

THESE

En vue de l'obtention du : **DOCTORAT**

Structure de Recherche : Biotechnologies Végétale et Microbienne, Biodiversité et Environnement (BioBio)

Discipline : Biologie

Spécialité : Immunologie

Présentée et soutenue le 13/10/2022 par :
Karima SAHMOUDI

Étude de la réponse immune à la tuberculose : exemple de la réponse spécifique au niveau du site d'infection au cours de la tuberculose ganglionnaire

JURY

Jamaledine BOURKADI	PES	Université Mohammed V, Faculté de Médecine et de Pharmacie - Rabat	Président
Youssef BAKRI	PES	Université Mohammed V, Faculté des Sciences -Rabat	Rapporteur/ Examineur
Mustapha MISSBAH EL IDRISSI	PES	Université Mohammed V, Faculté des Sciences - Rabat	Rapporteur/ Examineur
Abdellah El Habazi	PES	Université Chouaïb Doukkali, Faculté des Sciences - El Jadida	Rapporteur/ Examineur
Rajae EL AOUAD	PES	Ex Pr, Université Mohammed V, Faculté de Médecine et de Pharmacie - Rabat Académie Hassan II des Sciences et Techniques	Examinatrice
Fouad SEGHROUCHNI	Dr	Institut National d'Hygiène, Laboratoire d'Immunologie Cellulaire - Rabat	Co-encadrant
Abderrahim SADAK	PES	Université Mohammed V, Faculté des Sciences – Rabat	Directeur de thèse

Année Universitaire : 2022/2023

DÉDICACES

Pour tous leurs conseils, soutien et surtout leur amour inconditionné, cette thèse est dédiée à ma famille.

En particulier, mon défunt père et ma mère, merci pour tous vos sacrifices et d'avoir toujours cru en moi. Je suis aujourd'hui là grâce à vous et pour vous. J'espère vous rendre toujours fière de moi.

Mes grandes sœurs Rkia, Naima et Fatima, mes frères El mostafa et Mohammed vous étiez l'exemple pour moi tant dans les études que dans la vie. Merci pour votre support et d'être présent sous toutes conditions. Sans votre soutien je n'aurais pas pu aller au bout de mes projets.

Mes chères nièces et neveux: Kaoutar, Abdenmour, Reda, Hatim, Anas, Hiba, Rayan, Esin et Kursad, merci d'avoir rempli ma vie d'amour.

Mes beaux frères Said et Mustapha et ma belle-sœur Fadma, merci pour votre constant intérêt et soutien.

Mon mari, Farhan, merci pour ton support, d'avoir su gérer mes dépressions et de m'avoir submergé d'amour.

A ma belle famille, Merci pour votre amour et vos encouragements

A tous mes amis et spécialement ma meilleure amie Fatima HOUZANE, merci pour les bons moments que nous avons partagé ensemble.

REMERCIEMENT

A la fin de cette thèse, je tiens à remercier vivement toutes les personnes qui ont contribué à sa concrétisation. Je tiens à remercier :

Mr Abdelaziz BENHOUSA, PES à la Faculté des Sciences de Rabat et responsable de Structure de Recherche « Biotechnologies Végétale et Microbienne, Biodiversité et Environnement (BioBio) », pour m'avoir permis d'intégrer leur équipe pour ce projet de thèse.

Dr Seghrouchni Fouad, Responsable du Laboratoire d'Immunologie Cellulaire à l'Institut National d'Hygiène de Rabat, Merci de m'avoir accueilli dans votre laboratoire, d'être toujours disponible, à l'écoute de mes nombreuses questions et d'avoir encadré ce travail jusqu'au petit détail. Plus qu'un encadrement scientifique vous étiez une source constante d'encouragement pour moi. Je tiens à vous exprimer mon profond respect.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements au **Dr Canaday David** pour m'avoir permis d'intégrer son laboratoire à l'université de Case Western Reserve de Cleveland Ohio aux Etats Unies d'Amérique et bénéficier d'une formation de pointe en cytométrie de flux, ce qui s'est avéré une expérience très enrichissante dans mon parcours. Votre rigueur dans l'analyse des résultats et les nombreuses discussions que nous avons eues sont pour beaucoup dans le résultat final de ce travail.

Mr Sadak Abderahim, PES à la Faculté des Sciences de Rabat, pour avoir accepté de me m'encadrer et de son suivi permanent de mon travail. Merci pour vos précieux conseils et de la confiance que vous avez mis en moi en me donnant beaucoup de liberté sous votre direction. J'espère que ce travail soit à la hauteur de cette confiance.

Mr Bourkadi Jamaledine, PES à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, pour votre contribution au projet IMMGEN et d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse. Je vous exprime ma plus haute considération.

Mr Bakri Youssef, PES à la Faculté des Sciences de Rabat, pour m'avoir fait l'honneur en acceptant de rapporter cette thèse et de juger ce travail. Je tiens à vous exprimer mon profond respect.

Mr Missbah El Idrissi Mustapha, PES à la Faculté des Sciences de Rabat, d'avoir accepté d'être parmi les rapporteurs de cette thèse et de critiquer ce travail. Je tiens à vous exprimer mon profond respect.

Mr El Habazi Abdellah, PES à la Faculté des Sciences d'El Jadida, pour m'avoir initié à l'immunologie et de m'avoir orienté vers le laboratoire du Dr Seghrouchni pour réaliser cette thèse. Je suis très honorée par votre présence dans ce jury de soutenance en tant que rapporteur et examinateur.

Mme El Aouad Rajae, Ex PES, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Mohammed V, Rabat, membre de Académie Hassan II des Sciences et Techniques et principal investigateur du projet IMMGEN. Je tiens à vous remercier pour m'avoir permis d'intégrer le projet IMMGEN ainsi d'avoir accepté de faire partie de ce jury en tant qu'examinatrice. Je voudrais exprimer ma sincère gratitude.

Je remercie tous les thésards du Laboratoire d'immunologie cellulaire avec qui j'ai eu l'occasion de travailler pour la bonne ambiance de travail, et également tous les thésards du projet IMMGEN pour les bons moments partagés.

Je remercie tous ceux que j'oublie et qui m'ont aidé à la réalisation de ce travail.

AVANT PROPOS

Aucun travail ne peut avoir le jour sans support. Cette thèse est le résultat d'une collaboration étroite entre le Laboratoire de Biodiversité, Ecologie et Génome à la Faculté des Sciences, Université Mohammed V, Rabat et le Laboratoire d'Immunologie Cellulaires à l'Institut National d'Hygiène, Rabat. Ce travail a été réalisé dans le cadre du projet IMMGEN « Etude génomique et immunologique de la TB dans la population marocaine (2015-2020) » financé par l'Académie Hassan II des Sciences. Une partie de cette thèse a été réalisée en collaboration avec la division des maladies infectieuses du département de médecine de l'université Case Western Reserve de Cleveland Ohio aux Etats Unies d'Amérique.

RÉSUMÉ

L'étude de la réponse immunitaire antituberculeuse permettra de comprendre le dysfonctionnement qui se produit lors de l'infection par *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) conduisant à la tuberculose active.

Au cours de cette étude, nous avons établi les valeurs de référence des sous populations lymphocytaires chez la population marocaine. Nous avons ensuite investigué l'altération de cette homéostasie au cours de la tuberculose. Une diminution des lymphocytes T CD4+, CD8+ et CD19+ chez les patients tuberculeux en comparaison aux contrôles a été observée. Les lymphocytes T activés étaient plus abondants chez les patients tuberculeux et dans les formes graves alors que les lymphocytes T mémoires diminuent chez les patients tuberculeux et avec la sévérité de la maladie. Pour avoir une idée de ces altérations au niveau du site d'infection, les cellules mononucléées des ganglions lymphatiques (LNMC) ont été comparées à celles du sang périphérique (PBMC) autologues. Les LNMC ont été enrichies en cellules T CD4+ mémoire effecteur différencié tardif et en Treg par rapport aux PBMC. Ces Treg ont montré une corrélation positive avec les cellules T CD4+ activées et la production de cytokines Th1 après stimulation par l'antigène *Mtb*.

Des recherches plus poussées détermineront le rôle exact des Treg au niveau du site d'infection.

Mots-clefs (5): Tuberculose, Lymphocytes, Réponses Th1/Th17, Treg, ganglions lymphatiques.

ABSTRACT

The study of the anti-tuberculosis immune response will make it possible to understand the dysfunction that occurs during the infection with *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) leading to active tuberculosis.

During this study, we established the reference values of lymphocyte subpopulations in the Moroccan population. We then investigated the alteration of this homeostasis during tuberculosis. A decrease in CD4+, CD8+ and CD19+ T cells in tuberculosis patients compared to controls was observed. Activated T lymphocytes were more abundant in tuberculosis patients and in severe forms, while memory T lymphocytes decrease in tuberculosis patients and with the severity of the disease. To get an idea of these alterations at the site of infection, lymph node mononuclear cells (LNMCs) were compared to autologous peripheral blood cells (PBMCs). LNMCs were enriched in late-differentiated effector memory CD4+ T cells and Tregs compared to PBMCs. These Tregs showed a positive correlation with activated CD4+ T cells and the production of Th1 cytokines after stimulation with the Mtb antigen.

Further research will determine the exact role of Tregs at the site of infection.

Keywords: Tuberculosis, Lymphocytes, Th1 / Th17 responses, Treg, lymph nodes.

Table des matières

DÉDICACES	I
REMERCIEMENT	VI
AVANT PROPOS.....	I
RÉSUMÉ.....	II
ABSTRACT	III
LISTE DES FIGURES	XI
LISTE DES TABLEAUX	XIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XIV
INTRODUCTION.....	1
GÉNÉRALITÉS.....	4
1. Historique de la tuberculose.....	5
2. Épidémiologie	7
2.1. Au niveau mondial	7
2.2. Au Maroc.....	9
3. L'agent pathogène	10
4. Lutte anti-tuberculose :	13
4.1. Diagnostic.....	13
4.2. Traitement	19
4.3. Vaccin	20
5. Aspects pathologique de la tuberculose.....	21
5.1. Risques d'infection par <i>Mtb</i>	21
5.2. De l'infection à la maladie.....	23
6. L'immunité anti-tuberculose	25
6.1. L'immunité innée	26
6.1.1. <i>Mtb</i> et Macrophages.....	26
6.1.2. <i>Mtb</i> et neutrophiles	29
6.1.3. <i>Mtb</i> et Cellules dendritiques.....	30
6.1.4. <i>Mtb</i> et Cellules NK.....	31
6.2. L'immunité adaptative	32

6.2.1.	L'immunité cellulaire.....	32
6.2.1.1.	<i>Mtb</i> et lymphocytes CD4.....	33
6.2.1.2.	<i>Mtb</i> et lymphocytes CD8.....	35
6.2.1.3.	<i>Mtb</i> et lymphocytes mémoires.....	36
6.2.1.4.	<i>Mtb</i> et lymphocytes régulatrices	36
6.2.1.5.	<i>Mtb</i> et cellules Th17.....	38
6.2.1.6.	<i>Mtb</i> et cytokines	38
6.2.1.6.1.	Cytokines pro-inflammatoires	38
6.2.1.6.2.	Cytokines anti-inflammatoires.....	40
6.2.2.	L'immunité humorale.....	40
6.2.3.	La réponse immune anti-tuberculose entre le site d'infection et le sang périphérique	41
OBJECTIFS DE L'ÉTUDE		44
1.	Objectif général.....	45
2.	Objectifs spécifiques	45
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....		46
1.	Méthodologie.....	47
2.	Population de l'étude.....	48
2.1.	Contrôles sains	48
2.2.	Contrôles sains exposés	49
2.3.	Patients atteints de TB active	49
3.	Matériels biologique	51
4.	Investigations techniques	51
4.1.	Analyse phénotypique des sous populations lymphocytaires dans le sang total.....	51
4.2.	Isolement des cellules mononucléées du sang périphérique et du ganglion lymphatique.....	54
4.3.	Étude phénotypique et fonctionnelle des cellules T.....	54
4.4.	Distribution des lymphocytes T activés et des Treg dans les LNMC et PBMC	56
5.	Analyses statistiques.....	58
RÉSULTATS		59
I.	Valeurs de références des sous populations lymphocytaires chez la population marocaine: l'influence de l'âge, le sexe, l'origine ethnique et les facteurs socio-économiques	60

I.1.	Les caractéristiques générales de la population.....	60
I.2.	Valeurs de références des sous population lymphocytaires chez la population Marocaine	60
I.3.	Impact de l'âge sur les valeurs de référence	62
I.4.	Impact du sexe sur les valeurs de référence.....	65
II.	Les caractéristiques immunphénotypique des lymphocytes du sang périphérique, dans les différentes formes de la TB active chez la population des adultes marocains	67
II.1.	Caractéristiques démographiques et bactériologiques de la population de l'étude.....	67
II.2.	Altération de l'homéostasie des lymphocytes dans le sang périphérique chez les patients atteints de TB active	68
II.3.	Analyse phénotypique des états mémoires et marqueurs d'activation des cellules T CD4+ et T CD8 + dans le sang périphérique chez les patients tuberculeux.....	72
III.	Activation immunitaire et lymphocytes T régulateurs dans les ganglions lymphatiques	76
III.1.	Profil phénotypique et cytokine des cellules T CD4 + dans la LNMC et PBMC.....	76
III.2.	Distribution des lymphocytes T activés et des Treg dans les LNMC et PBMC	80
III.3.	Corrélation de Treg avec la production de cytokines induite par les antigènes <i>Mtb</i>	82
	DISCUSSIONS.....	84
I.	Valeurs de références des sous populations lymphocytaires chez la population marocaine: l'influence de l'âge, le sexe, l'origine ethnique et les facteurs socio-économiques.....	85
II.	Les profils immunphénotypiques des lymphocytes du sang périphérique dans les différentes formes de TB active chez les adultes marocains.....	90
III.	Activation immunitaire et lymphocytes T régulateurs dans les ganglions lymphatiques	95
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	98
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	101
	ANNEXES	133
	Annexe 1 : Fiches d'exploitations des patients.....	134
	Annexe 2 : Préparation des cellules mononucléées	148
	Annexe 3 : Conservation des cellules mononucléées.....	150
	Annexe 4 : Cells thawing procedure	151
	Annexe 5 : LN TB 13 color FACS staining Protocol	152
	Annexe 6: T reg staining protocol (Day 0 Experiment)	156

Annexe 7: PUBLICATIONS	158
------------------------------	-----

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Le sanatorium de Ben Smim d'Azrou	6
Figure 2 : Estimation des nouveaux cas de TB dans le monde en 2018.	8
Figure 3 : Distribution proportionnelle de la notification des nouveaux cas de TB par régions en 2015, Maroc.....	9
Figure 4 : Classification des mycobactéries.....	11
Figure 5 : Vue schématique de la paroi du <i>Mtb</i>	12
Figure 6 : Photo de <i>Mtb</i> prise en microscopie électronique.....	13
Figure 7 : Pathogénèse de la TB. Le développement d'une réponse immunitaire innée et adaptative contre l'infection par <i>Mtb</i> entraîne la formation du granulome.....	22
Figure 8 : Le spectre de la TB : de l'infection à <i>Mtb</i> à la TB active (pulmonaire).....	25
Figure 9 : Représentation de la stratégie de fenêtrage par de cytométrie en flux des sous populations lymphocytaire dans le sang périphérique.....	53
Figure 10 : Représentation de la stratégie de fenêtrage par de cytométrie en flux des lymphocytes T mémoires produisant l'IFN γ , TNF α , IL 2, IL17 et MIP1- α au repos et après stimulation par ESAT6/CFP10.	56
Figure 11 : Représentation de la stratégie de fenêtrage par de cytométrie en flux des lymphocytes T CD4+ activées et CD4+ régulatrices.	57
Figure 12 : Changements liés à l'âge des sous populations lymphocytaires	64
Figure 13 : Comparaison des pourcentage (A) et valeurs absolues (B) des lymphocytes T CD3+, T CD4+, T CD8+, B, NK et NKT du sang périphérique des groupes des contrôles sains (CS)(n=101), des sujets sains exposés (EXPO)(n=43) et des patients atteints de TB active TB (n=185), obtenus par cytométrie en flux.....	70
Figure 14 : comparaison des pourcentages (A) et valeurs absolues (B) des lymphocytes T CD3+, T CD4+, T CD8+, B, NK et NKT du sang périphérique des groupes de patients atteints de TB pulmonaire (TBP) (n=134) et de patients atteints de TB pleural (TBEP) (n=33) et de patients atteints de TB ganglionnaire (TBEP)(n=18) obtenus par cytométrie en flux.....	71
Figure 15 : Analyse phénotypique des états mémoires des cellules T CD4+ et T CD8 + dans le sang périphérique chez les patients tuberculeux.	74
Figure 16 : Analyse phénotypique des cellules T CD4+ et T CD8 + activés dans le sang périphérique chez les patients tuberculeux.	75
Figure 17 : Distribution des sous-populations cellulaires T CD4+ (A) et CD8 + (B) .parmi les cellules T CD3 + dans le sang périphérique et dans le ganglion lymphatique chez les patients atteints de TB ganglionnaire.	77

Figure 18 : Distribution des phénotypes mémoire des sous-populations cellulaires T CD4 + des parmi les cellules T CD3 + dans le sang périphérique et dans le ganglion lymphatique chez les patients atteints de TB ganglionnaire.	77
Figure 19 : Production intra-cytoplasmique des cytokines par cellules T CD4 + mémoire viables après stimulation avec le RVL(A) et ESAT6 / CFP10 (B).....	78
Figure 20 : Composition polyfonctionnelle de cellules T CD4 + mémoire totale après stimulation avec le RVL, ESAT6 / CFP10 et SEB.	79
Figure 21 :Distribution des fréquences des cellules T CD4 + HLA-DR + CD38 + activées (A) et FoxP3+ CD25+ CD127- régulatrices (B) dans LNMC et PBMC.....	80
Figure 22 : Corrélation des fréquences ex vivo des Treg avec les fréquences ex vivo des cellules activées par CD4 + dans les PBMC (A) et LNMC (B)	81
Figure 23 : Distribution des marqueurs d'activation parmi les Treg CD4 + CD25 + FoxP3 + CD127dim dans les PBMC et LNMC	82

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Valeurs de référence des sous populations lymphocytaires du sang périphérique.....	61
Tableau 2 : Différences liées à l'âge des sous-populations lymphocytaires du sang périphérique.	63
Tableau 3 : Différences liées au sexe des sous-populations lymphocytaires du sang périphérique.	66
Tableau 4 : Caractéristiques des sujets d'études.....	68
Tableau 5 : Corrélation des fréquences des Treg avec les fréquences des lymphocytes T CD4 ⁺ exprimant IFN γ , IL2, TNF α , IL17 et MIP1 α suite à une stimulation <i>ex-vivo</i> par les antigènes RVL dans les PBMC et LNMC.....	83
Tableau 6 : Comparaison des sous-ensembles de lymphocytes de la présente étude avec d'autres études	86

LISTE DES ABRÉVIATIONS

BAAR : Bacilles acido-alcoolo-résistants

BAL : Lavages broncho-alvéolaires

BCG : Bacille Calmette-Guérin

CFP-10 : Protéine de filtrat de culture - 10

CM : Central mémoire,

CS : Contrôles sains

CTL : Lymphocytes T cytolytiques

DCs : Cellules dendritiques

DOTS : Thérapie sous observation directe

EM : Effecteur mémoire,

ESAT-6 : Cible antigénique sécrétoire précoce-6

EXPO : Sujets sains exposés au *Mtb*

GM-CSF : Facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages

IDR : Intradermo-réaction à la tuberculine

IFN γ : Interféron γ

IGRA : Interféron gamma release assay

IL-10 : Interleukine 10

IL17 : Interleukine 17

IL-2 : Interleukine 2

IL-4 : Interleukine 4

iNOS : Oxyde nitrique synthase inducible

LD : Mémoire différenciées tardives,

LNMC : Cellules mononucléées des ganglions lymphatiques

Mtb: *Mycobacterium tuberculosis*

N: Naïf

NK: Tueuse naturelle

NO : Oxyde nitrique

OMS : Organisation mondiale de la Santé

PBMC : Cellules mononucléées du sang périphérique

PNLAT : Programme National de Lutte Antituberculeuse

PPD : Dérivé protéinique purifié

QFT-G: QuantiFERON-Gold

QTF-GIT: TB Gold In-Tube

RD1 : Région de différence1

RNI : Réactifs intermédiaires de l'azote

ROI : Réactifs intermédiaires de l'oxygène

RP : Revenu personnel

RR : Risque relatif

RVL : Lysat de cellules entières du *Mtb* CDC1551

SEB : Entérotoxine B staphylococcique

TB : Tuberculose

TBEG : TB ganglionnaire

TBEP : TB pleurale

TBL : Infection tuberculeuse latente

TBP : TB pulmonaire

TCR $\alpha\beta$: T cell receptor $\alpha\beta$

TGF β : Transforming growth factor beta

TLR : Récepteurs de type Toll

TM : Lymphocytes T mémoire

TNF α : Facteur de nécrose tumorale α

Treg : T régulateurs

TST : Test cutané à la tuberculine

INTRODUCTION

Au 21^{ème} siècle, malgré près d'un siècle de vaccination par le BCG et le développement de médicaments antituberculeux hautement efficaces, la tuberculose (TB) reste la principale cause de décès par un seul agent infectieux (Ahmed *et al.*, 2021). La maladie est causée par le bacille *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), 10 millions de personnes ont développé la maladie et 1,3 million de personnes en sont décédées (OMS, 2021). Pour aggraver la situation, environ un quart de la population mondiale est actuellement infectée par le *Mtb* (infection tuberculeuse latente: TBL) (Houben & Dodd, 2016). Cependant, seulement 5 à 10 % de ces personnes développeront une maladie active au cours de leur vie (OMS, 2019) ce qui suggère que le système immunitaire est très efficace pour contenir l'infection à *Mtb* chez la plupart des individus. De ce fait, une meilleure compréhension de ce qui constitue une immunité protectrice contre *Mtb* et les limites des réponses immunitaires adaptatives dans la TB sont essentielles pour progresser vers le contrôle de la maladie.

La TB active peut se présenter sous différentes formes selon la localisation clinique telle que la TB pulmonaire, la TB pleurale et la TB des ganglions lymphatiques avec des degrés de gravité très variables (Ankrah *et al.*, 2017). Les différentes manifestations de l'infection reflètent l'équilibre entre le bacille et le mécanisme de défense de l'hôte, dans lequel la qualité de la défense de l'hôte joue un rôle préjudiciable (Flynn & Chan, 2003; Mazzarella *et al.*, 2003). La TB est le prototype des infections qui nécessitent une réponse immunitaire cellulaire pour leur contrôle.

L'immunité protectrice dans la TB dépend principalement des lymphocytes auxiliaires T CD4⁺ qui sont recrutés dans le site de l'infection par les macrophages infectés. Ces derniers stimulent les macrophages pour inhiber la croissance ou tuer les mycobactéries phagocytées (Caruso *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2012; Mogues *et al.*, 2001; Muller *et al.*, 1987). Les lymphocytes T CD4⁺ ont été séparés classiquement en deux classes phénotypiques : Th1 et Th2 qui dérivent de cellules dites Th naïfs, et leur différenciation à partir de cette cellule précurseur peut être sous le contrôle de plusieurs cytokines (Garra *et al.*, 2013; Jasenosky *et al.*, 2015; Kaufmann, 2002). Les cellules Th1 se caractérisent principalement par leur capacité à produire les cytokines pro-inflammatoires

tels que l'interféron ($\text{IFN}\gamma$), le facteur de nécrose tumorale α ($\text{TNF}\alpha$) et l'interleukine 2 (IL2), tandis que les cellules Th2 produisent des cytokines anti-inflammatoires telles que l'interleukine 4 (IL-4), l'interleukine 5 (IL-5), l'interleukine 10 (IL-10) et l'interleukine 13 (IL-13) (Garra *et al.*, 2013; Kaufmann, 2002). Des études expérimentales chez l'animal ont montré que l' $\text{IFN}\gamma$ joue un rôle central dans l'immunité protectrice contre *M. tuberculosis*. Des investigations plus récentes ont associé une tuberculose pulmonaire active moins avancée, en l'absence de lésions cavitaires sur les radiographies thoraciques, à une alvéolite avec des lymphocytes produisant des cytokines Th1 telle que l' $\text{IFN}\gamma$, mais pas des cytokines Th2 (Gideon *et al.*, 2015).

Les cellules Th17, un sous-ensemble distinct des cellules T auxiliaires CD4 ont été identifiées et jouent un rôle essentiel dans l'immunité contre un certain nombre d'agents pathogènes bactériens et fongiques (Curtis & Way, 2009). Elles produisent des cytokines uniques qui sont l'interleukine 17 (IL-17), l'interleukine 21 et l'interleukine 22 (Cruz *et al.*, 2010). Il a été rapporté que l'IL17 avait un rôle très important dans l'amélioration du recrutement des neutrophiles et des cellules T CD4⁺ (Th1) vers le site de l'infection, ce qui est en corrélation avec le contrôle de l'infection à *Mtb* (Curtis & Way, 2009).

Les lymphocytes T cytolytiques (CTL), contribuant également de manière significative à la réponse anti TB, sont primordiaux dans cette protection (Silva *et al.*, 2014). L'importance des lymphocytes T CD8 lors d'une infection à *Mtb* est liée à leur sécrétion de cytokines et de molécules effectrices cytolytiques qui peuvent limiter la réplication bactérienne, tels que l' $\text{IFN}\gamma$ et le $\text{TNF}\alpha$ (Serbina *et al.*, 2000). Elles produisent également des molécules effectrices cytolytiques associées aux granules telles que la perforine pour lyser les macrophages infectés par *Mtb* (Stenger *et al.*, 1997), et les granzymes pour tuer directement le *Mtb* intracellulaire (Ernst *et al.*, 2000; Stenger *et al.*, 1997; Stenger *et al.*, 1998). Les cellules T CD8⁺ interviennent également dans l'induction de l'apoptose des cellules infectées par l'intermédiaire des interactions Fas-FasL (Stenger *et al.*, 1997).

Le système immunitaire utilise les lymphocytes T régulateurs (Treg) pour contrebalancer la réponse inflammatoire excessive durant l'infection *Mtb* (Cardona & Cardona, 2019). La cytokine clé impliquée dans cette fonction immunosuppressive est l'IL-10 (Collison *et al.*, 2007; Moore *et al.*, 2001; Nakamura *et al.*, 2004). Une expansion limitée des Treg peut contribuer à une réponse optimale à *Mtb* caractérisée par une inflammation modulée dans les premières semaines après

l'établissement de l'infection (Mayer-Barber *et al.*, 2011; McNab *et al.*, 2014). Cependant, il existe également des preuves que l'induction précoce des cellules T régulatrices (Treg) retarde les réponses des cellules T effectrices lors de la réponse immune anti TB, ce qui entraîne une altération de l'immunité antituberculeuse (Shafiani *et al.*, 2010).

Malgré les progrès dans l'identification des mécanismes immunitaires protectifs durant la TB, les études sur les réponses immunitaires locales au niveau des différents sites d'infections chez l'homme ont pris du retard (Brighenti & Andersson, 2012), en particulier au niveau des ganglions lymphatiques (Ganchua *et al.*, 2020). La plupart des études sur la TB humaine impliquent des cellules du sang périphérique, qui peuvent ne pas fournir une image représentative des réponses immunitaires spécifiques présentes sur le site de l'organe infecté ou dans le microenvironnement des lésions granulomateuses.

Dans ce contexte, le but principal de cette étude est d'évaluer les changements des sous population dans le sang périphérique des patients marocains adultes ayant différentes manifestations de la TB, ainsi que de caractériser phénotypiquement et fonctionnellement la réponse immune antituberculeuse au niveau du site d'infection dans le cadre de la TB ganglionnaire.

GÉNÉRALITÉS

1. Historique de la tuberculose

Le Mtb, l'ennemi le plus ancien de l'Homme, s'est enraciné profondément dans l'histoire de l'évolution et la migration de la civilisation humaine ainsi qu'avec les origines de la microbiologie.

Les premières preuves archéologiques de la TB chez l'homme sont fournies par des découvertes osseuses montrant le gibbus typique de la maladie de Pott tuberculeux dans les artefacts et les momies égyptiennes dont l'âge est estimé à 5 500 ans. Un ADN unique au complexe *Mtb* a été détecté dans les poumons d'une momie égyptienne (1550- 1080 avant J-C), ainsi que dans le corps d'une momie du Pérou datant d'il y a 1 000 ans (Barberis *et al.*, 2017; Nerlich *et al.*, 1997; Salo *et al.*, 1994).

Les écrits décrivant la TB ont été au commencement trouvés dans des textes de l'Inde et de la Chine remontant respectivement à 3 300 et à 2 300 ans (Daniel, 2006). D'ailleurs, dans les livres bibliques, elle a été mentionnée utilisant le nom schachepeth (Daniel & Daniel, 1999). Dans l'histoire grecque, la TB était qualifiée de «phtisie» (consommation), et elle était notée dans les scripts d'Hippocrate (460 avant J-C) que la TB était bien répandue dans la société grecque et qu'elle était presque toujours mortelle (Barberis *et al.*, 2017). C'est vers 1 839 que Johann Lukas Schönlein propose la terminologie «Tuberculose», en se référant à l'aspect pomme de terre des lésions observées au cours de la maladie active (Lomax, 1977).

Pendant longtemps, la cause de la TB était en grande partie inconnue ; d'une part considérée comme héréditaire puisque plusieurs membres semblaient succomber au sein de la même famille, d'autre part supposée être causée par un agent infectieux. Ce n'est qu'au 19^{ème} siècle, spécialement en 1882, que l'identification du *Mtb* comme agent de la TB fut établie (Koch, 1932). Le médecin et microbiologiste allemand, Robert Koch a été le responsable de l'un des événements les plus importants de l'histoire de la médecine. Il avait isolé l'agent causal de la TB chez l'homme et le bétail, l'avait cultivé dans une culture pure et reproduit la maladie après l'inoculation de *Mtb* à des animaux sains. Les postulats de Koch, tels qu'ils sont connus

aujourd'hui, sont à la base de la microbiologie moderne. Ils ont établi depuis lors la norme pour démontrer une étiologie infectieuse (Koch, 1932; Lagier *et al.*, 2017).

Le traitement de la TB se résumait aux séjours dans les sanatoriums où on recommandait une bonne alimentation et du repos et aux interventions chirurgicales agressives sur le poumon pour enlever les zones atteintes (Daniel, 2006) (Figure 1). Au milieu du 20^{ème} siècle, une percée majeure dans la lutte contre la TB a eu lieu après la découverte des médicaments antimycobactériens (streptomycine (1949), isoniazide (1952), rifamycines (1966) et pyrazinamide (1952)) initiant ainsi une révolution dans le traitement de la TB (Duncan, 2003; McKinney, 2000; Van Scoy, 1999). Avant l'avènement du traitement antimycobactérien, la TB avait un taux de mortalité de 50 % (Bouchikh *et al.*, 2012).



Figure 1 : Le sanatorium de Ben Smim d'Azrou (1954 – 1975).

(Source : https://www.libe.ma/Souvenirs-d-un-long-sejour-au-sanatorium-de-Bensmim_a69307.html).

Les premiers essais de contrôle de la TB par la vaccination ont commencé très peu de temps après l'identification du *Mtb* par Robert Koch (Wack & Rappuoli, 2005). Cependant, c'est la

souche vaccinale atténuée de *Mycobacterium bovis*, développé par Calmette et Guérin, qui s'est montrée la plus efficace et a été présentée comme vaccin humain en 1921 (Hanekom, 2016).

Avec ces découvertes une nouvelle ère dans la prévention, la recherche et le traitement de la maladie a commencé. Le futur semblait plus clair, avec de gros espoirs d'éradiquer complètement ce plus ancien ennemi de l'humanité. Toutefois, malgré l'immunisation globale avec le BCG et l'efficacité des traitements, la TB reste de nos jours une menace importante pour la santé publique, en particulier dans les pays en développement. Ceci a obligé l'OMS à déclarer la TB comme une urgence sanitaire mondiale et à introduire la thérapie sous observation directe (DOTS), afin d'éviter que l'épidémie de TB ne devienne plus incontrôlable

2. Épidémiologie

Depuis 1997, l'épidémiologie de la TB fait l'objet d'un suivi annuel par l'OMS, avec la publication d'un rapport dressant l'état des lieux de l'épidémie de tuberculose, ainsi qu'un suivi des progrès des procédures de prévention, diagnostic et traitement de la maladie. Cela permet d'évaluer l'efficacité des différents programmes de lutte mis en place à l'échelle mondiale, régionale et des pays.

2.1. Au niveau mondial

Au 21^e siècle et malgré les différentes stratégies de lutte, la TB reste une des causes majeures de morbidité et de mortalité au niveau mondial. Selon le dernier rapport de l'OMS sur la lutte contre la TB dans le monde, 10 millions nouveaux cas de TB active, avec 1,2 millions de décès parmi les patients HIV négatifs, et 251 000 décès parmi les patients HIV positifs, ont été recensés en 2018 (OMS, 2019). Ce qui peut être plus alarmant est que le un tiers de la population mondiale est estimée déjà infecté par le *Mtb* (Houben & Dodd, 2016), avec 5 à 10 % (encore plus chez le sujets immunodéprimés) qui sont susceptibles de développer la TB active au cours de leur vie.

Le nombre de nouveaux cas de TB enregistrés dans le monde corrèle grossièrement avec les conditions économique: les incidences les plus élevées sont enregistrées au niveau des pays du Sud-Est d'Asie (44 %), d'Afrique (24 %) et des pays de la région occidentale du pacifique (18 %) (OMS, 2019). Toutefois, la résurgence de la TB dans les pays développés, notamment aux

États-Unis ou en Europe, suite aux migrations Est-Ouest, le déclenchement de la pandémie du SIDA et l'émergence de la résistance des bacilles aux médicaments antituberculeux montre bien que la guerre n'est pas encore gagnée pour ces pays; la maladie est loin d'être contrôlée, et que la population mondiale est toujours concernée. La Figure 2 illustre les nouvelles statistiques relatives l'incidence de la TB par habitant dans les différents pays du monde.

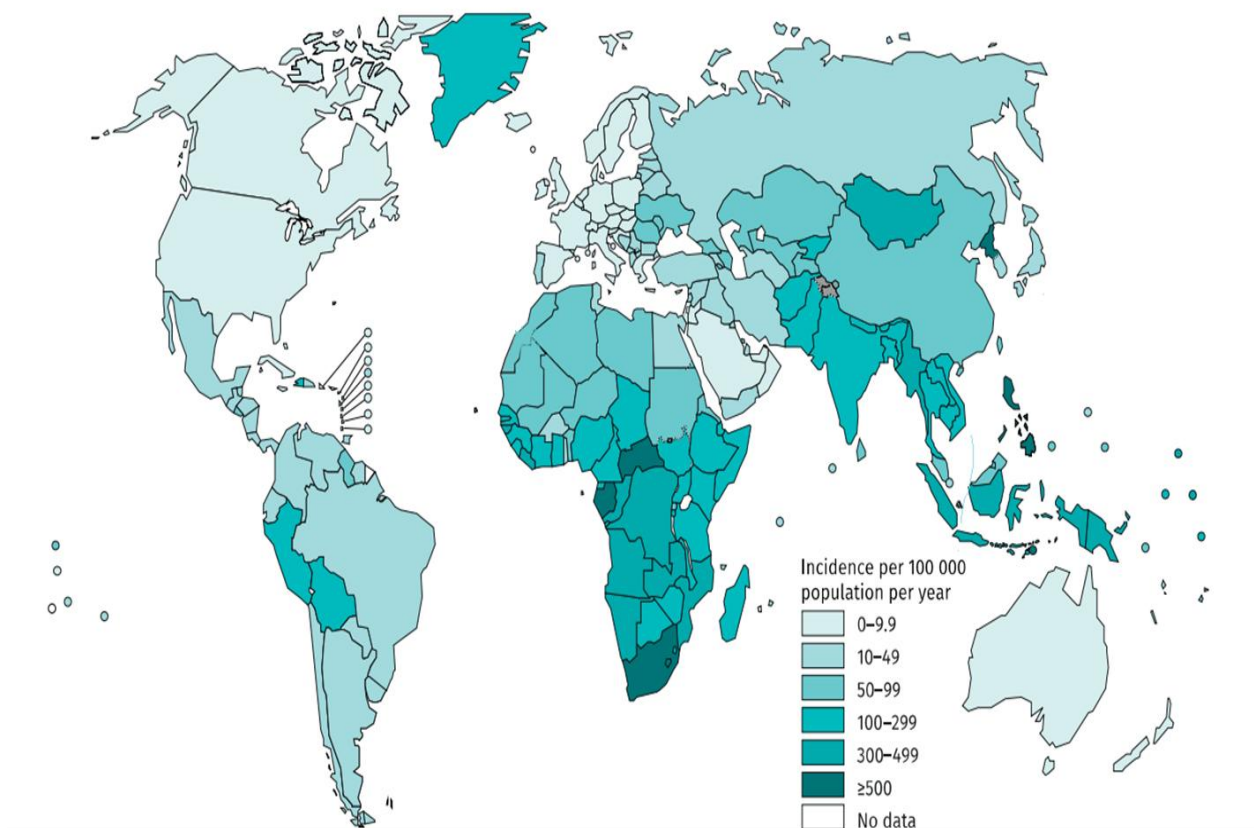


Figure 2 : Estimation des nouveaux cas de TB dans le monde en 2020 (OMS, 2021 modifié).

En termes d'incidence annuelle de cas de TB par habitant, l'incidence en Afrique subsaharienne est presque deux fois plus élevée que dans les pays du Sud-est d'Asie malgré les nombres élevés de cas de la TB déclarés par cette dernière. Pour rendre le schéma plus sombre, le taux des patients co-infectés par le HIV en Afrique est le plus élevé dans le monde, excédant 50 % dans quelques parties de l'Afrique du sud, rendant le risque de développer une TB active chez les HIV positifs 19 fois plus grand que dans le reste du monde (Blumberg, 1996; Cantwell & Binkin, 1996).

Les dernières données de l'OMS indiquent que, bien que très lente, l'incidence de la TB est en diminution d'une façon globale dans le monde. En effet, Le taux de mortalité par TB a chuté de 27 % entre 2 000 et 2 018 et près de 22 millions de vies ont été sauvées grâce à la mise en œuvre de la stratégie DOTS et de la stratégie Halte à la TB recommandée par l'OMS (OMS, 2019). Le défi actuel est de transformer la lutte vers l'élimination totale de la TB.

2.2. Au Maroc

Avec une incidence de 103 nouveaux cas pour 100 000 habitants et un taux de mortalité estimé à 9,3 décès pour 100 000 habitants par an, la TB est une pathologie endémique au Maroc. Les chiffres de la TB au Maroc s'appuient sur la déclaration obligatoire de la maladie. En 2 016, le nombre de cas de TB toutes formes détectées par an s'est élevé à 36 000 cas. La TB extrapulmonaire est la forme la plus prédominante avec 13 522 cas (PNLT, 2016).

Plus de 70 % des nouveaux cas de TB le sont notifiés dans les quartiers populaires autour des grandes villes (Casablanca, Salé, Fès, Tanger, Tétouan, Kénitra et Inezgane) (Figure 3).

Les rangs des jeunes âgés entre 20 et 45 ans, dont 58 % sont de sexe masculin, sont particulièrement affectés (Adnaoui *et al.*, 2009).

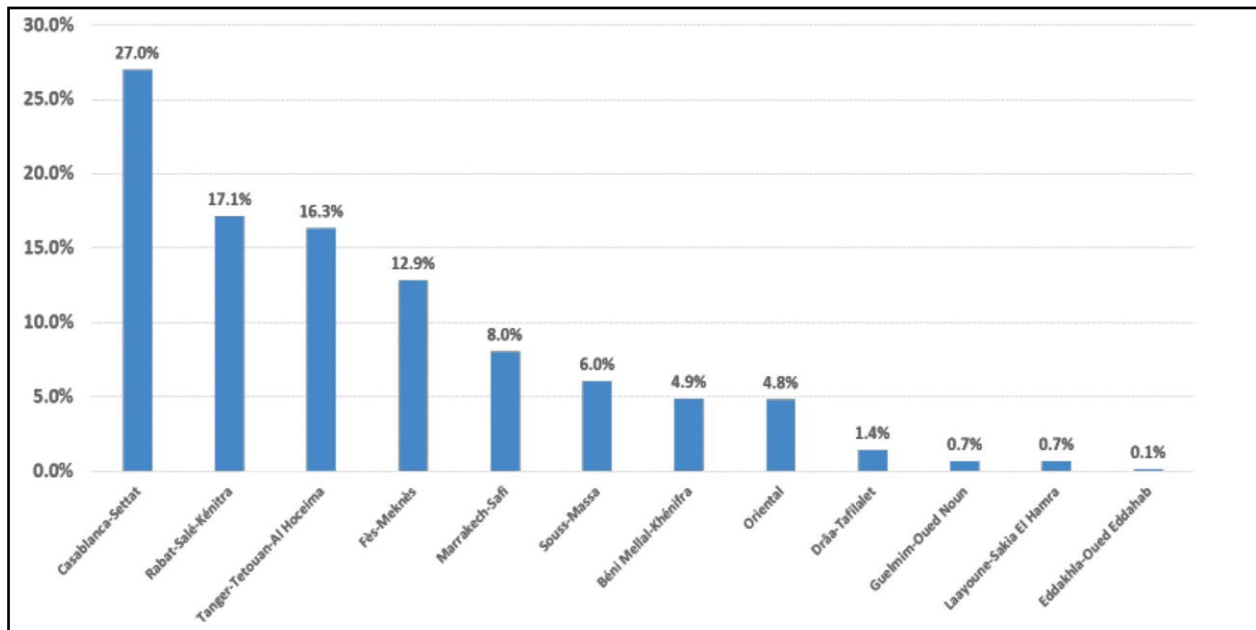


Figure 3: Distribution proportionnelle de la notification des nouveaux cas de TB par régions en 2015, Maroc (PNLT, 2016).

La lutte anti-TB au Maroc est organisée dans le cadre du Programme National de Lutte Antituberculeuse (PNLAT). Le nouveau programme antituberculeux a été révisé pendant l'année 1990. Il a été mis en œuvre dans toutes les provinces à partir de janvier 1991. Il s'était fixé comme objectif, de dépister 80 % des cas de TB pulmonaire à microscopie positive qui existent dans la population et d'en guérir 85 %. Pour ce faire, la stratégie DOTS de l'OMS a été introduite au Maroc dès 1991 (PNLT, 2016).

Les tendances épidémiologiques du PNLAT montrent une diminution de l'incidence des cas de TPM+ depuis 1996, suggérant une diminution de la transmission du bacille tuberculeux dans la population. Ceci est corroboré par les tendances évolutives de certains indicateurs épidémiologiques. En effet, de 1980 à 2004, il a été relevé une diminution significative de l'incidence de la primo-infection tuberculeuse chez les individus de moins de 15 ans, cette incidence a diminué de trois fois et demi en 2004 par rapport au début des années 1980, une augmentation progressive de l'âge moyen des malades tuberculeux qui est passé de 28 ans en 1980 à 33,4 ans en 2004 et une diminution de l'incidence de la TB à microscopie positive dans les tranches jeunes de la population associée à son élévation dans les tranches plus âgées (Adnaoui *et al.*, 2009).

Tous les rapports, à l'échelle mondiale ou nationale, insistent sur le besoin urgent d'améliorer les outils de détection, de thérapie et de prévention (spécialement des vaccins) de la TB. Pour ce faire, une meilleure compréhension de la microbiologie, la physiopathologie et l'immunologie liées à la TB est requise.

3. L'agent pathogène

La TB est une maladie pulmonaire chronique liée à l'infection par des mycobactéries et plus particulièrement par *Mtb*. Ces bactéries appartiennent au genre *Mycobacterium*, famille des Mycobacteriaceae, ordre des Actinomycétales (Figure 4).

Mtb partage avec les membres du genre *Mycobacterium* trois caractéristiques spécifiques. L'acido-alcool-résistance, ce qui permet de les visualiser au microscope grâce à la coloration de

Ziehl-Neelsen qui est à la base du test diagnostique le plus couramment utilisé pour mettre en évidence l'infection. Ces bactéries expriment également des acides mycoliques uniques dans l'enveloppe cellulaire qui jouent un rôle essentiel dans la structure et la fonction de la paroi cellulaire. Et finalement, elles présentent une teneur élevée (65,6 %) en guanine et cytosine (G+C) de leur ADN (Martin & Maugein, 2012).

Les mycobactéries sont des bacilles intracellulaires facultatifs qui se multiplient préférentiellement dans les cellules phagocytaires, comme les macrophages et les monocytes alvéolaires. Bien que de nombreuses espèces mycobactériennes soient environnementales, le *Mtb* est strictement parasitaire. Il n'a jamais été isolée dans l'environnement et son seul réservoir écologique semble être l'homme, avec pour seul vecteur de transmission la voie aérosol depuis des individus atteints de TB active vers des personnes saines (Sakamoto, 2012).

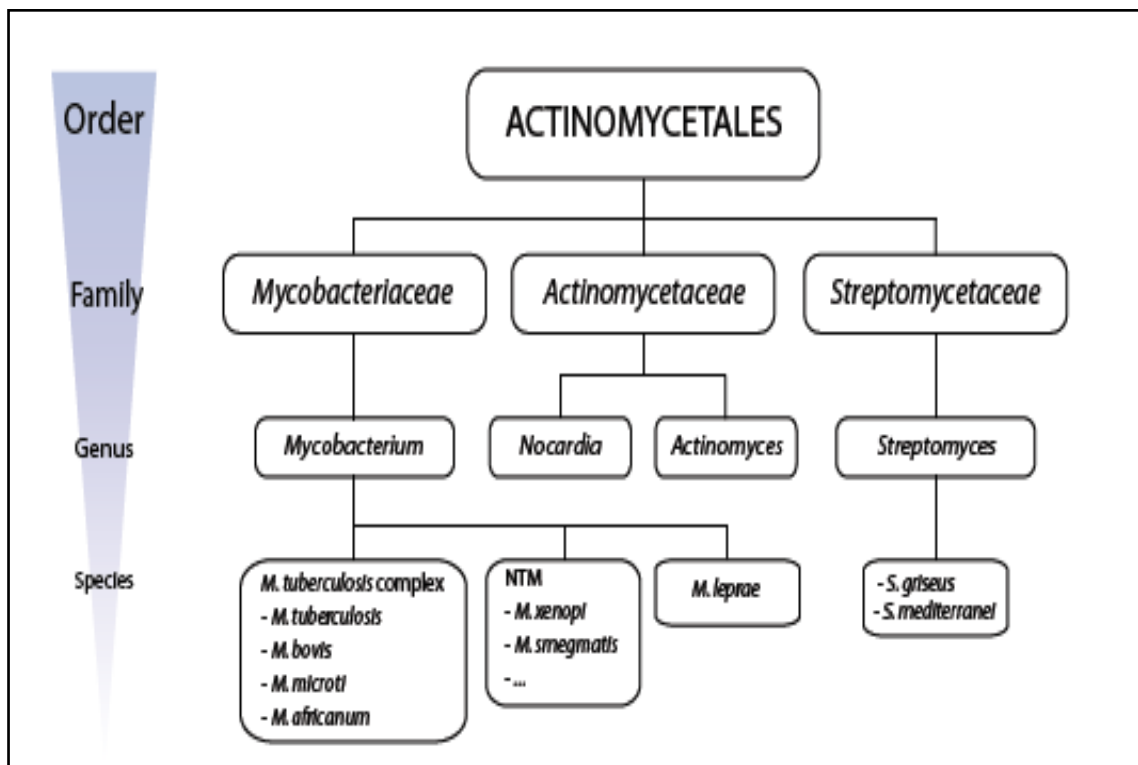


Figure 4: Classification des mycobactéries (Iseman, 2000).

Le *Mtb* a une paroi cellulaire unique et complexe se composant schématiquement (Figure 5): (Brennan & Nikaido, 1995; M. Daffé, 1996; Mamadou Daffé & Draper, 1997)

- d'une membrane plasmique interne composée de lipides, de protéines et de phospholipides,
- d'un squelette pariétal formé du complexe peptidoglycane-arabinogalactane-acides mycoliques,
- d'une capsule externe contenant surtout des hydrates de carbone hydrophile et pauvre en lipides.

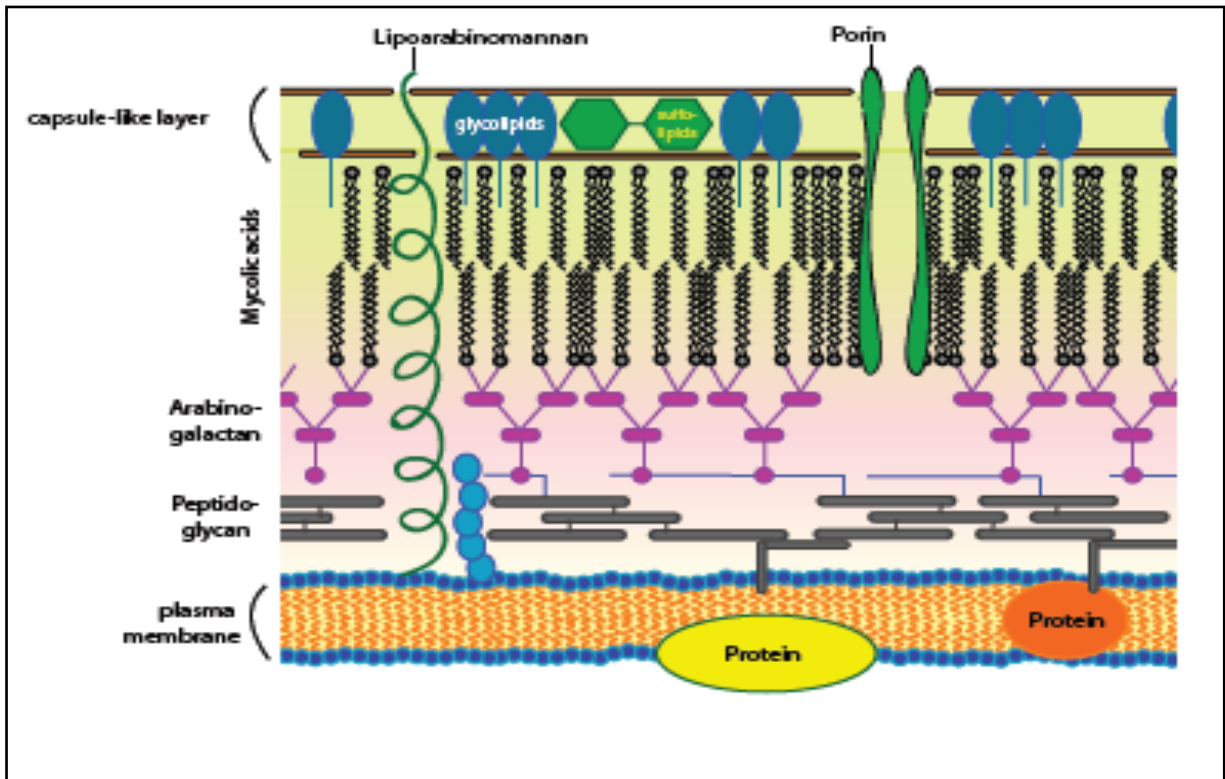


Figure 5: Vue schématique de la paroi du *Mtb* (Vincent et al., 2004).

Le Mtb est un bacille fin, légèrement incurvé, de 2 à 5 microns de long sur 0,2 à 0,3 microns de large (Figure 6). Il se distingue des autres espèces bactériennes par ses exigences de culture et sa lenteur de croissance. Avec un temps de génération 12 à 24 heures, les cultures sur gélose ne sont positives qu'après 21 à 28 jours d'incubation à 37 °C.

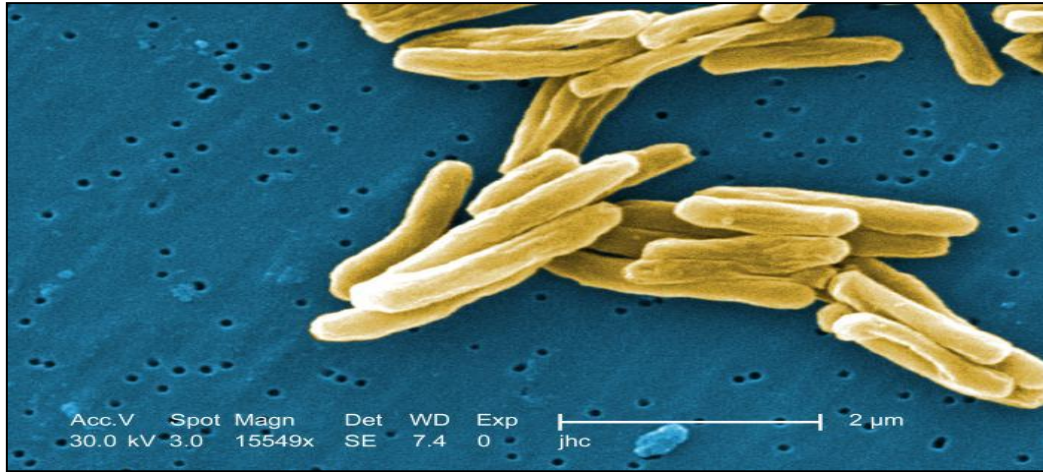


Figure 6: Photo de *Mtb* prise en microscopie électronique

(Source: <https://www.hopkinsmedicine.org/news/newsroom/news-releases/research-story-tip-international-johns-hopkins-study-says-broad-measures-needed-to-prevent-tb-spread-in-india>)

L'analyse du génome de *Mtb* a permis d'identifier la région de différence 1 (RD1) codant pour des protéines absentes dans le génome du Bacille de Calmette-Guérin (BCG) et de la plupart des mycobactéries environnementales et est donc hautement spécifique de *Mtb* (Behr *et al.*, 1998; Hsu *et al.*, 2003). On pense que la fonction principale de RD1 est le codage et la sécrétion des principales protéines antigéniques, telles que la cible antigénique sécrétoire précoce-6 (ESAT-6) et la protéine de filtrat de culture -10 (CFP-10) (Brodin *et al.*, 2004; Hsu *et al.*, 2003; Kaku *et al.*, 2007). Ces protéines sont récemment introduites dans les tests de diagnostic de la TB.

4. Lutte anti-tuberculose :

Les efforts mondiaux actuels de lutte contre la TB comprennent le traitement de l'infection tuberculeuse latente, le diagnostic précoce des cas positifs et le traitement par la stratégie DOTS et la vaccination par le BCG. Une telle approche a pour vue de minimiser la propagation de l'infection.

4.1. Diagnostic

Au cours de ces dernières années, de nouvelles techniques ont été mises à la disposition des cliniciens ce qui a permis de modifier radicalement l'approche diagnostique tant de l'infection tuberculeuse latente que de l'infection tuberculeuse active.

4.1.1. Diagnostic de la TB latente

Pour le dépistage de la TBL, les approches immunologiques ont apporté de nouvelles perspectives dans le diagnostic. Elles sont principalement basées sur la démonstration de réponses spécifiques des lymphocytes T contre les antigènes mycobactériens. Ceci dit, ils sont un marqueur indirect d'une infection passée ou présente, mais seuls ne peuvent pas faire la distinction entre les personnes atteintes de TBL, de TB active ou de TB antérieure. Plusieurs tests de détection d'antigènes sont disponibles dans le commerce avec une approbation limitée de l'OMS pour l'utilisation dans le diagnostic de la TB active.

➤ L'intradermo-réaction à la tuberculine

L'intradermo-réaction (IDR) à la tuberculine a été le premier test mis au point pour le diagnostic immunologique de la TB. Ce test consiste en l'injection intradermique d'un volume de 0,1 ml de tuberculine (dérivé protéinique purifié (PPD)) et la mesure par la suite de l'induration palpable provoquée par la tuberculine après 48 à 96 h de l'injection. En fait, Ce test mesure la réponse in vivo d'hypersensibilité à médiation cellulaire de type retardé (type IV de la classification de Gell et Coombs), après injection intradermique de tuberculine. C'est une réaction inflammatoire locale tardive, de durée prolongée et caractérisée par la migration des lymphocytes T CD4 mémoires spécifiques de la tuberculine vers le site cutané où ils libèrent des lymphokines. Ces lymphokines induisent une induration par vasodilatation locale, œdème, dépôt de fibrine et recrutement d'autres cellules inflammatoires (Mack *et al.*, 2009).

Outre son incapacité de distinguer l'infection active de l'infection latente, un autre inconvénient du test cutané est son incapacité à distinguer les individus qui sont «véritablement» infectés de manière latente par *Mtb* des individus qui ont été vaccinés avec le BCG, le vaccin plus couramment utilisé dans le monde (Mack *et al.*, 2009). En effet, la tuberculine obtenue à partir d'un surnageant de culture de *Mtb* contient plus de 200 antigènes dont la plupart sont communs à de nombreuses espèces mycobactériennes, y compris *M. bovis*, souche vaccinale utilisée dans le vaccin BCG.

➤ Production d'IFN γ

La spécificité de détection de l'infection par *Mtb* a pu être améliorée lorsque des antigènes spécifiques de *Mtb*, qui ne sont pas produits par *M. bovis* (souches vaccinales BCG), tels que l'ESAT-6 et la CFP 10, ont été identifiés (Diel *et al.*, 2006). L'utilisation de ces antigènes a ensuite été appliquée dans des tests qui reposent sur la détection de l'IFN γ libéré ex vivo par les cellules T spécifiques de *Mtb* (en grande partie les cellules T CD4) en réponse à ces antigènes (Andersen *et al.*, 2000; Mack *et al.*, 2009). Ces tests, à qui on a donné le nom d'IGRA (interféron gamma release assay), ont été développés initialement pour le diagnostic de la TB latente dans les contextes d'immunodépression, y compris les personnes vivant avec le VIH, l'insuffisance rénale chronique, la greffe d'organe solide, les lésions fibreuses, la silicose, le cancer des voies aérodigestives, la malnutrition et le diabète.

Actuellement, il existe deux tests IGRA approuvés par la FDA disponibles dans le commerce.

- QuantiFERON-Gold (QFT-G) (Cellestis Ltd, Carnegie, Australia 216) mesure l'interféron γ en UI / ml en utilisant un test d'immuno-absorption enzymatique (ELISA)
- T-SPOT.TB (Oxford Immunotec Ltd, Abingdon, UK 217) compte les cellules libérant de l'interféron γ visualisées sous forme de taches avec la technique de l'immunospot lié à l'enzyme (ELISPOT)

La sensibilité du Quantiféron a été amélioré récemment par la commercialisation du Quantiféron®-TB Gold In-Tube (Cellestis, Victoria, Australia) (QFT-GIT). Ce test, incorpore, en plus des antigènes ESAT-6 et de la CFP 10 un nouveau peptide de la protéine TB7.7, codée dans la région RD11 et non partagée par la plupart des mycobactéries atypiques. Une méta-analyse récente a rapporté une spécificité du QFT-G à 99 %, du QFT-GIT à 96 % et du T-SPOT à 93 % (Pai *et al.*, 2008). En comparant les tests Quantiférons, QFT-GIT semble être plus sensible que le QFT-G avec une sensibilité de 92,6 % et 81,4 %, respectivement (Harada *et al.*, 2008; Pai *et al.*, 2008). Pour le T-SPOT.TB, Une sensibilité légèrement meilleure (95 %) est notée en comparaison aux tests Quantiférons (Chee *et al.*, 2008; Ferrara *et al.*, 2006; Pai *et al.*, 2008).

Malgré plus sensible que l'IDR (Arend *et al.*, 2007; Ewer *et al.*, 2003), ces procédures sont plus coûteuses et nécessitent des infrastructures de laboratoire. Ces facteurs pourraient être une vraie limite à la propagation de l'utilisation de l'IGRA dans les zones endémiques.

4.1.2. Diagnostic de la TB active

Étant une entité clinique, le diagnostic de la TB repose généralement sur des observations cliniques et l'imagerie par radiographie pulmonaire. De ce fait, dans la plupart des cas, un traitement multi-médicamenteux spécifique est initié aux patients suspectés d'avoir une TB active, bien avant la confirmation du diagnostic par le laboratoire

Les signes évocateurs de la TB sont très variables, dépendent généralement de la location de cette infection et diffèrent selon l'évolution de la maladie. Les principaux signes symptomatiques cliniques de la TB sont la fièvre avec des sueurs nocturnes, la fatigue et l'altération de l'état général avec amaigrissement et une toux, d'abord sèche puis devient productive et des douleurs thoraciques apparaissent (Pérez-Guzmán *et al.*, 1999).

➤ Examen radiologique

La radiographie pulmonaire conventionnelle reste la méthode la plus couramment utilisée pour le dépistage, le diagnostic et le suivi des réponses au traitement chez les patients atteints de TB pulmonaire (Pande *et al.*, 2015). Des anomalies typiques visibles sur le cliché thoracique permettent généralement de poser un diagnostic. Ces lésions siègent dans les lobes supérieurs au sommet ou dans le segment apical du lobe inférieur. Elles sont isolées ou associées, de type infiltrat, caverne ou nodule, souvent bilatérales, accompagnées d'une réaction pleurale. Cependant, des clichés normaux sont souvent observés chez les patients immunodéprimés (Jones *et al.*, 1998; Morris, 1990; Yeon & Lee, 2008).

L'émergence de la radiologie numérique et de l'interprétation assistée par ordinateur a permis une meilleure identification des lésions parenchymateuses précoces et les élargissements des ganglions lymphatiques médiastinaux (Kyung & Im, 1995; Pande *et al.*, 2015). Récemment, une méthode non invasive, la tomographie par émission de positons pulmonaire en série [¹⁸F] -2-fluoro-désoxy-D-glucose, a été étudiée pour surveiller l'activité de la maladie et les réponses à la chimiothérapie antituberculeuse (Davis *et al.*, 2009; Kyung & Im, 1995).

➤ Diagnostic biologique

Le diagnostic de la TB au niveau du laboratoire passe par plusieurs étapes consécutives qu'on va essayer de détailler ci-dessous. La plupart des échantillons biologiques sont prélevés dans la sphère pulmonaire (crachats, tubes gastriques et lavages broncho-alvéolaires (BAL)). D'autres prélèvements sont généralement obtenus à partir de ponctions (liquides pleuraux, abcès, adénopathies ou liquide céphalo-rachidien) ou de biopsie.

Actuellement, il existe trois principales méthodes validées pour la détection de la TB active : la microscopie, les cultures et les tests d'amplification des acides nucléiques (PCR).

- Microscopie

En raison de sa disponibilité mondiale facile, la microscopie constitue une première ligne importante dans le diagnostic de l'infection tuberculeuse. La spécificité de cette technique est excellente, atteignant 95 à 98 % dans les régions à forte incidence de TB.

La méthode la plus largement utilisée consiste à examiner les lames colorées de Ziehl-Neelsen sous microscopie optique. Cependant, la microscopie fluorescente, avec des colorants comme l'auramine, est 10 % plus sensible et permet un dépistage plus rapide d'un grand nombre de frottis (Marais et al., 2008). Auparavant, les sources lumineuses nécessaires pour la microscopie à fluorescence n'étaient pas disponibles pour une utilisation sur le terrain. Les progrès de la technologie des diodes électroluminescentes (LED) ont élargi l'applicabilité de la microscopie fluorescente en réduisant considérablement le coût, la puissance et les besoins d'entretien, et en éliminant le besoin d'une chambre noire, tout en conservant la sensibilité (Marais et al., 2008; Steingart et al., 2006).

Cependant, ces procédures de coloration ne sont pas toujours spécifiques de *Mtb*, puisqu'elles ne différencient pas les espèces du genre *Mycobacterium* d'autres organismes acido-résistants, tels que les mycobactéries non tuberculeuses. Une autre limitation technique est le manque de sensibilité, qui varie considérablement (20 à 80 %) et est particulièrement faible chez les patients atteints de TB pauci-bacillaire, y compris les enfants, les patients atteints de TB extra-pulmonaire ou ceux qui sont co-infectés par le VIH (Warren et al., 2000). On estime qu'environ 5 000 à 10 000 bacilles / ml de crachats sont nécessaires pour un frottis direct positif.

- Culture

La culture reste la méthode de référence pour le diagnostic de la TB et pour tester la sensibilité aux antituberculeux. On distingue deux grands types de milieux de culture: le solide (à base d'œuf, comme le classique Löwenstein-Jensen ou à base de gélose, comme Middlebrook) et le liquide (généralement 7H9) qui sont associés à un système de détection automatisable tels que BACTEC et MGIT (Cruciani *et al.*, 2004; Dinnes *et al.*, 2007; Gil-Setas *et al.*, 2004).

Le seuil de détection des mycobactéries par culture est d'environ 100 bacille/ ml. Sur milieu solide, les colonies sont détectées en 4 à 6 semaines alors que sur les milieux de culture liquides une croissance est détectée en 1 à 3 semaines (Tortoli *et al.*, 1999). Ainsi, l'OMS a récemment approuvé l'utilisation de la culture liquide du *Mtb* dans les pays à faibles ressources. Les nouveaux tests de culture liquide plus sensible ont des systèmes de détection uniques permettant de détecter une petite quantité de croissance bactérienne, comme par la radioactivité ou des changements de concentration d'oxygène, aussi rapidement que possible. Ces systèmes peuvent également être utilisés pour les tests de sensibilité aux médicaments (Cruciani *et al.*, 2004; Palomino *et al.*, 2008).

La culture est très sensible et spécifique, mais l'inconvénient majeur de cette technique est son délai d'incubation, auquel il faut rajouter en cas de positivité de la culture le temps nécessaire à l'identification et la réalisation de l'antibiogramme ce qui peut être préjudiciable à une prise en charge adéquate du patient.

- Biologie moléculaires

Ces dernières années, plusieurs techniques de biologie moléculaire complexes ont été développées pour identifier précisément les bacilles du complexe *Mtb* et même de détecter des mutations dans certains gènes qui confèrent une résistance à des antituberculeux, tels que l'isoniazide et la rifampicine (Piersimani & Scarparo, 2003).

Ces tests détectent les mycobactéries, à partir de l'échantillon clinique soit dès la positivité de la culture soit directement à partir des échantillons biologique, avec une spécificité élevée en amplifiant des séquences d'acide nucléique cible (Piersimani & Scarparo, 2003). Leur sensibilité combinée sur les échantillons à frottis positif est de 96 % alors qu'elle varie entre 66 à 72 %

pour les échantillons à frottis négatif (Greco *et al.*, 2006, 2009). Dans l'ensemble, la sensibilité des méthodes de PCR est intermédiaire entre la microscopie et la culture (Drobniewski *et al.*, 2003).

L'apport de la biologie moléculaire dans le diagnostic de la TB est considérée pouvoir donner une confirmation TB beaucoup plus rapidement qu'avec la culture ; généralement dans la journée. En cas d'examen microscopique direct positif, une amplification génique positive permet la mise en route d'un traitement approprié, ainsi que l'isolement des patients contagieux, tandis qu'un résultat négatif permettra d'éviter le traitement et l'isolement inutile d'un patient infecté par une mycobactérie atypique.

4.2. Traitement

L'approche actuelle du traitement de la TB repose sur un traitement à long terme avec des antibiotiques administrés via la stratégie DOTS. Le traitement antibiotique a pour objectif d'obtenir une bactéricidie rapide, d'éviter le développement de bactéries résistantes et d'éradiquer les bacilles persistants dans les foyers tuberculeux pour prévenir une rechute.

En 1944, La streptomycine a été rapportée par Schatz et al comme ayant une activité antibiotique contre les bactéries et c'était le premier médicament à être utilisé avec succès pour traiter la TB (Schatz *et al.*, 2005). Il est rapidement apparu que *Mtb* pouvait en devenir résistant, mais cela pouvait être surmonté en l'associant à l'acide para-aminosalicylique (Medical Research Council, 1952). La découverte de l'isoniazide en 1952 a révolutionné le traitement de la TB. En plus de son activité bactéricide il avait l'avantage d'être administré par voie orale (Saltini, 2006). Le pyrazinamide, actif contre les bactéries non répliquantes, a été introduit en 1952 (Saltini, 2006). L'introduction de l'éthambutol dans les années 1961, qui a remplacé l'acide para-aminosalicylique dans l'association thérapeutique médicamenteuse standard, a permis de réduire la toxicité et la durée du traitement de 24 à 18 mois. En 1966, la rifampicine s'est avérée efficace contre *Mtb*. Son ajout au cocktail de médicaments a réduit le traitement de 18 mois à 9 mois (Campbell *et al.*, 2001). Cette durée a encore été réduite à 6 mois par l'ajout de pyrazinamide au cocktail d'isoniazide et de la rifampicine. Actuellement, la pierre angulaire du traitement de la multi-résistance repose sur les fluoroquinolones.

Il existe plusieurs schémas thérapeutiques possibles, tous comprenant un cocktail de médicaments pris quotidiennement sur une période d'au moins six mois; initialement, une phase d'attaque intensive de deux mois avec quatre médicaments - isoniazide, rifampicine, pyrazinamide et éthambutol - est suivi par une phase de quatre mois, dites d'entretien avec les médicaments isoniazide et rifampicine (Bouchikh *et al.*, 2012).

Malgré que la l'antibiothérapie est efficace contre *Mtb*, mais ceci n'était pas suffisant pour le contrôle de la maladie. Avec un protocole thérapeutique long et complexe, la plupart des patients interrompent le traitement une fois leur état amélioré, ce qui entraîne une rechute de la maladie et l'émergence d'une TB multirésistante. Les changements socio-économiques et politiques dans certaines parties du monde qui conduisent à l'effondrement des soins de santé et des systèmes gouvernementaux, tels que les guerres, les réfugiés, la pauvreté, la malnutrition et le surpeuplement conduiront à l'établissement et à la propagation des épidémies. Une solution à ce problème est le développement de nouveaux médicaments antituberculeux efficaces permettant l'élaboration de protocole thérapeutiques plus court (Salomon *et al.*, 2006; Tiberi *et al.*, 2018).

4.3. Vaccin

Le vaccin BCG obtenu par Calmette et Guérin est un *M. bovis* atténué grâce à 231 passages en série entre 1908 et 1924 (Hanekom, 2016). Il est considéré comme l'un des vaccins les plus administrés dans le monde. Cependant, les politiques d'utilisation diffèrent d'un pays à l'autre (1) ceux qui recommandent le BCG à la naissance ou au premier contact avec le système de santé; (2) ceux qui recommandent le BCG une seule fois dans l'enfance; (3) ceux qui recommandent des boosters BCG répétés; et (4) les Pays où le BCG n'est pas recommandé comme les États-Unis et les Pays-Bas (Franco-Paredes *et al.*, 2006). La politique en vigueur au Maroc est la vaccination à la naissance recommandée par l'OMS (PNLT, 2016).

Bien que le BCG soit moyennement efficace contre les formes infantiles mortelles de TB extra-pulmonaire, comme la méningite tuberculeuse, il ne protège pas les patients adultes (Brewer, 2000; Rodrigues *et al.*, 1993). En effet, dans certaines populations la vaccination n'a pas eu d'effet notable sur la prévalence de la TB pulmonaire chez l'adulte, la forme d'infection qui contribue le plus significativement à la propagation de la maladie (Brewer, 2000; Fine, 1995). Une méta-analyse a révélé que la vaccination par le BCG réduisait le risque de développer une TB de 50 % en moyenne (Brewer, 2000). Par conséquent, le développement de nouveaux vaccins

efficaces est un objectif important dans la lutte contre la TB dans le monde. Il existe deux approches principales des stratégies de vaccination actuelles: (Kaufmann *et al.*, 2006)

- vaccins sous-unités antigéniques exprimant des antigènes mycobactériens distincts, basés sur l'hypothèse qu'un ou quelques antigènes protecteurs et des clones de cellules T spécifiques suffiront pour une protection efficace;
- vaccins recombinant viables atténués qui utilisent tout le spectre des antigènes et la capacité de stimuler la combinaison optimale de différentes populations de lymphocytes T, couvrant ainsi la large gamme d'antigènes qui peuvent être nécessaires pour une protection efficace.

5. Aspects pathologique de la tuberculose

Deux événements majeurs doivent se produire pour qu'une personne développe la TB; au premier lieu l'infection par *Mtb* doit s'établir et ensuite l'infection doit évoluer vers la maladie, souvent des années plus tard.

5.1. Risques d'infection par *Mtb*

L'exposition de l'hôte avec *Mtb* se produit généralement par inhalation de gouttelettes en aérosol, de 1 à 5 µm de diamètre, contenant les bacilles générés par une personne atteinte de TB active. Ces particules, appelées gouttelettes de Pflügge, sèchent rapidement dans l'air, mais peuvent rester en suspension dans une pièce non aérée pendant environ 30 minutes, en conservant leur infectiosité. Les gouttelettes évitent l'élimination mécanique par les cils trachéaux et se déposent dans les espaces alvéolaires des poumons (préférentiellement des lobes moyens et inférieurs, car ce sont les zones les mieux ventilées), où elles rencontrent des macrophages alvéolaires. Aux premiers stades de l'infection, *Mtb* échappe à la destruction et survit dans les cellules phagocytaires en imposant l'arrêt de la maturation phagosomique par de multiples mécanismes. En résultat à ces mécanismes inhibiteurs, le *Mtb* se réplique d'une façon incontrôlée à l'intérieur des cellules infectées et se propage également de cellule en cellule jusqu'à ce que l'immunité à médiation cellulaire soit induite deux à trois semaines après l'infection. *Mtb* infecte également les cellules dendritiques (DC) qui patrouillent dans le parenchyme pulmonaire à la recherche d'agents pathogènes envahissants. Les DC infectées mûrissent, quitteront le poumon et migreront

vers les ganglions lymphatiques régionaux où elles amorcent les cellules T naïves. Les cellules T activées spécifiques se déplacent vers les poumons où elles reconnaissent les macrophages infectés. La réponse immunitaire de l'hôte contre *Mtb* est initiée et entraîne la formation de structures organisées appelées granulomes. Le granulome sert de barrière et constitue une interaction dynamique entre la réponse immunitaire de l'hôte et les bacilles tuberculeux. La fluctuation des facteurs qui influencent la réponse immunitaire peut entraîner une perte de contrôle des bacilles et le développement d'une maladie exacerbée (Kaufmann, 2013; Ling, Flynn, 2012; Pai *et al.*, 2016; Ramakrishnan, 2012) (Figure 7).

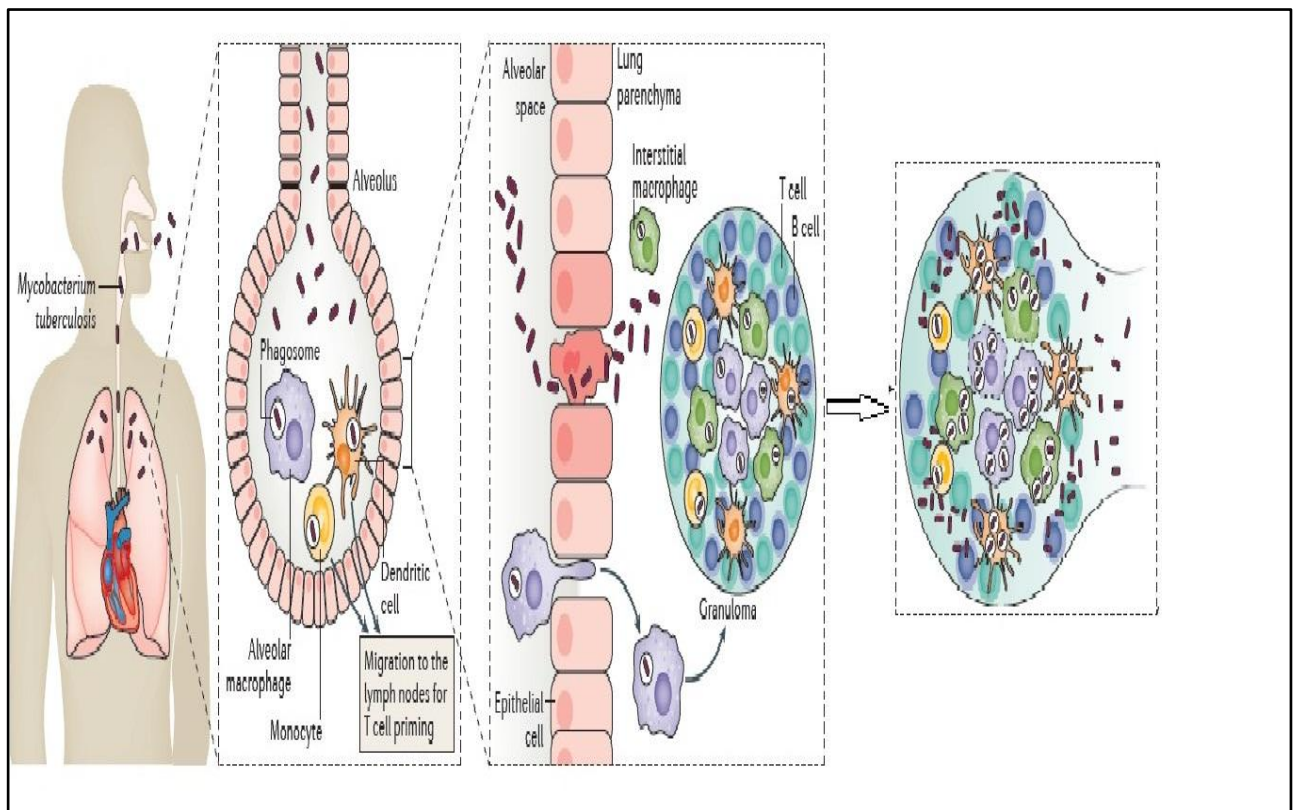


Figure 7: Pathogenèse de la TB: Le développement d'une réponse immunitaire innée et adaptative contre l'infection par *Mtb* entraîne la formation du granulome (Pai *et al.*, 2016 modifiée)

Biologiquement, l'infection par *Mtb* est définie comme un résultat positif pour le test IDR ou IGRA. L'exposition à *Mtb* ne garantit pas toujours l'infection, puisque seulement 20 à 30 % des personnes exposées développeront un IDR ou IGRA positive (Migliori *et al.*, 2021). Un exemple typique est donné lors d'un événement où 13 marins parmi les 66 marins d'un navire de la

marine américaine sont restés IDR négatifs après 6 mois de partage d'une cabine avec 7 autres personnes atteintes de TB pulmonaire (Houk et al., 1968). Malgré que, théoriquement, l'inhalation de quelques bacilles *Mtb* est considérée suffisante pour causer l'infection, le risque d'infection dépendra de plusieurs facteurs à savoir (1) l'intensité du contact, qui est influencée par la durée de l'exposition et la distance physique dans un espace aérien partagé ; (2) la capacité de la personne infectée à transmettre *Mtb* qui dépendra de l'étendue de la maladie pulmonaire et de la concentration des bacilles tuberculeux dans ses expectorations ; (3) les caractéristiques de la souche mycobactérienne, y compris le pouvoir infectant et la virulence ; et (4) la sensibilité des individus exposés résultant d'un déficit immunitaire sous-jacent tel qu'une infection par le VIH, ou si l'individu exposé a déjà eu une infection tuberculeuse, une vaccination par le BCG ou une infection par des mycobactéries environnementales (Churchyard *et al.*, 2017; Mathema *et al.*, 2017; McIntosh *et al.*, 2019; Turner *et al.*, 2017).

5.2. De l'infection à la maladie

L'exposition à *Mtb* conduit généralement soit à une élimination de l'infection ou la persistance de l'agent pathogène (Figure 8). L'élimination de l'infection par des mécanismes immunitaires innés ou une réponse immunitaire acquise sans amorçage ou mémoire des lymphocytes T aboutit à des résultats négatifs au test IDR ou IGRA (Koeken *et al.*, 2019). Certains individus élimineront le pathogène, mais conserveront une forte réponse des lymphocytes T mémoire et seront positifs à l'IDR ou à l'IGRA. Cette protection a été appelée «clairance précoce», alors que d'autres utilisent le terme «résistance à l'infection» (Ma *et al.*, 2014; Verrall *et al.*, 2014).

Lorsque l'infection à *Mtb* n'est pas éliminée, la primo infection tuberculeuse aboutit au contrôle de la réplication du bacille grâce à la mise en place de la réponse immune retardée et les individus infectés développeront des résultats positifs à l'IDR et à l'IGRA (Migliori et al., 2021). Dans la population générale, 90 % des personnes infectées contrôleront la primo infection; ils ne sont ni contagieux ni symptomatiques, et la grande majorité d'entre eux le resteront toute leur vie. On dit que ces personnes ont une TB latente (Maitre *et al.*, 2018). Vu que le *Mtb* n'est pas totalement éliminé lors de la TBL, il existe un risque de 10 % de réactivation chez ces individus (Lin *et al.*, 2012). Ce risque est plus élevé chez les personnes récemment infectée. On estime

que le risque de réactivation est de 0,31 % par an dans les 3 à 5 ans suivant l'infection et de 0,16 % par an dans les 6 à 7 ans suivant l'infection. Si les personnes infectées ne se réactivent pas dans les 10 premières années suivant l'infection, on estime que le risque de réactivation est de 10 % au cours de la vie d'un individu (Ferebee & Mount, 1962; Lin *et al.*, 2012).

Seulement 5 à 10 % des sujets infectés par *Mtb* développeront une TB active dite primaire après une primo-infection (Maitre *et al.*, 2018). Cependant, le risque de maladie active est considérablement augmenté lorsque les réponses immunitaires sont déprimées pour une raison quelconque. En effet, par rapport aux individus sains dépourvus de facteurs de risque, le risque relatif (RR) de développer une TB active augmente considérablement en présence d'une infection par le VIH (RR: 50-110) , SIDA (RR: 110-170), les traitements par anti-TNF (RR: 1,5-17), les transplantations d'organe sous immunosuppresseurs (RR: 20-74), la corticothérapie (plus de 15 mg/j d'équivalent prednisone plus de 2-4 semaines, RR: 4,9), les hémopathies malignes (RR: 16), les carcinomes de la tête et du cou (RR: 2,5-6,3), le diabète de type 2 (RR: 2,3-6), la silicose (RR: 30), le déficit pondéral (RR: 2-2,6), l'alcoolisme (RR: 3) et l'insuffisance rénale chronique (RR: 10-25) . Le jeune âge (< 5ans) représente également un facteur de risque avec un RR compris entre 2 et 5 (Erkens *et al.*, 2010). Soixante-quinze à 80 % des TB actives se développent dans les 2 premières années suivant le comptage et l'infection initiale, le risque étant maximal dans les 6 premiers mois (Comstock *et al.*, 1974; Marais *et al.*, 2004; Sloot *et al.*, 2014). Les patients atteints de TB active présentent des symptômes tels que toux, fièvre et perte de poids, et le diagnostic peut généralement être confirmé par un frottis d'expectoration, une culture et des tests moléculaires. Dans de nombreux contextes, jusqu'à 50 % de toutes les personnes atteintes de TB active à culture positive n'ont pas de toux productive prolongée (généralement à frottis négatif en raison de la faible charge bacillaire) et au moins 25 % n'ont aucun symptôme. Un résultat négatif à l'IDR ou à l'IGRA en raison d'une anergie induite par la maladie elle-même ou d'une suppression immunitaire est aussi observé (Pai *et al.*, 2016; Sousa *et al.*, 1997). Bien que la TB soit une maladie pulmonaire, elle peut se manifester dans d'autres sites tissulaires. La TB extrapulmonaire se développe en moins de 10 % de tous les cas. L'évolution de la TB non traitée est mauvaise, car 49 % des patients tuberculeux mourront dans les cinq ans. Parmi eux, 25 % mourront dans les deux premières années. En revanche, 33 % des patients tuberculeux guérissent spontanément de leur maladie. Les 18 % restants développeront des infections chroniques avec des frottis d'expectoration positifs représentant ainsi une source de contamination pour d'autres

individus. Heureusement, à l'exception des souches multi-résistantes, une chimiothérapie adéquate réussit dans plus de 90 % des cas (OMS, 2019).

Ceci dit, on peut conclure que la TB est un spectre de différentes manifestations (Figure 8) qui reflètent l'équilibre entre le bacille et les mécanismes de défense de l'hôte, dans lesquels la qualité de la défense de l'hôte détermine l'issue.

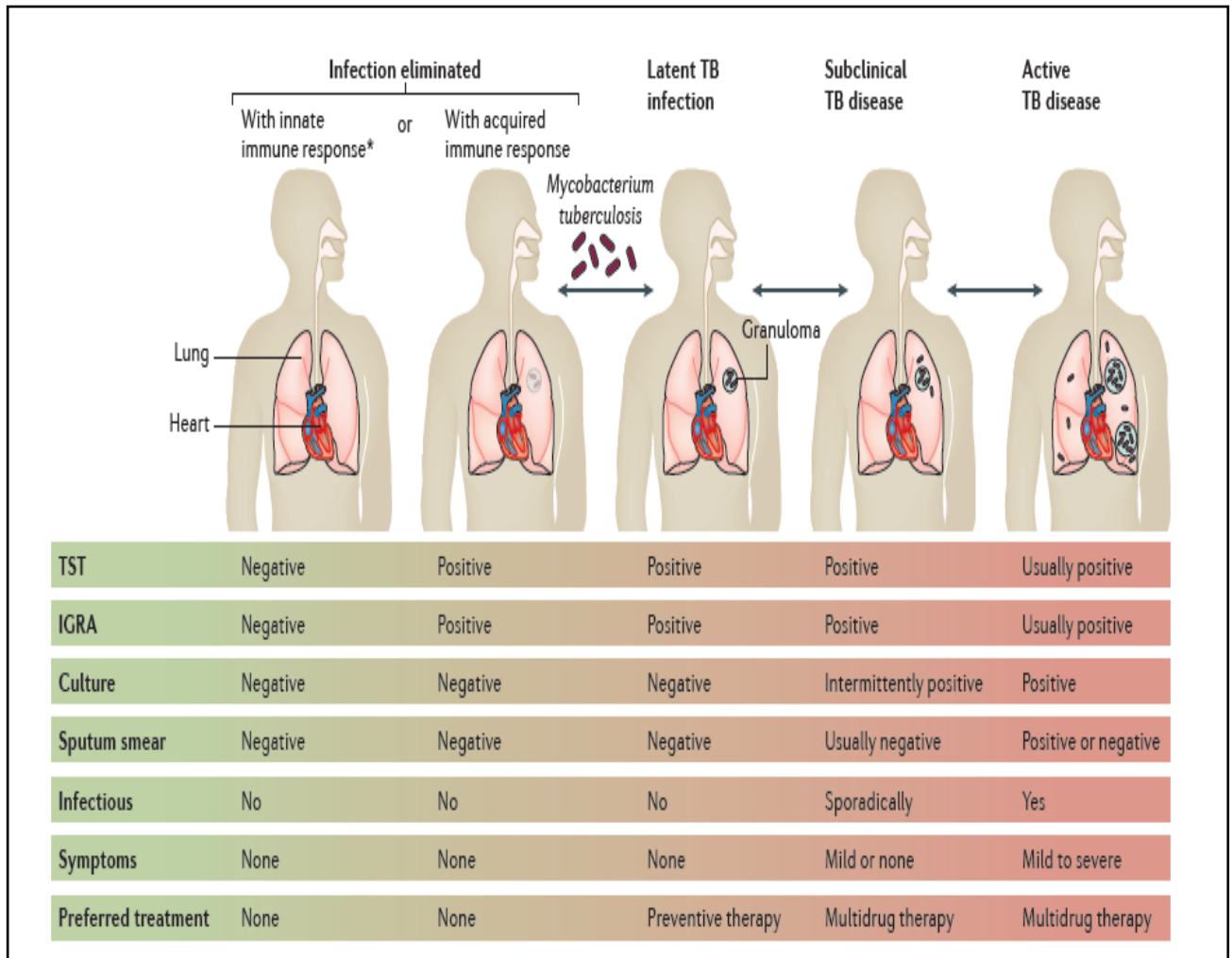


Figure 8: Le spectre de la TB : de l'infection à *Mtb* à la TB active (pulmonaire) (Pai *et al.*, 2016).

6. L'immunité anti-tuberculose

Comprendre la réponse de l'hôte à l'infection à *Mtb* est un aspect clé des efforts d'éradication de la TB grâce au développement de vaccins efficaces et de thérapies immunitaires (P. Cheng *et al.*,

2022). Cette réponse implique la contribution d'une grande variété de cellules immunitaires innées et adaptatives que nous allons essayer de présenter dans cette partie. En plus, nous allons présenter les différentes stratégies employées par le *Mtb* pour échapper à cette réponse.

6.1. L'immunité innée

La première rencontre du *Mtb* avec le système immunitaire de son hôte se fait avec les cellules de la réponse immunitaire innée. Suite à l'établissement de l'infection à *Mtb* dans les voies respiratoires et le parenchyme pulmonaire, les bacilles seraient phagocytés par les macrophages alvéolaires et puis repris par les différentes cellules présentatrices d'antigènes et les cellules tueuse naturelle (NK) recrutées au site de l'infection (Crevel *et al.*, 2011). Ces cellules sont responsables de la réponse antimycobactérienne précoce. De plus en plus de preuves suggèrent que le système immunitaire inné peut aussi produire des réponses spécifiques aux agents pathogènes et augmenter la résistance aux infections secondaires grâce à la «mémoire immunitaire innée» ou à «l'immunité entraînée» (Kleinnijenhuis *et al.*, 2014; Netea *et al.*, 2016). Elles sont également importantes pour la progression de l'infection et le contrôle à long terme de *Mtb* en amorçant et en éduquant continuellement les réponses immunitaires adaptatives et en régulant l'inflammation.

6.1.1. *Mtb* et Macrophages

Les macrophages alvéolaires sont les premières cellules immunitaires à rencontrer le *Mtb* et représentent également sa principale niche de réplication (Russell *et al.*, 2009; Sampath *et al.*, 2021). Les interactions macrophages-mycobactéries et le rôle des macrophages dans la réponse de l'hôte peuvent être résumés sous les processus suivant: liaison du *Mtb* à la surface des macrophages, internalisation et fusion phagosome-lysosome et finalement inhibition / destruction de la croissance mycobactérienne.

Liaison du *Mtb* à la surface des macrophages

La reconnaissance du *Mtb* par les macrophages est la première étape pour l'activation de la réponse immunitaire innée. Ces cellules utilisent différents récepteurs et mécanismes opsoniques

ou non opsoniques, pour pouvoir se lier aux composants de la paroi cellulaire bactérienne et phagocyter *le Mtb*, tel les récepteurs de la famille du complément, les récepteurs Fc des anticorps, le récepteur du mannose, les récepteurs lectines de type C, récepteurs membranaires ancrés au glycoposphatidylinositol (GPI) (par exemple CD14) et divers récepteurs éboueurs, y compris CD36. En plus, les macrophages expriment un large éventail de récepteurs de reconnaissance de formes (PRR) dont les récepteurs de type Toll (TLR). Parmi les TLR, TLR-2, TLR-4 et TLR-9 sont d'une importance particulière dans la détection de *Mtb*, avec NOD2, Mincle, Dectin-1, MR et DC-SIGN, contribuant à l'activation des macrophages par PRR (Berrington & Hawn, 2007; Jo, 2008; Jo et al., 2007; Sia & Rengarajan, 2019; Crevel *et al.*, 2011).

L'entrée de *Mtb* dans les macrophages via différents récepteurs conduit à des différences dans la transduction du signal et l'activation immunitaire qui peuvent inhiber ou favoriser la réplication bactérienne. Par exemple, la phagocytose médiée par le récepteur Fc est directement liée à une augmentation de la production des espèces réactifs de l'oxygène et permet la fusion des phagosomes lysosomes, alors que la liaison à CR3 déclenche une production minimale de superoxyde et inhibe la fusion phagosome lysosome (Aderem & Underhill, 1999; Crevel *et al.*, 2002; Jayachandran *et al.*, 2007).

Internalisation et fusion phagosome-lysosome

Après l'ingestion par les phagocytes activés, *Mtb* est englobé dans un phagosome immature, une vésicule caractérisée par son pH modérément bas (Armstrong & Hart, 1971). Cette endocytose est suivie de la maturation du phagosome, qui est marquée par la diminution du pH du compartiment, aboutissant à la fusion du phagosome avec le compartiment lysosomal dégradant (Colombo *et al.*, 2006; Gutierrez *et al.*, 2004).

Cependant le *Mtb* est capable de survivre et de se répliquer dans le phagosome en inhibant la maturation phagosomale et la génération phagolysosomale grâce à divers mécanismes (Ehrt & Schnappinger, 2009; Philips & Ernst, 2012). Des études ont démontré que les mycobactéries sont capables de produire de l'ammoniac, ce qui pourrait à la fois inhiber la fusion phagosome-lysosome et en alcalinisant le contenu intralysosomal, diminuer la puissance du complexe de fusion (Gordon *et al.*, 1980). De même, les sulfatides (dérivés du tréhalose 2-sulfate, un glycolipide produit par *Mtb*) avaient déjà été montrés inhiber également la fusion phagosome-

lysosome (Goren *et al.*, 1976; Goren *et al.*, 1974). En plus d'éviter la destruction des cellules bactériennes par les phagocytes hôtes, ces mécanismes de virulence bactérienne limitent également le succès de la présentation de l'antigène par les cellules infectées, un mécanisme important par lequel *Mtb* échappe à la détection par les cellules T (Schluger & Rom, 1998). Les cellules phagocytaires peuvent contourner ce blocage en dirigeant les phagosomes bactériens dans la voie autophagique de dégradation (Harris *et al.*, 2009).

Inhibition / destruction de la croissance mycobactérienne

Une fois à l'intérieur du macrophage, le *Mtb* peut être dégradé par plusieurs mécanismes grâce à une multitude d'interactions compliquées, médiées par des cytokines, entre les lymphocytes et les phagocytes. L'activation avec l'IFN- γ , stimule les mécanismes anti-mycobactériens dans les macrophages, notamment les réactifs intermédiaires de l'oxygène (ROI) et les réactifs intermédiaires de l'azote (RNI). L'oxyde nitrique (NO), le produit de l'oxyde nitrique synthase inducible (iNOS), est très toxique pour les mycobactéries intracellulaires (Chan *et al.*, 1992). Les inhibiteurs d'iNOS aggravent l'évolution de la TB murine et les souris déficientes en NOS2 sont très sensibles aux infections mycobactériennes (Chan *et al.*, 1992; Garcia *et al.*, 2000). Cependant, le rôle de l'iNOS dans la TB humaine est moins clair, bien que l'expression d'iNOS soit documentée dans les monocytes humains et les macrophages alvéolaires (Nicholson *et al.*, 1996). Le rôle du ROI est encore plus ambigu, bien que les souris déficientes en p47 cytosolique, qui est nécessaire pour une production efficace de superoxyde, étaient partiellement incapables de contrôler les infections aiguës par aérosols (Cooper *et al.*, 2000). Plus important encore, il a été rapporté que les personnes atteintes de la maladie granulomateuse chronique sont plus sensibles à la TB (Lau *et al.*, 1998). On pense que les ROI seuls sont insuffisant pour tuer *Mtb*, et des interactions synergiques avec le RNI sont probables. En effet, *Mtb* possède différents systèmes de détoxification lui permettant de résister à l'accumulation de ROI et RNI tels qu'une catalase (KatG), des superoxyde dismutases (SodA, SodC), des enzymes anti-oxydantes (CysH) et des réductases/peroxydases (AhpC, AhpD, DlaT et Lpd) (Voskuil *et al.*, 2011). Les microbes persistants pourraient passer à un stade de dormance avec une activité métabolique réduite qui facilite leur survie dans des conditions de privation de nutriments et d'oxygène. Ces bactéries peuvent persister sans produire de maladie et donc créer un état de latence (Kaufmann, 2001).

Un autre mécanisme potentiel impliqué dans la défense des macrophages contre *Mtb* est l'apoptose, ou mort cellulaire programmée (Oddo *et al.*, 1998). L'apoptose des macrophages libère des vésicules apoptotiques qui transportent les antigènes mycobactériens vers les DC non infectées et conduit à une présentation d'antigène plus efficace. L'inhibition de l'apoptose des macrophages pourrait réduire le transfert d'antigènes vers les cellules voisines et affecter l'activation des cellules T CD8 (Dheda *et al.*, 2010; Schaible *et al.*, 2003). Des souches de *Mtb* plus virulentes peuvent induire des niveaux plus élevés de la molécule anti-apoptotique Bcl-2, empêchant l'apoptose et favorisant la mort nécrotique, définie par la lyse cellulaire, qui permet la sortie des bacilles du macrophages et donc la propagation de cellule à cellule (Chen *et al.*, 2006; Gan *et al.*, 2008; Keane *et al.*, 2000).

Dans les macrophages, *Mtb* induit une augmentation de production de cytokines pro-inflammatoires (en particulier le TNF- α) qui stimulent la sécrétion des chimiokines (en particulier CCL-2, 3, 4, 5 et CXCL9 et 10) par les macrophages dans le site d'infection. Ces chimiokines attirent d'autres cellules au site de l'infection et sont importantes dans la formation et le maintien du granulome (Algood *et al.*, 2003; Ferraz *et al.*, 2006).

6.1.2. *Mtb* et neutrophiles

Les neutrophiles sont parmi les premières cellules immunitaires à migrer vers le site de l'infection lors de l'infection à *Mtb* et jouent un rôle crucial dans le développement de réponses inflammatoires innées (Dallenga & Schaible, 2016). Ces cellules peuvent phagocyter les bacilles et induire leur dégradation grâce à un arsenal d'effecteurs antimicrobiens contenus dans leurs granules tels α -défensines, métalloprotéases matricielles, lactoférine et lipocaline. Parallèlement à cette forte activité bactéricide, ils sécrètent également des chimiokines et des cytokines pro-inflammatoires (IFN- γ et TNF- α) pour recruter et activer d'autres cellules immunitaires (Appelberg, 2007; Korbel *et al.*, 2008; Segal, 2005). Ils favorisent aussi la réponse immunitaire adaptative contre *Mtb* en fournissant les bacilles aux cellules dendritiques sous une forme qui rend celles-ci un initiateurs efficaces de l'activation des lymphocytes T CD4⁺. Cependant l'importance de ces cellules est discutée. Certains modèles confèrent aux neutrophiles un rôle essentiel dans le contrôle des premières étapes de l'infection. D'autres soutiennent un rôle négatif de ces cellules dans la pathogenèse de la TB (Eruslanov *et al.*, 2005; Feng *et al.*, 2006; Korbel *et al.*, 2008). Le rôle pathogène des neutrophiles est démontrée dans des études comparant le

recrutement des neutrophiles chez des souches de souris résistantes et sensibles (Eruslanov *et al.*, 2005; Keller *et al.*, 2006). Les neutrophiles étaient rapidement recrutés dans l'espace bronchoalvéolaire à des magnitudes plus élevées chez les souris sensibles. En plus l'élimination de ces cellules au début de l'infection à *Mtb* a permis de prolonger la durée de vie des souris génétiquement sensible, ce qui suggère que l'implication précoce des neutrophiles était pathogène chez ces souris.

6.1.3. *Mtb* et Cellules dendritiques

Les DCs sont des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles qui sont cruciaux pour la protection contre l'infection à *Mtb* en provoquant à la fois des réponses cellulaires T primaires et secondaires. Après phagocytose du *Mtb*, les DCs présentent les antigènes mycobactériens aux lymphocytes en utilisant à la fois des voies classiques (CMH I et II) et non classiques (par exemple CD1) (Blackwell, 1996; Steinman, 1998). La phagocytose du *Mtb* par les DCs humaines se fait via la ligature de DC-SIGN au lipoarabinomannan (Geijtenbeek *et al.*, 2003; Tallieux *et al.*, 2003). L'infection des cellules dendritiques par *Mtb* entraîne la maturation de ces cellules caractérisées par une expression accrue des molécules d'adhésion, de co-stimulation et de présentation d'antigène (ICAM-1, CD54, CD40, B7.1, B7. 2, CMH Classe I et CMH Classe II), ainsi que dans la production des cytokines induisant la réponse Th1/IFN γ telles que TNF- α , IL-1 et IL-12 (Bodnar *et al.*, 2001; Turley *et al.*, 2016). En plus, les cellules dendritiques infectées par *Mtb* exprimaient CCL3, CCL4, CXCL9 et CXCL10, qui étaient impliquées dans la stimulation de la migration des cellules NK et T au site de l'infection (Lande *et al.*, 2003). Les DCs matures augmentent leur expression en CCR7 et migrent vers les ganglions lymphatiques régionaux où ils amorcent les lymphocytes T naïfs (Bhatt *et al.*, 2004; Olmos *et al.*, 2010; Wolf *et al.*, 2008). Ce processus de migration est impliqué dans la dissémination de *Mtb* du site primaire de l'infection aux ganglions lymphatiques régionaux. Les lymphocytes T spécifiques de l'antigène peuvent être amorcés à la fois par les DCs migratrices infectées et par les DCs résidentes des ganglions lymphatiques non infectés. Une étude a démontré que les DCs infectés migrent vers les ganglions lymphatiques drainant les poumons où ils sécrètent des antigènes solubles et non transformés de *Mtb* qui sont par la suite phagocytés par les DCs résidentes des ganglions lymphatiques non infectés (Srivastava & Ernst, 2014).

De son côté, *Mtb* a développé des mécanismes évasif par lequel il supprime la maturation des DCs en réduisant l'expression de CD1, diminuant ainsi leur capacité à présenter des antigènes lipidiques mycobactériens (Baena & Porcelli, 2009; Stenger *et al.*, 1998); en inhibant leur expression de marqueurs de maturation et leur capacité à induire la prolifération des lymphocytes T (Geijtenbeek *et al.*, 2003; Hanekom *et al.*, 2003); et en promouvant l'induction de la sécrétion d' interleukine 10 (IL-10) (Geijtenbeek *et al.*, 2003).

6.1.4. *Mtb* et Cellules NK

Comme les cellules T et B, les cellules NK se développent à partir d'un progéniteur lymphoïde commun, Cependant, elles ont été considérées comme des cellules innées parce qu'elles expriment des récepteurs activateurs codés par la lignée germinale et peuvent répondre rapidement aux agents pathogènes. Ces cellules sont des composants cellulaires importants de la réponse immune anti TB (Kust *et al.*, 2021). Elles assurent cette fonction principalement par cytotoxicité cellulaire, notamment d'une manière dépendante de la perforine / granulysine, et la production d'une gamme de cytokines (Kulpraneet *et al.*, 2007; Topham & Hewitt, 2009; Yoon *et al.*, 2015). Ces cellules peuvent lyser directement le pathogène comme elles peuvent lyser les monocytes infectés (Vankayalapati *et al.*, 2002, 2005). Elles régulent également l'activité cytotoxique des macrophages contre *Mtb* et sont de puissants producteurs d'IFN- γ , une cytokine cruciale pour l'activation des macrophages (Khader *et al.*, 2019; Schierloh *et al.*, 2005).

Les cellules NK ne sont pas seulement des effecteurs clés dans la réponse immunitaire innée, mais régulent également les réponses immunitaires adaptatives, telles que la maturation des cellules T CD8 + cytotoxiques (Vankayalapati *et al.*, 2004), la prolifération des cellules T $\gamma\delta$ (Zhang *et al.*, 2006) ou la lyse des T régulatrices lors de stimulations antigéniques avec des antigènes mycobactériens (Roy *et al.*, 2008). Cependant, Malgré les fonctions effectrices et l'expansion précoce des cellules NK après l'infection par *Mtb*, l'absence des cellules NK n'a pas influencé la charge bactérienne ou la progression de la maladie dans les poumons, ce qui suggère que les cellules NK ne sont pas essentielles pour la résistance de l'hôte à *Mtb* (Zhang *et al.*, 2006).

6.2. L'immunité adaptative

Par rapport à la réponse immunitaire à d'autres infections, la réponse initiale à *Mtb* est retardée (Reiley *et al.*, 2008; Wolf *et al.*, 2008). Malgré ce retard, la croissance bactérienne exponentielle (au moins dans le modèle murin) est stoppée lorsque les lymphocytes T amorcés migrent vers le site de l'infection, indiquant que la réponse immunitaire adaptative agit pour contrôler et contenir la bactérie (P. Cheng *et al.*, 2022; Lazarevic *et al.*, 2005).

6.2.1. L'immunité cellulaire

Mtb est un exemple classique d'agent pathogène pour lequel la réponse protectrice repose sur l'immunité à médiation cellulaire. Vu que c'est un organisme qui vit dans des cellules, généralement les macrophages. Les mécanismes effecteurs de lymphocytes T, plutôt que des anticorps, sont nécessaires pour contrôler ou éliminer ces bactéries. Historiquement, la recherche s'est concentrée sur la réponse des cellules T CD4⁺ à la TB. Mais récemment, il y a eu un intérêt accru pour le rôle des cellules T CD8⁺ dans la réponse immunitaire à ce pathogène.

Dans le modèle murin, une semaine suivant l'infection par un *Mtb* virulent, le nombre de cellules T CD4⁺ et CD8⁺ activées a augmenté dans les ganglions lymphatiques drainant les poumons (Feng *et al.*, 1999; Serbina & Flynn, 1999). Entre 2 et 4 semaines après l'infection, ces cellules migrent vers les poumons et présentent un phénotype effecteur / mémoire (CD44^{hi} CD45^{lo} CD62L⁻); environ 50 % de ces cellules sont CD69⁺ (Feng *et al.*, 1999; Flynn & Chan, 2001; Raja, 2004). Cela indique que les cellules T activées migrent vers le site de l'infection et interagissent avec les cellules présentatrices d'antigènes. Au niveau des granulomes tuberculeux les cellules T CD4⁺ et CD8⁺ contiennent l'infection et empêchent la réactivation de la maladie (Randhawa, 1990). La réponse des lymphocytes T contre l'infection à *Mtb* se fait généralement par la sécrétion de cytokines ou par les actions antimicrobiennes directes de ces cellules (Serbina *et al.*, 2000).

6.2.1.1. *Mtb* et lymphocytes CD4

Le lymphocyte T CD4 est la principale cellule effectrice dans l'immunité à médiation cellulaire contre le *Mtb*. Des études sur des modèles animaux ont montré, par la déplétion des cellules T CD4 (Caruso *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2012; Mogues *et al.*, 2001; Muller *et al.*, 1987), le transfert adoptif (Lake, 1983; Orme & Collins, 1984) ou l'utilisation de souris à gène perturbé (Caruso *et al.*, 1999; Tascon *et al.*, 1998), le rôle primordial des cellules T CD4⁺ dans le contrôle de l'infection. Chez l'homme, l'émergence de l'épidémie du VIH a démontré que la perte de cellules T CD4⁺ augmente considérablement la sensibilité à la TB aiguë et la réactivation. En fait, les sujets VIH⁺ PPD⁺ ont un risque annuel de 8 à 10 % de développer une TB active, contre un risque à vie de 10 % pour les patients VIH⁻ PPD⁺ (Ling, 2012)

Étant une bactérie intracellulaire, la présentation des antigènes mycobactériens aux cellules T CD4⁺ se fait via le CMH classe II. En effet, les lymphocytes T CD4 expriment le *TCRαβ* (pour *Tcell receptor*) impliqués dans la reconnaissance des antigènes qui ont été traités dans les phagosomes et présentés sous forme de petits fragments peptidiques par les molécules du CMH de classe II à la surface des cellules présentatrices d'antigènes telles que monocytes, macrophages ou cellules dendritiques (Stefan, 1993). Suite à la reconnaissance des antigènes mycobactériens, les cellules CD4⁺ activées aident à amplifier la réponse immunitaire de l'hôte en activant les fonctions effectrices des cellules phagocytaires et en recrutant d'autres cellules immunitaires au site de l'infection.

Les cellules T CD4⁺ spécifiques de *Mtb* sont typiquement du type cellule T auxiliaire (Th1). Les cellules T CD4 Th1 produisent des cytokines, notamment l'IFN γ , le TNF α , l'interleukine 2 (IL-2), la lymphotoxine et le facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages (GM-CSF), qui incitent à la stimulation des cellules Th1 et des CTL ainsi que de la maturation et de l'activation des macrophages et les granulocytes (Garra *et al.*, 2013; Jasenosky *et al.*, 2015; Kaufmann, 2002). Les cytokines Th2, telles que l'interleukine 4 (IL-4) et l'IL-10 sont rares, mais pas totalement absentes; elles favorisent la production d'anticorps mais suppriment la réponse immunitaire de type Th1 (Garra *et al.*, 2013; Kaufmann, 2002). Th1 et Th2 interagissent et s'inhibent mutuellement pour maintenir la réponse immunitaire normale, tuant ainsi *Mtb* sans dommage pathologique causé par une réponse immunitaire excessive (Guo & Zhao, 2012; Harris *et al.*, 2007). Un déséquilibre Th1 / Th2 a été trouvé chez les patients tuberculeux avec une

diminution des cytokines Th1 et une augmentation des cytokines Th2 dans la circulation proposant ainsi une corrélation significatif entre les réponses Th2 et la pathogenèse et le développement de la TB (Dheda et al., 2005; Reljic et al., 2009; Seah et al., 2000; Wu et al., 2021). Cependant, d'autres auteurs n'ont pas réussi à associer les réponses Th2 et la TB (Lin et al., 1996). En conséquence, le débat sur la balance Th1-Th2 est toujours ouvert. Cela devient encore plus complexe après la description récente d'un rôle supplémentaire pour d'autres sous-ensembles cellulaires, tels que les cellules T régulatrices et les cellules T Th17.

Au cours de la différenciation induite par l'antigène, les cellules T CD4⁺ peuvent acquérir la capacité de produire simultanément deux cytokines ou plus. Ces cellules T dites «polyfonctionnelles» sont généralement considérées comme des effecteurs supérieurs par rapport aux cellules qui ne produisent qu'une cytokine. Les lymphocytes T trifonctionnels, produisant simultanément IFN γ , TNF α et IL-2, sont supposés avoir de capacité fonctionnelle effectrices et prolifératives (Jasenosky et al., 2015; Seder et al., 2008). Parmi les études qui ont examiné l'activité des lymphocytes T CD4⁺ trifonctionnelle versus mono et bifonctionnelle au cours de l'infection à *Mtb* et la TB active, plusieurs ont rapporté que la TB active est associée à des fréquences élevées de lymphocytes T CD4⁺ spécifiques de *Mtb* avec une ou deux fonction, en particulier TNF α ⁺ ou TNF α ⁺ IFN γ ⁺. En revanche, les personnes atteintes d'une infection latente présentent des fréquences plus élevées de lymphocytes T CD4⁺ trifonctionnels IFN γ ⁺ TNF α ⁺ IL-2⁺ (Chiacchio et al., 2011; Harari et al., 2011; Jeong et al., 2014; Pollock et al., 2013). De plus, le traitement antituberculeux semble rendre le compartiment des lymphocytes T CD4⁺ à nouveau trifonctionnel (Day et al., 2011; Riou et al., 2014). D'autres études, par contre, ont montré que la TB active s'accompagne d'une augmentation de la fréquence des lymphocytes T TNF α ⁺ IFN γ ⁺ IL-2⁺ CD4⁺, par rapport à une infection latente (Caccamo et al., 2010; Mueller et al., 2008; Qiu et al., 2012; Sutherland et al., 2009) ou après un traitement antituberculeux (Young et al., 2010).

Outre la fonction cruciale des cellules T CD4⁺ dans la production de cytokines, ces cellules peuvent également participer à l'induction de l'apoptose des cellules infectées et à la réduction subséquente de la viabilité bactérienne par le biais du Système ligand CD95 (Fas) (Oddo et al., 1998). Une autre fonction a été attribuée à ces cellules, c'est-à-dire aider à développer la réponse médiée par les cellules T CD8⁺ (Serbina et al., 2001).

6.2.1.2. *Mtb* et lymphocytes CD8

Il a été observé, lors de l'infection à *Mtb*, que les souris avec délétion du gène de la microglobuline $\beta 2$, qui abroge la présentation de l'antigène par le CMH de classe I, ou les souris dépourvues de lymphocytes T CD8, vivent plus longtemps que les souris dépourvus de CD4 ou ayant des perturbations correspondantes de la voie de présentation d'antigène par le du CMH de classe II (Mogues *et al.*, 2001). Cependant, les lymphocytes T CD8 contribuent de manière significative à l'immunité contre l'infection à *Mtb*. En effet, les souris dépourvues de molécules impliquées dans la voie de présentation des antigènes TAP-1 (transporteur associé au traitement antigénique¹) ont des réponses T CD8 déficientes et succombent plus rapidement après une infection à *Mtb* par rapport aux témoins de type sauvage (Behar *et al.*, 1999; Sousa *et al.*, 2000). La déplétion des lymphocytes T CD8 chez les macaques rhésus compromet l'immunité protectrice contre la vaccination BCG ou les interventions chimiothérapeutiques (Chen *et al.*, 2009), ce qui suggère que les lymphocytes T CD8 sont des composants importants des réponses de rappel à l'infection. De même, dans un modèle murin de latence induite par un traitement antibiotique, les réponses des lymphocytes T CD8 se sont avérées importantes pour empêcher la réactivation (Pinxteren *et al.*, 2000).

L'importance des lymphocytes T CD8 lors d'une infection à *Mtb* est liée à leur sécrétion de cytokines et de molécules effectrices cytolytiques qui peuvent limiter la réplication bactérienne. En plus de l'IFN- γ et du TNF- α , les lymphocytes T CD8 sécrètent de la perforine pour lyser les macrophages infectés par *Mtb* (Stenger *et al.*, 1997). Les lymphocytes T CD8 peuvent également libérer de la granulysine dans des granules cytotoxiques pour tuer directement *Mtb* intracellulaire (Ernst *et al.*, 2000; Stenger *et al.*, 1997; Stenger *et al.*, 1998). Les cellules T CD8 + interviennent également dans l'induction de l'apoptose des cellules infectées par l'intermédiaire des interactions Fas-FasL (Stenger *et al.*, 1997). Des changements dans la fonction des lymphocytes T CD8 + pendant une TB active ont été décrits. Les lymphocytes T CD8+ spécifiques à *Mtb* circulants (Smith *et al.*, 2000) et ceux situés sur les sites de TB active (Andersson *et al.*, 2007) présentent une activité cytotoxique réduite par rapport à celles trouvées chez personnes atteintes d'une infection latente. Bien qu'un rapport récent ait révélé un enrichissement des espaces pleuraux de patients tuberculeux en cellules T CD69 + CD8 + spécifiques à *Mtb* trifonctionnelles, IFN γ + TNF α + IL-2+ (Li *et al.*, 2014), une étude antérieure a rapporté que ces cellules étaient réduites

chez les patients atteints de TB active par rapport aux personnes atteintes d'une infection latente. En plus, la charge élevée d'antigènes de *Mtb* semblait exacerber le dysfonctionnement des lymphocytes T CD8⁺ (Day *et al.*, 2011).

6.2.1.3. *Mtb* et lymphocytes mémoires

Les lymphocytes T mémoire (TM) se forment après une exposition ou une infection par des agents pathogènes. Ces cellules peuvent être subdivisées chez l'homme en cellules TM effectrices (CD45RO, CCR7^{lo}, CD62L^{lo}, CD69^{hi}) et TM centrales (CD45RO, CCR7^{hi}, CD62L^{hi}, CD69^{lo}) (Kaufmann & McMichael, 2005). Les cellules TM prolifèrent rapidement après la rencontre avec des antigènes, et produisent plusieurs cytokines telles que l'IFN γ , l'IL -2, le TNF α , le lymphotoxine et / ou le GM-CSF conférant une protection à long terme contre la réinfection (Kaufmann & Parida, 2008).

À la fin des années 1980, Orme a été le premier à montrer expérimentalement, en utilisant le transfert adoptif chez des souris lymphopéniques, que les cellules T CD4 mémoires offrent une protection accélérée contre la provocation intraveineuse de *Mtb* par rapport aux cellules naïves (Kirman *et al.*, 2016). Les lymphocytes T mémoires spécifiques de l'antigène ont été aussi détectés chez des personnes atteintes de TBL et chez des patients tuberculeux après un traitement et une guérison réussis (Adekambi *et al.*, 2012; Arlehamn *et al.*, 2013; Serbina & Flynn, 2001). Cependant, même en présence de cellules immunitaires à mémoire protectrice, la récurrence de la TB est courante. Des études en Ouzbékistan ont révélé qu'un tiers des patients tuberculeux traités avec succès ont été ultérieurement diagnostiqués à nouveau avec une TB récurrente après un suivi d'environ 2 ans (Cox *et al.*, 2006). Dans d'autres études, la réinfection a été identifiée comme la principale cause de récurrence, par opposition à la réactivation de l'infection latente (Van Rie *et al.*, 1999). Ceci suggère que les lymphocytes T mémoires générés après une infection primaire à *Mtb* ont une capacité limitée de protection contre une réinfection.

6.2.1.4. *Mtb* et lymphocytes régulatrices

Le système immunitaire dispose de mécanismes pour supprimer la réponse aux auto-antigènes et non auto-antigènes persistants. Les lymphocytes T régulateurs (Treg), qui suppriment, et donc contrebalancent la réponse inflammatoire, sont l'un de ces mécanismes (Cardona & Cardona,

2019). Il a été reporté que la déplétion des Treg avant et tôt après l'infection à *Mtb* améliore le contrôle de la charge bactérienne (Scott-Browne *et al.*, 2007). En plus, les Treg spécifiques de *Mtb* retardent l'expansion des lymphocytes T anti-mycobactériens CD4 et CD8 et par conséquent, le transfert des Treg spécifiques de *Mtb* confère une sensibilité accrue à l'infection (Shafiani *et al.*, 2010; Stringari *et al.*, 2021). Les cytokines clés impliquées dans cette fonction immunosuppressive sont l'IL-10, le TGF β (Transforming growth factor beta) et l'interleukine 35 (Collison *et al.*, 2007; Moore *et al.*, 2001; Nakamura *et al.*, 2004). Les Treg expriment également des granzymes et induisent ainsi l'apoptose des cellules cibles (Grossman *et al.*, 2004). Un autre mécanisme de suppression est la perturbation métabolique, obtenue en consommant de l'IL-2 disponible (Grossman *et al.*, 2004). Les marqueurs utilisés pour identifier cette entité cellulaire comprennent, en plus du CD3 et CD4, CD25, FoxP3, CD127 ou CD39 (Jasenosky *et al.*, 2015).

Étant donné l'immunopathologie étendue et les lésions pulmonaires qui caractérisent la TB humaine, le rôle précis des cellules Treg (délétère, bénéfique ou spectateur) dans l'immunopathogenèse de la TB reste incertain. De nombreuses études ont apporté des nombres plus élevés de Treg chez les patients tuberculeux que chez les sujets TBL ou les témoins sains (Burl *et al.*, 2007; T. Chiacchio *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2014; Semple *et al.*, 2013). Par ailleurs, il a été démontré que chez les patients tuberculeux, les taux des Treg sont plus élevés dans le site d'infection (études sur le BAL et le liquide pleural principalement) que dans le sang (Arram *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2010; Semple *et al.*, 2013). Ces taux élevés de Treg chez les patients tuberculeux ont été accompagnés d'une augmentation de la production d'IL-10 dans les cultures cellulaires de ces patients par rapport au TBL (Kim *et al.*, 2014). Certaines études se sont intéressées également au suivi des patients tuberculeux après traitement. Ces études ont montré que le taux de Treg diminuait avec la chimiothérapie, sans augmentation transitoire (Agrawal *et al.*, 2018a, 2018b; Díaz *et al.*, 2015). Cependant, on ne sait pas encore si des taux élevés de Treg sont une conséquence de l'inflammation ou un facteur de risque de développement de la TB. Une expansion limitée des Treg peut contribuer à une réponse optimale à *Mtb* caractérisée par une inflammation modulée dans les premières semaines après l'établissement de l'infection, mais une trop grande expansion de Treg entraîne une altération de l'immunité antituberculeuse (Mayer-Barber *et al.*, 2011; McNab *et al.*, 2014).

6.2.1.5. *Mtb* et cellules Th17

Les cellules Th17, un sous-ensemble distinct des cellules T auxiliaires CD4, jouent un rôle essentiel dans l'immunité contre un certain nombre d'agents pathogènes bactériens et fongiques (Curtis & Way, 2009). Ces cellules produisent des cytokines uniques ; l'IL-17, l'IL-17F, l'interleukine 21 et l'interleukine 22. Il a été rapporté que les cellules Th17 soit jouent un rôle protecteur (Khader *et al.*, 2007; Wozniak *et al.*, 2010) ou bien confèrent des effets pathologiques (Cruz *et al.*, 2010) au cours d'une infection mycobactérienne. En particulier, les cellules Th17 sont importantes dans l'amélioration du recrutement des neutrophiles et des cellules T CD4+Th1 par la sécrétion de diverses chimiokines, ce qui est en corrélation avec le contrôle de l'infection à *Mtb* (Kathamuthu *et al.*, 2022; Khader *et al.*, 2007). Les cellules Th17 participent également à la réponse inflammatoire précoce à une infection mycobactérienne. Cependant, la production d'IL-17 dans les poumons est régulée négativement par l'IFN γ (Cruz *et al.*, 2014). Ceci suggère qu'une réponse équilibrée Th1 et Th17 est souhaitable pour l'immunité contre *Mtb*.

6.2.1.6. *Mtb* et cytokines

La régulation des interactions entre les cellules du système immunitaire, lors de la réponse immunitaire à tous les agents pathogènes, se fait en grande partie par des cytokines. *Mtb* ne fait pas exception et induit fortement la production des cytokines lors de l'infection. Les cytokines pro-inflammatoires sont cruciales pour le contrôle de l'infection, alors que les cytokines anti-inflammatoires contribuent à réguler les réponses inflammatoires incontrôlées et dommageables.

6.2.1.6.1. Cytokines pro-inflammatoires

IL12 : l'IL-12 joue un rôle important en tant qu'intermédiaire entre les réponses immunitaires innées et adaptatives, et est produit par, et influence, multiples cellules effectrices (Gately *et al.*, 1991; Kobayashi *et al.*, 1989). Elle est induite à la suite de la phagocytose des bacilles de *Mtb* par les macrophages et les cellules dendritiques (Geijtenbeek *et al.*, 2003; Ladel *et al.*, 1997). Une

production stable et prolongée d'IL-12 est nécessaire pour le développement d'une réponse Th1 avec production d'IFN γ et pour limiter la croissance bactérienne à long terme (Feng *et al.*, 2005).

IFN γ : cette cytokine est essentiellement produite par les cellules T CD4 et CD8 ainsi que par les cellules NK et les macrophages (Flynn & Chan, 2001). L'IFN γ est une cytokine activatrice des phagocytes qui ordonne aux macrophages et à d'autres cellules de changer de fonction. En particulier, en l'absence d'IFN γ , *Mtb* occupe un environnement intracellulaire dans lequel il y a peu de production de radicaux réactifs, le phagosome ne fusionne pas avec les lysosomes et reste à pH neutre (Domingo-gonzalez *et al.*, 2016; Schroder *et al.*, 2004). La production d'IFN γ est régulée par des cytokines telles que l'IL-12 et l'IL-18 (Munder *et al.*, 1998).

TNF α : le TNF α est principalement produit par les macrophages mais peut également être sécrété par les cellules T CD4 et CD8 et joue un rôle important dans l'activation optimale des macrophages (Serbina & Flynn, 1999). Il exerce un spectre extrême de bioactivités et la plupart des cellules montrent au moins une certaine réactivité à cette cytokine (Wajant *et al.*, 2003). Le TNF α contribue au contrôle de l'infection à *Mtb* par l'induction des RNI et des ROI par les macrophages et l'induction précoce des chimiokines. Les souris déficientes en TNF α produisent des niveaux réduits de chimiokines entraînant la formation de granulomes défectueux (Roach *et al.*, 2002).

IL2 : l'IL-2 a un rôle central dans la génération d'une réponse immunitaire en induisant une expansion du pool de lymphocytes spécifiques d'un antigène (Raja, 2004). Par conséquent, la sécrétion d'IL-2 par les cellules CD4 Th1 protectrices est un paramètre important à mesurer et plusieurs études ont démontré que l'IL-2 peut influencer l'évolution des infections mycobactériennes, soit seule, soit en association avec d'autres cytokines (Kayblanchard *et al.*, 1989).

IL17 : la famille des cytokines IL-17 est composée de six membres, IL-17A-F, l'IL-17A et l'IL-17F étant les plus étudiées. La production d'IL-17 est classiquement attribuée aux cellules T, cependant, d'autres lymphocytes ainsi que des cellules immunitaires innées peuvent produire cette cytokine (Jin & Dong, 2013). L'IL-17 stimule la production de défensine et recrute des neutrophiles et des monocytes sur le site de l'inflammation, et est impliqué dans la phase précoce de la défense de l'hôte (Dheda *et al.*, 2010). Une capacité récemment identifiée de l'IL-17 est de réguler l'IL10 induite par des mycobactéries (Jin & Dong, 2013).

6.2.1.6.2. Cytokines anti-inflammatoires

IL4 : l'IL-4 est une des cytokines clé de la réponse Th2 induisant l'inhibition de la réponse Th1 protectrice contre le *Mtb* (Powrie *et al.*, 1993). L'expression de l'IL-4 est en partie régulée par l'IL-2 et est associée à la différenciation des cellules Th2, qui expriment et maintiennent ensuite l'IL-4 et l'IL-5 dans une boucle de rétroaction positive (Graham *et al.*, 1990).

IL10 : l'IL-10 antagonise l'action des réponses pro-inflammatoires en régulant négativement l'expression de l'IFN- γ , du TNF α et de l'IL-12 (Moore *et al.*, 2001; Oswald *et al.*, 1992; Richardson *et al.*, 2015). Il est produit par les cellules Th2 ainsi que par les cellules Th1 et Th17, les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules B et les neutrophiles. De plus, les Treg sont également une source majeure d'IL-10 et servent à limiter les réponses immunitaires potentiellement pathogènes (Redford *et al.*, 2011; Vieira *et al.*, 1991).

TGF β : le TGF β est une cytokine pléiotrope et régule des centaines de gènes pour moduler l'inflammation, la prolifération et la différenciation cellulaires, ainsi que la migration cellulaire (Letterio & Roberts, 1998; Taylor, 2008; Travis & Sheppard, 2014). Le TGF β peut être produit par divers types de cellules, y compris tous les leucocytes (par exemple, lymphocytes, macrophages, monocytes, cellules dendritiques) (Travis & Sheppard, 2014).

6.2.2. L'immunité humorale

En plus des macrophages, des cellules dendritique et des lymphocytes T, les cellules B sont aussi présentes dans le granulome (Tsai *et al.*, 2006). Egalement , des anticorps contre des protéines de *Mtb* ont été rapportés dans les sérums de patients tuberculeux et les anticorps identifiés chez des travailleurs de la santé exposés à *Mtb* offraient une protection modeste in vitro et dans un modèle d'infection murin (Lyashchenko *et al.*, 1998; Rijnink *et al.*, 2021). Cependant, leur fonction n'est pas aussi bien comprise que celle des cellules T en particulier. Des études chez des souris déficientes en cellules B indiquent que les cellules B pourraient agir comme des cellules présentatrices d'antigène et être responsables de la génération de centres germinatifs dans le poumon infecté. En outre, plusieurs études ont suggéré que les cellules B aident à moduler l'inflammation trouvée dans le site de l'infection (Bosio *et al.*, 2000; Maglione *et al.*, 2007).

Chez les souris dépourvues de cellules B, l'infection par *Mtb* a entraîné une augmentation du recrutement des neutrophiles et de l'inflammation. En outre, ces souris avaient une charge bactérienne et une sensibilité accrues à l'infection par rapport aux homologues de type sauvage (Bosio *et al.*, 2000; Maglione *et al.*, 2007). Le transfert adoptif des cellules B ou d'anticorps monoclonaux spécifiques des composants de la paroi cellulaire de *Mtb* peut améliorer le résultat de l'infection chez ces souris (Achkar *et al.*, 2015; Maglione *et al.*, 2007). La liaison de l'anticorps au récepteur inhibiteur Fc- γ IIB entraîne une atténuation de la production de l'IL-12 par les macrophages résultant en un impact négatif sur les réponses Th1 (Maglione *et al.*, 2008). La sécrétion des cytokines par les lymphocytes B peut également influencer les macrophages infectés par *Mtb*. En fait, l'expression de l'IFN de type I par les cellules B murines et les cellules B provenant d'un épanchement pleural de patients tuberculeux a modifié la polarisation des macrophages vers un phénotype anti-inflammatoire (Benard *et al.*, 2018). En gros, on peut dire que les lymphocytes B modulent l'inflammation par la sécrétion d'anticorps et des cytokines.

6.2.3. La réponse immune anti-tuberculose entre le site d'infection et le sang périphérique

Bien que l'infection à *Mtb* implique différentes formes cliniques de TB, telles que la TB pulmonaire, la TB pleurale et la TB des ganglions lymphatiques, la majorité des études humaines étudient les réponses immunitaires ex vivo ou après une infection in vitro des cellules du sang périphérique. Durant l'infection par *Mtb*, les lymphocytes T effecteurs spécifiques de *Mtb* sont recrutés, ils s'accumulent et prolifèrent au niveau du site local de la réplication bactérienne et seulement une très faible proportion des cellules se trouve dans le sang périphérique. Ceci dit, l'étude des cellules du sang périphérique peut ne pas fournir une image correcte de la réponse immunitaire spécifique induite au site local de l'infection.

Jusqu'à présent, seuls quelques rapports ont étudié les réponses immunitaires au site de l'infection chez les patients tuberculeux. La plupart de ces expériences utilisaient les cellules du liquides pleural ou du lavage bronchoalvéolaire qui offrent des modèles appropriés pour étudier la réponse immunitaire spécifique à *Mtb* au niveau des tissus des poumons et de la plèvre (Schwander & Dheda, 2011; Toossi *et al.*, 2011). Cependant, un nombre plus limité d'études ont examiné cette réponse au niveau des ganglions lymphatiques (Ganchua *et al.*, 2020; Kathamuthu

et al., 2017). Ces études ont rapporté des différences considérables dans la réponse immunitaire cellulaire et les mécanismes de régulation induits dans ces deux compartiments.

La réponse cellulaire médiée par les lymphocytes T est au cœur de l'immunité protectrice contre l'infection à *Mtb*. Une augmentation de la proportion des lymphocytes T CD3⁺ et en particulier les lymphocytes T CD4⁺ spécifiques à *Mtb* produisant l'IFN γ a été trouvée dans les épanchements pleuraux et le BAL de patients atteints d'une TB par rapport au sang périphérique (Herrera *et al.*, 2009; Hirsch *et al.*, 2001; Place *et al.*, 2010). En plus, Il a été démontré que les cellules T productrices d'IFN γ spécifiques de l'ESAT-6, sont hautement enrichies dans les poumons et la plèvre (Jafari *et al.*, 2008; Nemeth *et al.*, 2009; Wilkinson *et al.*, 2005). En utilisant une analyse de cytométrie en flux multi-paramètres, une partie significative des cellules T CD4⁺ spécifiques du *Mtb* dans l'espace pleural et le BAL étaient polyfonctionnelles démontrant deux, trois ou quatre fonctions simultanées et présentant un phénotype effecteur/effecteur mémoire (El Fenniri *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012). Ces résultats confirment la compartimentation de la réponse des cellules T effectrices au niveau du site de l'inflammation tissulaire. Cette accumulation sélective est probablement le résultat à la fois d'une migration vers les sites de l'infection et la différenciation en cellules T effectrices in situ.

L'interaction entre les cytokines pro-inflammatoires et les cytokines anti-inflammatoires est un facteur important pour déterminer l'issue de la maladie. La réponse immunitaire à *Mtb* est caractérisée par une réponse exubérante des lymphocytes Th1, qui est contrecarrée par des mécanismes immunitaires suppressifs locaux. En effet, une augmentation de la production d'IFN γ mais aussi une augmentation des taux de l'IL10 dans le liquide pleural par rapport au sérum a été rapportée (Barnes *et al.*, 1993). De même, une augmentation significative des taux d'IFN γ ainsi que d'IL10 ou IL4 a été trouvée dans les surnageants de culture des cellules du BAL stimulées par *Mtb* comparée aux PBMC chez les patients tuberculeux (Gerosa *et al.*, 1999; Herrera *et al.*, 2009). Ainsi, des mécanismes immunitaires suppressifs interviennent dans le site d'infection pendant la TB.

Les cellules Treg migrent vers les sites de réplication bactérienne pour moduler l'inflammation locale et prévenir la pathologie tissulaire. Cependant, l'inhibition de la production d'IFN γ pourrait également empêcher l'induction d'importantes fonctions effectrices antimicrobiennes. Une proportion significativement plus élevée de cellules Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ a été trouvée dans le liquide pleural et le BAL par rapport au sang périphérique et semblent participer à la

suppression des réponses immunitaires locales (Arram *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2007, 2010; Semple *et al.*, 2013; Sharma *et al.*, 2009). Semblable à un changement de la balance Th1 / Th2, un changement dans le rapport lymphocytes T effecteurs / lymphocytes Treg pourrait favoriser les signaux immunosuppresseurs et la persistance bactérienne dans les lésions tuberculeuses, offrant une niche de survie protectrice pour les bactéries.

Ensemble, ces résultats fournissent des preuves que l'étude de la compartimentation des réponses mixtes Th1 et immunosuppressives au niveau du site de la maladie pourrait fournir des indications importantes des mécanismes responsables de la réponse immunitaire altérée au cours de la TB, qu'il ne serait pas possible de détecter à partir d'études des échantillons de la circulation systémique.

OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

1. Objectif général

Le but principal de cette étude est d'évaluer les changements des sous populations dans le sang périphérique des patients marocains adultes, ayant différentes manifestations de la TB ainsi que de caractériser phénotypiquement et fonctionnellement les lymphocytes T au cours de la réponse immune antituberculeuse au niveau du site de l'infection dans le cadre de la TB ganglionnaire.

2. Objectifs spécifiques

- Établir des valeurs de référence des sous populations lymphocytaires ainsi qu'évaluer l'influence du sexe, de l'âge, de l'origine ethnique et des facteurs socio-économiques sur ces valeurs.
- Étudier les variations dans les concentrations et les proportions respectives de ces différentes sous populations dans le sang périphérique au cours de la TB active, comparer ces paramètres entre les différentes manifestations de la TB et explorer l'association de ces paramètres avec la charge bacillaire dans les frottis d'expectoration.
- Caractériser phénotypiquement et fonctionnellement la réponse immune antituberculeuse dans le site d'infection au cours de la TB ganglionnaire.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Méthodologie

Une interprétation correcte des troubles immunologiques et pathologiques dépend d'une bonne connaissance de ce qu'est un état immunitaire normal. Déterminer des valeurs de référence fiables pour les sous populations lymphocytaires chez les adultes sains normaux est nécessaires pour faciliter l'interprétation objective des résultats anormaux dans des maladies tels que la leucémie, les lymphomes, les déficits immunitaires, les maladies auto-immunes et infectieuses tels que la TB. Devant l'absence de telles références pour la population marocaine, le premier objectif de cette étude était d'établir des valeurs de référence des sous populations lymphocytaires. Cette première partie de l'étude vise également à évaluer l'influence du sexe, de l'âge, de l'origine ethnique et des facteurs socio-économiques sur ces valeurs.

La réponse immune à *Mtb*, en particulier l'immunité à médiation cellulaire, est particulièrement importante pour le contrôle de la TB. Vue l'importance cruciale des sous populations lymphocytaires dans cette réponse, le deuxième objectif de notre étude était d'étudier les variations dans les concentrations et les proportions respectives de ces différentes sous populations dans le sang périphérique chez les contrôles sains (CS), les sujets sains exposés au *Mtb* (EXPO) et les patients atteints de TB active (TB). En plus, nous avons comparé ces paramètres entre les patients atteints de TB pulmonaire (TBP), de TB ganglionnaire (TBEG) et de TB pleurale (TBEP). En fin, on a exploré l'association de ces paramètres avec la charge bacillaire dans les frottis d'expectoration chez les patients TBP.

L'étude de l'immunité contre le *Mtb*, au niveau du site infection, offre une fenêtre unique sur l'interaction entre l'hôte et le *Mtb* dans le microenvironnement naturel. Cependant, les études sur les réponses immunes cellulaires antituberculeuses au niveau des sites de l'infection dans le modèle humain sont très limitées. La TB ganglionnaire représente 43 % des lymphadénopathies et elle représente l'atteinte tuberculeuse extra-pulmonaire la plus fréquente au Maroc. Cette manifestation de la TB offre une occasion unique de comparer les réponses immunitaires locales in situ et périphériques dans le sang. Le troisième objectif de cette étude était donc de caractériser phénotypiquement et fonctionnellement la réponse immune antituberculeuse des PBMC et LNMC au cours de la TBEG.

2. Population de l'étude

Les participants aux différentes parties de cette thèse ont été recrutés dans le cadre du projet «Étude Immuno-génétique de la population marocaine 2015-2020 (IMMGEN) » et comprennent CS, EXPO et TB. Les informations relatives à chaque sujet de cette étude ont été collectées lors de son recrutement dans un questionnaire préparé spécialement pour la catégorie à laquelle il appartient. Le questionnaire a été rempli par les participants (avec une assistance externe pour les sujets analphabètes) afin de collecter des informations démographiques (sexe, âge, appartenance ethnique) et socio-économique (revenu personnel (RP), niveaux d'instruction, tabagisme, consommation d'alcool) (Voir annexe 1). Tous les sujets de l'étude ont été vaccinés au BCG. Ils ont tous fait l'objet de test sérologique pour l'infection par les virus VIH-1 et 2 (AxSYM Assays, Abbott Laboratories Chicago, IL, USA) et de test IDR après le prélèvement sanguin pour évaluer l'exposition à *Mtb*.

2.1. Contrôles sains

Les CS impliqués dans cette étude étaient des donneurs de sang recrutés dans les Centres Régionaux de Transfusion Sanguine de quatre préfectures du Maroc (Marrakech, Fès, Oujda, Tanger) pour couvrir tous les groupes ethniques de la population marocaine. Tous les participants de cette catégorie remplissaient les critères de recrutement suivants:

Critères d'inclusion:

- ✓ âge ≥ 18 ans ;
- ✓ volontaire cliniquement sain ;
- ✓ une IDR négative.

Critère d'exclusion:

- ✓ sujet en contact étroit avec un cas de TB active ;
- ✓ sujet atteint d'une maladie connue ;
- ✓ sujet ayant été sous corticothérapie dans le courant des 3 derniers mois ;

- ✓ sujet ayant effectué un test IDR dans le courant des 5 dernières années ;
- ✓ antécédent familial de TB.

2.2. Contrôles sains exposés

Les EXPO ont été recrutés au niveau des Centres régionaux du Diagnostic de la TB et des Maladies Respiratoires et des Centres Hospitaliers de Casablanca, Rabat, Marrakech, Fès, Oujda et Tanger. Ils ont été sélectionnés parmi les professionnels de santé travaillant en contact étroit avec les patients TB et parmi les sujets vivant en contacts familiaux des ces patients. Tous les participants de cette catégorie remplissaient les critères de recrutement suivants :

Critères d'inclusion :

- ✓ âge ≥ 18 ans ;
- ✓ sujet cliniquement sains en contact étroit avec, au moins, un cas de TB pulmonaire active ;
- ✓ une IDR positive.

Critères d'exclusion :

- ✓ sujet atteint d'une maladie connue ;
- ✓ sujet ayant été sous corticothérapie dans le courant des 3 derniers mois ;
- ✓ sujet ayant effectué un test IDR dans le courant des 5 dernières années.

2.3. Patients atteints de TB active

Les patients atteints d'une TB active se composait de ceux atteints de TB pulmonaire (TBP), de TB ganglionnaire (TBEG) et de TB pleurale (TBEP). Ces patients étaient recrutés au niveau des Centres régionaux de Diagnostic de la TB et des Maladies Respiratoires et des Centres Hospitaliers de Casablanca, Rabat, Marrakech, Fès, Oujda et Tanger. Tous les participants de cette catégorie remplissaient les critères de recrutement suivants :

Critères d'inclusion :

- ✓ âge ≥ 18 ans ;
- ✓ nouveau cas de TB pulmonaire, pleurale ou ganglionnaire.

Critère d'exclusion :

- ✓ patients atteints d'une maladie chronique autre que la TB ;
- ✓ sujet ayant été sous corticothérapie dans le courant des 3 derniers mois ;
- ✓ sujet ayant effectué un test IDR dans le courant des 5 dernières années ;
- ✓ patients étant déjà sous antibacillaires.

Les arguments cliniques de suspicion de la TB comprenaient une perte de poids, de la toux, de la fièvre, des sueurs et une anorexie. Les patients avaient une réponse positive au traitement par des médicaments antituberculeux. Les patients de chaque groupe ont été considérés selon les critères suivants:

- Patients TBP : Patients avec deux frottis d'expectoration positifs ou un frottis d'expectoration positif et une radiographie thoracique compatible avec la TB puis confirmée par une culture positive.
- Patients TBEP : Epanchement pleural avec une culture positive du liquide pleural et une histologie évocatrice d'une TB.
- Patients TBEG : Lymphadénopathies périphériques avec culture tissulaire positive et preuves histopathologiques consistant en la présence d'une lésion granulomateuse avec caséation dans les échantillons de biopsie. Une radiographie pulmonaire a été effectuée pour exclure la TBP et aucun patient n'a signalé un contact avec un cas TBP.

2.4.Considérations éthiques

L'approbation éthique a été obtenue par le comité d'éthique local de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de l'Université Mohammed V Souissi et un consentement écrit éclairé a été obtenu de tous les sujets avant leur participation à l'étude.

3. Matériels biologique

Pour tous les sujets de l'étude, un prélèvement de 10 ml de sang périphérique a été recueilli dans un tube contenant un anticoagulant EDTA (Vacutainer® BD) pour l'analyse phénotypique des sous populations lymphocytaires.

Pour les patients TBEG, le ganglion lymphatique affecté était au niveau du cou et a été isolé chirurgicalement. Une partie du ganglion lymphatique a été utilisée pour l'examen anatomo-pathologique à visée diagnostique, et l'autre pour l'isolement des LNMC pour les études immunologiques. De plus, 10 ml de sang périphérique a été recueilli dans un tube contenant un anticoagulant Héparine (Vacutainer® BD) pour l'isolement des PBMC.

Tous les échantillons ont été transportés au laboratoire de l'Institut National d'Hygiène dans les 24h après le prélèvement.

4. Investigations techniques

4.1. Analyse phénotypique des sous populations lymphocytaires dans le sang total

Les sous populations lymphocytaires ont été analysées en utilisant une procédure de lyse / sans lavage basée sur une technique à double plateforme.

Pour dénombrer les sous-ensembles de cellules T, de cellules B, de cellules NK, de cellules T naïves / mémoire, de cellules T activées et de cellules Treg, le sang total a été marqué avec les combinaisons suivantes: BD Multitest™ CD3 FITC / CD8 PE / CD45 PerCP / CD4 APC, BD Multitest™ CD3 FITC / CD16 + 56 PE / CD45 PerCP / CD19 APC, BD Multitest™ CD45 RA FITC / CD45 RO PE / CD3PerCP / CD4 APC, BD Multitest™ CD45 RA FITC / CD45 RO PE / CD3PerCP / CD8APC, BD Multitest™ CD4 FITC / CD38 PE / CD3PerCP / HLA DR APC, BD Multitest™ CD8 FITC / CD38 PE / CD3PerCP / HLA DR APC, CD3 FITC / CD25 PE / CD45 PerCP (tous de BD Biosciences® San Jose, CA) Chaque tube a été incubé pendant 15 min à température ambiante à l'obscurité. Pour fixer les leucocytes et lyser les globules rouges, ces cellules marquées ont été incubées pendant 10 min à l'obscurité dans 450 µl de la solution de lyse FACS (BD Biosciences). Les échantillons ont été acquis dans un cytomètre de

flux BD FACSCalibur à 2 lasers (BD Biosciences) et les données analysées à l'aide du logiciel FlowJo (version 6.1.1; Tree Star, Ashland, OR, USA). La population des lymphocytes a été discriminée sur la base de la granularité (SSC-H) et de l'expression de CD45. Les cellules T CD3⁺, T CD4 (CD3⁺, CD4⁺) et T CD8 (CD3⁺, CD8⁺), les cellules NK (CD3⁻, CD16⁺ CD56⁺), et NKT (CD3⁺ CD16⁺ CD56⁺) ou les cellules B (CD3⁻, CD19⁺) de même que les cellules Treg (CD4⁺ CD25^{High}), les marqueurs naïfs / mémoires et d'activation des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ ont été identifiés selon les combinaisons de leurs marqueurs de surface. Le fenêtrage détaillé est illustré dans la Figure 9. Le calibrage et le contrôle de qualité de l'instrument a été réalisée chaque semaine en passant les billes BD CALIBRITE sur le logiciel BD FACSComp .

Les numérations de leucocytes pour chaque échantillon se fait sur le même tube EDTA. Elles ont été effectuées à l'aide d'un compteur de cellules automatique Sysmex SF-3000 (Sysmex Corporation, Mundelein, IL, USA) pour calculer les valeurs absolues des sous populations lymphocytaires (Cellules/ μ l).

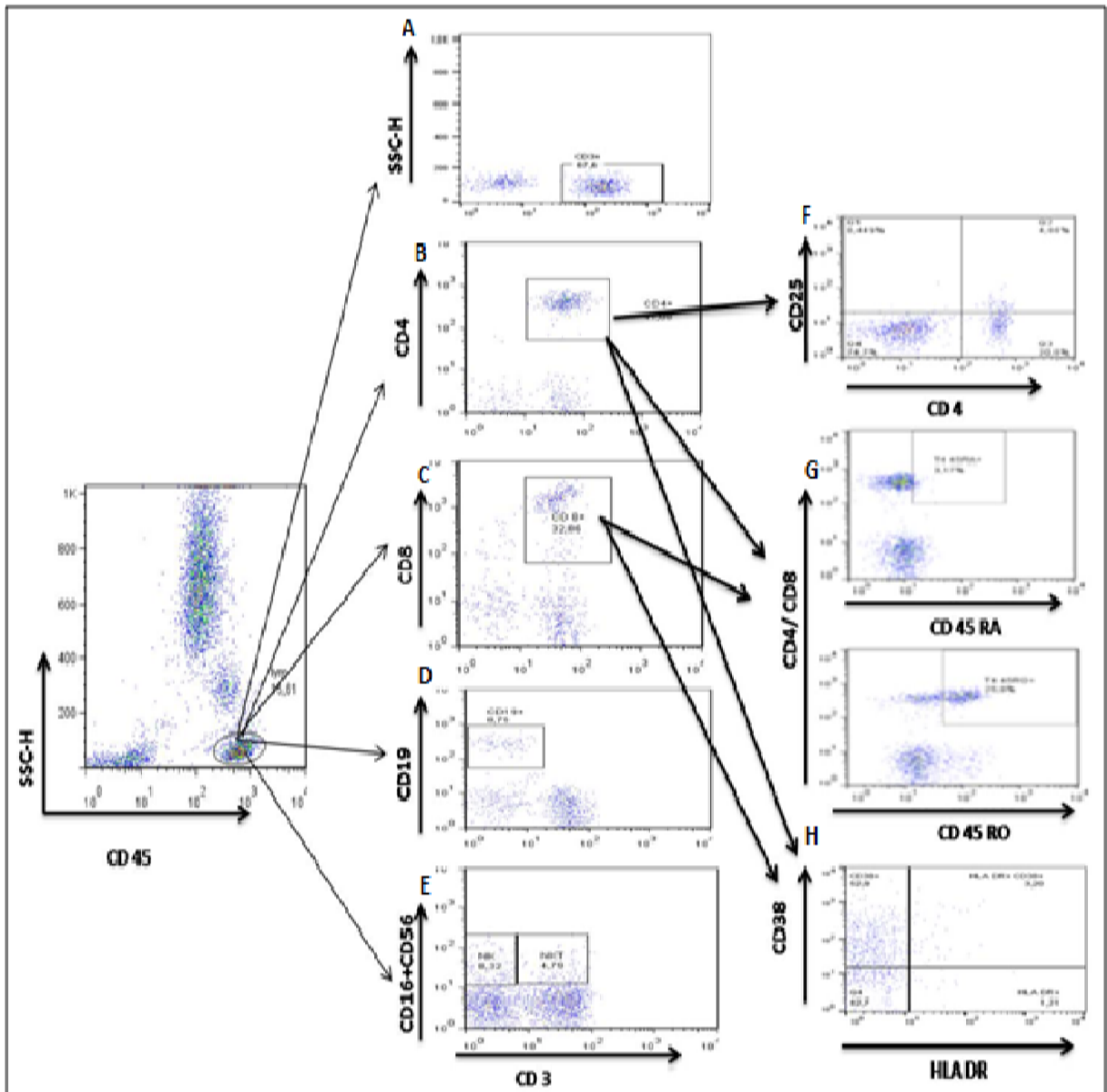


Figure 9: Représentation de la stratégie de fenêtrage par la cytométrie en flux des sous populations lymphocytaires dans le sang périphérique.

La population des lymphocytes a été discriminée sur la base de la granularité (SSC-H) et de l'expression de CD45. Les cellules T CD3(A), T CD4 (B) et T CD8(C), les cellules B (D) ou les cellules NK et NKT(E) de même que les cellules Treg (CD4 + CD25 High)(F), les marqueurs naïfs / mémoires (G) et d'activation (H) des cellules T CD4+ et CD8+ ont été identifiés selon les combinaisons de leurs marqueurs de surface.

4.2. Isolement des cellules mononucléées du sang périphérique et du ganglion lymphatique

Les échantillons de biopsie destinée à l'examen immunologique ont été écrasés doucement dans un milieu RPMI. Les LNMC récoltées ont été centrifugées et séparées en utilisant un gardien de densité (Ficoll-Hypaque ; SIGMA) (**Annexe 2**). Les cellules mononucléées du sang périphérique PBMC ont été isolées à partir du sang veineux hépariné dans des conditions sans endotoxine par un gardien de densité (Ficoll-Hypaque ; SIGMA) (**Annexe 2**). Les cellules ont été cryoconservées (**Annexe 3**) et stockées dans de l'azote liquide jusqu'à leur expédition par un cryoshipper à Case Western Reserve University. Les cellules ont été par la suite décongelées pour effectuer les études immunologiques (**Annexe 4**).

4.3. Étude phénotypique et fonctionnelle des cellules T

Les PBMC et LNMC (10^6 / tube) ont été stimulées avec un pool de 34 peptides chevauchants de l'antigène *Mtb* ESAT6 / CFP10 à 6,25 µg/ml par peptide (New England peptide, Gardner, MA), lysat des cellules entières du *Mtb* CDC1551 (RVL) (BEI Resources) ou l'entérotoxine B staphylococcique (SEB, 2 µg/ml, Sigma) pendant une nuit à 37 °C et 5 % de CO₂. Les PBMC et LNMC non stimulés ont servi de témoins négatifs. L'anti-CD28/CD49d (1ug /ml chacun, eBioscience et Biolegend) a été ajouté à chaque tube pendant la stimulation et la brefeldine A (5 ug / ml, Sigma) a été ajoutée 2 heures plus tard. Après stimulation, les cellules ont été lavées avec du PBS et marquées en surface avec de l'anti-CCR7-PE-Cy7 (BD Bioscience) pendant 15 min à 37 ° C, puis le marqueur de viabilité cellulaire (Invitrogen), l'anti-CD14-BV570, l'anti-CD4-APC / Cy7, l'anti-CD8-BV510 (tous Biolegend) et l'anti-CD45RA-PE / TR (Invitrogen) ont été ajoutés et incubés à température ambiante pendant 25 min. Ensuite, les cellules ont été lavées, perméabilisées (Kit Cytofix / Cytoperm, BD Pharmingen) selon les instructions du fabricant et marquées pour l'expression intracellulaire avec l'anti-CD3-PerCP l'anti-IFN γ -Alexa700, l'anti-IL2-APC, l'anti-TNF α -Pacific Blue, l'anti-IL17-BV711 (tous Biolegend) et l'anti-MIP-1 α -FITC (R&D). Les cellules ont ensuite été lavées, fixées dans 1% de paraformaldéhyde et 1×10^6 événements totaux ont été collectés à partir de chaque échantillon sur un cytomètre en flux LSR-II (BD) (**Annexe 5**). La réponse nette des cellules pour chaque cytokine ont été calculées en soustrayant la réponse dans la condition sans antigène (milieu uniquement) de la réponse à la

simulation par l'antigène. L'analyse de tous les marqueurs fonctionnels exprimés après stimulation a été effectuée sur les cellules T CD4⁺ mémoire totale viables. Le phénotype mémoire a été déterminé par l'expression CCR7 et CD45RA. Les cellules T naïves étaient CD45RA⁺ / CCR7⁺, les cellules de mémoire centrale (CM) étaient CD45RA⁻ / CCR7⁺, les cellules de mémoire effectrice (EM) étaient CD45RA⁻ / CCR7⁻ et les cellules effectrices (E) étaient CD45RA⁺ / CCR7⁻.

Les diagrammes à point (dotplots) ont été analysés à l'aide du logiciel FlowJo (version 6.1.1; Tree Star, Ashland, OR, USA). (Figure 10) Une analyse booléenne sur Flow Jo et SPICE (NIAID, NIH, USA) a été utilisée pour évaluer la polyfonctionnalité des différentes sous-populations lymphocytaires T.

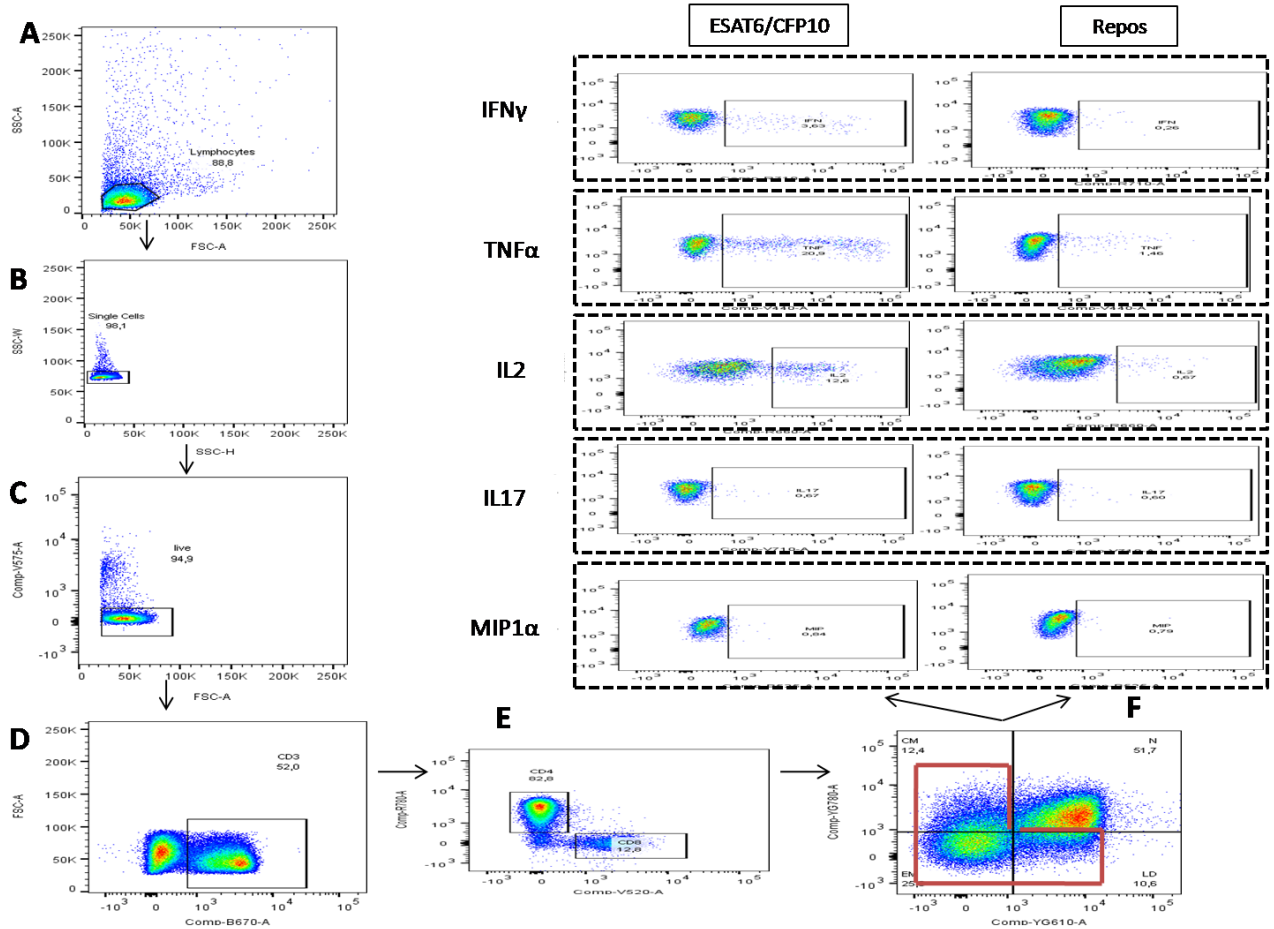


Figure 10: Représentation de la stratégie de fenêtrage par de cytométrie en flux des lymphocytes T mémoires produisant l'IFN γ , TNF α , IL 2, IL17 et MIP1- α au repos et après stimulation par ESAT6/CFP10.

Les lymphocytes sont d'abord identifiés selon la taille et la granulosité (A) puis les lymphocytes individualise (B) et vivante (C) sont analysées. Les lymphocytes T CD3+ (D) sont divisés en T CD4+ et T CD8+ (E). Les lymphocytes T CD4+ mémoires totaux (F) sont évalués pour l'expression de l'IFN γ , TNF α , IL 2, IL17 et MIP1- α au repos et après stimulation par ESAT6/CFP10.

4.4. Distribution des lymphocytes T activés et des Treg dans les LNM et PBMC

Pour identifier les Treg et les cellules T activées, les PBMC et LNM ont été marquées en surface et incubées à température ambiante pendant 25 min avec le marqueur de viabilité cellulaire (Invitrogen), l'anti-CD3-APC / Cy7, l'anti-CD4-PerCP, l'anti-CD8 -Alexa700, l'anti-CD25-APC, l'anti- HLA-DR-FITC, l' anti-CD38-PE / Cy7 (tous Biolegend) et l'anti-CD127-BV6 50 (BD Bioscience), . Après, les cellules ont été lavées, perméabilisées et marquées en intracellulaires avec l'anti-FoxP3-PE (eBioscience). Un tube avec des isotopes appariés comme

contrôle négatif pour estimer les bruits de fond engendré par le marquage non spécifique (**Annexe 6**). 1×10^6 événements totaux ont été collectés à partir de chaque échantillon sur le cytomètre en flux LSR-II (BD). Les diagrammes à point (dotplots) ont été analysées à l'aide du logiciel FlowJo (version 6.1.1; Tree Star, Ashland, OR, USA). (Figure 11)

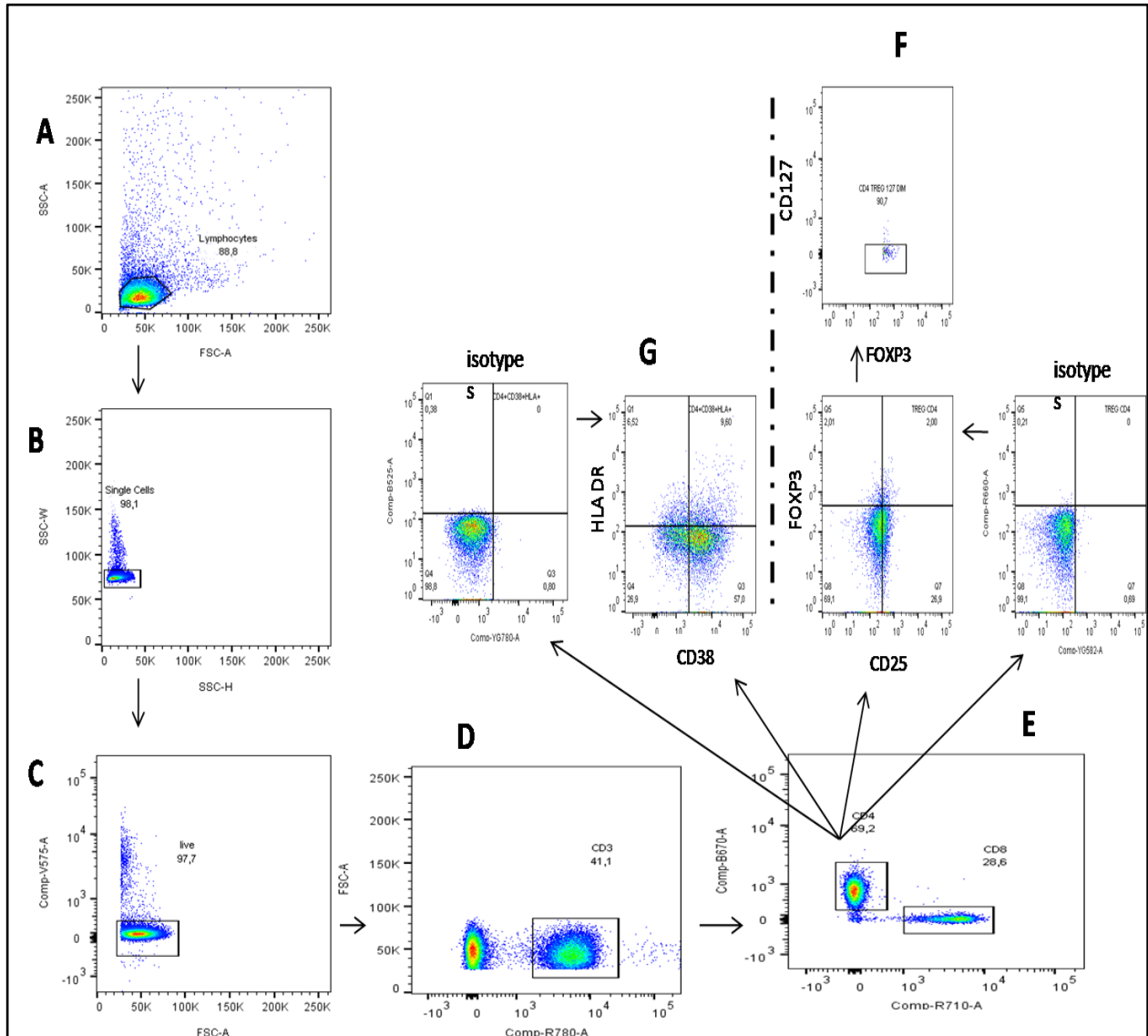


Figure 11: Représentation de la stratégie de fenêtrage par de cytométrie en flux des lymphocytes T CD4+ activées et CD4+ régulatrices.

Les lymphocytes sont d'abord identifiés selon la taille et la granulosité (A) puis les lymphocytes individualise (B) et vivante (C) sont analysées. Les lymphocytes T CD3+ (D) sont divisés en T CD4+ et T CD8+ (E). Les lymphocytes T CD4+ régulatrices CD25+ FOXP3+ CD127- (F) et les lymphocytes T CD4+ activités CD38+ HLA DR+ (G) sont déterminés. Les tubes isotypes sont utilisés comme contrôle négatif pour estimer les bruits de fond engendré par le marquage non spécifique.

5. Analyses statistiques

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide de Graph Pad Prism version 5.00 pour Windows (GraphPad Software, La Jolla, Californie) et du logiciel statistique pour les sciences sociales (SPSS) (IBM). Les médianes, les moyennes, l'écart type, les intervalles de référence et les intervalles de confiance à 95% ont été calculés pour chaque paramètre. Un test t de Student a été utilisé pour évaluer les différences lors des analyses appariées. Le test non paramétrique de Kruskal – Wallis a été utilisé pour déterminer les différences entre plusieurs groupes. La corrélation de rang de Spearman a été utilisée pour évaluer les associations entre les paramètres. La valeur p pour la comparaison du profil polyfonctionnel a été réalisée à l'aide du logiciel SPICE. Toutes les valeurs $p < 0,05$ ont été considérées comme statistiquement significatives.

RÉSULTATS

I. Valeurs de références des sous populations lymphocytaires chez la population marocaine: l'influence de l'âge, le sexe, l'origine ethnique et les facteurs socio-économiques

Les résultats de cette partie ont fait l'objet d'une publication dans le Journal of Immunoassay and Immunochemistry

I.1. Les caractéristiques générales de la population

Un total de 145 volontaires sains a été inclus dans cette étude. Parmi eux, 64 étaient des hommes (44,13 %) et 78 étaient des femmes (53,79 %). Leur âge variait de 18 à 63 ans avec des tranches d'âge similaires pour les hommes et les femmes (de 19 à 63 ans pour les hommes et de 18 à 55 ans pour les femmes). La composition ethnique de notre cohorte était de 68 % d'arabes, 19 % d'amazighs, 9 % de rifis et 4 % de sahraouis. Environ 90 % de nos bénévoles ont déclaré ne pas fumer ni boire d'alcool. Concernant leur niveau d'enseignement, 19 % étaient analphabètes, 44 % avaient reçu un niveau coranique / primaire / secondaire et 37 % avaient atteint le niveau universitaire. Dans l'ensemble, 52 % des volontaires avaient un RP faible et 48 % un RP moyen / élevé, respectivement inférieur et supérieur au salaire minimum SMIG.

I.2. Valeurs de références des sous population lymphocytaires chez la population Marocaine

La valeur absolue des lymphocytes variait de 1678 à 1978 cellules / μ l et le pourcentage de cellules T totales (CD3 +) représentait 68,6 % à 71,9 % d'entre eux, soit 1147 à 1363 cellules / μ l. Les cellules T CD4 + variaient de 644 à 791 cellules / μ l et les cellules T CD8 + de 414 à 510 cellules / μ l, les cellules B (CD19 +) de 180 à 225 cellules / μ l, les cellules NK (CD3-CD16 + CD56 +) de 186 à 250 cellules / μ l et NKT cellules (CD3 + CD16 + CD56 +) de 72 à 136 cellules / μ l. Parmi les cellules T CD4 +, 15,9 % à 20,2 % avaient le phénotype naïf CD45RA + (CD4 + CD45RA +) et 58,4 % à 63,8 % le phénotype mémoire (CD4 + CD45RO +). Comparativement, 27,3 % à 33,6 % des cellules T CD8 + avaient le phénotype naïf CD45RA + et 30,5 % à 36,1 % le phénotype mémoire (CD8 + CD45RO +). Concernant le statut d'activation, l'activation a été mesurée sur l'expression de CD38 (34,2 % à 38,5 %); HLA DR (4,8 %–9,1 %) ou les deux (4 % à

8,3 %) pour les lymphocytes T CD4 + et CD38 (24,5 % à 28,8 %); HLA DR (6,6 %–10,9 %) ou les deux (5,2 % à 9,5 %) pour les cellules T CD8 +. Les cellules Treg (CD4 + CD25 High) représentaient 11,4 % à 14 % des cellules T CD4 +. Les résultats sont présentés dans le Tableau 1.

Tableau 1: Valeurs de référence des sous populations lymphocytaires du sang périphérique

PARAMETERS		Moyenne	Médiane	Ecart type	plages de Référence	Intervalles de confiance à
Lymphocytes	Cellules/ μ l	1828	1700	929	504,3-4262,5	1678-1978
Cellules B	/Lymphocytes%	12,6	11,6	5,61	4,38-29	11,7-13,5
	Cellules / μ l	202	173	140	34,8-506,3	180-225
Cellules NK	/Lymphocytes%	11,5	10,7	6,9	1,5-28,5	10,4-12,6
	Cellules / μ l	218	173	200	17,5-833,4	186-250
Cellules NKT	/Lymphocytes%	5,1	3,9	6,6	0,2-14,9	4,8-6,2
	Cellules / μ l	104	55,8	200	1,9-391	72,2-136,8
Cellules T CD3+	/Lymphocytes	70,2	72,1	10,1	46,2-85,7	68,6-71,9
	Cellules / μ l	1255	1093	670	305,4-2633,8	1147-1363
Cellules T CD3+ CD4+	/Lymphocytes%	39,4	39,1	9,1	22,18-58	38,0-40,9
	Cellules / μ l	718	633	453	103,5-1545,1	644-791
Cellules T CD3+ CD8+	/Lymphocytes%	25,7	25,3	7,3	12,3-40,5	24,6-26,9
	Cellules / μ l	462	394	298	81-1019,9	414-510
CD4+CD45RO+	/ CD4+ %	61,1	62,2	16,5	31,5-92	58,4-63,8
	Cellules / μ l	465	450	207	143,9-939,2	431,8-498,7
	/ CD8+%	33,3	33,9	17,3	5,5-70,3	30,5- 36,1
CD8+CD45RO+	Cellules / μ l	157	148	97,6	32,9-359,5	141,8-173,3
CD4+CD45RA+	/ CD4+ %	18,1	16,9	13,2	0-43,6	15,9-20,2
	Cellules / μ l	156	102	152,1	7,9-532,8	131,4-180,4
CD8+CD45RA+	/ CD8+%	30,5	27,5	19,6	1-71,9	27,3-33,6
	Cellules / μ l	166	125	156	14-580,4	141,2-191,3
CD4+ HLA DR+	/ CD4+ %	7	2	10,4	0-36,6	4,8-9,1
	Cellules / μ l	97	26	156	5-570	72,1-122,5
CD8 HLA DR+	/ CD8+%	8,8	3,3	11,5	0-40,5	6,6-10,9
	Cellules / μ l	89	36	136	8,6-581,6	67,4-111,5
CD4+CD38+	/ CD4+ %	36,3	37,6	12,5	11,5-61,9	34,2-38,5
	Cellules / μ l	347	298	223	59-957,2	311,6-383,7
CD8+CD38+	/ CD8+%	26,6	24,7	11,6	8,3-51,3	24,5-28,8
	Cellules / μ l	253	213	190	34,2-781,5	223,0-284,3
CD4+ HLA DR+ CD38+	/ CD4+ %	6,2	2	9,5	0-26,7	4-8,3
	Cellules / μ l	126	37	181	0-639,9	97,6-155,9
CD8+ HLA DR+ CD38+	/ CD8+%	7,7	3,9	9	0,4-35,6	5,2-9,5
	Cellules / μ l	166	69	195	9,7-713,5	135,4-198,2
CD4+ CD25 High	/ CD4+ %	12,7	13,1	8,0	0,3-27,7	11,4-14,0
	Cellules / μ l	107,2	95,3	81,1	2,9-293,2	87,5-126,9

* Les différentes sous populations lymphocytaires (pourcentages%) ont été fenêtrées à l'aide de CD45 et le SSC pour distinguer cette population des monocytes, des granulocytes et des débris cellulaires. Les valeurs absolues (Abs) pour chaque sous populations ont été calculés en multipliant le pourcentage de cette sous populations par la valeur absolue de la population mère spécifique / 100.

I.3. Impact de l'âge sur les valeurs de référence

Pour étudier l'influence de l'âge des participants sur les sous populations lymphocytaires, nous avons divisé les sujets de l'étude en classes d'âge (10 ans chacune). Les valeurs de référence liées à chaque classe d'âge (pourcentages et valeurs absolues) sont indiquées dans le Tableau 2.

Les valeurs absolues et les pourcentages des lymphocytes T totaux et des sous-ensembles CD4 + CD8 + n'étaient pas significativement différents entre les classes d'âge de 18 à 60 ans. En revanche, la distribution des lymphocytes T naïfs et mémoire évoluait avec l'âge. Une tendance à la diminution des valeurs absolues des CD4 + naïfs ($r = -0,3309$, $p = 0,0026$, Figure 12a) et des cellules T CD8 + ($r = -0,3660$, $p = 0,0017$, Figure 12b) ont été observée avec l'augmentation de l'âge. À l'inverse, nous avons détecté une tendance à la hausse avec le vieillissement en pourcentages des cellules T mémoire CD4 + ($r = 0,2763$, $p = 0,0059$, Figure 12c) et CD8+ ($r = 0,4795$, $p < 0,0001$, Figure 12d). De même, la tendance inverse pour CD4 + CD38+ ($r = -0,4290$, $p = 0,0002$, Figure 12e) et CD8 + CD38 + ($r = -0,2425$, $p = 0,0448$, Figure 12f) a également été montrée dans notre étude. Les nombres absolus de cellules Treg changent avec l'âge et une analyse de corrélation plus poussée a trouvé une corrélation négative par rapport aux valeurs absolues ($r = -0,4952$, $p = 0,0001$, Figure 12g) et pourcentages ($r = -0,2552$, $p = 0,044$, Figure 12h). Les cellules B n'étaient pas affectées de manière significative par l'âge, ni en proportions ni en valeurs absolues (Tableau 2). Les valeurs absolues de cellules NK ont changé de manière significative et ont montré une tendance à la baisse liée à l'âge ($r = -0,1940$, $p = 0,0463$, Figure 12i). En revanche, les valeurs absolues des NKT corrélé positivement avec l'âge ($r = 0,3531$, $p = 0,0004$, Figure 12j).

Tableau 2: Différences liées à l'âge des sous-populations lymphocytaires du sang périphérique.

PARAMETERES (Moyenne±SD)		18-20 ans	21-30 ans	31-40 ans	41-50 ans	51-63 ans	p Value
		N=8	N=39	N=40	N=41	N=17	
Lymphocytes	Cellules/μl	1308,4±113 5,8	2265,0±110 4,6	2058,2±181 1,8	1951,3±168 1,8	1642,7±108 4,4	0,0753
Cellules B	/lymphocyte s%	10,3±2,9	12,4±4,8	13,2±6,9	12,8±5,1	12,5±6,3	0,8092
	Cellules /μl	119,2±87,3	271,1±190,6	235,9±235,9	225,1±239,6	173,8±115,3	0,0745
Cellules NK	/lymphocyte s%	13,1±4,9	13,7±7,9	10,2±4,9	10,8±5,0	8,9±6,8	0,1109
	Cellules /μl	166,3±175,5	364,9±294,1	180,7±90	167,5±119,2	123,8±94,2	0,0056
Cellules NKT	/lymphocyte s%	2,2±1,3	3,2±2,1	6,4±11,1	6,4±4,2	5,2±3	0,007
	Cellules /μl	30,4±30,8	86,5±80,1	145,7±363	118±109,7	75,5±79,8	0,0371
Cellules T CD3	/lymphocyte s%	70,2±3,1	68,6±7,7	70,6±11,6	72,2±9,2	68,1±14,3	0,1635
	Cellules /μl	944,2±848,6	1539,7±746, 0	1504,4±144 2,8	1415,9±117 2,7	1018,0±537, 2	0,0635
Cellules T CD3+ CD4+	/lymphocyte s%	34,9±6,3	38,6±7,6	38,6±10,3	40,5±9,1	42,6±9,5	0,2475
	Cellules /μl	411,7±308,0	870,5±403,5	820,6±725,6	791,7±710,9	757,7±715,0	0,0543
Cellules T CD3+ CD8+	/lymphocyte s%	25,6±9,9	24,5±5,9	26,1±7,5	27,2±7,2	24,0±8,3	0,5879
	Cellules /μl	424,6±509,7	571,6±364,1	558,2±612,1	507,8±361,9	357,6±225,7	0,1178
CD4+CD45 RO+	/ CD4+ %	50,6±11,5	52,7±17,7	63±9,3	65±15,2	68±17,6	0,0196
	Cellules /μl	280,6±274,0	507,0±157,7	487,5±228,8	477,3±233,0	369,1±143,4	0,2864
CD8+CD45 RO+	/ CD8+ %	20,6±16,7	21,9±14	34,3±14,8	39,6±15,1	47,7±18,5	P<0,00 01
	Cellules /μl	176,5±1744	163,7±85,3	147,3±77,0	151,6±85,1	174,2±166,5	0,9672
CD4+CD45 RA+	/ CD4+%	17,8±10,8	19,7±16	19,7±9,4	15,8±14,5	17,8±11,8	0,379
	Cellules /μl	158,7±184,3	231,1±164,5	158,6±133,6	114,0±1473	94,9±80,30	0,0520
CD8+CD45RA+	/ CD8+ %	33,9±20,1	29,6±24,8	38,2±14,3	27,7±14,5	26,6±18,3	0,1892
	Cellules /μl	246,3±267,3	256,3±220,0	179,4±97,4	111,9±116,9	92,6±52,0	0,0154
CD4+ HLA DR+	/ CD4+%	10,7±18	8,1±10,6	5,3±9,2	8,3±12,5	6,4±7,6	0,2407
	Cellules /μl	9,3±7,1	90,9±146,3	79,2±151,7	134,7±182,9	76,9±132,0	0,3096
CD8+ HLA DR+	/ CD8+ %	12,5±16,1	8,6±11,3	7,7±11,1	10,4±12,4	9,3±13,2	0,1256
	Cellules /μl	18,6±12,8	77,0±111,3	62,4±77,7	118,7±177,2	96,3±153,5	0,5484
CD4+CD38+	/ CD4+%	29,2±11,0	38,3±11,9	35,6±11,4	34,5±13,1	35,7±14,7	0,6543
	Cellules /μl	247,2±304,5	452,1±215,6	353,9±234,9	321,8±196,5	248,9±253,7	0,0518
CD8+CD38+	/ CD8+ %	21,7±12,4	29,4±10,3	27,8±12,7	23,2±8,9	25,4±13,8	0,1208
	Cellules /μl	339,7±396,1	361,7±205,2	206,8±194,6	242,2±153,6	175,7±165,6	0,0454
CD4+ HLADR+CD38+	/ CD4+%	5,7±3,4	7,5±9,7	4,1±5,7	8,1±12,9	4±4,2	0,9681
	Cellules /μl	20,7±2,8	96,2±168	98,8±127,6	185,3±224,5	94,6±158,2	0,3192
CD8+HLADR+CD 38+	/ CD8+%	5,2±1,1	8,1±9,5	6,5±7,9	8,4±10,8	5,8±6,4	0,9371
	Cellules /μl	39,9±41,3	143,5±166,1	143,3±176,1	228,1±231,4	109,0±162	0,1865
CD4+ CD25 High	/ CD4+%	13,2±6,4	15,4±7,9	14,1±7,9	9,4±8,1	6,6±6,6	0,1657
	Cellules /μl	93,4±70,1	159,5±77,1	102,6±80,7	62,3±62,0	65,5±73,1	0,0045

* Les différentes sous populations lymphocytaires (pourcentages%) ont été fenêtrées à l'aide de CD45 et le SSC pour distinguer cette population des monocytes, des granulocytes et des débris cellulaires. Les valeurs absolues (Abs) pour chaque sous populations ont été calculés en multipliant le pourcentage de cette sous populations par la valeur absolue de la population mère spécifique / 100.

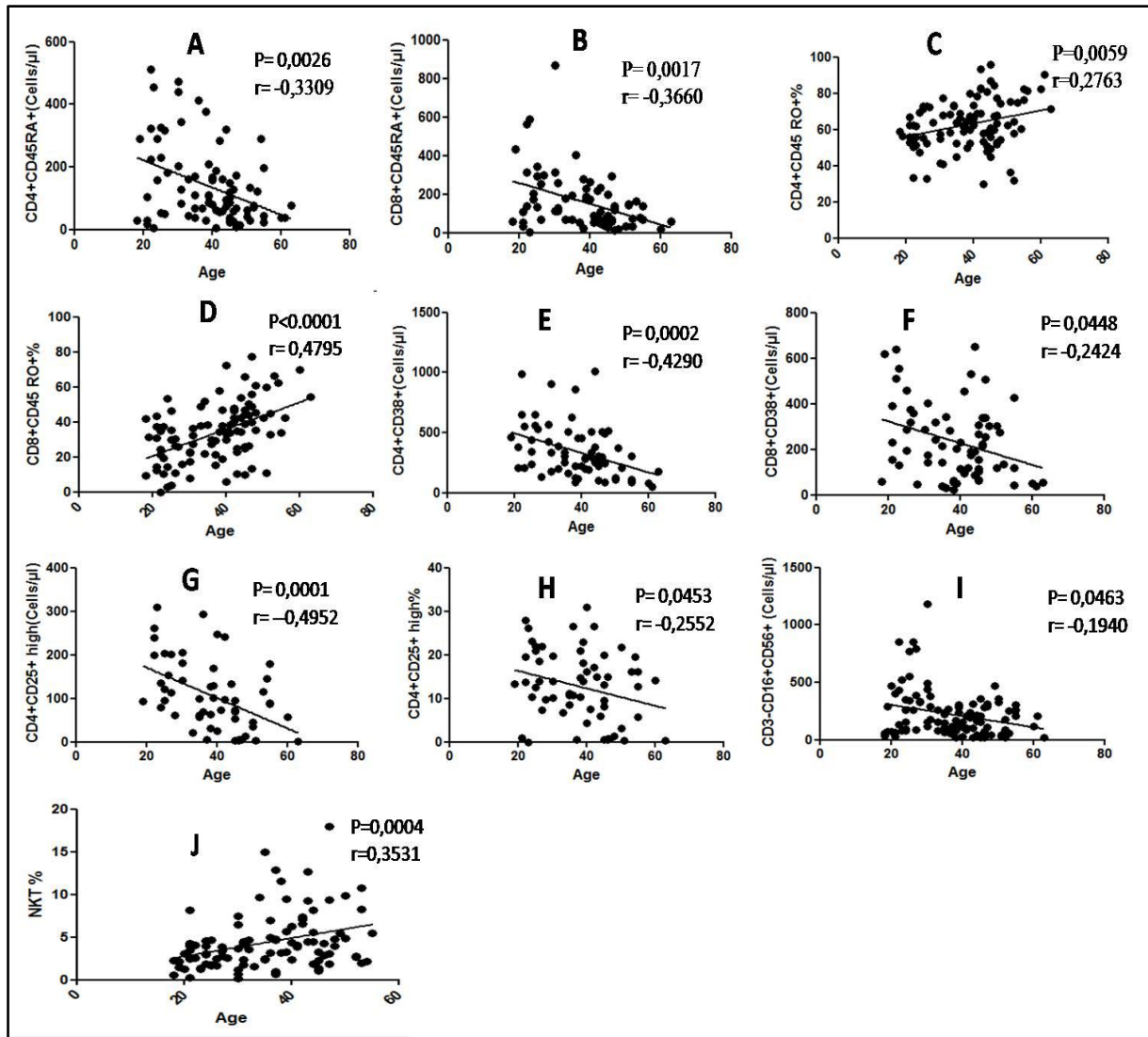


Figure 12: Changements liés à l'âge des sous populations lymphocytaires

(a) valeurs absolues des lymphocytes CD4 + CD45RA +, (b) valeurs absolues des lymphocytes CD8 + CD45RA +, (c) des pourcentages des lymphocytes CD4 + CD45RO +, (d) pourcentage des lymphocytes CD8 + CD45RO +, (e) valeurs absolues des lymphocytes CD4 + CD38 +, (f) valeurs absolues des lymphocytes CD8 + CD38 +, (g) pourcentage des lymphocytes CD4 + CD25High, (h) valeurs absolues des lymphocytes de CD4 + CD25high, (i) valeurs absolues de cellules NK et (j) pourcentage de cellules NKT. Les corrélations entre deux variables ont été effectuées en utilisant la corrélation de Spearman et la régression linéaire a été utilisée pour tracer le graphique.

I.4. Impact du sexe sur les valeurs de référence

Les valeurs de référence spécifiques au sexe des sous populations lymphocytaires (pourcentages et valeurs absolues) sont données dans le Tableau 3. Ces résultats révèlent des différences significatives liées au sexe dans la distribution des lymphocytes des sujets Marocains sains: le pourcentage de cellules T CD3 + et de cellules T CD4+ était plus élevé chez les femmes que chez les hommes ($p = 0,0202$ et $p = 0,0104$, respectivement). En revanche, les valeurs absolues des cellules T CD8 +, des cellules B et NK ont été significativement plus élevées chez les hommes que chez les femmes ($p = 0,047$, $p = 0,0161$ et $p = 0,0221$, respectivement). Les sous-ensembles de cellules T activées et Treg n'ont montré aucune différence liée au sexe. De même, la distribution des cellules T naïves et mémoires n'a montré aucune différence liée au sexe, la seule exception étant une proportion plus élevée des valeurs absolues des cellules CD8+ CD45RA+ chez les hommes par rapport aux femmes ($p = 0,0092$).

Tableau 3: Différences liées au sexe des sous-populations lymphocytaires du sang périphérique.

PARAMÈTERES (Moyenne±SD)		Homme N=67	Femme N=78	p Value
Lymphocytes	Cellules/μl	2014,1±933,2	1962,8±1816,5	0,1108
Cellules B	/lymphocytes %	13,6±6,0	11,9±5,1	0,2026
	Cellules /μl	249,6±165,9	210,3±235,7	0,0161
Cellules NK	/lymphocytes %	12,6±7,6	10,5±6,2	0,1066
	Cellules /μl	288,2±251,8	191,0±170,3	0,0221
Cellules NKT	/lymphocytes %	3,9±2,5	6,2±8,5	0,0522
	Cellules /μl	76,4±66	147,7±266,1	0,5062
Cellules T CD3+	/lymphocytes %	68,9±8,4	71,4±11,34	0,0202
	Cellules /μl	1383,0±628,6	1401,2±1339,0	0,1787
Cellules T CD3+ CD4+	/lymphocytes %	37,7±7,9	41,0±9,8	0,0104
	Cellules /μl	745,9±311,7	832,7±809,2	0,307
Cellules T CD3+ CD8+	/lymphocytes %	26,50±8,2	25,0±6,2	0,5847
	Cellules /μl	538,9±325,1	491,2±519,3	0,047
CD4+CD45RO+	/ CD3+ %	60,3±15,8	61,8±17,2	0,4228
	Cellules /μl	459,1±138,9	470,1±249,9	0,8719
CD8+CD45RO+	/ CD3+ %	30,5±15,8	36±17,4	0,1458
	Cellules /μl	169,7±92,6	148,6±101,3	0,3309
CD4+CD45RA+	/ CD3+ %	20,3±16	15,9±9,4	0,2523
	Cellules /μl	196,6±188,0	123,8±108,1	0,1894
CD8+CD45RA+	/ CD3+ %	33,6±35,4	27,5±16,6	0,1951
	Cellules /μl	235,9±202,1	114,8±79,4	0,0092
CD4+ HLA+	/ CD3+ %	8,7±12,3	5,4±8,1	0,5888
	Cellules /μl	104,6±182,6	90,8±131,5	0,5489
CD8+ HLA+	/ CD3+ %	10,2±12,7	7,5±10,3	0,9588
	Cellules /μl	92,4±164,2	86,8±109,9	0,1261
CD4+ CD38+	/ CD3+ %	34,8±13,3	37,7±11,6	0,2995
	Cellules /μl	367,3±199,4	330,6±244,2	0,1696
CD8+ CD38+	/ CD3+ %	25,6±12,1	27,6±11	0,2674
	Cellules /μl	272,0±202,2	237,6±180,2	0,5271
CD4+ HLA DR+CD38+	/ CD3+ %	7,9±11,9	4,5±6,312,4	0,4453
	Cellules /μl	145,4±217,1	110,1±142,4	0,995
CD8+ HLADR+CD38+	/ CD3+ %	8,2±9,5	6,6±8,6	0,9937
	Cellules /μl	185,8±232,9	149,6±155,2	0,4358
CD4+ CD25 High	/ CD4+ %	13,2±8,5	12,3±7,7	0,6124
	Cellules /μl	112,8±92,3	101,5±69,2	0,9124

* Les différentes sous populations lymphocytaires (pourcentages%) ont été fenêtrées à l'aide de CD45 et le SSC pour distinguer cette population des monocytes, des granulocytes et des débris cellulaires. Les valeurs absolues (Abs) pour chaque sous populations ont été calculés en multipliant le pourcentage de cette sous populations par la valeur absolue de la population mère spécifique / 100.

II. Les caractéristiques immunphénotypiques des lymphocytes du sang périphérique, dans les différentes formes de la TB active chez la population des adultes marocains

II.1. Caractéristiques démographiques et bactériologiques de la population de l'étude.

Les caractéristiques démographiques et bactériologiques des patients TB, EXPO et CS sont présentées dans le Tableau 4.

Un total de 183 patients TB a été inclus dans cette étude. Le groupe de patients TB a été divisé en trois sous-groupes: TBP (72,43 %), TBEP (17,84 %) et TBEG (9,73 %). Cent et un (101) CS ayant un test IDR- (<10 mm) et 43 EXPO ayant un test IDR+ (≥ 10 mm) appariés selon l'âge et le sexe ont été sélectionnés. Les patients TB d'un âge moyen de 31,6 ans étaient principalement des hommes (71,58 %). L'âge moyen de la population CS et EXPO était de 32,87 ans et 34,5 ans respectivement. Les hommes représentés 70,30 % et 69,77 % parmi les CS et EXPO respectivement. En termes d'âge et de sexe, il n'y avait pas de différence significative entre les groupes. Les patients tuberculeux ont été divisés en fonction de la charge bacillaire estimée par le test de bacilloscopie sur frottis d'expectoration: 1+ (10 à 99 bacilles acido-alcolo-résistants (BAAR) pour 100 champs); 2+ (1 à 10 (BAAR) par champ dans 50 champs), ou 3+ ($< >10$ (BAAR) par champ dans 20 champs). La majorité des patients TBP ($n = 121$) présentaient une charge bacillaire positive dont 29,93 % classés dans le groupe 1+, 47,93 % classés dans le groupe 2+ et 23,14 % classés dans le groupe 3+. Chez les patients TBEP et TBEG le frottis d'expectoration est revenu négatif pour tous les patients. La culture et l'examen anatomopathologique ont confirmé le diagnostic TB dans ces groupes pour 80 % et 100 % des cas respectivement. La majorité des sujets d'études étaient vaccinés par le BCG (98 %). Le test d'IDR était positif chez 71,64 % des patients TBP, 63,27 % des patients TBEP et 83 % des TBEG. Les résultats des tests d'IDR des patients TB allaient de 0 mm à 30 mm avec une moyenne de $(12,27 \pm 6,01)$ mm. Cette réponse moyenne était plus faible chez les patients TBEP par rapport aux patients TBP et TBEG, mais aucune différence n'a été observée entre les trois sous-groupes TB.

Tableau 4: Caractéristiques des sujets d'études

	Contrôle sains (n=101)	Sains exposés (n=43)	Patients tuberculeux			
			Total TB (n=185)	TBP (n=134)	TBEP (n=33)	TBEG (n=18)
Age moyen (min- max)	32,87 (18-55)	34,5 (20- 63)	31,57 (17-65)	31,64 (20-65)	31,39 (18-52)	29,78 (17-60)
Sexe (H/F)	71/30	30/13	131/50	103/31	23/10	5/13
IDR (mm) (moy±sd)	3,01 ± 2,38	15,3 3± 4,43	12,27 ± 6,01	12,67 ± 5,9	11,27 ± 6,01	13,07 ± 3,01
Charge bacillaire						
1+	NA	NA	35 (19,13%)	35 (29,93%)	0	0
2+	NA	NA	58 (31,69%)	58 (47,93%)	0	0
3+	NA	NA	28 (15,30%)	28 (23,14%)	0	0

*TB : patients tuberculeux ; TBP : TB pulmonaire ; TBEP : TB pleural ; TBEG : TB ganglionnaire; IDR: intradermo-réaction; moy: moyenne; sd: écart type. Les patients tuberculeux ont été divisés en fonction de la charge bacillaire: 1+ (10 à 99 bacilles acido-alcolo-résistants (BAAR) pour 100 champs); 2+ (1 à 10 (BAAR) par champ dans 50 champs), ou 3+ (> 10 (BAAR) par champ dans 20 champs.NA:non appliquée

II.2. Altération de l'homéostasie des lymphocytes dans le sang périphérique chez les patients atteints de TB active

Le profil des lymphocytes circulants dans le sang périphérique des patients atteints de différentes formes de TB a été évalué. La Figure 13 montre les résultats phénotypiques ex vivo sous forme de pourcentages (Figure 13a), ainsi que les valeurs absolues (Figure 13b) des lymphocytes T CD3+, T CD4+, T CD8+, B, NK et NKT du sang périphérique des groupes CS, EXPO et TB. En

ce qui concerne le pourcentage des lymphocytes T CD3+ ($P=0,4503$), T CD4+ ($P=0,3078$), T CD8+ ($P=0,9877$), aucune différence n'a été observée entre les 3 groupes. D'autre part, on a noté une diminution significative des valeurs absolues des lymphocytes T CD3+ ($P=0,0093$), des lymphocytes T CD4 + ($P= 0,0062$) ainsi que des lymphocytes T CD8+ ($P= 0,0494$) chez les patients TB par rapport aux CS. Cette diminution a été aussi trouvée chez les patients EXPO par rapport aux CS pour les valeurs absolues des lymphocytes T CD4+ ($P= 0,0499$) et CD8+ ($P= 0,0387$). L'analyse des données a démontré qu'il y avait une diminution significative des pourcentages et des valeurs absolues des lymphocytes B CD19 + chez les patients TB et EXPO par rapport au CO. Bien qu'aucune différence n'ait été observée dans les valeurs absolues des lymphocytes NK entre les 3 groupes ($P= 0,2981$), les patients tuberculeux présentaient une augmentation des pourcentages par rapport aux EXPO ($P= 0,0351$). Aucune différence n'a été observée entre les 3 groupes pour les pourcentages ($P= 0,1672$) et les valeurs absolues ($P= 0,2126$) des lymphocytes NKT.

Pour illustrer les altérations des sous populations lymphocytaires spécifique aux différents formes de TB, on a comparé ces sous populations entre les sous-groupes des patient TB (Figure 14). Aucune différence significative n'a été observée entre les 3 sous-groupes pour les pourcentages et les valeurs absolues des lymphocytes T CD3+, des lymphocytes T CD4+ et CD8+ et des lymphocytes NKT (Figure 14a et Figure 14b). Les pourcentages de lymphocytes B chez les patients TBEG étaient moins élevés que chez les patients TBP ($P=0,0051$). De plus, les pourcentages des lymphocytes NK étaient plus élevés chez les patients TBP ($P= 0,0299$) et TBEP ($P= 0,0495$) que chez les patients TBEG (Figure 14a).

La charge bacillaire dans le frottis d'expectoration des patients TBP a été utilisée pour classer les patients TB en patients ayant une charge bacillaire faible (1+), moyenne (2+) ou élevée (3+). La charge bacillaire n'a montré aucune différence significative pour toutes les sous populations lymphocytaires (données non affichées).

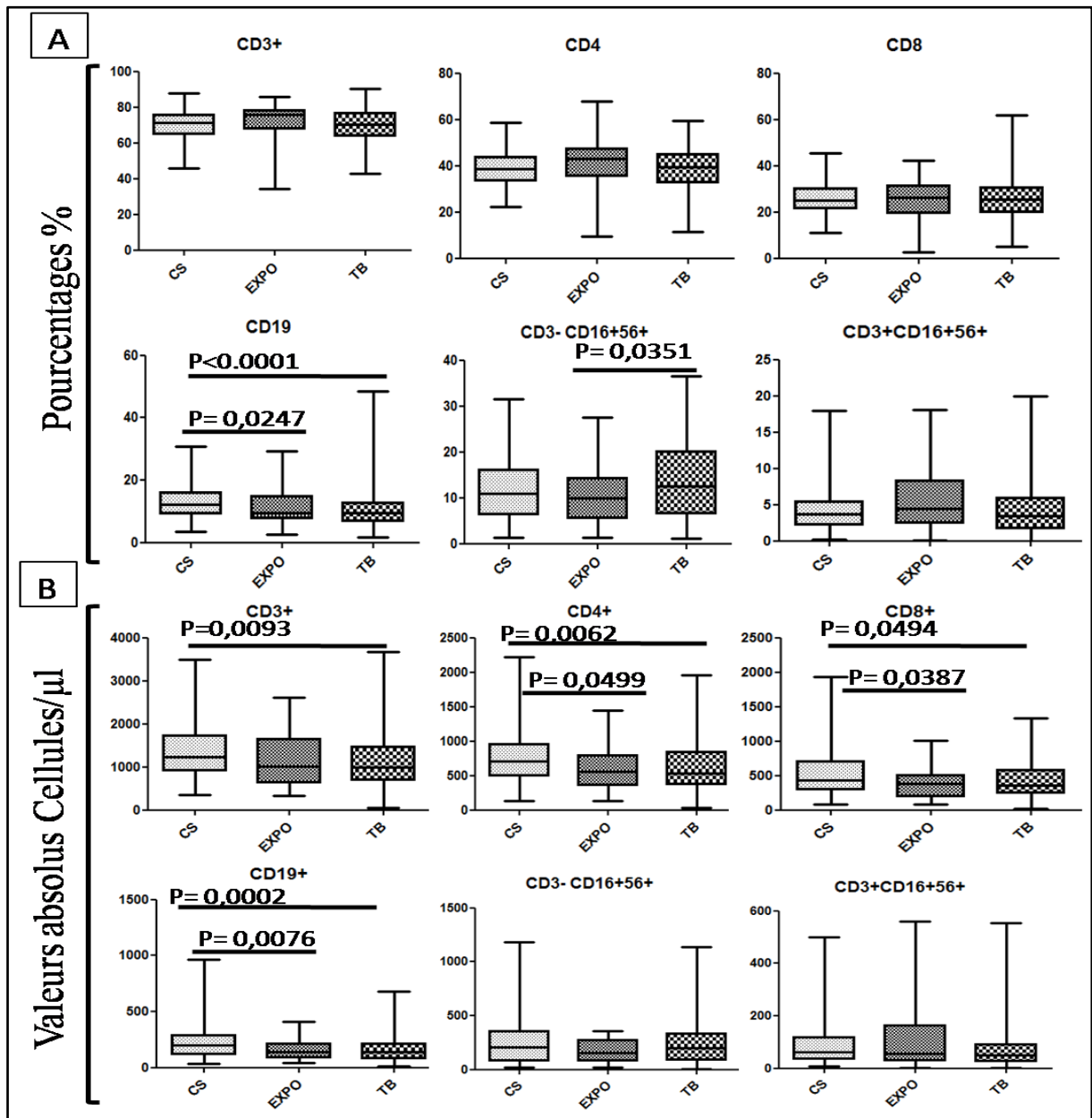


Figure 13: Comparaison des pourcentage (A) et valeurs absolues (B) des lymphocytes T CD3+, T CD4+, T CD8+, B, NK et NKT du sang périphérique des groupes des contrôles sains (CS)(n=101), des sujets sains exposés (EXPO)(n=43) et des patients atteints de TB active TB (n=185), obtenus par cytométrie en flux.

Les résultats sont représentés dans des graphiques en boîtes à moustaches, avec une médiane et une plage interquartile. Les données ont été analysées à l'aide du test de Mann-Whitney. Les différences sont considérées significatives lorsque $p \leq 0,05$.

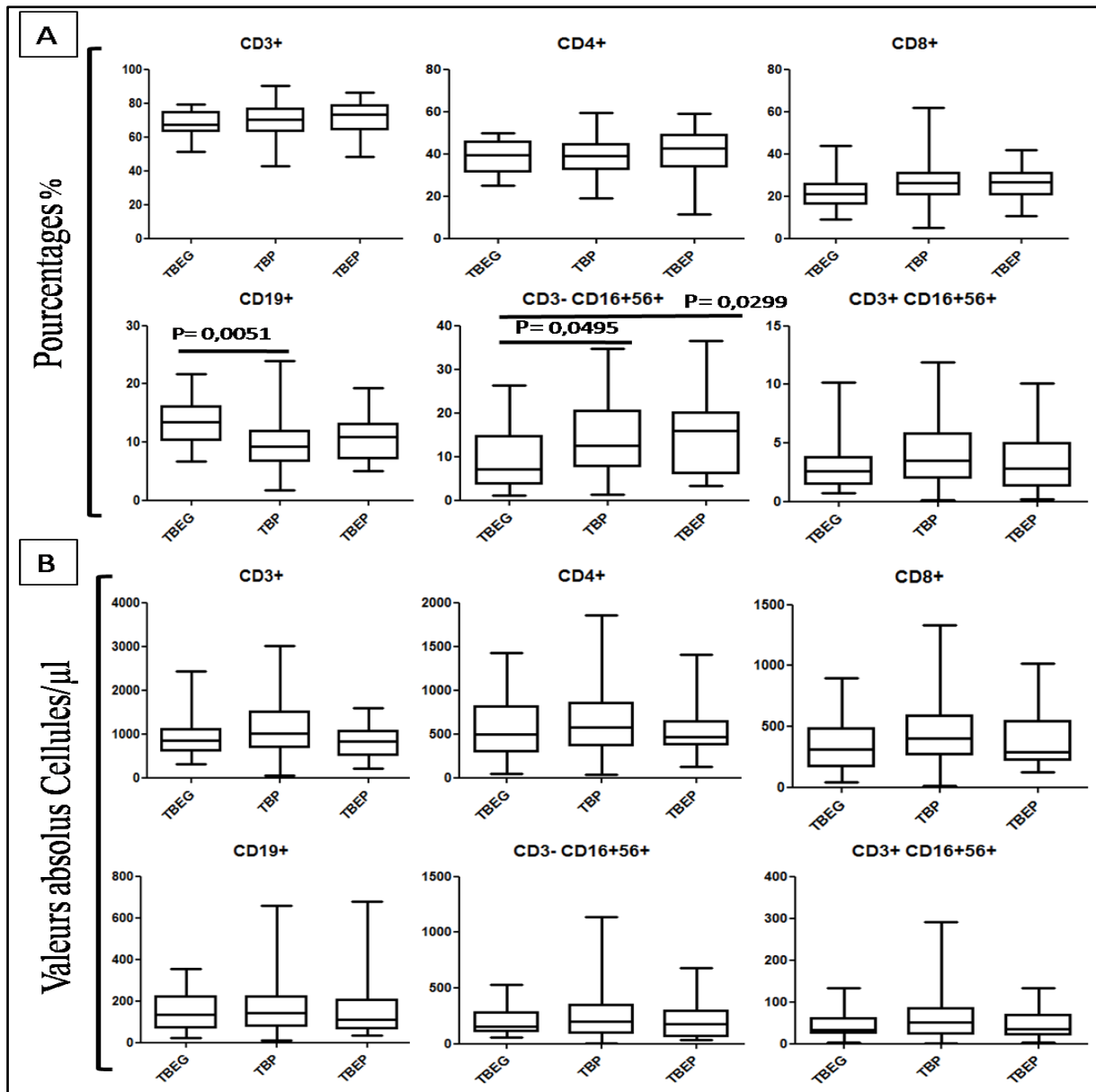


Figure 14: comparaison des pourcentages (A) et valeurs absolues (B) des lymphocytes T CD3+, T CD4+, T CD8+, B, NK et NKT du sang périphérique des groupes de patients atteints de TB pulmonaire (TBP) (n=134) et de patients atteints de TB pleural (TBEP) (n=33) et de patients atteints de TB ganglionnaire (TBEG) (n=18) obtenus par cytométrie en flux.

Les résultats sont représentés en boîtes à moustaches, avec une médiane et une plage interquartile. Les données sont analysées à l'aide du test de Mann-Whitney. Les différences sont considérées significatives lorsque $p \leq 0,05$.

II.3. Analyse phénotypique des états mémoires et marqueurs d'activation des cellules T CD4+ et T CD8 + dans le sang périphérique chez les patients tuberculeux

Nous avons comparé les lymphocytes T naïfs exprimant le CD45RA et mémoires exprimant le CD45RO entre les groupes CS, EXPO et TB. L'analyse statistique a révélé des différences significatives concernant la distribution des lymphocytes T CD4+ naïfs (CD45RA+) ($P < 0,0001$) et CD4+ mémoires (CD45RO+) ($P = 0,0004$) entre les 3 groupes (Figure 15a). Les patients TB avaient les pourcentages les plus élevés en lymphocytes T CD4+ naïfs. Par contre les lymphocytes T CD4+ mémoires étaient plus élevés chez les EXPO. Les pourcentages des lymphocytes T CD8+ mémoires (CD45RO+) différaient aussi entre les 3 groupes ($P = 0,0219$) (Figure 15a). L'analyse en paire a montré que les pourcentages des lymphocytes T CD8+CD45RO+ étaient significativement élevés dans le groupe des EXPO en comparaison avec les patients TB. En revanche, aucune différence significative entre les 3 groupes n'a été observée pour les lymphocytes T CD8 naïfs (CD8+CD45RA+).

L'analyse des phénotypes naïfs/mémoires entre les sous-groupes des patients TB a montré que les pourcentages des lymphocytes CD4+CD45RO+ étaient significativement plus élevés chez les patients TBEG en comparaison aux patients TBP et TBEP, mais aucune différence n'a été notée pour les lymphocytes T CD4+CD45RA+, CD8+CD45RA+ et CD8+CD45RO+ (Figure 15b).

Le pourcentage des lymphocytes T CD4+CD45RO+ diminuait à mesure que la charge bacillaire augmentait chez les patients tuberculeux. Une différence significative a été notée entre les patients ayant un score 1+ et 3+ ($P = 0,0395$) (données non affichées).

Nous avons ensuite étudié le pourcentage de lymphocytes T CD4⁺ et de lymphocytes T CD8⁺ exprimant les marqueurs d'activation cellulaire HLA-DR et CD38 dans les groupes CS, EXPO et TB. Des différences statistiquement significatives ont été observées entre les 3 groupes pour les pourcentages des lymphocytes CD4⁺ CD38⁺ HLA-DR⁺ ($P=0,0162$), CD4⁺ CD38⁺ ($P<0.0001$), CD8⁺ CD38⁺ HLA-DR⁺ ($P= 0,0211$) et CD8⁺ CD38⁺ ($P<0.0001$). En comparaison aux groupes des CS et EXPO, les pourcentages des lymphocytes CD4⁺ CD38⁺ HLA-DR⁺, CD4⁺ CD38⁺, CD8⁺ CD38⁺ HLA-DR⁺ et CD8⁺ CD38⁺ étaient plus élevée chez les patients TB. (Figure 16a).

L'analyse de ces sous populations parmi les trois groupes TB a montré une augmentation significatif des pourcentages des lymphocytes CD4⁺ CD38⁺ HLA-DR⁺, CD4⁺ CD38⁺, CD8⁺ CD38⁺ chez les patients TBEP en comparaison aux patients TBP et TBEG (Figure 16b).

Aucune différence significative n'a été trouvée par rapport à la charge bacillaire pour les statuts d'activation des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ (données non affichées).

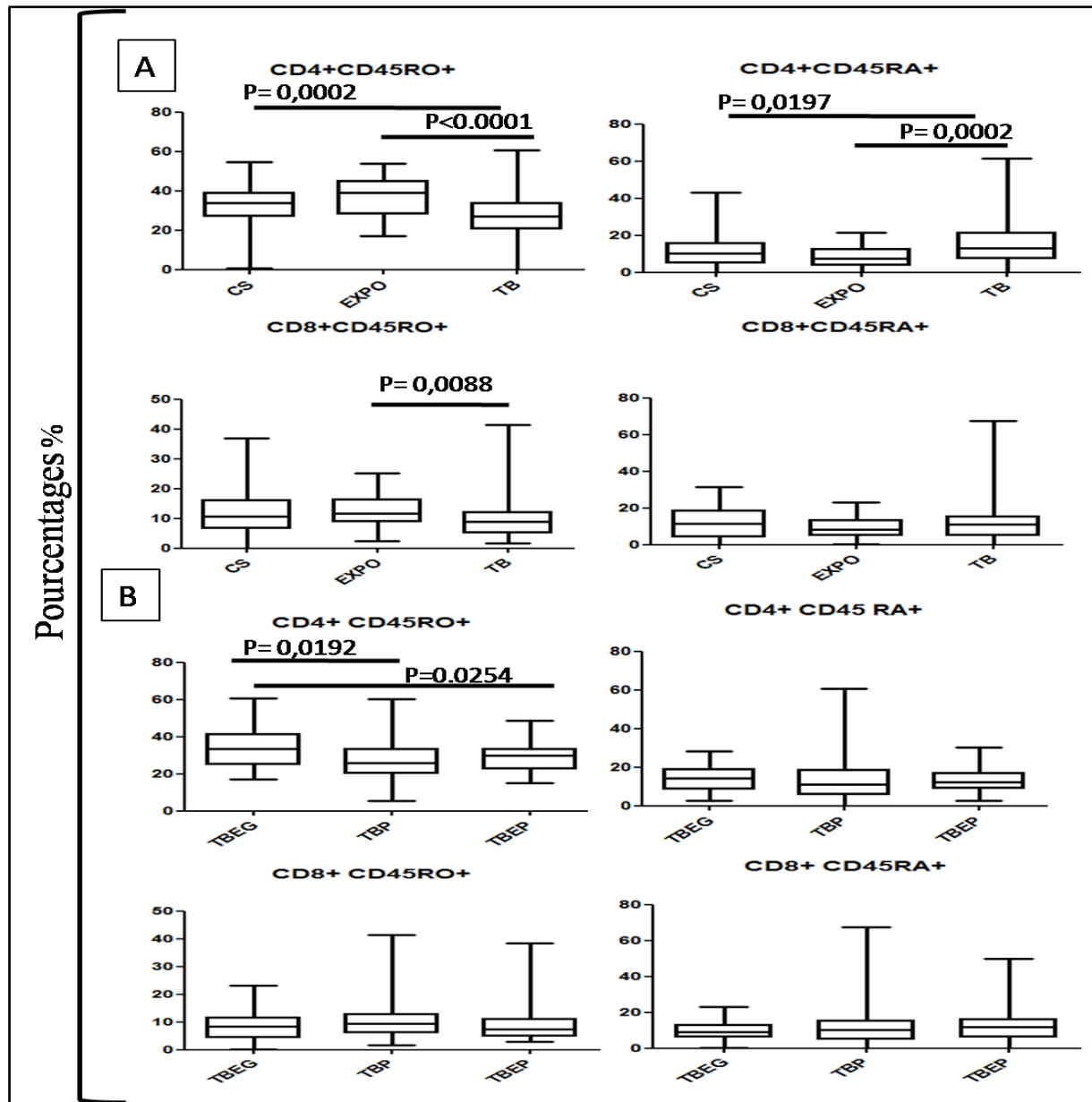


Figure 15: Analyse phénotypique des états mémoires des cellules T CD4+ et T CD8 + dans le sang périphérique chez les patients tuberculeux.

(A) comparaison des pourcentage des lymphocytes T CD4+CD45RA+, CD4+CD45RO+, T CD8+CD45RA+ et CD8+CD45RO+ entre les groupes de contrôles sains (CS) (n=101), de sains exposés (EXPO) (n=43) et de patients atteints de TB active (TB) (n=185) (B) comparaison des pourcentage des lymphocytes T +CD45RA+, CD4+CD45RO+, CD8+CD45RA+ et CD8+CD45RO+ entre les groupes de patients atteints de TB pulmonaire (TBP) (n=134) et de patients atteints de TB pleural (TBEP) (n=33) et de patients atteints de TB ganglionnaire (TBEG) (n=18). Les résultats sont représentés en boîtes à moustaches, avec une médiane et une plage interquartile. Les données sont analysées à l'aide du test de Mann-Whitney. Les différences sont considérées significatives lorsque $p \leq 0,05$.

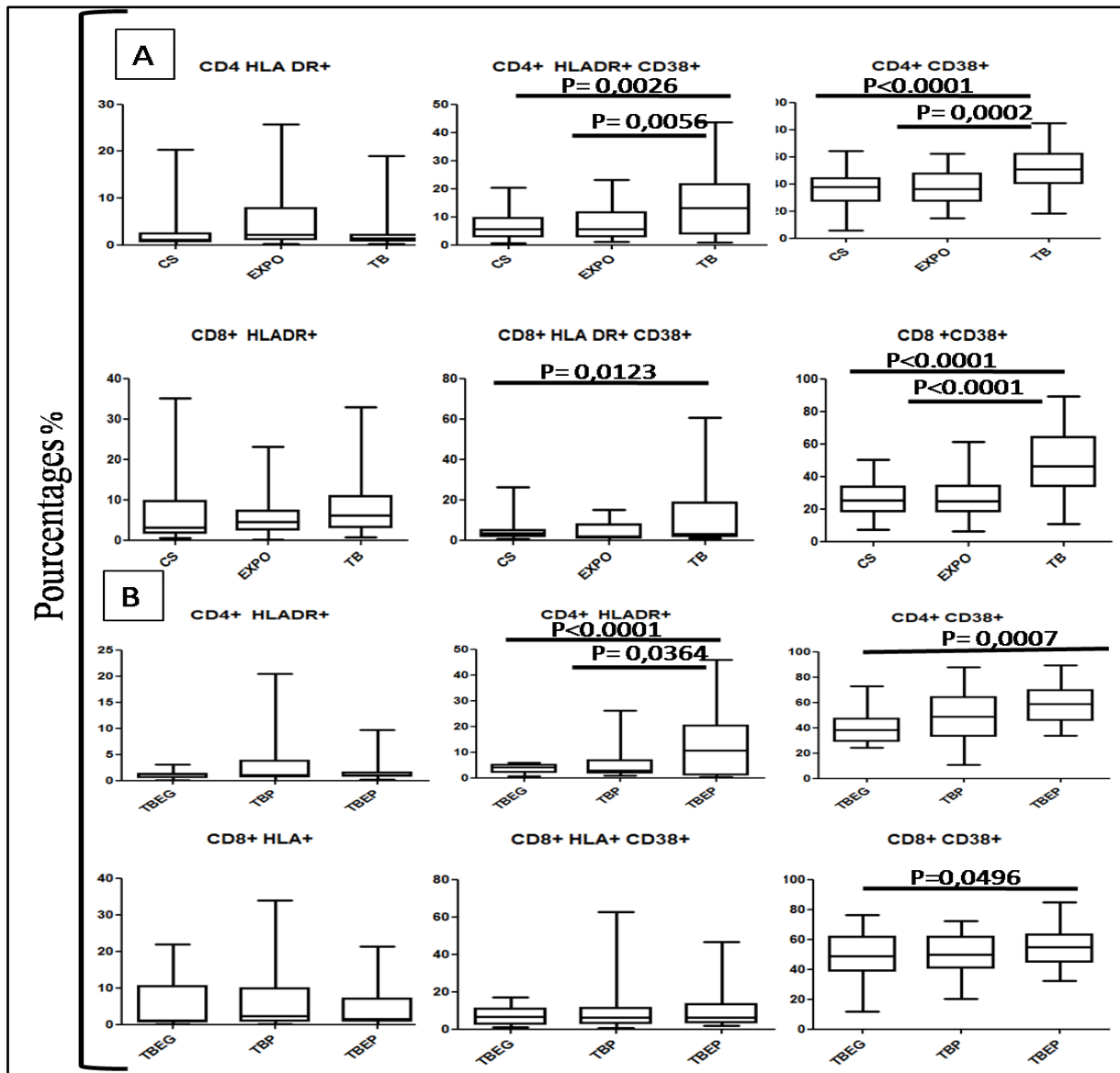


Figure 16: Analyse phénotypique des cellules T CD4+ et T CD8 + activés dans le sang périphérique chez les patients tuberculeux.

(A) comparaison des pourcentage des lymphocytes T CD4+ HLA DR+, CD4+ CD38+ HLA-DR+, CD4+ CD38+, CD8+ HLA-DR+, CD8+ CD38+ HLA-DR+ et CD8+ CD38+ entre les groupes de contrôles sains (CS)(n=101), de sujet exposés à l'infection (EXPO) (n=43) et de patients atteints de TB active (TB) (n=185) (B) comparaison des pourcentages des lymphocytes T CD4+ HLA DR+, CD4+ CD38+ HLA-DR+, CD4+ CD38+, CD8+ HLA-DR+, CD8+ CD38+ HLA-DR+ et CD8+ CD38+ entre les groupes de patients atteints de TB pulmonaire (TBP) (n=134), de TB pleurale (TBEP) (n=33) et de TB ganglionnaire (TBEG) (n=18). Les résultats sont représentés en boîtes à moustaches, avec une médiane et une plage interquartile. Les données sont analysées à l'aide du test de Mann-Whitney. Les différences sont considérées significatives lorsque $p \leq 0,05$.

III. Activation immunitaire et lymphocytes T régulateurs dans les ganglions lymphatiques

Les résultats de cette partie ont fait l'objet d'une publication dans le journal BMC Immunology

III.1. Profil phénotypique et cytokine des cellules T CD4 + dans la LNMC et PBMC

Nous avons d'abord comparé les phénotypes mémoires de sous-populations de lymphocytes T dans LNMC et PBMC. Les LNMC ont été significativement enrichis en cellules T CD4 + [$80,7 \pm 5,6$ % contre $68,0 \pm 6,6$ % ($p = 0,0015$)] (Figure 17a). Les lymphocytes T CD8 + étaient par contre plus faiblement représentés dans LNMC par rapport aux PBMC [$17,6 \pm 5,8$ % vs $27,4 \pm 11,7$ % ($p = 0,0055$)] (Figure 17b). Les sous-populations mémoires des cellules T CD4 + ont été définies selon l'expression du CD45RA et CCR7 et seulement le sous type effecteur a été légèrement augmenté dans LNMC par rapport à PBMC ($p = 0,0002$) (Figure 19).

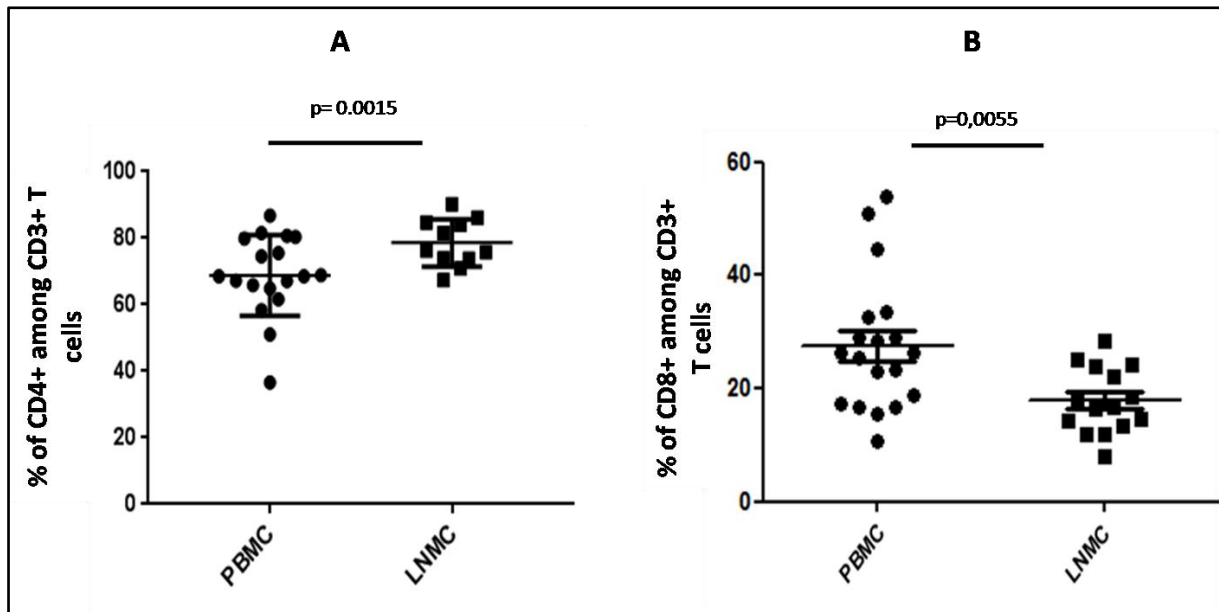


Figure 17: Distribution des sous-populations cellulaires T CD4+ (A) et CD8 + (B) .parmi les cellules T CD3 + dans le sang périphérique et dans le ganglion lymphatique chez les patients atteints de TB ganglionnaire.

Les moyennes de 18 sujets sont affichées et des barres d'erreur représentent les écarts types.

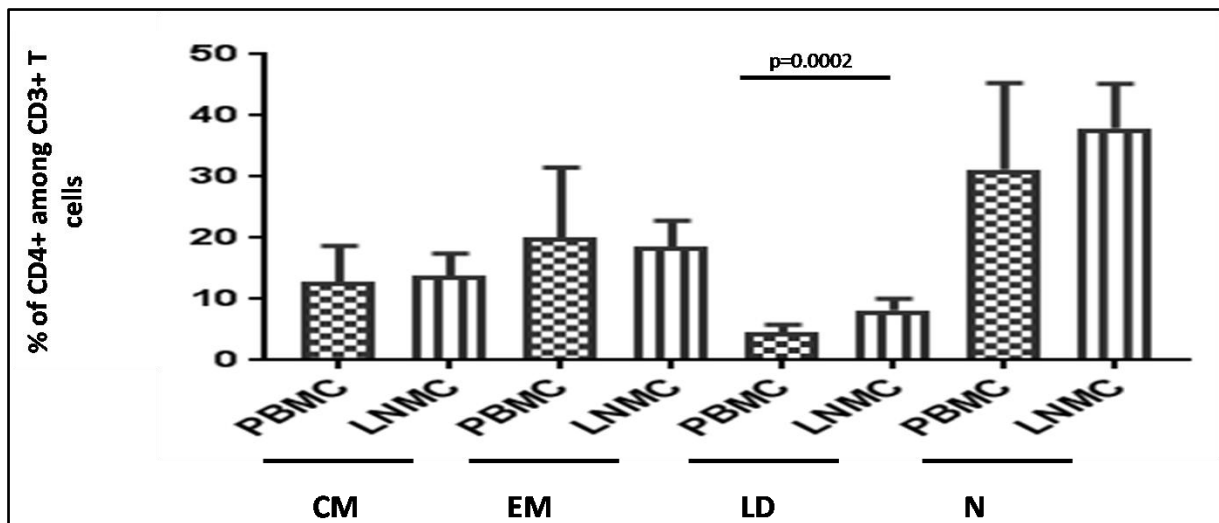


Figure 18: Distribution des phénotypes mémoire des sous-populations cellulaires T CD4 + des parmi les cellules T CD3 + dans le sang périphérique et dans le ganglion lymphatique chez les patients atteints de TB ganglionnaire.

Les moyennes de 18 sujets sont affichées et les barres d'erreur représentent les écarts types. CM: central mémoire, EM: effecteur mémoire, LD: cellules mémoire différenciées tardives, N: naïf.

Les profils fonctionnels des lymphocytes T en réponse aux antigènes *Mtb* ont été comparés entre LNMC et PBMC. La production intra-cytoplasmique d'IFN γ , d'IL2, de TNF α , de IL17 et de MIP-1 α par les cellules T CD4 + dans les PBMC et LNMC en réponse à *Mtb* RVL n'était pas différente entre LNMC et PBMC (Figure 19a). De même, ces productions cytokiniques des lymphocytes T CD4 + en réponse aux peptides ESAT6 / CFP10 n'étaient pas différentes entre LNMC et PBMC (Figure 19b).

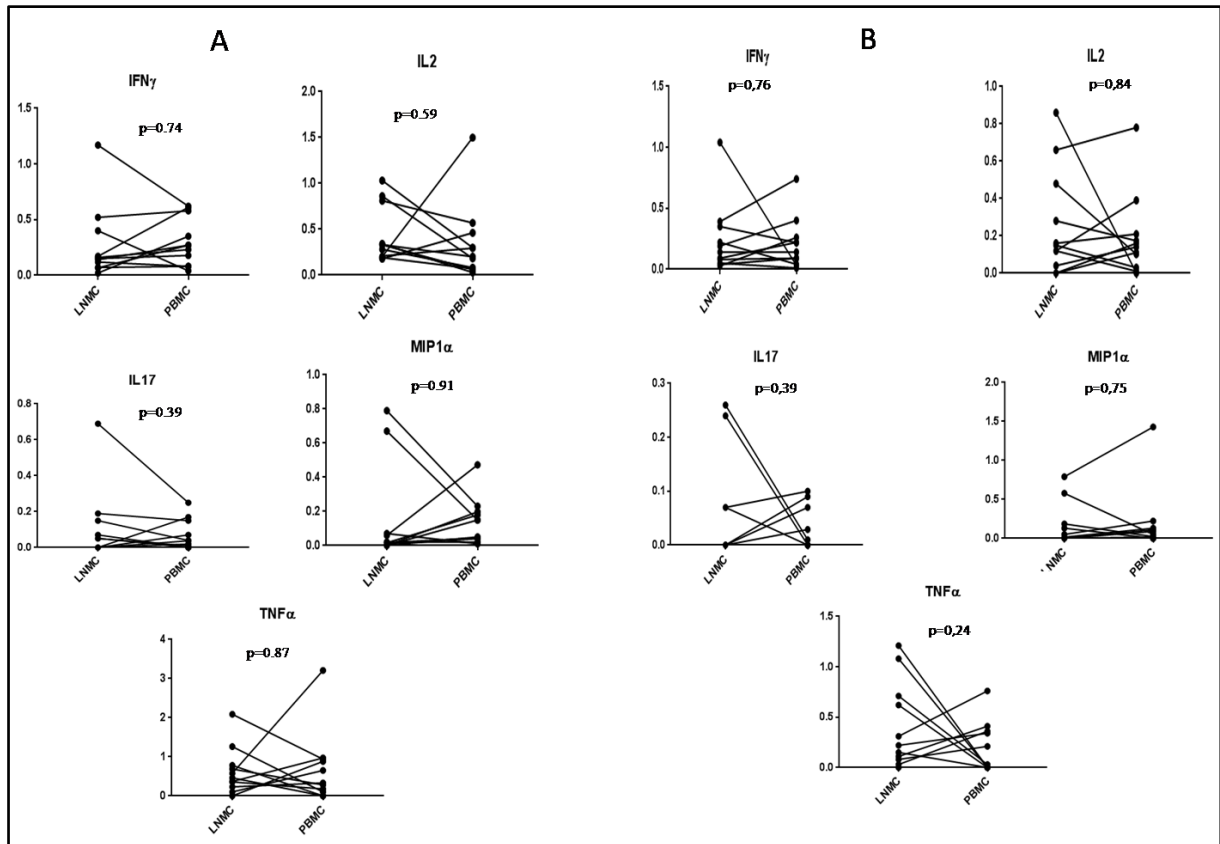


Figure 19: Production intra-cytoplasmique des cytokines par cellules T CD4 + mémoire viables après stimulation avec le RVL(A) et ESAT6 / CFP10 (B). Les résultats de 11 sujets sont présentés.

Aucune différence significative n'a été observée dans la polyfonctionnalité des cellules T CD4+ mémoires totale dans LNMCM par rapport aux PBMC pour les mêmes stimuli (Figure 20) (les trois rangées avec comparaison côte à côte). La polyfonctionnalité des cellules T CD4 + mémoire totale en réponse aux peptides ESAT6 / CFP10 et au lysat de *Mtb* était significativement différente de celle en réponse au SEB à la fois dans les PBMC et la LNMCM, indiquant une différence dans les cellules spécifiques au *Mtb* en tant que groupe de clones (Figure 20, 4 premiers pies en comparaison des 2 en bas), mais aucune différence n'a été trouvée dans la polyfonctionnalité en réponse aux antigènes spécifiques de *Mtb*, peptides ESAT6 / CFP10 et RVL (Figure 20, comparaison des deux premiers et deux du milieu).

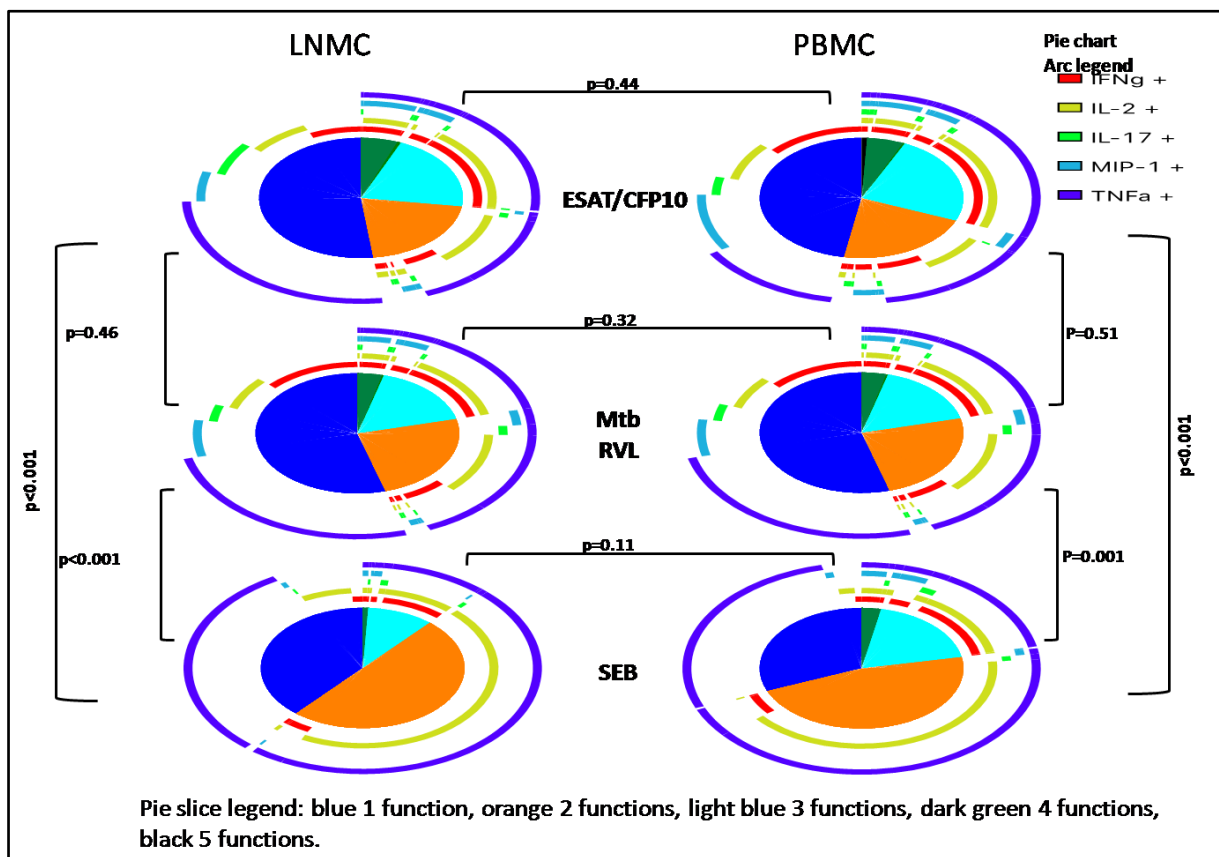


Figure 20: Composition polyfonctionnelle de cellules T CD4 + mémoire totale après stimulation avec le RVL, ESAT6 / CFP10 et SEB.

Les résultats de 11 sujets sont présentés. L'analyse a été faite sur des cellules T CD4 + mémoire viables. Les graphiques secteurs illustrent le profil polyfonctionnel moyen des cellules répondantes pour chaque stimulus spécifique de tous les sujets. Toutes les combinaisons possibles de réponses sont représentées par les arcs avec une légende de couleur d'arc à secteurs sur la figure

III.2. Distribution des lymphocytes T activés et des Treg dans les LNMC et PBMC

Nous avons mesuré la fréquence des lymphocytes T CD4 + conventionnels activés et des Treg dans les LNMC et les PBMC. L'activation était basée sur l'expression de HLA-DR et CD38. Les Treg ont été identifiés comme CD4+, CD25+, FoxP3+ et CD127dim. Une proportion accrue de lymphocytes T CD4 + HLA-DR+ CD38+ activés ($p < 0,0001$) et de Treg CD4+ CD25+ FoxP3+ CD127dim ($p = 0,0089$) dans LNMC par rapport aux PBMC a été observée (Figure 21).

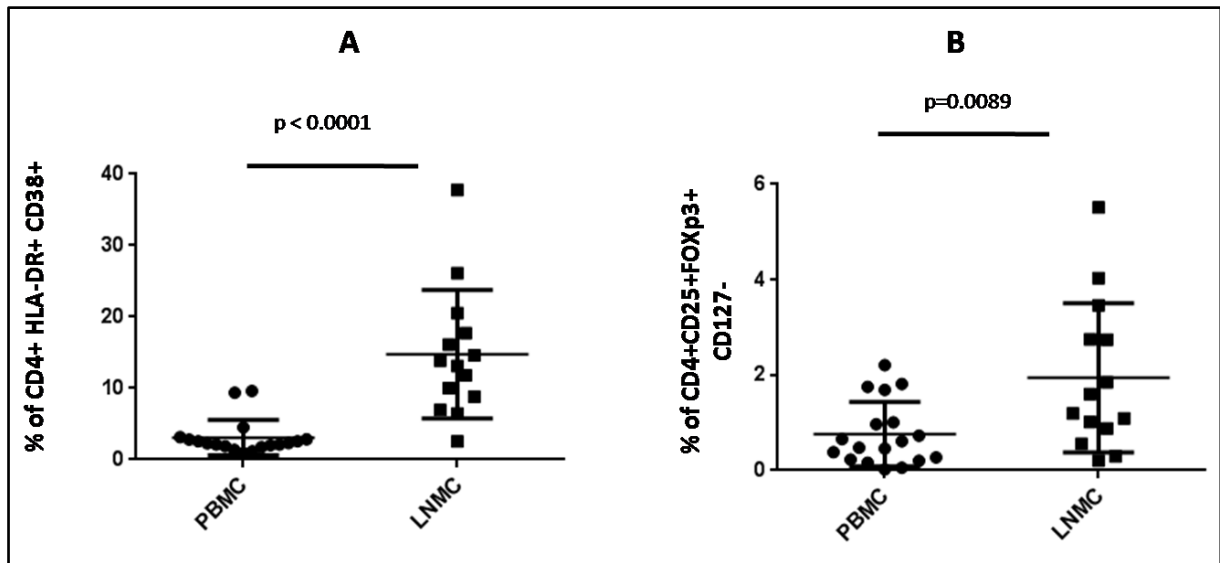


Figure 21: Distribution des fréquences des cellules T CD4 + HLA-DR + CD38 + activées (A) et FoxP3+ CD25+ CD127- régulatrices (B) dans LNMC et PBMC

Une corrélation positive entre la fréquence des lymphocytes T CD4⁺ activés totaux et les Treg a été observée dans LNMC ($r = 0,676$, $p = 0,008$) et PBMC ($r = 0,549$, $p = 0,018$) (Figure 22).

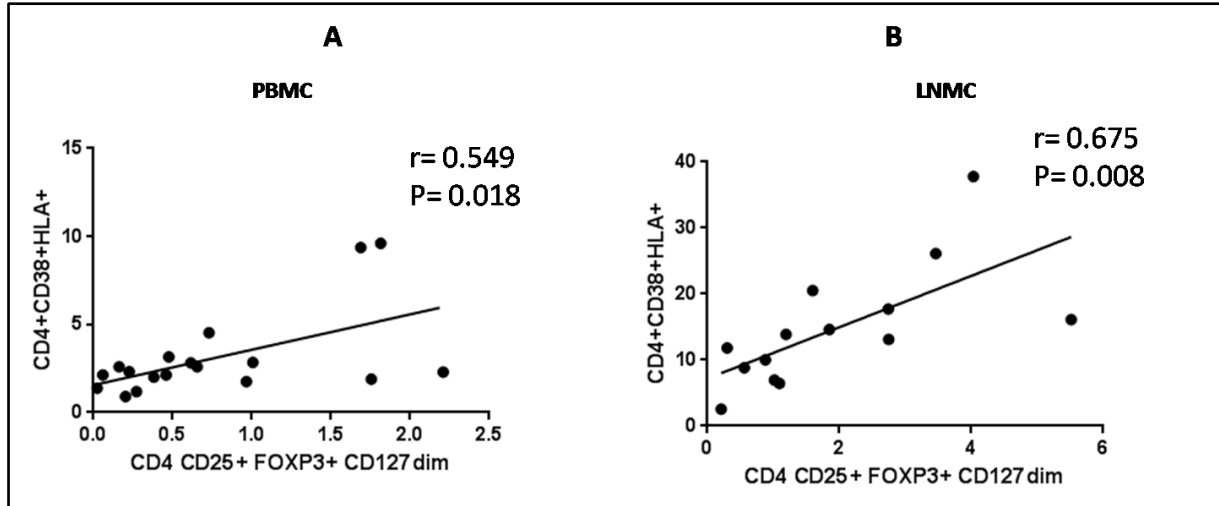


Figure 22: Corrélation des fréquences ex vivo des Treg avec les fréquences ex vivo des cellules activées par CD4 + dans les PBMC (A) et LNMC (B)

Nous avons comparé, parmi les Treg dans LNMC, la proportion de cellules exprimant des marqueurs d'activation. Plus de 90% des cellules CD25⁺ FoxP3⁺ CD127^{dim} exprimaient HLA-DR et / ou CD38. En outre, la sous-population prédominante de Treg dans les LNMC et les PBMC était celle exprimant HLA-DR et CD38 simultanément (Figure 23).

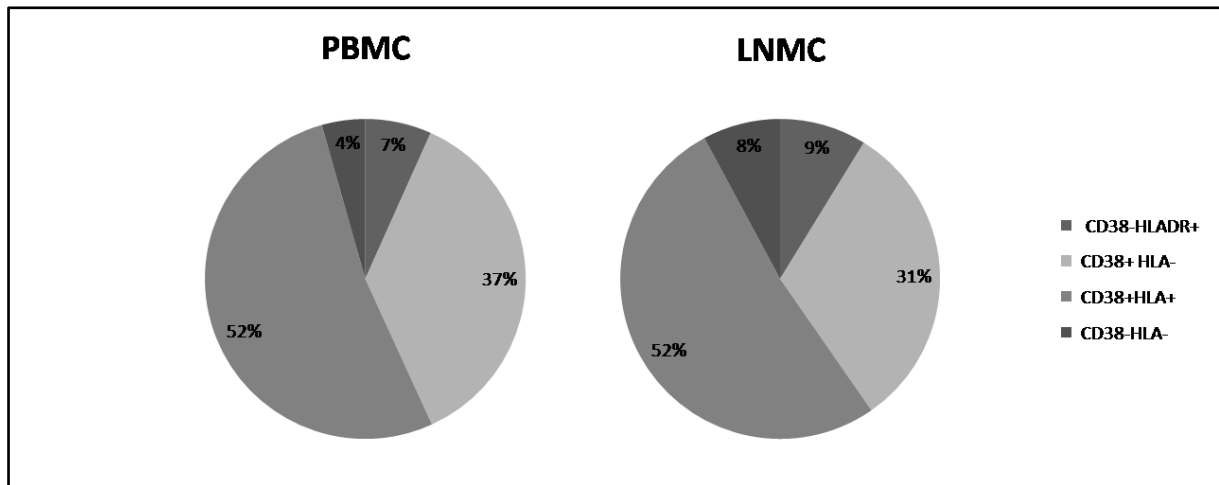


Figure 23: Distribution des marqueurs d'activation parmi les Treg CD4 + CD25 + FoxP3 + CD127dim dans les PBMC et LNMC

III.3. Corrélation de Treg avec la production de cytokines induite par les antigènes *Mtb*.

Nous avons déterminé la corrélation entre les proportions des Treg et des cellules T CD4+ produisant des cytokines après l'activation avec les antigènes *Mtb* pendant la nuit dans le LNMC et PBMC. Une corrélation positive entre la proportion de Treg et la production des cytokines Th1 (IL2 et IFN γ) et le MIP-1 α a été observée après stimulation par l'antigène de lysat *Mtb* chez les LNMC mais pas chez les PBMC (Tableau 5). D'autre part, une corrélation similaire a été trouvée après stimulation par les peptides *Mtb* ESAT6 / CFP10 alors qu'aucune corrélation n'a été trouvée après stimulation du mitogène SEB (données non présentées).

Tableau 5: Corrélation des fréquences des Treg avec les fréquences des lymphocytes T CD4+ exprimant IFN γ , IL2, TNF α , IL17 et MIP1 α suite à une stimulation ex-vivo par les antigènes RVL dans les PBMC et LNMC.

	T reg			
	PBMC		LNMC	
	r	p	r	p
IFN-γ	-0,19	0,60	0,66	0,04
IL2	-0,04	0,90	0,71	0,02
TNF-α	-0,02	0,96	0,48	0,16
IL17	-0,23	0,52	0,45	0,12
MIP-1α	-0,04	0,91	0,95	<0,001

DISCUSSIONS

I. Valeurs de références des sous populations lymphocytaires chez la population marocaine: l'influence de l'âge, le sexe, l'origine ethnique et les facteurs socio-économiques.

Une interprétation correcte des troubles immunologiques et pathologiques passe par une détermination de ce qu'est un état immunitaire normal. Le dénombrement des sous populations lymphocytaires, par cytométrie en flux, est une technique sensible devenue un outil clé dans l'évaluation de l'état immunologique. Il est donc important d'utiliser cette approche pour l'établissement de valeurs de référence chez des adultes normaux en bonne santé.

Les sous populations lymphocytaires peuvent être affectées par différents facteurs intrinsèques de l'hôte ainsi que par des facteurs environnementaux. Cela implique la nécessité d'établir des valeurs de référence normales locales et spécifiques pour chacune des sous populations lymphocytaires (C. K. W. Cheng et al., 2004; Choong et al., 1995; García-Dabrio et al., 2012; Huenecke et al., 2008; Pera et al., 2015; Pérez-de-Heredia et al., 2015). Très peu de données sont disponibles pour les valeurs de référence de la population nord-africaine en général (Feki *et al.*, 1998; Touil *et al.*, 2012). Ces études se sont limitées à l'établissement des valeurs de référence pour les populations lymphocytaires comprenant les cellules T (sous-ensembles CD4 et CD8), les cellules B et les cellules NK. A notre connaissance, il n'existe qu'une seule étude marocaine publiée dans ce sens (Touil *et al.*, 2012) et qui présente de nombreuses limites et ne peut être représentative de la population marocaine. En effet, Dans cette étude seule l'approche taille versus structure a été utilisée pour identifier la population de lymphocytes et un panel d'anticorps monoclonaux relativement limité a été utilisé. De plus, le sexe et l'âge n'ont pas été pris en compte puisque 90 % de la population étudiée étaient des hommes de moins de 49 ans. Ainsi, l'objectif de la présente étude était de réévaluer les valeurs de référence marocaine des lymphocytes et d'inclure des valeurs pour des sous-populations lymphocytaires supplémentaires concernées par la maturation et l'activation. De plus, nous avons également évalué l'influence du sexe, de l'âge, de l'origine ethnique et des facteurs environnementaux sur ces valeurs de références.

À l'instar des travaux publiés précédemment (voir Tableau 4), nos résultats ont également montré des différences dans les valeurs de référence avec les autres séries. En fait, ces différences sont observées entre pays d'un même continent et même entre population de même race (caucasienne,

asiatique, arabe ou noir). Seules quelques similitudes ponctuelles concernant certains paramètres dans certaines populations ont été observées. Cela indique la nécessité de prendre en compte les variations géographiques lors de l'utilisation des valeurs de référence des lymphocytes (Al-Jabri *et al.*, 2008; Bosire *et al.*, 2013; Jentsch-Ullrich *et al.*, 2005; Naluyima *et al.*, 2016; Qin *et al.*, 2016; Santagostino *et al.*, 1999; Torres *et al.*, 2013; Valiathan *et al.*, 2014; Yaman *et al.*, 2005). Ces écarts sont probablement dus à des différences de paramètres biologiques (sexe, âge et origine ethnique) (Chng *et al.*, 2004), de facteurs liés au mode de vie (consommation d'alcool, tabagisme, régime alimentaire, exercice et niveaux de stress)(García-Dabrio *et al.*, 2012; Tollerud *et al.*, 1989) et à des facteurs environnementaux (exposition aux maladies infectieuses) (Ben-smith *et al.*, 2008; Sutherland *et al.*, 2011; Weiss *et al.*, 2009). De plus, les techniques employées pour mesurer les valeurs des paramètres peuvent également affecter les résultats.

Tableau 6: Comparaison des sous-ensembles de lymphocytes de la présente étude avec d'autres études

			Année	Taille de la population	CD3+ (cellules/ μ l)	CD3+ CD4+ (cellules/ μ l)	CD3+ CD8+ (cellules/ μ l)	CD4/CD8	CD16+CD56+ (cellules/ μ l)	CD19+ (cellules/ μ l)
Afrique	Maghreb	Maroc	Étude actuelle	145	1393	793	513	1.54	233	227
			2012	242	1431	871	637	1.37	211	59
		Tunisie	1998	52	1345	799	470	-	-	-
	Subtropicale	Uganda	2016	663	1615	945	586	1.8	329	133
		Kenya	2013	315	1655	920	646	1.57	-	-
Asie	Moyen-Orient	Oman	2008	118	1701	1005	638	-	308	348
	Asie occidentale	Turquie	2005	220	1680	1095	669	1.68	164	254
	Asie de l'Est	Chine	2016	1068	1387	694	589	1.32	403	216
Europe		Allemagne	2005	100	1320	870	460	1.9	280	220
		Italie	1999	965	1532	940	551	1.71	278	230
Amérique		Floride	2014	50	1620	1003	590	1.8	214	256
		Brésil	2013	641	1585	931	541	-	-	-

Dans notre étude, les valeurs des sous populations lymphocytaires, à l'exception des cellules B, sont inférieures à celles rapportées par Touil *et al.* en 2012. Ces différences pourraient être dues à un facteur lié au sexe / âge de la population étudiée (90 % de la population étudiée étaient de

jeunes hommes) ou liées à la méthode de mesure utilisée. Par ailleurs, nous notons une similitude particulière entre nos résultats et ceux rapportés au sein de la population tunisienne (Feki *et al.*, 1998). En fait, ces deux populations maghrébines partagent les mêmes aspects géographiques, ethniques, économiques et culturels.

A l'âge adulte, le processus naturel de vieillissement s'accompagne d'une détérioration du système immunologique à la fois inné et adaptatif (Weiskopf *et al.*, 2009). Ces altérations fonctionnelles sont alors associées à une plus grande sensibilité aux infections (Weiskopf *et al.*, 2009), à une altération de réponse immunitaire médiée par les anticorps au vaccin (Aspinall *et al.*, 2007; Nikolich-žugich, 2008) et à un risque accru de développer un cancer auto-immun et malin (Fulop *et al.*, 2010; Prelog, 2005). Le thymus est un organe central du système immunitaire des lymphocytes T, qui subit une involution liée à l'âge. L'involution thymique est directement corrélée à la déclinaison de la thymopoïèse qui précède l'immuno-incompétence liée aux lymphocytes T à un âge avancé (Goronzy & Weyand, 2013; Gui *et al.*, 2012). Des résultats controversés sur l'impact de l'âge sur les lymphocytes T ont été observés. Certaines études ont montré que le nombre de cellules CD4⁺ augmentait tandis que le nombre de CD8⁺ diminuait avec l'âge chez les adultes (Tollerud *et al.*, 1990). Il n'en reste pas moins que d'autres études montrent des résultats contradictoires. En effet, tandis que les unes indiquent que les nombres de CD4⁺ et CD8⁺ peuvent augmenter (Chang *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 1996), d'autres montrent une diminution (Jentsch-Ullrich *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2009) ou même pas de changement avec l'âge (Kverneland *et al.*, 2016).

Nos résultats ne montrent aucune modification quantitative significative des lymphocytes T totaux avec l'âge. Cependant, nous avons observé une diminution liée à l'âge des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ naïves et une augmentation des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ mémoires. Ces résultats s'apparentent à de nombreuses autres études, qui ont rapporté que ces cellules T CD8⁺ mémoires sont principalement des cellules T mémoires effectrices et des cellules T mémoires effectrices différenciées tardives, tandis que les cellules T CD4⁺ mémoires sont des cellules T mémoires centrales (Koch *et al.*, 2008; Lipp *et al.*, 1999; Saule *et al.*, 2006). Ce shift entraîne une restriction du répertoire des récepteurs des lymphocytes T et conduit à une altération des fonctions des lymphocytes T (Goronzy *et al.*, 2007; Tollerud *et al.*, 1990). De plus, des tendances à la baisse significatives de CD4⁺ CD38⁺ et CD8⁺ CD38⁺ avec le vieillissement ont été notées dans notre analyse, conformément au rapport précédent (Melzer *et al.*, 2015; Qin *et al.*, 2016).

Une expression élevée de CD38 est considérée comme un marqueur de mauvaise réponse au traitement et de mauvais pronostic dans la malignité. Cependant, les connaissances sur le mécanisme des changements liés à l'âge des marqueurs d'activation des cellules T, CD38 et HLA-DR, sont encore très limitées.

Contrairement aux études précédentes qui ont montré des évolutions du nombre des cellules Treg à la fois croissantes et stables avec l'âge (Kverneland *et al.*, 2016; Qin *et al.*, 2016), nous avons trouvé des nombres de Treg décroissants. Dans ce sens, des études ont montré que les cellules Treg subissent une différenciation en fonction de l'âge vers le phénotype mémoire CD45RA⁺ qui ne s'accompagne pas d'une diminution de leur capacité de suppression (Kverneland *et al.*, 2016; Santner-Nanan *et al.*, 2008).

Le changement lié à l'âge de la fréquence phénotypique et l'activité des cellules NK a été traité dans plusieurs études avec des résultats de pourcentage et de valeur absolue qui se maintiennent (Kverneland *et al.*, 2016; Qin *et al.*, 2016) ou augmentent (Lee *et al.*, 1996; Solana & Mariani, 2000; Yang *et al.*, 2009) chez les personnes âgées. Dans notre population d'étude, nous avons noté une diminution liée à l'âge du nombre de cellules NK. Un remodelage de sous-ensembles de cellules NK caractérisé par une diminution du pourcentage de cellules NK CD56^{bright} plus immatures et une augmentation des cellules NK CD56^{dim} a été décrit (Solana *et al.*, 2014). Une augmentation significative des cellules coexprimant les marqueurs des cellules CD3 et NK a été montrée au cours du vieillissement (Solana & Mariani, 2000). De même, notre étude a révélé une augmentation significative en fonction de l'âge des cellules NKT.

En ce qui concerne les différences liées à l'âge des cellules B, nos données n'ont montré aucune différence significative entre les groupes d'âge. Ceci est conforme à toutes les autres études liées à l'âge réalisées sur d'autres populations (Kverneland *et al.*, 2016; Qin *et al.*, 2016). Bien que la numération des lymphocytes B n'est pas significativement modifiée au cours de la vie adulte, la diversité des lymphocytes B peut considérablement s'effondrer chez les personnes âgées et augmenter la fragilité immunitaire (Gibson *et al.*, 2009). En fait, on sait que la qualité de la réponse anticorps change avec l'âge, avec une diminution des anticorps efficaces et spécifiques en faveur de la production d'anticorps non spécifiques (Howard *et al.*, 2006). Cette réduction de la diversité des lymphocytes B est probablement due à une production plus faible de nouvelles

cellules B de la moelle osseuse en raison des changements liés à l'âge dans le nombre et la fonction des cellules souches hématopoïétiques.

En concordance avec les observations dans d'autres populations (Kverneland *et al.*, 2016; Naluyima *et al.*, 2016; Qin *et al.*, 2016; Yaman *et al.*, 2005), le sexe n'a pas été démontré comme ayant un rôle important dans la composition du sous populations lymphocytaires dans notre population d'étude. Un pourcentage plus élevé de cellules T CD3+ et CD4+ a été observé chez les femmes tandis que les nombres de cellules CD8 + (en particulier CD8 + CD45RA), B et NK étaient plus élevés chez les hommes. Il a été suggéré que les hormones sexuelles pourraient être une explication des différences observées entre les sexes. En effet, il a été démontré que les hormones sexuelles modulent la fonction immunitaire à différents niveaux. Les lymphocytes circulants ont des récepteurs pour les androgènes et les œstrogènes (OLSEN *et al.*, 1998; Verthelyi, 2001).

Ces cellules immunitaires sont également influencées par le niveau d'hygiène des individus. Les facteurs majeurs ayant un impact sur ce niveau d'hygiène sont le statut économique et le niveau de conscience de l'individu. Dans cette optique, nous avons vérifié l'influence du RP sur les valeurs de références des sous populations lymphocytaires. Nous n'avons observé aucune différence entre les personnes à faible RP et celles à RP moyen et élevé (données non présentées). Nous avons également évalué l'influence des niveaux d'enseignement de notre population d'étude sur les valeurs de références des sous populations lymphocytaires, mais n'avons noté aucune différence de manière globale ni entre les hommes et les femmes (données non présentées). Nous n'avons pas été en mesure d'évaluer l'influence du tabagisme et de la consommation d'alcool puisque 90 % de notre population d'étude a déclaré être non-fumeurs et non consommateurs d'alcool.

La variation immunogénétique lié à l'ethnicité a montré une influence significative sur les sous populations lymphocytaires (Howard *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1996). La population Marocaine est très hétérogène et est contient historiquement des grands groupes plus au moins mixés entre eux: les Arabes et les Amazigh, Rifi et Sahraoui. Dans cette étude, nous avons recruté des sujets de différentes régions géographiques du Maroc afin de garantir que tous les groupes ethniques de la population marocaine soient inclus dans l'étude. Notre analyse n'a montré aucune différence dans les valeurs de références des lymphocytes par rapport à l'origine ethnique (données non

présentées). Les sujets de notre étude étant recrutés dans les grandes villes marocaines, la pureté de leur caractère génétique a certainement été perdue par le brassage ethnique dans ces centres urbains.

II. Les profils immunphénotypiques des lymphocytes du sang périphérique dans les différentes formes de TB active chez les adultes marocains

Avec le tiers de la population mondiale infecté par le *Mtb*, seulement 5 % à 10 % de ces sujets développent une TB active au cours de leur vie (OMS, 2019). Les formes cliniques de cette maladie sont aussi diverses avec des degrés de sévérité variables et reflètent la résultante de l'interaction entre le bacille et le mécanisme de défense de l'hôte. Dans cette interaction la qualité de la défense de l'hôte joue un rôle déterminant (Dheda *et al.*, 2010; Flynn & Chan, 2001; Mogues *et al.*, 2001; Sia & Rengarajan, 2019). Malgré l'importance cruciale des lymphocytes dans l'immunité antituberculeuse, très peu d'études ont étudié les variations des pourcentages et les valeurs absolues de ces sous-populations dans le sang périphérique au cours de la tuberculose. Ces quelques études ont obtenu des résultats incohérents. De plus, la majorité de ces études se sont limitées à explorer les sous populations lymphocytaires chez des patients atteints d'une TB pulmonaire ou se sont focalisées sur les sous populations T, B et NK. Dans ce contexte, le but de notre étude est de déterminer les pourcentages et les valeurs absolues des sous-populations des lymphocytes T CD3+ ; CD3+ CD4+ et CD3+ CD8+, des lymphocytes B CD3-CD19+, des lymphocytes NK CD3-CD16/56 + et des lymphocytes NKT CD3+CD16/56+ chez les patients présentant différentes manifestations cliniques de la TB, et de comparer ces données avec des groupes témoins sains et exposés. L'immunophénotypage a été élargi pour déterminer l'état d'activation et le phénotype naïf / mémoire des lymphocytes T CD4 + et T CD8 +. Enfin, nous avons comparé ces paramètres entre les différentes formes cliniques de TB. Nous avons aussi exploré l'association des différents sous populations à la charge bacillaire dans les frottis d'expectoration des patients TBP.

Le groupe TB dans notre étude a été composée de patients atteints d'une TBP (72,43 %) comme la forme classique de la TB, de patients atteints d'une TBEG (9,73 %) comme forme la plus répondue et la moins sévère de la TB extra-pulmonaire, et de patients atteints d'une TBEP (17,84

%) comme forme sévère de cette maladie. L'analyse directe des lymphocytes circulants a révélé que la TB provoquait des altérations majeures de la distribution périphérique des sous-populations des cellules lymphocytaires. Ces résultats suggèrent une relative lymphopénie chez les patients TB, avec une altération plus grave des lymphocytes B comparée aux lymphocytes T. Cette lymphopénie a été trouvée dans des rapports précédents comme étant transitoire et qui revient à l'état normal après traitement (Deveci *et al.*, 2006; Rodrigues *et al.*, 2002; Sei *et al.*, 2006)

Les lymphocytes T et ses sous-populations T CD4 + et T CD8+, sont essentiels pour l'immunité contre l'infection à *Mtb*. Les lymphocytes T CD4 + semblent jouer leur rôle contre l'infection tuberculeuse en partie par la production des cytokines (IFN- γ , TNF α) qui régissent les réponses immunitaires à médiation cellulaire et également par l'activation du macrophage infecté par *Mtb* qui tue ensuite les bacilles (Boom *et al.*, 2003; Pollock *et al.*, 2013). Les lymphocytes T cytotoxiques CD8 + sont une source importante d'IFN- γ et peuvent également tuer des bactéries via des mécanismes cytotoxiques médiés par des granules cytotoxiques (Rozot *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2014). Des résultats controversés ont été reportés concernant la répartition des lymphocytes T CD4+ et CD8+ dans le sang périphérique chez les patients tuberculeux. Dans certaines études, des proportions inchangées des lymphocytes T CD4+ et CD8+ dans le sang périphérique des patients tuberculeux par rapport aux témoins ont été décrits (Elkholy *et al.*, 2018; Hernandez *et al.*, 2010). Cependant, d'autres études ont montré que les pourcentages des lymphocytes T CD4+ étaient diminués tandis que les pourcentages des lymphocytes T CD8+ étaient inchangés par rapport aux témoins (Carvalho *et al.*, 2002; Deveci *et al.*, 2006). En revanche, des rapports font état de proportions réduites de lymphocytes T CD4 + tandis que les lymphocytes T CD8 + sont augmentés (Singhal *et al.*, 1989; Ye *et al.*, 2009). D'autres chercheurs ont observé une réduction des lymphocytes T CD4+ et CD8+ (Guglielmetti *et al.*, 2013; Jing *et al.*, 2012; Rodrigues *et al.*, 2002). De même, une décroissance des valeurs absolues des lymphocytes T CD3+, CD4+ et CD8+, mais pas des pourcentages de ces cellules, a été observée chez nos patients TB par rapport aux CS. Cette diminution peut refléter l'immunodéficience observée chez les patients tuberculeux, ce qui expliquerait d'ailleurs la perte de la réponse d'hypersensibilité retardée spécifique dans les cas sévères (Bhatnagar *et al.*, 1977), les modifications du profil de production de cytokines et la diminution de la capacité de prolifération des lymphocytes (Rojas *et al.*, 1999). Cette décroissance a été aussi observée dans le groupe

EXPO par rapport aux CS, ce qui suggère que l'infection par *Mtb* en elle-même peut exercer un impact significatif sur la réponse immunitaire, entraînant des changements dans le nombre de lymphocytes T périphériques. Ce phénomène peut être le résultat d'une migration des lymphocytes T vers les sites d'infection (Brighenti & Andersson, 2012). En fait, des nombre plus élevé de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ a été décrit dans le BAL (Gerosa *et al.*, 1999), les ganglions lymphatiques (Sahmoudi *et al.*, 2018) et le liquide pleural (El Fenniri *et al.*, 2011a; Li *et al.*, 2012) des patients tuberculeux par rapport au sang périphérique. L'augmentation du niveau d'apoptose ou l'altération de la fonction du thymus peuvent être aussi des explications à ce phénomène (Das *et al.*, 1999; Ozeki *et al.*, 1997). Certains chercheurs ont suggéré que ces altérations des lymphocytes T sont liées à la gravité de la TB (Hermida *et al.*, 2006; Morais-papini *et al.*, 2017). Jing *et al.* ont trouvé que les cas de TB extra-pulmonaire ont des pourcentages significativement plus faibles de lymphocytes T CD4⁺ que les patients atteints d'une TBP (Jing *et al.*, 2012). En plus, Davoudi *et al.* ont trouvé que les patients atteints d'une TB méningite / milliaire, formes très sévère de la TB, avaient les valeurs absolues les plus bas des lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺ en comparaison avec les autres formes de TB y compris pulmonaire et adénite (Davoudi *et al.*, 2008). Dans la présente étude aucune différence significative n'a été observée entre les différentes formes cliniques de la TB. Ensuite, nous avons examiné si la charge bacillaire dans les frottis d'expectoration de patients tuberculeux était corrélée avec les sous populations des lymphocytes T mais aucune association n'a été trouvée.

Pour explorer le phénotype de la déplétion des lymphocytes T, les sous-populations naïves et mémoires des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ ont été analysées. On a observé une diminution significative des pourcentages des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ mémoires exprimant le CD45 RO chez les patients TB. Ces résultats concorde avec d'autres études qui ont trouvé que les patients TBP avaient une fréquence réduite de cellules T CD4⁺ CD45RO⁺ CD27⁺ (centrale mémoire) et une fréquence accrue de cellules T CD4⁺ CD45RO⁻ CD27⁺ (précoce / naïf) en comparaison avec les CS et EXPO (Estévez *et al.*, 2020; Marín *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2010). Dans notre étude, les fréquences des lymphocytes CD4⁺CD45 RO⁺ ont été encore plus faibles chez les patients TBP et TBEP en comparaison avec les TBEG. Cela suggère une corrélation inverse entre les taux circulants de cellules T mémoires et la gravité de la maladie. En plus, cette diminution a été associée à une augmentation de la charge bacillaire. L'exposition continue aux antigènes *Mtb* pendant l'infection pourrait être la cause des niveaux circulants les plus faibles de

cellules T mémoires chez les patient TB. Cette exposition pourrait favoriser l'auto-renouvellement des cellules mémoires centrales, produisant ainsi des cellules effectrices qui pourraient migrer vers le site de l'infection (Lanzavecchia & Sallusto, 2005; Shin & Wherry, 2007).

Dans notre étude, nous avons également mesuré le degré d'activation immunitaire généralisé chez les sujets de l'étude en mesurant l'expression des marqueurs d'activation HLA DR et CD38 sur les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺. Nous avons constaté une augmentation des lymphocytes T CD4⁺ HLA DR⁺ CD38⁺, CD8⁺ HLA DR⁺ CD38⁺, CD4⁺ HLA DR⁻ CD38⁺, CD8⁺ HLA DR⁻ CD38⁺ chez les patients TB par rapport aux EXP et CS. Ces résultats sont en accord avec plusieurs études antérieures qui ont rapporté une activation accrue des lymphocytes T CD4 et CD8 dans la TB active et TBL (Barcelos *et al.*, 2006; Guglielmetti *et al.*, 2013; Hermida *et al.*, 2006; Rodrigues *et al.*, 2002; Wergeland *et al.*, 2011). Ceci dit, bien que les nombres absolus des lymphocytes T CD4 et CD8 aient été réduits, ils étaient à un niveau d'activité cellulaire plus élevé. Cependant ces études auraient traité soit uniquement les personnes atteintes de TBP, soit un mixte de formes cliniques de la TB comme une seule entité. L'originalité de notre étude est que nous avons caractérisé l'activation immunitaire dans trois formes distinctes de la TB qui représentent un spectre de sévérité de la maladie. Nous avons constaté que les lymphocytes T CD4 et, dans une moindre mesure, les lymphocytes T CD8 étaient plus activés chez le groupe TBEP en comparaison aux groupes TBP et TBEG. L'exposition à des charges très élevées de *Mtb* peut expliquer le niveau plus élevé d'activation chez les patient TBEP. Cependant nous n'avons observé aucune association des marqueurs d'activation avec la charge bacillaire.

Contrairement à ce qui est connu sur l'importance des lymphocytes T dans la défense de l'hôte contre le *Mtb*, il reste beaucoup à clarifier sur le rôle des lymphocytes B lors de la TB. Dans certaines études, une augmentation du pourcentage des lymphocytes B CD19⁺ circulants chez les patients atteints de TB a été trouvée (Jing *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012; Ye *et al.*, 2009). Cependant, d'autres études ont montré une diminution du nombre des lymphocytes B chez les patients atteints de TBP (Elkholy *et al.*, 2018; Hernandez *et al.*, 2010; Morais-papini *et al.*, 2017). Similairement à ces derniers nous avons trouvé une diminution des pourcentages et valeurs absolues des lymphocytes B CD19⁺ chez nos patients tuberculeux. Cette diminution peut être expliquée par une consommation des lymphocytes B dans le granulome plutôt que dans la circulation. On a aussi noté une plus profonde diminution chez les patients TBP que chez les

TBEG. Sur la même ligne, d'autres études suggèrent qu'une réduction des sous-populations de cellules B CD19⁺ CD5⁺ pourrait être liée à la gravité de la maladie (Guglielmetti et al., 2013; Morais-papini *et al.*, 2017). Cependant, après le traitement, ces cellules augmentent de manière significative (Barcelos *et al.*, 2006) avec une augmentation significative des niveaux d'anticorps de classe IgG après la guérison (Al Majid & Abba, 2008). La diminution des lymphocytes B peut altérer la protection du compartiment immunitaire humoral contre la TB.

Les cellules NK jouent un rôle important dans la lutte initiale contre certains pathogènes intracellulaires obligatoires dont le *Mtb* (Junqueira-kipnis *et al.*, 2003). Elles sont capables d'exercer leur effet avant que l'immunité médiée par les cellules T n'entre en jeu. Les cellules NK activées ont été trouvées dans la rate et le foie chez des patients atteints de TB (Ortaldo *et al.*, 2004). Certaines études suggèrent un pourcentage significativement plus faible de cellules NK chez les patients par rapport aux témoins (Jing *et al.*, 2012; Morais-papini *et al.*, 2017). Alors que d'autres chercheurs rapportent que les pourcentages de ces cellules sont augmentés chez les patients TB (Barcelos *et al.*, 2006; Deveci *et al.*, 2006). Dans notre série d'études une augmentation significative a été notée chez les patients TB par rapport aux EXPO et chez les patients TBP et TBEP par rapport aux patients TBEG. Les cellules NK peuvent donc être de bons marqueurs de différenciation entre la TB active et latente ainsi qu'un indice de la sévérité de la maladie. En réponse à une infection par *Mtb*, une expansion des cellules NK et de leurs activités dans le poumon a été rapportée, mais malgré l'activité accrue de ces cellules, la charge bactérienne dans les poumons des patients TB est restée inchangée (Pandey *et al.*, 2019). De même dans notre étude aucune association entre la charge bacillaire et les proportions des cellules NK n'a été trouvée.

Chez l'homme, les cellules NKT ont été décrites comme un autre sous-ensemble pertinent de lymphocytes T régulateurs, censés jouer des rôles innés (Godfrey *et al.*, 2000), antitumoraux (Vliet *et al.*, 2004) et régulateurs (Hammond & Å, 2003). Dans cette étude, aucune différence n'a été notée dans les pourcentages et les valeurs absolues des lymphocytes NKT entre les différents groupes étudiés. Dans d'autres études, un pourcentage élevé de cellules NKT a été détecté chez les patients TB (Ortaldo *et al.*, 2004; Pandey *et al.*, 2019). Cependant, après le traitement le pourcentage a été significativement réduit (Barcelos *et al.*, 2006), probablement en raison de l'absence de bacille après la guérison, ce qui favorise une diminution de l'activation et

l'expansion de ce phénotype cellulaire. Cependant, dans notre étude aucune association entre la charge bacillaire et les proportions des cellules NKT n'a été trouvée.

III.Activation immunitaire et lymphocytes T régulateurs dans les ganglions lymphatiques

L'issue de la réponse immunitaire au *Mtb* résulte de l'implication simultanée de mécanismes d'activation et de régulation (De Almeida *et al.*, 2012; Hougardy *et al.*, 2007). La nature de la relation entre les lymphocytes T conventionnels et les Treg au cours d'une TB active n'est toujours pas claire bien que cette interaction ait été étudiée dans différentes formes de TB (De Almeida *et al.*, 2012; Wergeland *et al.*, 2011). Une expression accrue des marqueurs d'activation sur les cellules T (Baecher-Allan *et al.*, 2001, 2005) et des taux plus élevés de Treg (Guyot-Revol *et al.*, 2006; Hougardy *et al.*, 2007) ont été décrits dans le sang périphérique de patients atteints de TB. Néanmoins, les réponses immunitaires locales peuvent différer de celles du sang périphérique et l'exploration de cette interaction sur le site de l'infection active peuvent donner des indices importants sur leur implication dans la protection ou la pathogenèse (Diedrich *et al.*, 2016; Nemeth *et al.*, 2012). La présente étude visait à évaluer les relations entre les Treg et les lymphocytes T CD4 + conventionnels dans les ganglions lymphatiques et le sang périphérique au cours de la TBEG.

Nous avons noté une proportion plus élevée de cellules T CD4+ dans LNMC par rapport aux PBMC. Ceci est en accord avec les études précédentes rapportant une augmentation de la proportion de lymphocytes T CD4 + dans le sang des patients tuberculeux par rapport aux témoins non infectés et un nombre beaucoup plus élevé de lymphocytes T CD4+ au site de l'infection (Nemeth *et al.*, 2012; T. Wang *et al.*, 2011). Sauf pour une élévation modeste des cellules effectrices dans LNMC, aucune différence n'a été remarquée dans la fréquence relative des sous-ensembles de cellules T CD4+ mémoire entre PBMC et LNMC. D'autres ont montré que les cellules T CD4+ spécifiques de *Mtb* dans les fluides bronchoalvéolaires et pleuraux sont principalement du phénotype mémoire (Chiacchio *et al.*, 2011; El Fenniri *et al.*, 2011). Dans les LNMC, nous constatons que jusqu'à 40 % des cellules T CD4+ étaient naïves.

Les cellules T Th1 et Th17 spécifiques au *Mtb* contribuent à la défense contre une infection progressive à *Mtb*. En particulier, la TBEG était caractérisée par des fréquences élevées de

cellules Th1 et Th17 dans le sang périphérique (Kumar *et al.*, 2013). Lorsque nous avons mesuré la production intracellulaire de cytokines Th1 (IFN γ , IL2 et TNF α), IL17 et MIP-1 α , nous avons été surpris de ne pas trouver d'augmentation des fréquences des cellules spécifiques à *Mtb* produisant des cytokines dans LNMC par rapport au PBMC. Les LNMC ont été générées à partir d'un grand bloc de tissu ganglionnaire excisé qui comprenait des zones granulomateuses et non granulomateuses qui pourraient avoir affecter notre capacité à détecter des fréquences plus élevées de cellules spécifiques de *Mtb* dans LNMC que PBMC.

Les lymphocytes T polyfonctionnels sont corrélés à la protection dans certaines (Day *et al.*, 2011; Harari *et al.*, 2011; Marín *et al.*, 2013) et à l'activité de la maladie dans d'autres (Caccamo *et al.*, 2010; Sutherland *et al.*, 2009). Dans notre cas, aucune différence n'a été observée dans la proportion et les qualités polyfonctionnelles des cellules T CD4 $^{+}$ spécifiques à *Mtb* entre LNMC et PBMC. La comparaison de la polyfonctionnalité dans les cellules T CD4 $^{+}$ répondant à l'antigène *Mtb* a montré une différence significative avec SEB provoquant une réponse plus dominée par le TNF α . Cela confirme que les réponses spécifiques de *Mtb* étaient différentes de celles du pool de cellules T CD4 $^{+}$ mémoires totaux.

Pour analyser l'interaction entre les cellules T CD4 $^{+}$ activées conventionnelles et les Treg dans le ganglion lymphatique pendant la TB active, nous avons mesuré la fréquence des cellules T CD4 $^{+}$ exprimant CD38 et HLA-DR. Ces marqueurs d'activation immunitaire ont été décrits comme substantiellement élevés chez les sujets atteints de TB active (Adekambi *et al.*, 2015). Les cellules T CD4 $^{+}$ étaient plus activées dans les ganglions lymphatiques que dans le sang. La proportion accrue de cellules T activées dans la LNMC reflète probablement une plus grande exposition aux antigènes *Mtb*. L'accumulation sélective est probablement le résultat à la fois du recrutement actif et de l'expansion locale des cellules T au site de réplication du *Mtb* (J. Nemeth *et al.*, 2009; Wilkinson *et al.*, 2005).

Les Treg ont été identifiés en sélectionnant des cellules CD4 $^{+}$ avec une haute expression du CD25, une expression de faible niveau de CD127 et une expression de FoxP3. Les Tregs ont également augmenté dans LNMC en réponse à une activation immunitaire locale, certainement pour contrôler les dommages induits par le système immunitaire (Hertoghe *et al.*, 2000; Nemeth *et al.*, 2009; Ribeiro-Rodrigues *et al.*, 2006). Conformément à une étude précédente (Wergeland *et al.*, 2011), nos données révèlent une corrélation positive entre les cellules Treg et CD4 $^{+}$

activées au sein des PBMC mais cette corrélation était plus forte pour les LNMC. Les Treg co-exprimant les marqueurs HLA-DR et CD38 étaient fréquents dans le LNMC et les PBMC. On pense que les Treg exprimant le CMH II *ex-vivo* sont un sous-ensemble distinct des Treg fonctionnellement matures impliqués dans la suppression *in-vitro* dépendante du contact (Baecher-Allan *et al.*, 2006). Une corrélation positive entre la proportion de Treg et la fréquence des cellules T CD4 + mémoires spécifiques à Mtb exprimant chaque fonction Th1 mesurée individuellement a été observée dans LNMC mais pas dans les PBMC. La prédominance des Treg activés dans les LNMC et la corrélation des Treg avec les cellules T CD4+ activées et les cellules T CD4+ exprimant les cytokines Th1 suggèrent une activité régulatrice spécifique et renforcée dans le ganglion lymphatique. Une autre hypothèse suggère que les Treg se développent simplement sur des sites tissulaires, mais pas nécessairement à des fins d'immunorégulation. L'absence d'une proportion plus élevée attendue des cellules T CD4+ produisant les cytokines Th1 dans LNMC par rapport aux PBMC soutient l'hypothèse que la corrélation Treg / CD4 refléterait une rétroaction négative contre la production excessive de cytokines Th1 en augmentant les Treg suppressifs. Des données récentes suggèrent que l'IFN γ augmente la fonction suppressive de Treg pour le contrôle des réponses Th1 (Baecher-Allan *et al.*, 2006; Hall *et al.*, 2012).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'avènement de la biologie moléculaire et de l'immunologie moderne a permis des progrès remarquables dans notre compréhension de la réponse immunitaire. Cependant, les mécanismes immunitaires exacts qui régissent l'immunité protectrice contre le *Mtb* chez l'homme restent inconnus. La poursuite des efforts de recherche concertée et l'application des technologies modernes sont susceptibles d'améliorer notre compréhension de l'immunopathogenèse de la TB. Plus nous en apprenons sur la pathogenèse de la maladie, plus vite nous pouvons progresser vers le succès dans la bataille contre ce pathogène. Cette étude s'inscrit dans la perspective de souligner l'importance de l'immunité cellulaire, spécialement au niveau du site d'infection au cours de la TB active.

Au terme de cette thèse, nous avons, tout d'abord, établi les valeurs de référence pour les sous populations lymphocytaires dans la population adulte marocaine. De plus, nous avons analysé l'influence du sexe, de l'âge, l'origine ethnique et des facteurs environnementaux sur les sous populations lymphocytaires. Le pourcentage et le nombre absolu des sous populations lymphocytaires ont été déterminés par cytométrie en flux à 4 couleurs dans une étude de population de 145 adultes marocains volontaires sains. L'analyse a montré des changements significatifs en fonction de l'âge. L'âge était associé à une diminution des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ naïfs et à une augmentation des lymphocytes T CD4⁺ ou CD8⁺ mémoires. Les lymphocytes T CD4⁺ CD38⁺ et CD8⁺ CD38⁺ activés, les Treg ainsi que les cellules NK ont montré des altérations dépendantes de l'âge. En revanche, les cellules B sont restées inchangées. Un pourcentage plus élevé de lymphocytes T CD3⁺ et CD4⁺ a été observé chez les femmes tandis que le nombre de cellules CD8⁺, B et NK était plus élevé chez les hommes. L'ethnicité, les niveaux d'instruction et le revenu personnel ne semblent pas influencer les valeurs de référence des sous populations lymphocytaires. Ces résultats peuvent être appliqués à tous les pays d'Afrique du Nord compte tenu de leurs similitudes géographiques, ethniques, économiques et culturelles. Nos résultats soulignent l'importance de prendre en compte ces facteurs lors de la prise de décisions médicales cliniques.

Nous avons ensuite étudié les variations dans les concentrations et les proportions respectives des différentes sous populations lymphocytaires dans le sang périphérique au cours de la TB active chez 183 patient TB. Nous avons comparé ces paramètres avec des CS, EXPO et entre les différentes manifestations de la TB. En plus, nous avons exploré l'association de ces paramètres avec la charge bacillaire dans les frottis d'expectoration. Nous avons démontré qu'il y avait des changements dans la distribution des lymphocytes chez les adultes souffrant de TB par rapport aux témoins. On a noté une diminution significative des valeurs absolues des lymphocytes T CD3+, des lymphocytes T CD4 + ainsi que des lymphocytes T CD8+ chez les patients TB par rapport aux CS. L'analyse des données a démontré qu'il y avait une diminution significative des pourcentages et des valeurs absolues des lymphocytes B CD19 + chez les patients TB et EXPO par rapport au CS et une augmentation des pourcentages des lymphocytes NK chez les patients TB par rapport aux EXPO. Les patients TB avaient les pourcentages les plus élevés en lymphocytes T CD4+ naïfs. Par contre les lymphocytes T CD4+ mémoires et T CD8+ mémoires étaient plus élevés chez les EXPO. En comparaison aux groupes des CS et EXPO, les pourcentages des lymphocytes CD4+ CD38+ HLA-DR+, CD4+ CD38+, CD8+ CD38+ HLA-DR+ et CD8+ CD38+ étaient plus élevée chez les patients TB. Ces changements sont plus évidents chez les patients atteints de formes plus sévères de la TB. En effet, Les pourcentages de lymphocytes B chez les patients TBEG étaient moins élevés que chez les patients TBP. De plus, les pourcentages des lymphocytes NK étaient plus élevés chez les patients TBP et TBEP que chez les patients TBEG. Les pourcentages des lymphocytes CD4+CD45RO+ étaient significativement plus élevés chez les patients TBEG en comparaison aux patients TBP et TBEP. Une augmentation significative des pourcentages des lymphocytes CD4+ CD38+ HLA-DR+, CD4+ CD38+, CD8+ CD38+ chez les patients TBEP en comparaison aux patients TBP et TBEG a été aussi notée. La charge bacillaire n'a montré aucune différence significative pour toutes les sous populations lymphocytaires et les statuts d'activation. Par contre, Le pourcentage des lymphocytes T CD4+CD45RO+ diminuait à mesure que la charge bacillaire augmentait chez les patients tuberculeux. Une différence significative a été notée entre les patients ayant un score 1+ et 3+. Une évaluation des mécanismes conduisant à ces changements est nécessaire afin de comprendre la pathogenèse de la maladie. De plus, tous ces paramètres étudiés semblent avoir le potentiel d'être de bons indicateurs pronostiques, non invasifs pour les patients atteints de TB.

Enfin, cette étude rapporte des résultats originaux importants concernant les réponses immunitaires locales dans la TB ganglionnaire active. Nous n'avons trouvé aucune différence de production de Th1, Th17 ou MIP-1 α par les lymphocytes T CD4 + spécifiques de *Mtb* dans la LNMIC par rapport aux PBMC. Les Treg étaient positivement corrélés avec les cellules T CD4+ spécifiques de *Mtb* exprimant les cytokines Th1 dans LNMIC mais pas dans les PBMC. Les Treg HLA-DR+ CD38+ activés étaient plus abondants, suggérant une modulation par les Treg des réponses immunitaires dans la LNMIC. Nous suggérons que l'augmentation des Treg au site ganglionnaire de l'infection active à *Mtb* régule la réponse immunitaire. Reste à déterminer si cela est avantageux ou non pour l'hôte.

Bien que présentant certaines limites, cette thèse a le mérite d'ouvrir de nombreux champs d'investigation futurs. Tout d'abord, le groupe TB dans notre étude comporte seulement les patients TBP, TBEP et TBEG. Ils seraient préférables d'ajouter d'autres formes de la TB comme la TB méningites qui constitue la forme la plus sévère de la TB. Deuxièmement, la non-disponibilité d'échantillons des mêmes sujets de l'étude effectuée, avant et à la fin du processus pathologique ne nous a pas permis de déterminer si les changements des sous populations lymphocytaires étaient une cause ou un effet de l'infection TB. Au cours de cette thèse, l'étude de la réponse immunitaire au niveau du site d'infection chez les patients TBEG n'a pas été comparée à la réponse immunitaire au cours d'autres adénopathies comme l'adénopathie cancéreuse ; une telle étude permettra de définir la spécificité de la réponse anti TB. Enfin, on a pu déterminer la proportion *ex vivo* des Treg au niveau des LNMIC. Une autre étude sur les Treg spécifiques au *Mtb* ainsi que leur fonction au niveau du site d'infection est nécessaire. Celle ci permettra de déterminer leur rôle précis dans la pathogenèse de la TB.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Achkar, J. M., Chan, J., Casadevall, A., & States, U. (2015). B cells and Antibodies in the Defense against Mycobacterium tuberculosis infection. *Immunological Reviews*, 264(1), 167–181. <https://doi.org/10.1111/imr.12276>
- Adekambi, T., Ibegbu, C. C., Cagle, S., Kalokhe, A. S., Wang, Y. F., Hu, Y., Day, C. L., Ray, S. M., & Rengarajan, J. (2015). Biomarkers on patient T cells diagnose active tuberculosis and monitor treatment response. *Journal of Clinical Investigation*, 125(5), 1827–1838. <https://doi.org/10.1172/JCI84059>
- Adekambi, T., Ibegbu, C. C., Kalokhe, A. S., Yu, T., Ray, S. M., & Rengarajan, J. (2012). *Distinct Effector Memory CD4 + T Cell Signatures in Latent Mycobacterium tuberculosis Infection , BCG Vaccination and Clinically Resolved Tuberculosis*. 7(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036046>
- Aderem, A., & Underhill, D. M. (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual Review of Immunology*, 17, 593–623. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.17.1.593>
- Adnaoui, M., Benfenatki, N., & Hamzaoui, A. (2009). Épidémiologie de la tuberculose dans les pays du Maghreb. *Revue de Medecine Interne*, 30(SUPPL. 4), 265–267. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2009.09.004>
- Agrawal, S., Parkash, O., Palaniappan, A. N., Bhatia, A. K., Kumar, S., Chauhan, D. S., & Madhan Kumar, M. (2018a). Efficacy of T regulatory cells, Th17 cells and the associated markers in monitoring tuberculosis treatment response. *Frontiers in Immunology*, 9(FEB), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00157>
- Agrawal, S., Parkash, O., Palaniappan, A. N., Bhatia, A. K., Kumar, S., Chauhan, D. S., & Madhan Kumar, M. (2018b). The role of T regulatory cell-associated markers in monitoring tuberculosis treatment completion and failure. *Immunologic Research*, 66(5), 620–631. <https://doi.org/10.1007/s12026-018-9022-7>
- Ahmed, A., Rakshit, S., Adiga, V., Dias, M., Dwarkanath, P., D'Souza, G., & Vyakarnam, A. (2021). A century of BCG: Impact on tuberculosis control and beyond. *Immunological Reviews*, 301(1), 98–121. <https://doi.org/10.1111/imr.12968>
- Al-Jabri, A. A., Al-Shukaili, A. K., Al-Rashdi, Z. T., & Ganguly, S. S. (2008). Reference ranges for lymphocyte subsets in healthy adult male Omanis. *Saudi Medical Journal*, 29(3), 409–412.
- Al Majid, F., & Abba, A. (2008). Immunophenotypic characterisation of peripheral T lymphocytes in pulmonary tuberculosis. *J Postgrad Med*, 54(1), 7–11.
- Algood, H. M. S., Chan, J., & Flynn, J. A. L. (2003). Chemokines and tuberculosis. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 14(6), 467–477. [https://doi.org/10.1016/S1359-6101\(03\)00054-6](https://doi.org/10.1016/S1359-6101(03)00054-6)
- Andersen, P., Munk, M. E., Pollock, J. M., & Doherty, T. M. (2000). *Specific immune-based diagnosis of tuberculosis*. 356, 1099–1104.
- Andersson, J., Samarina, A., Fink, J., Rahman, S., & Grundström, S. (2007). Impaired expression of perforin and granulysin in CD8+ T cells at the site of infection in human chronic pulmonary tuberculosis. *Infection and Immunity*, 75(11), 5210–5222. <https://doi.org/10.1128/IAI.00624-07>

- Ankrah, A. O., Glaudemans, A. W. J. M., Maes, A., Wiele, C. Van de, Dierckx, R. A. J. O., Vorster, M., & Sathekge, M. M. (2017). Tuberculosis. *Seminars in Nucl Ear Medecine*, 48, 108–130.
- Appelberg, R. (2007). Neutrophils and intracellular pathogens: beyond phagocytosis and killing. *Trends in Microbiology*, 15(2), 87–92. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.11.009>
- Arend, S. M., Thijsen, S. F. T., Leyten, E. M. S., Bouwman, J. J. M., Franken, W. P. J., Koster, B. F. P. J., Cobelens, F. G. J., Van Houte, A. J., & Bossink, A. W. J. (2007). Comparison of two interferon- γ assays and tuberculin skin test for tracing tuberculosis contacts. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 175(6), 618–627. <https://doi.org/10.1164/rccm.200608-1099OC>
- Arlehamn, C. S. L., Gerasimova, A., Mele, F., Henderson, R., Swann, J., Greenbaum, J. A., Kim, Y., Sidney, J., James, E. A., Taplitz, R., Mckinney, D. M., Kwok, W. W., Grey, H., Sallusto, F., Peters, B., & Sette, A. (2013). *Memory T Cells in Latent Mycobacterium tuberculosis Infection Are Directed against Three Antigenic Islands and Largely Contained in a CXCR3 + CCR6 + Th1 Subset*. 9(1). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003130>
- Armstrong, B. Y. J. A., & Hart, A. P. D. A. (1971). RESPONSE OF CULTURED MACROPHAGES TO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS , W I T H OBSERVATIONS ON FUSION OF LYSOSOMES W I T H PHAGOSOMES (Received for publication 27 April 1971) Downloaded from jem . rupress . org on September 24 , 2015 When large foreign bodi. *The Journal of Experimental Medicine*, 134(3), 713–740.
- Arram, E. O., Hassan, R., & Saleh, M. (2014). Increased frequency of CD4+CD25+FoxP3+ circulating regulatory T cells (Treg) in tuberculous patients. *Egyptian Journal of Chest Diseases and Tuberculosis*, 63(1), 167–172. <https://doi.org/10.1016/j.ejcdt.2013.10.013>
- Aspinall, R., Giudice, G. Del, Effros, R. B., Grubeck-, B., & Sambhara, S. (2007). Immunity & Ageing Challenges for vaccination in the elderly. *Immunity and Ageing*, 4(9), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1742-4933-4-9>
- Baecher-Allan, C., Brown, J. A., Freeman, G. J., & Hafler, D. A. (2001). CD4 + CD25 high Regulatory Cells in Human Peripheral Blood . *The Journal of Immunology*, 167(3), 1245–1253. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.3.1245>
- Baecher-Allan, C., Wolf, E., & Hafler, D. A. (2005). Functional analysis of highly defined, FACS-isolated populations of human regulatory CD4+CD25+ T cells. *Clinical Immunology*, 115(1 SPEC. ISS.), 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2005.02.018>
- Baecher-Allan, C., Wolf, E., & Hafler, D. A. (2006). MHC Class II Expression Identifies Functionally Distinct Human Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology*, 176(8), 4622–4631. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.8.4622>
- Baena, A., & Porcelli, S. A. (2009). Evasion and subversion of antigen presentation by Mycobacterium tuberculosis: REVIEW ARTICLE. *Tissue Antigens*, 74(3), 189–204. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2009.01301.x>
- Barberis, I., Bragazzi, N. L., Galluzzo, L., & Martini, M. (2017). The history of tuberculosis: From the first historical records to the isolation of Koch's bacillus. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*, 58(1), E9–E12. <https://doi.org/10.15167/2421-4248/jpmh2017.58.1.728>
- Barcelos, W., Martins-filho, O. A., Mara, T., Dabés, P., Hamilton, M., Oliveira, P., Spíndola-de-miranda, S., Carvalho, B. N., Paulo, V. De, & Peixoto, C. (2006). Peripheral Blood Mononuclear Cells

- Immunophenotyping in Pulmonary Tuberculosis Patients before and after Treatment. *Microbiol Immunol*, 50(8), 597–605.
- Barnes, P. F., Lu, S., Abrams, J. S., Wang, E., Yamamura, M., & Modlin, R. L. (1993). Cytokine production at the site of disease in human tuberculosis. *Infection and Immunity*, 61(8), 3482–3489. <https://doi.org/10.1128/iai.61.8.3482-3489.1993>
- Behar, B. S. M., Dascher, C. C., Grusby, M. J., Wang, C., & Brenner, M. B. (1999). *Susceptibility of Mice Deficient in CD1D or TAP1 to Infection with Mycobacterium tuberculosis*. 189, 1973–1980.
- Behr, M. A., Wilson, M. A., Gill, W. P., Salamon, H., Schoolnik, G. K., Rane, S., & Small, P. M. (1998). Comparative Genomics of BCG Vaccines by Whole-Genome DNA Microarray. *Science, New Series*, 284(5419), 1520–1523.
- Ben-smith, A., Gorak-stolinska, P., Floyd, S., Weir, R. E., Lalor, M. K., Mvula, H., Crampin, A. C., Wallace, D., Beverley, P. C. L., Fine, P. E. M., & Dockrell, H. M. (2008). Differences between naive and memory T cell phenotype in Malawian and UK adolescents: a role for Cytomegalovirus? *BMC Infectious Diseases*, 8, 139. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-8-139>
- Benard, A., Sakwa, I., Schierloh, P., Colom, A., Mercier, I., Tailleur, L., Jouneau, L., Boudinot, P., Al-Saati, T., Lang, R., Rehwinkel, J., Loxton, A. G., Kaufmann, S. H. E., Anton-Leberre, V., eronique, O'Garra, A., Sasiain, M. D. C., Gicquel, B., Fillatreau, S., Neyrolles, O., & Hudrisier, D. (2018). B Cells Producing Type I IFN Modulate Macrophage Polarization in Tuberculosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 197(6), 801–813. <https://doi.org/10.1164/rccm.201707-1475OC>
- Berrington, W. R., & Hawn, T. R. (2007). Mycobacterium tuberculosis, macrophages, and the innate immune response: Does common variation matter? *Immunological Reviews*, 219(1), 167–186. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2007.00545.x>
- Bhatnagar, R., Malaviya, A. N., Narayanan, S., Rajgopalan, P., Kumar, R., & Bharadwaj, O. P. (1977). Spectrum of immune response abnormalities in different clinical forms of tuberculosis. *American Review of Respiratory Disease*, 115(2), 207–212. <https://doi.org/10.1164/arrd.1977.115.2.207>
- Bhatt, K., Hickman, S. P., & Salgame, P. (2004). Cutting Edge: A New Approach to Modeling Early Lung Immunity in Murine Tuberculosis. *The Journal of Immunology*, 172(5), 2748–2751. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.5.2748>
- Blackwell, J. M. (1996). Structure and of the atura o resistance o associated macrophage protein (N r a m p I) , a candidate protei for infectiot s and autoin rnur e disease susceptibility. *Mol. Med. Today*, 2, 205–211.
- Blumberg, L. (1996). Tuberculosis and HIV infection in southern Africa. *The National Medical Journal of India*, 9(4), 189–190.
- Bodnar, K. A., Serbina, N. V., & Flynn, J. L. (2001). Fate of Mycobacterium tuberculosis within murine dendritic cells. *Infection and Immunity*, 69(2), 800–809. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.2.800-809.2001>
- Boom, W. H., Canaday, D. H., Fulton, S. A., Gehring, A. J., Rojas, R. E., & Torres, M. (2003). Human immunity to M . tuberculosis: T cell subsets and antigen processing. *Tuberculosis*, 83, 98–106. [https://doi.org/10.1016/S1472-9792\(02\)00054-9](https://doi.org/10.1016/S1472-9792(02)00054-9)

- Bosio, C. M., Gardner, D., & Elkins, K. L. (2000). Infection of B Cell-Deficient Mice with CDC 1551, a Clinical Isolate of Mycobacterium tuberculosis : Delay in Dissemination and Development of Lung Pathology. *The Journal of Immunology*, 164, 6471–6425. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.12.6417>
- Bosire, E. M., Nyamache, A. K., Gicheru, M. M., Khamadi, S. A., Lihana, R. W., & Okoth, V. (2013). Population specific reference ranges of CD3, CD4 and CD8 lymphocyte subsets among healthy Kenyans. *AIDS Research and Therapy*, 10(1), 4–10. <https://doi.org/10.1186/1742-6405-10-24>
- Bouchikh, S., Stirnemann, J., Prendki, V., Porcher, R., Kesthmand, H., Morin, A. S., Cruaud, P., Rouaghe, S., Farge, D., & Fain, O. (2012). Durée de traitement des tuberculoses extrapulmonaires : Six mois ou plus ? Analyse de la base de données TB-INFO. *Revue de Medecine Interne*, 33(12), 665–671. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2012.05.008>
- Brennan, P. J., & Nikaido, H. (1995). The envelope of mycobacteria. *Annual Review of Biochemistry*, 64, 29–63. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.64.070195.000333>
- Brewer, T. F. (2000). Preventing tuberculosis with bacillus Calmette-Guérin vaccine: A meta-analysis of the literature. *Clinical Infectious Diseases*, 31(SUPPL. 3), 64–67. <https://doi.org/10.1086/314072>
- Brighenti, S., & Andersson, J. (2012). Local immune responses in human tuberculosis: Learning from the site of infection. *Journal of Infectious Diseases*, 205(SUPPL. 2). <https://doi.org/10.1093/infdis/jis043>
- Brodin, P., Rosenkrands, I., Andersen, P., Cole, S. T., & Brosch, R. (2004). ESAT-6 proteins: Protective antigens and virulence factors? *Trends in Microbiology*, 12(11), 500–508. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.09.007>
- Burl, S., Hill, P. C., Jeffries, D. J., Holland, M. J., Fox, A., Lugos, M. D., Adegbola, R. A., Rook, G. A., Zumla, A., McAdam, K. P. W. J., & Brookes, R. H. (2007). FOXP3 gene expression in a tuberculosis case contact study. *Clinical and Experimental Immunology*, 149(1), 117–122. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2007.03399.x>
- Caccamo, N., Guggino, G., Joosten, S. A., Gelsomino, G., Di Carlo, P., Titone, L., Galati, D., Bocchino, M., Matarese, A., Salerno, A., Sanduzzi, A., Franken, W. P. J., Ottenhoff, T. H. M., & Dieli, F. (2010). Multifunctional CD4+ T cells correlate with active Mycobacterium tuberculosis infection. *European Journal of Immunology*, 40(8), 2211–2220. <https://doi.org/10.1002/eji.201040455>
- Campbell, E. A., Korzheva, N., Mustaev, A., Murakami, K., Nair, S., Goldfarb, A., & Darst, S. A. (2001). Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *Cell*, 104(6), 901–912. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00286-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00286-0)
- Cantwell, M. F., & Binkin, N. J. (1996). Tuberculosis in sub-Saharan Africa: A regional assessment of the impact of the human immunodeficiency virus and National Tuberculosis Control Program quality. *Tubercle and Lung Disease*, 77(3), 220–225. [https://doi.org/10.1016/S0962-8479\(96\)90004-0](https://doi.org/10.1016/S0962-8479(96)90004-0)
- Cardona, P., & Cardona, P. J. (2019). Regulatory T Cells in Mycobacterium tuberculosis Infection. *Frontiers in Immunology*, 10(September), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02139>
- Caruso, A. M., Serbina, N., Klein, E., Triebold, K., Bloom, B. R., & Flynn, J. L. (1999). Mice deficient in CD4 T cells have only transiently diminished levels of IFN-gamma, yet succumb to tuberculosis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 162(9), 5407–5416. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10228018>

- Carvalho, A. C. C., Matteelli, A., Airò, P., Tedoldi, S., Casalini, C., Imberti, L., Cadeo, G. P., Beltrame, A., & Carosi, G. (2002). $\gamma\delta$ T lymphocytes in the peripheral blood of patients with tuberculosis with and without HIV co-infection. *Thorax*, 57, 357–360.
- Chan, J., Xing, Y., Magliozzo, R. S., & Bloom, B. R. (1992). Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J Exp Med*, 175(1111–1122). <https://doi.org/10.25557/2310-0435.2019.04.43-49>
- Chee, C. B. E., Gan, S. H., KhinMar, K. W., Barkham, T. M., Koh, C. K., Liang, S., & Wang, Y. T. (2008). Comparison of sensitivities of two commercial gamma interferon release assays for pulmonary tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(6), 1935–1940. <https://doi.org/10.1128/JCM.02403-07>
- Chen, C. Y., Huang, D., Wang, R. C., Shen, L., Zeng, G., Yao, S., Shen, Y., Halliday, L., Fortman, J., McAllister, M., Estep, J., Hunt, R., Vasconcelos, D., Du, G., Porcelli, S. A., Larsen, M. H., Jacobs, W. R., Haynes, B. F., Letvin, N. L., & Chen, Z. W. (2009). A critical role for CD8 T cells in a nonhuman primate model of tuberculosis. *PLoS Pathogens*, 5(4). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000392>
- Chen, M., Gan, H., & Remold, H. G. (2006). A Mechanism of Virulence: Virulent *Mycobacterium tuberculosis* Strain H37Rv, but Not Attenuated H37Ra, Causes Significant Mitochondrial Inner Membrane Disruption in Macrophages Leading to Necrosis . *The Journal of Immunology*, 176(6), 3707–3716. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.6.3707>
- Chen, X., Zhang, M., Liao, M., Graner, M. W., Wu, C., Yang, Q., Liu, H., & Zhou, B. (2010). Reduced Th17 response in patients with tuberculosis correlates with IL-6R expression on CD4+ T cells. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 181(7), 734–742. <https://doi.org/10.1164/rccm.200909-1463OC>
- Chen, X., Zhou, B., Li, M., Deng, Q., Wu, X., Le, X., Wu, C., Larmonier, N., Zhang, W., Zhang, H., Wang, H., & Katsanis, E. (2007). CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells suppress *Mycobacterium tuberculosis* immunity in patients with active disease. *Clinical Immunology*, 123(1), 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2006.11.009>
- Cheng, C. K. W., Chan, J., Cembrowski, G. S., & van Assendelft, O. W. (2004). Complete blood count reference interval diagrams derived from NHANES III: Stratification by age, sex, and race. *Laboratory Hematology*, 10(1), 42–53. <https://doi.org/10.1532/LH96.04010>
- Cheng, P., Wang, L., & Gong, W. (2022). Review Article Cellular Immunity of Patients with Tuberculosis Combined with Diabetes. *Journal of Immunology Research*, 2022, 12.
- Chiacchio, T., Casetti, R., Butera, O., Vanini, V., Carrara, S., Girardi, E., Di Mitri, D., Battistini, L., Martini, F., Borsellino, G., & Goletti, D. (2009). Characterization of regulatory T cells identified as CD4 +CD25 highCD39 + in patients with active tuberculosis. *Clinical and Experimental Immunology*, 156(3), 463–470. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2009.03908.x>
- Chiacchio, Teresa, Petruccioli, E., Vanini, V., Butera, O., Cuzzi, G., Petrone, L., Matteucci, G., Lauria, F. N., Franken, K. L. M. C., Girardi, E., Ottenhoff, T. H. M., & Goletti, D. (2011). Higher frequency of T-cell response to *M. tuberculosis* latency antigen RV2628 at the site of active tuberculosis disease than in peripheral blood. *PLoS ONE*, 6(11), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027539>
- Chng, W. J., Tan, G. B., & Kuperan, P. (2004). Establishment of Adult Peripheral Blood Lymphocyte Subset

Reference Range for an Asian Population by Single-Platform Flow Cytometry : Influence of Age , Sex , and Race and Comparison with Other Published Studies. *CLINICAL AND DIAGNOSTIC LABORATORY IMMUNOLOGY*, 11(1), 168–173. <https://doi.org/10.1128/CDLI.11.1.168>

- Choong, M. L., Ton, S. H., & Cheong, S. K. (1995). Influence of race, age and sex on the lymphocyte subsets in peripheral blood of healthy Malaysian adults. *Annals of Clinical Biochemistry*, 32(6), 532–539. <https://doi.org/10.1177/000456329503200603>
- Churchyard, G., Kim, P., Shah, N. S., Rustomjee, R., Gandhi, N., Mathema, B., Dowdy, D., Kasmar, A., & Cardenas, V. (2017). What We Know about Tuberculosis Transmission: An Overview. *Journal of Infectious Diseases*, 216(January), S629–S635. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix362>
- Collison, L. W., Workman, C. J., Kuo, T. T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K. M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R. S., & Vignali, D. A. A. (2007). The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*, 450(7169), 566–569. <https://doi.org/10.1038/nature06306>
- Colombo, M. I., Gutierrez, M. G., & Romano, P. S. (2006). The two faces of autophagy: Coxiella and Mycobacterium. *Autophagy*, 2(3), 162–164. <https://doi.org/10.4161/auto.2827>
- Comstock, G. W., Livesay, V. T., & Woolpert, S. F. (1974). The prognosis of a positive tuberculin reaction in childhood and adolescence. *American Journal of Epidemiology*, 99(2), 131–138. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a121593>
- Cooper, A. M., Segal, B. H., Frank, A. A., Holland, S. M., & Orme, I. M. (2000). Transient loss of resistance to pulmonary tuberculosis in p47(phox-/-) mice. *Infection and Immunity*, 68(3), 1231–1234. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.3.1231-1234.2000>
- Cox, H., Kebede, Y., Allamuratova, S., Ismailov, G., Davletmuratova, Z., Byrnes, G., Blok, L., Doshetov, D., Stone, C., Niemann, S., & Ru, S. (2006). *Tuberculosis Recurrence and Mortality after Successful Treatment : Impact of Drug Resistance*. 3(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030384>
- Crevel, R. Van, Ottenhoff, T. H. M., & Meer, J. W. M. Van Der. (2002). *Innate Immunity to Mycobacterium tuberculosis*. 15(2), 294–309. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.294>
- Cruciani, M., Scarparo, C., Malena, M., Bosco, O., Serpelloni, G., & Mengoli, C. (2004). Meta-Analysis of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460 TB, with or without Solid Media, for Detection of Mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(5), 2321–2325. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.5.2321-2325.2004>
- Cruz, A., Fraga, A. G., Fountain, J. J., Rangel-moreno, J., Torrado, E., Saraiva, M., Pereira, D. R., Randall, T. D., Pedrosa, J., Cooper, A. M., & Castro, A. G. (2010). *Pathological role of interleukin 17 in mice subjected to repeated BCG vaccination after infection with Mycobacterium tuberculosis*. 207(8), 1609–1616. <https://doi.org/10.1084/jem.20100265>
- Cruz, A., Khader, S. A., Torrado, E., Fraga, A., Pearl, J. E., Pedrosa, J., Andrea, M., & Castro, A. G. (2014). Cutting Edge: IFN- γ Regulates the Induction and Expansion of IL-17-Producing CD4 T Cells during Mycobacterial Infection. *Journal of Immunology*, 177, 1416–1420. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.3.1416>
- Curtis, M. M., & Way, S. (2009). Interleukin- 17 in host defence against bacterial , mycobacterial and fungal pathogens. *Immunology*, 126, 177–185. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.03017.x>
- Daffé, M. (1996). Structure de l'enveloppe de Mycobacterium tuberculosis. *Medecine et Maladies*

Infectieuses, 26(11), 891–897. [https://doi.org/10.1016/S0399-077X\(96\)80193-4](https://doi.org/10.1016/S0399-077X(96)80193-4)

- Daffé, Mamadou, & Draper, P. (1997). The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. In *Advances in Microbial Physiology* (Vol. 39). [https://doi.org/10.1016/s0065-2911\(08\)60016-8](https://doi.org/10.1016/s0065-2911(08)60016-8)
- Dallenga, T., & Schaible, U. E. (2016). Neutrophils in tuberculosis--first line of defence or booster of disease and targets for host-directed therapy? *Pathogens and Disease*, 74(3), 1–8. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw012>
- Daniel, T. M. (2006). The history of tuberculosis. *Respiratory Medicine*, 100(11), 1862–1870. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2006.08.006>
- Daniel, V. S., & Daniel, T. M. (1999). Old testament biblical references to tuberculosis. *Clinical Infectious Diseases*, 29(6), 1557–1558. <https://doi.org/10.1086/313562>
- Das, G., Vohra, H., Saha, B., Agrewala, J. N., & Mishra, G. C. (1999). Apoptosis of Th1-like cells in experimental tuberculosis (TB). *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases*, 67(4 SUPPL.), 501–502.
- Davis, S. L., Nuermberger, E. L., Um, P. K., Vidal, C., Jedynak, B., Pomper, M. G., Bishai, W. R., & Jain, S. K. (2009). Noninvasive pulmonary [18F]-2-fluoro-deoxy-D-glucose positron emission tomography correlates with bactericidal activity of tuberculosis drug treatment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(11), 4879–4884. <https://doi.org/10.1128/AAC.00789-09>
- Davoudi, S., Rasoolinegad, M., Younesian, M., Hajiabdolbaghi, M., & Soudbakhsh, A. (2008). *CD4 + Cell Counts in Patients with Different Clinical Manifestations of Tuberculosis*. 12, 483–486.
- Day, C. L., Abrahams, D. A., Lerumo, L., Janse van Rensburg, E., Stone, L., O'rie, T., Pienaar, B., de Kock, M., Kaplan, G., Mahomed, H., Dheda, K., & Hanekom, W. A. (2011). Functional Capacity of Mycobacterium tuberculosis -Specific T Cell Responses in Humans Is Associated with Mycobacterial Load . *The Journal of Immunology*, 187(5), 2222–2232. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101122>
- De Almeida, A. S., Fiske, C. T., Sterling, T. R., & Kalams, S. A. (2012). Increased frequency of regulatory T cells and T lymphocyte activation in persons with previously treated extrapulmonary tuberculosis. *Clinical and Vaccine Immunology*, 19(1), 45–52. <https://doi.org/10.1128/CVI.05263-11>
- Deveci, F., Akbulut, H. H., Celik, I., Muz, M. H., & Ilhan, F. (2006). Lymphocyte subpopulations in pulmonary tuberculosis patients. *Mediators of Inflammation*, 2006, 1–6. <https://doi.org/10.1155/MI/2006/89070>
- Dheda, K., Chang, J. S., Breen, R. A. M., Kim, L. U., Haddock, J. A., Huggett, J. F., Johnson, M. A., Rook, G. A. W., & Zumla, A. (2005). In vivo and in vitro studies of a novel cytokine, interleukin 4δ2, in pulmonary tuberculosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 172(4), 501–508. <https://doi.org/10.1164/rccm.200502-278OC>
- DHEDA, K., SCHWANDER, S. K., ZHU, B., ZYL-SMIT, R. N. VAN, & ZHANG, Y. (2010). The immunology of tuberculosis : From bench to bedside \. *Respirology*, 15, 433–450. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2010.01739.x>
- Diáz, A., Santucci, N., Bongiovanni, B., D'Attilio, L., Massoni, C., Lioi, S., Radcliffe, S., Dícoli, G., Bottasso, O., & Bay, M. L. (2015). Increased frequency of CD4+ CD25+ FoxP3+ T regulatory cells in pulmonary tuberculosis patients undergoing specific treatment and its relationship with their immune-endocrine

profile. *Journal of Immunology Research*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/985302>

- Diedrich, C. R., O'Hern, J., Gutierrez, M. G., Allie, N., Papier, P., Meintjes, G., Coussens, A. K., Wainwright, H., & Wilkinson, R. J. (2016). Relationship between HIV Coinfection, Interleukin 10 Production, and Mycobacterium tuberculosis in Human Lymph Node Granulomas. *Journal of Infectious Diseases*, 214(9), 1309–1318. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw313>
- Diel, R., Ernst, M., Döschner, G., Visuri-Karbe, L., Greinert, U., Niemann, S., Nienhaus, A., & Lange, C. (2006). Avoiding the effect of BCG vaccination in detecting Mycobacterium tuberculosis infection with a blood test. *European Respiratory Journal*, 28(1), 16–23. <https://doi.org/10.1183/09031936.06.00107005>
- Dinnes, J., Deeks, J., Kunst, H., Gibson, A., Cummins, E., Waugh, N., Drobniewski, F., & Lalvani, A. (2007). A systematic review of rapid diagnostic tests for the detection of tuberculosis infection. *Health Technology Assessment*, 11(3), 1–178. <https://doi.org/10.3310/hta11030>
- Domingo-gonzalez, R., Prince, O., Cooper, A., & Khader, S. (2016). Cytokines and Chemokines in Mycobacterium tuberculosis infection. 4(5), 1–58. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TBTB2-0018-2016.Cytokines>
- Drobniewski, F. A., Caws, M., Gibson, A., & Young, D. (2003). Modern laboratory diagnosis of tuberculosis. *Lancet Infectious Diseases*, 3(3), 141–147. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(03\)00544-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(03)00544-9)
- Duncan, K. (2003). Progress in TB drug development and what is still needed. *Tuberculosis*, 83(1–3), 201–207. [https://doi.org/10.1016/S1472-9792\(02\)00076-8](https://doi.org/10.1016/S1472-9792(02)00076-8)
- Ehrt, S., & Schnappinger, D. (2009). Mycobacterial survival strategies in the phagosome: Defence against host stresses. *Cellular Microbiology*, 11(8), 1170–1178. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01335.x>
- El Fenniri, L., Toossi, Z., Aung, H., El Iraki, G., Bourkkadi, J., Benamor, J., Laskri, A., Berrada, N., Benjouad, A., Mayanja-Kizza, H., Betts, M. R., El Aouad, R., & Canaday, D. H. (2011a). Polyfunctional Mycobacterium tuberculosis-specific effector memory CD4+ T cells at sites of pleural TB. *Tuberculosis*, 91(3), 224–230. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2010.12.005>
- El Fenniri, L., Toossi, Z., Aung, H., El Iraki, G., Bourkkadi, J., Benamor, J., Laskri, A., Berrada, N., Benjouad, A., Mayanja-Kizza, H., Betts, M. R., El Aouad, R., & Canaday, D. H. (2011b). Polyfunctional Mycobacterium tuberculosis-specific effector memory CD4+ T cells at sites of pleural TB. *Tuberculosis*, 91(3), 224–230. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2010.12.005>
- Elkholy, A., Anany, M. El, Ezzat, G. M., Abd El Reheem, F., & Ellessawy, A. F. (2018). View of Immunophenotyping of circulating mononuclear cells in active pulmonary tuberculosis imoprtsant.pdf. *J Infect Dev Ctries*, 12(12), 1073–1078.
- Erkens, C. G. M., Kamphorst, M., Abubakar, I., Bothamley, G. H., Chemtob, D., Haas, W., Migliori, G. B., Rieder, H. L., Zellweger, J. P., & Lange, C. (2010). Tuberculosis contact investigation in low prevalence countries: A European consensus. *European Respiratory Journal*, 36(4), 925–949. <https://doi.org/10.1183/09031936.00201609>
- Ernst, W. A., Thoma-Uszynski, S., Teitelbaum, R., Ko, C., Hanson, D. A., Clayberger, C., Krensky, A. M., Leippe, M., Bloom, B. R., Ganz, T., & Modlin, R. L. (2000). Granulysin, a T Cell Product, Kills Bacteria by Altering Membrane Permeability. *The Journal of Immunology*, 165(12), 7102–7108.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.12.7102>

- Eruslanov, E. B., Lyadova, I. V., Kondratieva, T. K., Majorov, K. B., Scheglov, I. V., Orlova, M. O., & Apt, A. S. (2005). Neutrophil responses to Mycobacterium tuberculosis infection in genetically susceptible and resistant mice. *Infection and Immunity*, 73(3), 1744–1753. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.3.1744-1753.2005>
- Estévez, O., Anibarro, L., Garet, E., Martínez, A., Pena, A., Barcia, L., Peleteiro, M., & González-Fernández, Á. (2020). Multi-parameter flow cytometry immunophenotyping distinguishes different stages of tuberculosis infection. *Journal of Infection*, 81(1), 57–71. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.03.064>
- Ewer, K., Deeks, J., Alvarez, L., Bryant, G., Waller, S., Andersen, P., Monk, P., & Lalvani, A. (2003). Comparison of T-cell-based assay with tuberculin skin test for diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection in a school tuberculosis outbreak. *Lancet*, 361(9364), 1168–1173. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12950-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12950-9)
- Feki, S., Rekaya, Z., Ben Chaaben, T., Zribi, A., Boukef, K., & Jenhani, F. (1998). Determination of T-lymphocyte subsets in a North African population (Tunisia): Establishment of normal ranges and results in HIV-infected individuals. *Disease Markers*, 14(3), 161–164. <https://doi.org/10.1155/1998/153450>
- Feng, C. G., Bean, A. G. D., Hooi, H., Briscoe, H., & Britton, W. J. (1999). Increase in gamma interferon-secreting CD8+, as well as CD4+, T cells in lungs following aerosol infection with Mycobacterium tuberculosis. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases*, 67(4 SUPPL.), 503.
- Feng, Carl G., Kaviratne, M., Rothfuchs, A. G., Cheever, A., Hieny, S., Young, H. A., Wynn, T. A., & Sher, A. (2006). NK Cell-Derived IFN-γ Differentially Regulates Innate Resistance and Neutrophil Response in T Cell-Deficient Hosts Infected with Mycobacterium tuberculosis. *The Journal of Immunology*, 177(10), 7086–7093. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.10.7086>
- Feng, Carl G., Jankovic, D., Kullberg, M., Scanga, C. A., Hieny, S., Caspar, P., Yap, G. S., Sher, A., Feng, C. G., Jankovic, D., Kullberg, M., Cheever, A., Scanga, C. A., Hieny, S., Caspar, P., Yap, G. S., & Sher, A. (2005). Maintenance of pulmonary Th1 effector function in chronic tuberculosis requires persistent IL-12 production. *The Journal of Immunology*, 174, 4185–4192. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.7.4185>
- FEREBEE, S. H., & MOUNT, F. W. (1962). Tuberculosis morbidity in a controlled trial of the prophylactic use of isoniazid among household contacts. *The American Review of Respiratory Disease*, 85, 490–510. <https://doi.org/10.1164/arrd.1962.85.4.490>
- Ferrara, G., Losi, M., D’Amico, R., Roversi, P., Piro, R., Meacci, M., Meccugni, B., Dori, I. M., Andreani, A., Bergamini, B. M., Mussini, C., Rumpianesi, F., Fabbri, L. M., & Richeldi, L. (2006). Use in routine clinical practice of two commercial blood tests for diagnosis of infection with Mycobacterium tuberculosis: a prospective study. *Lancet*, 367(9519), 1328–1334. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68579-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68579-6)
- Ferraz, J. C., Imunologia, D., & Pernambuco, U. F. De. (2006). *Immune factors and immunoregulation in tuberculosis*. 1387, 1387–1397.
- Fine, P. E. M. (1995). Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *The Lancet*, 346(8986), 1339–1345. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(95\)92348-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(95)92348-9)
- Flynn, J. A. L., & Chan, J. (2003). Immune evasion by Mycobacterium tuberculosis: Living with the enemy.

Current Opinion in Immunology, 15(4), 450–455. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(03\)00075-X](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(03)00075-X)

- Flynn, J. L., & Chan, J. (2001). *IMMUNOLOGY OF TUBERCULOSIS*. 19, 93–129. http://arjournals.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.immunol.19.1.93?url_ver=Z39.88-2003&rft_id=ori:rid:crossref.org&rft_dat=cr_pub=ncbi.nlm.nih.gov%5Cnpapers2://publication/uuid/C71C77EA-511D-42BF-9389-76885B7EDCE8
- Franco-paredes, C., Rouphael, N., & Santos-preciado, I. (2006). *Vaccination strategies to prevent tuberculosis in the new millennium: from BCG to new vaccine candidates*. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2005.06.002>
- Fulop, T., Kotb, R., Fortin, C. F., Pawelec, G., & Angelis, F. De. (2010). Potential role of immunosenescence in cancer development. *ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES*, 1197, 158–165. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05370.x>
- Gan, H., Lee, J., Ren, F., Chen, M., Kornfeld, H., & Remold, H. G. (2008). Mycobacterium tuberculosis blocks crosslinking of annexin-1 and apoptotic envelope formation on infected macrophages to maintain virulence. *Nature Immunology*, 9(10), 1189–1197. <https://doi.org/10.1038/ni.1654>
- Ganchua, S. K. C., White, A. G., Klein, E. C., & Flynn, J. A. L. (2020). Lymph nodes—The neglected battlefield in tuberculosis. *PLoS Pathogens*, 16(8), 1–19. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1008632>
- García-Dabrio, M. C., Pujol-Moix, N., Martínez-Perez, Á., Fontcuberta, J., Souto, J. C., Soria, J. M., & Nomdedéu, J. F. (2012). Influence of age, gender and lifestyle in lymphocyte subsets: Report from the Spanish gait-2 study. *Acta Haematologica*, 127(4), 244–249. <https://doi.org/10.1159/000337051>
- Garcia, I., Guler, R., Vesin, D., Olleros, M. L., Vassalli, P., Chvatchko, Y., Jacobs, M., & Ryffel, B. (2000). Lethal Mycobacterium bovis Bacillus Calmette Guérin infection in nitric oxide synthase 2-deficient mice: Cell-mediated immunity requires nitric oxide synthase 2. *Laboratory Investigation*, 80(9), 1385–1397. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3780146>
- Garra, A. O., Redford, P. S., McNab, F. W., Bloom, C. I., Wilkinson, R. J., & Berry, M. P. R. (2013). *The Immune Response in Tuberculosis*. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095939>
- Gately, M., Desai, B., Wolitzky, A., Quinn, P., Dwyer, C., Podlaski, F., Familletti, P., Sinigaglia, F., Chizzonite, R., Gubler, U., & Al, E. (1991). Regulation of human lymphocyte proliferation by a heterodimeric cytokine, IL-12 (cytotoxic lymphocyte maturation factor). *Journal of Immunology*, 147(3), 874–882. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2009.03908.x>
- Geijtenbeek, T. B. H., Van Vliet, S. J., Koppel, E. A., Sanchez-Hernandez, M., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E., Appelmelk, B., & Van Kooyk, Y. (2003). Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *Journal of Experimental Medicine*, 197(1), 7–17. <https://doi.org/10.1084/jem.20021229>
- Gerosa, F., Nisii, C., Righetti, S., Micciolo, R., Marchesini, M., Cazzadori, A., & Trinchieri, G. (1999). CD4+ T cell clones producing both interferon- γ and interleukin-10 predominate in bronchoalveolar lavages of active pulmonary tuberculosis patients. *Clinical Immunology*, 92(3), 224–234. <https://doi.org/10.1006/clim.1999.4752>
- Gibson, K. L., Wu, Y. C., Barnett, Y., Duggan, O., Vaughan, R., Kondeatis, E., Nilsson, B. O., Wikby, A., Kipling, D., & Dunn-Walters, D. K. (2009). B-cell diversity decreases in old age and is correlated with poor health status. *Aging Cell*, 8(1), 18–25. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2008.00443.x>

- Gideon, H. P., Phuah, J. Y., Myers, A. J., Bryson, B. D., Rodgers, M. A., Coleman, M. T., Maiello, P., Rutledge, T., Marino, S., Fortune, S. M., Kirschner, D. E., Lin, P. L., & Flynn, J. A. L. (2015). Variability in Tuberculosis Granuloma T Cell Responses Exists, but a Balance of Pro- and Anti-inflammatory Cytokines Is Associated with Sterilization. *PLoS Pathogens*, 11(1), 1–28. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004603>
- Gil-Setas, A., Torroba, L., Fernandez, J. L., Martinez-Artola, V., & Olite, J. (2004). Evaluation of the MB/BacT system compared with Middlebrook 7H11 and Lowenstein-Jensen media for detection and recovery of mycobacteria from clinical specimens. *Clinical Microbiology and Infection*, 10(3), 224–228. <https://doi.org/10.1111/j.1198-743X.2004.00733.x>
- Godfrey, D. I., Hammond, K. J. L., Poulton, L. D., Smyth, M. J., & Baxter, A. G. (2000). NKT cells : facts , functions and fallacies. *Immunology Today*, 21(11), 573–583.
- Gordon, A. H., Hart, P. D., & Young, M. R. (1980). Ammonia inhibits phagosome-lysosome fusion in macrophages. *Nature*, 286, 79– 80.
- Goren, M. B., D'Arcy Hart, P., Young, M. R., & Armstrong, J. A. (1976). Prevention of phagosome lysosome fusion in cultured macrophages by sulfatides of Mycobacterium tuberculosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(7), 2510–2514. <https://doi.org/10.1073/pnas.73.7.2510>
- Goren, Mayer B, Brokl, O., & Schaefer, W. B. (1974). Lipids of putative relevance to virulence in Mycobacterium tuberculosis: phthiocerol dimycocerosate and the attenuation indicator lipid. *Infection and Immunity*, 9(1), 150–158.
- Goronzy, J. J., Lee, W.-W., & Weyand, C. M. (2007). Aging and T-cell diversity. *Experimental Gerontology*, 42(5), 400–406. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Goronzy, J. J., & Weyand, C. M. (2013). Understanding immunosenescence to improve responses to vaccines. *Nature Immunology*, 14(5), 428–436. <https://doi.org/10.1038/ni.2588>
- Graham, B., Gros, L., Ben-sasson, S. Z., Seder, R., Finkelman, F. D., & Paul, W. E. (1990). Generation of Interleukin 4 (114)-producing Cells In Vivo and In Vitro: Ilr2 and Ilr4 Are Required For In Vitro Generation of U-4-producing Cells. *Journal of Experimental Medicine*, 172(September), 921–929.
- Greco, S., Girardi, E., Navarra, A., & Saltini, C. (2006). Current evidence on diagnostic accuracy of commercially based nucleic acid amplification tests for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Thorax*, 61(9), 783–790. <https://doi.org/10.1136/thx.2005.054908>
- Greco, S., Rulli, M., Girardi, E., Piersimoni, C., & Saltini, C. (2009). Diagnostic accuracy of in-house PCR for pulmonary tuberculosis in smear-positive patients: Meta-analysis and metaregression. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(3), 569–576. <https://doi.org/10.1128/JCM.02051-08>
- Grossman, W. J., Verbsky, J. W., Barchet, W., Colonna, M., Atkinson, J. P., & Ley, T. J. (2004). Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity*, 21(4), 589–601. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.09.002>
- Guglielmetti, L., Cazzadori, A., Conti, M., Boccafoglio, F., Vella, A., Ortolani, R., & Concia, E. (2013). Lymphocyte subpopulations in active tuberculosis: Association with disease severity and the QFT-GIT assay. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 17(6), 825–828. <https://doi.org/10.5588/ijtld.12.0361>

- Gui, J., Mustachio, L. M., Su, D., Craig, R. W., Worth, F., & Worth, F. (2012). Thymus Size and Age-related Thymic Involution : Early Programming , Sexual Dimorphism , Progenitors and Stroma. *Aging and Disease*, 3(3), 280–290.
- Guo, S., & Zhao, J. (2012). Immunotherapy for Tuberculosis: what's the better choice? *Frontiers in Bioscience*, 17, 2684–2690.
- Gutierrez, M. G., Master, S. S., Singh, S. B., Taylor, G. A., Colombo, M. I., & Deretic, V. (2004). Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages. *Cell*, 119(6), 753–766. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.11.038>
- Guyot-Revol, V., Innes, J. A., Hackforth, S., Hinks, T., & Lalvani, A. (2006). Regulatory T cells are expanded in blood and disease sites in patients with tuberculosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 173(7), 803–810. <https://doi.org/10.1164/rccm.200508-1294OC>
- Hall, A. O. H., Beiting, D. P., Tato, C., John, B., Oldenhove, G., Lombana, C. G., Pritchard, G. H., Silver, J. S., Bouladoux, N., Stumhofer, J. S., Harris, T. H., Grainger, J., Wojno, E. D. T., Wagage, S., Roos, D. S., Scott, P., Turka, L. A., Cherry, S., Reiner, S. L., ... Hunter, C. A. (2012). The Cytokines Interleukin 27 and Interferon- γ Promote Distinct Treg Cell Populations Required to Limit Infection-Induced Pathology. *Immunity*, 37(3), 511–523. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.06.014>
- Hammond, K. J. L., & Ā, M. K. (2003). Natural killer T cells : natural or unnatural regulators of autoimmunity ? *Current Opinion in Immunology*, 15, 683–689. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2003.09.014>
- Hanekom, W. A. (2016). Tuberculosis Vaccines. *The Vaccine Book: Second Edition*, 363–383. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802174-3.00018-7>
- Hanekom, W. A., Mendillo, M., Manca, C., Haslett, P. A. J., Siddiqui, M. R., Barry, C., & Kaplan, G. (2003). Mycobacterium tuberculosis inhibits maturation of human monocyte-derived dendritic cells in vitro. *Journal of Infectious Diseases*, 188(2), 257–266. <https://doi.org/10.1086/376451>
- Harada, N., Higuchi, K., Yoshiyama, T., Kawabe, Y., Fujita, A., Sasaki, Y., Horiba, M., Mitarai, S., Yonemaru, M., Ogata, H., Ariga, H., Kurashima, A., Wada, A., Takamori, M., Yamagishi, F., Suzuki, K., Mori, T., & Ishikawa, N. (2008). Comparison of the sensitivity and specificity of two whole blood interferon-gamma assays for M. tuberculosis infection. *Journal of Infection*, 56(5), 348–353. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2008.02.011>
- Harari, A., Rozot, V., Enders, F. B., Perreau, M., Stalder, J. M., Nicod, L. P., Cavassini, M., Calandra, T., Blanchet, C. L., Jaton, K., Faouzi, M., Day, C. L., Hanekom, W. A., Bart, P. A., & Pantaleo, G. (2011). Dominant TNF- α + Mycobacterium tuberculosis-specific CD4+ T cell responses discriminate between latent infection and active disease. *Nature Medicine*, 17(3), 372–377. <https://doi.org/10.1038/nm.2299>
- Harris, J., De Haro, S. A., Master, S. S., Keane, J., Roberts, E. A., Delgado, M., & Deretic, V. (2007). T Helper 2 Cytokines Inhibit Autophagic Control of Intracellular Mycobacterium tuberculosis (DOI:10.1016/j.immuni.2007.07.022). *Immunity*, 27(4), 685. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.09.003>
- Harris, J., Master, S. S., Haro, S. A. De, Delgado, M., Roberts, E. A., Hope, J. C., Keane, J., & Deretic, V. (2009). *Veterinary Immunology and Immunopathology Th1 – Th2 polarisation and autophagy in the*

- control of intracellular mycobacteria by macrophages. 128, 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.10.293>
- Hermida, C., Espinosa-cueto, P., Ortiz-ortiz, L., Salazar-gonza, F., Cubilla-tejeda, A. C., Leyva-meza, R., Diaz-silvestre, H., & Ñ, R. M. (2006). Impact of Opportunistic Mycobacterium tuberculosis Infection on the Phenotype of Peripheral Blood T Cells of AIDS Patients. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 20, 80–86. <https://doi.org/10.1002/jcla>
- Hernandez, J., Velazquez, C., Valenzuela, O., Robles-zepeda, R., Ruiz-bustos, E., Navarro, M., & Garibay-escobar, A. (2010). Low Number of Peripheral Blood B Lymphocytes in Patients with Pulmonary. *Immunological Investigations*, 39, 197–205. <https://doi.org/10.3109/08820130903586346>
- Herrera, M. T., Torres, M., Nevels, D., Perez-Redondo, C. N., Ellner, J. J., Sada, E., & Schwander, S. K. (2009). Compartmentalized bronchoalveolar IFN- γ and IL-12 response in human pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis*, 89(1), 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2008.08.002>
- Hertoghe, T., Wajja, A., Ntambi, L., Okwera, A., Aziz, M. A., Hirsch, C., Johnson, J., Toossi, Z., Mugerwa, R., Mugenyi, P., Colebunders, R., Ellner, J., & Vanham, G. (2000). T cell activation, apoptosis and cytokine dysregulation in the (co)pathogenesis of HIV and pulmonary tuberculosis (TB). *Clinical and Experimental Immunology*, 122(3), 350–357. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2000.01385.x>
- Hirsch, C. S., Toossi, Z., Johnson, J. L., Luzze, H., Ntambi, L., Peters, P., McHugh, M., Okwera, A., Joloba, M., Mugenyi, P., Mugerwa, R. D., Terebuh, P., & Ellner, J. J. (2001). Augmentation of apoptosis and interferon- γ production at sites of active Mycobacterium tuberculosis infection in human tuberculosis. *Journal of Infectious Diseases*, 183(5), 779–788. <https://doi.org/10.1086/318817>
- Houben, R. M. G. J., & Dodd, P. J. (2016). The Global Burden of Latent Tuberculosis Infection: A Re-estimation Using Mathematical Modelling. *PLoS Medicine*, 13(10), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002152>
- Hougardy, J. M., Place, S., Hildebrand, M., Drowart, A., Debie, A. S., Loch, C., & Mascart, F. (2007). Regulatory T cells depress immune responses to protective antigens in active tuberculosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 176(4), 409–416. <https://doi.org/10.1164/rccm.200701-084OC>
- Houk, V. N., Baker, J. H., Sorensen, K., & Kent, D. C. (1968). The Epidemiology of Tuberculosis Infection in a Closed Environment. *Archives of Environmental Health*, 16(1), 26–35. <https://doi.org/10.1080/00039896.1968.10665011>
- Howard, R. R., Fasano, C. S., Frey, L., & Miller, C. H. (1996). Reference intervals of CD3, CD4, CD8, CD4/CD8, and absolute CD4 values in Asian and non-Asian populations. *Communications in Clinical Cytometry*, 26(3), 231–232. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0320\(19960915\)26:3<231::AID-CYT09>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0320(19960915)26:3<231::AID-CYT09>3.0.CO;2-H)
- HOWARD, W. A., GIBSON, K. L., & DUNN-WALTERS, D. K. (2006). Antibody Quality in Old Age WENDY. *REJUVENATION RESEARCH*, 9(1), 117–125.
- Hsu, T., Hingley-Wilson, S. M., Chen, B., Chen, M., Dai, A. Z., Morin, P. M., Marks, C. B., Padiyar, J., Goulding, C., Gingery, M., Eisenberg, D., Russell, R. G., Derrick, S. C., Collins, F. M., Morris, S. L., King, C. H., & Jacobs, W. R. (2003). The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette-Guérin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(21), 12420–12425.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1635213100>

- Huenecke, S., Behl, M., Fadler, C., Zimmermann, S. Y., Bochennek, K., Tramsen, L., Esser, R., Klarmann, D., Kamper, M., Sattler, A., Von Laer, D., Klingebiel, T., Lehrnbecher, T., & Koehl, U. (2008). Age-matched lymphocyte subpopulation reference values in childhood and adolescence: Application of exponential regression analysis. *European Journal of Haematology*, 80(6), 532–539. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.2008.01052.x>
- Iseman, M. D. (2000). *A Clinician's Guide to Tuberculosis* (L. W. & Wilkins (ed.); 1st Editio).
- Jafari, C., Ernst, M., Strassburg, A., Greinert, U., Kalsdorf, B., Kirsten, D., & Lange, C. (2008). Local immunodiagnosis of pulmonary tuberculosis by enzyme-linked immunospot. *European Respiratory Journal*, 31(2), 261–265. <https://doi.org/10.1183/09031936.00096707>
- Jasenosky, L. D., Scriba, T. J., Hanekom, W. A., & Goldfeld, A. E. (2015). T cells and adaptive immunity to *Mycobacterium tuberculosis* in humans. *Immunological Reviews*, 264(1), 74–87. <https://doi.org/10.1111/imr.12274>
- Jayachandran, R., Sundaramurthy, V., Combaluzier, B., Mueller, P., Korf, H., Huygen, K., Miyazaki, T., Albrecht, I., Massner, J., & Pieters, J. (2007). Survival of *Mycobacteria* in Macrophages Is Mediated by Coronin 1-Dependent Activation of Calcineurin. *Cell*, 130(1), 37–50. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.04.043>
- Jentsch-Ullrich, K., Koenigsmann, M., Mohren, M., & Franke, A. (2005). Lymphocyte subsets' reference ranges in an age- and gender-balanced population of 100 healthy adults - A monocentric German study. *Clinical Immunology*, 116(2), 192–197. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2005.03.020>
- Jeong, Y. H., Jeon, B. Y., Gu, S. H., Cho, S. N., Shin, S. J., Chang, J., & Ha, S. J. (2014). Differentiation of antigen-specific T cells with limited functional capacity during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infection and Immunity*, 82(1), 132–139. <https://doi.org/10.1128/IAI.00480-13>
- Jin, W., & Dong, C. (2013). IL-17 cytokines in immunity and inflammation. *Emerging Microbes and Infections*, 2(July), 1–5. <https://doi.org/10.1038/emi.2013.58>
- Jing, X., Lin, S., Xi-rong, W., Qing, M., Wei-wei, J., Chen, S., Dan, S., FENG, W., Fang, L., & A-dong, F. (2012). Association of immunophenotypic characterization of peripheral lymphocytes with different clinical phenotypes of tuberculosis in Chinese Han children. *Chinese Medical Journal*, 125(2), 275–280. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0366-6999.2012.02.021>
- Jo, E. K. (2008). *Mycobacterial interaction with innate receptors: TLRs, C-type lectins, and NLRs. Current Opinion in Infectious Diseases*, 21(3), 279–286. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e3282f88b5d>
- Jo, E. K., Yang, C. S., Choi, C. H., & Harding, C. V. (2007). Intracellular signalling cascades regulating innate immune responses to *Mycobacteria*: Branching out from Toll-like receptors. *Cellular Microbiology*, 9(5), 1087–1098. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.00914.x>
- Jones, B. R., Ryu, R., Yang, Z., Cave, M. D., Pogoda, J. M., Orava, M., & Barnes, P. F. (1998). Chest radiographic findings in patients with tuberculosis with recent or remote infection. *Pneumologie*, 52(5), 278–279.
- Junqueira-kipnis, A. P., Kipnis, A., Juarrero, M. G., Raulet, D. H., Turner, J., Ian, M., Junqueira-kipnis, A. P., Kipnis, A., Jamieson, A., Gonzalez, M., Diefenbach, A., Raulet, D. H., Turner, J., & Orme, I. M. (2003).

- NK Cells Respond to Pulmonary Infection with *Mycobacterium tuberculosis* , but Play a Minimal Role in Protection. *J Immunol*, 171, 6039–6045. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.11.6039>
- Kaku, T., Kawamura, I., Uchiyama, R., Kurenuma, T., & Mitsuyama, M. (2007). RD1 region in mycobacterial genome is involved in the induction of necrosis in infected RAW264 cells via mitochondrial membrane damage and ATP depletion. *FEMS Microbiology Letters*, 274(2), 189–195. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00838.x>
- Kathamuthu, G. R., Kumar, N. P., Moideen, K., Dolla, C., Kumaran, P., & Babu, S. (2022). Multi-Dimensionality Immunophenotyping Analyses of MAIT Cells Expressing Th1/Th17 Cytokines and Cytotoxic Markers in Latent Tuberculosis Diabetes Comorbidity. *Pathogens*, 11(1), 1–14. <https://doi.org/10.3390/pathogens11010087>
- Kathamuthu, G. R., Moideen, K., Baskaran, D., Banurekha, V. V., Nair, D., Sekar, G., Sridhar, R., Vidyajayanthi, B., Gajendraraj, G., Parandhaman, D. K., Srinivasan, A., & Babua, S. (2017). Tuberculous Lymphadenitis Is Associated with Enhanced Baseline and Antigen-Specific Induction of Type 1 and Type 17 Cytokines and Reduced Interleukin-1 γ (IL-1 γ) and IL-18 at the Site of Infection. *Clinical Immunology*, 24(5), 1–12.
- Kaufmann, S. (2002). *Protection against tuberculosis: cytokines, T cells, and macrophages*. 54–58.
- Kaufmann, S. H. E. (2001). *HOW CAN IMMUNOLOGY CONTRIBUTE TO THE CONTROL OF TUBERCULOSIS ?* 1(October), 20–30.
- Kaufmann, S. H. E. (2013). Tuberculosis vaccines : Time to think about the next generation. *Seminars in Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2013.04.006>
- Kaufmann, S. H. E., Baumann, S., & Eddine, A. N. (2006). Exploiting immunology and molecular genetics for rational vaccine design against tuberculosis. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 10(10), 1068–1079.
- Kaufmann, S. H. E., & McMichael, A. J. (2005). *Annulling a dangerous liaison : vaccination strategies against AIDS and tuberculosis*. 11(4). <https://doi.org/10.1038/nm1221>
- Kaufmann, S. H. E., & Parida, S. K. (2008). *Review Tuberculosis in Africa : Learning from Pathogenesis for Biomarker Identification*. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.08.002>
- Kayblanchard, D., Friedman, H., & Djeu, J. Y. (1989). Lysis of Mycobacteria-Infected Monocytes by IL-2-Activated Killer Cells : Role of LFA-1 '. *Cellular Immunology*, 119, 402–411.
- Keane, J., Remold, H. G., & Kornfeld, H. (2000). Virulent *Mycobacterium tuberculosis* Strains Evade Apoptosis of Infected Alveolar Macrophages . *The Journal of Immunology*, 164(4), 2016–2020. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.4.2016>
- Keller, C., Hoffmann, R., Lang, R., Brandau, S., Hermann, C., & Ehlers, S. (2006). Genetically determined susceptibility to tuberculosis in mice causally involves accelerated and enhanced recruitment of granulocytes. *Infection and Immunity*, 74(7), 4295–4309. <https://doi.org/10.1128/IAI.00057-06>
- Khader, S. A., Bell, G. K., Pearl, J. E., Fountain, J. J., Rangel-moreno, J., Cilley, G. E., Shen, F., Eaton, S. M., Gaffen, S. L., Swain, S. L., Locksley, R. M., Haynes, L., Randall, T. D., & Cooper, A. M. (2007). *IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4 + T cell responses after vaccination and during*

Mycobacterium tuberculosis challenge. 8(4), 369–377. <https://doi.org/10.1038/ni1449>

- Khader, S. A., Divangahi, M., Hanekom, W., Hill, P. C., Maeurer, M., Makar, K. W., Mayer-Barber, K. D., Mhlana, M. M., Nemes, E., Schlesinger, L. S., Van Crevel, R., Vankalayapati, R., Xavier, R. J., & Netea, M. G. (2019). Targeting innate immunity for tuberculosis vaccination. *Journal of Clinical Investigation*, 129(9), 3482–3491. <https://doi.org/10.1172/JCI128877>
- Kim, K., Perera, R., Tan, D. B. A., Fernandez, S., Seddiki, N., Waring, J., & French, M. A. (2014). Circulating mycobacterial-reactive CD4+ T cells with an immunosuppressive phenotype are higher in active tuberculosis than latent tuberculosis infection. *Tuberculosis*, 94(5), 494–501. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2014.07.002>
- Kirman, J. R., Henao-tamayo, M. I., & Agger, E. M. (2016). The Memory Immune Response to Tuberculosis. *Microbiology Spectrum*, 4(6), 1–20. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TBTB2-0009>
- Kleinnijenhuis, J., Van Crevel, R., & Netea, M. G. (2014). Trained immunity: Consequences for the heterologous effects of BCG vaccination. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 109(1), 29–35. <https://doi.org/10.1093/trstmh/tru168>
- Kobayashi, B. Y. M., Fitz, L., Ryan, M., Hewick, R. M., Clark, S. C., Chan, S., Loudon, R., Sherman, F., Cd, C. D., & Nk, N.-C. D. (1989). IDENTIFICATION AND PURIFICATION OF NATURAL KILLER CELL STIMULATORY FACTOR (NKSF), A CYTOKINE WITH MULTIPLE BIOLOGIC EFFECTS ON HUMAN LYMPHOCYTES Human B lymphoblastoid cell lines facilitate the growth in vitro of human NK cells and of T cell clones (1-. *Journal of Experimental Medicine*, 170(September), 827–845.
- Koch, R. (1932). die aetiologie der tuberculose, a translation by Berna Pinner and Max Pinner with an introduction by Allen K. Krause. *American Review of Tuberculosis*, 25, 285–323.
- Koch, S., Larbi, A., Derhovanessian, E., Özcelik, D., Naumova, E., & Pawelec, G. (2008). Immunity & Ageing Multiparameter flow cytometric analysis of CD4 and CD8 T cell subsets in young and old people. *Immunity and Ageing*, 5, 6. <https://doi.org/10.1186/1742-4933-5-6>
- Koeken, V. A. C. M., Verrall, A. J., Netea, M. G., Hill, P. C., & van Crevel, R. (2019). Trained innate immunity and resistance to Mycobacterium tuberculosis infection. *Clinical Microbiology and Infection*, 25(12), 1468–1472. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.02.015>
- Korbel, D. S., Schneider, B. E., & Schaible, U. E. (2008). Innate immunity in tuberculosis: myths and truth. *Microbes and Infection*, 10(9), 995–1004. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.07.039>
- Kulpraneet, M., Sukwit, S., Sumransurp, K., Chuenchitra, T., Santiwatanakul, S., & Srisurapanon, S. (2007). Cytokine production in NK and NKT cells from Mycobacterium tuberculosis infected patients. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 38(2), 370–375.
- Kumar, N. P., Sridhar, R., Banurekha, V. V., Nair, D., Jawahar, M. S., Nutman, T. B., & Babu, S. (2013). Expansion of Pathogen-Specific Mono- and Multifunctional Th1 and Th17 Cells in Multi-Focal Tuberculous Lymphadenitis. *PLoS ONE*, 8(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057123>
- Kust, S. A., Streltsova, M. A., Panteleev, A. V., Karpina, N. L., Lyadova, I. V., Sapozhnikov, A. M., & Kovalenko, E. I. (2021). HLA-DR-Positive NK Cells Expand in Response to Mycobacterium Tuberculosis Antigens and Mediate Mycobacteria-Induced T Cell Activation. *Frontiers in Immunology*, 12(May), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.662128>

- Kverneland, A. H., Streitz, M., Geissler, E., Hutchinson, J., Vogt, K., Bo, D., Niemann, N., Pedersen, A. E., Schlickeiser, S., & Sawitzki, B. (2016). Age and Gender Leucocytes Variances and References Values Generated Using the Standardized ONE-Study Protocol. *Cytometry Part A*, 89(6), 543–564. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22855>
- Kyung, S. L. and J.-G., & Im. (1995). CT in Adults with Tuberculosis of the Chest: Characteristic Findings and Role in Management. *Am J Roentgenol*, 164, 1361–1367.
- Ladel, C. H., Szalay, G., & Riedel, D. (1997). *Interleukin-12 Secretion by Mycobacterium tuberculosis - Infected Macrophages*. 65(5), 1936–1938.
- Lagier, J. C., Dubourg, G., Amrane, S., & Raoult, D. (2017). Koch Postulate: Why Should we Grow Bacteria? *Archives of Medical Research*, 48(8), 774–779. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2018.02.003>
- Lake, S. (1983). *PROTECTION INFECTION IMMUNOTHERAPY * Requirement for T Cell-deficient Recipients Analysis of the mechanisms of cell-mediated immunity by the passive transfer of immune cells to appropriate recipients remains one of the most powerful tools in the*. 158(July), 74–83.
- Lande, R., Giacomini, E., Grassi, T., Remoli, M. E., Iona, E., Miettinen, M., Julkunen, I., & Coccia, E. M. (2003). IFN- $\alpha\beta$ Released by Mycobacterium tuberculosis -Infected Human Dendritic Cells Induces the Expression of CXCL10: Selective Recruitment of NK and Activated T Cells . *The Journal of Immunology*, 170(3), 1174–1182. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.3.1174>
- Lanzavecchia, A., & Sallusto, F. (2005). Understanding the generation and function of memory T cell subsets. *Current Opinion in Immunology*, 17(3), 326–332. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2005.04.010>
- Lau, Y. L., Chan, G. C. F., Ha, S. Y., Hui, Y. F., & Yuen, K. Y. (1998). The role of phagocytic respiratory burst in host defense against Mycobacterium tuberculosis. *Clinical Infectious Diseases*, 26(1), 226–227. <https://doi.org/10.1086/517036>
- Lazarevic, V., Nolt, D., & Flynn, J. L. (2005). Long-Term Control of Mycobacterium tuberculosis Infection Is Mediated by Dynamic Immune Responses . *The Journal of Immunology*, 175(2), 1107–1117. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.2.1107>
- Lee, B., Yap, H., Chew, F., Quah, T., Prabhakaran, K., Chan, G. S. H., Wong, S., & Seah, C. (1996). Age- and Sex-Related Changes i n Lymphocyte Subpopulations of Healthy Asian Subjects : From Birth to Adulthood. *Cytometry*, 26, 8–15.
- Letterio, J. J., & Roberts, A. B. (1998). REGULATION OF IMMUNE RESPONSES BY TGF- β . *Annual Review of Immunology*, 16, 137–161. <https://doi.org/10.1111/nyas.12445>
- Li, L., Qiao, D., Li, Q., Zhang, X., Lao, S., & Wu, C. (2012). Distinct polyfunctional CD4 + T cell responses to BCG, ESAT-6 and CFP-10 in tuberculous pleurisy. *Tuberculosis*, 92(1), 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2011.11.004>
- Li, L., Yang, B., Zhang, X., Lao, S., & Wu, C. (2014). Mycobacterium tuberculosis-specific polyfunctional cytotoxic CD8 + T cells express CD69. *Tuberculosis*, 94(3), 219–225. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2013.12.007>
- Lin, P. L., Rutledge, T., Green, A. M., Bigbee, M., Fuhrman, C., Klein, E., & Flynn, J. L. (2012). CD4 T cell depletion exacerbates acute mycobacterium tuberculosis while reactivation of latent infection is dependent on severity of tissue depletion in cynomolgus macaques. *AIDS Research and Human*

Retroviruses, 28(12), 1693–1702. <https://doi.org/10.1089/aid.2012.0028>

- Lin, Y., Zhang, M., Hofman, F. M., Gong, J., & Barnes, P. F. (1996). Absence of a prominent Th2 cytokine response in human tuberculosis. *Infection and Immunity*, 64(4), 1351–1356. <https://doi.org/10.1128/iai.64.4.1351-1356.1996>
- Lipp, M., Sallusto, F., Lenig, D., Fo, R., & Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials. *Letters to Nature*, 401(October), 708–712.
- Lomax, E. (1977). Hereditary or acquired disease? early nineteenth century debates on the cause of infantile scrofula and tuberculosis. *Journal of the History of Medicine and Allied Sciences*, 32(4), 356–374. <https://doi.org/10.1093/jhmas/XXXII.4.356>
- Lyashchenko, K., Colangeli, R., Houde, M., Jahdali, H. A. L., Menzies, D., & Gennaro, M. L. (1998). Heterogeneous Antibody Responses in Tuberculosis. *Infection and Immunity*, 66(8), 3936–3940.
- Ma, N., Zalwango, S., Malone, L. S. L., Nsereko, M., Wampande, E. M., Thiel, B. A., Okware, B., Igo, R. P., Joloba, M. L., Mupere, E., Mayanja-Kizza, H., Boom, W. H., & Stein, C. M. (2014). Clinical and epidemiological characteristics of individuals resistant to M. tuberculosis infection in a longitudinal TB household contact study in Kampala, Uganda. *BMC Infectious Diseases*, 14(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-352>
- Mack, U., Migliori, G. B., Sester, M., Rieder, H. L., Ehlers, S., Goletti, D., Bossink, A., Magdorf, K., Holscher, C., Kampmann, B., Arend, S. M., Detjen, A., Bothamley, G., Zellweger, J. P., Milburn, H., Diel, R., Ravn, P., Cobelens, F., Cardona, P. J., ... Lange, C. (2009). LTBI: Latent tuberculosis infection or lasting immune responses to M. tuberculosis? A TBNET consensus statement. *European Respiratory Journal*, 33(5), 956–973. <https://doi.org/10.1183/09031936.00120908>
- Maglione, P. J., Xu, J., Casadevall, A., Maglione, P. J., Xu, J., Casadevall, A., & Chan, J. (2008). Fcγ Receptors Regulate Immune Activation and Susceptibility during Mycobacterium tuberculosis Infection. *The Journal of Immunology*, 180, 3329–3338. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.5.3329>
- Maglione, P. J., Xu, J., Chan, J., Maglione, P. J., Xu, J., & Chan, J. (2007). tuberculosis B Cells Moderate Inflammatory Progression and Enhance Bacterial Containment upon Pulmonary Challenge with Mycobacterium tuberculosis. *The Journal of Immunology*, 178, 7222–7234. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.11.7222>
- Maitre, T., Robert, J., & Veziris, N. (2018). Introduction – épidémiologie de la tuberculose et de l'infection tuberculeuse latente. *Revue Des Maladies Respiratoires*, 35(8), 859–861. <https://doi.org/10.1016/j.rmr.2018.08.009>
- Marais, B. J., Gie, R. P., Schaaf, H. S., Hesselning, A. C., Obihara, C. C., Nelson, L. J., Enarson, D. A., Donald, P. R., & Beyers, N. (2004). The clinical epidemiology of childhood pulmonary tuberculosis: A critical review of literature from the pre-chemotherapy era. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 8(3), 278–285.
- Marais, Ben J., Brittle, W., Painczyk, K., Hesselning, A. C., Beyers, N., Wasserman, E., Van Soolingen, D., & Warren, R. M. (2008). Use of light-emitting diode fluorescence microscopy to detect acid-fast bacilli in sputum. *Clinical Infectious Diseases*, 47(2), 203–207. <https://doi.org/10.1086/589248>
- Marín, N. D., París, S. C., Rojas, M., & García, L. F. (2012). Reduced frequency of memory T cells and increased Th17 responses in patients with active tuberculosis. *Clinical and Vaccine Immunology*,

19(10), 1667–1676. <https://doi.org/10.1128/CVI.00390-12>

- Marín, N. D., París, S. C., Rojas, M., & García, L. F. (2013). Functional profile of CD4+ and CD8+ T cells in latently infected individuals and patients with active TB. *Tuberculosis*, 93(2), 155–166. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2012.12.002>
- Martin, C., & Maugein, J. (2012). *Bactériologie des mycobactéries responsables d' infections respiratoires*. 9(12), 1–15.
- Mathema, B., Andrews, J. R., Cohen, T., Borgdorff, M. W., Behr, M., Glynn, J. R., Rustomjee, R., Silk, B. J., & Wood, R. (2017). Drivers of Tuberculosis Transmission. *Journal of Infectious Diseases*, 216(January), S644–S653. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix354>
- Mayer-Barber, K. D., Andrade, B. B., Barber, D. L., Hieny, S., Feng, C. G., Caspar, P., Oland, S., Gordon, S., & Sher, A. (2011). Innate and Adaptive Interferons Suppress IL-1 α and IL-1 β Production by Distinct Pulmonary Myeloid Subsets during Mycobacterium tuberculosis Infection. *Immunity*, 35(6), 1023–1034. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.12.002>
- Mazzarella, G., Bianco, A., Perna, F., D'Auria, D., Grella, E., Moscariello, E., & Sanduzzi, A. (2003). T lymphocyte phenotypic profile in lung segments affected by cavitary and non-cavitary tuberculosis. *Clinical and Experimental Immunology*, 132(2), 283–288. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2003.02121.x>
- McIntosh, A. I., Jenkins, H. E., Robert Horsburgh, C., Jones-López, E. C., Whalen, C. C., Gaeddert, M., Marques-Rodrigues, P., Ellner, J. J., Dietze, R., & White, L. F. (2019). Partitioning the risk of tuberculosis transmission in household contact studies. *PLoS ONE*, 14(10), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223966>
- McKinney, J. D. (2000). In vivo veritas: The search for TB drug targets goes live. *Nature Medicine*, 6(12), 1330–1333. <https://doi.org/10.1038/82142>
- McNab, F. W., Ewbank, J., Howes, A., Moreira-Teixeira, L., Martirosyan, A., Ghilardi, N., Saraiva, M., & O'Garra, A. (2014). Type I IFN Induces IL-10 Production in an IL-27–Independent Manner and Blocks Responsiveness to IFN- γ for Production of IL-12 and Bacterial Killing in Mycobacterium tuberculosis – Infected Macrophages . *The Journal of Immunology*, 193(7), 3600–3612. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401088>
- Medical Research Council. (1952). THE PREVENTION OF STREPTOMYCIN RESISTANCE BY COMBINED CHEMOTHERAPY subcommittee of the Medical Research Council ' s Strepto- Tuberculosis Association ' s Research Committee. *British Medical Journal*, 2.
- Melzer, S., Zachariae, S., Bocsi, J., Engel, C., Löffler, M., & Tárnok, A. (2015). Reference intervals for leukocyte subsets in adults: Results from a population-based study using 10-color flow cytometry. *Cytometry Part B - Clinical Cytometry*, 88(4), 270–281. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21234>
- Migliori, G. B., Ong, C. W. M., Petrone, L., D'ambrosio, L., Centis, R., & Goletti, D. (2021). The definition of tuberculosis infection based on the spectrum of tuberculosis disease. *Breathe*, 17(3), 1–12. <https://doi.org/10.1183/20734735.0079-2021>
- Mogues, T., Goodrich, M. E., Ryan, L., LaCourse, R., & North, R. J. (2001). The relative importance of T cell subsets in immunity and immunopathology of airborne Mycobacterium tuberculosis infection in mice. *Journal of Experimental Medicine*, 193(3), 271–280. <https://doi.org/10.1084/jem.193.3.271>

- Moore, K. W., Malefyt, R. D. W., Robert, L., & Garra, A. O. (2001). Interleukin -10 and the Interleukin -10. *Molecular and Cellular Biology*, 1(1), 683–765. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11244051>
- Morais-papini, T. F., Graziela, J., Coelho-dos-reis, A., Paula, A., Wendling, B., Ribeiro, L., Fanini, P., Luiza, V., Bonato, D., Maria, V., & Elói-santos, S. (2017). Systemic Immunological changes in patients with distinct clinical outcomes during Mycobacterium tuberculosis infection. *Immunobiology*, May.
- Morris, C. D. W. (1990). Pulmonary tuberculosis in the elderly: A different disease? *Thorax*, 45(12), 912–913. <https://doi.org/10.1136/thx.45.12.912>
- Mueller, H., Detjen, A. K., Schuck, S. D., Gutschmidt, A., Wahn, U., Magdorf, K., Kaufmann, S. H. E., & Jacobsen, M. (2008). Mycobacterium tuberculosis-specific CD4+, IFN γ +, and TNF α + multifunctional memory T cells coexpress GM-CSF. *Cytokine*, 43(2), 143–148. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.05.002>
- Muller, I., Cobbold, S. P., Waldmann, H., & Kaufmann, S. H. E. (1987). Impaired resistance to Mycobacterium tuberculosis infection after selective in vivo depletion of L3T4+ and Lyt-2+ T cells. *Infection and Immunity*, 55(9), 2037–2041. <https://doi.org/10.1128/iai.55.9.2037-2041.1987>
- Munder, B. M., Mallo, M., Eichmann, K., & Modolell, M. (1998). Murine Macrophages Secrete Interferon γ upon Combined Stimulation with Interleukin (IL)-12 and IL-18: A Novel Pathway of Autocrine Macrophage Activation. 187(12), 2103–2108.
- Nakamura, K., Kitani, A., Fuss, I., Pedersen, A., Harada, N., Nawata, H., & Strober, W. (2004). TGF- β 1 Plays an Important Role in the Mechanism of CD4 + CD25 + Regulatory T Cell Activity in Both Humans and Mice . *The Journal of Immunology*, 172(2), 834–842. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.2.834>
- Naluyima, P., Eller, L. A., Ouma, B. J., Kyabaggu, D., Kataaha, P., Guwatudde, D., Kibuuka, H., Wabwire-Mangen, F., Robb, M. L., Michael, N. L., Souza, M. S., Sandberg, J. K., & Eller, M. A. (2016). Sex and urbanicity contribute to variation in lymphocyte distribution across Ugandan populations. *PLoS ONE*, 11(1), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146196>
- Nemeth, J., Winkler, H. M., Zwick, R. H., Rumetshofer, R., Schenk, P., Burghuber, O. C., Graninger, W., Ramharter, M., & Winkler, S. (2009). Recruitment of mycobacterium tuberculosis specific CD4+ T cells to the site of infection for diagnosis of active tuberculosis. *Journal of Internal Medicine*, 265(1), 163–168. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2008.02012.x>
- Nemeth, Johannes, Rumetshofer, R., Winkler, H. M., Burghuber, O. C., Müller, C., & Winkler, S. (2012). Active tuberculosis is characterized by an antigen specific and strictly localized expansion of effector T cells at the site of infection. *European Journal of Immunology*, 42(11), 2844–2850. <https://doi.org/10.1002/eji.201242678>
- Nerlich, A. G., Haas, C. J., Zink, A., Szeimies, U., & Hagedorn, H. G. (1997). Molecular evidence for tuberculosis in an ancient Egyptian mummy [10]. *Lancet*, 350(9088), 1404. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)65185-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)65185-9)
- Netea, M. G., Joosten, L. A. B., Latz, E., Mills, K. H. G., Natoli, G., Stunnenberg, H. G., O'Neill, L. A. J., & Xavier, R. J. (2016). Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science*, 352(6284), 427. <https://doi.org/10.1126/science.aaf1098>
- Nicholson, S., Bonecini-Almeida, M. D. G., Lapa E Silva, J. R., Nathan, C., Xie, Q. W., Mumford, R., Weidner, J. R., Calaycay, J., Geng, J., Boechat, N., Linhares, C., Rom, W., & Ho, J. L. (1996). Inducible nitric oxide

- synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. *Journal of Experimental Medicine*, 183(5), 2293–2302. <https://doi.org/10.1084/jem.183.5.2293>
- Nikolich-Žugich, J. (2008). Ageing and life-long maintenance of T - cell subsets in the face of latent persistent infections. *Nature Reviews Immunology*, 8(7), 512–522. <https://doi.org/10.1038/nri2318>
- Oddo, M., Renno, T., Attinger, A., Bakker, T., MacDonald, H. R., & Meylan, P. R. (1998). Fas ligand-induced apoptosis of infected human macrophages reduces the viability of intracellular Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 160(11), 5448–5454. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9605147>
- Olmos, S., Stukes, S., & Ernst, J. D. (2010). Ectopic Activation of Mycobacterium tuberculosis -Specific CD4 + T Cells in Lungs of CCR7 - / - Mice . *The Journal of Immunology*, 184(2), 895–901. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901230>
- OLSEN, A. J., VISELLI, S. M., FAN, J., & KOVACS, W. J. (1998). Androgens indirectly accelerate thymocyte apoptosis. *Endocrinology*, 139(2), 748–752. [https://doi.org/10.1016/S1567-5769\(00\)00029-1](https://doi.org/10.1016/S1567-5769(00)00029-1)
- OMS. (2019). *Global tuberculosis report*. https://www.m-culture.go.th/mculture_th/download/king9/Glossary_about_HM_King_Bhumibol_Adulyadej's_Funeral.pdf
- Orme, I. M., & Collins, F. M. (1984). Adoptive protection of the Mycobacterium tuberculosis-infected lung. *Cellular Immunology*, 84(1), 113–120. [https://doi.org/10.1016/0008-8749\(84\)90082-0](https://doi.org/10.1016/0008-8749(84)90082-0)
- Ortaldo, J. R., Young, H. A., Robin, T., Bere, E. W., Murphy, W. J., & Wilttrout, R. H. (2004). Dissociation of NKT Stimulation, Cytokine Induction, and NK Activation In Vivo by the Use of Distinct TCR-Binding Ceramides. *J Immunol*, 172943–953. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.2.943>
- Oswald, I. P., Wynn, T. A., Sher, A., & James, S. L. (1992). Interleukin 10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor α required as a costimulatory factor for interferon γ -induced activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(18), 8676–8680. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.18.8676>
- Ozeki, Y., Kaneda, K., Fujiwara, N., Morimoto, M., Oka, S., & Yano, I. (1997). In vivo induction of apoptosis in the thymus by administration of mycobacterial cord factor (trehalose 6,6'-dimycolate). *Infection and Immunity*, 65(5), 1793–1799. <https://doi.org/10.1128/iai.65.5.1793-1799.1997>
- P. Ling, J. Flynn. (2012). Understanding Latent Tuberculosis: A Moving Target. *Journal of Immunology*, 185(1), 15–22. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903856>.Understanding
- Pai, M., Behr, M. A., Dowdy, D., Dheda, K., Divangahi, M., Boehme, C. C., Ginsberg, A., Swaminathan, S., Spigelman, M., Getahun, H., Menzies, D., & Raviglione, M. (2016). Tuberculosis. *Nature Reviews Disease Primers*, 2. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.76>
- Pai, M., Zwerling, A., & Menzies, D. (2008). Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: An update. *Annals of Internal Medicine*, 149(3), 177–184. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-149-3-200808050-00241>
- Palomino, J. C., Martin, A., Von Groll, A., & Portaels, F. (2008). Rapid culture-based methods for drug-resistance detection in Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Microbiological Methods*, 75(2), 161–166. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.06.015>

- Pande, T., Pai, M., Khan, F. A., & Denking, C. M. (2015). Use of chest radiography in the 22 highest tuberculosis burden countries. *European Respiratory Journal*, 46(6), 1816–1819. <https://doi.org/10.1183/13993003.01064-2015>
- Pandey, P., Bhatnagar, A. K., Mohan, A., Sachdeva, K. S., Vajpayee, M., Das, B. K., & Samantaray, J. C. (2019). Insights in Tuberculosis Immunology : Role of NKT and T Regulatory Cells. *Int J Mycobacteriol*, 8, 333–340. <https://doi.org/10.4103/ijmy.ijmy>
- Pera, A., Campos, C., López, N., Hassounah, F., Alonso, C., Tarazona, R., & Solana, R. (2015). Immunosenescence: Implications for response to infection and vaccination in older people. *Maturitas*. <https://doi.org/10.7748/ns2001.03.15.27.40.c3000>
- Pérez-de-Heredia, F., Gómez-Martínez, S., Díaz, L. E., Veses, A. M., Nova, E., Wärnberg, J., Huybrechts, I., Vyncke, K., Androutsos, O., Ferrari, M., Palacios, G., Wastlund, A., Kovács, É., Gottrand, F., González-Gross, M., Castillo, M. J., Sjöström, M., Manios, Y., Kafatos, A., ... Marcos, A. (2015). Influence of sex, age, pubertal maturation and body mass index on circulating white blood cell counts in healthy European adolescents—the HELENA study. *European Journal of Pediatrics*, 174(8), 999–1014. <https://doi.org/10.1007/s00431-015-2497-5>
- Pérez-Guzmán, C., Vargas, M. H., Torres-Cruz, A., & Villarreal-Velarde, H. (1999). Does aging modify pulmonary tuberculosis?: A meta-analytical review. *Chest*, 116(4), 961–967. <https://doi.org/10.1378/chest.116.4.961>
- Philips, J. A., & Ernst, J. D. (2012). Tuberculosis pathogenesis and immunity. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 7, 353–384. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011811-132458>
- Piersimani, C., & Scarparo, C. (2003). Relevance of Commercial Amplification Methods for Direct Detection of Mycobacterium tuberculosis Complex in Clinical Samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(12), 5355–5365. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.12.5355-5365.2003>
- Place, S., Verscheure, V., De San, N., Jean-Michel Hougardy, Schepers, K., Dirix, V., Dediste, A., Michel, O., Drowart, A., Allard, S. D., Doherty, T. M., Lecher, S., Locht, C., & Mascart, F. (2010). Heparin-binding, hemagglutinin-specific IFN- γ synthesis at the site of infection during active tuberculosis in humans. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 182(6), 848–854. <https://doi.org/10.1164/rccm.201001-0083OC>
- PNLT. (2016). *Plan stratégique national pour la prévention et le contrôle de la tuberculose au Maroc 2018-2021*.
- Pollock, K. M., Whitworth, H. S., Montamat-Sicotte, D. J., Grass, L., Cooke, G. S., Kapembwa, M. S., Kon, O. M., Sampson, R. D., Taylor, G. P., & Lalvani, A. (2013). T-cell immunophenotyping distinguishes active from latent tuberculosis. *The Journal of Infectious Diseases*, 208(6), 952–968. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit265>
- Powrie, F., Menon, S., & Coffman, R. L. (1993). Interleukin-4 and interleukin-10 synergize to inhibit cell-mediated immunity in vivo *. *European Journal of Immunology*, 23, 3043–3049.
- Prelog, M. (2005). Aging of the immune system : A risk factor for autoimmunity ? *Autoimmunity Reviews*, 5(2), 136–139. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2005.09.008>
- Qin, L., Jing, X., Qiu, Z., Cao, W., Jiao, Y., Routy, J. P., & Li, T. (2016). Aging of immune system: Immune signature from peripheral blood lymphocyte subsets in 1068 healthy Adults Ling. 8(2), 1–12.

- Qiu, Z., Zhang, M., Zhu, Y., Zheng, F., Lu, P., Liu, H., Graner, M. W., Zhou, B., & Chen, X. (2012). Multifunctional CD4 T cell responses in patients with active tuberculosis. *Scientific Reports*, 2, 2–7. <https://doi.org/10.1038/srep00216>
- R E. Van Scoy, C. J. W. I. (1999). Antimycobacterial Therapy. *Mayo Clinic Proceedings*, 74, 1038–1048. <https://doi.org/10.4065/73.10.994>
- Raja, A. (2004). Immunology of tuberculosis. *Indian J Med Res*, 120(October), 213–232.
- Ramakrishnan, L. (2012). Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nature Reviews Immunology*, 12(5), 352–366. <https://doi.org/10.1038/nri3211>
- Randhawa, P. S. (1990). Lymphocyte subsets in granulomas of human tuberculosis: An in situ immunofluorescence study using monoclonal antibodies. *Pathology*, 22(3), 153–155. <https://doi.org/10.3109/00313029009063555>
- Redford, P. S., Murray, P. J., & O’Garra, A. (2011). The role of IL-10 in immune regulation during M. tuberculosis infection. *Mucosal Immunology*, 4(3), 261–270. <https://doi.org/10.1038/mi.2011.7>
- Reiley, W. W., Calayag, M. D., Wittmer, S. T., Huntington, J. L., Pearl, J. E., Fountain, J. J., Martino, C. A., Roberts, A. D., Cooper, A. M., Winslow, G. M., & Woodland, D. L. (2008). ESAT-6-specific CD4 T cell responses to aerosol Mycobacterium tuberculosis infection are initiated in the mediastinal lymph nodes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(31), 10961–10966. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801496105>
- Reljic, R., Paul, M. J., & Arias, M. A. (2009). Cytokine therapy of tuberculosis at the crossroads. *Expert Review of Respiratory Medicine*, 3(1), 53–66. <https://doi.org/10.1586/17476348.3.1.53>
- Ribeiro-Rodrigues, R., Resende Co, T., Rojas, R., Toossi, Z., Dietze, R., Boom, W. H., Maciel, E., & Hirsch, C. S. (2006). A role for CD4+ CD25+ T cells in regulation of the immune response during human tuberculosis. *Clinical and Experimental Immunology*, 144(1), 25–34. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03027.x>
- Richardson, E. T., Shukla, S., Sweet, D. R., Wearsch, P. A., Tsichlis, P. N., Henry Boom, W., & Harding, C. V. (2015). Toll-like receptor 2-dependent extracellular signal-regulated kinase signaling in Mycobacterium tuberculosis-infected macrophages drives anti-inflammatory responses and inhibits Th1 polarization of responding T cells. *Infection and Immunity*, 83(6), 2242–2254. <https://doi.org/10.1128/IAI.00135-15>
- Rijnink, W. F., Ottenhoff, T. H. M., & Joosten, S. A. (2021). B-Cells and Antibodies as Contributors to Effector Immune Responses in Tuberculosis. *Frontiers in Immunology*, 12(February), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.640168>
- Riou, C., Gray, C. M., Lugongolo, M., Gwala, T., Kiravu, A., Deniso, P., Stewart-Isherwood, L., Omar, S. V., Grobusch, M. P., Coetzee, G., Conradie, F., Ismail, N., Kaplan, G., & Fallows, D. (2014). A subset of circulating blood mycobacteria-specific CD4 T cells can predict the time to Mycobacterium tuberculosis sputum culture conversion. *PLoS ONE*, 9(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102178>
- Roach, D. R., Bean, A. G. D., Demangel, C., France, M. P., Briscoe, H., & Britton, W. J. (2002). TNF Regulates Chemokine Induction Essential for Cell Recruitment, Granuloma Formation, and Clearance of Mycobacterial Infection. *The Journal of Immunology*, 168, 4620–4527.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.9.4620>

- Rodrigues, D. S. S., Medeiros, E. A. S., Weckx, L. Y., Bonnez, W., & Salomão, R. (2002). Immunophenotypic characterization of peripheral T lymphocytes in Mycobacterium tuberculosis infection and disease. *Clin Exp Immuno*, 128, 149–154.
- Rodrigues, L. C., Diwan, V. K., & Wheeler, J. G. (1993). Protective effect of bcg against tuberculous meningitis and miliary tuberculosis: A meta-analysis. *International Journal of Epidemiology*, 22(6), 1154–1158. <https://doi.org/10.1093/ije/22.6.1154>
- Rojas, R. E., Balaji, K. N., Subramanian, A., & Boom, W. H. (1999). Regulation of human CD4+ $\alpha\beta$ T-cell-receptor-positive (TCR+) and $\gamma\delta$ TCR+ T-cell responses to Mycobacterium tuberculosis by interleukin-10 and transforming growth factor β . *Infection and Immunity*, 67(12), 6461–6472. <https://doi.org/10.1128/iai.67.12.6461-6472.1999>
- Roy, S., Barnes, P. F., Garg, A., Wu, S., Cosman, D., & Vankayalapati, R. (2008). NK Cells Lyse T Regulatory Cells That Expand in Response to an Intracellular Pathogen. *The Journal of Immunology*, 180(3), 1729–1736. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.3.1729>
- Rozot, V., Vigano, S., Mazza-Stalder, J., Idrizi, E., Day, C. L., Perreau, M., Lazor-Blanchet, C., Petruccioli, E., Hanekom, W., Goletti, D., Bart, P. A., Nicod, L., Pantaleo, G., & Harari, A. (2013). Mycobacterium tuberculosis-specific CD8+ T cells are functionally and phenotypically different between latent infection and active disease. *European Journal of Immunology*, 43(6), 1568–1577. <https://doi.org/10.1002/eji.201243262>
- Russell, D. G., Cardona, P.-J., Kim, M.-J., Allain, S., & Altare, F. (2009). Foamy macrophages and the progression of the human TB granuloma. *Nature Immunology*, 10(9), 943–948. <https://doi.org/10.1038/ni.1781>
- Sahmoudi, K., Abbassi, H., Bouklata, N., El Alami, M. N., Sadak, A., Burant, C., Henry Boom, W., El Aouad, R., Canaday, D. H., & Seghrouchni, F. (2018). Immune activation and regulatory T cells in Mycobacterium tuberculosis infected lymph nodes. *BMC Immunology*, 19(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12865-018-0266-8>
- Sakamoto, K. (2012). The Pathology of Mycobacterium tuberculosis Infection. *Veterinary Pathology Online*, 49(3), 423–439. <https://doi.org/10.1177/0300985811429313>
- Salo, W. L., Aufderheide, A. C., Buikstra, J., & Holcomb, T. A. (1994). Identification of Mycobacterium tuberculosis DNA in a pre-Columbian Peruvian mummy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(6), 2091–2094. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.6.2091>
- Salomon, J. A., Lloyd-Smith, J. O., Getz, W. M., Resch, S., Sánchez, M. S., Porco, T. C., & Borgdorff, M. W. (2006). Prospects for advancing tuberculosis control efforts through novel therapies. *PLoS Medicine*, 3(8), 1302–1309. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030273>
- Saltini, C. (2006). Chemotherapy and diagnosis of tuberculosis. *Respiratory Medicine*, 100(12), 2085–2097. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2006.09.015>
- Sampath, P., Periyasamy, K. M., Ranganathan, U. D., & Bethunaickan, R. (2021). Monocyte and Macrophage miRNA: Potent Biomarker and Target for Host-Directed Therapy for Tuberculosis. *Frontiers in Immunology*, 12(June), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.667206>

- SANTAGOSTINO, A., GARBACCIO, G., PISTORIO, A., BOLIS, V., GIOVANNI CAMISASCA, P. P., & GIROTTO, M. (1999). An Italian national multicenter study for the definition of reference ranges for normal values of peripheral blood lymphocyte subsets in healthy adults. *Haematologica*, 84, 499–504.
- Santner-Nanan, B., Seddiki, N., Zhu, E., Quent, V., Kelleher, A., De St Groth, B. F., & Nanan, R. (2008). Accelerated age-dependent transition of human regulatory T cells to effector memory phenotype. *International Immunology*, 20(3), 375–383. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxm151>
- Saule, P., Trauet, J., Dutriez, V., Dessaint, J., & Labalette, M. (2006). Accumulation of memory T cells from childhood to old age : Central and effector memory cells in CD4 + versus effector memory and terminally differentiated memory cells in CD8 + compartment. *Mechanisms of Ageing and Development*, 127, 274–281. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2005.11.001>
- Schaible, U. E., Winau, F., Sieling, P. A., Fischer, K., Collins, H. L., Hagens, K., Modlin, R. L., Brinkmann, V., & Kaufmann, S. H. E. (2003). *Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC-I and CD1 in tuberculosis*. 9(8), 1039–1046.
- Schatz, A., Bugie, E., & Waksman, S. A. (2005). Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria. 1944. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 437, 3–6. <https://doi.org/10.1097/01.blo.0000175887.98112.fe>
- Schierloh, P., Yokobori, N., Alemán, M., Musella, R. M., Beigier-Bompadre, M., Saab, M. A., Alves, L., Abbate, E., de la Barrera, S. S., & Sasiain, M. C. (2005). Increased Susceptibility to Apoptosis of CD56 dim CD16 + NK Cells Induces the Enrichment of IFN- γ -Producing CD56 bright Cells in Tuberculous Pleurisy . *The Journal of Immunology*, 175(10), 6852–6860. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.10.6852>
- Schluger, N. W., & Rom, W. N. (1998). State of the Art The Host Immune Response to Tuberculosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 157, 679–691.
- Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T., & Hume, D. A. (2004). Interferon- γ : an overview of signals , mechanisms and functions. *Journal of Leucocyte Biology*, 75(February), 163–189. <https://doi.org/10.1189/jlb.0603252.Journal>
- Schwander, S., & Dheda, K. (2011). Human Lung Immunity against Mycobacterium tuberculosis Insights into Pathogenesis and Protection. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 183, 696–707. <https://doi.org/10.1164/rccm.201006-0963PP>
- Scott-Browne, J. P., Shafiani, S., Tucker-Heard, G., Ishida-Tsubota, K., Fontenot, J. D., Rudensky, A. Y., Bevan, M. J., & Urdahl, K. B. (2007). Expansion and function of Foxp3-expressing T regulatory cells during tuberculosis. *Journal of Experimental Medicine*, 204(9), 2159–2169. <https://doi.org/10.1084/jem.20062105>
- Seah, G. T., Scott, G. M., & Rook, G. A. W. (2000). Type 2 cytokine gene activation and its relationship to extent of disease in patients with tuberculosis. *Journal of Infectious Diseases*, 181(1), 385–389. <https://doi.org/10.1086/315200>
- Seder, R. A., Darrah, P. A., & Roederer, M. (2008). T-cell quality in memory and protection: Implications for vaccine design. *Nature Reviews Immunology*, 8(4), 247–258. <https://doi.org/10.1038/nri2274>
- Segal, A. W. (2005). How neutrophils kill microbes. *Annual Review of Immunology*, 23, 197–223. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115653>

- Sei, W. L., Young, A. K., Young, S. Y., Um, S. W., Sang, M. L., Yoo, C. G., Young, W. K., Sung, K. H., Shim, Y. S., & Yim, J. J. (2006). The prevalence and evolution of anemia associated with tuberculosis. *Journal of Korean Medical Science*, 21(6), 1028–1032. <https://doi.org/10.3346/jkms.2006.21.6.1028>
- Semple, P. L., Binder, A. B., Davids, M., Maredza, A., Van Zyl-Smit, R. N., & Dheda, K. (2013). Regulatory T cells attenuate mycobacterial stasis in alveolar and blood-derived macrophages from patients with tuberculosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 187(11), 1249–1258. <https://doi.org/10.1164/rccm.201210-1934OC>
- Serbina, N. V., & Flynn, J. L. (1999). Early emergence of CD8⁺ T cells primed for production of type 1 cytokines in the lungs of Mycobacterium tuberculosis-infected mice. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases*, 67(4 SUPPL.), 509–510.
- Serbina, Natalya V., Liu, C.-C., Scanga, C. A., & Flynn, J. L. (2000). CD8 + CTL from Lungs of Mycobacterium tuberculosis -Infected Mice Express Perforin In Vivo and Lyse Infected Macrophages . *The Journal of Immunology*, 165(1), 353–363. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.1.353>
- Serbina, Natalya V., & Flynn, J. O. A. L. (2001). CD8 ϵ T Cells Participate in the Memory Immune Response to Mycobacterium tuberculosis. 69(7), 4320–4328. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.7.4320>
- Serbina, Natalya V, Lazarevic, V., & Flynn, J. L. (2001). CD4 + T Cells Are Required for the Development of Cytotoxic CD8 + T Cells During Mycobacterium tuberculosis Infection. *The Journal of Immunology*, 167, 6991–7000. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.12.6991>
- Shafiani, S., Tucker-Heard, G., Kariyone, A., Takatsu, K., & Urdahl, K. B. (2010). Pathogen-specific regulatory T cells delay the arrival of effector T cells in the lung during early tuberculosis. *Journal of Experimental Medicine*, 207(7), 1409–1420. <https://doi.org/10.1084/jem.20091885>
- Sharma, P. K., Saha, P. K., Singh, A., Sharma, S. K., Ghosh, B., & Mitra, D. K. (2009). FoxP3⁺ regulatory T cells suppress effector T-cell function at pathologic site in miliary tuberculosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 179(11), 1061–1070. <https://doi.org/10.1164/rccm.200804-529OC>
- Shin, H., & Wherry, E. J. (2007). CD8 T cell dysfunction during chronic viral infection. *Current Opinion in Immunology*, 19(4), 408–415. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2007.06.004>
- Sia, J. K., & Rengarajan, J. (2019). Immunology of Mycobacterium tuberculosis infections. *Microbiol Spectr*, 7(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0022-2018>
- Silva, B. D. de S., Trentini, M. M., da Costa, A. C., Kipnis, A., & Junqueira-Kipnis, A. P. (2014). Different phenotypes of CD8⁺ T cells associated with bacterial load in active tuberculosis. *Immunology Letters*, 160(1), 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2014.03.009>
- Singhal, M., Banavalikar, J. N., & Saha, K. (1989). Peripheral blood 1 lymphocyte subpopulations in patients with tuberculosis and the effect of chemotherapy. *Tubercle*, 171–178.
- Sloot, R., Van Der Loeff, M. F. S., Kouw, P. M., & Borgdorff, M. W. (2014). Risk of tuberculosis after recent exposure: A 10-year follow-up study of contacts in Amsterdam. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 190(9), 1044–1052. <https://doi.org/10.1164/rccm.201406-1159OC>
- Smith, S. M., Klein, M. R., Malin, A. S., Sillah, J., Huygen, K., Andersen, P., McAdam, K. P. W. J., & Dockrell, H. M. (2000). Human CD8⁺ T cells specific for Mycobacterium tuberculosis secreted antigens in

- tuberculosis patients and healthy BCG-vaccinated controls in the Gambia. *Infection and Immunity*, 68(12), 7144–7148. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.12.7144-7148.2000>
- Solana, R., Campos, C., Pera, A., & Tarazona, R. (2014). Shaping of NK cell subsets by aging. *Current Opinion in Immunology*, 29(1), 56–61. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.04.002>
- Solana, R., & Mariani, E. (2000). NK and NK/T cells in human senescence. *Vaccine*, 18(16), 1613–1620. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(99\)00495-8](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(99)00495-8)
- Sousa, A. O., Salem, J. I., Lee, F. K., Vercosa, M. C., Cruaud, P., Bloom, B. R., Lagrange, P. H., & David, H. L. (1997). An epidemic of tuberculosis with a high rate of tuberculin anergy among a population previously unexposed to tuberculosis, the Yanomami Indians of the Brazilian Amazon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(24), 13227–13232. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.24.13227>
- Sousa, Alexandra O., Mazzaccaro, R. J., Russell, R. G., Lee, F. K., Turner, O. C., Hong, S., Van Kaer, L., & Bloom, B. R. (2000). Relative contributions of distinct MHC class I-dependent cell populations in protection to tuberculosis infection in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(8), 4204–4208. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.8.4204>
- Srivastava, S., & Ernst, J. D. (2014). *Cell-to-Cell Transfer of M. tuberculosis*. 741–752.
- Stefan, K. (1993). *Immunity To Intracellular*.
- Steingart, K. R., Henry, M., Ng, V., Hopewell, P. C., Ramsay, A., Cunningham, J., Urbanczik, R., Perkins, M., Aziz, M. A., & Pai, M. (2006). Fluorescence versus conventional sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infectious Diseases*, 6(9), 570–581. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70578-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70578-3)
- Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Experimental Hematology*, 26(8), 681.
- Stenger, S., Hanson, D. A., Teitelbaum, R., Dewan, P., Niazi, K. R., Froelich, C. J., Ganz, T., Thoma-Uszynski, S., Melián, A., Bogdan, C., Porcelli, S. A., Bloom, B. R., Krensky, A. M., & Modlin, R. L. (1998). An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science*, 282(5386), 121–125. <https://doi.org/10.1126/science.282.5386.121>
- Stenger, S., Mazzaccaro, R. J., Uyemura, K., Sette, A., Brenner, M. B., & Porcelli, S. A. (1997). *Differential Effects of Cytolytic T Cell Subsets on Intracellular Infection*. 276(1 972), 11–14.
- Stenger, S., Niazi, K. R., & Modlin, R. L. (1998). Down-regulation of CD1 on antigen-presenting cells by infection with Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Immunology*, 161(7), 3582–3588.
- Stringari, L. L., Covre, L. P., da Silva, F. D. C., de Oliveira, V. L., Campana, M. C., Hadad, D. J., Palaci, M., Salgame, P., Dietze, R., Gomes, D. C. de O., & Ribeiro-Rodrigues, R. (2021). Increase of cd4+cd25highfoxp3+ cells impairs in vitro human microbicidal activity against mycobacterium tuberculosis during latent and acute pulmonary tuberculosis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 15(7), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009605>
- Sutherland, J. S., Adetifa, I. M., Hill, P. C., Adegbola, R. A., & Ota, M. O. C. (2009). Pattern and diversity of cytokine production differentiates between Mycobacterium tuberculosis infection and disease. *European Journal of Immunology*, 39(3), 723–729. <https://doi.org/10.1002/eji.200838693>

- Sutherland, J. S., Hill, P. C., Adetifa, I. M., Jong, B. C. De, Donkor, S., Joosten, S. A., Opmeer, L., Haks, M. C., Ottenhoff, T. H. M., Adegbola, R. A., & Ota, M. O. C. (2011). Identification of Probable Early-Onset Biomarkers for Tuberculosis Disease Progression. *PLoS ONE*, 6(9), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025230>
- Tallieux, L., Schwartz, O., Herrmann, J. L., Pivert, E., Jackson, M., Amara, A., Legres, L., Dreher, D., Nicod, L. P., Gluckman, J. C., Lagrange, P. H., Gicquel, B., & Neyrolles, O. (2003). DC-SIGN is the major Mycobacterium tuberculosis receptor on human dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine*, 197(1), 121–127. <https://doi.org/10.1084/jem.20021468>
- Tascon, R. E., Stavropoulos, E., Lukacs, K. V., & Colston, M. J. (1998). Protection against Mycobacterium tuberculosis infection by CD8+ T cells requires the production of gamma interferon. *Infection and Immunity*, 66(2), 830–834. <https://doi.org/10.1128/iai.66.2.830-834.1998>
- Taylor, A. W. (2008). Review of the activation of TGF- in immunity. *Journal of Leukocyte Biology*, 85(1), 29–33. <https://doi.org/10.1189/jlb.0708415>
- Tiberi, S., du Plessis, N., Walzl, G., Vjecha, M. J., Rao, M., Ntouni, F., Mfinanga, S., Kapata, N., Mwaba, P., McHugh, T. D., Ippolito, G., Migliori, G. B., Maeurer, M. J., & Zumla, A. (2018). Tuberculosis: progress and advances in development of new drugs, treatment regimens, and host-directed therapies. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(7), e183–e198. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30110-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30110-5)
- Tollerud, D. J., Clark, J. W., Brown, L. M., Neuland, C. Y., Mann, D. L., Pankiw-trost, L. K., Blattner, W. A., & Hoover, R. N. (1989). The Effects of Cigarette Smoking on T Cell Subsets A Population-based Survey of Healthy Caucasians. *American Review of Respiratory Disease*, 139, 1148–1454.
- Tollerud, D. J., Ildstad, S. T., Brown, L. M., Clark, J. W., Blattner, W. A., Mann, D. L., Neuland, C. Y., Pankiw-trost, L., & Hoover, R. N. (1990). T-Cell Subsets in Healthy Teenagers: Transition to the Adult Phenotype. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 56, 88–96.
- Toossi, Z., Hirsch, C. S., Wu, M., Mayanja-Kizza, H., Baseke, J., & Thiel, B. (2011). Distinct cytokine and regulatory T cell profile at pleural sites of dual HIV/tuberculosis infection compared to that in the systemic circulation. *Clinical and Experimental Immunology*, 163(3), 333–338. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2010.04269.x>
- Topham, N. J., & Hewitt, E. W. (2009). Natural killer cell cytotoxicity: How do they pull the trigger? *Immunology*, 128(1), 7–15. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03123.x>
- Torres, A. J. L., Angelo, A. L. D., Silva, M. O., Bastos, M. de C., de Souza, D. F., Inocência, L. A., de Lemos, J. A. R., Junior, R. S., de Castro, A. C., Palma, P. V. B., Ceci, L., Netto, E. M., & Brites, C. (2013). ESTABLISHING THE REFERENCE RANGE FOR T LYMPHOCYTES SUBPOPULATIONS IN ADULTS AND CHILDREN FROM BRAZIL. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 55(5), 323–328. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652013000500005>
- Tortoli, E., Cichero, P., Piersimoni, C., Simonetti, M. T., Gesu, G., & Nista, D. (1999). Use of BACTEC MGIT 960 for recovery of mycobacteria from clinical specimens: Multicenter study. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(11), 3578–3582. <https://doi.org/10.1128/jcm.37.11.3578-3582.1999>
- Touil, N., Hadeif, R., Lemnouer, A., Zrara, A., Sbair, A. I., Belfquih, B., Mrani, S., Benkirane, A., Ouahline, M., & Mrabet, M. (2012). Range-reference determination of lymphocyte subsets in Moroccan blood donors. *African Health Sciences*, 12(3), 334–338. <https://doi.org/10.4314/ahs.v12i3.14>

- Travis, M. A., & Sheppard, D. (2014). TGF- β activation and function in immunity. *Annual Review of Immunology*, 32(November 2013), 51–82. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120257>
- Tsai, M. C., Chakravarty, S., Zhu, G., Xu, J., Tanaka, K., Koch, C., Tufariello, J., Flynn, J., & Chan, J. (2006). Characterization of the tuberculous granuloma in murine and human lungs : cellular composition and relative tissue oxygen tension. *Cellular Microbiology*, 8(September 2005), 218–232. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00612.x>
- Turley, S. J., Inaba, K., Garrett, W. S., Ebersold, M., Steinman, R. M., Mellman, I., Turley, S. J., Inaba, K., Garrett, W. S., & Mellman, I. (2016). *Transport of Peptide : MHC Class II Complexes in Developing Dendritic Cells Published by : American Association for the Advancement of Science Linked references are available on JSTOR for this article : Transport of Peptide-MHC Class II Complexes in Devel.* 288(5465), 522–527.
- Turner, R. D., Chiu, C., Churchyard, G. J., Esmail, H., Lewinsohn, D. M., Gandhi, N. R., & Fennelly, K. P. (2017). Tuberculosis Infectiousness and Host Susceptibility. *Journal of Infectious Diseases*, 216(January), S636–S643. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix361>
- Valiathan, R., Deeb, K., Diamante, M., Ashman, M., Sachdeva, N., & Asthana, D. (2014a). Reference ranges of lymphocyte subsets in healthy adults and adolescents with special mention of T cell maturation subsets in adults of South Florida. *Immunobiology*, 219(7), 487–496. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2014.02.010>
- Valiathan, R., Deeb, K., Diamante, M., Ashman, M., Sachdeva, N., & Asthana, D. (2014b). Reference ranges of lymphocyte subsets in healthy adults and adolescents with special mention of T cell maturation subsets in adults of South Florida. *Immunobiology*, 219(7), 487–496. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2014.02.010>
- Van Crevel, R., Kleinnijenhuis, J., Oosting, M., Joosten, L. A. B., & Netea, M. G. (2011). Innate immune recognition of mycobacterium tuberculosis. *Clinical and Developmental Immunology*, 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/405310>
- Van Pinxteren, L. A. H., Cassidy, J. P., Smedegaard, B. H. C., Agger, E. M., & Andersen, P. (2000). Control of latent Mycobacterium tuberculosis infection is dependent on CD8 T cells. *European Journal of Immunology*, 30(12), 3689–3698. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200012\)30:12<3689::AID-IMMU3689>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200012)30:12<3689::AID-IMMU3689>3.0.CO;2-4)
- Van rie, A., Warren, R., Richardson, M., Victor, T., Gie, R. P., Enarson, donald A., Beyers, N., & van helden, P. D. (1999). EXOGENOUS REINFECTION AS A CAUSE OF RECURRENT TUBERCULOSIS AFTER CURATIVE TREATMENT. *The New England Journal of Medicine*, 341, 1174–1179.
- Vankayalapati, R., Garg, A., Porgador, A., Griffith, D. E., Klucar, P., Safi, H., Girard, W. M., Cosman, D., Spies, T., & Barnes, P. F. (2005). Role of NK Cell-Activating Receptors and Their Ligands in the Lysis of Mononuclear Phagocytes Infected with an Intracellular Bacterium. *The Journal of Immunology*, 175(7), 4611–4617. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.7.4611>
- Vankayalapati, R., Klucar, P., Wizel, B., Weis, S. E., Samten, B., Safi, H., Shams, H., & Barnes, P. F. (2004). NK Cells Regulate CD8 + T Cell Effector Function in Response to an Intracellular Pathogen . *The Journal of Immunology*, 172(1), 130–137. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.1.130>
- Vankayalapati, R., Wizel, B., Weis, S. E., Safi, H., Lakey, D. L., Mandelboim, O., Samten, B., Porgador, A., &

- Barnes, P. F. (2002). The NKp46 Receptor Contributes to NK Cell Lysis of Mononuclear Phagocytes Infected with an Intracellular Bacterium. *The Journal of Immunology*, 168(7), 3451–3457. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.7.3451>
- Verrall, A. J., G. Netea, M., Alisjahbana, B., Hill, P. C., & van Crevel, R. (2014). Early clearance of Mycobacterium tuberculosis: A new frontier in prevention. *Immunology*, 141(4), 506–513. <https://doi.org/10.1111/imm.12223>
- Verthelyi, D. (2001). Sex hormones as immunomodulators in health and disease. *International Immunopharmacology*, 1(6), 983–993. [https://doi.org/10.1016/S1567-5769\(01\)00044-3](https://doi.org/10.1016/S1567-5769(01)00044-3)
- Vieira, P., De Waal-Malefyt, R., Dang, M. N., Johnson, K. E., Kastelein, R., Fiorentino, D. F., DeVries, J. E., Roncarolo, M. G., Mosmann, T. R., & Moore, K. W. (1991). Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor cDNA clones: Homology to Epstein-Barr virus open reading frame BCRF1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(4), 1172–1176. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.4.1172>
- Vincent, V., Martin, C., & Denis, F. (2004). Bactériologie fondamentale : Aspects récents. In F. Denis & C. Perrone (Eds.), *Mycobacterium tuberculosis et mycobactéries atypiques* (pp. 117–138). Elsevier.
- Vliet, H. J. J. Van Der, Molling, J. W., Blomberg, B. M. E. Von, Nishi, N., Ko, W., Eertwegh, A. J. M. Van Den, Pinedo, H. M., Giaccone, G., & Scheper, R. J. (2004). The immunoregulatory role of CD1d-restricted natural killer T cells in disease. *Clinical Immunology*, 112, 8–23. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2004.03.003>
- Voskuil, M. I., Bartek, I. L., Visconti, K., & Schoolnik, G. K. (2011). The response of Mycobacterium tuberculosis to reactive oxygen and nitrogen species. *Frontiers in Microbiology*, 2(MAY). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00105>
- Wack, A., & Rappuoli, R. (2005). Vaccinology at the beginning of the 21st century. *Current Opinion in Immunology*, 17(4 SPEC. ISS.), 411–418. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2005.05.005>
- Wajant, H., Pfizenmaier, K., & Scheurich, P. (2003). Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death and Differentiating*, 10, 45–65. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401189>
- Wang, T., Lv, M., Qian, Q., Nie, Y., Yu, L., & Hou, Y. (2011). Increased frequencies of T helper type 17 cells in tuberculous pleural effusion. *Tuberculosis*, 91(3), 231–237. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2011.02.002>
- Wang, X., Cao, Z., Jiang, J., Niu, H., Dong, M., Tong, A., & Cheng, X. (2010). Association of mycobacterial antigen-specific CD4+ memory T cell subsets with outcome of pulmonary tuberculosis. *Journal of Infection*, 60(2), 133–139. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2009.10.048>
- Warren, J. R., Bhattacharya, M., De Almeida, K. N. F., Trakas, K., & Peterson, L. R. (2000). A minimum 5.0 ml of sputum improves the sensitivity of acid-fast smear for Mycobacterium tuberculosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 161(5), 1559–1562. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.161.5.9908063>
- Weiskopf, D., Weinberger, B., & Grubeck-loebenstein, B. (2009). The aging of the immune system. *Transplant International*, 22, 1041–1050. <https://doi.org/10.1111/j.1432-2277.2009.00927.x>
- Weiss, G. E., Crompton, P. D., Li, S., Walsh, L. A., Moir, S., Traore, B., Kayentao, K., Ongoiba, A., Doumbo, O.

- K., & Pierce, S. K. (2009). Atypical Memory B Cells are Greatly Expanded in Individuals Living in a Malaria-endemic Area. *Journal of Immunology*, 183(3), 2176–2182. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901297>.Atypical
- Wergeland, I., Amus, J., & Dyrhol-Riise, A. M. (2011). T Regulatory Cells and Immune Activation in Mycobacterium tuberculosis Infection and the Effect of Preventive Therapy. *Scandinavian Journal of Immunology*, 73(3), 234–242. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2010.02496.x>
- Wergeland, I., Aßmus, J., & Dyrhol-riise, A. M. (2011). T Regulatory Cells and Immune Activation in Mycobacterium tuberculosis Infection and the Effect of Preventive Therapy. *Clinical Immunology*, 73, 234–242. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2010.02496.x>
- Wilkinson, K. A., Wilkinson, H. J., Pathan, A., Ewer, K., Prakash, M., Klenerman, P., Maskell, N., Davies, R., Pasvol, G., & Lalvani, A. (2005). Ex vivo characterization of early secretory antigenic target 6-specific T cells at sites of active disease in pleural tuberculosis. *Clinical Infectious Diseases*, 40(1), 184–187. <https://doi.org/10.1086/426139>
- Wolf, A. J., Desvignes, L., Linas, B., Banaiee, N., Tamura, T., Takatsu, K., & Ernst, J. D. (2008). Initiation of the adaptive immune response to Mycobacterium tuberculosis depends on antigen production in the local lymph node, not the lungs. *Journal of Experimental Medicine*, 205(1), 105–115. <https://doi.org/10.1084/jem.20071367>
- Wozniak, T. M., Saunders, B. M., Ryan, A. A., & Britton, W. J. (2010). Mycobacterium bovis BCG-Specific Th17 Cells Confer Partial Protection against Mycobacterium tuberculosis Infection in the Absence of Gamma Interferon γ . *Infection and Immunity*, 78(10), 4187–4194. <https://doi.org/10.1128/IAI.01392-09>
- Wu, Q., Huang, Y., Zhou, Y., Zhou, G., Wu, H., & He, J. (2021). Study of the association of interferon- γ gene polymorphisms and Th1/Th2 balance in tuberculosis susceptibility. *American Journal of Translational Research*, 13(5), 5533–5539.
- Yaman, A., Çetiner, S., Kibar, F., Taşova, Y., Şeydaoğlu, G., & Dündar, I. H. (2005). Reference ranges of lymphocyte subsets of healthy adults in Turkey. *Medical Principles and Practice*, 14(3), 189–193. <https://doi.org/10.1159/000084638>
- Yang, J., Zhifeng, Q. I. U., Jing, X. I. E., Dongjing, L. I., & Taisheng, L. I. (2009). Reference ranges and age-related changes of peripheral blood lymphocyte subsets in Chinese healthy adults. *Science in China Series C: Life Sciences*, 52(7), 643–650. <https://doi.org/10.1007/s11427-009-0086-4>
- Ye, W. U., Hang, S. W. Z., Eng, W. G. P., Ks, L. I., Iang, J. K. J., & In, J. H. L. (2009). Changes in Lymphocyte Subsets in the Peripheral Blood of Patients with Active Pulmonary Tuberculosis. *The Journal of International Medical Research*, 1742–1749.
- Yeon, J. J., & Lee, K. S. (2008). Pulmonary tuberculosis: Up-to-date imaging and management. *American Journal of Roentgenology*, 191(3), 834–844. <https://doi.org/10.2214/AJR.07.3896>
- Yoon, S. R., Kim, T. D., & Choi, I. (2015). Understanding of molecular mechanisms in natural killer cell therapy. *Experimental and Molecular Medicine*, 47(2). <https://doi.org/10.1038/emm.2014.114>
- Young, J. M., Adetifa, I. M. O., Ota, M. O. C., & Sutherland, J. S. (2010). Expanded polyfunctional T cell response to mycobacterial antigens in TB disease and contraction post-treatment. *PLoS ONE*, 5(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011237>

Zhang, R., Zheng, X., Li, B., Wei, H., & Tian, Z. (2006). Human NK Cells Positively Regulate $\gamma\delta$ T Cells in Response to Mycobacterium tuberculosis . *The Journal of Immunology*, 176(4), 2610–2616. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.4.2610>

Webographie

- https://www.libe.ma/Souvenirs-d-un-long-sejour-au-sanatorium-de-Bensmim_a69307.html (Dernière consultation le 10 Décembre 2020)
- <https://www.hopkinsmedicine.org/news/newsroom/news-releases/research-story-tip-international-johns-hopkins-study-says-broad-measures-needed-to-prevent-tb-spread-in-india> (Dernière consultation le 10 Décembre 2020)

ANNEXES

Annexe 1 : Fiches d'exploitations des patients

Fiche d'exploitation pour les sujets contrôles sains non exposés

N° de recrutement :

Collez ici un exemplaire de l'étiquette autocollante

date de recrutement :

j j m m a a

1- Critères d'inclusion

- ☐ Age ≥ 18 ans
- ☐ Volontaire cliniquement sain.
- ☐ Consentement éclairé

2- Critères d'exclusion

- ☐ Sujet en contact étroit avec un cas de tuberculose active.
- ☐ Sujet atteint d'une maladie connue.
- ☐ Sujet ayant été sous corticothérapie dans le courant des 3 derniers mois.
- ☐ Sujet ayant effectué un test IDR dans le courant des 5 dernières années
- ☐ Antécédent familial de tuberculose

3- Identité

Nom :

Prénom :

Age :

Sexe : ☐ M ☐ F

Adresse :

Tel :

N° Centre de Transfusion : Collez ici la série d'identification du donneur fournie par le CRTS

4- Origine ethnique

- ☐ Arabe
- ☐ Rifi
- ☐ Soussi

- ☐ Amazigh
☐ Sahraoui
☐ Autre : (Préciser).....
☐ Mixte : (Préciser) entre et

5- Antécédents

5.1- Vaccination au BCG:

- ☐ non
☐ oui

Justification : ☐ Cicatrice vaccinale

☐ Présence d'un document

5.2- Consanguinité des parents : ☐ non ☐ oui

5.3- Autre maladie chronique dans la famille : ☐ non

☐ oui : (Préciser).....

5.4- Antécédent Carcéral ☐ non ☐ oui

6- Comportement :

6.1- Statut socio économique

6.1.1- Lieu de résidence,

6.1.1.1- Commune :

- ☐ Urbain
☐ Suburbain
☐ Rural
☐ Carcéral

6.1.1.2- Habitation :

- ☐ Formel
☐ Informel : ☐ en dur ☐ Baraque
☐ Nombre de chambre par habitation

6.1.2- Salarié : ☐ Oui : ☐ <SMIG ☐ =SMIG ☐ >SMIG

☐ Non : Revenu journalier en moyen : (Préciser).....Dh.

6.2- Niveau d'instruction : ☐ Illettré

- ☐ Lettré ☐ Coranique
☐ Primaire

☐ Secondaire

☐ Universitaire

6.3- Connaissances relatives à la tuberculose :

Avez-vous connaissance de la maladie Tuberculose ? ☐ Oui ☐ Non

Avez-vous connaissance de son mode de transmission ? ☐ Oui ☐ Non

Avez-vous connaissance des symptômes de la tuberculose ? ☐ Oui ☐ Non

Moyen d'information sur la Tuberculose : ☐ L'école
☐ Les médias
☐ Les affiches publicitaires
☐ Les professionnels de santé

6.4- Prise de drogues

6.4.1- Tabagisme : ☐ Non

☐ Oui ☐ Rarement ☐ Fréquemment

6.4.2- Prise d'alcool : ☐ Non

☐ Oui ☐ Rarement ☐ Fréquemment

6.4.3- ☐ Autres drogues : (Préciser)..... ☐ Rarement ☐ Fréquemment

6.5- Accessibilité de l'offre de soins ☐ Accessible ☐ Non accessible

7- Test d'intradermoréaction (IDR) (A effectuer impérativement après le prélèvement sanguin destiné à l'étude):

Date de réalisation :/...../.....

Date de la lecture :/...../.....

Résultat : ☐ Négatif

☐ Positif : Diamètre : (Préciser).....(mm)

Signature et cachet du médecin

Fiche d'exploitation pour les sujets contrôles sains exposés

Code d'identification

Collez ici un exemplaire de l'étiquette autocollante

date de recrutement :

j j m m a a

Information concernant le cas index

N° LAT : (Préciser).....

☐ Si cas index est recruté dans cette étude :

☐ Etude cas témoins

☐ Etude familiale

N° de recrutement (Préciser).....

Date de recrutement : .../.../...

1- Critères d'inclusion

☐ Age ≥ 18 ans

☐ Sujet cliniquement sains en contact étroit avec, au moins, un cas de tuberculose pulmonaire active.

☐ **Si étude cas témoins** : Sujet ayant un contact étroit avec un cas de tuberculose pulmonaire active à bacilloscopie positive.

☐ **Si étude familiale** : Sujet ascendant ou descendant direct, ou frère ou sœur d'un cas index de tuberculose active recruté dans cette étude

☐ Consentement éclairé

2- Critères d'exclusion :

☐ Sujet atteint d'une maladie connue.

☐ Sujet ayant été sous corticothérapie dans le courant des 3 derniers mois.

☐ Sujet ayant effectué un test IDR dans le courant des 5 dernières années

3- Identité

Date de prélèvement / recrutement :/...../.....

Nom : Prénom :

Age : Sexe : ☐ M ☐ F

Adresse:

Tel :

4- Contexte d'exposition au cas de TB index :

4.1- Si contexte familial,

4.1.1- La relation avec le cas index :

- ☐ Grand-père ☐ Grand-mère ☐ Père ☐ Mère
☐ Fils ☐ Fille ☐ Petit fils ☐ Petite fille
☐ Frère ☐ soeur ☐ Conjoint(e)
☐ Autre : *(Préciser)*.....

4.1.2- Lieu de contact

- ☐ Partage la même chambre
☐ Partage la même maison
☐ Nombre de personnes partageant ce lieu

4.1.3- Lieu de résidence,

4.1.3.1- Commune :

- ☐ Urbain
☐ Suburbain
☐ Rural
☐ Carcéral

4.1.3.2- Habitation :

- ☐ Formel
☐ Informel : ☐ en dur ☐ Baraque
☐ Nombre de chambre par habitation

4.2- Si contact scolaire :

4.2.1- Commune de l'établissement scolaire :

- ☐ Urbain
☐ Suburbain
☐ Rural

4.2.2- Espace partagé avec le cas index

- ☐ Partage la même table

☐ Partage la même salle

☐ Nombre de personnes partageant ce lieu

4.3- Si contact professionnel :

4.3.1-Entreprise :

- ☐ Etatique
☐ Grande
☐ Moyenne
☐ Petite
☐ Professionnel de santé

4.3.2- La dimension approximative de l'espace partagé avec le cas index : *(Préciser)*.....

4.4- Estimation temporelle d'exposition :

☐ <2h/ jour ☐ entre 2h et 6h/jours ☐ 6h et 12h /jour

5. Origine ethnique

- ☐ Arabe
☐ Rifi
☐ Soussi
☐ Amazighi
☐ Sahraoui
☐ Autre : (Préciser).....
☐ Mixte : (Préciser)entre et

6. Antécédents

6.1- Vaccination au BCG:

- ☐ non
☐ oui

Justification : ☐ Cicatrice vaccinale

☐ Présence d'un document

6.2- Consanguinité des parents : ☐ non ☐ oui

6.3- Autre maladie chronique dans la famille : ☐ non

☐ oui : (Préciser).....

6.4- Antécédents Carcéral ☐ non ☐ oui

7- Comportement :

7.1- Niveau d'instruction : ☐ Illettré

- ☐ Lettré ☐ Coranique
☐ Primaire
☐ Secondaire
☐ Universitaire

7.2- Connaissances relatives à la tuberculose :

Avez-vous connaissance de la maladie Tuberculose ? ☐ Oui ☐ Non

Avez-vous connaissance de son mode de transmission ? ☐ Oui ☐ Non

Avez-vous connaissance des symptômes de la tuberculose ? ☐ Oui ☐ Non

Moyen d'information sur la Tuberculose : ☐ L'école
☐ Les medias

- ☐ Les affiches publicitaires
☐ Les professionnels de santé

7.3- Salarié : ☐ Oui : ☐ <SMIG ☐ =SMIG ☐ >SMIG
☐ Non : Revenu journalier en moyen : (Préciser).....Dh.

7.4- Prise de drogues

7.4.1- Tabagisme : ☐ Non
☐ Oui ☐ Rarement ☐ Fréquemment

7.4.2- Prise d'alcool : ☐ Non
☐ Oui ☐ Rarement ☐ Fréquemment

7.4.3- ☐ Autres drogues : (Préciser)..... ☐ Rarement ☐ Fréquemment

7.5- Accessibilité à l'offre de soins : ☐ Accessible ☐ Non accessible

8- Test d'intradermoréaction (IDR) (a effectuer impérativement après le prélèvement):

Date de réalisation :/...../.....

Date de la lecture :/...../.....

Résultat : ☐ Négatif

☐ Positif : Diamètre : (Préciser).....(mm)

9- Imagerie

☐ RX photo

☐ RX Thorax

Image ☐ Normale

☐ Anormale : (Préciser).....

Signature et cachet du médecin

Fiche d'exploitation pour les patients tuberculeux

Code d'identification

date de recrutement :

...../...../ 2010

1- Type de l'étude : ☐ Cas témoins

☐ Familiale

2- Critères d'inclusion

☐ Age ≥ 18 ans

☐ Nouveau cas de tuberculose pulmonaire ou pleurale

☐ Consentement éclairé

☐ Si cas familial ; coexistence d'au moins deux cas documentés de tuberculose dont l'un est un parent et l'autre un descendant direct

3- Critères d'exclusion

☐ Patients atteints d'une maladie chronique autre que la tuberculose.

☐ Sujet ayant été sous corticothérapie dans le courant des 3 derniers mois.

☐ Sujet ayant effectué un test IDR dans le courant des 5 dernières années

☐ Patients étant déjà sous antibacillaires

4- Catégorie

☐ TP

☐ TPM+

☐ TPM0

☐ Pleurale

☐ TP associée à une TEP

5- Identité

Nom :

Prénom :

Age : Sexe : ☐ M ☐ F
Adresse :
Tel :
N° LAT : N° d'entrée :
(en cas d'hospitalisation)

6- Origine ethnique

- ☐ Arabe
☐ Rifi
☐ Soussi
☐ Amazigh
☐ Sahraoui
☐ Autre : (Préciser)
☐ Mixte : (Préciser) entre et

7- Antécédents

7.1- Notion de contagé :

- ☐ Non
☐ Ne sait pas
☐ oui: Contexte : ☐ Familial ☐ Professionnel ☐ Scolaire

7.2- Vaccination au BCG:

- ☐ non
☐ oui

Justification : ☐ Cicatrice vaccinale
☐ Présence d'un document

7.3- Prise de traitement autre que les antibacillaires :

- ☐ non
☐ oui: les quels 1)(Préciser) Date de prise :.../.../...
2)(Préciser) Date de prise :.../.../...
3)(Préciser) Date de prise :.../.../...

7.4- Consanguinité des parents : ☐ non ☐ oui

7.5- Autre maladie chronique dans la famille : ☐ non

☐ oui : (Préciser)

7.6- Antécédent carcéral : ☐ Oui ☐ Non

8- Comportement :

8.1- Statut socio économique

8.1.1- Lieu de résidence

8.1.1.1- Commune :

- ☐ Urbain
- ☐ Suburbain
- ☐ Rural
- ☐ Carcéral

8.1.1.2- Habitation :

- ☐ Formel
- ☐ Informel : ☐ en dur ☐ Baraque
- ☐ Nombre de chambre par habitation

8.1.2- Salarié : ☐ Oui : ☐ <SMIG ☐ =SMIG ☐ >SMIG
☐ Non : Revenu journalier en moyenne : (Préciser).....Dh.

8.2- Niveau d'instruction : ☐ Illettré

- ☐ Lettré ☐ Coranique
- ☐ Primaire
- ☐ Secondaire
- ☐ Universitaire

8.3- Connaissances relatives à la tuberculose :

Avez-vous connaissance de la maladie Tuberculose ? ☐ Oui ☐ Non

Avez-vous connaissance de son mode de transmission ? ☐ Oui ☐ Non

Avez-vous connaissance des symptômes de la tuberculose ? ☐ Oui ☐ Non

Moyen d'information sur la Tuberculose : ☐ L'école
☐ Les medias
☐ Les affiches publicitaires
☐ Les professionnels de santé

8.4- Prise de drogues

8.4.1- Tabagisme : ☐ Non

☐ Oui ☐ Rarement ☐ Fréquemment

8.4.2- Prise d'alcool : ☐ Non

☐ Oui ☐ Rarement ☐ Fréquemment

8.4.3- ☐ Autres drogues : (Préciser)..... ☐ Rarement ☐ Fréquemment

8.5- L'offre de soins

8.5.1- Accessibilité : ☐ Accessible ☐ Non accessible

8.5.2- Service offert par le centre : ☐ Correcte ☐ Incorrecte

8.5.3- L'offre de soins psychiatrique : ☐ Existant ☐ Inexistant

8.5.4- Délai entre le début des symptômes et la prise en charge : (Préciser).....

9- Signes cliniques

9.1- Début des Symptômes : depuis :

9.2- Examen physique :

- Pleuro – Pulmonaire ☐ Normal
☐ Anormal : (Préciser).....

- Extra – pulmonaire ☐ Normal
☐ Anormal : (Préciser).....

9.2.1 - Signes évocateurs

☐ Toux

☐ Expectoration

☐ Hémoptysie

☐ Fièvre

☐ Amaigrissement : ☐ Chiffré : (Préciser).....kg

☐ Non chiffré : ☐ Important ☐ Modéré ☐ Léger

☐ Autre : (Préciser).....

9.3- Imagerie

☐ RX photo

☐ RX Thorax

Image : ☐ Normale

☐ Anormale :

Sièges des lésions : LSD ☐ LM ☐ LID ☐ LSG ☐ LIG ☐

☐ cavité ; si oui (Préciser le nombre).....

- ☐ Infiltration
- ☐ Nodule
- ☐ Epanchement pleural
- ☐ Autre : (Préciser).....

9.4- Signes de gravité

- ☐ Absence
- ☐ Présence
 - ☐ Tuberculose pulmonaire : ☐ Milliaire
 - ☐ Broncho Pneumonie
 - ☐ Pneumonie casseuse
 - ☐ Diffuse et bilatérale
 - ☐ Tuberculose Extra Pulmonaire
 - ☐ Uni-focale
 - ☐ Multifocale
 - ☐ Neuromeningée ☐ Hématologique
 - ☐ Autres : (Préciser)...

9.5- Biologie

9.5.1- Test d'intradermoréaction (IDR) (A effectuer impérativement **après** le prélèvement sanguin destiné à l'étude):

Date de réalisation :/...../.....

Date de lecture :/...../.....

- Résultat : ☐ Négatif
- ☐ Positif : Diamètre (Préciser).....(mm)

9.5.2- HIV ☐ non fait

- ☐ Fait : ☐ négative ☐ positive

9.5.3- NFS ☐ non fait

- ☐ Fait ☐ Normale ☐ Anormale : (Préciser).....

9.5.4- Bascilloscopie

Date de réalisation:/...../.....

Lieu de réalisation: ☐ CDTMR ☐ Hôpital ☐ INH

Résultat : ☐ Absence de BAAR (0 par 300 champs)

- ☐ Présence BAAR
- ☐ 1-10 par 100champs

☐ 1-10 par 10 champs

☐ 1-10 par champs

☐ >10 par champs

9.5.5- Culture du BK : ☐ non faite

☐ Faite : Date de réalisation :/...../.....

Lieu : de réalisation ☐ CDTMR ☐ Hôpital ☐ INH

Type de prélèvement (*Préciser*).....

Résultat : ☐ Absence de colonies

☐ Présence de colonies

Nombre de colonies par tube :

(*Préciser*).....

9.5.6- Examen anatomo-pathologique

☐ non fait

☐ Fait

Date de réalisation:/...../.....

Siège de la biopsie : (*Préciser*).....

Lieu de réalisation : ☐ INH

☐ Hôpital: (*Préciser*).....

☐ Privé : (*Préciser*).....

Résultat : Granulome : ☐ oui ☐ non

Caséum : ☐ oui ☐ non

Signature et cachet du médecin

Annexe 2 : Préparation des cellules mononucléées

- **Milieux et réactifs :**

- Ficoll
- RPMI à 2% SVF : 48,5 ml du milieu RPMI + 1ml du SVF décomplémenté + 500 μ l de glutamine.
- RPMI à 10% SVF : 44,5 ml du milieu RPMI + 5ml du SVF décomplémenté + 500 μ l de glutamine.
- Milieu de conservation (SVF 10%DMSO) : 9ml du SVF décomplémenté+ 1ml du DMSO
- Bleu de trypan

- **Isolement**

- 1) dilution du sang au demi dans du milieu RPMI incomplet.
- 2) couler le sang dilué au 2/3 1/3 sur le ficoll.
- 3) Centrifuger à 400g pendant 30 min à température ambiante et sans frein.
- 4) Récupérer l'anneau à l'aide d'une pipette pasteur stérile dans un tube de 50 ml.
- 5) lavages au RPMI à 2% SVF:
 - Ajouter environ 40 ml de milieu RPMI incomplet.
 - Centrifuger à 1600tr/min pendant 06 min à température ambiante et avec frein.
 - Jeter le surnageant
 - Décanner le culot
- 6) lavages au RPMI à 10% SVF:
 - Ajouter environ 40 ml de milieu RPMI complet.
 - Centrifuger à 1600tr/min pendant 06 min à température ambiante et avec frein.
 - Jeter le surnageant
 - Décanner le culot
- 7) Récupérer le culot dans environ 500 μ l de RPMI à 10% SVF.

- **Comptage**

- 1) Prendre 20 μ l de la suspension cellulaire
- 2) diluer au demi dans le bleu de trypan (20 μ l de la suspension cellulaire+20 μ l de bleu de trypan)
- 3) Compter le nombre de cellules dans une cellule malassez à l'aide d'un microscope optique :

$$nb = 100 A = 10 B$$

- La concentration de la suspension PBMC est $C = nb * 2 * 10^3$
 - A et B représentent le nombre de cellules vivantes comptées dans l'aire A et B respectivement
 - L'unité est : cellules / ml
- 4) Concentrer ou diluer les cellules pour atteindre une concentration de travail de 10^7 cellules / ml.
- ❖ Mesurer le volume V initial de la suspension cellulaire grâce à une pipette de 1mL

Pour concentrer : centrifuger le contenu du tube et enlever le volume nécessaire (V_e)

$$V_e = V - (C * V / 10^7)$$

Pour diluer : Volume à ajouté = $(C * V / 10^7) - V$.

L'unité est par mL

Annexe 3 : Conservation des cellules mononucléées

- 1) Compter les cellules sur Malassez.
- 2) Centrifuger la suspension cellulaire à 130g pendant 10min.
- 3) Jeter le surnageant (faire attention au culot).
- 4) Récupérer le culot dans le milieu de conservation (SVF 10%DMSO) pour avoir une concentration de 10 millions de cellule par mL.

$$V = C_i * V_i / C_f$$

- 5) Mettre 1 mL de suspension ainsi récupérer dans les cryotubes étiquetées.
- 6) Mettre les cryotubes dans le box de congélation périodique à -80°C pendant 3 jours.
- 7) Transférer les cryotubes dans l'azote liquide

Annexe 4 : Cells thawing procedure

1. Prewarm C10 water bath and add DNase (add 100ul of DNase to 10ml of C10)
2. Thaw cell sample vials in a 37 °C water bath until there is a pea-sized pellet of ice remaining.
3. Transfer the cell suspensions to a labeled 15-ml conical tube.
4. Add drop by drop prewarmed C10 with DNase.
5. Centrifuge at 1500rpm for 6 min, decant supernatant and resuspend cells in 1ml Xvivo medium.
6. Countcells and adjust the density to 2×10^6 PBMCs/ml.
7. Put 500ul of cells suspension in 5ml polystyrene round-bottom tube and incubate 4H at 37°C and 5% CO₂.

Annexe 5 : LN TB 13 color FACS staining Protocol

1. Stimulation

1. After 4H incubation at 37°C and 5% CO₂, stimulate cells with appropriated stimuli:
 - i. Neg : 500ul cells+ 5ul CD28/CD49d
 - ii. SEB (2ug/ml): 500ul cells+ 5ul CD28/CD49d+ 1ul SEB(1mg/ml)
 - iii. RVL (2ug/ml): 500ul cells+ 5ul CD28/CD49d+ 3.3ul RVL (300ug/ml)
 - iv. ESAT6/CFP10 pep (1/300): 500ul cells+ 5ul CD28/CD49d+ 1.6ul pep
2. Incubate 2H at 37°C and 5% CO₂ and add 1ul of BFA to each tube.
3. Incubate overnight at 37°C and 5% CO₂

2. Staining

1. After the cells were incubated in the incubator, add 1 ml of cold PBS (1x) to each tube, wash 1 time (1500 rpm x 6 min x 4°C).
2. Discard the supernatant and tap only once the tube on the paper towel (to remove the remaining fluid from the tube). (after tap, approximately 50 ul of media left in the tube).
3. Add 5 ul of CCR7 (PE/Cy7) to all tubes.
4. Vortex and incubate in water bath at 37 °C for 15 minutes (prevent light).
5. Prepare surface markers for the tubes.
6. Prepare master-mix tube for surface stain according to the number of tubes needed (prepare 1 or 2 extra tubes). Add in the live dead yellow to the master mix and adjust volmes accordingly.
For each tube:

a. LIVE DEAD	YELLOW	15.5 ul
b. CD4	APC/Cy7	1 ul
c. CD8	BV510	0.5 ul
d. PD-1	BV605	0.5 ul
e. CD45RA	PE/Texas Red	1 ul
f. CD14	BV570	0.25 ul
g. PBS		10 ul
10. Add 28.75 ul of master –mix to the tubes, vortex well and incubate for 25 min in the dark at RT.
11. Wash the cells with FACS Wash (1 ml/tube).

12. Discard the supernatant.
13. Add 250 ul/tube of BD Cytofix/Cytoperm Fixation and Permeabilization Solution (1x) and incubate the tubes for 20 minutes at RT.
14. Add 1 ml of BD Perm Wash (cold) to each tube and wash.
15. Wash again with 1ml of BD Perm Wash (cold).
16. Discard the supernatant and tap the tubes.
17. Prepare master-mix for intracellular stain.

For each tube

- | | | |
|-------------------|--------------|--------|
| a. CD3 | PerCP | 2 ul |
| b. IFN- γ | Alexa 700 | 0.5 ul |
| c. TNF- α | Pacific Blue | 1 ul |
| d. MIP-1 α | FITC | 5 ul |
| e. Granylusin | PE | 20 ul |
| f. IL-17 | BV711 | 2.5 ul |
| g. IL-2 | APC | 0.5 |
| h. PBS | | 10 |
18. Spin the master-mix tube in the micro-centrifuge for 3 minutes (high speed) to remove aggregates.
 19. Add 41.5 ul of master-mix to the tube and incubate for 45 min minutes at RT.
 20. Wash with BD Perm Wash (1 ml/tube).
 21. Remove the supernatant and add 1% Paraformaldehyde (300 ul/tube) to each tube.
 22. FACS within 24 hrs.

Reagents

Live Dead Fixable Yellow Dead-cell stain Kit

Invitrogen Catalog # L34959

Preparation

1. Add 50 ul of DMSO (kit) to the Live-Dead Yellow vial (stock).
2. Mix 2 ul of stock solution with 198 ul of PBS 1x (1:100 dilution).

3. Add 15.5 ul of diluted solution to the tube (final 1:500 dilution).

BD Cytofix/Cytoperm Fixation and Permeabilization Solution

BD Cat # 554722 (Kit – 51-2090KZ).

BD Perm Wash Buffer

Dilute 10X BD Perm Wash buffer in double distilled water to make 1x solution.

(eg. Dilute 100 ml of 10X BD Perm Wash in 900 ml of double distilled water)

FACS wash buffer

900 ml double distilled water

100 ml 10X PBS

10 ml FCS Heat treated

10 ml of 10% azide stock

2% Paraformaldehyde solution

40 ml of pre-made 10% Paraformaldehyde

20 ml 10X PBS

140 ml of double distilled water

FACS antibodies

		Catalog #	Company
CCR7	PE/Cy7	557648	BD Bioscience
CD4	APC/Cy7	317418	Biologend
CD8	BV510		

Tuberculose, Lymphocytes, Réponses Th1/Th17, Treg, ganglions lymphatiques

CD45RA	PE/Texas Red	MHCD45RA17	Invitrogen
CD3	PerCP	300428	Biolegend
IL-2	APC		
IFN- γ	Alexa 700	506516	Biolegend
TNF- α	Pacific Blue	502920	Biolegend
MIP-1 α	FITC	IC2701F	R&D
Perforin-1	PE		
IL-17	BV711		

Annexe 6: T reg staining protocol (Day 0 Experiment)

- a) Prepare cells for experiment (250.000 to 1.000.000 cell/tube)
 - i. Isotype antibody
 - ii. Marker antibody
- b) Add 1ml/tube of cold PBS and wash 1 times (1500rpm x 6min x 4°C).
- c) Prepare master-mix tube for surface stain according to the number of tubes needed (prepare 1 or 2 extra tubes).
For each tube:

Emission	Marker	Dye	Vol (µl)	Location
V575	Live/Dead	Yellow (1:500)	22	locked fridge
YG780	CD38	PeCy7	5	14-8
R710	CD8	Alexa700	0.2	14-7
B670	CD4	PerCP	2	1-9
R660	CD25	APC	20	14-9
V440	CD45RO	PacBlue	0.2	15-3
B525	HLA-DR	FITC	0.2	5-12
R780	CD3	APC-Cy7	1	6-3
V660	CD127	BV650	5	
	PBS		10	

Emission	Isotype Marker	Dye	Vol (µl)	Location
V575	Live/Dead	Yellow (1:500)	22	locked fridge
YG780	IgG1 (mouse)	PeCy7	5	14-8
R710	CD8	Alexa700	0.2	14-7
B670	CD4	PerCP	2	1-9
R660	IgG1 (mouse)	APC	20	14-9
V440	CD45RO	PacBlue	0.2	15-3
B525	IgG2a (mouse)	FITC	0.2	5-12
R780	CD3	APC-Cy7	1	6-3
	PBS		10	

- d) Discard supernatant and tap tube on paper towel (~50ul final volume)
- e) Add 61.6ul of surface stain master mix of markers or isotype to the corresponding tube
- f) Vortex well and incubate for **25min in the dark at RT.**
- g) Wash cells with 1mL/tube of FACS wash (1500rpm x 6min x 4°C)
- h) Discard supernatant and tap tube on paper towel (~50ul final volume)
- i) Add 250ul/tube of BD Cytotfix/CytopermFixation and Permeabilization Solution (1x) while agitating the tube by hand. Do not vortex.
- j) Incubate **20min in the dark at RT.**
- k) Wash cells with 2mL/tube of cold BD Perm Wash (1500rpm x 6min x 4°C)
- l) Discard supernatant and tap tube on paper towel (~50ul final volume)
- m) Add 2.5ul of anti FoxP3 or Isotype to each tube.
- n) Incubate **20min in the dark at RT.**
- o) Wash cells with 2mL/tube of cold BD Perm Wash (1500rpm x 6min x 4°C)
- p) Discard supernatant and tap tube on paper towel (~50ul final volume)
- q) Resuspend in 300 ul of 1% paraformaldehyde
- r) FACS within 24 hours

Annexe 7: PUBLICATIONS

ARTICLES SCIENTIFIQUES INTERNATIONAUX

- **“Moroccan Lymphocyte subsets reference ranges: Age, gender, ethnicity and socio-economic factors dependent differences”**. Karima Sahmoudi, Aicha El Allam, Sara El Fakihi, Hicham Tahoune, Abderrahim Sadak, Naima El Hafidi, Jamaledine Bourkadi, Rajae El Aouad, Fouad Seghrouchni. Journal of Immunoassay and Immunochemistry, 41:3, 281-296, DOI: 10.1080/15321819.2020.1728543
- **“Immune Activation and Regulatory T Cells in Mycobacterium tuberculosis Infected Lymph Nodes”**. Karima Sahmoudi, Hassan Abbassi, Nada Bouklata, Mohamed Nouredine El Alami, Abderrahim Sadak, Christopher Burant, W. Henry Boom, Rajae El Aouad, David H. Canaday*, Fouad Seghrouchni*. BMC Immunol. 2018 Nov 8; 19(1):33. doi: 10.1186/s12865-018-0266-8.

COMMUNICATION ORALES

- **"Age and gender influences on homeostasis of lymphocyte subsets"**. Karima Sahmoudi, Aicha El Allam, Sara El Fakihi, Hicham Tahoune, Abderrahim Sadak, Naima El Hafidi, Jamaledine Bourkadi, Rajae El Aouad, Fouad Seghrouchni. 12th National Congress on Predisposition to Infection and 3rd Inflammation Maghreb Meeting of Immunoglobulin Experts. From 3 to 5 October 2019, Faculty of Medicine and Pharmacy, Cadi Ayyad University, Marrakech



Moroccan lymphocyte subsets reference ranges: age, gender, ethnicity, and socio-economic factors dependent differences

Karima Sahmoudi, Aicha El Allam, Sara El Fakihi, Hicham Tahoune, Abderrahim Sadak, Naima El Hafidi, Jamaledine Bourkadi, Rajae El Aouad & Fouad Seghrouchni

To cite this article: Karima Sahmoudi, Aicha El Allam, Sara El Fakihi, Hicham Tahoune, Abderrahim Sadak, Naima El Hafidi, Jamaledine Bourkadi, Rajae El Aouad & Fouad Seghrouchni (2020): Moroccan lymphocyte subsets reference ranges: age, gender, ethnicity, and socio-economic factors dependent differences, Journal of Immunoassay and Immunochemistry, DOI: 10.1080/15321819.2020.1728543

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/15321819.2020.1728543>



Published online: 15 Feb 2020.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=ljii20>



Moroccan lymphocyte subsets reference ranges: age, gender, ethnicity, and socio-economic factors dependent differences

Karima Sahmoudi ^{a,b}, Aicha El Allam^{a,b}, Sara El Fakihi^a, Hicham Tahoune ^a, Abderrahim Sadak ^b, Naima El Hafidi^c, Jamaledine Bourkadi^d, Rajae El Aouad^a, and Fouad Seghrouchni ^a

^aLaboratory of Cellular Immunology, The National Institute of Hygiene, Rabat, Morocco; ^bFaculty of Sciences, University Mohammed V Agdal, Rabat, Morocco; ^cDepartment of Pediatric Infectious Diseases, Avicenne University Hospital, Rabat, Morocco; ^dMoulay Youssef University Hospital, Rabat, Morocco

ABSTRACT

Lymphocyte subsets reference ranges are helpful for a precise diagnosis and therapy of various diseases. We attempted in the current study to establish Moroccan lymphocyte reference range and reveal age, gender, ethnicity, income, and instructional levels dependent differences. Lymphocyte subsets percentage and absolute count were determined by 4-color flow cytometry in a population study of 145 adults Moroccan healthy volunteers. Analysis showed significant age-dependent changes. Age was associated with a decrease of naïve CD4+ and CD8+ T cells and an increase of memory CD4+ or CD8+ T cells. Activated CD4+ CD38+ and CD8+ CD38+ T cells, Treg as well as NK cell showed age-dependent alterations. In contrast, B cells remained unchanged. A higher percentage of CD3+ and CD4+ T cells was observed in females while CD8+, B and NK cells count were higher in men. Ethnicity, instructional levels, and personal income seem to not influence lymphocyte subsets reference values. This study provides reference ranges for lymphocyte subsets of healthy Moroccan adults. These results can be used for other North African (Maghrebien) countries considering their geographic, ethnic, economic, and cultural similarities.

KEYWORDS

Lymphocyte subsets; gender; age; ethnicity and environmental factors

Introduction

Correct interpretation of immunological and pathological disorders depends on a good knowledge of what is a normal immune status. Reliable reference intervals for lymphocyte subsets in normal healthy adults are needed to facilitate the objective interpretation of abnormal results in diseases such as leukemia, lymphomas, autoimmune, infectious diseases, and immunodeficiencies such as AIDS.^[1]

CONTACT Fouad Seghrouchni  fseghrouchni@yahoo.fr  National Institute of Hygiene, 27, Avenue Ibn Batouta, PB 769, Rabat 11400, Morocco

© 2020 Taylor & Francis

Several previous studies from different regions have indicated variations in reference ranges and concluded that reference ranges obtained in one population are not applicable for another.^[2] Different intrinsic factors such as age, gender, genetic background, and socio-economic as well as environmental factors, such as infections, are suggested to influence the homeostasis of lymphocyte subsets and most probably account for the variation shown between populations.^[2-7]

Very few data are available for reference ranges of North African population in general.^[8-9] Those studies have established reference value to a limited lymphocyte subset including T cells (CD4 and CD8 subsets), B cells, and NK cells. To best of our knowledge, there is only one published Moroccan study^[9] which has many limitations and cannot be representative of the Moroccan population. To mention, the forward scatter versus side scatter approach was used for identifying the lymphocyte population and a limited panel of monoclonal antibodies was used. In this study gender and age were not taken into account since 90% of the population study was men under 49 years of age. Thus, the objective of the present study was to re-assess established Moroccan lymphocyte reference ranges and include additional lymphocyte maturation and activation subsets. Furthermore, we also assessed the influence of gender, age, ethnicity, and socio-economic factors on lymphocyte composition.

Materials and methods

Study population

The subjects involved in this study were healthy blood donors recruited from the Regional Centers of Blood Transfusion of different prefectures from north to south Morocco (Marrakech, Fes, Oujda, Tanger) to cover all ethnic groups of the Moroccan population. All Participants fulfilled Blood donation conditions, being over 18 years of age, healthy in appearance with a proportionate height/weight ratio, not taking medication, no past history of disease, no cough, fever, or infection. A questionnaire was completed by all participants (with external assistance for illiterate subjects) in order to collect demographic (sex, age, ethnicity) and lifestyle information (personal income (PIC), instructional levels, smoking habit, alcohol intake). All subjects were found to be serologically negative for HIV-1 and 2 viruses (tested by AxSYM Assays, Abbott Laboratories, and Chicago, IL, USA). Ethical approval was obtained by the local ethics committee (Faculty of Medicine and Pharmacy from the Mohammed V-Souissi University) and informed written consent was obtained from all subjects.

Leucocytes count and phenotyping analysis

Whole blood was collected into EDTA tube (Vacutainer® BD) and transported to the INH laboratory within 24 h. The lymphocyte subsets

were analyzed using a lyse/no-wash procedure based on a dual-platform technique.

Whole blood was stained with the following combinations: BDMultitest™CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC, BDMultitest™ CD3 FITC/CD16+56 PE/CD45 PerCP/CD19 APC, BDMultitest™CD45 RA FITC/CD45 RO PE/CD3PerCP/CD4 APC, BDMultitest™CD45 RA FITC/CD45 RO PE/CD3PerCP/CD8APC, BDMultitest™CD4 FITC/CD38 PE/CD3PerCP/HLA DR APC, BDMultitest™ CD8 FITC/CD38 PE/CD3PerCP/HLA DR APC, CD3 FITC/CD25 PE/CD45 PerCP (all from BD Biosciences® San Jose, CA) to enumerate T cell, B cell, NK cell, naïve/memory T cell, activated T cell and Treg cell subsets. Each tube was incubated for 15 min at room temperature in the dark and then 450 µl of 1% FACS Lysing solution (BD Biosciences) was used to fix leukocytes and lyse the red blood cells for 10 min in the dark. Samples were acquired in a BD 2 lasers FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences) and data analyzed using FlowJo software (version 6.1.1; Tree Star, Ashland, OR, USA) (Figure 1). Instrument setup was accomplished weekly by using analysis of BD CALIBRITE beads and BD FACSCComp software.

Leukocytes counts were performed using a Sysmex SF-3000 automatic cell counter (Sysmex Corporation, Mundelein, IL, USA) on the same tube to calculate the absolute values of lymphocyte subsets (Cells/µl).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Graph Pad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, California). Medians, means, standard deviation, reference ranges, and 95% confidence intervals were calculated for each immuno-hematological parameter. A Student's t-test was used to evaluate the influence of gender on lymphocyte subsets. The non-parametric Kruskal-Wallis test was used to determine differences across age, PIC, instructional levels, and ethnic groups. The Spearman's rank correlation was used to assess associations between parameters. All *p* values < .05 were considered statistically significant.

Results

Study population general's characteristics

A total of 145 healthy volunteers were included in this study. Among them, 64 were men (44.13%) and 78 were women (53.79%). Their ages ranged from 18 to 63 years with similar age ranges for men and women (from 19 to 63 years for men and from 18 to 55 years for women). The ethnicity composition of our cohort was 68% Arab, 19% Amazigh, 9% Rifi, and 4% Sahraoui. About 90% of our volunteers declared not to smoke nor drinking alcohol. Regarding their instructional levels, 19% were illiterate, 44% had received a coranic/primary/

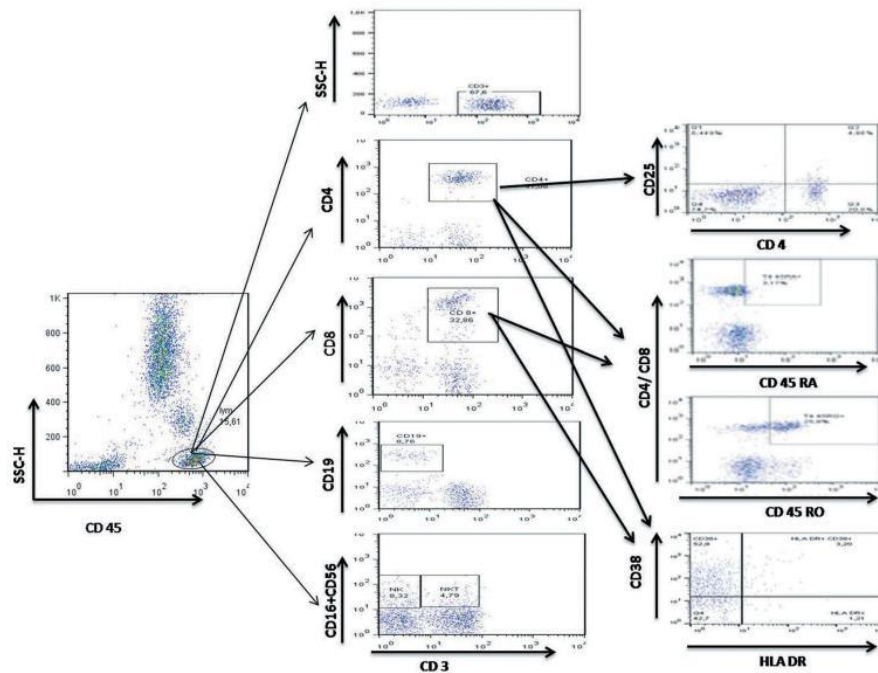


Figure 1. Representative flow cytometry gating strategy for lymphocyte subsets in the peripheral blood from a healthy donor. Cells were first gated for lymphocytes (SSC-A vs. CD45), then CD3 + T cells, CD4 +, CD8 +, CD16+ CD56 + NK cells, CD3+ CD16+ CD56 + NKT cells or CD19 + B cells were positively determined. Next, Treg cells (CD4+ CD25 High), naïve/memory, and activation makers of CD4+ and CD8 + T cells were identified.

secondary level and 37% reached university level. Overall, 52% of volunteers had low PIC and 48% had middle/high PIC, respectively below and above the guaranteed interprofessional minimum wage.

Lymphocytes ranged from 1678 to 1978 cells/ μ L and percentage for total T cells (CD3+) represented 68.6% to 71.9% of them, meaning 1147 to 1363 cells/ μ L. CD4+ T cell ranged from 644 to 791 cells/ μ L and CD8+ T cell from 414 to 510 cells/ μ L, B cells (CD19+) from 180 to 225 cells/ μ L, NK cells (CD3-CD16+ CD56+) from 186 to 250 cells/ μ L and NKT cells (CD3+ CD16+ CD56+) from 72 to 136 cells/ μ L. Among CD4+ T Cells, 15.9% to 20.2% had the naïve CD45RA+ phenotype (CD4+ CD45RA+), and 58.4% to 63.8% the memory (CD4+ CD45RO+) phenotype. Comparatively, 27.3% to 33.6% of CD8+ T cells had the naïve CD45RA+ phenotype and 30.5 to 36.1 the memory (CD8+ CD45RO+). Regarding the activation status, activation was measured on expression of CD38 (34.2% to 38.5%); HLA DR (4.8–9.1) or both (4% to 8.3%) for CD4+ T cells and CD38 (24.5% to 28.8%); HLA DR (6.6–10.9) or both (5.2% to 9.5%) for CD8+ T cells. Treg cells (CD4+ CD25 High) represented 11.4% to 14% of CD4+ T Cells. Results are shown in Table 1.

Table 1. Peripheral blood lymphocyte subset reference values.

PARAMETERS		Mean	Median	Std. deviation	Reference range	95% Confidence interval
Lymphocytes	Cells/ μ l	1828	1700	929	504.3–4262.5	1678–1978
B cells	/Lymphocytes %	12.6	11.6	5.61	4.38–29	11.7–13.5
	Cells/ μ l	202	173	140	34.8–506.3	180–225
NK cells	/Lymphocytes %	11.5	10.7	6.9	1.5–28.5	10.4–12.6
	Cells/ μ l	218	173	200	17.5–833.4	186–250
NKT cells	/Lymphocytes %	5.1	3.9	6.6	0.2–14.9	4.8–6.2
	Cells/ μ l	104	55.8	200	1.9–391	72.2–136.8
CD3+ T cells	/Lymphocytes %	70.2	72.1	10.1	46.2–85.7	68.6–71.9
	Cells/ μ l	1255	1093	670	305.4–2633.8	1147–1363
CD3+ CD4+ T cells	/Lymphocytes %	39.4	39.1	9.1	22.18–58	38.0–40.9
	Cells/ μ l	718	633	453	103.5–1545.1	644–791
CD3+ CD8+ T cells	/Lymphocytes %	25.7	25.3	7.3	12.3–40.5	24.6–26.9
	Cells/ μ l	462	394	298	81–1019.9	414–510
CD4+ CD45RO+	/CD4+ %	61.1	62.2	16.5	31.5–92	58.4–63.8
	Cells/ μ l	465	450	207	143.9–939.2	431.8–498.7
CD8+ CD45RO+	/CD8+ %	33.3	33.9	17.3	5.5–70.3	30.5–36.1
	Cells/ μ l	157	148	97.6	32.9–359.5	141.8–173.3
CD4+ CD45RA+	/CD4+ %	18.1	16.9	13.2	0–43.6	15.9–20.2
	Cells/ μ l	156	102	152.1	7.9–532.8	131.4–180.4
CD8+ CD45RA+	/CD8+ %	30.5	27.5	19.6	1–71.9	27.3–33.6
	Cells/ μ l	166	125	156	14–580.4	141.2–191.3
CD4+ HLA DR+	/CD4+ %	7	2	10.4	0–36.6	4.8–9.1
	Cells/ μ l	97	26	156	5–570	72.1–122.5
CD8+ HLA DR+	/CD8+ %	8.8	3.3	11.5	0–40.5	6.6–10.9
	Cells/ μ l	89	36	136	8.6–581.6	67.4–111.5
CD4+ CD38+	/CD4+ %	36.3	37.6	12.5	11.5–61.9	34.2–38.5
	Cells/ μ l	347	298	223	59–957.2	311.6–383.7
CD8+ CD38+	/CD8+ %	26.6	24.7	11.6	8.3–51.3	24.5–28.8
	Cells/ μ l	253	213	190	34.2–781.5	223.0–284.3
CD4+ HLA DR+CD38+	/CD4+ %	6.2	2	9.5	0–26.7	4–8.3
	Cells/ μ l	126	37	181	0–639.9	97.6–155.9
CD8+ HLA DR+CD38+	/CD8+ %	7.7	3.9	9	0.4–35.6	5.2–9.5
	Cells/ μ l	166	69	195	9.7–713.5	135.4–198.2
CD4+ CD25 High	/CD4+ %	12.7	13.1	8.0	0.3–27.7	11.4–14.0
	Cells/ μ l	107.2	95.3	81.1	2.9–293.2	87.5–126.9

*The different lymphocyte subsets (percentages %) were gated using CD45 and SSC to discriminate this population from monocytes, granulocytes, and cell debris. The absolute counts (Abs) for each cell subset were calculated by multiplying the subset percentage by the absolute count of the specific gated population/100.

Impact of age on reference values

To investigate the influence of the age of participants on the lymphocyte subsets we divided the subjects to classes of age (10 years each). The age-related reference values (percentages and absolute numbers) are shown in Table 2.

Table 2. Age-related differences in the peripheral blood lymphocyte subsets.

PARAMETERS (Mean $\pm$ SD)	18–20 year N = 8	21–30 year N = 39	31–40 year N = 40	41–50 year N = 41	51–63 year N = 17	p Value
Lymphocytes	1308.4 $\pm$ 1135.8	2265.0 $\pm$ 1104.6	2058.2 $\pm$ 1811.8	1951.3 $\pm$ 1681.8	1642.7 $\pm$ 1084.4	0.0753
B cells	103.4 $\pm$ 2.9	12.4 $\pm$ 4.8	13.2 $\pm$ 6.9	12.8 $\pm$ 5.1	12.5 $\pm$ 6.3	0.8092
	119.2 $\pm$ 87.3	271.1 $\pm$ 190.6	235.9 $\pm$ 235.9	225.1 $\pm$ 239.6	173.8 $\pm$ 115.3	0.0745
NK cells	13.1 $\pm$ 4.9	13.7 $\pm$ 7.9	10.2 $\pm$ 4.9	10.8 $\pm$ 5.0	8.9 $\pm$ 6.8	0.1109
	166.3 $\pm$ 175.5	364.9 $\pm$ 294.1	180.7 $\pm$ 90	167.5 $\pm$ 119.2	123.8 $\pm$ 94.2	0.0056
NKT cells	2.2 $\pm$ 1.3	3.2 $\pm$ 2.1	6.4 $\pm$ 11.1	6.4 $\pm$ 4.2	5.2 $\pm$ 3	0.007
	30.4 $\pm$ 30.8	86.5 $\pm$ 80.1	145.7 $\pm$ 363	118 $\pm$ 109.7	75.5 $\pm$ 79.8	0.0371
CD3+ T cells	70.2 $\pm$ 3.1	68.6 $\pm$ 7.7	70.6 $\pm$ 11.6	72.2 $\pm$ 9.2	68.1 $\pm$ 14.3	0.1635
	944.2 $\pm$ 848.6	1539.7 $\pm$ 746.0	1504.4 $\pm$ 1442.8	1415.9 $\pm$ 1172.7	1018.0 $\pm$ 537.2	0.0635
CD3+ CD4+ T cells	34.9 $\pm$ 6.3	38.6 $\pm$ 7.6	38.6 $\pm$ 10.3	40.5 $\pm$ 9.1	42.6 $\pm$ 9.5	0.2475
	411.7 $\pm$ 308.0	870.5 $\pm$ 403.5	820.6 $\pm$ 725.6	791.7 $\pm$ 710.9	757.7 $\pm$ 715.0	0.0543
CD3+ CD8+ T cells	25.6 $\pm$ 9.9	24.5 $\pm$ 5.9	26.1 $\pm$ 7.5	27.2 $\pm$ 7.2	24.0 $\pm$ 8.3	0.5879
	424.6 $\pm$ 509.7	571.6 $\pm$ 364.1	558.2 $\pm$ 612.1	507.8 $\pm$ 361.9	357.6 $\pm$ 225.7	0.1178
CD4+ CD45 RO+	50.6 $\pm$ 11.5	52.7 $\pm$ 17.7	63 $\pm$ 9.3	65 $\pm$ 15.2	68 $\pm$ 17.6	0.0196
	280.6 $\pm$ 274.0	507.0 $\pm$ 157.7	487.5 $\pm$ 228.8	477.3 $\pm$ 233.0	369.1 $\pm$ 143.4	0.2864
CD8+ CD45 RO+	20.6 $\pm$ 16.7	21.9 $\pm$ 14	34.3 $\pm$ 14.8	39.6 $\pm$ 15.1	47.7 $\pm$ 18.5	P < .0001
	176.5 $\pm$ 174.4	163.7 $\pm$ 85.3	147.3 $\pm$ 77.0	151.6 $\pm$ 85.1	174.2 $\pm$ 166.5	0.9672
CD4+ CD45 RA+	17.8 $\pm$ 10.8	19.7 $\pm$ 16	19.7 $\pm$ 9.4	15.8 $\pm$ 14.5	17.8 $\pm$ 11.8	0.379
	158.7 $\pm$ 184.3	231.1 $\pm$ 164.5	158.6 $\pm$ 133.6	114.0 $\pm$ 147.3	94.9 $\pm$ 80.30	0.0520
CD8+ CD45RA+	33.9 $\pm$ 20.1	29.6 $\pm$ 24.8	38.2 $\pm$ 14.3	27.7 $\pm$ 14.5	26.6 $\pm$ 18.3	0.1892
	246.3 $\pm$ 267.3	256.3 $\pm$ 220.0	179.4 $\pm$ 97.4	111.9 $\pm$ 116.9	92.6 $\pm$ 52.0	0.0154
CD4+ HLA DR+	10.7 $\pm$ 18	8.1 $\pm$ 10.6	5.3 $\pm$ 9.2	8.3 $\pm$ 12.5	6.4 $\pm$ 7.6	0.2407
	93 $\pm$ 7.1	90.9 $\pm$ 146.3	79.2 $\pm$ 151.7	134.7 $\pm$ 182.9	76.9 $\pm$ 132.0	0.3096
CD8+ HLA DR+	12.5 $\pm$ 16.1	8.6 $\pm$ 11.3	7.7 $\pm$ 11.1	10.4 $\pm$ 12.4	9.3 $\pm$ 13.2	0.1256
	18.6 $\pm$ 12.8	77.0 $\pm$ 111.3	62.4 $\pm$ 77.7	118.7 $\pm$ 177.2	96.3 $\pm$ 153.5	0.5484
CD4+ CD38+	29.2 $\pm$ 11.0	38.3 $\pm$ 11.9	35.6 $\pm$ 11.4	34.5 $\pm$ 13.1	35.7 $\pm$ 14.7	0.6543
	247.2 $\pm$ 304.5	452.1 $\pm$ 215.6	353.9 $\pm$ 234.9	321.8 $\pm$ 196.5	248.9 $\pm$ 253.7	0.0518
CD8+ CD38+	21.7 $\pm$ 12.4	29.4 $\pm$ 10.3	27.8 $\pm$ 12.7	23.2 $\pm$ 8.9	25.4 $\pm$ 13.8	0.1208
	339.7 $\pm$ 396.1	361.7 $\pm$ 205.2	206.8 $\pm$ 194.6	242.2 $\pm$ 153.6	175.7 $\pm$ 165.6	0.0454
CD4+ HLADR+CD38+	5.7 $\pm$ 3.4	7.5 $\pm$ 9.7	4.1 $\pm$ 5.7	8.1 $\pm$ 12.9	4 $\pm$ 4.2	0.9681
	20.7 $\pm$ 2.8	96.2 $\pm$ 168	98.8 $\pm$ 127.6	185.3 $\pm$ 224.5	94.6 $\pm$ 158.2	0.3192
CD8+ HLADR+CD38+	5.2 $\pm$ 1.1	8.1 $\pm$ 9.5	6.5 $\pm$ 7.9	8.4 $\pm$ 10.8	5.8 $\pm$ 6.4	0.9371
	39.9 $\pm$ 41.3	143.5 $\pm$ 166.1	143.3 $\pm$ 176.1	228.1 $\pm$ 231.4	109.0 $\pm$ 162.	0.1865
CD4+ CD25 High	13.2 $\pm$ 6.4	15.4 $\pm$ 7.9	14.1 $\pm$ 7.9	9.4 $\pm$ 8.1	6.6 $\pm$ 6.6	0.1657
	93.4 $\pm$ 70.1	159.5 $\pm$ 77.1	102.6 $\pm$ 80.7	62.3 $\pm$ 62.0	65.5 $\pm$ 73.1	0.0045

*The different lymphocyte subsets (percentages %) were gated using CD45 and SSC to discriminate this population from monocytes, granulocytes, and cell debris. The absolute counts (Abs) for each cell subset were calculated by multiplying the subset percentage by the absolute count of the specific gated population/100. Bold values is to show the significant differences.

Absolute counts and percentage of total T cells and CD4+ CD8+ subsets were not significantly different between age classes from 18 to 60. In contrast, the distribution of naive and memory T cells changed with age. A trend of decrease in the absolute count of naive CD4+ ($r = -0.3309$, $p = .0026$, Figure 2a) and CD8+ T cells ($r = -0.3660$, $p = .0017$, Figure 2b) was observed with the increased age. Conversely, we detected an increasing trend with aging in percentages of memory CD4+ ($r = 0.2763$, $p = .0059$, Figure 2c) and CD8+ T cells ($r = 0.4795$, $p < .0001$, Figure 2d). Similarly, reverse trend for CD4+ CD38+ ($r = -0.4290$, $p = .0002$, Figure 2e) and CD8+ CD38+ ($r = -0.2425$, $p = .0448$, Figure 2f) was also showed in our study. The absolute counts of Treg cells change with age and further correlation analysis found negative correlation with respect to the absolute counts ($r = -0.4952$, $p = .0001$, Figure 2g) percentage ($r = -0.2552$, $p = .044$, Figure 2h). B cells were not affected significantly by age either proportionally or absolutely (Table 2). The absolute count of NK cells changed significantly and showed an age-related trend decrease ($r = -0.1940$, $p = .0463$, Figure 2i). In

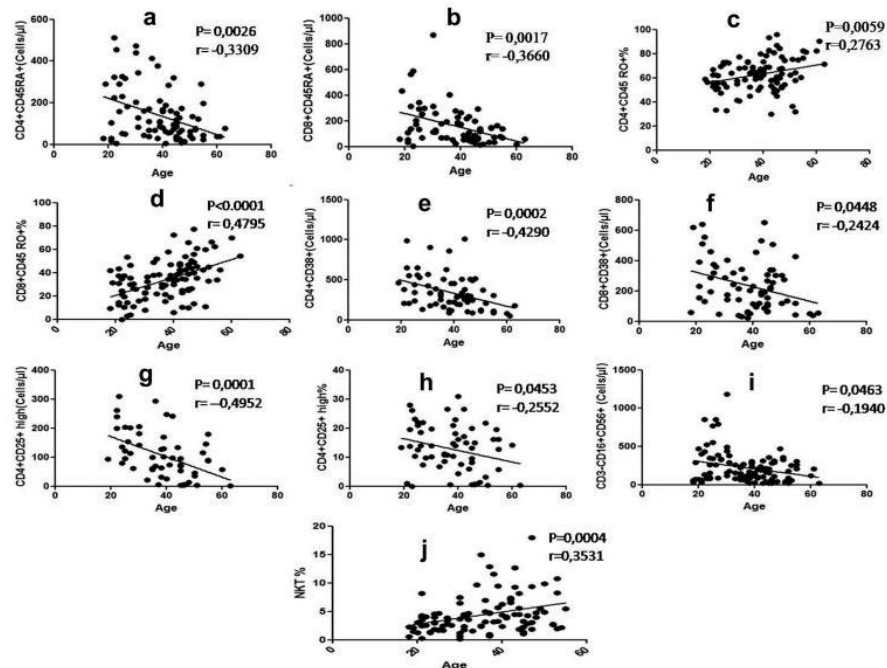


Figure 2. Age-related change of (a) CD4+ CD45RA+ absolute count, (b) CD8+ CD45RA+ absolute count, (c) CD4+ CD45RO+ percentage, (d) CD8+ CD45RO+ percentage, (e) CD4+ CD38+ absolute count, (f) CD8+ CD38+ absolute count, (g) CD4+ CD25 high percentage, (h) CD4+ CD25 high absolute count, (i) NK cells absolute count, and (j) NKT cells percentage. Correlations between two variables were done using Spearman's correlation and linear regression was used to plot graph.

contrast, le NKT absolute count correlated positively with age ($r = 0,3531$, $p = 0,0004$, Figure 2j).

Impact of sex on reference values

The gender-specific reference ranges of lymphocyte subsets (percentages and absolute numbers) are given in Table 3. These results reveal a significant sex-associated differences in lymphocyte distribution of healthy Moroccans: CD3+ T cells and CD4+ T cells percentage was higher in women than in men ($p = .0202$ and $p = .0104$, respectively). In contrast, the absolute count of

Table 3. Sex-related differences in the peripheral blood lymphocyte subsets.

PARAMETERS (Mean $\pm$ SD)		Male N = 67	Female N = 78	p Value
Lymphocytes	Cells/ μ l	2014.1 $\pm$ 933.2	1962.8 $\pm$ 1816.5	0.1108
B cells	/lymphocytes %	13.6 $\pm$ 6.0	11.9 $\pm$ 5.1	0.2026
	Cells/ μ l	249.6 $\pm$ 165.9	210.3 $\pm$ 235.7	0.0161
NK cells	/lymphocytes %	12.6 $\pm$ 7.6	10.5 $\pm$ 6.2	0.1066
	Cells/ μ l	288.2 $\pm$ 251.8	191.0 $\pm$ 170.3	0.0221
NKT cells	/lymphocytes %	3.9 $\pm$ 2.5	6.2 $\pm$ 8.5	0.0522
	Cells/ μ l	76.4 $\pm$ 66	147.7 $\pm$ 266.1	0.5062
CD3+ T cells	/lymphocytes %	68.9 $\pm$ 8.4	71.4 $\pm$ 11.34	0.0202
	Cells/ μ l	1383.0 $\pm$ 628.6	1401.2 $\pm$ 1339.0	0.1787
CD3+CD4+ T cells	/lymphocytes %	37.7 $\pm$ 7.9	41.0 $\pm$ 9.8	0.0104
	Cells/ μ l	745.9 $\pm$ 311.7	832.7 $\pm$ 809.2	0.307
CD3+CD8+ T cells	/lymphocytes %	26.50 $\pm$ 8.2	25.0 $\pm$ 6.2	0.5847
	Cells/ μ l	538.9 $\pm$ 325.1	491.2 $\pm$ 519.3	0.047
CD4+ CD45RO+	/CD4+ %	60.3 $\pm$ 15.8	61.8 $\pm$ 17.2	0.4228
	Cells/ μ l	459.1 $\pm$ 138.9	470.1 $\pm$ 249.9	0.8719
CD8+ CD45RO+	/CD8+ %	30.5 $\pm$ 15.8	36 $\pm$ 17.4	0.1458
	Cells/ μ l	169.7 $\pm$ 92.6	148.6 $\pm$ 101.3	0.3309
CD4+ CD45RA+	/CD4+ %	20.3 $\pm$ 16	15.9 $\pm$ 9.4	0.2523
	Cells/ μ l	196.6 $\pm$ 188.0	123.8 $\pm$ 108.1	0.1894
CD8+ CD45RA+	/CD8+ %	33.6 $\pm$ 35.4	27.5 $\pm$ 16.6	0.1951
	Cells/ μ l	235.9 $\pm$ 202.1	114.8 $\pm$ 79.4	0.0092
CD4+ HLA+	/CD4+ %	8.7 $\pm$ 12.3	5.4 $\pm$ 8.1	0.5888
	Cells/ μ l	104.6 $\pm$ 182.6	90.8 $\pm$ 131.5	0.5489
CD8+ HLA+	/CD8+ %	10.2 $\pm$ 12.7	7.5 $\pm$ 10.3	0.9588
	Cells/ μ l	92.4 $\pm$ 164.2	86.8 $\pm$ 109.9	0.1261
CD4+ CD38+	/CD4+ %	34.8 $\pm$ 13.3	37.7 $\pm$ 11.6	0.2995
	Cells/ μ l	367.3 $\pm$ 199.4	330.6 $\pm$ 244.2	0.1696
CD8+ CD38+	/CD8+ %	25.6 $\pm$ 12.1	27.6 $\pm$ 11	0.2674
	Cells/ μ l	272.0 $\pm$ 202.2	237.6 $\pm$ 180.2	0.5271
CD4+ HLA DR+CD38+	/CD4+ %	7.9 $\pm$ 11.9	4.5 $\pm$ 6.312.4	0.4453
	Cells/ μ l	145.4 $\pm$ 217.1	110.1 $\pm$ 142.4	0.995
CD8+ HLADR+CD38+	/CD8+ %	8.2 $\pm$ 9.5	6.6 $\pm$ 8.6	0.9937
	Cells/ μ l	185.8 $\pm$ 232.9	149.6 $\pm$ 155.2	0.4358
CD4+ CD25 High	/CD4+ %	13.2 $\pm$ 8.5	12.3 $\pm$ 7.7	0.6124
	Cells/ μ l	112.8 $\pm$ 92.3	101.5 $\pm$ 69.2	0.9124

*The different lymphocyte subsets (percentages %) were gated using CD45 and SSC to discriminate this population from monocytes, granulocytes, and cell debris. The absolute counts (Abs) for each cell subset were calculated by multiplying the subset percentage by the absolute count of the specific gated population/100. Bold values is to show the significant differences.

CD8+ T cells, B and NK cells was significantly found higher in men versus women ($p = .047$, $p = .0161$ and $p = .0221$, respectively). The activated T cell subsets and Treg showed no differences in regards to sex. Similarly, the distribution of naive and memory T cells showed no differences in regards to sex, the only exception being a higher proportion of CD8+ CD45RA+ absolute count in men versus women ($p = .0092$).

Discussion

Lymphocyte subsets can be affected by host and environmental factors. This implies a need to establish local, specific, normal reference values for each of the lymphocyte subset.^[2-7] Similar to previous published works (see Table 4) our results demonstrated differences in the reference values as well. In fact, no similarities are observed between countries of the same continent or between population of the same race (Caucasian, Asian, Arab or Negroide). Only punctual isolate similarities concerning some populations for some parameters were observed. This indicates the need to consider geographical variations when using the lymphocyte reference ranges.^[10-18] Such variances are likely to be due to differences in biological parameters (e.g., gender, age, and ethnicity)^[19], lifestyle factors (e.g., alcohol intake, smoking habit, diet, exercise, and stress levels)^[5-20], and environmental factors (exposure to infectious diseases).^[21-23] Furthermore, the techniques employed in the measurement of the parameter values can also affect the results.

In our study, the values of the lymphocyte subsets except for B cells are lower than those reported in the previous Moroccan study.^[9] Those differences could be due to the sex/age stringency of the population studied (90% of the study population were young male) or related to the measurement method employed (gating strategy was based only on forward-side scatter plot). Interestingly, we note a particular similarity between our results and those reported within Tunisian population. In fact, these two Maghrebien populations are sharing the same geographic, ethnic, economic, and cultural aspects.

The natural process of aging is accompanied by a deterioration of both innate and adaptive immunological system.^[24] These functional alterations are then associated with a higher susceptibility to infections^[25], an impaired antibody-mediated response to vaccine^[26-27] and an increased risk to develop autoimmune and malignant cancer.^[28-29] The thymus is a central organ of the T cell immune system, which undergoes age-related involution. Thymic involution directly correlates with the declination of thymopoiesis which precedes T cell-related immune-incompetence in advanced age.^[30-31] Controversial results on the impact of age on T lymphocyte were observed. Some studies have shown that the number of CD4+ cells increased while the number of CD8+ decreased with

Table 4. Comparison of the lymphocyte subsets in the present study with other studies.

		Year	Sample size	CD3+ (cells/ μ l)	CD3+ CD4+ (cells/ μ l)	CD3 +CD8+ (cells/ μ l)	CD4/CD8RATIO	CD16+ CD56+ (cells/ μ l)	CD19+ (cells/ μ l)
Africa	Maghreb	Morocco	145	1393	793	513	1.54	233	227
		Tunisia	242	1431	871	637	1.37	211	59
Asia	Subtropical	Uganda	52	1345	799	470	-	-	-
		Kenyan	663	1615	945	586	1.8	329	133
	Middle east	Oman	315	1655	920	646	1.57	-	-
		Turkia	118	1701	1005	638	-	308	348
Europe	Western Asia	China	220	1680	1095	669	1.68	164	254
		Germany	1068	1387	694	589	1.32	403	216
	East Asia	Italy	100	1320	870	460	1.9	280	220
America	Florida	1999	965	1532	940	551	1.71	278	230
		Brazil	50	1620	1003	590	1.8	214	256
		2013	641	1585	931	541	-	-	-

age^[32], while others state that the numbers of CD4+ and CD8+ may increase^[17-19-33], decrease^[15-34] or don't change with age.^[35]

Our results do not show any significant quantitative alteration in the overall T subsets with age. However, we did observe an age-related decrease in naive CD4+ and CD8+ T cells and an increase in memory CD4+ and CD8+ T cells. These results are akin to many other studies, which have reported that CD8+ memory T cells are mainly effector memory and late differentiated effector memory T cells, while the CD4+ memory T cells are central memory T cells.^[36-38] This shift results in a restriction of the T-cell receptor repertoire and leads to impaired T cell functions.^[31-39] Moreover, significant decrease trends of CD4+ CD38+ and CD8+ CD38+ with aging were noted in our analysis, in accordance with previous report.^[14-40] High expression of CD38 is considered as a marker of poor response to therapy and bad prognosis in malignancy. However, the knowledge on the mechanism of age-related changes of T activation marker, CD38, or HLA-DR, is still very limited.

In contradiction to previous studies which have found both an increasing and stable Treg numbers with age^[35-40], we found a decreasing Treg numbers. Other studies have shown that Treg undergoes an age-dependent differentiation toward CD45RA+ memory phenotype that is not accompanied by a decrease in their suppressive capability.^[35-41]

The age-related change in the frequency phenotype and activity of NK cells has been well documented. The percentage and absolute numbers of NK cells have been reported to be maintained^[14-35] or increased^[33-34-42] in the elderly. Interestingly, in our population study, we noted an age-associated decrease in NK cells counts. A remodeling of NK cell subsets characterized by a decrease in the percentage of the more immature CD56bright NK cells and an increase of CD56dim NK cells has been described.^[43] A significant increase in cells co-expressing CD3 and NK cell markers has been shown in aging.^[42] Similarly, our study revealed a significant age-dependent increase of NKT cell subsets.

With regard to B cell-age-related differences, our data have shown no significant differences between the age groups. This is in line with all other age-related studies performed on other populations.^[14-35] Although B-cell counts were not significantly changed during long lifetime, B-cell diversity can dramatically collapse in elderly and increase immune frailty.^[44] In fact, it is known that the quality of the antibody response changes with age, with a decrease in effective and specific antibodies in favor of the production of nonspecific antibodies in response to vaccination.^[45] This reduced B-cell diversity is likely due to a lower output of new B cells from the bone marrow as a consequence of the age-associated changes in the number and function of hematopoietic stem cells.

In concordance with other populations^[10-13-14-35], gender has not been demonstrated to have an important role in lymphocyte subset composition in our study population. A higher percentage of CD3+ and CD4+ T cells was observed in females while CD8+ (in particular CD8+ CD45RA), B and

NK cell counts were higher in men. It has been suggested that sex hormone could be an explanation for the gender observed differences. In fact, sex hormones have been shown to modulate immune function at various levels. Circulating lymphocytes have receptors for androgens and estrogens and these hormones also exhibit diurnal and circannual rhythmicity.^[46–48]

These immune cells are also influenced by the hygiene standard of individuals. The mean factors impacting this hygiene standard are the individual's economic status and level of awareness. In this optic, we checked the influence of PIC. We observed no differences between persons with low PIC and those with middle and high PIC (data not shown). We also assessed the influence of the instructional levels of our study population but noted no differences as total and between men and female (data not shown). We were unable to assess the influence of smoking and alcohol intake since 90% of our study population declared to be non-smokers nor alcohol drinkers.

The immunogenetic background related to ethnicity has shown to have a significant influence on the lymphocytes subset.^[33–49] Moroccan population is very heterogeneous and is historically divided into two major groups: Arabs and Berber. In this study, we recruited subjects from different geographic regions of Morocco to ensure that all ethnic groups of the Moroccan population were included in the study. Our analysis showed no differences in lymphocyte ranges with respect to ethnic origin (data not shown). Since our study subjects were recruited from Moroccan big cities, the purity of their genetic character was certainly lost by the ethnic mixing in such urban centers.

Conclusion

To summarize, we established the reference cell count values for lymphocyte subsets in the healthy Moroccan population. Moreover, we analyzed the influence of gender, age, infection, ethnic and income level on the lymphocyte subsets. Gender and age had a significant impact on the lymphocyte subset but no ethnic or socio-economic factors difference influences were observed. These results can be applied to all North African (Maghrebien) countries considering their geographic, ethnic, economic, and cultural similarities. Our results highlight the importance of taking into account these factors when making clinical medical decisions.

Acknowledgments

The authors would like to thank all study participants and the health and laboratory professional that facilitate the realization of this work.

Funding

This study was supported by [Hassan II Academy for Sciences and techniques of Morocco] under [IMMGEN project].

Conflict of interest statement

The authors declare that they have no competing interests.

ORCID

Karima Sahmoudi  <http://orcid.org/0000-0001-7384-3656>
 Hicham Tahoune  <http://orcid.org/0000-0002-9748-734X>
 Abderrahim Sadak  <http://orcid.org/0000-0001-8312-4233>
 Fouad Seghrouchni  <http://orcid.org/0000-0001-9935-2580>

References

- [1] Huenecke, S.; Behl, M.; Fadler, C.; Zimmermann, S. Y.; Bochennek, K.; Tramsen, L.; Esser, R.; Klarmann, D.; Kamper, M.; Sattler, A.; et al. Age-matched Lymphocyte Subpopulation Reference Values in Childhood and Adolescence. Application of Exponential Regression Analysis. *Eur. J. Haematol.* 2008, 80, 532–539. DOI: 10.1111/j.1600-0609.2008.01052.x.
- [2] Mandala, W. L.; Ananworanich, J.; Apornpong, T.; Kerr, S. J.; MacLennan, J. M.; Hanson, C.; Jaimulwong, T.; Gondwe, E. N.; Rosenblatt, H. M.; Bunupuradah, T.; et al. Control Lymphocyte Subsets: Can One Country's Values Serve for Another's? *J. Allergy Clin. Immunol.* 2014, 134, 759–761. DOI: 10.1016/j.jaci.2014.06.030.
- [3] Choong, M. L.; Ton, S. H.; Cheong, S. K. Influence of Race, Age and Sex on the Lymphocyte Subsets in Peripheral Blood of Healthy Malaysian Adults. *Ann. Clin. Biochem.* 1995, 32, 532–539. DOI: 10.1177/000456329503200603.
- [4] Cheng, C. K.; Chan, J.; Cembrowski, G. S.; van Assendelft, O. W. Complete Blood Count Reference Interval Diagrams Derived from NHANES III: Stratification by Age, Sex, and Race. *Lab Hematol.* 2004, 10, 42–53. DOI: 10.1532/LH96.04010.
- [5] García-Dabrio, M. C.; Pujol-Moix, N.; Martínez-Perez, A.; Fontcuberta, J.; Souto, J. C.; Soria, J. M.; Nomdedéu, J. F. Influence of Age, Gender and Life Style in Lymphocyte Subsets: Report from the Spanish Gait-2 Study. *Acta Haematol.* 2012, 127, 244–249. DOI: 10.1159/000337051.
- [6] Pera, A.; Campos, C.; López, N.; Hassounah, F.; Alonso, C.; Tarazona, R.; Solana, R. Immunosenescence: Implications for Response to Infection and Vaccination in Older People. *Maturitas.* 2015, 82, 50–55. DOI: 10.1016/j.maturitas.2015.05.004.
- [7] Pérez-de-Heredia, F.; Gómez-Martínez, S.; Díaz, L. E.; Veses, A. M.; Nova, E.; Wärnberg, J.; Huybrechts, I.; Vyncke, K.; Androutsos, O.; Ferrari, M.; et al. Influence of Sex, Age, Pubertal Maturation and Body Mass Index on Circulating White Blood Cell Counts in Healthy European Adolescents-the HELENA Study. *Eur. J. Pediatr.* 2015, 174, 999–1014. DOI: 10.1007/s00431-015-2497-5.
- [8] Feki, S.; Rekaya, Z.; Ben Chaaben, T.; Zribi, A.; Boukef, K.; Jenhani, F. Determination of T-lymphocyte Subsets in a North African Population (Tunisia): Establishment of

- Normal Ranges and Results in HIV-Infected Individuals. *Dis. Markers*. 1998, 14, 161–164. DOI: [10.1155/1998/153450](https://doi.org/10.1155/1998/153450).
- [9] Touil, N.; Hadeif, R.; Lemnouer, A.; Zrara, A.; Sbai, A. I.; Belfquih, B.; Mrani, S.; Benkirane, A.; Ouahine, M.; Mrabet, M. Range-reference Determination of Lymphocyte Subsets in Moroccan Blood Donors. *Afr. Health Sci*. 2012, 12, 334–338. DOI: [10.4314/ahs.v12i3.14](https://doi.org/10.4314/ahs.v12i3.14).
- [10] Naluyima, P.; Eller, L. A.; Ouma, B. J.; Kyabaggu, D.; Kataaha, P.; Guwatudde, D.; Kibuuka, H.; Wabwire-Mangen, F.; Robb, M. L.; Michael, N. L.; et al. Sex and Urbanicity Contribute to Variation in Lymphocyte Distribution across Ugandan Populations. *PLoS One*. 2016, 11, e0146196. DOI: [10.1371/journal.pone.0146196](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146196).
- [11] Bosire, E. M.; Nyamache, A. K.; Gicheru, M. M.; Khamadi, S. A.; Lihana, R. W.; Okoth, V. Population Specific Reference Ranges of CD3, CD4 and CD8 Lymphocyte Subsets among Healthy Kenyans. *AIDS Res. Ther*. 2013, 10, 24. DOI: [10.1186/1742-6405-10-24](https://doi.org/10.1186/1742-6405-10-24).
- [12] Al-Jabri, A. A.; Al-Shukaili, A. K.; Al-Rashdi, Z. T.; Ganguly, S. S. Reference Ranges for Lymphocyte Subsets in Healthy Adult Male Omanis. *Saudi Med. J*. 2008, 29, 409–412.
- [13] Yaman, A.; Cetiner, S.; Kibar, F.; Taşova, Y.; Seydaoğlu, G.; Dündar, I. H. Reference Ranges of Lymphocyte Subsets of Healthy Adults in Turkey. *Med. Princ. Pract*. 2005, 14, 189–193. DOI: [10.1159/000084638](https://doi.org/10.1159/000084638).
- [14] Qin, L.; Jing, X.; Qiu, Z.; Cao, W.; Jiao, Y.; Routy, J. P.; Li, T. Aging of Immune System: Immune Signature from Peripheral Blood Lymphocyte Subsets in 1068 Healthy Adults. *AGING*. 2016, 8, 848–859. DOI: [10.18632/aging.100894](https://doi.org/10.18632/aging.100894).
- [15] Jentsch-Ullrich, K.; Koenigsmann, M.; Mohren, M.; Franke, A. Lymphocyte Subsets' Reference Ranges in an Age and Gender Balanced Population of 100 Healthy Adults a Monocentric German Study. *Clin. Immunol*. 2005, 2, 192–197. DOI: [10.1016/j.clim.2005.03.020](https://doi.org/10.1016/j.clim.2005.03.020).
- [16] Santagostino, A.; Garbaccio, G.; Pistorio, A.; Bolis, V.; Camisasca, G.; Pagliaro, P.; Girotto, M. An Italian National Multicenter Study for the Definition of Reference Ranges for Normal Values of Peripheral Blood Lymphocyte Subsets in Healthy Adults. *Haematologica*. 1999, 84, 499–504.
- [17] Valiathan, R.; Deeb, K.; Diamante, M.; Ashman, M.; Sachdeva, N.; Asthana, D. Reference Ranges of Lymphocyte Subsets in Healthy Adults and Adolescents with Special Mention of T Cell Maturation Subsets in Adults of South Florida. *Immunobiology*. 2014, 219, 487–496. DOI: [10.1016/j.imbio.2014.02.010](https://doi.org/10.1016/j.imbio.2014.02.010).
- [18] Torres, A. J.; Angelo, A. L.; Silva, M. O.; Bastos Mde, C.; Souza, D. F.; Inocêncio, L. A.; Lemos, J. A.; Junior, R. S.; Castro, A. C.; Palma, P. V.; et al. Establishing the Reference Range for T Lymphocytes Subpopulations in Adults and Children from Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*. 2013, 55, 323–328. DOI: [10.1590/S0036-46652013000500005](https://doi.org/10.1590/S0036-46652013000500005).
- [19] Chng, W. J.; Tan, G. B.; Kuperan, P. Establishment of Adult Peripheral Blood Lymphocyte Subset Reference Range for an Asian Population by Single-platform Flow Cytometry: Influence of Age, Sex, and Race and Comparison with Other Published Studies. *Clin. Diagn. Lab. Immunol*. 2004, 11, 168–173. DOI: [10.1128/cdli.11.1.168-173.2004](https://doi.org/10.1128/cdli.11.1.168-173.2004).
- [20] Tollerud, D. J.; Clark, J. W.; Brown, L. M.; Neuland, C. Y.; Mann, D. L.; Pankiw-Trost, L. K.; Blattner, W. A.; Hoover, R. N. The Effects of Cigarette Smoking on T-cell Subsets: A Population-based Survey of Healthy Caucasians. *Am. Rev. Respir. Dis*. 1989, 139, 1446–1451. DOI: [10.1164/ajrccm/139.6.1446](https://doi.org/10.1164/ajrccm/139.6.1446).
- [21] Ben-Smith, A.; Gorak-Stolinska, P.; Floyd, S.; Weir, R. E.; Lalor, M. K.; Mvula, H.; Crampin, A. C.; Wallace, D.; Beverley, P. C.; Fine, P. E.; et al. Differences between

- Naive and Memory T Cell Phenotype in Malawian and UK Adolescents: A Role for Cytomegalovirus? *BMC Infect. Dis.* 2008, 8, 139. DOI: 10.1186/1471-2334-8-139.
- [22] Weiss, G. E.; Crompton, P. D.; Li, S.; Walsh, L. A.; Moir, S.; Traore, B.; Kayentao, K.; Ongoiba, A.; Doumbo, O. K.; Pierce, S. K. Atypical Memory B Cells are Greatly Expanded in Individuals Living in a Malaria-endemic Area. *J. Immunol.* 2009, 183, 2176–2182. DOI: 10.4049/jimmunol.0901297.
- [23] Sutherland, J. S.; Hill, P. C.; Adetifa, I. M.; de Jong, B. C.; Donkor, S.; Joosten, S. A.; Opmeer, L.; Haks, M. C.; Ottenhoff, T. H.; Adegbola, R. A.; et al. Identification of Probable Early-onset Biomarkers for Tuberculosis Disease Progression. *PLoS One.* 2011, 6, e25230. DOI: 10.1371/journal.pone.0025230.
- [24] Weiskopf, D.; Weinberger, B.; Grubeck-Loebenstein, B. The Aging of the Immune System. *Transpl. Int.* 2009, 11, 1041–1050. DOI: 10.1111/j.1432-2277.2009.00927.x.
- [25] Yager, E. J.; Ahmed, M.; Lanzer, K.; Randall, T. D.; Woodland, D. L.; Blackman, M. A. Age-associated Decline in T Cell Repertoire Diversity Leads to Holes in the Repertoire and Impaired Immunity to Influenza Virus. *J. Exp. Med.* 2008, 205, 711–723. DOI: 10.1084/jem.20071140.
- [26] Nikolich-Zugich, J.; Ageing and Life-long Maintenance of T-cell Subsets in the Face of Latent Persistent Infections. *Nat. Rev. Immunol.* 2008, 8, 512–522. DOI: 10.1038/nri2318.
- [27] Aspinall, R.; Del Giudice, G.; Effros, R. B.; Grubeck-Loebenstein, B.; Sambhara, S. Challenges for Vaccination in the Elderly. *Immun. Ageing.* 2007, 4, 9. DOI: 10.1186/1742-4933-4-9.
- [28] Prelog, M.; Aging of the Immune System: A Risk Factor for Autoimmunity? *Autoimmun. Rev.* 2006, 5, 136–139. DOI: 10.1016/j.autrev.2005.09.008.
- [29] Fulop, T.; Kotb, R.; Fortin, C. F.; Pawelec, G.; de Angelis, F.; Larbi, A. Potential Role of Immunosenescence in Cancer Development. *Ann. NY AcadSci.* 2010, 1197, 158–165. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2009.05370.x.
- [30] Goronzy, J. J.; Weyand, C. M. Understanding Immunosenescence to Improve Responses to Vaccines. *Nat. Immunol.* 2013, 14, 428–436. DOI: 10.1038/ni.2588.
- [31] Gui, J.; Mustachio, L. M.; Su, D. M.; Craig, R. W. Thymus Size and Age-related Thymic Involution: Early Programming, Sexual Dimorphism, Progenitors and Stroma. *Ageing Dis.* 2012, 3, 280–290.
- [32] Tollerud, D. J.; Ildstad, S. T.; Brown, L. M.; Clark, J. W.; Blattner, W. A.; Mann, D. L.; Neuland, C. Y.; Pankiw-Trost, L.; Hoover, R. N. T-cell Subsets in Healthy Teenagers: Transition to the Adult Phenotype. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1990, 56, 88–96. DOI: 10.1016/0090-1229(90)90172-M.
- [33] Lee, B. W.; Yap, H. K.; Chew, F. T.; Quah, T. C.; Prabhakaran, K.; Chan, G. S.; Wong, S. C.; Seah, C. C. Age- and Sex-related Changes in Lymphocyte Subpopulations of Healthy Asian Subjects: From Birth to Adulthood. *Cytometry.* 1996, 26, 8–15. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0320(19960315)26:1<8::AID-CYTO2>3.0.CO;2-E.
- [34] Jiao, Y.; Qiu, Z.; Xie, J.; Li, D.; Li, T. Reference Ranges and Age Related Changes of Peripheral Blood Lymphocyte Subsets in Chinese Healthy Adults. *Sci. China C Life Sci.* 2009, 7, 643–650.
- [35] Kverneland, A. H.; Streitz, M.; Geissler, E.; Hutchinson, J.; Vogt, K.; Boës, D.; Niemann, N.; Pedersen, A. E.; Schlickeiser, S.; Sawitzki, B. Age and Gender Leucocytes Variances and References Values Generated Using the Standardized ONE-Study Protocol. *Cytometry A.* 2016, 8, 543–564. DOI: 10.1002/cyto.a.22855.
- [36] Koch, S.; Larbi, A.; Derhovanessian, E.; Ozcelik, D.; Naumova, E.; Pawelec, G. Multiparameter Flow Cytometric Analysis of CD4 and CD8 T Cell Subsets in Young and Old People. *Immun. Ageing.* 2008, 5, 6. DOI: 10.1186/1742-4933-5-6.

- [37] Lipp, M.; Sallusto, F.; Lenig, D.; Fo, R.; Lanzavecchia, A. Two Subsets of Memory T Lymphocytes with Distinct Homing Potentials. *Lett. Nat.* 1999, 401, 708–712. DOI: 10.1038/44385.
- [38] Saule, P.; Trauet, J.; Dutriez, V.; Lekeux, V.; Dessaint, J. P.; Labalette, M. Accumulation of Memory T Cells from Childhood to Old Age: Central and Effector Memory Cells in CD4 (+) versus Effector Memory and Terminally Differentiated Memory Cells in CD8 (+) Compartment. *Mech. Ageing Dev.* 2006, 127, 274–281. DOI: 10.1016/j.mad.2005.11.001.
- [39] Goronzy, J. J.; Lee, W. W.; Weyand, C. M. Aging and T-cell Diversity. *Exp. Gerontol.* 2007, 42, 400–406. DOI: 10.1016/j.exger.2006.11.016.
- [40] Melzer, S.; Zachariae, S.; Bocsi, J.; Engel, C.; Löffler, M.; Tárnok, A. Reference Intervals for Leucocyte Subsets in Adults: Results from a Population-based Study Using 10-color Flow Cytometry. *Cytometry B. Clin. Cytom.* 2015, 88, 270–281. DOI: 10.1002/cyto.b.21234.
- [41] Santner-Nanan, B.; Seddiki, N.; Zhu, E.; Quent, V.; Kelleher, A.; Fazekas de St Groth, B.; Nanan, R. Accelerated Age-dependent Transition of Human Regulatory T Cells to Effector Memory Phenotype. *Int. Immunol.* 2008, 20, 375–383. DOI: 10.1093/intimm/dxm151.
- [42] Solana, R.; Mariani, E. NK and NK/T Cells in Human Senescence. *Vaccine.* 2000, 18, 1613–1620. DOI: 10.1016/S0264-410X(99)00495-8.
- [43] Solana, R.; Campos, C.; Pera, A.; Tarazona, R. Shaping of NK Cell Subsets by Aging. *Curr. Opin. Immunol.* 2014, 29, 56–61. DOI: 10.1016/j.coi.2014.04.002.
- [44] Gibson, K. L.; Wu, Y. C.; Barnett, Y.; Duggan, O.; Vaughan, R.; Kondeatis, E.; Nilsson, B. O.; Wikby, A.; Kipling, D.; Dunn-Walters, D. K. B-cell Diversity Decreases in Old Age and Is Correlated with Poor Health Status. *Aging Cell.* 2009, 1, 18–25. DOI: 10.1111/j.1474-9726.2008.00443.x.
- [45] Howard, W. A.; Gibson, K. L.; Dunn-Walters, D. K. Antibody Quality in Old Age. *Rejuvenation Res.* 2006, 9, 117–125. DOI: 10.1089/rej.2006.9.117.
- [46] Olsen, N. J.; Viselli, S. M.; Fan, J.; Kovacs, W. J. Androgens Accelerate Thymocyte Apoptosis. *Endocrinology.* 1998, 2, 748–752.
- [47] Grossman, C.; Possible Underlying Mechanisms of Sexual Dimorphism in the Immune Response, Fact and Hypothesis. *J. Steroid Biochem.* 1989, 34, 241–251. DOI: 10.1016/0022-4731(89)90088-5.
- [48] Verthelyi, D.; Sex Hormones as Immunomodulators in Health and Disease. *Int. Immunopharmacol.* 2001, 1, 983–993. DOI: 10.1016/S1567-5769(01)00044-3.
- [49] Hozard, R. R.; Fasano, C. S.; Frey, L.; Miller, C. H. Reference Intervals of CD3, CD4, CD8, CD4/CD8 and Absolute CD4 Values in Asian and Non-Asian Populations. *Cytometry.* 1996, 26, 231–232. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0320(19960915)26:3<231::AID-CYTO9>3.0.CO;2-H.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Immune activation and regulatory T cells in *Mycobacterium tuberculosis* infected lymph nodesKarima Sahmoudi^{1,2}, Hassan Abbassi³, Nada Bouklata⁴, Mohamed Nouredine El Alami³, Abderrahmane Sadak², Christopher Burant⁵, W. Henry Boom⁶, Rajae El Aouad¹, David H. Canaday^{6†} and Fouad Seghrouchni^{1*†} **Abstract**

Background: Lymph node tuberculosis (LNTB) is the most frequent extrapulmonary form of tuberculosis (TB). Studies of human tuberculosis at sites of disease are limited. LNTB provides a unique opportunity to compare local *in situ* and peripheral blood immune response in active *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) disease. The present study analysed T regulatory cells (Treg) frequency and activation along with CD4+ T cell function in lymph nodes from LNTB patients.

Results: Lymph node mononuclear cells (LNMC) were compared to autologous peripheral blood mononuclear cells (PBMC). LNMC were enriched for CD4+ T cells with a late differentiated effector memory phenotype. No differences were noted in the frequency and multifunctional profile of memory CD4+ T cells specific for Mtb. The proportion of activated CD4+ and Tregs in LNMC was increased compared to PBMC. The correlation between Tregs and activated CD4+ T cells was stronger in LNMC than PBMC. Tregs in LNMC showed a strong positive correlation with Th1 cytokine production (IL2, IFN γ and TNF α) as well as MIP-1 α after Mtb antigen stimulation. A subset of Tregs in LNMC co-expressed HLA-DR and CD38, markers of activation.

Conclusion: Further research will determine the functional relationship between Treg and activated CD4+ T cells at lymph node sites of Mtb infection.

Keywords: Tuberculosis, Lymphadenitis, Lymph node, Treg cells, conventional T cell, activation

Background

Mycobacterium tuberculosis (Mtb) infection is a major global health problem with approximately 10.4 million cases and 1.4 million deaths from tuberculosis (TB) in 2015 [1]. Furthermore, one-third of the world's population is thought to be infected by Mtb. Extra pulmonary TB represents approximately 20% of clinical TB disease. Lymph node tuberculosis (LNTB) is the most frequent extrapulmonary form [1].

Cellular immune responses play a pivotal role in control of Mtb infection with CD4+ T cells having the central role. After infection CD4+ T cells undergo activation manifested by expression of surface molecules including

HLA-DR and CD38 [2, 3]. Functionally, CD4+ T cells control infection by producing Th1 and Th17 cytokines [4]. Polyfunctional T cells, defined by their ability to co-express more than one cytokine, have been associated with protection against Mtb disease [4–6].

At sites of infection, immune responses are modulated by T regulatory cells (Tregs) [7, 8]. Tregs express CD3, CD4, high levels of CD25, low levels of the IL-7 receptor α -chain (CD127) and the intracellular marker forkhead box p3 (FoxP3) [9].

The relationship between Tregs and immune activation at sites of Mtb disease is not clear [10, 11]. The objective of the present study was to evaluate the interaction between Tregs and the function and activation of CD4+ T cells in lymph node vs. the peripheral blood compartments in persons with LNTB.

* Correspondence: fseghrouchni@yahoo.fr

[†]David H. Canaday and Fouad Seghrouchni contributed equally to this work.

¹Laboratory of Cellular Immunology, National Institute of Hygiene, 27, Avenue Ibn Batouta, PB 769, 11400 Rabat, Morocco

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2018 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Methods

Subjects and preparation of immune cells

Eighteen patients (5 men, 13 women, age range 17–60 years) were recruited in the Hassan II University Hospital of Fes (Morocco) among patients with cervical lymphadenitis. Active LNTB was diagnosed by history, physical examination, and lab studies by experienced clinicians. The diagnosis of LNTB was based on a combination of clinical symptoms, pathology and response to TB drug therapy. Clinical symptoms associated with lymphadenitis included local lymphadenopathy, weight loss, fever, sweats, and anorexia. Histopathological evidence consisted of the presence of a granulomatous lesion with caseation in excisional biopsy specimens. Pulmonary radiography and HIV serology were performed to exclude pulmonary TB and HIV infection respectively. All LNTB cases were newly diagnosed and none had received anti-TB chemotherapy before sample collection. Tuberculin skin test results were positive (induration ≥ 10 mm) for 15 out of 18 patients (83%). All patients were BCG vaccinated, and none reported contact with a case of pulmonary TB.

For all patients, the affected lymph node was in the neck and was surgically removed. In addition, 10 ml of peripheral blood was collected before starting anti-TB treatment. One portion of the lymph node was used for histological examination, and the other for isolation of lymph node mononuclear cells (LNMC) for immunologic studies.

Biopsy specimens were crushed gently in tissue culture medium. LNMC were spun and separated using Ficoll-Hypaque density centrifugation. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from heparinized venous blood under endotoxin-free conditions by Ficoll-Hypaque (SIGMA) density centrifugation. Cells were cryopreserved and stored in liquid nitrogen until shipment by a cryoshipper to Case Western Reserve University for immunological studies.

Phenotypic and functional study of T cells

PBMC and LNMC (10^6 /tube) were stimulated with a pool of 34 overlapping peptides from Mtb-antigen ESAT6/CFP10 at 6.25 μ g/ml per peptide (New England peptide, Gardner, MA), *M. tuberculosis* CDC1551 whole cells lysate (Mtb lysate) (BEI Resources) or staphylococcal enterotoxin B (SEB, 2 μ g/ml, Sigma) overnight at 37 °C in 5% CO₂. Unstimulated PBMC and LNMC served as negative controls. Anti-CD28/CD49d (1 μ g/ml each, eBioscience and Biolegend) was added to each tube during stimulation and brefeldin A (5 μ g/ml, Sigma) was added 2 hr later. After stimulation, cells were washed with PBS and surface stained with anti-CCR7-PE-Cy7 (BD Bioscience) for 15 min at 37 °C, then live dead yellow (Invitrogen), anti-CD14-BV570, anti-CD4-APC/Cy7,

anti-CD8-BV510 (all Biolegend) and anti-CD45RA-PE/TR (Invitrogen) were added and incubated at RT for 25 min. Afterward cells were washed, permeabilized (Cytofix/Cytoperm Kit, BD Pharmingen) according to the manufacturer's instructions and stained for intracellular expression with anti-CD3-PerCP, anti-IFN γ -Alexa700, anti-IL2-APC, anti-TNF α -Pacific Blue, anti-IL17-BV711 (all Biolegend) and anti-MIP-1 α -FITC (R&D). Cells were then washed, fixed in 1% paraformaldehyde and 1×10^6 total events collected from each sample on an LSR-II flow cytometer (BD). Net responding cells for each cytokine were calculated by subtracting the no antigen condition (medium only) from the antigen simulated result. The analysis of all functional markers expressed after stimulation were done on viable total memory CD4+ and CD8+ T cells. Memory phenotype was determined by CCR7 and CD45RA expression. Naïve T cells were CD45RA+/CCR7+, central memory (CM) cells were CD45RA-/CCR7+, effector memory (EM) cells were CD45RA-/CCR7- and effector cells (E) were CD45RA+/CCR7-.

To identify Tregs and activated T cells, PBMC and LNMC were surface stained with live dead yellow (Invitrogen), anti-CD3-APC/Cy7, anti-CD4-PerCP, anti-CD8-Alexa700, anti-CD25-APC, anti-HLA-DR-FITC, anti-CD38-PE/Cy7 (all Biolegend), and anti-CD127-BV650 (BD Bioscience), and incubated at RT for 25 min. After, cells were washed, permeabilized and intracellular stained with anti-FoxP3-PE (eBioscience) or isotype-matched negative control for gating purposes.

Plots were analyzed using FlowJo software (version 6.1.1; Tree Star, Ashland, OR, USA). Boolean analysis on Flow Jo and SPICE (NIAID, NIH, USA) was used to assess cytokine polyfunctionality.

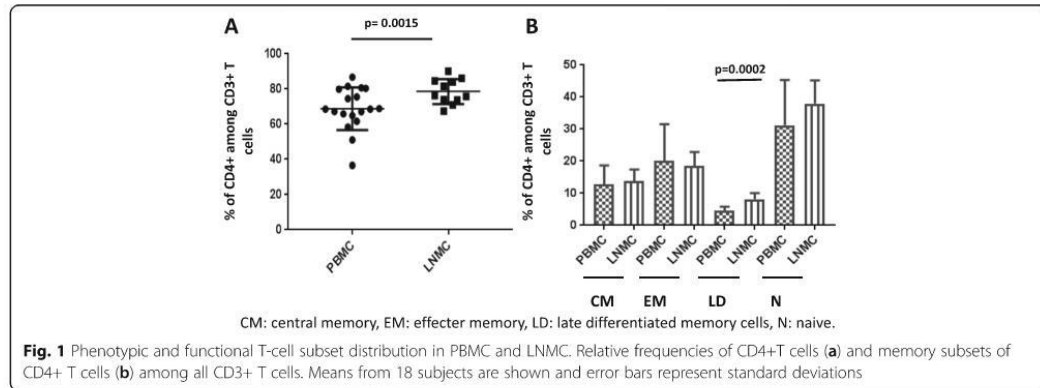
Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the paired Student's t test for comparisons of PBMC and LNMC. P value for comparison of polyfunctional profile was done using SPICE software. Significance of correlations was analyzed by the nonparametric Spearman test. A *p* value of ≤ 0.05 was considered significant. Data were analyzed by Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software (IBM) and the GraphPad Prism software, version 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego).

Results

Phenotypic and cytokine profile of CD4+ T cells in LNMC and PBMC

We first compared memory phenotypes of T lymphocyte subsets in LNMC and PBMC. LNMC were significantly enriched for CD4+ T cells [80.7 ± 5.6 % vs. 68.0 ± 6.6 % (*p* = 0.0015)] (Fig. 1a). CD8+ T cells were concomitantly lower in LNMC compared to PBMC

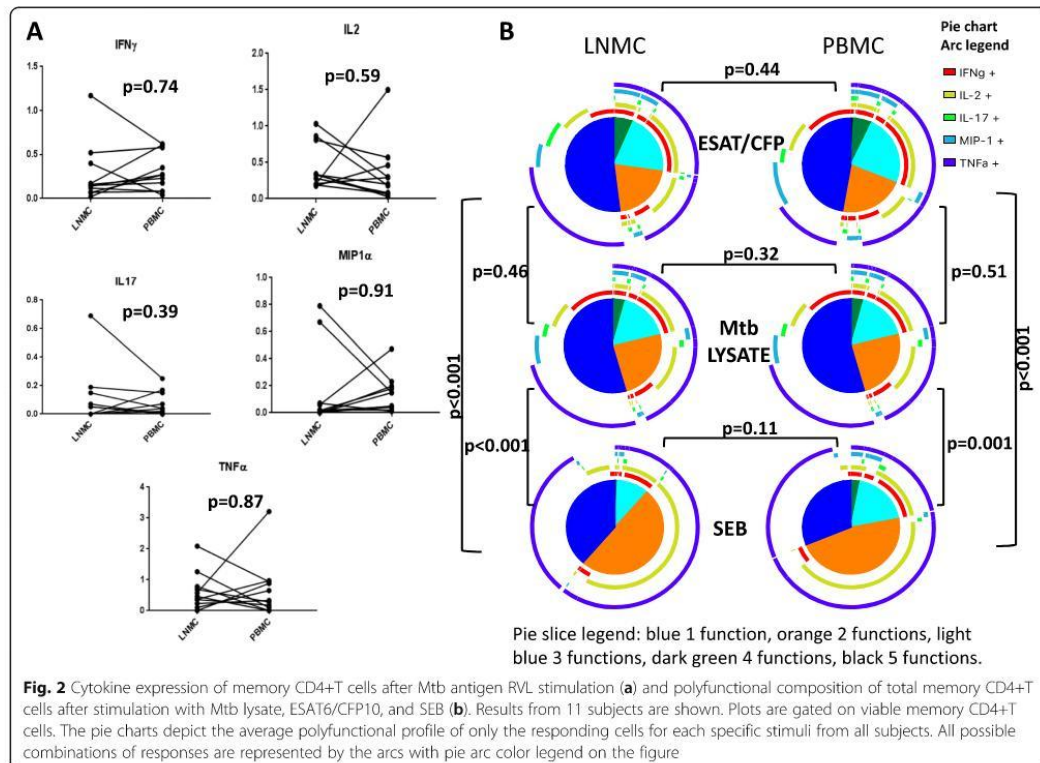


[17.6±5.8 % vs. 27.4±11.7 % ($p = 0.0055$)] (Additional file 1). Memory subsets of CD4+ T cells were defined according to expression of CD45RA and CCR7 and only the effector subset was modestly increased in LNMC compared to PBMC ($p = 0.0002$) (Fig. 1b).

T cell functional profiles in response to Mtb antigens were compared between LNMC and PBMC. IFN γ , IL2,

TNF α , IL17, and MIP-1 α production by CD4+ T cells in PBMC and LNMC in response to Mtb RVL were not different (Fig. 2a). Similarly CD4+ T cell responses in response to ESAT6/CFP10 peptides were not different between LNMC and PBMC (Additional file 2).

No significant differences were observed in the polyfunctionality of total memory CD4+ T cells in LNMC



when compared to PBMC for the same stimuli (Fig. 2b all three rows with side to side comparison). Polyfunctionality of total memory CD4⁺ T cells in response to ESAT6/CFP10 peptides and Mtb lysate were significantly different from that in response to SEB in both PBMC and LNMC indicating a difference in Mtb-specific cells as a group (Fig. 2b, top 4 pies vs. bottom 2 comparison), but no differences were found in the polyfunctionality in response to Mtb-specific antigens, ESAT6/CFP10 peptides and Mtb lysate (Fig. 2b top two and middle two comparison).

Distribution of activated T cells and Tregs in LNMC and PBMC

We measured the frequency of activated conventional CD4⁺ T cells and Tregs in LNMC and PBMC. Activation was based on the expression of HLA-DR and CD38. Tregs were identified as CD4⁺, CD25⁺, FoxP3⁺ and CD127^{dim}. An increased proportion of activated CD4⁺ HLA-DR+CD38⁺ T cells ($p < 0.0001$) and Treg CD4⁺ CD25⁺FoxP3⁺CD127^{dim} ($p = 0.0089$) in LNMC compared to PBMC was observed (Fig. 3). A positive correlation between the frequency of total activated CD4⁺ T cells and Tregs was observed within LNMC ($r = 0.676$, $p = 0.008$) and PBMC ($r = 0.549$, $p = 0.018$) (Fig. 4).

We compared, among Tregs in LNMC, the proportion of cells expressing activation markers. More than 90% of CD25⁺ FoxP3⁺CD127^{dim} cells expressed HLA-DR and/or CD38. Furthermore, the predominant Treg subpopulation in both LNMC and PBMC was the one expressing HLA-DR and CD38 simultaneously (Fig. 5).

Treg correlation with Mtb-antigen induced cytokine production

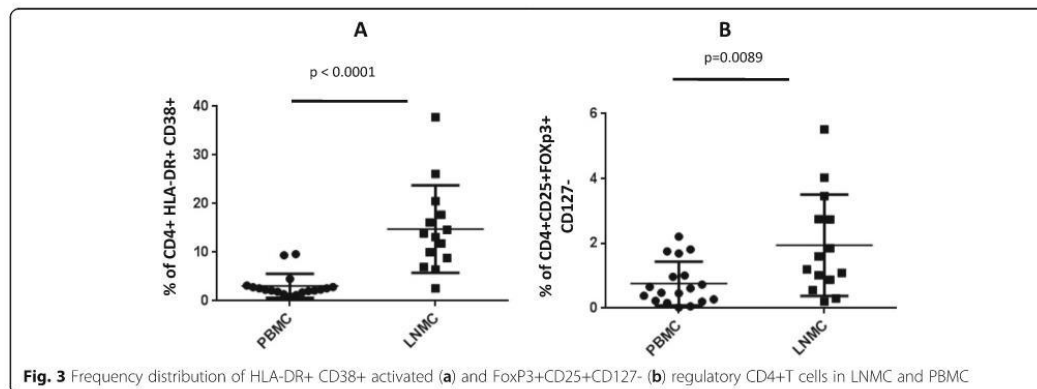
We determined the correlation between the proportion of Tregs and cytokine producing CD4⁺ T cells after overnight Mtb-antigen activation in LNMC and PBMC. There was a positive correlation between the proportion

of Tregs and Th1 cytokine production (IL2 and IFN γ) as well as MIP-1 α following stimulation by Mtb lysate antigen within LNMC but not among PBMC (Table 1). A similar correlation was found after stimulation by Mtb ESAT6/CFP10 peptides while no correlation was found after SEB mitogen stimulation (data not shown).

Discussion

The outcome of the immune response to Mtb results from the simultaneous involvement of activating and regulatory mechanisms [8, 11]. The nature of the relationship between conventional T cells and Tregs during active TB is still not clear although this interaction has been studied in different forms of TB [10, 11]. Increased expression of activation markers on T cells [12, 13] and higher levels of Tregs [7, 8] have been described in peripheral blood of patients with TB. Nevertheless, local immune responses may differ from those in peripheral blood and exploring this interaction in the site of active infection will give important clues about their involvement in protection or pathogenesis [14, 15]. The present study sought to evaluate the relationships between Tregs and conventional CD4⁺ T cells in lymph nodes and peripheral blood during TB lymphadenitis.

We found a higher proportion of CD4⁺ T cells in LNMC compared to PBMC. This is in agreement with previous studies reporting an increase in the proportion of CD4⁺ T cells in the blood of TB patients compared to uninfected controls and a much higher number of CD4⁺ T cells at the site of infection [16, 17]. Except for modest elevation in effector cells in LNMC, no difference was found in the relative frequency of memory CD4⁺ T cell subsets between PBMC and LNMC. Others have shown that Mtb-specific CD4⁺ T cells in bronchoalveolar and pleural fluids are mainly of the memory phenotype [18, 19]. In LNMC we find that up to 40% of CD4⁺ T cells were naïve.



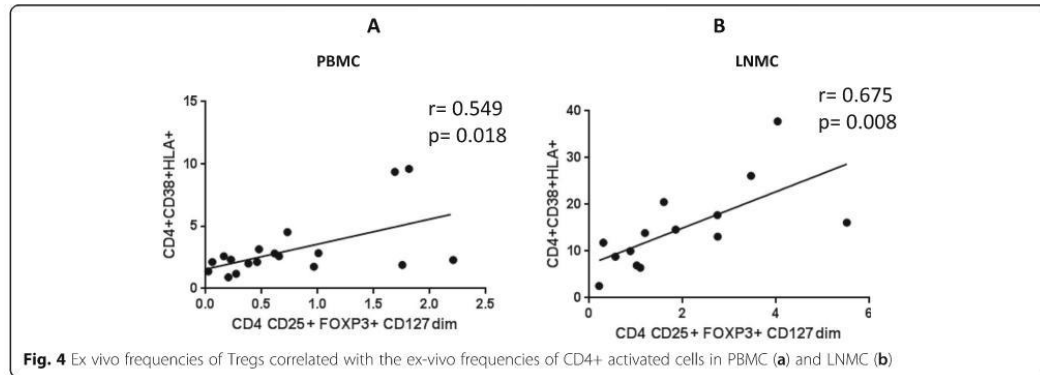


Fig. 4 Ex vivo frequencies of Tregs correlated with the ex-vivo frequencies of CD4+ activated cells in PBMC (a) and LNMC (b)

Th1 and Th17 Mtb-specific T cells contribute to the defense against progressive Mtb infection. Particularly, TB lymphadenitis was characterized by elevated frequencies of Th1 and Th17 cells in peripheral blood [20]. When we measured intracellular production of Th1 cytokines (IFN γ , IL2 and TNF α), IL17 and MIP-1 α , we were surprised to not find an increase in the frequencies of Mtb-specific cytokine producing cells in LNMC vs. PBMC. LNMC were generated from a large block of excised lymph node tissue that included granulomatous and non-granulomatous areas which may have affected our ability to detect higher frequencies of Mtb-specific cells in LNMC than PBMC.

Polyfunctional T cells are correlated with protection in some studies [5, 6, 21] and with disease activity in others [22, 23]. In our case, no differences were observed in the proportion and polyfunctional qualities of the Mtb-responsive CD4+ T cells between LNMC and PBMC. Comparing polyfunctionality in CD4+ T cells responding to Mtb-antigen vs. SEB showed a significant difference with SEB eliciting a more TNF α dominated response. This supports that the Mtb-specific responses

were different from those of the whole memory CD4+ T cell pool.

To analyze the interaction between conventional activated CD4+T cells and Tregs in the lymph node during active TB, we measured the frequency of CD4+T cells expressing CD38 and HLA-DR. These immune activation markers were described as substantially elevated in subjects with active TB [24]. CD4+ T cells were more activated in lymph node compared to blood. The increased proportion of activated T cells in LNMC likely reflects more exposure to Mtb antigens. The selective accumulation is likely the result of both active recruitment and local expansion of T cells at this site of Mtb replication [25, 26].

Tregs were identified by selecting CD4+ cells with high-level expression of CD25, low-level expression of CD127, and expression of FoxP3. Tregs were also increased in LNMC in response to local immune activation possibly to control immune induced damage [3, 26, 27]. In accordance with the previous study [10], our data reveal a positive correlation between Treg and CD4+ activated cells within PBMC but this correlation was stronger in LNMC. Tregs co-expressing HLA-DR and CD38

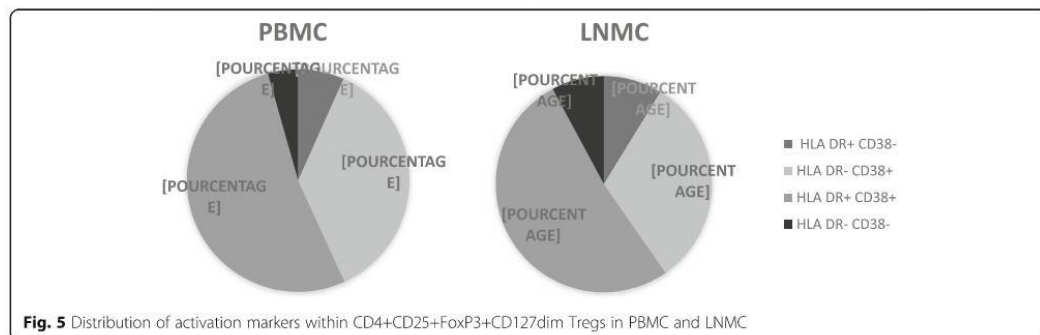


Fig. 5 Distribution of activation markers within CD4+CD25+FoxP3+CD127dim Tregs in PBMC and LNMC

Table 1 Correlation of the ex vivo frequencies of Tregs with the frequencies of CD4+T cells expressing IFN γ , IL2, TNF α , IL17 and MIP1 α following Mtb lysate antigen stimulation in PBMC and LNMC

	T reg			
	PBMC		LNMC	
	r	p	r	p
IFN- γ	-0.19	0.60	0.66	0.04
IL2	-0.04	0.90	0.71	0.02
TNF- α	-0.02	0.96	0.48	0.16
IL17	-0.23	0.52	0.45	0.12
MIP-1 α	-0.04	0.91	0.95	<0.001

markers were frequent in the LNMC and PBMC. The ex-vivo MHC II expressing Tregs are believed to be a functionally mature distinct Treg subset implicated in contact-dependent *in vitro* suppression [28]. A positive correlation between Treg proportion and frequency of memory Mtb-specific CD4+ T cells expressing each individual measured Th1 function was observed in LNMC but not in PBMC. The predominance of activated Tregs in LNMC and the correlation of Tregs with activated CD4+ T cells and CD4+ T cells expressing Th1 cytokines suggests a regulatory activity specific and enhanced in the lymph node. An alternate hypothesis could be that the Treg are just expanding at tissue sites but not necessarily for regulatory purposes. The absence of an expected higher proportion of Th1 producing CD4+T cells in LNMC compared to PBMC supports the hypothesis that the Treg/CD4 correlation reflected a negative feedback for excess Th1 cytokine production by increasing suppressive Tregs. Recent data suggest that IFN γ increases Treg suppressive function for control of Th1 responses [29, 30]. A limitation of the study is that we did not have any blood or lymph node material in healthy BCG-vaccinated or latently infected individuals available to contrast to the TB lymphadenitis subjects. Contrasting these cohorts in future studies as well as further research on the function of Tregs and their modulation of immune responses in TB lymphadenitis are needed. The current study will help develop an optimal approach to such supplementary exploration.

Conclusion

This study has important original findings regarding local immune responses in active LNTB. We found no Th1, Th17 or MIP-1 α production differences by Mtb-specific CD4+ T cells in total LNMC vs. PBMC. Tregs were positively correlated with Th1 expressing Mtb-specific CD4+ T cells in LNMC but not in PBMC. Activated HLA-DR+CD38+Tregs were more abundant, suggesting modulation by Tregs of immune responses in LNMC. We suggest that increased Tregs at the lymph node site of active Mtb

infection regulates the immune response. Whether this is advantageous to the host or not remains to be determined.

Additional files

Additional file 1: CD8+ T-cell subset distribution in PBMC and LNMC. Relative frequencies of CD8+ T cells among all CD3+ T cells. Means from 18 subjects are shown and error bars representing standard deviations. (PPTX 51 kb)

Additional file 2: Cytokine expression of memory CD4+T cells after ESAT6/CFP10 stimulation. Results from 11 subjects are shown. Plots are gated on viable memory CD4+T cells. (PPTX 91 kb)

Abbreviations

LNTB: Lymph node TB; TB: Tuberculosis; Mtb: *Mycobacterium tuberculosis*; Treg: T regulatory cells; LNMC: Lymph node mononuclear cells; PBMC: Peripheral blood mononuclear cells; CD127: IL-7 receptor α -chain; FoxP3: The intracellular marker forkhead box p3; Mtb lysate: *M. tuberculosis* CDC1551 whole cells lysate; SEB: Staphylococcal enterotoxin B; N: Naïve T cells; CM: Central memory cells; EM: Effector memory cells; E: Effector cells

Acknowledgements

The authors would like to thank all patients for their participation. They also would like to thank all the health and laboratory professional that facilitate the realization of this work.

Funding

This study was supported by the Hassan II Academy for Sciences and techniques of Morocco (IMMGEN project), NIH A108972, NIH A1080313, NIH P30 A1036219, NIAID Contract No. HHSN266200700022C / NO1-AI-70022, and VA GRECC.

Availability of data and materials

All the raw data were kept in the experiment book, or as electronic files such as acquired by flow cytometer will be available on request.

Authors' contributions

This study was designed by KS, WHB, RE, DHC and FS. HA, NB and MN were the key investigators that assisted in design of the clinical aspects of the study then recruited, treated, and collected clinical data on the subjects. Data analysis, interpretation and statistical analysis were performed by KS, AS, CB, DHC and FS. KS, DHC and FS wrote the first draft and AS, WHB, RE, FS and DHC contributed to the final manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

The study protocol was approved by the two Ethical Committees for Biomedical Research; Faculty of Medicine and Pharmacy, Mohammed V University of Rabat (Morocco) and University Hospitals of Cleveland Institutional Review Board (US). Informed consent was obtained from each patient according to the National Ethics Committee.

Consent for publication

Not applicable

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Laboratory of Cellular Immunology, National Institute of Hygiene, 27, Avenue Ibn Batouta, PB 769, 11400 Rabat, Morocco. ²Faculty of Sciences, University Mohammed V Agdal, Rabat, Morocco. ³Department of ENT, Maxillo-facial, Reconstructive and Plastic Surgery, University Hospital Hassan II, Fes, Morocco. ⁴National Reference Laboratory of Mycobacteriology, the National Institute of Hygiene, Rabat, Morocco. ⁵Case Western Reserve

University School of Nursing, Cleveland, USA. ⁶TB Research Unit and Division of Infectious Diseases, Case Western Reserve University, University Hospitals of Cleveland and Cleveland VA, Cleveland, OH, USA.

Received: 19 January 2018 Accepted: 11 October 2018
Published online: 08 November 2018

References

1. WHO. Global tuberculosis control: WHO Report 2016.
2. Rodrigues DS, Medeiros EA, Weckx LY, Bonnez W, Salomao R, Kallas EG. Immunophenotypic characterization of peripheral T lymphocytes in Mycobacterium tuberculosis infection and disease. Clin Exp Immunol. 2002; 128:149–54.
3. Hertoghe T, Wajja A, Ntambi L, Okwera A, Aziz MA, Hirsch C, Johnson J, Toossi Z, Mugenwa R, Mugenyi P, Colebunders R, Eller J, Vanham G. T cell activation, apoptosis and cytokine dysregulation in the (co) pathogenesis of HIV and pulmonary tuberculosis (TB). Clin Exp Immunol. 2000;122:350–7.
4. Gideon HP, Phuah J, Myers AJ, Bryson BD, Rodgers MA, Coleman MT, Maiello P, Rutledge T, Marino S, Fortune SM, Kirschner DE, Lin PL, Flynn JL. Variability in tuberculosis granuloma T cell responses exists, but a balance of pro- and anti-inflammatory cytokines is associated with sterilization. PLoS Pathog. 2015;11(1):e1004603. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004603>.
5. Day CL, Abrahams DA, Lerumo L, Janse van Rensburg E, Stone L, O'Rie T, Pienaar B, de Kock M, Kaplan G, Mahomed H, Dheda K, Hanekom WA. Functional capacity of Mycobacterium tuberculosis-specific T cell responses in humans is associated with mycobacterial load. J Immunol. 2011;187: 2222–32. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101122>.
6. Harari A, Rozot V, Enders FB, Perreau M, Stalder JM, Nicod LP, et al. Dominant TNF- α Mycobacterium tuberculosis-specific CD4+ T cell responses discriminate between latent infection and active disease. Nat Med. 2011;17:372–6. <https://doi.org/10.1038/nm.2299>.
7. Guyot-Revot V, Innes JA, Hackforth S, Hinks T, Lalvani A. Regulatory T-cells are expanded in blood and disease sites in patients with tuberculosis. Am J Respir Crit Care Med. 2006;173:803–10.
8. Hougardy JM, Place S, Hildebrand M, Drowart A, Debré AS, Loch C, Mascart F. Regulatory T-cells depress immune responses to protective antigens in active tuberculosis. Am J Respir Crit Care Med. 2007;175:409–16.
9. Rodríguez-Perea AL, Arcia ED, Rueda CM, Velilla PA. Phenotypical characterization of regulatory T cells in humans and rodents. Clin Exp Immunol. 2016;185(3):281–91.
10. Wergeland I, Aßmus J, Dyrhol-Riise AM. T Regulatory Cells and Immune Activation in Mycobacterium tuberculosis Infection and the Effect of Preventive Therapy. Scand J Immunol. 2011;73:234–42.
11. De Almeida AS, Fiske CT, Sterling TR, Kalams SA. Increased Frequency of Regulatory T Cells and T Lymphocyte Activation in Persons with Previously Treated Extrapulmonary Tuberculosis. Clin Vaccine Immunol. 2012;19:45–52.
12. Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. J Immunol. 2001;167:1245–53.
13. Baecher-Allan C, Wolf E, Hafler DA. Functional analysis of highly defined, FACS-isolated populations of human regulatory CD4+ CD25+ T cells. Clin Immunol. 2005;115:10–8.
14. Nemeth J, Rumetshofer R, Winkler HM, Burghuber OC, Müller C, Winkler S. Active tuberculosis is characterized by an antigen specific and strictly localized expansion of effector T cells at the site of infection. Eur J Immunol. 2012;42(11):2844–50.
15. Diedrich CR, O'Hern J, Gutierrez MG, Allie N, Papier P, Meintjes G, Coussens AK, Wainwright H, Wilkinson RJ. Relationship between HIV Coinfection, Interleukin 10 Production, and Mycobacterium tuberculosis in Human Lymph Node Granulomas. J Infect Dis. 2016;214(9):1309–18.
16. Wang T, Lv M, Qian Q, Nie Y, Yu L, Hou Y. Increased frequencies of T helper type 17 cells in tuberculous pleural effusion. Tuberculosis. 2011;91:231–7.
17. Rumetshofer R, Winkler HM, Burghuber OC, Müller C, Winkler S. Active tuberculosis is characterized by an antigen specific and strictly localized expansion of effector T cells at the site of infection. Eur J Immunol. 2012; 42(11):2844–50.
18. El Fenniri L, Toossi Z, Aung H, El Iraki G, Bourkkadi J, Benamor J, Laskri A, Berrada N, Benjouad A, Mayanja-Kizza H, Betts MR, El Aouad R, Canaday DH. Polyfunctional mycobacterium tuberculosis-specific effector memory CD4+ T cells at sites of pleural TB. Tuberculosis. 2011;91:224–30.
19. Chiacchio T, Petruccioli E, Vanini V, Butera O, Cuzzi G, Petrone L, Matteucci G, Lauria FN, Franken KL, Girardi E, Ottenhoff TH, Goletti D. Higher Frequency of T-Cell Response to M. tuberculosis Latency Antigen Rv2628 at the Site of Active Tuberculosis Disease than in Peripheral Blood. PLoS One. 2011;6:e27539. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027539>.
20. Kumar NP, Sridhar R, Banurekha VV, Nair D, Jawahar MS, Nutman TB, Babu S. Expansion of Pathogen-Specific Mono- and Multifunctional Th1 and Th17 Cells in Multi-Focal Tuberculous Lymphadenitis. PLoS One. 2013;8(2):e57123.
21. Marin ND, Paris SC, Rojas M, Garcia LF. Functional profile of CD4+ and CD8+ T cells in latently infected individuals and patients with active TB. Tuberculosis. 2013;93:155–66.
22. Sutherland JS, Adetifa IM, Hill PC, Adegbola RA, Ota MO. Pattern and diversity of cytokine production differentiates between Mycobacterium tuberculosis infection and disease. Eur J Immunol. 2009;39:723–9.
23. Caccamo N, Guggino G, Joosten SA, Gelsomino G, Di Carlo P, Titone L, Galati D, Bocchino M, Matarese A, Salerno A, Sanduzzi A, Franken WP, Ottenhoff TH, Dieli F. Multifunctional CD4(+) T cells correlate with active Mycobacterium tuberculosis infection. Eur J Immunol. 2010;40:2211–20.
24. Adekambi T, Ibegbu CC, Cagle S, Kalokhe AS, Wang YF, Hu Y, Day CL, Ray SM, Rengarajan J. Biomarkers on patient T cells diagnose active tuberculosis and monitor treatment response. J Clin Invest. 2015;125:1827–38.
25. Wilkinson KA, Wilkinson RJ, Pathan A, Ewer K, Prakash M, Klennerman P, Maskell N, Davies R, Pasvol G, Lalvani A. Ex vivo characterization of early secretory antigenic target 6-specific T cells at sites of active disease in pleural tuberculosis. Clin Infect Dis. 2005;40:184–7.
26. Nemeth J, Winkler HM, Zwick RH, Rumetshofer R, Schenk P, Burghuber OC, Graninger W, Ramharther M, Winkler S. Recruitment of Mycobacterium tuberculosis specific CD41 T cells to the site of infection for diagnosis of active tuberculosis. J Intern Med. 2009;265:163–8.
27. Ribeiro-Rodrigues R, Resende Co T, Rojas R, Toossi Z, Dietze R, Boom WH, Maciel E, Hirsch CS. A role for CD4+CD25+ T cells in regulation of the immune response during human tuberculosis. Clin Exp Immunol. 2006;144:25–34.
28. Baecher-Allan C, Wolf E, Hafler DA. MHC Class II Expression Identifies Functionally Distinct Human Regulatory T Cells. J Immunol. 2006;176:4622–463.
29. Hall BM, Tran GT, Verma ND, Plain KM, Robinson CM, Nomura M, Hodgkinson SJ, Do Natural T. Regulatory Cells become Activated to Antigen Specific T Regulatory Cells in Transplantation and in Autoimmunity? Front Immunol. 2013;24–208. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00208>.
30. Hall AO, Belting DP, Tato C, John B, Oldenhove G, Lombana CG, Pritchard GH, Silver JS, Bouladoux N, Stumhofer JS, Harris TH, Grainger J, Wojno ED, Wagage S, Roos DS, Scott P, Turka LA, Cherry S, Reiner SL, Cua D, Belkaid Y, Elloso MM, Hunter CA. The cytokines interleukin 27 and interferon- γ promote distinct Treg cell populations required to limit infection-induced pathology. Immunity. 2012; 37(3):511–23. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.06.014>.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



