*. 1992 Jan 15;267(3):369–73.
184. ANSM. Résumé des caractéristiques du produit : IMUKIN 2 X 106 UI (0,1 mg), solution injectable [Internet]. 2012 [cited 2021 Apr 5]. Available from: [http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/rcp/R0214464.htm#:~:text=Solution%20injectable.,chronique%20\(voir%20rubrique%204.4\)](http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/rcp/R0214464.htm#:~:text=Solution%20injectable.,chronique%20(voir%20rubrique%204.4)).
185. Gaur RL, Pai M, Banaei N. Impact of blood volume, tube shaking, and incubation time on reproducibility of QuantiFERON-TB gold in-tube assay. *J Clin Microbiol*. 2013 Nov;51(11):3521–6.
186. Banaei N, Gaur RL, Pai M. Interferon Gamma Release Assays for Latent Tuberculosis: What Are the Sources of Variability? *J Clin Microbiol*. 2016 Apr;54(4):845–50.
187. Doberne D, Gaur RL, Banaei N. Preanalytical delay reduces sensitivity of QuantiFERON-TB gold in-tube assay for detection of latent tuberculosis infection. *J Clin Microbiol*. 2011 Aug;49(8):3061–4.
188. Carcelain G. Tests IGRAs (Interferon Gamma Release Assays) : du principe des tests à leur interprétation. Cours DES immunologie, phase socle. Module 6 : déficits immunitaires presented at; 2018.
189. Metcalfe JZ, Cattamanchi A, McCulloch CE, Lew JD, Ha NP, Graviss EA. Test variability of the QuantiFERON-TB gold in-tube assay in clinical practice. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013 Jan 15;187(2):206–11.
190. Slater M, Parsonnet J, Banaei N. Investigation of false-positive results given by the QuantiFERON-TB Gold In-Tube assay. *J Clin Microbiol*. 2012 Sep;50(9):3105–7.
191. institut d'immunologie [Internet]. <http://biologiepathologie.chru-lille.fr>. [cited 2021 Feb 4]. Available from: <http://biologiepathologie.chru-lille.fr/institutimmunologie/>
192. UF 9879 : Déficiences immunitaires et immunothérapies [Internet]. biologiepathologie.chru-lille.fr. [cited 2021 Feb 4]. Available from: <http://biologiepathologie.chru-lille.fr/institutimmunologie/1149178.php>
193. Article L6211-2 - code de la santé publique [Internet]. Légifrance. [cited 2021 Feb 4]. Available from: https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000021708778

194. Hofman V, Ilie M, Gavric-Tanga V, Lespinet V, Mari M, Lassalle S, et al. Role of the surgical pathology laboratory in the pre-analytical approach of molecular biology techniques. *Ann Pathol.* 2010 Apr;30(2):85–93.
195. Trauet J, Lekeux V, Demaret J. Procédure interne du laboratoire d'immunologie, déficits immunitaires et immunothérapies (UF 9879) - ANA-FI-IMC-053 : Réalisation du test T-SPOT.TB. 2020.
196. Trauet J, Lekeux V, Demaret J. Procédure interne du laboratoire d'immunologie, déficits immunitaires et immunothérapies (UF 9879) - ANA-MO-IMC-011: Nimbus-Presto, mode opératoire. 2020.
197. Trauet J, Lekeux V, Demaret J. Procédure interne du laboratoire d'immunologie, déficits immunitaires et immunothérapies (UF 9879) - ANA-MO-IMC-0120 : cytomètre en flux guava, mode opératoire. 2020.
198. Trauet J, Lekeux V, Demaret J. Procédure interne du laboratoire d'immunologie, déficits immunitaires et immunothérapies (UF 9879) - ANA-MO-IMC-013: Lecteur ELISPOT CTL reader – mode opératoire. 2020.
199. Demaret J, Top I, Varlet P. Procédure interne du laboratoire d'immunologie, déficits immunitaires et immunothérapies (UF 9879) - ANA-FI-IMC-035 : Validation biologique des tests immunologiques de quantification de production d'interféron gamma (Quantferon/TB SPOT). 2020.
200. Trauet J, Lekeux V, Meleszka M-T, Demaret J. Procédure interne du laboratoire d'immunologie, déficits immunitaires et immunothérapies (UF 9879) - ANA-PG-IMC-012: Etapes analytiques et post-analytiques des tests IGRAs (QuantiFERON + T-SPOT TB). 2020.
201. Lekeux V, Cracco P, Demaret J. Procédure interne du laboratoire d'immunologie, déficits immunitaires et immunothérapies (UF 9879) - PRA-PG-IMC-011: Etapes pré-analytiques des tests IGRAs (QuantiFERON). 2019.
202. Trauet J, Rubeck C, Betrancourt V, Deleplanque A-S. Procédure interne du laboratoire d'immunologie, déficits immunitaires et immunothérapies (UF 9879) - ANA-FI-IMC-026 : Réalisation du dosage du quantiFERON sur l'automate DS2. 2018.
203. Trauet J, Lekeux V, Demaret J. Procédure interne du laboratoire d'immunologie, déficits immunitaires et immunothérapies (UF 9879) - ANA-FI-IMC-058: Isolement de cellules mononucléées par gradint de densité. 2018.
204. Trauet J, Lekeux V, Lefevre G. Procédure interne du laboratoire d'immunologie, déficits immunitaires et immunothérapies (UF 9879) - ANA-FI-IMC-050: Réalisation de la numération d'une suspension cellulaire par cytométrie en flux. 2018.
205. Trauet J, Lekeux V, Cracco P, Demaret J. Procédure interne du laboratoire d'immunologie, déficits immunitaires et immunothérapies (UF 9879) - ANA-FI-IMC-061: Lecture du test T-SPOT TB sur le lecteur C.T.L. 2018.
206. Kweon OJ, Lim YK, Kim HR, Kim T-H, Lee M-K. Evaluation of Standard E TB-Feron Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection in Health Care Workers. *J Clin Microbiol.* 2019 Dec;57(12).

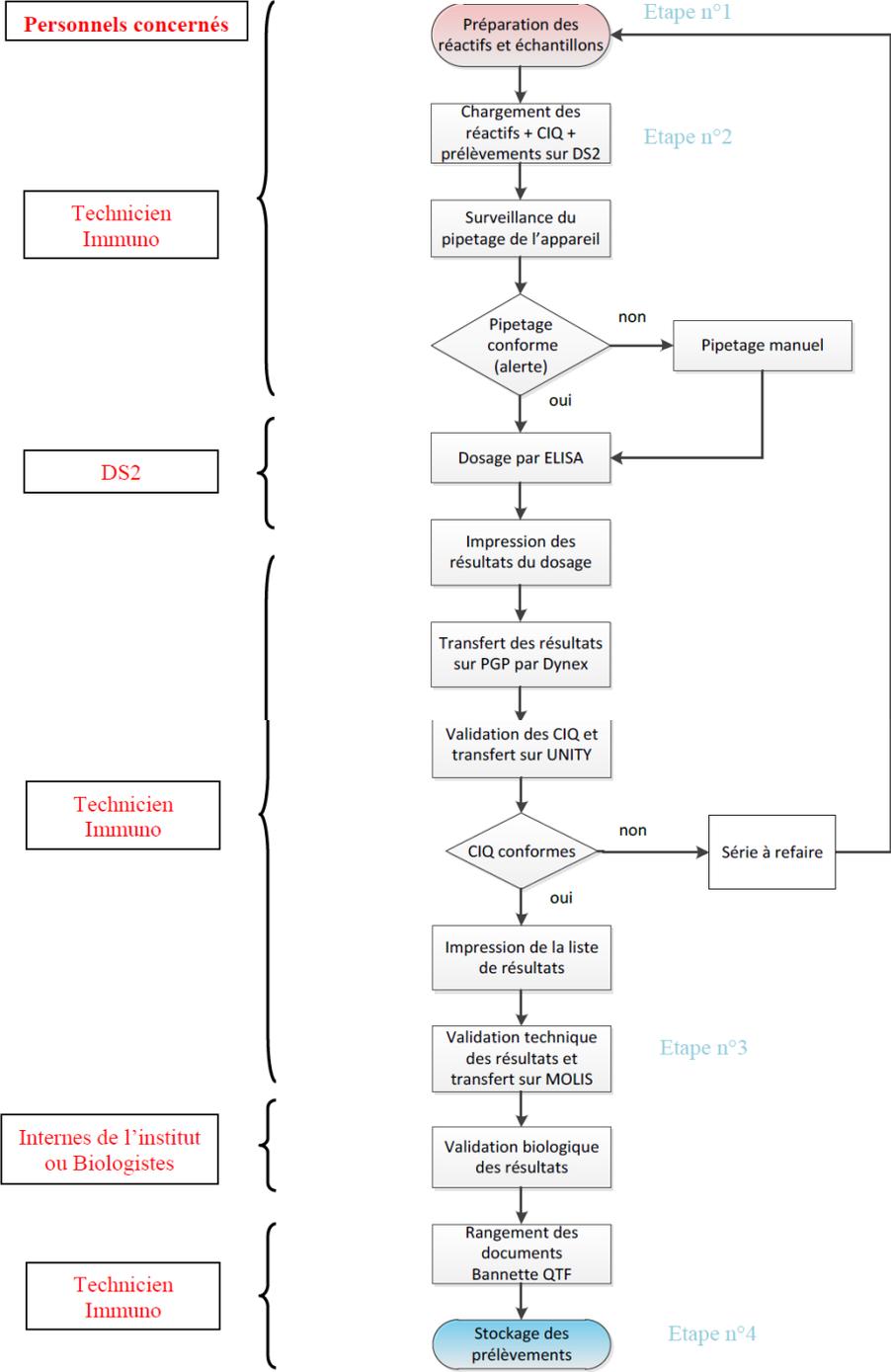
207. Demaret J, Deleplanque A-S, Lekeux V. Evaluation of a new kit for the detection of interferon-gamma production for the immunological diagnosis of latent tuberculosis (IGRA-ELISA test). Université de Lille.
208. Jung J, Jhun BW, Jeong M, Yoon SJ, Huh HJ, Jung CW, et al. Is the New Interferon-Gamma Releasing Assay Beneficial for the Diagnosis of Latent and Active Mycobacterium tuberculosis Infections in Tertiary Care Setting? *J Clin Med*. 2021 Mar 29;10(7).
209. DiaSorin LIAISON® QuantiFERON-TB Gold Plus [Internet]. [cited 2021 Apr 12]. Available from: <https://www.quantiferon.com/products/liaison-quantiferon-tb-gold-plus/>
210. Journal officiel de la République Française. Décision du 24 mai 2017 de l'Union nationale des caisses d'assurance maladie relative à la liste des actes et prestations pris en charge par l'assurance maladie. Sect. Tests immunologiques de dépistage de l'infection tuberculeuse latente par quantification de la production d'interféron gamma, SSAU1715474S Jun 22, 2017 p. 3.
211. Sundararaman S, Karulin AY, Ansari T, BenHamouda N, Gottwein J, Laxmanan S, et al. High Reproducibility of ELISPOT Counts from Nine Different Laboratories. *Cells*. 2015 Jan 9;4(1):21–39.
212. Kim TY, Chang HE, Lee S-W, Seo SH, Hong YJ, Park JS, et al. A novel strategy for interpreting the T-SPOT.TB test results read by an ELISPOT plate imager. *PloS One*. 2019;14(9):e0222920.

Annexes

Annexe 1 : Organigramme du JOUR 1 de la réalisation du test T-SPOT.TB® avec extraction automatisée des CMN du sang à l'Institut d'Immunologie du CHU de Lille (195).



Annexe 2 : Logigramme résumant les étapes des phases analytiques et post-analytique des tests QFT®-Plus à l'Institut d'Immunologie du CHU de Lille (200).



Annexe 3 : Listes du matériel et consommables complémentaires nécessaires à la réalisation des tests IGRAs à l'Institut d'Immunologie du CHU de Lille.

1. Test T-SPOT.TB® (Oxford Immunotech) avec extraction automatisée des CMN du sang

Consommables :

- Milieu de culture AIM V
- Milieu de culture RPMI
- Tampon phosphate salin (*phosphate buffered saline*, PBS) pH 7.4
- Guava ViaCount Reagent (pour la numération cellulaire en CMF)
- Guava ICF (nettoyage)
- Kit EasyCheck calibrateur (CQI du cytomètre en flux Guava)
- Flowcell (Guava)
- Capillaire Guava (pièce détachée)
- 0,5 mL Guava tubes
- 1,5 mL Guava tubes
- Microplaques de 96 puits à fond rond
- Microplaques de 96 puits à fond conique (V)
- Tubes Falcon® 50 mL
- Tubes Falcon® 15 mL
- Pointes 1000 µL STARLET pour Nimbus-Presto
- Pointes 300 µL STARLET pour Nimbus-Presto
- Plaques de dilution des cellules de 96 puits (96 wells DWP)
- Filtre pour plaque de 96 puits (96 wells Sieve plate)
- Plaque de dilution du sang de 24 puits (24 wells DWP)
- Plaques à peigne 24 puits (24 wells DWP with tip comb (thermo))
- Flacon réactif pour Nimbus 50-60 mL
- Flacon conique réactif 5 mL
- Réservoirs non stériles 25 mL

2. Test QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT®-Plus)

Matériel :

- Incubateur à 37°C +/- 1°C sans CO2 (BINDER)
- Centrifugeuse
- Vortex
- Agitateur
- Pipettes Gilson 100 µL, 200 µL, 1000 µL

Consommables :

- Kit réactif 2 x 192 tests : kit dosage IFN γ QuantiFERON-TB Gold (QIAGEN)
- CQI : pools « maison » constitués à partir d'un sérum humain AB auquel est ajouté de l'IFN γ à trois concentrations, correspondant à trois niveaux différents : low/medium/high (aliquots congelés).
- Eau distillée

- Tubes à hémolyse 2 mL
- Embouts de pipette 200 µL et 1000 µL
- Embout pour automate DS2
- Flacons de 25 mL et de 15 mL

3. Test T-SPOT.TB® (Oxford Immunotech) avec extraction manuelle des CMN du sang

Matériel :

- Cytomètre en flux Navios (Beckman Coulter)
- Lecteur ELISpot CTL Immunoscan + logiciel TB SCAN
- Clé USB (pour impression du compte-rendu)
- Poste de sécurité microbiologique (PSM) type 2
- Centrifugeuse
- Réfrigérateur
- Pipettes 10 µL, 20 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL
- Mutipette plus
- Pipet boy

Consommables :

- Milieu de culture AIM-V
- Milieu de culture RPMI
- Tampon phosphate salin (phosphate buffered saline, PBS) pH 7.4
- Eau physiologique
- Milieu de séparation des lymphocytes
- Divers embouts stériles pour pipettes
- Divers embouts stériles pour pipetman
- Pipettes de transfert stériles
- Pots à coproculture
- Tube Falcon 50 mL stérile
- Tubes à cytométrie en polypropylène
- Pipettes et pointes adaptées
- Billes Flow Count
- Mix d'anticorps T4T8 (position n°1 sur le préparateur PrepPlus), dont la composition est la suivante :
 - CD45 Krome Orange Beckman Coulter B36294 – 1,25 µL/test
 - CD3 FITC Beckman Coulter A07746 – 2,5 µL/test
 - CD4 Pacific Blue Beckman Coulter B49197 – 0,6 µL/test
 - CD8 APc Blue Beckman Coulter A99023 – 0,6 µL/test

Annexe 4 : Unités de soins du CHU de Lille et sites extérieurs prescripteurs des tests IGRAs analysés de ce travail de thèse.

CHU de Lille				services prescripteurs des tests IGRA			
CHU de Lille				hôpitaux et laboratoires extérieurs			
Pôle	Service	code UF	Secteur/unité	Hôpital/laboratoire	code UF	service (si connu)	
Santé publique, pharmacie et pharmacologie	Médecine du travail	619	Médecine du travail personnel hospitalier Huriez	CH de Béthune	BE0313	Médecine du travail	
					BE7003	HJ gastroentérologie	
					BE8219	Consultation pédiatrie	
Spécialités médicales et oncologiques	Dermatologie	1281	HC dermatologie	CH de Roubaix	RB0142	IRM	
		1283	HS dermatologie		RB0317	Urgences adultes	
		1287	HJ dermatologie		RB0367	Consultations externes	
		1328	Consultation dermatologie		RB1123	Hospitalisation pédiatrie	
		1300	HC UHSI		RB1125	Urgences pédiatrie	
	Unité de consultations et de soins ambulatoires (UCSA)	1306	UCSA site d'Annoeuillin				
		1308	UCSA site de Sequedin				
	Maladies du sang (MDS)	1405	HC MDS- greffe			RB1437	ORL externe
		1408	Consultations MDS			RB3034	HJ traumatologie
		1421	SC MDS pré et post greffe			RB3247	Gynécologie externe
		1423	MDS DOIGT D			RB5013	Hospitalisation gastroentérologie
						RB5033	Neurologie
	Médecine interne	2210	HC immunologie clinique			RB5143	Médecine interne
		2218	Consultation immunologie clinique			RB6057	Rhumatologie externe
		2220	Médecine interne A			RB7777	Service du personnel
2222		HC médecine interne		RB9878			
2227		HJ médecine interne		RB9773	Hospitalisation hématologie		
Maladies infectieuses	2228	Consultation médecine interne		SE1240	Cardiologie		
	2230	Consultation maladies infectieuses		SE2300	Gastroentérologie		
	2300	HC maladies infectieuses		SE4240	SSR		
	2250	HC médecine polyvalente post-urgences		SE7821	Consultations rhumatologie		
				SE9620	Médecine du travail		
				Centre Oscar Lambret	E12		
				CH de Cambrai	E5		
Pôle médico-chirurgical et spécialités médico-chirurgicales	Gastro-entérologie adulte – Maladies de l'appareil digestif	1440, 1445	HC MAD Lambling	Abej Solidarité - Capinghem	E190		
		1446	HS MAD	CH d'Abbeville	E190		
		1448	Consultation MAD	CH d'Arras	E190		
		1454	SI MAD		E190		
						E190	
	Endocrinologie	7041	HS EDMN	CH de Bar le Duc	E190		
		7042	HC EDMN C et D	CH de Boulogne sur mer	E190		
		7043	HC EDMN A et B		E190		
		1771	HC ophtalmologie	CH de Calais	E190		
		1777	HJ ophtalmologie		E190		
	Ophtalmologie	1778	Consultation ophtalmologie	CH de Dunkerque	E190		
				CH intercommunal Montdidier-Roye	E190		
				CH de Lens	E190	Centres hospitaliers ou laboratoires reliés au service des analyses extérieures (AE) du CHU de Lille	
		1780	Urgences ophtalmologie		E190		
						E190	
Néphrologie	5074	Consultation suivi de greffe	CH de Saint Die	E190			
	5077	HJ suivi de greffe	CH de Saint Omer	E190			
	3031	HC neuropédiatrie	CH de Sambre-Avesnois	E190			
	4205	HC hématologie pédiatrique	CH de Saverne	E190			
	4207	SI hématologie pédiatrique	CH Valenciennes	E190			
Neurologie pédiatrique	4243	HC Gastro-entérologie et hépatologie	GCS HOSPIBIO - Armentières	E190			
	4244	HC pneumologie et allergologie pédiatrique	GCS HOSPIBIO - Hazebrouck	E190			
	4244	HC néphrologie et maladies métabo. pédiatrique	Hôpital Rober Pax - Sarreguemines	E190			
	4251	HC réanimation pédiatrique		E190			
	3091	accueil orientation urgences pédiatriques	Laboratoire Biocentre site de Roncq	E190			
Hématologie pédiatrique	3092	HCD urgences pédiatriques	Laboratoire Biocentre site de Tourcoing	E190			
			centre	E190			
			Laboratoire Biocentre site de Tourcoing les Francs	E190			
			Laboratoire Biocentre site de Bondues	E190			
			Laboratoire Biochâlons - Châlons-en-Champagne	E190			
pôle enfant	Pédiatrie générale et infectiologie pédiatrique	4234	Consultation pédiatrie	Laboratoire CBNA site de Douai	E190		
		4237	HJ pédiatrie	Médecins Solidarité Lille (MSL)	E190		
	Gastro-entérologie, hépatologie	4242	HC Gastro-entérologie et hépatologie				
	Pneumologie et allergologie pédiatrique	4243	HC pneumologie et allergologie pédiatrique				
	Néphrologie pédiatrique	4244	HC néphrologie et maladies métabo. pédiatrique				
pôle urgences	Réanimation pédiatrique	4251	HC réanimation pédiatrique				
		3091	accueil orientation urgences pédiatriques				
		3092	HCD urgences pédiatriques				
		3250	HC neurologie D				
		3258	Consultation neurologie D				
Neurosciences et appareil locomoteur	Neurologie	3271	HC neurologie A 4				
		3272	HC neurologie A nord				
		3278	Consultation neurologie A				
		3281	HC neurologie B				
		3303	SI neurovasculaire				
	Rhumatologie	3717	HJ neurologie				
		3803	HC neurochirurgie pédiatrique C				
		3261	HC rhumatologie				
		3267	HJ rhumatologie				
		3268	Consultation rhumatologie				
	Réanimation	Réanimation	3330	Réanimation D			
			3332	Réanimation C			
			5343	Réanimation B			
			5344	Réanimation A			
		Unité d'accueil de déchoquage médical – Toxicologie (UADM)	7630	Réanimation cardio-vasculaire			
Gérontologie	Médecine gériatrique	5087	UADM				
		5349	SI UADM				
	Rééducation gériatrique	3711	HC médecine gériatrique sud				
		3715	HC médecine gériatrique ouest				
		8743	HC SSR gériatrique polyvalent				
Pôle cardiovasculaire et pulmonaire	Pneumologie et Immuno-Allergologie (PIA)	5301	HC PIA C				
		5302	HC PIA B				
		5307	HJ PIA				
		5318	Consultation pneumologie				
		7532	HC cardiologie sud				
Cardiologie	7537	HJ cardiologie					
	7532	HC chirurgie cardiaque					
	7643	SI cardio-vasculaire					
Rééducation, réadaptation et soins de suite	Médecine physique et de réadaptation (MPR)	8020	HC MPR appareil locomoteur				

Annexe 5 : « Flash info » émis par l'Institut d'Immunologie dans le cadre du changement de technique de première intention pour les tests IGRAs, à destination des services prescripteurs du CHU de Lille et des sites extérieurs

INSTITUT D'IMMUNOLOGIE
Centre de Biologie-Pathologie
Boulevard du Prof. J. Leclercq
59037 LILLE CEDEX



**Centre Hospitalier Régional
Universitaire de Lille**

Lille, le 10 février 2020

Chef de service
Pr Myriam LABALETTE

Secrétariat Hospitalier
Sylvie FIEVET
☎ 03.20.44.55.72
Fax 03.20.44.69.54
sylvie.fievet@chru-lille.fr

Secrétariat Universitaire
Yamina BENALLAL
☎ 03.20.62.34.10
Fax 03.20.62.68.93
yamina.benallal@chru-lille.fr

Maladies auto-immunes
Allergies
Immunoglobulines & Système du Complément
Dr Sylvain DUBUCQUOI
Dr Stéphanie ROGEAU
Dr A-Sophie DELEPLANCQUE
Dr Benjamin LOPEZ

Déficits immunitaires
Immunothérapies
Syndromes hyperéosinophiliques
Pr Myriam LABALETTE
Dr Guillaume LEFÈVRE
Dr Isabelle TOP
Dr Pauline VARLET
Dr Julie DEMARET

Histocompatibilité - HLA
Pr Myriam LABALETTE
Dr Isabelle TOP
Dr Vincent ELSERMANS
Dr Pauline VARLET

Secrétariat - HLA
Pascale GAUTHIEZ
☎ 03.20.44.54.08
Fax 03.20.44.43.89
pascale.gauthiez@chru-lille.fr

Objet : information sur le changement de technique principale pour les tests IGRAs

Cher Professeur, cher Docteur, cher Collègue,

Nous nous adressons à vous en tant que prescripteur de **Tests IGRAs pour le diagnostic immunologique de la tuberculose latente**.

Nous vous informons qu'**à partir du 17 février 2020**, les tests IGRAs seront réalisés **en première intention par technique ELISPOT (test T-SPOT.TB®)**, et en cas d'impossibilité, par technique ELISA (test Quantiferon®).

Ce changement simplifie les modalités de prélèvement : **1 seul tube de 7mL sur héparinate de lithium** suffit et **l'envoi se fait à température ambiante**. Ne plus prélever sur les tubes réactifs Quantiferon®.

De ce fait, la prescription d'un test IGRA se fera par le **code CIRUS = TBSPOT**.

Nous vous rappelons que les tests IGRAs (T-SPOT TB® et Quantiferon®) sont inscrits à la NABM et remboursés par la sécurité sociale lorsqu'ils répondent aux indications de prescription (*enfants migrants de moins de 15 ans, patients infectés par le VIH, avant la mise en route d'un traitement par anti-TNF, aide au diagnostic de tuberculose paucibacillaire en cas de diagnostic difficile chez l'enfant ou de tuberculose extra pulmonaire*).

Pouvez-vous s'il vous plait transmettre ces informations aux équipes médicales de votre service ?

Pour tout renseignement, vous pouvez contacter : les chargées de clientèle (Mme Catherine Sosnowski p30064), la cadre du service de notre laboratoire (Mme Elise Boucly p29599).

Nous vous remercions de votre compréhension et restons à votre disposition pour toute question.

Bien cordialement,

Pr M. Labalette
Dr J. Demaret

Réseau Eosinophile
Sylvie FIEVET
☎ 03.20.44.55.72
Dr Guillaume LEFÈVRE
reseau.eosinophile@chru-lille.fr

AUTEUR : Nom : LEZIER (née DECHAUX-BLANC)

Prénom : Doriane

Date de soutenance : 4 juin 2021

Titre de la thèse : Mise en place du test T-SPOT.TB[®] automatisé pour le dépistage de la tuberculose latente : expérience de l'Institut d'Immunologie du CHU de Lille

Thèse - Médecine - Lille - 2021

Cadre de classement : Immunologie

DES + spécialité : DES de biologie médicale

Mots-clés : tuberculose ; infection tuberculeuse latente ; test IGRA ; ELISpot ; T-SPOT.TB[®]

Résumé :

Contexte : L'infection tuberculeuse latente (ITL) demeure un problème majeur de santé publique, touchant actuellement près d'un quart de la population mondiale. L'ITL constitue un réservoir important de cas émergents dans les pays à faible incidence de tuberculose, d'où la nécessité de pouvoir la dépister efficacement. En 2020, l'Institut d'Immunologie du CHU de Lille est devenu le premier laboratoire français à utiliser la technique ELISpot en première intention pour le diagnostic de l'ITL, remplaçant l'ELISA utilisé jusqu'alors. L'objectif de ce travail est de fournir un retour d'expérience sur le passage à l'automatisation du test T-SPOT.TB[®].

Méthode : Ce travail s'intéresse aux actions menées par le laboratoire dans le cadre du changement de méthode aux phases pré-analytique, analytique et post-analytique entre septembre 2019 et octobre 2020. Les tests étudiés sont le test T-SPOT.TB[®] dans sa version automatisée (plateforme incluant le préparateur d'échantillons Microlab[®] Nimbus-Presto, le cytomètre en flux Guava[®], le lecteur de plaque ELISpot CTL reader, le logiciel MAPP) et manuelle (isolement par gradient de densité) et le test QFT[®]-Plus (station ELISA automatique DS2[®]).

Résultats : Le passage au test T-SPOT.TB[®] automatisé a été effectif au 17/02/2020. Un total de 962 tests T-SPOT.TB[®] et 661 tests QFT[®]-Plus ont été pris en charge par le laboratoire d'immunologie cellulaire entre le 17/02/2020 et le 31/05/2020. On dénombre entre 20 et 30% d'échantillons T-SPOT.TB[®] non conformes les premières semaines, contre 10% en moyenne à la fin du mois de mai. Le rendement de l'isolement des CMN par le Nimbus-Presto est de 27,5 % (\pm 10,4%)(n=134), aboutissant à un test non réalisable pour 5 à 10% des prélèvements traités par la plateforme. On rapporte 3,8% de résultats indéterminés en ELISA (n=25) contre 2,8% en ELISpot (n=15), systématiquement en lien avec un contrôle négatif ininterprétable pour l'ELISpot.

Conclusion : Le défi représenté par l'automatisation de l'ELISpot pour le dépistage de l'ITL a été relevé avec succès par l'Institut d'Immunologie du CHU de Lille. La technologie apportée par la plateforme ELISpot promet l'ouverture de nouvelles perspectives pour le laboratoire.

Composition du Jury :

Présidente : Mme le Pr. Myriam LABALETTE

Assesseures : Mme le Pr. Guislaine CARCELAIN

Mme le Pr. Sophie CANDON

Directrice de thèse : Mme le Dr. Julie DEMARET