
LES MECANISMES CELLULAIRES ET MOLECULAIRES DE L'INFECTION MYCOBACTERIENNE

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement en 2003
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Cécile, Anne, Claudine PERROTEAU
Née, le 5 mai 1971 à ENGHUEN-LES-BAINS (Val d'Oise)

Directeur de thèse : Mme le Docteur Frédérique MESSUD-PETIT

JURY

PRESIDENT :
M. Antoine BLANCHER

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :
Mme Frédérique MESSUD-PETIT
Mlle Séverine BOULLIER

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PÊCHE
ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE

Directeur	:	M.	P. DESNOYERS
Directeurs honoraires.....	:	M.	R. FLORIO
		M.	J. FERNEY
		M.	G. VAN HAVERBEKE
Professeurs honoraires.....	:	M.	A. BRIZARD
		M.	L. FALIU
		M.	C. LABIE
		M.	C. PAVAU
		M.	F. LESCURE
		M.	A. RICO
		M.	A. CAZIEUX
		Mme	V. BURGAT
		M.	D. GRIESS

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **CABANIE Paul**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **CHANTAL Jean**, *Pathologie infectieuse*
- M. **DARRE Roland**, *Productions animales*
- M. **DORCHIES Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **GUELFY Jean-François**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*
- M. **TOUTAIN Pierre-Louis**, *Physiologie et Thérapeutique*

PROFESSEURS 1^{ère} CLASSE

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
- M. **BODIN ROZAT DE MANDRES NEGRE Guy**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **BRAUN Jean-Pierre**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **EECKHOUTTE Michel**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
- M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*
- M. **MILON Alain**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
- M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
- M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

PROFESSEURS 2^e CLASSE

- Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les industries agro-alimentaires*
- M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mme **KOLF-CLAUW Martine**, *Pharmacie -Toxicologie*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
- M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*

PROFESSEUR ASSOCIE

- M. **HENROTEAUX Marc**, *Médecine des carnivores*

INGENIEUR DE RECHERCHES

- M. **TAMZALI Youssef**, *Clinique équine*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

Mme MICHAUD Françoise, *Professeur d'Anglais*
M. SEVERAC Benoît, *Professeur d'Anglais*

MAITRE DE CONFERENCES HORS CLASSE

M. JOUGLAR Jean-Yves, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

MAITRES DE CONFERENCES 1^{ère} CLASSE

M. ASIMUS Erik, *Pathologie chirurgicale*
M. BAILLY Jean-Denis, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
M. BERGONIER Dominique, *Pathologie de la Reproduction*
M. BERTAGNOLI Stéphane, *Pathologie infectieuse*
Mme BOUCRAUT-BARALON Corine, *Pathologie infectieuse*
Mlle BOULLIER Séverine, *Immunologie générale et médicale*
Mme BOURGES-ABELLA Nathalie, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. BOUSQUET-MELOU Alain, *Physiologie et Thérapeutique*
Mme BRET-BENNIS Lydie, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. BRUGERE Hubert, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
M. CONCORDET Didier, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
Mlle DIQUELOU Armelle, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. DUCOS Alain, *Zootecnie*
M. DOSSIN Olivier, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
Mme GAYRARD-TROY Véronique, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
Mme HAGEN-PICARD Nicole, *Pathologie de la Reproduction*
M. JACQUIET Philippe, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. JAEG Jean-Philippe, *Pharmacie et Toxicologie*
M. LYAZRHI Faouzi, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. MATHON Didier, *Pathologie chirurgicale*
Mme MESSUD-PETIT Frédérique, *Pathologie infectieuse*
M. MEYER Gilles, *Pathologie des ruminants*
Mme PRIYMENKO Nathalie, *Alimentation*
Mme RAYMOND-LETRON Isabelle, *Anatomie pathologique*
M. SANS Pierre, *Productions animales*
Mlle TRUMEL Catherine, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*
M. VALARCHER Jean-François, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*
M. VERWAERDE Patrick, *Anesthésie, Réanimation*

MAITRES DE CONFERENCES 2^e CLASSE

Mlle CADIERGUES Marie-Christine, *Dermatologie*
Mme CAMUS-BOUCLAINVILLE Christelle, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mme COLLARD-MEYNAUD Patricia, *Pathologie chirurgicale*
M. FOUCRAS Gilles, *Pathologie du Bétail*
M. GUERIN Jean-Luc, *Productions animales*
M. MAREDA Marc, *Pathologie de la Reproduction*

MAITRES DE CONFERENCES CONTRACTUELS

M. DESMAIZIERES Louis-Marie, *Clinique équine*

MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIE

M. REYNOLDS Brice, *Pathologie chirurgicale*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

Mme MEYNADIER-TROEGELER Annabelle, *Alimentation*
M. MOGICATO Giovanni, *Anatomie, Imagerie médicale*
M. MONNEREAU Laurent, *Anatomie, Embryologie*

LES MECANISMES CELLULAIRES ET MOLECULAIRES DE L'INFECTION MYCOBACTERIENNE

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2003
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Cécile, Anne, Claudine PERROTEAU
Née, le 5 mai 1971 à ENGHIEEN-LES-BAINS (Val d'Oise)

Directeur de thèse : **Mme le Docteur Frédérique MESSUD-PETIT**

JURY

PRESIDENT :
M. Antoine BLANCHER

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :
Mme Frédérique MESSUD-PETIT
Mlle Séverine BOULLIER

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directeur	: M.	P. DESNOYERS
Directeurs honoraires.....	: M.	R. FLORIO
	M.	J. FERNEY
	M.	G. VAN HAVERBEKE
Professeurs honoraires.....	: M.	A. BRIZARD
	M.	L. FALIU
	M.	C. LABIE
	M.	C. PAVAU
	M.	F. LESCURE
	M.	A. RICO
	M.	A. CAZIEUX
	Mme	V. BURGAT
	M.	D. GRIESS

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **CABANIE Paul**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **CHANTAL Jean**, *Pathologie infectieuse*
- M. **DARRE Roland**, *Productions animales*
- M. **DORCHIES Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **GUEIFI Jean-François**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*
- M. **TOUTAIN Pierre-Louis**, *Physiologie et Thérapeutique*

PROFESSEURS 1^{ère} CLASSE

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
- M. **BODIN ROZAT DE MANDRES NEGRE Guy**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **BRAUN Jean-Pierre**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **EECKHOUTTE Michel**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
- M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*
- M. **MILON Alain**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
- M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
- M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

PROFESSEURS 2^e CLASSE

- Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les industries agro-alimentaires*
- M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mme **KOLF-CLAUW Martine**, *Pharmacie -Toxicologie*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
- M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*

PROFESSEUR ASSOCIE

- M. **HENROTEAUX Marc**, *Médecine des carnivores*

INGENIEUR DE RECHERCHES

- M. **TAMZALI Youssef**, *Clinique équine*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

- Mme MICHAUD Françoise, *Professeur d'Anglais*
M. SEVERAC Benoît, *Professeur d'Anglais*

MAITRE DE CONFERENCES HORS CLASSE

- M. JOUGLAR Jean-Yves, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

MAITRES DE CONFERENCES 1^{ère} CLASSE

- M. ASIMUS Erik, *Pathologie chirurgicale*
M. BAILLY Jean-Denis, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
M. BERGONIER Dominique, *Pathologie de la Reproduction*
M. BERTAGNOLI Stéphane, *Pathologie infectieuse*
Mme BOUCRAUT-BARALON Corine, *Pathologie infectieuse*
Mlle BOULLIER Séverine, *Immunologie générale et médicale*
Mme BOURGES-ABELLA Nathalie, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. BOUSQUET-MELOU Alain, *Physiologie et Thérapeutique*
Mme BRET-BENNIS Lydie, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. BRUGERE Hubert, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
M. CONCORDET Didier, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
Mlle DIQUELOU Armelle, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. DUCOS Alain, *Zootchnie*
M. DOSSIN Olivier, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
Mme GAYRARD-TROY Véronique, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
Mme HAGEN-PICARD Nicole, *Pathologie de la Reproduction*
M. JACQUIET Philippe, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. JAEG Jean-Philippe, *Pharmacie et Toxicologie*
M. LYAZRHI Faouzi, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. MATHON Didier, *Pathologie chirurgicale*
Mme MESSUD-PETIT Frédérique, *Pathologie infectieuse*
M. MEYER Gilles, *Pathologie des ruminants*
Mme PRIYMENKO Nathalie, *Alimentation*
Mme RAYMOND-LETRON Isabelle, *Anatomie pathologique*
M. SANS Pierre, *Productions animales*
Mlle TRUMEL Catherine, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*
M. VALARCHER Jean-François, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*
M. VERWAERDE Patrick, *Anesthésie, Réanimation*

MAITRES DE CONFERENCES 2^e CLASSE

- Mlle CADIERGUES Marie-Christine, *Dermatologie*
Mme CAMUS-BOUCLAINVILLE Christelle, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mme COLLARD-MEYNAUD Patricia, *Pathologie chirurgicale*
M. FOUCRAS Gilles, *Pathologie du Bétail*
M. GUERIN Jean-Luc, *Productions animales*
M. MARENDA Marc, *Pathologie de la Reproduction*

MAITRES DE CONFERENCES CONTRACTUELS

- M. DESMAIZIERES Louis-Marie, *Clinique équine*

MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIE

- M. REYNOLDS Brice, *Pathologie chirurgicale*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- Mme MEYNADIER-TROEGELER Annabelle, *Alimentation*
M. MOGICATO Giovanni, *Anatomie, Imagerie médicale*
M. MONNEREAU Laurent, *Anatomie, Embryologie*

**LES MECANISMES CELLULAIRES ET
MOLECULAIRES DE L'INFECTION
MYCOBACTERIENNE.**

A notre président de thèse,

Monsieur le Professeur Antoine BLANCHER

Professeur des Universités

Praticien hospitalier

Immunologie option Biologie

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse,

Hommage respectueux.

A notre jury de thèse,

Madame le Docteur Frédérique MESSUD-PETIT

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie infectieuse

Notre directeur de thèse,

Ainsi que

Mademoiselle le Docteur Séverine BOULLIER

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Immunologie générale et médicale

Qui a accepté de participer à ce jury,

Qu'ils reçoivent l'expression de notre estime et notre gratitude.

REMERCIEMENTS

A Madame Frédérique MESSUD-PETIT dont l'indulgente patience et les encouragements ont permis l'achèvement de ce travail. Votre personnalité et votre humour auront métamorphosé à mes yeux de sombres histoires de charbon, virions et hypothétiques prions.

A mes parents, ma famille, Lisa et Adrian, pour leur soutien et leur patience infinie.

A mes amis inoxydables : Furfur, Agnès, La Bearded, l'Inspecteur Dauphin, merci de votre chaleureuse présence. A JoeMan, référence permanente de cette thèse. A El Barbos.

A Jacqueline et Marc DELAVENNE, ainsi qu'à toute l'équipe fuméloise, pour la confiance que vous m'avez accordée à mes débuts dans ce métier. A Mumu et son aura, aux records de Bip-Bip Streiff.

A Julien, le Dormeur du Van, à Ced et Steph, votre amitié me touche profondément.

A Gravos.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES ILLUSTRATIONS	3
TABLE DES ABREVIATIONS	5
INTRODUCTION	7
 PREMIERE PARTIE : PRESENTATION DES PRINCIPALES CARACTERISTIQUES MYCOBACTERIENNES	9
I. CARACTERISTIQUES BIOLOGIQUES ET STRUCTURALES DES MYCOBACTERIES	10
1. Habitats et pouvoirs pathogènes	10
2. Structure et propriétés de la paroi mycobactérienne	12
II. CARACTERISTIQUES IMMUNOLOGIQUES DES MYCOBACTERIES	15
1. Pouvoirs antigènes et immunogènes	15
1.1. Les antigènes non peptidiques	15
1.2. Les antigènes peptidiques	22
2. Pouvoir allergène des mycobactéries	24
2.1. Le phénomène de Koch	24
2.2. L'hypersensibilité retardée	25
 DEUXIEME PARTIE : MECANISMES CELLULAIRES DES ETAPES DE LA PRIMO-INFECTION MYCOBACTERIENNE	31
I. ENTREE DES MYCOBACTERIES DANS LES CELLULES DE L'HOTE	32
1. Contamination par voie respiratoire	32
1.1. Entrée dans les cellules phagocytaires pulmonaires	33
1.2. Entrée dans les cellules non phagocytaires de l'espace alvéolaire	43
2. Contamination par voie digestive	45
2.1. Résistance des mycobactéries au pH du milieu extérieur	45
2.2. Entrée de <i>M avium</i> dans les cellules digestives de souris	46
II. LES EVENEMENTS CELLULAIRES NON SPECIFIQUES IMPLIQUANT LES PHAGOCYTES RESIDENTS INFECTES	48
1. Blocage de la maturation du phagosome mycobactérien en phagolysosome	48
1.1. Blocage sélectif du flux membranaire endosomal	50
1.2. Blocage du signal calcique lié à la phagocytose	55
1.3. Perméabilité et porosité du phagosome mycobactérien	59
2. Synthèse et libération de cytokines cellulaires par les phagocytes résidents	61
2.1. A l'origine de la synthèse des cytokines les récepteurs Toll-like	62
2.2. Libération de cytokines activatrices par les phagocytes	64
2.3. Modération de la réponse cytokinique de type 1 par les souches mycobactériennes virulentes	66
2.4. Libération de chimiokines et recrutement cellulaire	67

3. Apoptose non spécifique des phagocytes infectés	70
3.1. Apoptose spontanée infectieuse	70
3.2. Apoptose déclenchée par les lymphocytes NK	72
3.3. Apoptose déclenchée par l'ATP extracellulaire via les purinocepteurs	73
3.4. Blocage de l'apoptose des phagocytes par les mycobactéries virulentes	74
4. Mécanismes mycobactéricides au sein des phagocytes infectés	78
4.1. Bactéricide déclenchée par l'ATP extracellulaire via les purinocepteurs	78
4.2. Synthèse par le phagocyte de radicaux libres toxiques	80
4.3. Résistance des mycobactéries aux processus bactéricides	84
III. LES EVENEMENTS DE LA PHASE IMMUNITAIRE SPECIFIQUES	86
1. Quels lymphocytes T pour quels antigènes mycobactériens ?	86
1.1. Antigènes peptidiques et lymphocytes TCR $\alpha\beta$ CD4+	86
1.2. Antigènes peptidiques et lymphocytes TCR $\alpha\beta$ CD8+	91
1.3. Antigènes non peptidiques et les lymphocytes TCR $\alpha\beta$	93
1.4. Antigènes non peptidiques et les lymphocytes TCR $\gamma\delta$	96
2. Perturbation de la réponse immunitaire spécifique par la mycobactérie	98
2.1. Modération de la présentation antigénique par les CPA infectées	98
2.2. Sécrétion de cytokines inhibitrices	99
2.3. Stimulation de l'apoptose des lymphocytes T	99
2.4. Diminution de l'apoptose spécifique des macrophages	100
3. La formation du granulome mycobactérien	100
4. Le devenir du complexe primaire	102
TROISIEME PARTIE : MECANISMES DE LA REACTIVATION ET DE LA PHASE CLINIQUE DE L'INFECTION	105
I. LE REVEIL DE L'INFECTION MYCOBACTERIENNE	106
1. Effets de la co-infection mycobactéries/VHI-1	107
1.1. Co-infection au sein des cellules phagocytaires mononucléées	110
1.2. Effets du VIH sur les fonctions lymphocytaires	113
1.3. Apports des modèles expérimentaux de réactivation par déplétion lymphocytaire	113
2. Effets des substances immunomodératrices	114
3. Effets du vieillissement : exemple de la réactivation chez la souris âgée	115
II. MECANISMES CELLULAIRES DE LA PHASE CLINIQUE	116
1. Compartimentation apparente de la réponse immunitaire chez l'homme	116
1.1. Activation et apoptose des cellules de type 1 sur le site infectieux	116
1.2. Du phénomène de suppression systémique à l'anergie	117
2. Modifications endocrinologiques locales	119
3. Immunopathogénie des lésions tissulaires	120
CONCLUSION	122
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	123

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1: <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37 Rv	10
Figure 2: Deux modèles d'organisation de l'enveloppe lipidique externe.....	13
Figure 3: Représentation linéaire et moléculaire des différentes couches de la paroi mycobactérienne.....	14
Figure 4: Schéma du ManLAM.	16
Figure 5: Modèle structural d'un isoforme CD1. Association à la β 2microglobuline.	18
Figure 6: Antigènes glycolipidiques mycobactériens présentés par l'isoforme CD1b.....	19
Figure 7: Localisation présumée des isoformes CD1 au sein d'une cellule présentatrice d'antigènes	20
Figure 8: Interaction entre un antigène glycolipidique présenté par le CD1b ou d et le TCR du lymphocyte T	21
Figure 9: Mécanismes d'induction et d'expression de l'HSR.	28
Figure 10: Caractéristiques et évolution de la réaction tuberculique sur 8 jours.	29
Figure 11: Représentation schématique du récepteur CR3	34
Figure 12: Modèle de la fermeture-éclair.	35
Figure 13: Représentation schématique du récepteur Mannose.....	37
Figure 15: Pénétration de <i>M. avium</i> dans les entérocytes murins.....	47
Figure 16: Comparaison de la fusion phagolysosomale chez des CPA infectées par <i>M. avium</i> , <i>M. smegmatis</i> ou par <i>Escherichia coli</i>	49
Figure 17: Acquisition comparée des protéines Rab entre le phagosome mycobactérien et le phagosome classique contenant des billes de latex.....	51
Figure 18: Rétention de la protéine TACO par les mycobactéries vivantes autour du phagosome naissant.....	55
Figure 19: Devenir des mycobactéries en fonction du recrutement membranaire des protéines calcium-dépendantes	57
Figure 20: Participation des cytokines dans la réaction inflammatoire	61
Figure 21: Mécanismes d'inhibition de la production de cytokines inflammatoires.....	62
Figure 22: Sécrétion de TNF par les macrophages murins stimulés par diverses fractions mycobactériennes	63
Figure 23: Rôles physiologiques de l'IL-12 et de l'IL-18.	65
Figure 24: Apoptose des cellules dendritiques et macrophagiques infectées par <i>M. avium</i> ...	71
Figure 26: Fonctions activatrices et cytotoxiques des lymphocytes NK	72
Figure 28: Blocage de l'apoptose phagocytaire par le ManLAM de <i>M. tuberculosis</i> activant la PI-3-kinase.....	77
Figure 31: Activités bactéricides potentielles des macrophages au cours de la réponse innée.	81
Figure 32: Métabolisme des radicaux oxygénés toxiques au sein du phagocyte.....	83
Figure 33: Présentation des antigènes peptidiques exogènes par les molécules HLA de classe II.	87
Figure 34: Interactions moléculaires de la CPA et du lymphocyte T CD4+.	88
Figure 35: Identification et localisation de protéines mycobactériennes libérées depuis le phagosome.....	89
Figure 36: Différenciation des lymphocytes T CD4+ en sous-populations sécrétrices distinctes	90
Figure 37: Voie de présentation de l'antigène peptidique par les molécules de classe I du CMH.....	92
Figure 38: Effet létal direct de la granulysine sur <i>M. tuberculosis</i>	94

Figure 39: Mécanismes de protection face à <i>M. tuberculosis</i> identifiés chez les lymphocytes T CD8+ humains.....	95
Figure 40: Exemple de transit et de capture d'antigènes mycobactériens lipidiques libres.....	96
Figure 41: Reconnaissances antigéniques et fonctions des lymphocytes TCR $\gamma\delta$	98
Figure 43: Comparaison des concentrations locales en cytokines et des populations lymphocytaires sécrétantes pendant l'état de latence et la tuberculose active.....	104
Figure 44: Structure du VIH-1.....	110
Figure 45: Cycle de réplication du VIH-1.....	111
Figure 46: Co-activation de la colonisation des macrophages par le VIH-1 et les mycobactéries.....	112
Figure 47: Anergie lymphocytaire T par absence de signal de co-stimulation.....	118
Tableau 1: Composition des complexes <i>M. tuberculosis</i> et <i>M. avium</i>	11
Tableau 2: Spécificité relative des isoformes CD1 vis-à-vis de la structure antigénique des lipides mycobactériens.....	18
Tableau 3: Comparaison des marqueurs membranaires à la surface des phagosomes mycobactériens et classiques.....	52
Tableau 4: Comparaison des pouvoirs inducteurs de cytokines du ManLAM et de l'AraLAM.....	67
Tableau 5: Chimioquinas impliquées dans le recrutement cellulaire lors d'infection générant une HSR chez l'homme.....	68
Tableau 6: Principales caractéristiques épidémio-cliniques des infections à <i>M. tuberculosis</i> et <i>M. avium</i> associées ou non à une co-infection par le VIH-1.....	108

TABLE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
AraLAM	LAM à extrémités arabinose
ARNm	Acide ribonucléique messager
ATPe	Adénosine triphosphate extracellulaire
CaM	Calmoduline
CaMKII	Kinase II dépendante de la Calmoduline
CaMKII-P	Kinase II dépendante de la Calmoduline phosphorylée
CCR	Récepteur des chimiokines β
CD1	Cluster of Differentiation 1
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigènes
CR	Récepteur du Complément
CREBc	cAMP Responsive Element Binding Protein
CXCR	Récepteur des chimiokines de type α
DHEA	Déhydroépiandrostérone
EEA 1	Early endosome Antigen 1
ESAT	Early Secreted Antigen Tuberculosis
FasL	Ligand de Fas
Fc γ R	Récepteur des fractions constantes des immunoglobulines G
gp120	Glycoprotéine de 120 kDa du VIH
GTPase	Guanosine triphosphatase
HAART	Highly Active AntiRetroviral Therapy=Thérapie antiretrovirus Intensive
HSD 1	11 Hydroxy Steroid Deshydrogénase de type 1
HSP	Heat Shock Protein = protéine de choc thermique
HSR	Hypersensibilité retardée
IDR	Intradermo-réaction
IFN γ	Interféron Gamma
IFN γ R	Récepteur de l'Interféron Gamma
IL-X	Interleukine X
iNOS2	Synthétase de NO de type 2 inductible
JAK	c-Jun Activated Kinase
LAM	Lipoarabinomannane
LT	Lymphocyte T
M.	Mycobacterium
ManLAM	LAM à extrémités mannose
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MCP	Monocyte Chemoattractant Protein
MIF	Macrophage Migration Inhibitory Factor
MIP	Macrophage Inflammatory Protein
NF- κ B	Nuclear Factor kappa B
NK	Natural Killer
NSF	N-ethylmaleinide Sensitive Factor
PAI-2	Plasminogène de type 2
PGE2	Prostaglandine de type E2

PI-3-kinase	Phosphatidylinositol -3- kinase
PILAM	LAM à extrémités phosphatidylinositol
PIM	Phosphatidylinositol mannosylé
PLA2c	Phospholipase A2 cytosolique
PNN	Polynucléaires neutrophiles
RANTES	Regulated on activation Normal T cell Expressed and Secreted
RM	Récepteur Mannose
RNI	Réactifs nitrés
SHP-1	Src Homology-2 containing protein tyrosin Phosphatase 1
SIDA	Syndrôme d'Immunodéficience Acquise
SNAP	Soluble NSF Attachment Protein
SNARE	SNAP Receptor target ou vesicular
SOD	Superoxyde dismutase
SP-A	Protéine A du surfactant pulmonaire
SP-D	Protéine D du surfactant pulmonaire
STAT-1	Signal of Transduction and Transcription 1
T4	Lymphocyte T CD4+
TACO	Tryptophane Aspartate containing Coat
TGFβ	Transforming Growth Factor Beta
Th1	Réponse lymphocytaire helper de type 1
Th2	Réponse lymphocytaire helper de type 2
TLR	Récepteur Toll-like
TNFR	Récepteur du TNF
TNFR II	Récepteur de type II du TNF= récepteur leurre
TNFα	Tumor Necrosis Factor alpha
TRAIL	TNF Related Apoptosis Inducing Ligand
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine

INTRODUCTION :

L'agent de la tuberculose chez l'homme, *Mycobacterium tuberculosis*, provoque la mort de plus de 3 millions d'êtres humains chaque année, faisant de cette maladie la première cause de mortalité à agent infectieux unique. On estime qu'un tiers de la population mondiale est actuellement infectée par le bacille de Koch [232, 39].

Pourtant, vers la fin des années 1970, l'organisation mondiale de la santé prévoyait l'éradication de la tuberculose de la surface de la Terre pour le début du troisième millénaire. L'amélioration progressive des conditions de vie depuis le début du vingtième siècle, la découverte des antibiotiques anti-tuberculeux après la deuxième guerre mondiale, associées à la lutte drastique dans les pays industrialisés de la tuberculose du bétail, une zoonose majeure qui demeurait une source de contamination alimentaire importante, avaient permis un net recul de cette maladie très ancienne, décrite dès l'antiquité égyptienne [45].

Mais au début des années 1980, on assiste aux Etats-Unis à une recrudescence massive et inattendue de la tuberculose, liée à l'émergence de l'épidémie de SIDA, dont le virus se révèle être un redoutable catalyseur de l'infection mycobactérienne. De plus, la tuberculose est la seule maladie opportuniste du SIDA transmissible au reste de la communauté, même aux individus immunocompétents [219]. D'autres facteurs, comme la paupérisation, la prostitution, l'utilisation de drogues par voie veineuse, qui touchent souvent les mêmes catégories sociales très défavorisées, viennent alors aggraver une mauvaise gestion sanitaire et sociale et des thérapeutiques souvent inappropriées ; ces dernières vont en plus favoriser l'apparition de souches multirésistantes aux antibiotiques [12, 20, 222]. Quelques années plus tard, l'Europe est confrontée aux mêmes problèmes, mais à un moindre degré [207, 169, 28].

La situation est devenue rapidement dramatique en Afrique sub-saharienne, en Chine, en Asie du Sud-Est, zones où la co-infection avec le VIH est très fréquente ; la tuberculose a également gagné les anciens pays du bloc de l'Est. Son profil épidémiologique s'est transformé en vingt ans : la maladie des âges extrêmes est devenue celle des jeunes adultes, souvent séropositifs pour le VIH [39]. Les personnes atteintes au stade SIDA développent en plus des mycobactérioses atypiques opportunistes, dont *M. avium* est l'un des principaux responsables, souvent multirésistants aux antibiotiques [207, 129].

Outre cette fragilisation de l'éventail thérapeutique, les moyens de prévention restent assez limités : le BCG, seul vaccin disponible, d'une efficacité très variable, est incapable de prévenir le réveil de l'infection et il reste souvent décevant chez l'adulte [45]. Le développement d'un vaccin et de nouvelles cibles thérapeutiques est donc devenu une urgence.

Mais si les caractéristiques anatomo-cliniques de la tuberculose sont parfaitement connues depuis plus de cinquante ans, l'efficacité des traitements mis au point après 1945 n'avait pas incité la recherche à se pencher sur les mécanismes cellulaires pathogéniques et immunitaires de l'infection mycobactérienne, avant les années 1980. Or, la connaissance des ces mécanismes devenait un préalable obligatoire à l'élaboration de toute stratégie nouvelle contre ces bactéries.

Depuis maintenant plus d'une quinzaine d'années, ces mécanismes font l'objet de recherches intensives et la maîtrise d'outils de la biologie moléculaire et de la génétique a permis une avancée rapide, malgré leur grande complexité.

Nous proposons de faire le point sur les principaux mécanismes mis en lumière sans prétendre à l'exhaustivité. Nous rappellerons, tout d'abord, les principales caractéristiques des mycobactéries en insistant plus particulièrement sur leurs propriétés immunogènes, antigéniques et allergéniques.

Nous envisagerons ensuite les événements cellulaires de la primo-infection, parmi lesquels nous développerons les moyens mis en œuvre par les bacilles pour résister au système de défense, à chaque étape de la réponse immunitaire. Nous tenterons de suivre le déroulement chronologique supposé de l'infection mycobactérienne.

Nous aborderons enfin les mécanismes connus de la phase clinique et le rôle joué par le VIH dans l'aggravation des infections mycobactériennes.

Les similitudes et divergences concernant *M. avium* seront évoquées au fur et à mesure, mais nous nous appuierons essentiellement sur les études portant sur *M. tuberculosis*, conduites chez l'homme et la souris.

PREMIERE PARTIE :

**PRESENTATION DES PRINCIPALES CARACTERISTIQUES
MYCOBACTERIENNES**

I. CARACTERISTIQUES BIOLOGIQUES ET STRUCTURALES DES MYCOBACTERIES :

1. Habitats et pouvoirs pathogènes :

Les bactéries du genre *Mycobacterium* sont de petits bacilles, droits ou légèrement incurvés, de 1 à 10 microns de long et 0.2 à 0.6 microns de diamètre (Figure 1). Ces bactéries ne sont pas mobiles, ne forment pas de spores et, à l'exception de *Mycobacterium ulcerans*, ne sécrètent pas de toxines [31, 32, 66, 98].

En laboratoire, elles prennent mal la coloration de Gram, d'où leur appellation de bacilles « faux Gram + » ou « Gram neutre », mais résistent à la décoloration acide et alcoolique et sont dites bactéries acido-alcool-résistantes (AAR) [66].

Leur matériel génétique est constitué d'un unique chromosome circulaire à ADN simple brin, associé à des plasmides en nombre variable ; les bactéries du genre *Mycobacterium* sont caractérisées par un pourcentage de bases guanines et cytosines au sein de leur ADN supérieur à 60% [42, 85].

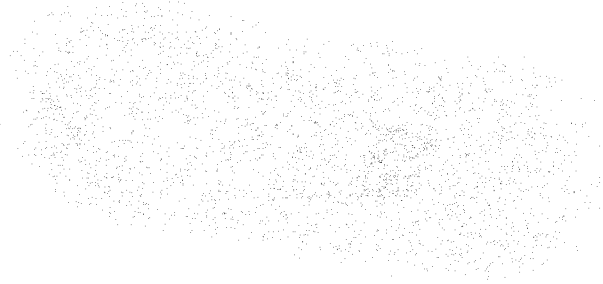


Figure 1: *Mycobacterium tuberculosis H37 Rv*

The Sanger Centre [206].

Les mycobactéries sont aérobies ou microaérophiles et peuvent vivre à demeure, pour la grande majorité d'entre elles, dans les sols, à la surface des eaux froides ou chaudes, douces ou salées [85]. Certaines sont parfois présentes sur la peau et les muqueuses de l'homme et de divers animaux, sans aucune conséquence néfaste pour leurs hôtes; ces bactéries avirulentes sont dites « saprophytes », (exemple de *M. phlei* et *M. terrae*) [104].

Les mycobactéries « opportunistes » sont également très résistantes dans le milieu extérieur mais elles peuvent se révéler pathogènes chez l'animal et peuvent dans certaines conditions, causer chez l'homme des infections chroniques variées, parfois mortelles [207]. Elles adoptent alors un mode de vie essentiellement intracellulaire (à l'exception de *M. ulcerans* [98]), tout en gardant la capacité de se multiplier activement à l'extérieur des cellules dans les stades avancés de la maladie et de coloniser de nombreux organes [31].

Mycobacterium avium subspecies avium est l'agent de la tuberculose des oiseaux et l'un des chefs de file des mycobactéries opportunistes chez l'homme; elle appartient à un complexe qui porte son nom, complexe au sein duquel lui sont associées des bactéries, phénotypiquement et génétiquement très proches, se divisant lentement (tableau 1). Ce

complexe est aussi appelé « *Complexe M. avium-intracellulare* », les deux espèces étant souvent confondues autrefois et difficilement différenciables [31].

Enfin, la troisième catégorie biologique de mycobactéries comprend les bacilles dits « pathogènes obligatoires », c'est-à-dire que l'infection bactérienne pourra se développer même en l'absence, chez l'hôte, de conditions favorables, comme une immunodéficience ou des néoplasies préexistantes. Les pathologies déclenchées par ces mycobactéries sont contagieuses et mortelles, à plus ou moins long terme, en l'absence de traitement ; elles se manifestent chez l'homme, de nombreux mammifères sauvages et domestiques et chez certains oiseaux [17]. Ces mycobactéries pathogènes présentent, elles aussi, une vitesse de croissance très lente en laboratoire, lorsqu'elles peuvent y être cultivées : *in vitro*, le temps de génération de *Mycobacterium tuberculosis* est de 18 à 24 heures ; la durée de division est de 14 jours pour *M. leprae*, qui est incultivable en laboratoire [98].

M. tuberculosis est l'agent responsable de la tuberculose humaine; le bacille a été découvert par Koch en 1882 et donne lui aussi son nom à un complexe taxonomique, qui regroupe les mycobactéries dites « tuberculeuses » pour l'homme et certains mammifères (tableau 1). L'identité des ADN respectifs des bactéries de ce complexe est de plus de 99%, au point que le terme de « genomospécies » est parfois employé pour souligner l'étroite communauté génétique de ces cinq mycobactéries [66, 98].

Ordre des Actinomycétales, s-o des Corynebacterinae Famille des MYCOBACTERIACEAE, genre MYCOBACTERIUM	
MEMBRES du complexe « <i>M. tuberculosis</i> » : Mycobactéries PATHOGENES OBLIGATOIRES dites Mycobactéries « TUBERCULEUSES »	MEMBRES du complexe « <i>M. avium</i> » : Mycobactéries dites « OPPORTUNISTES » ou « ATYPIQUES » [144]
<ul style="list-style-type: none"> • <i>M. tuberculosis</i> : (Koch 1882) tuberculose humaine - <i>M. tuberculosis</i> CDC 1551 - <i>M. tuberculosis</i> H37Rv : isolat devenu souche de laboratoire de référence virulente 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>M. avium</i> <i>subspecies avium</i> : tuberculose aviaire (Rivolta 1887) [17] • <i>M. avium</i> <i>subspecies paratuberculosis</i> : paratuberculose des bovins. • <i>M. avium</i> <i>subspecies silvaticum</i>
<ul style="list-style-type: none"> • <i>M. bovis</i> <i>subspecies bovis</i> : tuberculose des bovins (Smith 1896) • <i>M. bovis</i> <i>subspecies caprae</i> : tuberculose des petits ruminants [67] • <i>M. bovis</i> BCG : bacille de Calmette et Guérin espèce vaccinale atténuée, utilisée chez l'homme et obtenue à partir de <i>M. bovis</i>, après plus de 200 passages sur pomme de terre biliée [45]. 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>M. avium</i> <i>complex</i>
<ul style="list-style-type: none"> • <i>M. microti</i> : tuberculose du campagnol [17] 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>M. intracellulare</i>
<ul style="list-style-type: none"> • <i>M. africanum</i> : forme africaine de la tuberculose humaine [17] 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>M. scrofulaceum</i>
	<ul style="list-style-type: none"> • <i>M. avium</i> <i>complex</i> sp 5154 o' Connor • <i>M. avium</i> <i>complex</i> sp TMC 1476

Tableau 1: Composition des complexes *M. tuberculosis* et *M. avium* d'après [144] et [67].

La mise en évidence de matériel génétique issu de deux phages, et intégré dans le génome de *M. tuberculosis H37Rv*, suggère que le bacille tuberculeux serait au départ une bactérie environnementale, qui aurait adopté par la suite une niche intracellulaire spécialisée, lors de son évolution vers la pathogénicité [42]. Ce bacille est capable de survivre dans le milieu extérieur mais pendant des durées plus courtes que *M. avium* qui, lui, peut résister des années dans le sol et les déjections animales.

Les deux espèces sont en revanche rapidement détruites par les ultra-violets, la chaleur et la lumière directe. Mais elles sont particulièrement résistantes au froid, à la dessiccation et aux acides et bases en solution [17].

Cette résistance physico-chimique réside en grande partie dans l'exceptionnelle richesse en lipides de leur paroi, qui est très épaisse (300 angströms) et d'une grande complexité. L'organisation spatiale exacte de cette paroi, pourtant très étudiée, ne fait pas encore l'unanimité [38].

2. Structure et propriétés de la paroi mycobactérienne :

A la membrane plasmique du bacille se lie un réseau de peptidoglycane original par sa composition en acide N-glycolylmuramique ; sur ce réseau se greffe une treille ramifiée d'arabinogalactane, à l'extrémité de laquelle se fixent des acides mycoliques à très longues chaînes, qui représentent jusqu'à 40% du poids sec de la bactérie [59].

Ces acides gras de 60 à 90 carbones, qui sont caractéristiques du genre sont associés en leur partie terminale à une strate de lipides complexes (sulfo-, phospho- et glycolipides), l'ensemble des deux strates formant une sorte de deuxième bicouche lipidique externe, hautement hydrophobe (figure 2).

Selon ce modèle, le feuillet le plus interne de la bicouche est constitué par les mycolates, qui s'estérifient sur l'arabinogalactane et le deuxième feuillet par les lipides complexes [166].

Cette barrière lipidique supplémentaire empêche l'accès direct au bacille de petites molécules hydrophiles : acides, bases, radicaux libres, potentiellement toxiques, issus du milieu extérieur, ou libérés par les cellules de l'hôte [9, 66]. Certains sulfo- et glycolipides de cette deuxième bicouche ont même la capacité de piéger et de neutraliser directement les radicaux nitrés et oxygénés produits par le système immunitaire. Les propriétés hydrophobes de cette enveloppe externe expliquent aussi, en partie, l'inefficacité d'un grand nombre d'antibiotiques classiques, comme la grande famille des bêtalactamines, dans les traitements anti-tuberculeux chez l'homme.

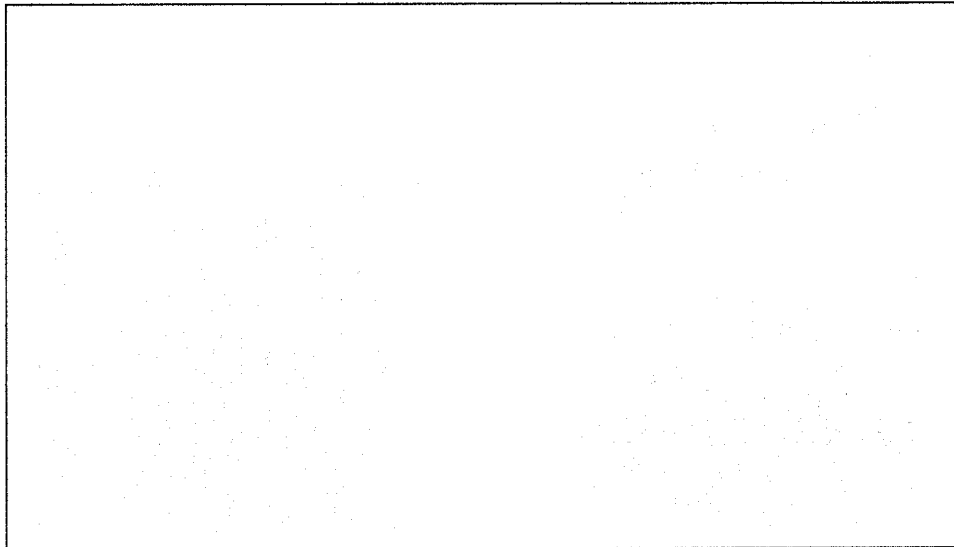


Figure 2: Deux modèles d'organisation de l'enveloppe lipidique externe.

a : modèle de Rastogi les chaînes alkyl des mycolates s'intercalent avec celles des lipides complexes. b : modèle de Minnikin sans chevauchement des chaînes carbonées [59].

A cette enveloppe lipidique externe s'ajoute une dernière couche, la plus externe, encore sujette à controverses et qualifiée de « pseudo-capsule ». Cette capsule serait plus abondante chez les mycobactéries à croissance lente [59]. On s'accorde sur la nature essentiellement polysaccharidique de la matrice capsulaire mais ses caractéristiques spatiales ou biochimiques détaillées restent discutées, d'autant plus que son épaisseur et sa composition semblent varier selon la phase et le milieu de croissance de la bactérie [66].

Pour certains, la pseudo-capsule mycobactérienne est une couche plus ou moins importante de mycosides, c'est-à-dire de glycolipides spécifiques aux mycobactéries, qui contiennent des résidus oligosaccharidiques liés à des lipides rares. Ces mycosides s'accumuleraient de façon compacte dans l'environnement bactérien immédiat, suite à leur sécrétion par le bacille en phase de croissance *in vivo* [13]. Cette couche de mycosides serait plus ou moins organisée, et elle se situerait au-delà de la strate des mycolates, à laquelle elle se lierait de façon non covalente.

D'autres auteurs estiment plutôt que la matrice glucidique de cette capsule accueille des composants protidiques et lipides qui s'intercalent entre les mycolates et que les polysaccharides de surface sont en fait les terminaisons glucidiques d'hétéromacromolécules traversant l'épaisseur des trois couches de la paroi bactérienne ; ces macromolécules s'associent à d'autres extrémités à des lipides complexes, comme le lipoarabinomannane (LAM) (voir figure 3) [38, 59, 166].

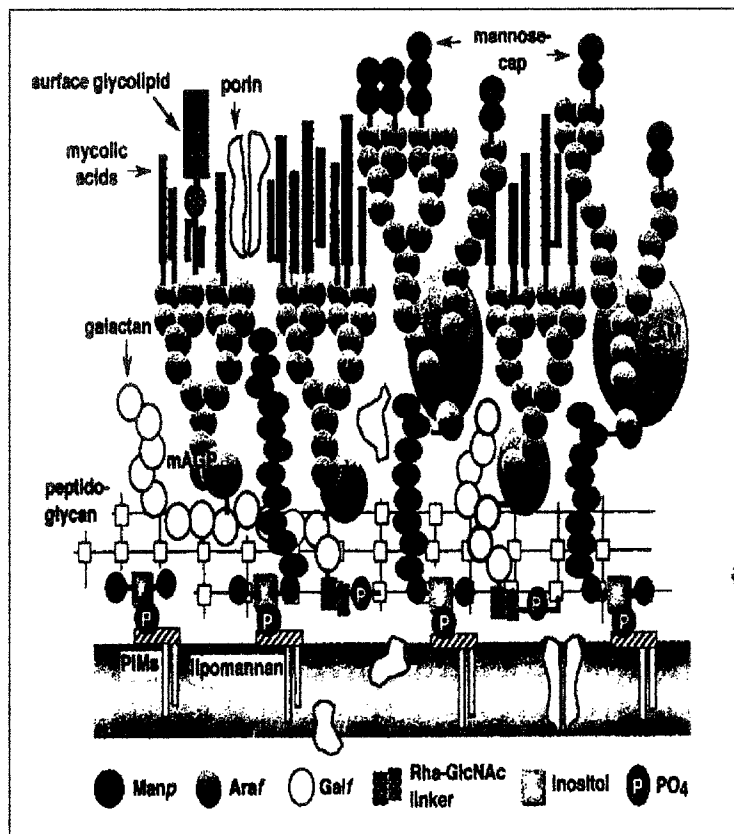
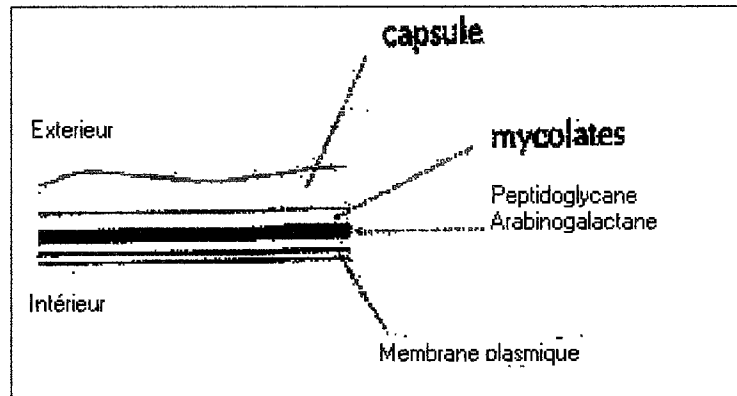


Figure 3: Représentation linéaire et moléculaire des différentes couches de la paroi mycobactérienne [59].

La composition de la pseudo-capsule en protéines et lipides varie également selon les espèces et les souches bactériennes : sans entrer dans les détails, celle de *M. avium* serait particulièrement riche en mycosides de groupe C (qui sont des glycopeptidolipides), alors

que la pseudo-capsule de *M. tuberculosis* en serait dépourvue mais elle comporterait davantage d'hétéroprotéines en surface [59, 166].

On pense que ces variations biochimiques pourraient être partiellement corrélées à la virulence des espèces, mais de nombreuses caractéristiques restent encore à élucider [13, 85].

Cette pseudo-capsule constitue une barrière protectrice supplémentaire contre des substances nocives du milieu environnant et prévient l'accès de macromolécules à la bactérie. En même temps, ses composants les plus externes sont les premiers à être reconnus comme xénoantigènes par l'hôte que le bacille infecte. Ces molécules de surface se retrouvent en première ligne face au système immunitaire de l'hôte et peuvent donc déclencher des réponses anti-bactériennes variables selon leur nature biochimique terminale voire servir de leurres, capables de détourner la réponse immunitaire à l'avantage de la mycobactérie [13, 59, 66, 85, 166].

II. CARACTERISTIQUES IMMUNOLOGIQUES DES MYCOBACTERIES :

1. Pouvoirs antigènes et immunogènes :

Les mycobactéries possèdent un répertoire vaste et complexe d'antigènes peptidiques et non peptidiques, qui déclenchent une réponse immunitaire à la fois humorale et cellulaire.

Dès 1942, des expériences montrent que seule la composante cellulaire de l'immunité est protectrice contre les infections mycobactériennes. Le transfert passif de serum immun acellulaire d'animaux préalablement infectés à des animaux naïfs, ne confère aucune protection à ces derniers, alors que le transfert de lymphocytes T présensibilisés leur permet de lutter avec succès contre l'infection [90, 198, 212].

L'inefficacité de la réponse humorale est à relier au mode de vie essentiellement intracellulaire de la mycobactérie, qui se trouve ainsi à l'abri des anticorps et des fractions du Complément formant le complexe d'attaque membranaire [45, 128].

1.1. Les antigènes non peptidiques :

Ce sont essentiellement des polysaccharides et des lipides pariétaux et néosynthétisés. L'analyse du génome de *M. tuberculosis H37Rv* a révélé qu'une très large partie de son ADN était consacrée au codage d'enzymes impliquées dans la lipogénèse et la lipolyse, et que certaines des voies de biosynthèse, jusqu'alors inconnues, généraient des lipides spécifiques du genre [42].

Les lipides représentent près de 60% de l'ensemble des constituants mycobactériens [66, 67]. Ces glucides et hétérolipides peuvent aussi être sécrétés par les bactéries et retrouvés dans les surnageants de cultures au laboratoire ou au sein des cellules infectées [38, 166, 202].

Nous ne détaillerons ici qu'un exemple : l'antigène hétérolipidique lipoarabinomannane, composant essentiel de la paroi mycobactérienne.

a) Un exemple, le lipoarabinomannane ou LAM :

C'est un liposaccharide macromoléculaire typique des mycobactéries d'un poids variant entre 15 et 17 kDa [38]. Il est considéré comme le pendant du LPS des bactéries gram négatif. Le LAM est un antigène majeur et il joue un rôle d'une grande importance dans différentes phases de l'infection mycobactérienne.

La position exacte du LAM au sein de la paroi n'est pas déterminée; selon le modèle le plus couramment retenu, il traverse l'épaisseur de l'enveloppe mycobactérienne en s'ancrant à la membrane plasmique par une terminaison phosphatidylinositol mannosylée « x » fois (abrégée en PIMx). Selon une autre hypothèse, cette ancre de glycérophosphatidylinositol, estérifiée par deux acides gras, s'attacherait sur la deuxième bicouche lipidique. Enfin, d'après un troisième modèle pas forcément incompatible avec les deux précédents, le LAM n'aurait pas de localisation pariétale précise mais sa terminaison polysaccharidique serait toujours celle en contact avec le milieu extrabacillaire. Le LAM peut également être excrété par la bactérie et retrouvé dans l'environnement mycobactérien, dans le milieu de culture ou la cellule eucaryote infectée [38, 214].

La structure biochimique primaire de la partie du LAM commune à toutes les mycobactéries est, quant à elle, précisément déterminée; l'ancre phosphatidylinositol mannosylée se poursuit par une trame ramifiée de mannopyranosyls associée à une extension d'arabinofuranosyls comprenant plusieurs ramifications linéaires de quatre à six résidus d'arabinofuranoses [214] (Fig.4).

Dans sa partie distale, le LAM peut se terminer, soit par des résidus arabinose (on parle alors d'AraLAM), soit par des sucres mannoses supplémentaires (ManLAM), soit par de rares résidus phosphatidylinositol sur quelques extrémités de branches d'arabinofuranosyl (ou PI LAM) [166].

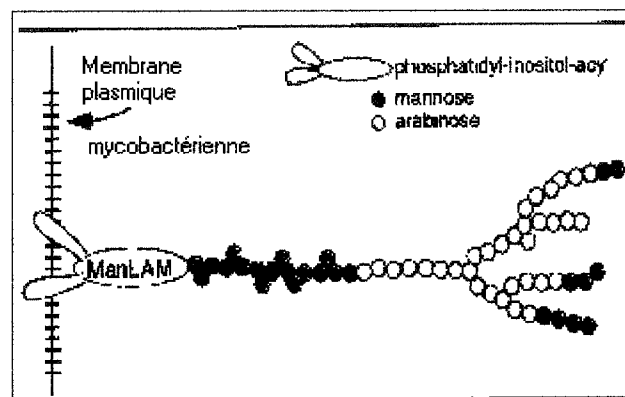


Figure 4: Schéma du ManLAM.

Présence de résidus terminaux mannose supplémentaires :
LAM à « capping Mannose » [35].

On a pensé, au départ, que le ManLAM n'était présent que chez les souches virulentes et que les mycobactéries apathogènes à croissance rapide ne synthétisaient que de l'AraLAM. Mais des souches avirulentes comme *M. tuberculosis H37Ra* ou *M. bovis BCG* expriment

elles aussi un LAM avec des terminaisons mannoses. En fait, toutes les souches actuellement recensées du complexe taxonomique « *M. tuberculosis* » synthétisent des LAM terminés par des résidus le plus souvent di- ou trimannosylés ; mais la fréquence de ces terminaisons mannose varie de 40 à 70% selon la souche considérée [38, 202].

Mycobacterium avium ne synthétise que de l'AraLAM, associé à du PiLAM, malgré sa virulence reconnue, notamment celle de ses sérovars 1, 4 et 8 chez les personnes immunodéprimées [13, 104, 136, 227]. La nature biochimique des extrémités du LAM ne corrèle donc pas avec le pouvoir pathogène des bacilles qui le synthétisent.

Les terminaisons acylées de l'ancre PIMx confèrent au LAM la capacité de franchir les membranes mycobactériennes et eucaryotes en s'insérant directement parmi les phospholipides des bicouches lipidiques. Le LAM est ainsi capable de sortir, de façon autonome, hors de la bactérie, hors des organites de la cellule hôte infectée. Cet antigène peut être exporté vers le milieu extracellulaire voire pénétrer dans des cellules encore vierges de toute colonisation mycobactérienne en franchissant les membranes plasmiques eucaryotes suivant le même processus [38, 166, 202].

Par ailleurs, les possibilités de variations biochimiques des extrémités distales carbohydrates et proximales des LAM de diverses espèces sont à l'origine des différences de leurs pouvoirs antigéniques pro-inflammatoires et immunitaires de la molécule : l'AraLAM de *M. avium* est notamment bien plus immunostimulant et chimioattractant que le ManLAM de *M. tuberculosis* [35, 166, 202]. Nous verrons les répercussions des variantes structurales de ce lipoglycide sur la phagocytose des bacilles, l'induction de cytokines et leurs régulations [35, 38, 202, 223].

Intervenant dans l'immunité humorale sans engendrer de protection, les antigènes non peptidiques ont révélé récemment leur capacité à déclencher également une réponse cellulaire.

b) Présentation des antigènes lipidiques par les molécules CD1 :

Il y a moins de dix ans, on a découvert que les antigènes glycolipidiques mycobactériens pouvaient, eux aussi, être présentés à des lymphocytes T, via une famille de protéines, les CD1 totalement indépendante du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) [140].

Les molécules CD1 sont présentes majoritairement sur les cellules présentatrices d'antigène spécialisées (CPA), c'est-à-dire essentiellement les macrophages et les cellules dendritiques, sur les thymocytes, et sur certains lymphocytes B. D'un point de vue structural, elles ressemblent beaucoup aux molécules de classe I du CMH, par leur chaîne $\alpha 1$, et elles s'associent comme ces dernières, de façon non covalente, à une $\beta 2$ microglobuline invariante [73, 140, 214] (Fig 5).

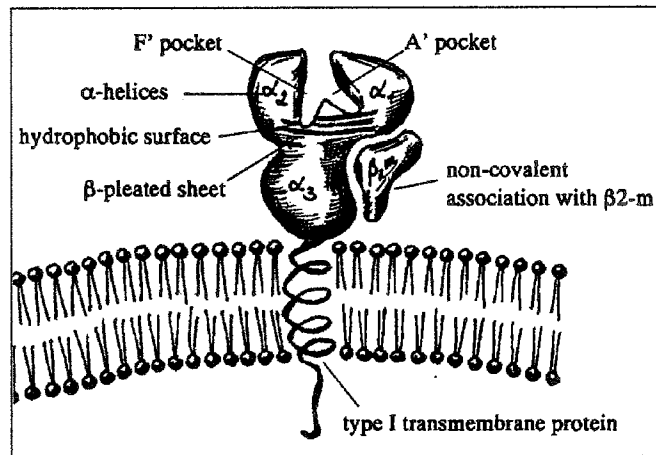


Figure 5: Modèle structural d'un isoforme CD1. Association non covalente à la $\beta 2$ microglobuline [214]. Poches F' et A' formées par deux zones en hélices α ; feuillet β plissé de la surface hydrophobe.

Contrairement aux molécules du CMH, les protéines CD1 ne sont pas polymorphes. Il n'y a que peu ou pas de différences entre les produits des gènes *cd1* d'individus sans liens de parenté et, chez un même individu, les structures des quatre isoformes sont quasi-identiques.

Malgré cette condamnation à l'isomorphisme des protéines CD1, chacune d'entre elles reconnaît une catégorie biochimique d'antigènes lipidiques bien particulière et présente ces antigènes à une population lymphocytaire bien identifiée, sans réaction croisée [214] (voir figure 6 et tableau 2).

ANTIGENES GLYCOLIPIDIQUES MYCOBACTERIENS :	PROTEINE ISOFORME PRESENTATRICE DE L'ANTIGENE :
• Lipides polaires	CD1a
• Acides mycoliques libres • Monomycolates glycosylés • LAM, LM (Lipomannane=LAM dépourvu du core arabinofuranosyl) • PIM = Phosphatidyl Inositol Mannosylé	CD1b
• Phospholipides	CD1c
• Céramides alpha glycosylés	CD1d

Tableau 2: Spécificité relative des isoformes CD1 vis-à-vis de la structure antigénique des lipides mycobactériens (d'après 140).

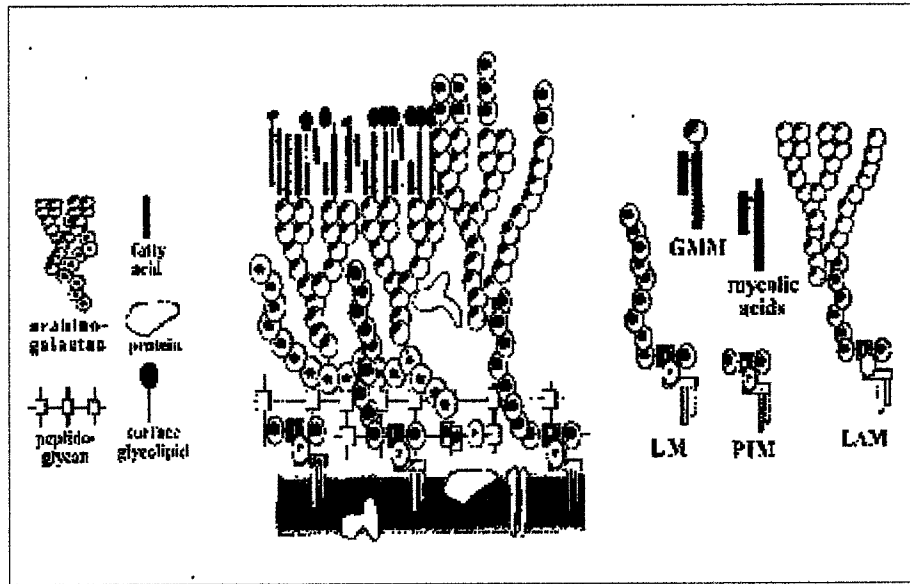


Figure 6: Antigènes glycolipidiques mycobactériens présentés par l'isoforme CD1b [140]
(abréviations explicitées tableau 2) .

Certains des antigènes lipidiques mycobactériens sont captés par les CD1 à la surface de la CPA et internalisés avec les protéines isoformes qui fonctionnent alors comme des récepteurs d'endocytose. D'autres antigènes parmi les plus hydrophobes, comme les acides mycoliques, sont capables de traverser directement les membranes des cellules [214].

En fonction de leurs caractéristiques biochimiques, les antigènes nécessitent parfois des transformations enzymatiques variées, préalablement à leur présentation par les CD1 aux récepteurs des lymphocytes. Cela semble déterminer la circulation et la distribution des CD1 au sein de la CPA.

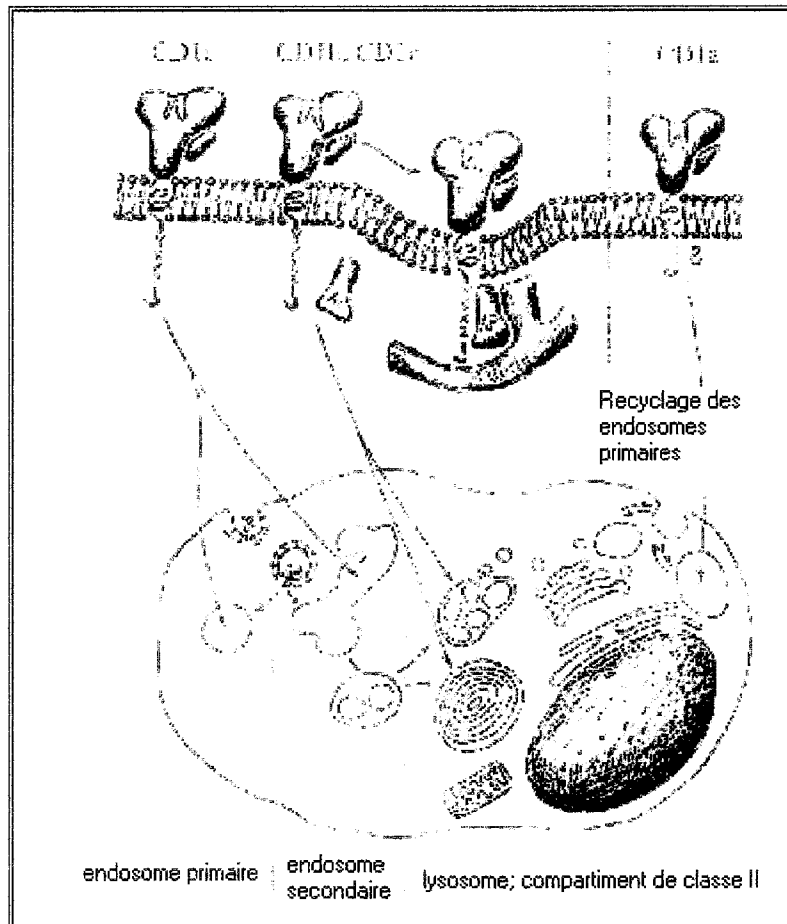


Figure 7: Localisation présumée des isoformes CD1 au sein d'une cellule présentatrice d'antigènes [214].

Après avoir subi les traitements enzymatiques nécessaires, les antigènes se retrouvent réduits à des molécules de petite taille présentant une queue hydrophobe et une tête hydrophile. La partie hydrophobe se lie de façon non spécifique à la plate-forme en feuillet β plissé et aux poches A' et F' de CD1 (voir Figure 5), tandis que la tête hydrophile, laissée accessible est reconnue spécifiquement par le TCR du lymphocyte (Fig.8) [140, 214].

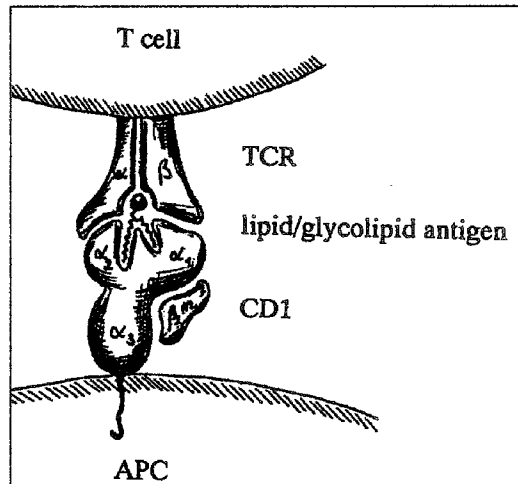


Figure 8: Interaction entre un antigène glycolipidique présenté par le CD1b ou d de la CPA et le TCR du lymphocyte T [214].

Cette reconnaissance de type « bipolaire » semble justifier, *a posteriori*, l'absence de polymorphisme des protéines CD1. Car la liaison entre l'antigène transformé et le CD1 de type « hydrophobe-hydrophobe », fait davantage intervenir une similitude de caractères chimiques, plutôt qu'une reconnaissance spécifique de structures fines et hautement variables du couple « peptide-protéine de classe I ou II du CMH ». De petites variations au sein des chaînes aliphatiques des antigènes présentés par les CD1 n'ont sans doute pas grande incidence, tant que ces chaînes conservent leur caractère globalement hydrophobe.

En conclusion, malgré leur absence de polymorphisme, les protéines CD1 sont capables, dans leur ensemble, de prendre en charge des antigènes mycobactériens glycolipidiques très différents, au sein de CPA diverses. En fonction de leur nature chimique, ces antigènes seront orientés et préparés dans des organites distincts coïncidant avec les propriétés de migration et la distribution des CD1 qui les présentent ensuite à la surface de la CPA. Il semble que les diverses combinaisons formées par l'antigène réduit et le CD1 soient ensuite reconnues par des populations lymphocytaires précises, ce qui assure une diversité de la réponse T. Finalement, ce système, en apparence uniforme et rigide, tend à se rapprocher, dans son résultat, de la présentation antigénique du CMH.

Par ailleurs, chez la souris, les isoformes CD1 peuvent aussi présenter de petits peptides hydrophobes [214].

1.2. Les antigènes peptidiques :

Les protéines mycobactériennes induisent *in vivo* la formation de nombreux anticorps, non protecteurs, dont l'utilisation diagnostique se heurte aux mêmes problèmes d'absence de spécificité rencontrés pour les antigènes glycolipidiques, notamment l'existence de nombreuses réactions croisées, par exemple avec la souche vaccinale BCG [223].

Certaines de ces protéines sont des glyco- ou lipoprotéines intégrées dans la paroi ou au sein d'autres éléments structuraux bactériens et sont donc présentes dans les filtrats de mycobactéries tuées [103]. D'autres, au contraire, ne sont synthétisées que par les bactéries en croissance et sont susceptibles d'être excrétées ou sécrétées dans le milieu de culture plus ou moins précocément [223].

Vu la médiocre efficacité de la réponse déclenchée par l'administration de mycobactéries tuées, on en conclut que la réaction cellulaire protectrice repose essentiellement sur ces antigènes protéiques, fabriqués et exportés par les bacilles vivants et en phase de croissance active [58].

De plus, on remarque que les bactéries qui se sont multipliées *in vivo* sont plus virulentes que celles cultivées en laboratoire. Certains facteurs de virulence ne sont synthétisés, ou correctement exprimés, que lorsque la mycobactérie se multiplie activement dans le milieu intracellulaire de son hôte [43, 223]. Certaines de ces protéines moins semblent correspondre aux antigènes peptidiques à l'origine de la réponse immunitaire cellulaire protectrice ; les antigènes protecteurs sont essentiellement des glycoprotéines dans le cas de la souche BCG [45, 46, 198].

La recherche s'attache à identifier les gènes codant pour les facteurs de la virulence des mycobactéries. Leur mise en évidence a été facilitée par le séquençage complet du génome de *H37Rv* et devrait se systématiser avec les programmes de génomique comparative, exploitant puis comparant le génome d'une souche virulente à celui de son pendant avirulent, comme pour le couple *M. bovis* et *M. bovis BCG*. Ce dernier se révèle être un jumeau tronqué d'un nombre important de gènes, disparus lors de son évolution, ce qui permet l'identification de gènes de virulence sur l'ADN spécifique à *M. bovis* [97, 98]. Nous ne donnons ici que quelques exemples d'antigènes protéiques identifiés comme facteurs de virulence :

- les protéines exportées *Erp* ou (Rv3810), jouant un rôle majeur dans la structuration de la paroi mycobactérienne [97],
- des enzymes capables de neutraliser les défenses antibactériennes de l'hôte comme la catalase-peroxydase (gène *katG*), la superoxyde dismutase (gène *sodA*), ou encore une phospholipase qui désagrège les membranes eucaryotes [98, 100],
- des protéines appartenant à de nouvelles familles dites PE et PPE, dont les gènes possèdent des séquences PGRS pour (Polymorphe G+C Rich Sequence), c'est-à-dire, constitués d'exons particulièrement riches en bases Guanine et Cytosine, caractéristiques qui se traduisent dans leur composition en acides aminés (proline, glycine, arginine). Ces séquences représenteraient des sources importantes de variations antigéniques et joueraient un rôle dans la virulence, à l'étude pour une éventuelle atténuation raisonnée du bacille de Koch [42, 98],
- ou encore les gènes *emb*, qui, chez *M. avium*, codent pour sa résistance naturelle à l'ethambutol un antibiotique antituberculeux majeur, qui inactive théoriquement une enzyme arabinosyltransférase impliquée dans la synthèse du LAM [45, 202].

Le second enjeu est de parvenir à isoler des antigènes immunodominants déclenchant une réponse protectrice efficace, et de les intégrer dans de nouvelles souches vaccinales recombinantes ; nous ne citerons que quelques exemples :

- les protéines « apa » dont l'immunogénicité dépend, comme pour le LAM, du degré de mannosylation terminale ; elles confèrent une protection efficace chez la souris [99],
- antigènes sécrétés majeurs, les trois composants du complexe Ag85 A,B, et C qui sont des enzymes mycolyltransférases impliquées dans la synthèse des acides mycoliques de la paroi, ils génèrent une importante réponse cellulaire [38].
- enfin, les protéines de choc thermique (Heat Shock Protein), une famille qui comprend de nombreux membres comme HSP65, 70kDa ou HSPX de 16 kDa [45, 139]. Elles sont synthétisées par les cellules procaryotes et eucaryotes lors d'agression, de stress physico-chimiques ; elles joueraient, chez *Mycobacterium*, un rôle de « transporteurs/protecteurs » envers d'autres polypeptides mycobactériens susceptibles de franchir la membrane plasmique bactérienne [45]. Leur utilisation vaccinale s'est révélée très prometteuse chez la souris mais la transposition à l'espèce humaine reste décevante [45, 175, 190, 199]. Certains auteurs contestent au premier chef leur caractère d'antigènes immunodominants » voire déconseillent leur intégration dans un éventuel vaccin : leur homologie structurale avec les HSP des cellules eucaryotes pourrait être à l'origine de réactions autoimmunes [149, 223].

Jusqu'à présent, tous les antigènes peptidiques « immunodominants » utilisés isolément à des fins vaccinales ont déclenché des réponses protectrices, chacune se révélant, jusqu'à présent, globalement moins efficace que celle induite par le vaccin BCG.

Sont également étudiés les pouvoirs d'activation lymphocytaire d'antigènes peptidiques exportés précocement par la mycobactérie ; certains sont typiques du complexe « Tuberculosis », comme ESAT-6, pour Early Secreted Antigen of *M. tuberculosis*, d'un poids moléculaire de 6 kDa [139]. Néanmoins ces antigènes seraient exprimés en quantité variable selon l'espèce du complexe, y compris chez les souches vaccinales BCG, ce qui permettrait de les différencier au sein du complexe [46, 198].

Ces variations d'expression feraient de ces antigènes des candidats intéressants pour leur utilisation dans des tests diagnostiques précoces. La mise en évidence de lymphocytes T sensibilisés à ces antigènes et qui, à leur contact, développent une réponse lymphoblastogénique ou cytokinique activatrice (IFN γ , TNF α ...) révèle la contamination antérieure du sujet dont les lymphocytes ont été prélevés. Le test à l'IFN γ est sérieusement envisagé comme moyen de dépistage de la tuberculose bovine par la Grande-Bretagne, *a fortiori* si le cheptel britannique devait être vacciné [43, 213, 223].

Enfin, les antigènes peptidiques mycobactériens sont un des principaux supports moléculaires induisant un autre phénomène immunitaire important et caractéristique, dont les granulomes mycobactériens sont la résultante au niveau histologique.

2. Pouvoir allergène des mycobactéries :

2.1. Le phénomène de Koch :

Première expérience. En 1890, Koch, qui a découvert le bacille responsable de la tuberculose humaine huit ans plus tôt, décide d'utiliser une culture fraîche de mycobactéries tuberculeuses, pour contaminer avec des bactéries vivantes des cobayes sains par injection.

Au bout d'une quinzaine de jours, au site de l'inoculation, apparaît un nodule inflammatoire, qui semble guérir au départ, puis qui s'abcède et s'ulcère. Ce nodule ulcéré est accompagné d'une adénite satellite marquée. L'ulcère s'aggrave, persiste, tandis que la maladie se développe et évolue en une tuberculose généralisée. Elle aboutit à la mort des cobayes au bout de deux à trois mois.

Deuxième expérience. Koch inocule à nouveau des bacilles vivants, en un point différent, à un lot de cobayes déjà infectés par une première injection réalisée quatre à six semaines auparavant. A ce deuxième point d'inoculation, une réaction inflammatoire intense et une induration locale apparaissent très rapidement, 24 à 48 heures après cette nouvelle injection. La lésion devient nécrotique, hémorragique, elle s'ulcère brutalement puis finit par guérir au bout de quelques jours, tandis qu'une reviviscence inflammatoire se produit à l'endroit de la première injection [17, 112, 164].

Koch décide de reproduire l'expérience précédente mais en la modifiant. Il remplace la deuxième injection de bacilles vivants par celle de « tuberculine vieillie », un filtrat acellulaire et chauffé, obtenu à partir d'une culture ancienne de mycobactéries tuberculeuses sur milieu glycéro-sérum.

Suite à l'injection de la tuberculine, il constate à nouveau l'apparition rapide en deux jours du phénomène inflammatoire, qui s'ulcère également. Mais après s'être ulcérée, la deuxième lésion guérit.

Koch en conclut que sa tuberculine est le remède de la tuberculose. Il l'administre alors à des patients malades, qui voient alors leurs symptômes s'aggraver avec apparitions de fièvres, de phénomènes de choc, parfois très graves qui conduisent ces patients à la mort [138].

Cet échec marquant du traitement de la tuberculose maladie par la tuberculine vient de l'interprétation erronée que fait Koch des résultats de sa deuxième expérience.

En fait, deux phénomènes immunologiques distincts mais parallèles se mettent en place simultanément à la première injection de bacilles vivants :

- le premier phénomène immunitaire est la réaction cellulaire protectrice, qui s'est instaurée en deux à six semaines après l'inoculation des bactéries vivantes ; cette réaction protectrice explique la guérison de la deuxième lésion, guérison que Koch attribue ensuite par erreur à sa tuberculine lorsqu'il renouvelle la deuxième expérience.
- le second phénomène est l'hypersensibilité retardée (HSR) qui est responsable de la reviviscence de la première lésion et du raccourcissement de la période d'incubation remarqué après la deuxième injection. En fait, la tuberculine ne fait que révéler l'état d'hypersensibilité induit par la première inoculation des bactéries [138, 164].

2.2. L'hypersensibilité retardée :

L'hypersensibilité retardée est un phénomène allergique à médiation cellulaire, qui se met en place dans les semaines qui suivent la première introduction dans l'organisme de l'antigène sensibilisant ; elle ne se révèle que 48 à 72 heures après le deuxième contact antigénique, par opposition à l'anaphylaxie, où la réaction d'hypersensibilité est immédiate et basée sur l'immunité humorale.

Tout comme la réponse protectrice, l'hypersensibilité n'est transférable à un individu naif que par l'injection de cellules T vivantes provenant d'un donneur déjà sensibilisé et histocompatible. Le transfert de serum acellulaire est totalement inefficace [8, 164].

L'introduction de mycobactéries vivantes chez un individu naïf initie le développement de deux sous-populations lymphocytaires T : la première est le support de la réponse protectrice et la seconde celui de l'HSR [103]. Ces deux sous-populations lymphocytaires T sont identifiables par des récepteurs membranaires distincts et dissociables expérimentalement [45, 128]. Des injections répétées de tuberculine entraîne la disparition de la réaction d'HSR par un phénomène de désensibilisation [45, 164], alors que la réponse protectrice reste efficace [138]. La tuberculine seule est incapable de sensibiliser un individu [17].

La réaction d'hypersensibilité peut se traduire cliniquement par des signes généraux avec fièvre et malaises ou par des symptômes locaux caractérisés par des rougeurs et des indurations qui apparaissent en un ou deux jours dans le cas d'un test tuberculinique [128]. Dans le phénomène de Koch, l'HSR est la composante immunitaire responsable de la reviviscence de l'inflammation au premier site d'inoculation des bacilles, elle est aussi responsable de l'aggravation clinique des malades traités par la tuberculine vieillie, car le « traitement » de Koch réveille ou fait flamber l'inflammation, voire la nécrose au niveau des foyers infectieux de l'ensemble des tissus colonisés par les mycobactéries.

♦ Induction et détection de l'hypersensibilité retardée :

L'hypersensibilité retardée peut être induite par :

- des bacilles mycobactériens vivants, lors de contamination,
- par des bacilles vivants atténués, comme ceux des souches vaccinales BCG, dès la primovaccination, mais l'HSR n'apparaît pas si les bacilles sont dépourvus de leurs lipides pariétaux [120],
- ou encore induite par l'injection, chez l'animal, soit de l'adjuvant complet de Freund, qui est une émulsion d'huile minérale et d'eau, contenant des mycobactéries tuées [164], soit l'inoculation en grande quantité de bacilles tués [128].

La structure biochimique minimale qui confère sa propriété hautement adjuvante à l'émulsion complète de Freund est contenue dans le peptidoglycane de la paroi des mycobactéries : il s'agit du N-acétyl-muramyl-alanyl-D-isoglutamine ou muramyl dipeptide, un glycopeptide hydrosoluble sous cette forme non polymérisée [8, 164].

Par contre, les antigènes de nature polysaccharique employés seuls entraînent la formation d'anticorps mais n'induisent pas de réponse cellulaire donc pas d'HSR, tout comme l'emploi d'antigènes protéiques en solution aqueuse, qui ne génèrent eux aussi qu'une réaction humorale [8, 45].

Les antigènes de nature protéique sont donc nécessaires à l'induction de l'HSR mais ils ne sont pas suffisants [164, 223].

L'HSR déclenche une réaction inflammatoire de type granulomateux autour des foyers bacillaires persistants ou dans la région d'inoculation des antigènes allergisants mycobactériens, qui perdure jusqu'à ce que les antigènes disparaissent [45, 103, 112].

Après le contact inducteur, l'HSR demande, en moyenne, entre 30 à 50 jours (de deux à sept semaines) pour se mettre en place [138]. Durant cette période l'état d'HSR est indétectable (période ante-allergique) [17].

Passé ce délai d'instauration, l'hypersensibilité retardée peut alors être révélée par :

- l'injection de bacilles vivants comme dans la deuxième expérience de Koch,
- l'injection de mycobactéries tuées,
- l'administration du BCG par voie sous-cutanée, le BCG test est une des épreuves diagnostiques possibles de la tuberculose chez le chien [17],
- l'injection intradermique de tuberculine ou de son dérivé protéique purifié (PPD) qui est une tuberculine standardisée, plus homogène sélectivement enrichie en protéines par l'utilisation de solvants appropriés [112, 128].

La tuberculine est un cocktail de molécules peptidiques et non peptidiques, non purifiées et très hétérogènes car obtenues après un autoclavage des bacilles et de leurs sécrétions dans un milieu de culture vieux de plusieurs semaines. Elle est, dans la pratique, remplacée par la tuberculine PPD [17].

Malgré son nom, la tuberculine PPD, même si elle est effectivement plus riche en composés de nature peptidique, comprend encore des acides nucléiques et des antigènes polysacchariques et glycolipidiques ; la PPD exprime donc aussi une certaine hétérogénéité de ses composants antigéniques dont beaucoup sont d'ailleurs communs au genre *Mycobacterium*. Une tuberculine PPD issue de l'espèce *M. tuberculosis* peut ainsi révéler un état d'HSR induit par une espèce mycobactérienne infectante différente ; la réaction tuberculinique sera néanmoins moins intense qu'avec l'utilisation de tuberculine homospécifique de l'espèce bactérienne inductrice, d'où l'intérêt des tuberculinations comparées [17, 138].

Les tuberculines ne possèdent aucune vertu curative, allergène ou immunogène et la réaction d'HSR qu'elles révèlent ne permet pas la destruction des mycobactéries infectantes ni des mycobactéries atténuées des souches vaccinales [17].

♦ Mécanisme de l'hypersensibilité retardée révélée par intradermo-réaction chez l'homme:

Lors du premier contact avec les antigènes mycobactériens (par contamination ou vaccination), les macrophages et les cellules dendritiques qui ont capturé les bactéries les transforment et les exposent à la surface de leurs membranes, sous la forme de petits peptides associés aux molécules de classe II du CMH. L'ensemble est reconnu par le TCR de lymphocytes T naïfs qui, une fois activés, prolifèrent et expriment leurs fonctions activatrices et cytotoxiques.

Quinze à trente jours après l'introduction antigénique, un petit nombre de ces lymphocytes donnent naissance à une population lymphocytaire « mémoire » de l'HSR [138].

Lors de l'injection de la tuberculine de l'intra-dermoréaction, les cellules de Langerhans et les macrophages cutanés capturent et présentent les antigènes de la PPD, dont la majorité ou la totalité d'entre eux étaient déjà présents dans l'éventail des antigènes exprimés par les bacilles vivants introduits lors du premier contact. Les antigènes de la PPD sont donc présentés pour la deuxième fois au système immunitaire de l'hôte. Les CPA, stimulées par la capture des antigènes, libèrent des molécules chimioattractives non spécifiques, les chimiokines, qui provoquent l'arrivée de polynucléaires neutrophiles, quelques monocytes et de lymphocytes T et B résidents et circulants sur le site d'inoculation. Cette première phase des 6 à 10 premières heures suivant l'intradermoréaction est caractérisée par une réaction inflammatoire assez discrète, essentiellement érythémateuse et non spécifique [49, 58].

Parmi les cellules immunitaires recrutées par les chimiokines, se trouvent quelques petits lymphocytes T « mémoire » préalablement sensibilisés à certains antigènes présentés sur le site. Leur TCR reconnaît ces antigènes, et, dans les premières 24 heures, les interactions spécifiques déclenchent la sécrétion de cytokines à l'origine de l'œdème et de l'érythème croissants, et la sécrétion de cytokines activatrices, comme l'interféron gamma. Toutes ces cytokines provoquent directement ou indirectement l'afflux rapide et massif de monocytes sanguins et de lymphocytes non spécifiques, qui sont maintenus sur le site inflammatoire par la cytokine MIF libérée par les lymphocytes « mémoire » [8, 164].

Certaines cellules dendritiques porteuses de l'antigène migrent dans le noeud lymphatique satellite où elles rencontrent des lymphocytes naïfs dans les zones T ; une fois activés, ces lymphocytes se dirigent vers le site par chimiotactisme. Cette étape est à l'origine de l'adénomégalie loco-régionale associée à l'IDR et caractérisée par une hypertrophie des zones thymodépendantes, paracorticales ou corticales profondes.

Au bout de 72 heures, la réaction d'HSR est à son maximum. Cette colonisation cellulaire rapide et persistante du tissu cutané explique l'induration et l'épaississement caractéristiques de l'IDR positive. Le recrutement cytokinique a essentiellement attiré des cellules lymphocytaires naïves et des monocytes sanguins, qui ont franchi l'endothélium vasculaire [58, 112, 138] (voir Fig 9).

Des expériences basées sur le marquage radioactif des lymphocytes « mémoire » ont montré qu'ils ne représentent que 10 % des cellules du granulome allergique et donc que les cellules néorecrutées, non spécifiques de l'allergène, constituent 90 % de la population cellulaire de l'infiltrat inflammatoire [8, 58, 164]. Dans le phénomène d'HSR, la composante spécifique est donc quantitativement minoritaire, mais indispensable à son déclenchement.

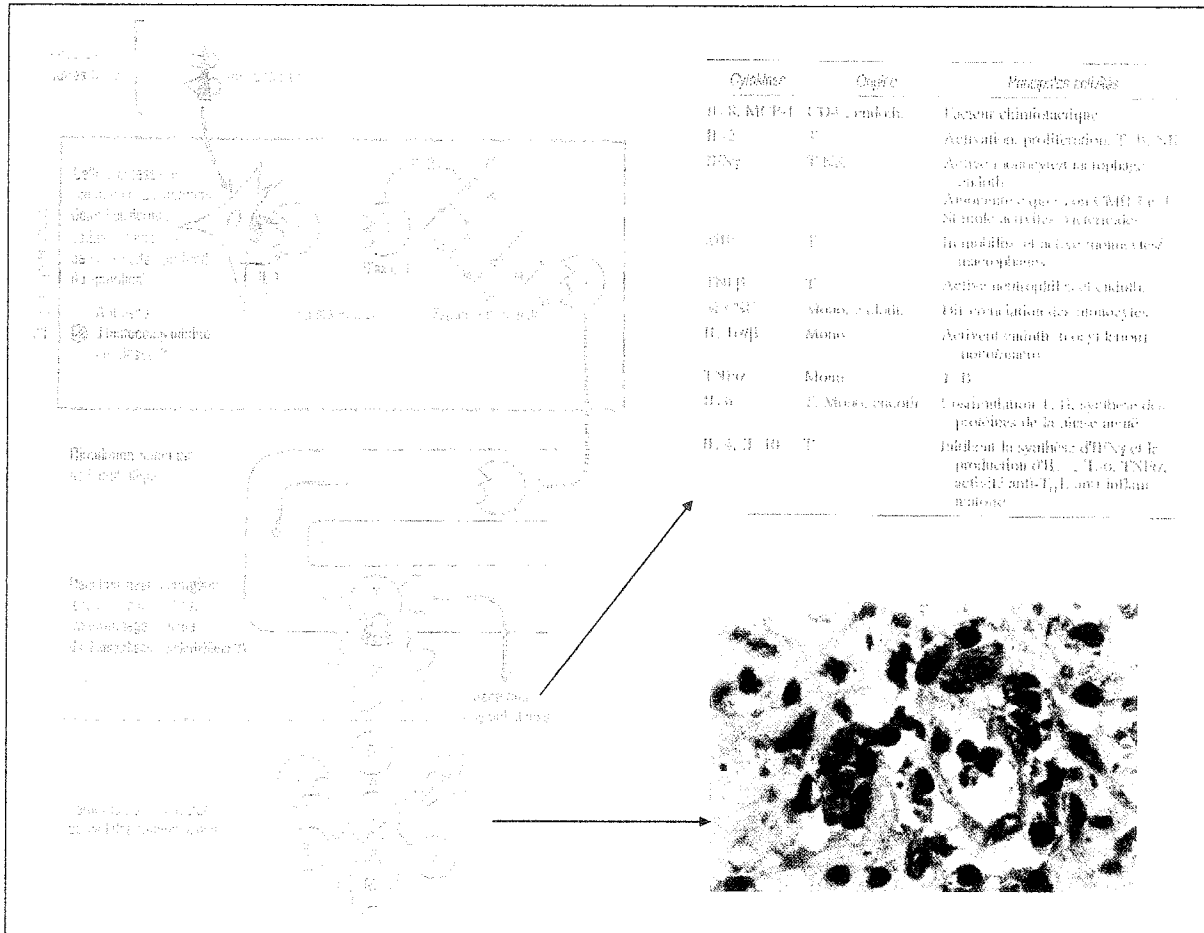


Figure 9: Mécanismes d'induction et d'expression de l'HSR.

Sont précisées les principales cytokines et chémokines intervenant dans l'expression de l'allergie lors de la deuxième présentation de l'antigène allergisant et celles régissant la régulation de la réaction. En bas à droite, une coupe histologique de la réaction cutanée à la tuberculine chez l'homme : avec un amas de cellules mononuclées centrée sur un capillaire témoignant de l'importance de la diapédèse des monocytes et lymphocytes naïfs. Grossissement $\times 500$. Cliché S.Colon et figures in : BACH JF, Traité d'immunologie, 1993, chez Flammarion Médecine-Sciences [112].

Dans le cas d'un test tuberculinique, la réaction d'HSR décroît progressivement en intensité à partir du troisième jour et finit par ne plus être détectable, en général au bout d'une semaine (Fig.10). Cette régulation modératrice fait intervenir des lymphocytes T et B suppresseurs de l'HSR qui libèrent des cytokines inhibitrices de l'immunité cellulaire [8, 112].

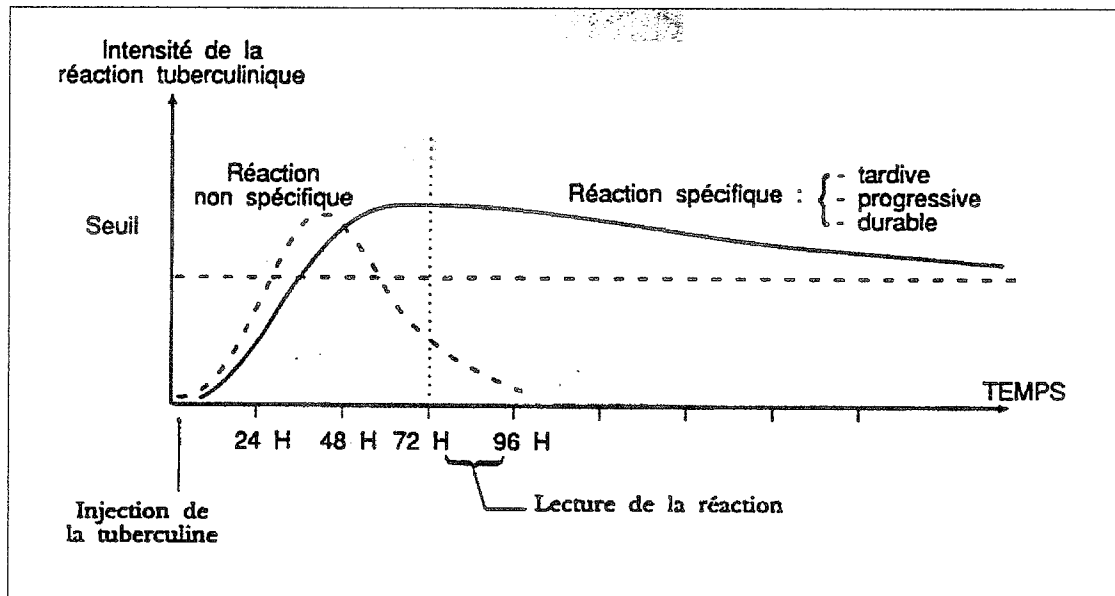


Figure 10: Caractéristiques et évolution de la réaction tuberculique sur 8 jours [17].

◆ Variations de l'expression de l'hypersensibilité retardée :

L'hypersensibilité retardée peut être d'intensité très variable, voire indétectable, selon la chronologie de l'infection mycobactérienne ou des facteurs liés l'individu.

La réaction cutanée peut être très violente avec apparition d'ulcères et de nécrose à l'endroit de la tuberculisation ; une réaction générale avec hyperthermie est également possible.

Parfois, au contraire, le test tuberculique reste négatif malgré une infection avérée, on parle alors d'état anergique.

Certaines personnes ne déclarent jamais de réaction d'HSR malgré des contacts antigéniques inducteurs répétés, comme des vaccinations à l'aide du BCG réitérées. Ces personnes sont dites en état d'anergie permanente sans que cela signifie forcément une absence totale de réponse immunitaire protectrice (voir la deuxième partie).

La prise de médicaments immunodépresseurs comme la cyclosporine A ou les glucocorticoïdes peut bloquer réversiblement l'expression de l'HSR pendant la durée du traitement [164]. On parle alors d'anergie iatrogène transitoire.

Il existe aussi des anergies réversibles physiologiques pour des raisons hormonales, notamment lors de gestation [17].

L'anergie peut être d'origine nutritionnelle: des carences protéiques expérimentales chez l'homme et le cobaye rendent l'HSR indétectable [138].

L'HSR peut disparaître de façon contradictoire chez certains patients atteints de formes très actives ou disséminées de tuberculose; cette forme d'anergie est dite alors post-infectieuse [17, 43].

Lors d'immunodéficience généralisée comme celle engendrée par le VIH, l'anergie peut devenir totale c'est-à-dire qu'elle n'est plus restreinte aux antigènes mycobactériens : les test cutanés à *Candida albicans* ou à la toxine tétanique restent également négatifs [104, 138].

L'intensité de la réaction d'HSR décline progressivement avec l'âge et peut finir par disparaître [49].

Enfin, l'élimination définitive de la source antigénique allergénique par destruction totale des bacilles lors de guérison entraîne la disparition de l'HSR dans les semaines ou mois qui suivent. Il n'y a plus aucune réaction d'HSR quand la population lymphocytaire mémoire, qui persiste un certain temps après l'élimination des antigènes, a totalement disparu [17].

DEUXIEME PARTIE :

**MECANISMES CELLULAIRES DES ETAPES DE LA
PRIMO-INFECTION MYCOBACTERIENNE**

I. ENTREE DES MYCOBACTERIES DANS LES CELLULES DE L'HÔTE : **De la mycobactérie libre au phagocyte infecté.**

Les infections mycobactériennes sont généralement des maladies chroniques, avec des temps d'incubation longs, durant parfois plusieurs années. La grande majorité des individus infectés vont rester porteurs inapparents toute leur vie. Ces porteurs sains ne sont pas capables de transmettre directement la maladie à un congénère. L'extériorisation et la progression plus ou moins rapide de la maladie dépendent à la fois de la résistance initiale de l'hôte et du pouvoir pathogène de la mycobactérie infectante mais les mécanismes exacts des facteurs déclenchant le passage à la phase clinique restent encore méconnus [17, 128].

Il n'y a pas de véritable tropisme spécifique d'espèces chez les mycobactéries tuberculeuses, ni de tropisme d'organes strict. Mais comme les voies d'entrée des bacilles sont essentiellement orale et respiratoire, on observe majoritairement des infections qui sont pulmonaires et digestives. *M. tuberculosis* engendre le plus souvent une pneumonie dont les expectorations sont très contagieuses pour l'homme et les animaux familiers qui entourent l'individu malade : le bacille de Koch est un agent majeur de zoonose [17]. La contamination orale ou pulmonaire par *M. avium* est jusqu'à présent considérée comme une anadémie environnementale ; sa transmission d'homme à homme n'a jamais été irréfutablement mise en évidence, même chez des personnes présentant une immunodéficience généralisée. Lors de phases de dissémination, d'autres organes peuvent être touchés. Chez les malades, les signes cliniques et radiographiques ne permettant pas de déterminer l'espèce bactérienne en cause, il est nécessaire d'avoir recours à des examens de laboratoire complémentaires pour typer le bacille et sa sensibilité aux antibiotiques [13, 85, 227].

M. avium et *M. tuberculosis* sont des pathogènes intracellulaires facultatifs; s'ils peuvent survivre des années dans le milieu extérieur (*M. tuberculosis* peut résister des mois sur des vêtements ou dans les crachats), ils sont également capables après inhalation ou ingestion de coloniser rapidement diverses cellules de leur hôte [129].

1. Contamination par voie respiratoire :

M. avium est inhalé sous forme d'aérosols provenant des mouvements des eaux de surface, des eaux issues des circuits domestiques ou d'aérosols des poussières de sols contaminés.

La transmission de *M. tuberculosis* se fait à partir de gouttelettes contenant, en général, 1 à 3 bacilles agglutinés par les poussières et les sécrétions de l'arbre respiratoire d'un malade présentant la forme pulmonaire ouverte de la tuberculose. Ces gouttelettes font environ 10 microns de diamètre et sont formées lors d'éternuements, de toux, de chants ou de rires. Après évaporation de l'eau, persistent en suspension dans l'air des « noyaux » infectieux plus légers, soumis aux courants d'air. Le risque d'infection pour les congénères proches dépend du nombre de ces « noyaux » par volume d'air inspiré, de la fréquence et de la durée des contacts [20, 169].

Une fois aspirées dans les voies aériennes, les particules les plus grosses sont prises en charge au niveau des bronchioles par l'ascenseur muco-ciliaire, puis remontées jusqu'au pharynx où elles sont dégluties ; elles sont alors théoriquement inactivées par l'acidité et les enzymes digestives [129]. Les « noyaux » de petite taille (1 à 5 microns), atteignent l'espace

alvéolaire des lobes pulmonaires apicaux [169, 201]. Selon certains auteurs, un unique bacille suffit à initier l'infection primaire ; pour d'autres, une dizaine de bactéries et donc plusieurs « noyaux » infectieux seraient nécessaires [90, 129, 168]. Pour d'autres, enfin, seules de grosses quantités de bacilles présentes dans la sphère environnante et inhalées de façon répétée sont susceptibles d'infecter les muqueuses [128, 202]. En se répliquant, chacune des bactéries infectantes sera à l'origine d'une colonie de clones [129].

Une fois arrivées dans l'espace alvéolaire, les mycobactéries entrent en contact avec les diverses cellules pulmonaires.

1.1. Entrée dans les cellules phagocytaires pulmonaires :

Au niveau alvéolaire, les macrophages résidents représentent la population cellulaire immunitaire majoritaire : neuf macrophages pour un lymphocyte [45, 128, 230]. Ces macrophages au repos constituent la première barrière de défense immune non spécifique, rencontrée par les mycobactéries ; ils sont éventuellement secondés par les cellules dendritiques et les polynucléaires neutrophiles [168]. Comme ces derniers, les macrophages alvéolaires sont spécialisés dans la capture et la dégradation des agents infectieux qu'ils rencontrent. Mécanisme très complexe, la phagocytose nécessite au préalable la reconnaissance et la liaison, directe ou indirecte, d'éléments mycobactériens à des récepteurs exprimés à la surface du phagocyte ; ainsi activés, les récepteurs macrophagiques déclenchent alors l'internalisation des pathogènes. Les récepteurs impliqués dans l'entrée des mycobactéries au sein des phagocytes sont nombreux et variés ; ils ont été tout particulièrement étudiés chez les macrophages [2].

◆ Entrée *via* les récepteurs du Complément :

M. tuberculosis et *M. avium* peuvent entrer dans les macrophages via les récepteurs du Complément CR1, CR3 et CR4. Ce sont les premières portes d'entrée mycobactériennes à avoir été mises en évidence [64]. Ces trois récepteurs reconnaissent les fractions du composé C3 de la voie alterne du Complément (C³). Ces fractions du C3 se lient à la surface des mycobactéries, qui sont ainsi opsonisées de façon non spécifique.

Le CR1 est une protéine monomérique transmembranaire de 190 à 280 kDa, qui se lie au C3b. Elle peut également se lier au C3bi mais avec une moindre affinité. Les récepteurs CR3 et CR4 ont pour ligand principal le C3bi en présence de cations divalents. Le CR3 et le CR4 peuvent coopérer avec le CR1, qui a la capacité intrinsèque de transformer son propre ligand C3b en C3bi. Les récepteurs CR3 et CR4 sont deux intégrines hétérodimériques structurellement quasi-identiques, ayant en commun la chaîne $\beta 2$ [6, 61, 89].

Selon les expériences, les résultats divergent quant à l'affinité préférentielle des bacilles pour tel ou tel CR, ou quant à la fraction de C3 jouant un rôle prépondérant : *M. avium* entre tantôt en priorité par CR3 et CR4, ou CR1, *M. tuberculosis* par CR3 ou CR4 [64, 125, 168, 201]. Mais le récepteur CR3 apparaît le plus souvent comme la principale porte d'entrée de *M. tuberculosis* et de *M. avium* [2, 64, 90, 125, 161].

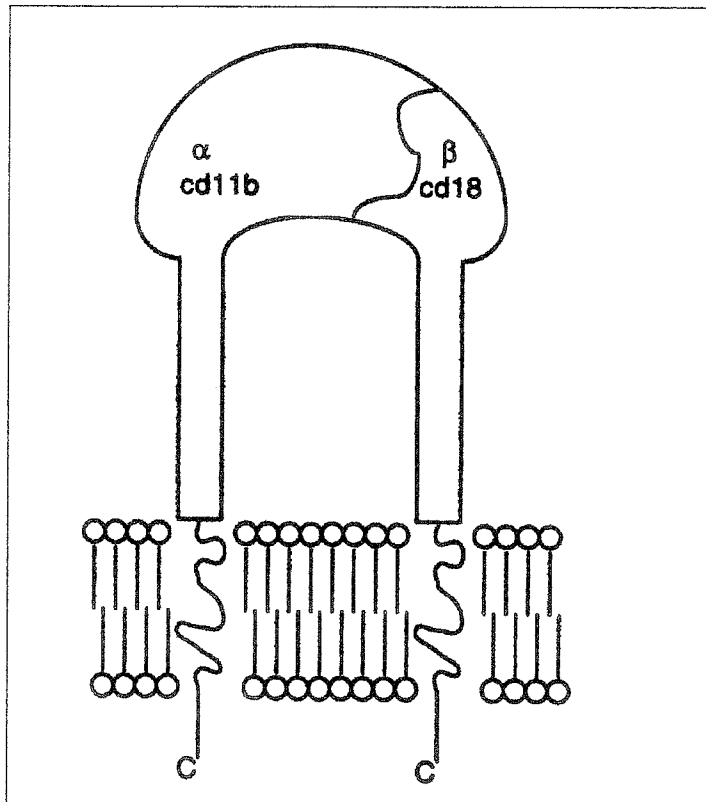


Figure 11: Représentation schématique du récepteur CR3 [122].

La fraction C3bi opsonisante se lie au CR3 au niveau d'un domaine « i » de sa chaîne α . Le récepteur CR3 montre en outre une grande affinité pour les polysaccharides mycobactériens sur un autre site de reconnaissance de sa chaîne α . Ce site, de type lectine, montre une très haute affinité pour les β D-oligomannosides et les oligosaccharides contenant la N acétyl-glucosamine [122], très abondants à la surface de la mycobactérie. Il est possible que plusieurs sites « lectine » distincts coexistent sur le même récepteur et reconnaissent plusieurs glucides pariétaux mycobactériens simultanément [61,122].

La reconnaissance simultanée du C3bi et du D- glucide mycobactérien entraîne l'activation du CR3 et déclenche la phagocytose ; ce n'est pas le cas si C3bi est reconnu seul [122].

Les bacilles sont capables d'entrer dans les phagocytes en l'absence de C' et d'interagir directement avec les CR. Le ManLAM pariétal peut se lier directement au CR3, grâce à la fixation de ses résidus terminaux mannosylés sur un des sites lectine [2].

Le CR3 peut également se lier à des lipoprotéines mycobactériennes au niveau de son domaine « i » qui contient plusieurs poches de liaison distinctes. La paroi des mycobactéries, particulièrement riche en composés lipidiques, offre un large éventail de ligands potentiels directs [61].

Enfin, la phagocytose par les CR se déroule selon une variation plus passive du modèle de la fermeture-éclair, avec très peu de pseudopodes [2].

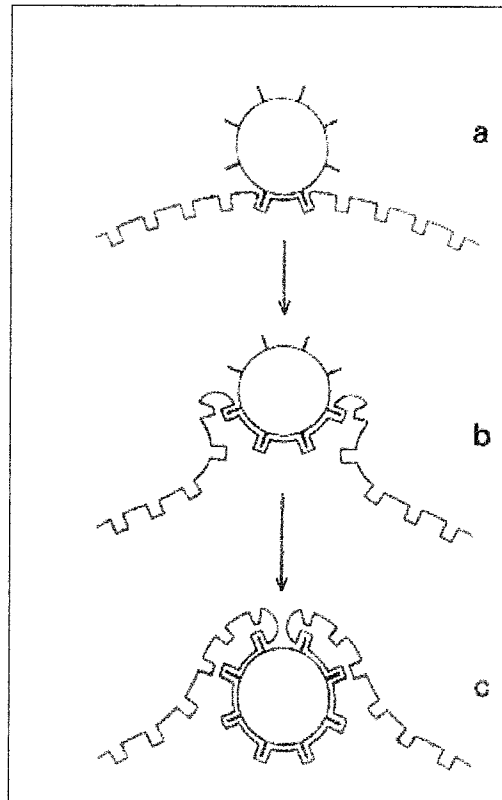


Figure 12: Modèle de la fermeture-éclair.

Dans le cas de la phagocytose via les CR, les bacilles sont opsonisés par les fractions C3b et C3bi ; les créneaux représentent les récepteurs CR de la membrane plasmique du phagocyte. (In : BACH 1993, Traité d'immunologie p147).

Rien ne permet d'affirmer actuellement que la présence de ces récepteurs sur les macrophages est nécessaire au développement de l'infection [64, 168]. Mais en utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre chacun des trois CR, on bloque l'entrée des mycobactéries jusqu'à près de 80%, ce qui montre que ces récepteurs ont au moins une importance quantitative [2, 64].

Les récepteurs du Complément semblent représenter une porte d'entrée inoffensive et sûre pour les mycobactéries. En effet, l'internalisation des bacilles *via* les CR ne semble pas déclencher conjointement des mécanismes antimicrobiens au sein des macrophages : la phagocytose des bacilles n'apparaît pas directement couplée à l'activation de la NADPH oxydase qui génère les radicaux oxygénés bactéricides [2, 61, 122, 125].

Les cellules dendritiques sont une autre catégorie de phagocytes que les mycobactéries sont susceptibles de rencontrer dès le début de l'infection. Ce sont des cellules extrêmement efficaces dans la capture et la présentation des antigènes; elles sont présentes dans tous les tissus non lymphoïdes notamment dans l'épithélium de l'arbre respiratoire, la plèvre et le parenchyme pulmonaire [51]. On connaît mal les récepteurs spécifiques aux cellules dendritiques permettant l'ingestion des mycobactéries, mais on a identifié à leur surface de nombreux récepteurs communs aux macrophages, dont les CR1, CR3, et CR4 [6, 61, 89].

La phagocytose de mycobactéries vivantes suffit à induire directement l'activation cellulaire de la cellule dendritique, qui est immature au départ [136]. Sa maturation se traduit par une variation de son phénotype et une baisse de ses capacités phagocytaires, associées à

l'augmentation de ses pouvoirs de présentation antigénique et de stimulation lymphocytaire [51]. Après leur ingestion, *M. avium* et *M. tuberculosis* sont localisés dans des vacuoles cytoplasmiques, ou « phagosomes des cellules dendritiques », où leur survie ne semble pas menacée. La croissance de *M. avium* dans ces vacuoles est nettement ralentie comparée à celle du bacille aviaire au sein des phagosomes macrophagiques, sans que la raison en soit connue [136].

Les polynucléaires neutrophiles expriment eux aussi les récepteurs du Complément à leurs surfaces : CR3, CR1, CR4 à un degré moindre et ils sont également capables de phagocyter les deux espèces de bacilles. [2, 6, 52, 64, 89, 125]. Premières cellules à être recrutées sur le site de l'infection mycobactérienne, elles peuvent jouer un rôle non négligeable dans la réponse immunitaire précoce. Chez l'homme, elles ont montré *in vitro* leur capacité à détruire *M. tuberculosis* par un mécanisme indépendant de l'explosion respiratoire, ainsi que leur aptitude à libérer des facteurs chimiotactiques recrutant les monocytes sanguins. L'importance exacte des polynucléaires neutrophiles dans la réponse protectrice contre l'infection mycobactérienne n'est pas encore déterminée mais fait l'objet de nombreuses études [52, 168].

Les monocytes sanguins présentent de très nombreux récepteurs du Complément à leur surface avec une majorité de CR3. Les monocytes peuvent internaliser les mycobactéries dans les capillaires alvéolaires [61,122]. Ils phagocytent plus efficacement *M. avium* que *M. tuberculosis*, mais la présence des CR1 et CR3 membranaires permet néanmoins la capture des souches virulentes du bacille de Koch, les fractions C3b et C3bi sériques jouant alors des rôles prépondérants [168].

◆ Entrée par le récepteur Mannose :

M. avium et certaines souches de *M. tuberculosis* sont également capables de se lier au récepteur mannose (RM) des macrophages [2, 5, 64, 90]. Ce récepteur reconnaît par affinité décroissante des oligosaccharides terminés par des résidus L-fucose, D-mannose et D-N-acétylglucosamine présents à la surface des pathogènes qui sont alors phagocytés [2, 122].

Ce récepteur est une glycoprotéine transmembranaire présentant huit domaines de reconnaissance de type lectine. La liaison de quatre de ces domaines suffit à induire l'affinité du récepteur entier pour les ligands par un phénomène de coopération, dès que le site numéro 4 est impliqué.

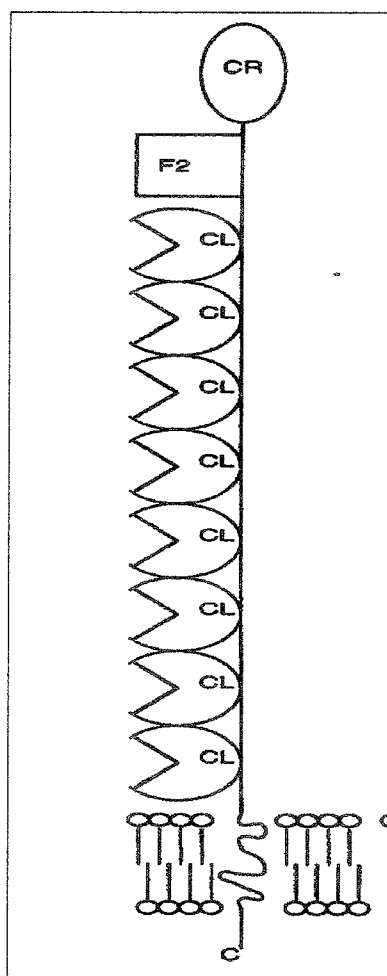


Figure 13: Représentation schématique du récepteur Mannose [122].

CL désigne un des huit domaines de type C-lectine; CR désigne la tête extramembranaire très riche en cystéines.

Le RM peut aussi phagocyter des antigènes mycobactériens solubles lipoglucidiques par voie endocyttaire [64]. La partie cytoplasmique du récepteur joue un rôle crucial dans la phase de l'internalisation mais on ne sait que peu de choses sur les signaux exacts qui dirigent l'ingestion. Apparemment, seule la polymérisation de l'actine serait requise pour la formation du phagosome issu du RM [2].

Le RM est capable de phagocyter les souches virulentes *M. tuberculosis Erdman*, ou *H37Rv*, mais pas la souche avirulente *H37Ra*. Il fut alors très séduisant d'attribuer à ce récepteur le pouvoir de discriminer les mycobactéries en fonction de leur virulence. Ainsi, le mécanisme bactérien permettant l'entrée, *via* le RM, dans les macrophages, représenterait un facteur majeur de virulence, en assurant la survie intracellulaire des bacilles internalisés de la sorte [64, 122, 236].

Malheureusement, le RM phagocyte également des mycobactéries apathogènes comme *M. phlei* ce qui compromet définitivement sa propriété sélective [5].

Parmi ses ligands potentiels, le récepteur mannose reconnaît préférentiellement les oligomannoses $\alpha(1-2)$ ramifiés, plutôt que linéaires. Chez *M. tuberculosis*, la liaison au récepteur se fait par l'intermédiaire du LAM pariétal, qui comporte des terminaisons de di-ou trimannosides $\alpha(1-2)$ [5, 122]. Chez toutes les mycobactéries appartenant au « Complexe tuberculosis », le LAM présente des résidus mannosylés terminaux mais avec des fréquences

variables allant de 40 à 70% des extrémités selon les espèces [155]. Il est probable que le LAM de la souche *H37Ra* se distingue soit par une conformation différente, soit par une fréquence insuffisante des terminaisons mannosylées pour se lier au RM efficacement. Enfin, le RM reconnaît et internalise *M. avium*, *M. smegmatis* et *M. phlei*, alors que les AraLAM de ces trois espèces sont pourtant théoriquement dépourvus de terminaisons mannose [5, 64, 90]. Il est donc possible qu'en plus des ligands identifiés plus haut, le récepteur Mannose soit capable de se lier à d'autres glycolipides pariétaux - par exemple le PIM- et que ces molécules soient peu ou pas représentées chez la souche *H37Ra* [5, 64].

Le récepteur Mannose ne discrimine donc pas les mycobactéries selon leur virulence, pas plus que la structure terminale du LAM n'est corrélée avec le pouvoir pathogène des bacilles [64].

Chez l'homme, contrairement à ce qui semble se passer chez la souris, la phagocytose des mycobactéries par le RM des macrophages ne déclenche apparemment pas directement l'activation de la NADPH oxydase, nécessaire à la synthèse des radicaux oxygénés [5]. Le récepteur Mannose est donc, au moins chez l'homme, une porte d'entrée semblant n'entraîner aucune conséquence nocive directe pour les bacilles.

Le récepteur Mannose est également présent à la surface des cellules dendritiques, où il est associé à une protéine supplémentaire, le marqueur DEC205, qui possède des domaines « lectine » multiples. Cette protéine permet aux cellules dendritiques de se lier encore plus fortement à des antigènes glucidiques, de les internaliser puis de les présenter plus efficacement [51, 61, 122].

Le RM est peu ou pas exprimé chez les monocytes circulants par comparaison aux macrophages tissulaires différenciés ou aux cellules dendritiques [64, 202].

◆ Rôle des protéines du surfactant pulmonaire et de leurs récepteurs :

Lorsque les mycobactéries parviennent au sein de l'espace alvéolaire, elles entrent potentiellement en contact avec le surfactant avant leur ingestion par les macrophages. Le surfactant pulmonaire, qui tapisse la surface des alvéoles est un complexe multimoléculaire hétérogène associant des protéines à des phospholipides.

Les protéines A et D du surfactant (SP-A et SP-D) sont deux collectines produites et sécrétées par les cellules épithéliales alvéolaires de type II et les cellules bronchiolaires non ciliées; elles existent chez tous les mammifères. Elles se lient aux glucides de façon calcium dépendante et jouent un rôle dans l'immunité non spécifique de l'arbre respiratoire. Ces protéines diffèrent par leur taille, leur structure tertiaire et leur action sur les pathogènes pulmonaires [40].

La protéine A est une glycoprotéine qui forme un complexe de 6 trimères semblable à un bouquet; elle est très étroitement liée aux phospholipides et est dix fois plus abondante dans le surfactant que la protéine D.

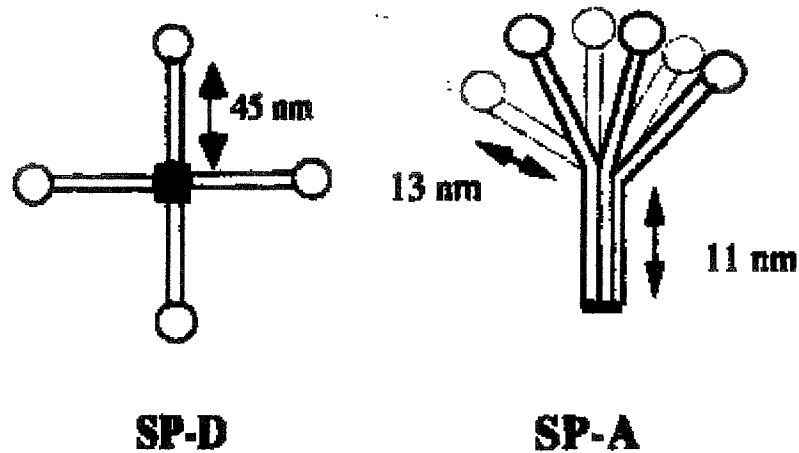


Figure 14: Représentation schématique des protéines du surfactant D et A [40].

Le carré noir symbolise le lieu de dimérisation NH2 terminal. Les tiges claires représentent les domaines collagène-like.

La protéine D est composée de 4 trimères assemblés en forme de croix ; son domaine de reconnaissance des glucides présente une forte affinité pour le mannose [71]. La protéine D se lie à *M. tuberculosis* de façon cation dépendante et saturable au niveau des terminaisons $\alpha(1-2)$ mannosylées du LAM pariétal. Elle entre ainsi directement en compétition avec le récepteur Mannose, qui reconnaît le même ligand de l'enveloppe mycobactérienne. La protéine D bloque ainsi l'accès et la liaison de la mycobactérie au RM. Aucun récepteur macrophagique reconnaissant la SP-D n'a été clairement identifié, la glycoprotéine gp340 du récepteur Scavenger restant un candidat potentiel.

La SP-D se comporte donc comme une « anti-opsonine », qui réduit, voire inhibe, l'attachement et la phagocytose des bacilles tuberculeux par le RM. La protéine D n'interagit que très faiblement avec l'AraLAM de *M. avium* auquel elle se lie par ses extrémités phosphatidylinositol, qui ne représentent que 10% des terminaisons de la macromolécule (76). La SP-D possède en outre la capacité d'agglutiner les bacilles de Koch, ce qui pourrait *in vivo* faciliter leur élimination par l'ascenseur mucociliaire [71].

La protéine A, quant à elle, se comporte comme une opsonine non spécifique : elle est reconnue par le récepteur macrophagique de la fraction du Complément C1q, avec laquelle elle partage de nombreuses similitudes structurales. La protéine A interagit également avec le récepteur transmembranaire SPR210 (pour Surfactant Protein Receptor 210) [2]. Les domaines lectine de la SP-A se lient aux molécules de mannose et de N-acétylglucosamine de la paroi mycobactérienne; cet ensemble s'attache alors au récepteur du C1q ou au récepteur SPR 210. Ainsi opsonisés par la protéine A, les bacilles sont ingérés par les macrophages alvéolaires au moyen d'un récepteur supplémentaire [201].

La protéine A pourrait aussi favoriser l'entrée des mycobactéries en stimulant l'expression membranaire du récepteur Mannose à la surface des macrophages [40, 64].

La SP-A joue également un rôle important dans la réponse phagocytaire microbicide faisant suite à l'ingestion de pathogènes, car elle limite, par sa fixation aux récepteurs du C1q et SPR, la production de dérivés nitrés et de radicaux libres oxygénés [154].

Protéger les tissus pulmonaires environnants en modérant la production de ces composés toxiques par les phagocytes infectés, est sans doute la fonction initiale de la protéine A. Elle réduit ainsi les conséquences néfastes découlant de l'activation des macrophages, bien qu'elle stimule par ailleurs cette activation en facilitant l'ingestion des microbes, étape nécessaire à la destruction ultérieure de ces derniers [64].

Ces deux fonctions, en théorie favorables à l'hôte, tournent à l'avantage des mycobactéries : la SP-A leur fournit une voie d'entrée supplémentaire au sein du phagocyte, qui est en fait pour les bacilles un abri intracellulaire peu ou non hostile [154].

Certaines études présentent des résultats apparemment divergents, où la protéine A augmente la destruction macrophagique des bacilles par une stimulation de la synthèse du monoxyde d'azote (NO). Ces résultats pourraient s'expliquer par des états d'activation des macrophages différents ou par un stade plus avancé de l'infection [2, 64].

Le rôle premier de la SP-A serait en fait de protéger l'organisme-hôte en assurant l'ingestion accrue des pathogènes par leur opsonisation, ingestion normalement suivie de leur destruction par les phagocytes. Mais il est possible qu'au stade chronique de l'infection, quand les macrophages sont activés pour produire le monoxyde d'azote et que la majorité des bacilles vivent en milieu intracellulaire, la protéine A intervienne alors pour limiter les dégâts tissulaires des radicaux nitrés, et favorise ainsi malencontreusement, une fois encore, la survie des mycobactéries [64].

♦ Le récepteur « Scavenger » de classe A et autres récepteurs de l'apoptose :

Après le blocage *in vitro* de l'accès de *M. tuberculosis* aux trois récepteurs du Complément et au récepteur mannose, les mycobactéries sont encore capables de pénétrer dans les macrophages. Si on empêche en plus l'accès des bacilles aux récepteurs Scavenger de classe A, on supprime alors quasiment toute liaison entre les bacilles et la cellule phagocytaire. Cela démontre l'importance, au moins quantitative des récepteurs Scavenger [236].

Scavenger signifie « piègeur » ou « nécrophage » en anglais, car ces récepteurs jouent essentiellement un rôle dans la phagocytose des cellules ou des corps apoptotiques [2, 19, 64, 236].

Le récepteur Scavenger de classe A est une glycoprotéine homotrimérique qui reconnaît un ou des composants de surface mycobactériens, actuellement non identifiés, ce qui permet ensuite l'internalisation des bacilles. Par analogie avec les ligands endogènes du récepteur, on estime que les lipoprotéines et/ou les phospholipides pariétaux du bacille sont de sérieux candidats, la seule certitude étant que les résidus phosphatidylinositol mycobactériens (PI ou PIM) ne sont pas concernés [208].

Le récepteur CD14, qui participe également à la phagocytose des produits de l'apoptose, est capable de lier la partie glycosylée du LAM mycobactérien. Le CD14 fonctionne davantage comme un co-récepteur ou co-activateur de signaux de transduction car il ne possède pas de domaine intracytoplasmique. Il est incapable d'ingérer des particules. Le CD14 peut favoriser l'internalisation des mycobactéries en offrant un site d'ancrage supplémentaire avant leur entrée au niveau du récepteur phagocytaire proprement dit, ce qui est par exemple le cas avec le Scavenger ou le CR3 [61, 154, 208].

Comme ces récepteurs de l'apoptose interviennent initialement dans des mécanismes régulés de turn-over cellulaire sans menace particulière pour l'hôte, il est logique qu'ils ne soient pas couplés directement aux réponses inflammatoires des macrophages, ce qui serait inutilement nocif en l'absence de menace.

Ainsi la phagocytose, *via* les récepteurs Scavenger, semble en fait associée à l'inhibition de la libération par le macrophage de cytokines et chémokines pro-inflammatoires (comme le TNF α , l'Interleukine 8, ou la MCP-1). Cette inhibition est assurée par la synthèse et la libération par de TGF β et de prostaglandine PGE₂, qui sont des cytokines immunomodératrices générées lors de l'activation des récepteurs de l'apoptose [2].

Bien que relativement secondaires, comparés aux récepteurs du Complément et au récepteur Mannose, les récepteurs Scavenger représentent une porte d'entrée supplémentaire qui ne semble pas directement hostile aux mycobactéries.

◆ Rôle des récepteurs des protéines de la matrice extracellulaire :

Ces récepteurs font également partie de la famille des « intégrines » mais sont de type $\alpha\beta\gamma$, où γ est différent de 2. Ils sont présents sur les macrophages et les monocytes et peuvent favoriser l'ingestion des mycobactéries. Cette famille de récepteurs comprend de très nombreuses combinaisons possibles entre les 2 sous-unités α et β (avec $\beta = 3, 5, 6$ ou 8), ce qui les rend particulièrement difficiles à étudier. La matrice extracellulaire reconnue par ces récepteurs est composée de nombreuses protéines distinctes, comme le collagène, la fibronectine ou la vitronectine [2, 90]. Mais ces récepteurs reconnaissent également des molécules de la surface mycobactérienne qui présentent certaines similarités avec les protéines de la matrice cellulaire.

Les récepteurs de la fibronectine ($\alpha 5 \beta 1$), et de la vitronectine ($\alpha v \beta 3$), une fois stimulés par leur liaison aux mycobactéries, vont augmenter l'expression et l'activation des CR à la surface des monocytes et permettre ainsi une phagocytose plus efficace des bacilles [2, 64]. Par exemple, *M. avium* entre dans les monocytes grâce aux récepteurs de la fibronectine et de la vitronectine [64].

M. tuberculosis et *M. avium* ont aussi la capacité de se lier indirectement au récepteur de la fibronectine par l'intermédiaire d'une protéine de surface de 45/47 kDa, appelée FAP (pour Fibronectin Attachment Protein), une protéine qui est commune au genre *Mycobacterium* [14]. La délétion du gène *fap* entraîne la réduction marquée de l'adhérence des bacilles à la matrice extracellulaire, ce qui suggère l'intervention d'autres adhésines bactériennes comme les protéines GroEL 1 et 2, qui peuvent se lier directement à la fibronectine [134, 139]. *M. avium* peut aussi se fixer indirectement au récepteur de la vitronectine du phagocyte *via* une protéine de 68 kDa, et cette liaison accroît l'expression membranaire du CR3. Un autre mécanisme de liaison indirecte des bacilles fait intervenir

d'autres protéines de la paroi bactérienne : par exemple, les composants A, B et C du complexe antigénique Ag 85 B s'attachent au récepteur $\alpha\beta 1$ par un pont intermédiaire de fibronectine [64].

En conclusion, les récepteurs de la matrice extracellulaire ne représentent pas forcément une nouvelle porte d'entrée pour les mycobactéries, à la surface des phagocytes, mais ils leur offrent la capacité d'adhérer très efficacement aux tissus infectés, ce qui facilite ainsi leur pénétration dans les cellules phagocytaires et non phagocytaires.

◆ Rôle du cholestérol membranaire :

Quel que soit le récepteur permettant l'ingestion des bacilles, l'efficacité de phagocytose est subordonnée à une étape préalable obligatoire qui consiste en la liaison minimum de la bactérie à ce récepteur, par l'intermédiaire du ou des ligands mycobactériens adéquats.

En plus des liaisons aux récepteurs phagocytaires, la mycobactérie interagit aussi avec le cholestérol membranaire des macrophages.

On constate effectivement, qu'après un traitement pharmacologique qui élimine le cholestérol de la membrane des phagocytes, les mycobactéries deviennent incapables d'entrer dans ces cellules. Cette inhibition de l'entrée, en l'absence de cholestérol, est un phénomène spécifique aux mycobactéries, car d'autres microorganismes continuent à pénétrer normalement dans les phagocytes traités.

Le cholestérol n'intervient pas dans le mécanisme de l'internalisation déclenché par le récepteur. Cela a été clairement démontré pour le CR3 : l'absence de cholestérol ne modifie aucune des fonctions du récepteur. Le cholestérol semble plutôt intervenir en tant que site d'arrimage nécessaire à la stabilisation des interactions bactérie-membrane plasmique du phagocyte, avant la liaison et l'internalisation du bacille par un récepteur de phagocytose spécifique [161].

Comme les mycobactéries se lient directement au cholestérol, il existe vraisemblablement un ou des composés pariétaux mycobactériens qui possèdent une grande affinité pour ce stérol. Ce ou ces composés de la paroi mycobactérienne ne seraient pas encore identifiés, à notre connaissance, mais ils représenteraient des cibles thérapeutiques idéales pour bloquer l'entrée des mycobactéries, dès la phase précoce de l'infection.

Le phosphatidylinositol, un phospholipide entrant dans la composition du PIM et du LAM pariétal, a montré très récemment des capacités à inhiber la liaison de *M. tuberculosis Erdman* aux macrophages, lorsqu'il est introduit au préalable dans le milieu extracellulaire des phagocytes. Ce phospholipide diminue de plus de 50% les interactions bacilles-macrophage, sans perturber l'internalisation d'autres particules.

Le phosphatidylinositol mycobactérien pourrait donc agir directement sur la membrane phagocytaire en s'y intégrant, et pourrait être un des composés permettant la liaison des bacilles au cholestérol. Mais ni son mode d'action exact, ni sa liaison effective au cholestérol n'ont été prouvés [208].

1.2. Entrée dans les cellules non phagocytaires de l'espace alvéolaire :

Suite à leur inhalation, les gouttelettes infectieuses se déposent à la surface des alvéoles ; les mycobactéries sont alors potentiellement en contact avec des cellules pulmonaires non phagocytaires. Leur capacité à pénétrer à l'intérieur de ces cellules a surtout été étudiée *in vitro*.

♦ Colonisation des pneumocytes :

M. tuberculosis et *M. avium* sérovars 1 et 4 entrent sans difficulté dans les cellules alvéolaires épithéliales de type I et de type II cultivées en laboratoire. Les cellules de type II sont des cellules cuboïdes qui représentent 5 à 8 % de la surface alvéolaire ; elles sont spécialisées dans la synthèse des composés du surfactant pulmonaire mais peuvent également se différencier en cellules de type I pour reconstituer l'épithélium respiratoire [19]. La présence des bacilles à l'intérieur de ces cellules est détectée dès la deuxième heure faisant suite à leur mise en incubation.

Chez la souris, *M. tuberculosis* est également capable de pénétrer dans les cellules M du BALT, le tissu lymphoïde associé à l'appareil bronchoalvéolaire [64].

Les souches mycobactériennes avirulentes, comme *M. tuberculosis H37Ra*, peuvent y pénétrer et s'y multiplier, mais les souches virulentes comme *H37Rv* colonisent ces cellules épithéliales beaucoup plus efficacement. L'entrée de *M. tuberculosis H37Rv* est possible en l'absence de sérum mais elle est nettement plus efficace lorsque le sérum est présent dans le milieu extracellulaire [19]. L'invasion maximale des cellules épithéliales se fait à une température de 37°C et diminue significativement à 30°C. Cela suggère que le ou les facteurs de virulence impliqués dans la colonisation épithéliale sont, soit uniquement libérés, soit exprimés de façon optimale à la température interne de l'hôte homéotherme.

En bloquant les récepteurs « intégrines » épithéliaux pour la fibronectine et la vitronectine, l'adhésion et l'entrée des bacilles dans les cellules épithéliales sont inhibées à 80 %. Les protéines mycobactériennes de surface lient les composants de la matrice extracellulaire, (fibronectine, vitronectine, fibrinogène...) comme la protéine de 68 kDa ou la FAP de *M. avium* interviennent dans le mécanisme de liaison aux cellules [64, 90]. Au sein de l'arbre respiratoire, *M. avium* est capable d'adhérer au mucus de type fibreux, à l'épithélium cilié sain et à la matrice extracellulaire des zones où l'épithélium est lésé.

Or, la protéine FAP de *M. avium* n'intervient que dans sa liaison à des régions abîmées de l'épithélium [134]. D'autres protéines d'adhésion à la matrice extracellulaire sont impliquées dans l'adhésion du bacille au mucus respiratoire ainsi qu'à une matrice extracellulaire intacte, mais certaines de ces protéines ne sont exprimées que si le bacille est en position intracellulaire et non s'il est cultivé sur milieu synthétique : par exemple, Groel 1 et Groel 2 sont exprimées quand les mycobactéries sont cultivées au sein de macrophages [139].

Alors que l'internalisation de *M. avium* au sein de l'épithélium n'est dépendante que de la polymérisation des filaments d'actine, celle de *M. tuberculosis* requiert en plus celle des microtubules, suggérant, dans ce cas, l'existence d'au moins deux mécanismes d'entrée distincts. Une fois à l'intérieur des cellules, les mycobactéries se retrouvent groupées, parfois en très grand nombre, dans des vacuoles cytoplasmiques. Vingt-quatre heures après le début

de l'infection, la plupart des bactéries sont isolées dans de petits compartiments vacuolaires monobactériens [19, 56].

◆ Acquisition d'un phénotype bactérien « invasif » :

Le passage des mycobactéries dans les cellules épithéliales augmente leur virulence : les bactéries présentent ensuite une capacité accrue à envahir d'autres cellules, épithéliales ou phagocytaires. Le processus inverse est également vrai : une première internalisation par les phagocytes alvéolaires de *M. tuberculosis* augmente les propriétés colonisatrices et cytotoxiques du bacille vis-à-vis des cellules de l'épithélium respiratoire. De même, la croissance de *M. avium* à l'intérieur de macrophages augmente son efficacité pour envahir d'autres macrophages par des mécanismes indépendants des récepteurs du Complément [136].

Les souches virulentes, comme *M. tuberculosis Erdman* ou *CDC1551* provoquent la mort des cellules épithéliales colonisées, par un phénomène de nécrose et non d'apoptose alors que *M. smegmatis*, une espèce apathogène, pénètre efficacement dans l'épithélium sans présenter de pouvoirs nécrosants. Ce phénomène de nécrose serait soit directement déclenché par la bactérie virulente, soit initié par des produits mycobactériens synthétisés après son entrée dans la cellule [56].

Dans les conditions naturelles de l'infection, les mycobactéries tuberculeuses inhalées par un nouvel hôte présentent très probablement un phénotype invasif dès le tout début de sa primo-infection: en effet, comme ces bactéries sont expectorées à partir de granulomes transformés en cavernes chez le patient contagieux, les mycobactéries inhalées ont certainement déjà effectué au moins un passage intracellulaire, épithélial ou macrophagique chez ce patient contagieux [64].

L'acquisition préalable de ces capacités d'invasion et de destruction de l'épithélium facilite très probablement la progression de l'infection vers l'intérieur du poumon ; il pourrait permettre d'atteindre le courant sanguin, puisque l'épithélium alvéolaire constitue la seule barrière physique à en limiter l'accès. Les phagocytes rencontrés (macrophages alvéolaires ou monocytes) n'en seront que plus efficacement colonisés [56]. Ces propriétés peuvent expliquer en partie le potentiel des mycobactéries à disséminer et envahir d'autres tissus à partir du site primaire de l'infection [64].

L'expression du phénotype invasif repose sur des facteurs variés et complexes, résultant d'un métabolisme actif régulé lors de la croissance intracellulaire. La viabilité des bactéries est nécessaire à l'invasion de l'épithélium : les mycobactéries tuées sont capables d'adhérer aux cellules épithéliales mais seules les bactéries vivantes sont internalisées [64].

Malgré la difficile caractérisation de ces facteurs, qui échappent sans doute pour la plupart aux observations *in vitro*, certains des mécanismes d'adhésion commencent à être cernés.

M. tuberculosis produit par exemple des adhésines liant la laminine, qui lui permettent d'adhérer aux pneumocytes et aux macrophages humains [158]. Les molécules PIM facilitent également l'adhésion du bacille de Koch aux cellules endothéliales et aux fibroblastes [64, 90].

Un des facteurs génétiques permettant la pénétration des mycobactéries dans les cellules non phagocytaires a été étudié plus en détail : il s'agit du complexe génique « mce » pour « mammalian cell entry », un complexe discontinu qui comprend quatre gènes actifs chez *M.*

tuberculosis. L'activité du phénotype d'entrée a été attribuée à une région d'environ 630 bp située au sein de *mce1*. La même organisation génique est retrouvée chez *M. avium*. Le gène *mce3* fait défaut à *M. bovis BCG* et la délétion supplémentaire de *mce1* rend la bactérie incapable d'entrer dans les cellules épithéliales [64].

2. Contamination par voie digestive :

Avant l'instauration, en 1955 pour la France, de la pasteurisation obligatoire, la consommation de lait issu de bovins infectés était la cause la plus fréquente des formes cervico-faciales ganglionnaires et gastro-intestinales de la tuberculose humaine, notamment chez les enfants. Dans la grande majorité des cas, *M. bovis* était l'agent responsable de la zoonose, transmise soit par le lait de vaches mammites, soit par l'ingestion de viandes tuberculeuses de bovins présentant une forme disséminée ; l'infection par voie orale à *M. tuberculosis*, bien qu'exceptionnelle est néanmoins possible [161].

Dans les pays en voie de développement, la contamination humaine par voie digestive n'est pas rare : il est difficile de prendre des mesures sanitaires sur des troupeaux infectés de façon enzootique, éventuellement surcontaminés par les contacts étroits avec des humains très souvent atteints par la forme pulmonaire de la tuberculose, la maladie étant quasi-épidémique dans certains pays africains [24, 82, 84]. Enfin, la voie orale est considérée comme la porte d'entrée des mycobactéries opportunistes à l'origine des formes disséminées chez l'homme séropositif.

Pourtant, le devenir exact, au niveau cellulaire, des mycobactéries ingérées reste mal connu. Par exemple, les bacilles de Koch remontés par l'ascenseur muco-ciliaire puis déglutis, sont-ils réellement détruits dans le milieu gastrique ou peuvent-ils être à l'origine d'une contamination du tractus digestif ? On connaît mal les conséquences réelles du passage des mycobactéries dans l'estomac, où le pH luminal est proche de 2, chez les espèces carnivores et omnivores.

2.1. Résistance des mycobactéries au pH du milieu extérieur :

Si certaines mycobactéries saprophytes colonisent des sols ou des eaux à pH fortement acides de 3.5 à 4.3, *M. tuberculosis* est une mycobactérie la plus sensible à l'acidité : le bacille de Koch se multiplie à des pH compris entre 6.2 et 7.3, mais à pH=5 ou pH=8.4, sa croissance est très nettement ralentie. *M. avium* est capable de croître indifféremment à pH 6 comme à pH 7.

Les mycobactéries possèdent un mécanisme de régulation de leur pH interne, qui maintient ce dernier aux alentours de la neutralité. Ce mécanisme fait intervenir des protéines de membrane capables de transloquer des protons, mais aussi d'autres cations, comme K⁺ et Na⁺.

Ce mécanisme comporte néanmoins des limites car le pH interne ne peut descendre en deçà de 6.1, seuil où apparaît une chute rapide de la viabilité des bacilles. La différentielle de pH externe-interne n'est pas extensible. La différence maximale possible entre le pH externe et le pH interne mycobactérien varie très légèrement en fonction des espèces étudiées et elle est en général de deux unités de pH, la différence maximale enregistrée étant de 2.3 pour *M.*

smegmatis, qui est très résistante à l'acidité. A l'aide d'une pompe à protons ATPase, *M. tuberculosis* parvient à maintenir son pH interne proche de 7, dans l'intervalle [6.1-7.2], alors que le pH externe mesuré est de 5. Lors des échanges de cations, l'accumulation excessive d'ions comme K^+ peut avoir des effets non négligeables sur la viabilité des bactéries, en plus des effets délétères de l'acidification du cytoplasme. Plus le pH externe diminue, plus la demande en énergie des pompes membranaires ATPases est grande et cela limite d'autant l'anabolisme et donc les capacités de croissance du bacille.

Très récemment, l'implication d'ions Mg^{2+} dans la régulation du pH chez *M. tuberculosis* a été montrée sans que leur rôle exact soit découvert. Il est probable que le magnésium soit requis au niveau d'ATP synthétases Mg^{2+} dépendantes, enzymes qui génèrent de l'énergie intracellulaire [163].

Les mécanismes mis en lumière jusqu'à présent ne suffisent pas, malgré tout, à expliquer la survie des mycobactéries dans un milieu à pH très acide, comme l'estomac, alors que la réalité des contaminations par le lait ou la viande infectés, ou de contaminations expérimentales par voie orale chez les rongeurs de laboratoire ne fait aucun doute. Lors de ces expériences, les capacités de multiplication préservées des bacilles retrouvés dans les intestins suggèrent un impact apparemment très modéré de leur passage dans l'estomac, à lier peut-être à un temps de séjour trop bref pour avoir des conséquences notables [163].

2.2. Entrée de *M. avium* dans les cellules digestives de souris :

Le modèle murin est actuellement le plus utilisé pour simuler la contamination par voie orale à *M. avium* chez les personnes atteintes du SIDA, et en cerner les mécanismes.

Chez ces personnes, on trouve de très nombreux bacilles aviaires dans la muqueuse et la sous-muqueuse intestinales, juste avant qu'elles ne présentent le stade bactériémique de la mycobactériose ; cela suggère une colonisation intestinale préalable à l'infection systémique.

Lorsque des souris reçoivent par voie orale *M. avium* sérovar 1, 100% d'entre elles développent la forme disséminée de l'infection [177].

Contrairement à *M. bovis* BCG et de nombreux pathogènes digestifs qui colonisent le tractus intestinal en entrant dans les cellules M des plaques de Peyer, *M. avium* envahit majoritairement (à plus de 80%), les entérocytes par leur surface apicale, avec une prédilection pour les cellules épithéliales de l'iléon terminal [64]. Seuls 20% des bacilles entrent dans les cellules M ; chez des souris dépourvues de plaques de Peyer, 100% des bacilles colonisent sans problème les cellules épithéliales [177]. *M. avium* entre plus facilement dans les entérocytes lorsqu'elle est en phase de croissance active. *M. avium* envahit indistinctement les villosités et les cryptes de la muqueuse, qui présente un phénomène d'effacement aux sites de liaison avec la mycobactérie (voir figure ci-dessous).

On ne sait pas si ce phénomène d'effacement muqueux est induit, ni s'il est nécessaire pour exposer le ou les récepteurs membranaires permettant l'entrée du bacille dans les entérocytes. Le mécanisme d'entrée est en tous cas indépendant des récepteurs de type $\beta 1$ liant la fibronectine : les entérocytes, contrairement aux cellules M, n'expriment pas ces récepteurs. *M. avium* *intracellulare* est incapable d'envahir les cellules de l'épithélium intestinal. Deux gènes *invA* et *invB* codent, chez *M. avium* pour une protéine similaire structurellement à la protéine d'invasion entérocytaire p60 de *Listeria monocytogenes*. Cette protéine pourrait permettre la liaison du bacille à la muqueuse de l'intestin.

L'internalisation de la mycobactérie requiert la polymérisation de l'actine et active les petites GTPases de la famille « Rho ». *M. avium* est ensuite localisé à l'intérieur de vacuoles cytoplasmiques [177].

La mycobactérie semble capable de retarder son exposition à la réponse immunitaire de l'hôte. Elle parvient à inhiber la libération de chémokines comme IL-8 et RANTES, ce qui signifierait sa présence au système de défense. La bactérie peut même supprimer la sécrétion d'IL-8 déclenchée par un autre pathogène digestif co-infectant. Chez la souris, la réponse inflammatoire n'est induite qu'une semaine après l'ingestion de *M. avium*.

Après avoir séjourné 2 ou 3 jours dans l'entérocyte, *M. avium* exprime un phénotype invasif qui augmente sa pénétration dans les macrophages péritonéaux *via* les récepteurs CR et Mannose. Ce phénotype accroît en plus les capacités de survie intracellulaire du bacille [177].

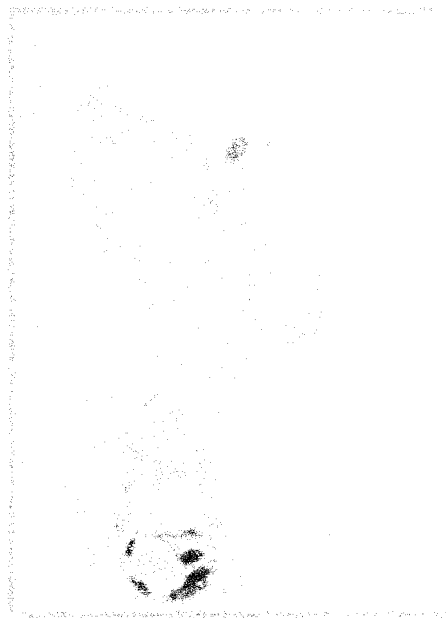


Figure 15: Pénétration de *M. avium* dans les entérocytes murins [177].

La flèche triangulaire montre un bacille aviaire (forme ovoïde) déclenchant le phénomène d'effacement de la muqueuse dans une zone villositaire de l'iléon.

II. LES EVENEMENTS CELLULAIRES NON SPECIFIQUES IMPLIQUANT LES PHAGOCYTES RESIDENTS INFECTES :

Outre l'ingestion des bacilles par les cellules phagocytaires, la réponse immunitaire non spécifique comprend théoriquement trois autres fonctions essentielles à la défense de l'hôte. Ces fonctions reposent chacune sur des aptitudes distinctes des phagocytes, et elles s'expriment sans doute de façon relativement synchrone *in vivo*, il s'agit de :

- la synthèse et la libération de médiateurs chimiques : les cytokines et chimiokines, qui permettent le recrutement et l'activation rapides, sur le site infectieux, de nouvelles cellules phagocytaires et lymphocytaires,
- la destruction, au sein des phagocytes, des pathogènes ingérés, par des mécanismes initiés ou stimulés par les médiateurs cités plus haut, sans requérir la reconnaissance d'antigènes présentés par les molécules du CMH ; l'éradication de l'infection au stade précoce est possible, mais le plus souvent l'infection est, au mieux, circonscrite.
- le traitement et la présentation d'antigènes à la surface des phagocytes spécialisés dans cette tâche, pour permettre le développement de la réponse immunitaire acquise.

Le traitement des antigènes s'effectue après la dégradation des bactéries par des enzymes hydrolytiques acides lysosomales, ce qui ne peut avoir lieu qu'au sein d'un phagosome préalablement transformé en phagolysosome acide. Cette transformation débute habituellement dès l'achèvement de l'internalisation des pathogènes.

Or, la phagocytose des mycobactéries par les récepteurs comme les CR ou le RM ne semble pas directement s'accompagner de déclenchements de mécanismes bactéricides. Les phagosomes néoformés qui contiennent *M. tuberculosis* et *M. avium* ne se transforment pas en vésicules acides et ne fusionnent pas avec les lysosomes : ces phagosomes particuliers offrent ainsi aux mycobactéries un refuge vacuolaire au sein duquel elles survivent et peuvent se multiplier activement de façon durable.

1. Blocage de la maturation du phagosome mycobactérien en phagolysosome :

Lorsque l'internalisation des pathogènes s'achève, l'actine F et la tubuline qui entouraient le phagosome naissant se dépolymérisent temporairement, laissant nue la membrane du phagosome néoformé ; cette membrane phagosomale possède alors toutes les caractéristiques de la membrane plasmique phagocytaire dont elle est directement issue [2].

La maturation du phagosome, produit de la voie endocyttaire, en phagolysosome est un processus dynamique très complexe qui comprend plusieurs étapes successives de fissions et fusions membranaires transitoires et incomplètes [2, 166]. Lors de ces étapes, des échanges partiels de contenus vacuolaires et de marqueurs membranaires ont lieu entre le phagosome et les différents organites du système endosomal primaire, puis secondaire ; ces échanges s'accompagnent d'une décroissance progressive du pH du phagosome en maturation, parallèlement au pH de plus en plus acide du contenu vacuolaire des organites rencontrés. On constate par ailleurs que les caractéristiques et les identités des divers organites qui fusionnent avec le phagosome sont préservées [2, 52, 72]. L'ultime étape de la maturation consiste en la fusion du phagosome avec les lysosomes (dont le pH interne est de 4.5-5), qui déversent leurs enzymes hydrolytiques activées par l'acidité du milieu ; les granules lysosomaux des phagocytes mononucléés comprennent, entre autres, des glycosidases, arylsulfatases, lysozyme, phosphatases acides etc ... [7, 53]. Mais les mécanismes exacts de l'activité

antimicrobienne de ces enzymes, tout comme ceux présidant à l'échange partiel des contenus vacuolaires, ne sont pas encore bien connus [2, 72].

La durée totale de la maturation du phagosome « classique » varie d'une vingtaine de minutes à deux heures, selon le contenu phagocyté et le récepteur à l'origine de l'internalisation [2, 74, 123].

Le phagosome qui héberge des mycobactéries aviaires et tuberculeuses *vivantes*, reste bloqué à un stade correspondant à une maturation de cinq minutes. Ce phagosome « mycobactérien » n'acquiert pas les marqueurs membranaires caractéristiques des lysosomes et semble pouvoir retenir indéfiniment à sa surface les marqueurs typiques d'un endosome primaire [52, 72, 166]. La capacité particulière de ces mycobactéries vivantes à bloquer sélectivement la transformation phagosomale a permis de mieux cerner les mécanismes qui orchestrent ces mouvements particuliers du flux membranaire [52, 145].

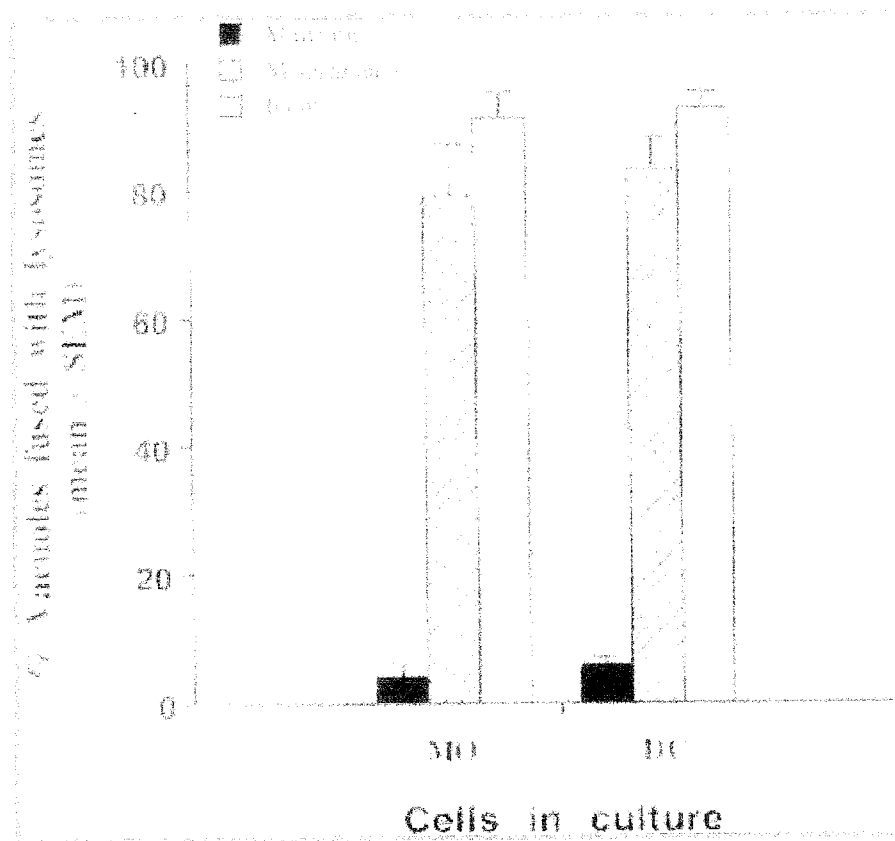


Figure 16: Comparaison de la fusion phagolysosomale chez des CPA infectées par *M. avium*, *M. smegmatis* ou par *Escherichia coli* [136]. Cellules en culture : MO=monocytes, DC= cellules dendritiques. En ordonnée, pourcentage de vacuoles phagocytaires fusionnant avec les lysosomes.

1.1. Blocage sélectif du flux membranaire endosomal :

♦ Les effecteurs du modèle « KISS AND RUN » :

Proposé en 1994, ce modèle fait intervenir quatre familles distinctes de protéines pour régir et réguler les fusions séquentielles entre les différentes vésicules cytoplasmiques de la cellule phagocytaire ; l'expression imagée qui lui est associée (littéralement « la fuite après le baiser »), rend compte de l'aspect partiel et transitoire des contacts membranaires échangés.

1) Les protéines du cytosquelette. La maturation correcte du phagosome requiert l'intervention coordonnée de l'actine et de la tubuline du cytosquelette de la cellule phagocytaire [2]. La polymérisation de l'actine est nécessaire à l'acquisition immédiate des premiers marqueurs endosomaux de type primaire. Or, on constate que les phagosomes qui hébergent des bacilles *M. avium* vivants, virulents ou avirulents, montrent une désorganisation marquée du réseau des filaments d'actine, coïncidant avec l'acquisition nettement retardée des marqueurs endosomaux à la surface des phagosomes mycobactériens; la repolymérisation de l'actine déclenchée pharmacologiquement au sein des phagocytes infectés restaure immédiatement l'acquisition « classique » des marqueurs endosomaux [86].

Les petites GTPases « Rho » coordonnent les mouvements du cytosquelette au transport des membranes endosomales et permettent l'expression des fonctions du cytosquelette dans la motilité et la déformation du phagocyte et de ses organites. Des mutations dirigées des protéines « Rho » modifient la forme prise par les phagosomes « classiques » et mycobactériens sans altérer le recyclage des marqueurs endosomaux [166].

Enfin les interactions des membranes et du cytosquelette nécessitent l'intervention de protéines appartenant à la famille des Annexines, qui se lient aux phospholipides membranaires de façon calcium dépendante. Les annexines I, II, III et V sont associées en permanence au phagosome, mais sans l'annexine IV, qui se lie préférentiellement aux vacuoles à maturation plus avancée [2].

Ni la morphologie externe, ni les composants de la paroi des mycobactéries ne peuvent être à l'origine des interactions bloquant la maturation car les bactéries tuées par irradiation subissent une maturation et une dégradation lysosomales complètes [52, 72].

2) Les protéines du système SNARE. Le système de fusion membranaire SNARE fonctionne un peu comme un bouton-pression. Les récepteurs SNARE constituent le point d'amorçage de la zone de fusion entre la membrane phagosomale et la membrane de la vésicule endocytaire. Quand les deux types t- et v-SNARE sont apposés, ils s'accouplent très aisément et forment alors une structure appelée SNAREPIN, qui résulte de la fusion mécanique des deux bicouches phospholipidiques. Les t- et v-SNARE ont tendance à s'accoupler de façon spontanée, durable et surtout très stable, en libérant de l'énergie. Le NSF et la protéine α SNAP sont en fait des outils complémentaires qui permettent la séparation et le maintien à distance du t- et du v-SNARE lors des épisodes de fission membranaire et en dehors des étapes de fusion [52, 161].

3) Les GTPases Rab. Vu leur grande affinité spontanée les t- et v-SNARE ne doivent pas fusionner au hasard. Les petites GTPases « Rab » jouent un rôle majeur dans la régulation des fusions en limitant les phénomènes de fusions anarchiques et en évitant la désintégration ou au contraire la complète fusion des membranes impliquées.

Les protéines sont activées dès qu'elles se lient aux GTP membranaires. Elles agissent alors sur le site d'amarrage théorique des SNARE en déplaçant de façon appropriée des régulateurs négatifs qui empêchent l'association indésirable du t- et du v-SNARE.

L'hydrolyse des GTP par les « Rab » en guanine diphosphate + phosphate (GDP+P), fournit de l'énergie nécessaire à l'activité des « Rab »; après cette hydrolyse, les Rab perdent leur fonctionnalité [161, 166]. Rab5 orchestre l'endocytose des éléments externes et la fusion homotypique entre endosomes primaires ainsi que celle des endosomes primaires avec les phagosomes néoformés. Rab7 est localisée sur les membranes des endosomes secondaires et se retrouve recrutée sur les phagosomes matures.

4) Les protéines effectrices de Rab. Elles assurent l'activation, la stabilisation et le couplage des différentes GTPases Rab. L'une d'entre elles, la protéine EEA1 (pour early endosomal antigen1) permet de coupler le site d'amarrage vésiculaire avec le t-SNARE, NSF et l' α -SNAP des endosomes. La présence de EEA1 est nécessaire à l'obtention de complexes fonctionnels, obtention conditionnée par un assemblage correct des différents éléments qui composent ces complexes. L'association des t-SNARE, NSF et α -SNAP, gérée par EEA1, conduit à la formation de complexes fonctionnels oligomériques de grande taille permettant la fusion des organites [52].

◆ **Eviction dynamique des marqueurs tardifs sur les phagosomes mycobactériens :**

Les phagosomes qui contiennent *M. tuberculosis* et *M. avium* vivantes (que nous appellerons « phagosomes mycobactériens ») montrent un état de maturation bloqué entre les étapes contrôlées par Rab5 et celles par Rab7 ; aussi ces phagosomes présentent-ils une accumulation de protéines Rab5 sur leurs membranes alors que Rab7 n'y est jamais présent. Un ou des mécanismes en aval de Rab5 et en amont de Rab7 sont donc compromis par la phagocytose de mycobactéries vivantes. Les phagosomes « classiques » qui contiennent des mycobactéries tuées vont acquérir Rab5 de façon transitoire et seront capables de recruter Rab7 et d'autres marqueurs endosomaux secondaires à la surface de leurs membranes pour se transformer complètement en phagolysosomes [52, 161, 166].

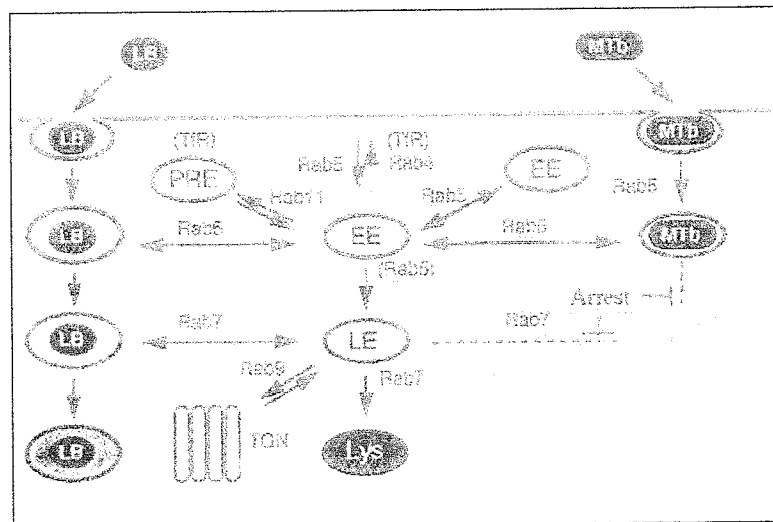


Figure 17: Acquisition comparée des protéines Rab entre le phagosome mycobactérien et le phagosome classique contenant des billes de latex (LB) [52]. EE= early endosome (endosome primaire), LE=late endosome (endosome secondaire), Lys=lysosome, TGN=trans Golgi Network (réseau transgolgien).

Marqueurs de la membrane phagosomale des :	Phagosomes mycobactériens contenant des bacilles vivants	Phagosomes classiques ou « modèles » contenant des bacilles tués = phagosomes matures
Annexines	I, II III et V	IV
t-SNARE : syntaxine 13 syntaxine 6	+ -	oui + 2, 3 et 4 +
v-SNARE: synaptobrevine cellubrevine	? +	I et II ?
Rab 5	+++ accumulation durable	+ présence transitoire
Rab 7	non	oui
Récepteur de la transferrine	+ (retenu)	-
Récepteur du mannose 6- phosphate	-	+
Procathepsine D (forme inactive) de la protéase acide	+	-
Cathepsine D mature (active)	- ou très peu	+
Molécules du CMH de classe I et II originaires de la membrane plasmique	oui	non
Molécules du CMH de classe I et II issues des endosomes secondaires	non, HLA-DR –	oui [166]
Molécules CD1 c	oui [204]	non [204]

Tableau 3: Comparaison des marqueurs membranaires à la surface des phagosomes mycobactériens et classiques d'après [52, 166, 204].

L'étude récente des effecteurs de Rab5 a permis d'approcher et de caractériser plus finement l'étape à partir de laquelle l'évolution du phagosome mycobactérien diverge de celle du phagosome contenant des bactéries inactivées.

La protéine EEA1 ne se fixe que sur les membranes d'organites de type endosomal primaire. Elle y est recrutée à la fois par Rab5 et par des produits de l'enzyme phosphatidylinositol 3-kinase (PI-3kinase), qui catalyse la phosphorylation de molécules phosphatidylinositol en phosphatidylinositol-3-phosphate. C'est le PI-3 phosphate qui recrute et se lie à EEA1. Les phagosomes mycobactériens expriment bien l'enzyme PI-3 kinase mais ne recrutent pas EEA1 à leur surface [74].

Les mycobactéries vivantes ont donc la capacité de bloquer : soit l'activation de la PI-3-kinase, soit l'obtention du produit normal de cette enzyme, ou encore de gêner l'accessibilité de EEA1 au phosphatidylinositol néoformé. Quelle que soit l'étape bloquée à

ce niveau, il en résulte l'absence de recrutement de EEA1 empêchant la poursuite de la maturation du phagosome [74].

Le ou les mécanismes mycobactériens aboutissant à cette absence de recrutement de EEA1 mettent en jeu le métabolisme actif de la bactérie et/ou des produits activement sécrétés. Il ne s'agit en tout cas pas de composés uniquement pariétaux, puisque les bacilles tués par irradiation en position intracellulaire n'empêchent pas la maturation phagosomale [166].

L'importance du métabolisme des lipides chez les mycobactéries fait de ces molécules et de leurs enzymes des candidats sérieux au blocage de la maturation phagosomale. De nombreux lipides mycobactériens, comme le cord factor ou les mycosides ont la capacité de s'immiscer et de s'insérer librement et passivement dans les bicouches lipidiques eucaryotes [74, 166]. Le ManLAM et des sulfolipides greffés sur des particules inertes préviennent respectivement de 40% le recrutement de EEA1 et de 34% la fusion avec les lysosomes à la surface des phagosomes [72, 74, 166]. Mais les lipides étudiés jusqu'à présent ne bloquent pas la maturation phagosomale aussi efficacement que les bacilles vivants [166].

◆ Acidification partielle des phagosomes mycobactériens :

Lors de sa formation à partir de la membrane plasmique du phagocyte, le phagosome naissant possède un pH identique à celui du cytoplasme cellulaire, c'est-à-dire proche de la neutralité, oscillant entre 6.9 et 8. Au fur et à mesure des fusions séquentielles de la maturation, le phagosome classique voit son pH décroître progressivement pour atteindre une valeur proche de 5, comparable à celui du pH intravacuolaire des lysosomes qui vont déverser leurs enzymes dans le phagosome lors de l'ultime fusion.

Les phagosomes des macrophages et des cellules dendritiques qui hébergent *M. tuberculosis* et *M. avium* vivantes, ne s'acidifient jamais de la sorte et gardent un pH interne aux alentours de 6.5-6.7, et jamais en dessous de 6.3, alors que les phagosomes contenant *M. smegmatis* ou *M. phlei* ont un pH interne de 5.4 à 5.6 [72, 136].

Les deux espèces de mycobactéries montrent des sensibilités différentes à l'acidité intraphagosomale ; *M. tuberculosis* est la plus sensible et sa croissance est ralentie en dessous de 6.3 alors que celle de *M. avium* n'est absolument pas influencée par une telle valeur de pH [81, 166].

Le recours aux techniques récentes de la microscopie électronique couplée à l'immunomarquage a permis de mettre en évidence ce qui est vraisemblablement le principal mécanisme d'acidification du phagosome en maturation. Son acidification est subordonnée à l'acquisition progressive sur sa membrane de pompes à protons ATPase vésiculaires. Les phagosomes mycobactériens ne possèdent que quelques rares exemplaires de cette pompe à protons, ce qui peut expliquer l'acidification très modérée de ces vacuoles. L'inhibition pharmacologique de ce petit nombre de pompes H⁺ ramène le pH à l'intérieur du phagosome mycobactérien à sa valeur initiale cytoplasmique neutre [52, 123].

Il existe par ailleurs d'autres pompes à protons sur la membrane phagosomale comme des échangeurs Na⁺/H⁺, mais elles sont d'une efficacité moindre et dépendent en outre de la concentration sodique du cytoplasme de la cellule phagocytaire [52, 163].

Les rares pompes à protons ATPases proviennent, soit de la membrane plasmique et /ou d'une acquisition très sélective depuis les endosomes du système endosomal secondaire. Le manque d'acidification apparaît comme une conséquence particulière mais essentielle de l'éviction dynamique qualitative et quantitative de marqueurs tardifs et du maintien, par les mycobactéries, d'un phagosome à l'état d'un endosome primaire, non acide, comme tout endosome primaire [161].

Les vésicules endosomales porteuses de la pompe à protons ATPase sont issues du réseau transgolgien qui exprime à sa surface le t-SNARE syntaxine 6. Or, cette syntaxine est présente sur les phagosomes classiques mais absente sur les phagosomes mycobactériens ; il se trouve que cette syntaxine interagit théoriquement avec EEA1 à la surface des phagosomes, ce qui pourrait expliquer son absence et celle des pompes à protons sur les phagosomes n'ayant pas recruté EEA1 [74].

Les mycobactéries peuvent intervenir sur le pH intraphagosomal par un autre moyen, qui semble également provoquer des perturbations dans le déroulement de la maturation.

In vitro, *M. tuberculosis* génère de grandes quantités d'ammoniaque, et on attribue à cette base faible la capacité du surnageant de culture mycobactérien à inhiber la fusion phagolysosomale. L'ammoniaque perturbe les mouvements saltatoires des lysosomes vers les phagosomes et parvient en plus à alcaliniser les vacuoles lysosomales ; le mécanisme d'action exact de l'ammoniaque responsable de cette inhibition est inconnu. Seule certitude : les propriétés alcalinisantes de l'ammoniaque ne sont pas en cause car d'autres bases n'ont aucun effet sur la maturation phagosomale [72].

◆ Rétention de la protéine TACO :

Cette protéine est une protéine d'enrobage ou protéine « manteau », qui entoure le phagosome naissant et que l'on ne retrouve pas sur les membranes des autres organites eucaryotes. « TACO » est l'abréviation de Tryptophane Aspartate Containing Coat ; ce polypeptide de 50 kDa est une coronine de type 1 (Cell Cortex Coronin 1). Sa fonction exacte n'est pas encore déterminée mais elle semble faciliter le déroulement de la phagocytose [166].

La protéine TACO est retenue spécifiquement et durablement à la surface des phagosomes renfermant des mycobactéries vivantes, alors qu'elle n'est détectée que transitoirement puis libérée dans le cytoplasme quand les bacilles phagocytés sont tués. Dans ce cas, la dissociation du phagosome classique s'effectue dans les deux heures qui suivent l'internalisation des bactéries tuées. Chez les phagocytes non infectés, la protéine TACO est associée au réseau de microtubules cytoplasmiques, puis elle se détache du réseau pour se lier au phagosome naissant lors de l'internalisation des bactéries [72].

Le mécanisme de rétention de la protéine TACO par les mycobactéries vivantes est un processus actif, qui est indépendant de l'acidification du phagosome : l'alcalinisation artificielle de phagosomes à bacilles tués ne peut empêcher la coronine de quitter la membrane phagosomale [72].

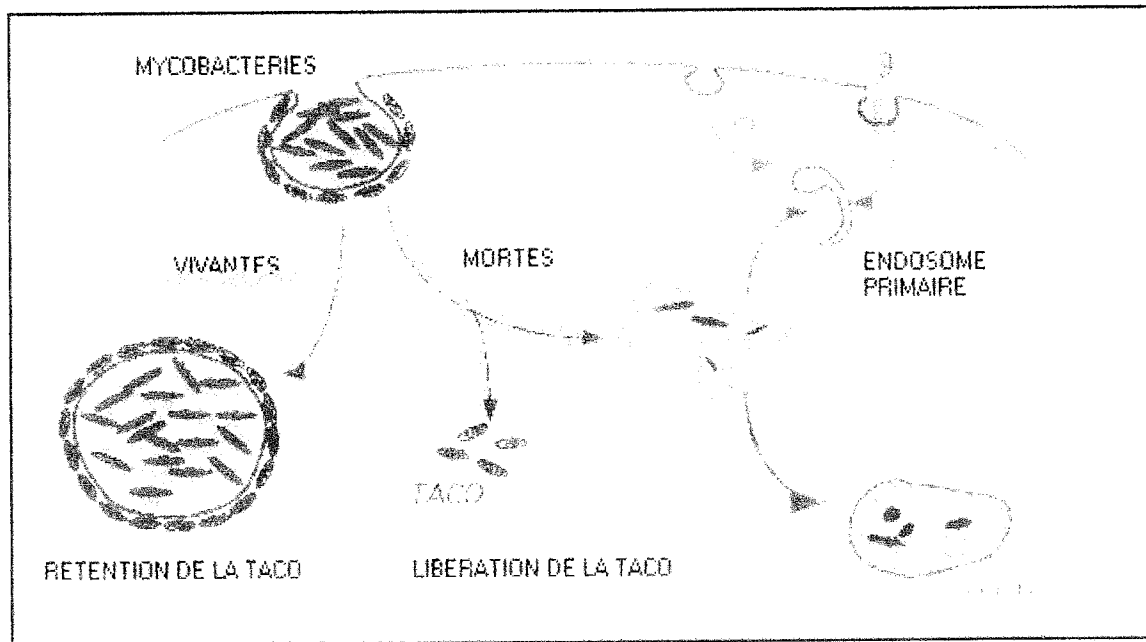


Figure 18: Rétention de la protéine TACO par les mycobactéries vivantes autour du phagosome naissant. D'après [161].

La présence de sites de liaison pour l'actine sur la TACO suggère que la coronine pourrait être un instrument de connexion entre le cytosquelette et le phagosome, auquel elle pourrait se lier *via* le cholestérol membranaire [72, 161, 166].

Une fois activement retenue par les mycobactéries vivantes, la coronine pourrait empêcher ou inhiber l'acquisition de certains marqueurs membranaires de la maturation phagosomale. Mais, en tous cas, elle ne bloque pas les phénomènes de fusion en général car les phagosomes mycobactériens enrobés acquièrent le matériel membranaire du réseau endocyttaire primaire sans problème [166].

Curieusement, les cellules de Kupffer, qui sont des macrophages résidents hépatiques spécialisés, n'expriment pas la protéine TACO. Or, le foie est considéré comme un organe relativement résistant à l'infection tuberculeuse, voire le siège privilégié de l'élimination efficace de *M. tuberculosis*. Au sein des cellules de Kupffer la destruction des mycobactéries semble être assurée par une maturation complète des phagosomes. La rétention de la protéine TACO est présentée par certains auteurs comme l'explication la plus simple de l'inhibition de la fusion phagolysosomale ; le mécanisme utilisé par les mycobactéries vivantes pour retenir activement cette protéine et les conséquences exactes de cette rétention sur le flux membranaire restent à découvrir [72, 161].

1.2. Blocage du signal calcique lié à la phagocytose :

Le calcium à l'état de cation divalent est un messager chimique d'une importance majeure dans le fonctionnement cellulaire et en particulier celui des cellules phagocytaires. Il joue un rôle de cofacteur indispensable dans les mouvements du cytosquelette, les fusions vésiculaires du flux membranaire [166]. Ce cation régule également diverses réponses

microbicides des phagocytes, telles la synthèse de médiateurs pro-inflammatoires, la sécrétion de granules cytotoxiques et les réactions chimiques de l'explosion respiratoire au sein des phagocytes [126].

Or, aucune élévation de la concentration intracytosolique calcique, que nous désignerons par « $[Ca^{2+}]_c$ », n'est enregistrée lors de l'internalisation de *M. tuberculosis* vivantes [125].

Par contre, la phagocytose de mycobactéries *mortes* s'accompagne d'une multiplication, (au minimum par trois et pouvant aller jusqu'à six), de la $[Ca^{2+}]_c$. Cette augmentation s'accompagne d'une maturation classique des phagosomes contenant les mycobactéries tuées.

M. tuberculosis est donc capable de bloquer le signal calcique déclenché par son ingestion. Ce blocage semble étroitement lié à l'inhibition de la maturation phagosomale. Il contribue à la survie des bacilles au sein du phagocyte résident. D'abord mis en évidence chez des bacilles avirulents (*M. tuberculosis H37Ra*, *BCG*), le pouvoir inhibiteur sur le flux calcique s'est trouvé confirmé pour des souches virulentes du bacille de Koch, et démontré chez la souris et l'homme [111, 126].

L'augmentation de $[Ca^{2+}]_c$ apparaît restreinte à chaque événement phagocytaire, c'est-à-dire comme un phénomène très localisé, spatialement circonscrit et spécifique à chaque phagosome en formation. Le blocage du signal calcique par les mycobactéries ne s'effectue que sur une petite superficie cytoplasmique restreinte à la zone périphagosomale concernée. Les autres signaux calcium-dépendants de la cellule sont préservés et fonctionnels, à l'exception, néanmoins, de signaux concernant les mécanismes antimicrobiens intraphagocytaires qui sont apparemment inhibés en même temps que la maturation phagosomale.

◆ Rôles de la calmoduline et de la kinase II dépendante de la calmoduline :

Certaines étapes situées en aval du flux calcique cytoplasmique ont très récemment permis d'entrevoir un lien possible entre le calcium, les protéines qui en dépendent, et les mécanismes de la maturation phagosomale.

La calmoduline (CaM) et la kinase II dépendante de la calmoduline (CaMKII) sont deux protéines dont le recrutement, l'activation et les fonctions à la surface des phagosomes sont directement tributaires de l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_c$. Ces protéines permettent la poursuite de la maturation phagosomale.

Lors de l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_c$, la calmoduline se lie aux ions calcium libérés dans le cytoplasme ; cette liaison entraîne l'activation de la protéine : elle subit un changement radical de conformation, qui révèle alors deux régions hydrophobes à sa surface. L'activation de la calmoduline provoque sa translocation du cytoplasme vers la membrane phagosomale. Une fois la calmoduline recrutée sur le phagosome, ses sites hydrophobes s'apparient à des domaines hydrophobes de protéines membranaires effectrices [126].

Une de ces protéines, la CaMKII, a montré très récemment son importance dans la régulation des fusions homologues endosomales.

La CaMKII est présente de façon stable sur les membranes de phagosomes. Dans un macrophage au repos, la CaMKII existe sous la forme d'un complexe oligomérique de 8 à 12 sous-unités qui auto-inhibe l'activité enzymatique de la kinase. Lorsque que la CaM- Ca^{2+} se

lie au complexe oligomérique, l'enzyme autophosphoryle ses sous-unités pour devenir une kinase phosphorylée active et fonctionnelle : la CaMKII-P.

On constate que les phagosomes mycobactériens ne possèdent que 20% de formes phosphorylées de la kinase à leur surface, alors qu'elles sont présentes à 84% sur les phagosomes renfermant des bacilles tués [126].

L'afflux calcique à partir des réserves intracellulaires apparaît donc comme le facteur déterminant qui signe l'origine des événements liés à la phagocytose dans la cellule macrophagique. L'activation et les effets de la calmoduline en sont totalement dépendants, ce qui rend la kinase II entièrement tributaire de l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_c$ (voir figure ci-dessous qui rappelle les étapes connues du signal calcique en aval du flux d'ions calcium en fonction de la viabilité initiale des mycobactéries phagocytées).

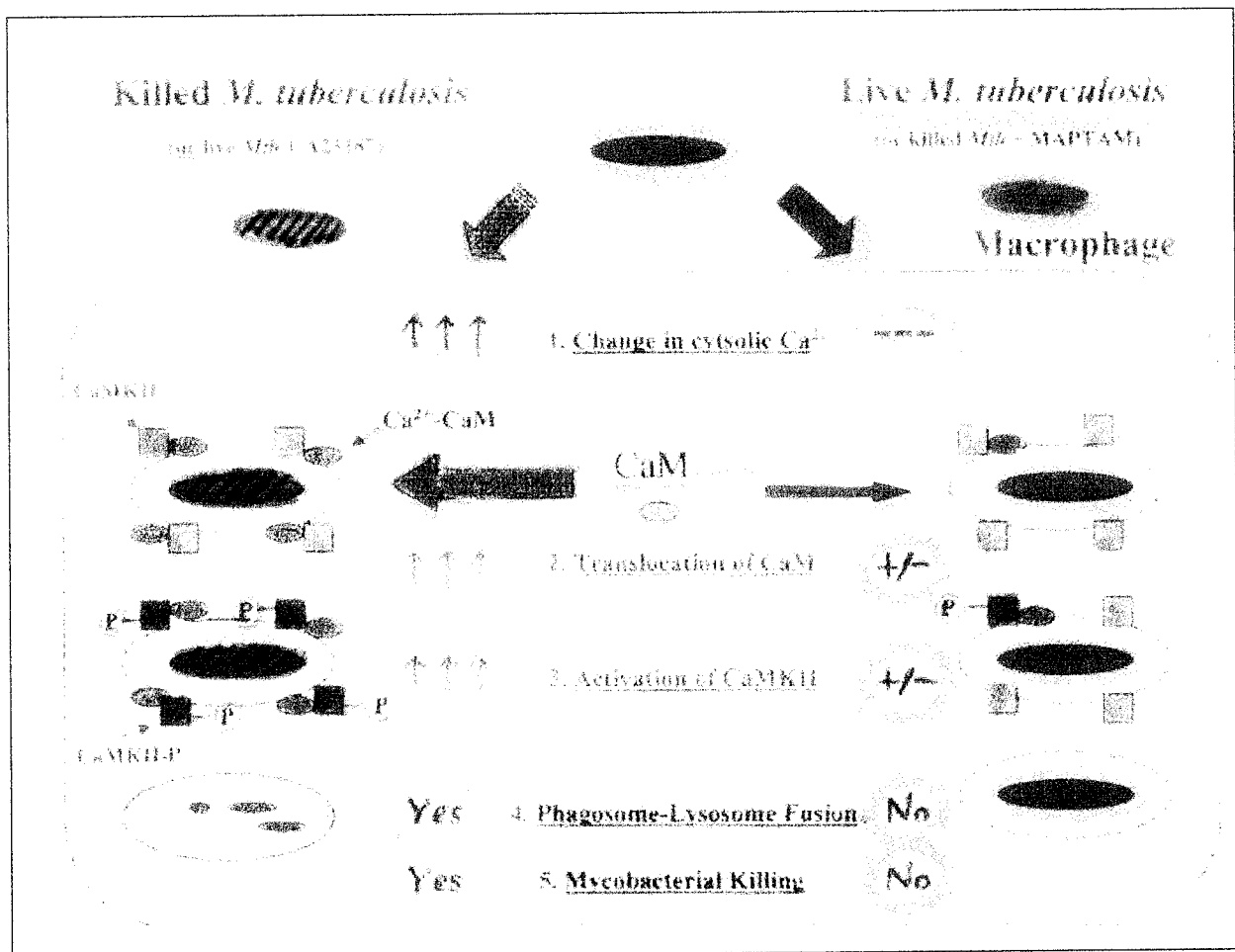


Figure 19: Devenir des mycobactéries en fonction du recrutement membranaire des protéines calcium-dépendantes [126]. Mycobactéries tuées : flux calcique cytosolique, translocation de la Calmoduline, activation de la CaMkinase, fusion phagolysosomale. Mycobactéries vivantes : blocage du flux calcique, pas ou peu de translocation de la CaM et d'activation de la CaMkinase, pas de fusion avec les lysosomes, survie des mycobactéries.

Les mécanismes exacts qui permettent à la calmoduline et à la kinase de réguler la maturation des phagosomes contenant des mycobactéries ne sont pas connus, mais des liens très intéressants entre les acteurs du signal calcique et du modèle « Kiss and Run » ont été mis en évidence. La calmoduline est capable d'activer la PI-3-kinase nécessaire au recrutement de EEA1 et la CaMKII peut phosphoryler certaines protéines t-SNARE et permettre les fusions membranaires [126].

♦ Facteurs mycobactériens inhibiteurs de Tyrosine kinases :

Le blocage de la maturation phagosomale fait intervenir un mécanisme actif, certainement immédiatement en amont de la libération des ions calcium hors du reticulum endoplasmique. Ce blocage agirait apparemment sur les événements précoces du signal de transduction des récepteurs d'internalisation [125].

Les voies du signal de la phagocytose sont loin d'être totalement élucidées : ces signaux sont polyfactoriels et font notamment appel au métabolisme de l'acide arachidonique et à la phosphorylation par des kinases de résidus aminés (tyrosine, sérine, thréonine...) au niveau des parties intracellulaires de récepteurs membranaires et d'autres substrats. Certaines de ces kinases interviennent dans le signal calcique. Parmi celles-ci, sont impliquées des Src tyrosine kinases, comme Syk qui initie notamment les signaux de transduction de la phagocytose macrophagique par les FcγR et que l'on trouve aussi chez les neutrophiles [2, 159].

Une autre tyrosine kinase, la kinase Hck, joue un rôle majeur dans la fusion phagosomale liée à la phagocytose chez les macrophages comme chez les polynucléaires neutrophiles. Lors de la fusion phagosomale déclenchée par la phagocytose, la Hck se transloque sur la membrane du phagosome naissant, ce qui induit l'activation de cette kinase. Sans activation de la Hck, la formation du phagolysosome est inhibée [159].

In vitro, la phagocytose par les neutrophiles humains de *M. tuberculosis* virulente, *M. tuberculosis* H 37Ra, *M. avium* et de *M. smegmatis* vivantes, s'accompagne également d'un blocage de la fusion phagolysosomale et d'une absence d'augmentation de la $[Ca^{2+}]_c$ [125, 159]. Le phagosome du neutrophile exprime des isoformes de protéines annexines différentes de celles présentes sur un phagosome baignant dans un cytosol dans lequel le flux calcique a effectivement lieu [126].

Chez les polynucléaires ayant phagocyté *M. smegmatis* vivantes, les fractions cytosoliques qui ont baigné les phagosomes mycobactériens (donc non fusionnels) transmettent la capacité à inhiber la fusion phagolysosomale à des phagosomes classiques, lorsque ces fractions de cytoplasme sont transférées dans les cytoplasmes de neutrophiles naïfs. Le contraire est également vrai : les phagosomes mycobactériens se mettent à fusionner avec les lysosomes si on les baigne dans des cytoplasmes ayant incubé avec des phagosomes fusionnels, ce qui mime l'effet de ionophores calciques.

Le blocage de la fusion phagosomale induit par les mycobactéries vivantes est un phénomène réversible qui repose sur la présence ou l'absence de substances présentes dans le cytosol au contact des phagosomes. Ce blocage mycobactérien mime parfaitement l'effet d'inhibiteurs spécifiques de la tyrosine kinase Hck.

En conclusion, la capacité des mycobactéries vivantes à inhiber la maturation phagosomale semble reposer sur un ou des facteurs solubles transférables, activement sécrétés

dans le cytosol [159]. Ces facteurs mycobactériens miment les effets de molécules inhibitrices du déstockage du calcium intracellulaire en agissant vraisemblablement sur des Src kinases impliquées dans des signaux de transduction, comprenant au moins le signal calcique. Ce dernier est lui-même directement ou indirectement lié au fonctionnement des GTPases et de leurs effecteurs qui orchestrent normalement les étapes du flux membranaire.

La libération de ces facteurs mycobactériens vers le cytoplasme de la cellule phagocytaire suggère par ailleurs une perméabilité au moins partielle de la bicouche membranaire du phagosome mycobactérien.

1.3. Perméabilité et porosité du phagosome mycobactérien :

Ayant ainsi déjoué l'un des tout premiers mécanismes de défense naturelle de l'hôte que constitue la digestion phagolysosomale, les mycobactéries se retrouvent dans un milieu liquidien maintenu à un pH clément, dont la valeur minimale oscille entre 6,3 et 6,5. Ce pH proche de la neutralité permet à *M. avium* et *M. tuberculosis* de se multiplier efficacement au sein des macrophages, tout en restant à l'abri d'éventuelles attaques provenant du milieu extracellulaire, comme celle du Complexe d'Attaque des Membranes du Complément.

Cette protection idéale conférée par les phagocytes aux mycobactéries est un point clef déterminant dans les possibles évolutions de l'infection mycobactérienne. Ayant ainsi détourné à leur seul profit les fonctions initiales des premières cellules immunitaires, les mycobactéries les transforment en petits chevaux de Troie...

La déplétion *in vivo* des macrophages alvéolaires chez des souris infectées par *M. tuberculosis* virulentes induit une très nette diminution de la croissance mycobactérienne au niveau pulmonaire. Cette déplétion semble en plus éviter la mort des souris infectées. Cela confirme l'impact négatif, sur l'hôte, de l'infection durable des phagocytes par les mycobactéries [117].

Selon la virulence de la souche bacillaire, la capacité de la mycobactérie à se multiplier varie et engendre des clones à comportement variable [128].

Dans les conditions les plus favorables aux bacilles, les deux premières semaines de la primo-infection constituent une phase d'intense reproduction au sein des cellules phagocytaires [45, 128]. Chez le cobaye, la multiplication active des bacilles durant cette période peut donner naissance à un foyer infectieux de 10 000 à 100 000 bacilles, avant la phase de décroissance amorcée avec l'avènement de la réponse spécifique [128].

C'est notamment durant cette phase de réplication intracellulaire précoce que *M. tuberculosis* et *M. avium* expriment les facteurs de virulence qui augmentent leurs pouvoirs d'infecter d'autres phagocytes ou de cellules épithéliales voisines [136].

Mais cette croissance active n'est possible que si les mycobactéries disposent des substrats nécessaires et en quantité suffisante à l'élaboration de leurs clones : ions, métaux cofacteurs essentiels d'enzymes mycobactériennes diverses, et nutriments porteurs des éléments constitutifs majeurs carbone, azote, oxygène etc... qui doivent être régulièrement renouvelés.

La perméabilité du phagosome mycobactérien aux éléments cytoplasmiques solubles est démontrée par la capacité des antibiotiques comme les aminosides administrés *in vitro*, à tuer

les bacilles intraphagosomaux. Les nutriments solubles issus du métabolisme de la cellule infectée permettent ainsi l'approvisionnement des bacilles *ad libitum* et sont utilisés pour les voies de synthèse mycobactériennes [202].

Malgré ses particularités membranaires, le phagosome mycobactérien n'est pas exclu du système endocyttaire environnant : le récepteur de la transferrine reste présent en permanence à sa surface et participe au métabolisme mycobactérien du fer, qui est essentiel [52, 111, 166, 202]. *M. tuberculosis* exprime en outre des protéines « hémoglobine-like » capteurs d'oxygène, et des « ferritine-like » qui retiennent le fer, car le phagosome est relativement pauvre en cet élément ; ces protéines accroissent la résistance des bacilles si ces éléments, comme le fer, se raréfient au sein du phagosome [42].

Le phagosome mycobactérien est également perméable à de plus grosses molécules, comme le Dextran de 70 kDa, et ce, de façon bi-directionnelle [159, 166]. Cette propriété est très certainement liée à la présence de pores dans la membrane phagosomale, pores visibles en microscopie électronique, chez les macrophages comme les cellules dendritiques infectés par *M. avium* et *M. tuberculosis* [136].

Ces mycobactéries sont capables d'exprimer une activité cytolitique contact-dépendante de type « hemolysine-like » attribuées aux phospholipases C, lipases et estérases codées au sein de leurs génômes [42, 141, 150, 196]. Ces mycobactéries seraient capables de lyser complètement la membrane phagosomale pour élire définitivement domicile dans le cytoplasme de la cellule phagocytaire [141]. Ces protéines lytiques sont sécrétées avec de nombreuses autres enzymes et protéines de virulence, dans l'environnement péri-bacillaire et peuvent ainsi se retrouver à l'extérieur du phagosome [42].

Des produits mycobactériens lipidiques sont également relargués en permanence dans le milieu phagosomal. Nombre d'entre eux, comme le LAM, les PIMx, sont capables, grâce à leurs portions acylées, de franchir librement les membranes eucaryotes pour gagner, soit le cytoplasme, soit des vacuoles endocytaires, voire le milieu extraphagocytaire ou l'intérieur d'une cellule phagocytaire naïve néorecrutée [14, 166, 202]. Outre la forme libre, les lipides mycobactériens peuvent aussi transiter sous une forme encapsulée appelée « exosome », qui peut contenir des cires, des lipides hétérogènes complexes ou des phospholipides polaires, qui franchissent ainsi aisément les bicouches lipidiques eucaryotes [166, 202].

Par sa perméabilité et sa porosité, le phagosome mycobactérien est ainsi le siège de flux entrants permettant la survie et la multiplication sans contrainte des bacilles internalisés et de flux sortants de diverses molécules protéiques et lipidiques, que nous envisagerons plus en détails dans le chapitre III.1.

Cette vacuole particulière est donc une source d'antigènes mycobactériens, sécrétés dans le cytoplasme, voire vers les cellules environnantes qui peuvent à leur tour réagir à l'infection.

2. Synthèse et libération de médiateurs cellulaires par les phagocytes résidents :

Au contact des mycobactéries ou de certains de leurs produits, les phagocytes résidents libèrent dans les heures qui suivent des cytokines variées.

Pour simplifier, distinguons trois catégories, non exclusives, de cytokines induites lors de l'infection mycobactérienne, mises en évidence *in vivo* et *in vitro*, chez l'homme et la souris :

- les cytokines dites pro-inflammatoires sont à l'origine des manifestations inflammatoires au niveau du site infectieux, caractérisées par l'œdème tissulaire et l'afflux de cellules ; il s'agit notamment du $TNF\alpha$, de l'IL-1, et de l'IL-6 et de dérivés de l'acide arachidonique comme certaines prostaglandines et leucotriènes... Ces cytokines sont également responsables de la synthèse secondaire de chimiokines qui orchestrent le recrutement cellulaire.

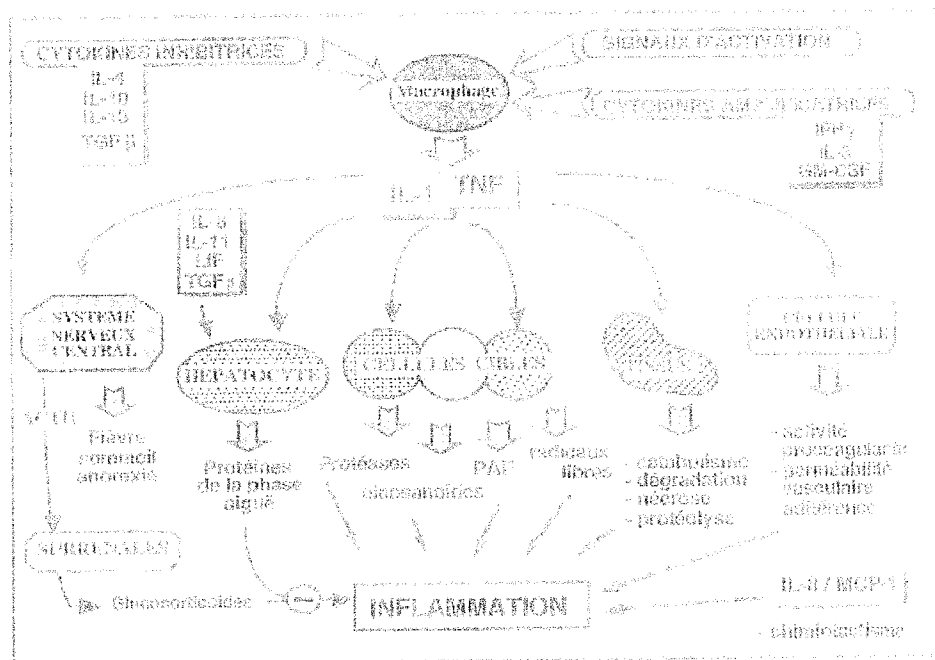


Figure 20: Participation des cytokines dans la réaction inflammatoire (In : Les cytokines, JM CAVAILLON, 1996, p 520).

- les cytokines activatrices déclenchent et activent les fonctions des leucocytes dans la phase innée et constitue le pilier de la réponse immunitaire protectrice spécifique, dite Th1 ou plus globalement de type 1 [72, 94]. Elles permettent l'expression des fonctions mycobactéricides des macrophages, des fonctions sécrétrices de d'autres cytokines et cytotoxiques des lymphocytes Natural Killer et des lymphocytes T spécifiques [230]. Ces cytokines activatrices majeures sont l'IL-12, l'IL-18, l'INF γ et le $TNF\alpha$ [90, 209].

- enfin, les cytokines immunomodulatrices sont théoriquement synthétisées en même temps que les cytokines activatrices afin de moduler leurs effets et de protéger les tissus environnants. Sont particulièrement importantes dans l'infection mycobactérienne l'IL-

10, l'IL-6, le TGF β , la prostaglandine PGE₂, l'IL-13 et l'IL-15. Certaines de ces interleukines sont aussi dites cytokines Th₂ ou de type 2 [209, 224, 230]. Si ces cytokines deviennent prééminentes, elles peuvent désorganiser la réponse protectrice, favoriser la survie et la dissémination des bacilles et concourir ainsi à la progression de l'infection. Cet équilibre fragile est essentiel et il pourrait être déstabilisé dès la phase précoce et déterminer le déroulement ultérieur de l'infection mycobactérienne [230].

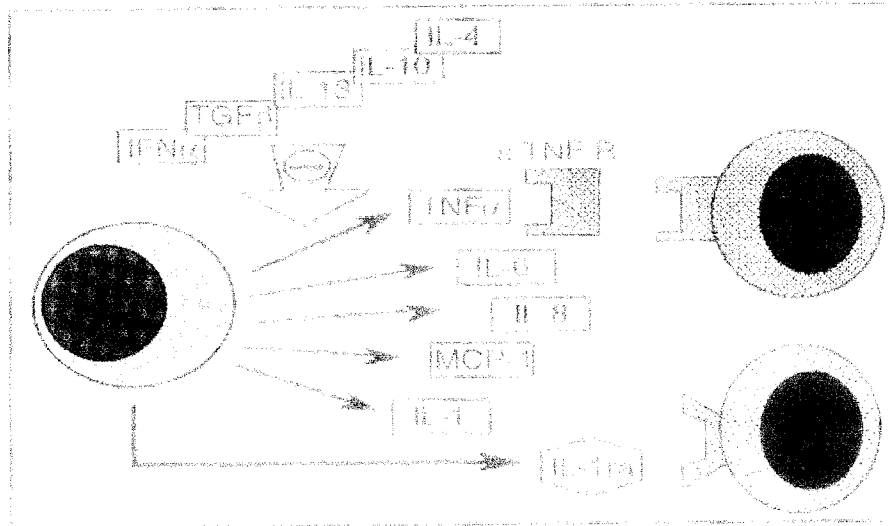


Figure 21: Mécanismes d'inhibition de la production de cytokines inflammatoires.

Synthèse de cytokines modératrices et de récepteurs « leurres » pour l'IL-1 et le TNF α . (In : Les cytokines, de JM CAVAILLON, 1996, Ed MASSON, p518).

2.1. A l'origine de la synthèse des cytokines, les récepteurs Toll-like :

Les récepteurs Toll-like (TLR) se sont révélés être les chaînons manquants essentiels dans la réaction immunitaire innée: ils font le lien entre les microorganismes infectieux ou leurs composants et la sécrétion de cytokines par les cellules eucaryotes de l'hôte, en particulier des cellules phagocytaires [131, 132, 142]. D'un point de vue structural, les TLR sont des protéines transmembranaires qui, une fois activées par leur ligand au niveau extracellulaire, génèrent un signal de transduction comprenant l'activation du facteur de transcription NF-kappaB. Ce facteur induit la transcription de nombreux gènes de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α , l'IL-1 β , l'IL-6, ou encore celui de la cytokine activatrice IL-12 [105, 142, 210].

On recense une dizaine de TLR distincts chez les mammifères. Certains TLR sont activement recrutés à la surface des phagosomes lors de l'internalisation des pathogènes et peuvent coopérer en s'associant par paires [105, 142]. Les TLR pourraient ainsi « sampler » leur contenu et identifier la nature du pathogène phagocyté [151, 159]. Le TLR2 et le TLR4 sont impliqués dans la réponse cytokinique des macrophages infectés par *M. tuberculosis* et *M. avium* et sont exclusivement présents sur les cellules de la lignée myélomonocytaire [132,

142]. Les bacilles *M. tuberculosis* H37Rv et H37Ra vivants stimulent à la fois le TLR2 et le TLR4 alors que *M. avium* n'interagit qu'avec le TLR2 [215]. Une fois tués par la chaleur, les bacilles deviennent incapables de stimuler le TLR4 alors qu'ils activent toujours le TLR2 [72, 131, 132]. L'éventail de ligands mycobactériens reconnus par le TLR4 semble donc plus restreint, mais l'importance du rôle qu'il joue dans la réponse protectrice *in vivo*, a été démontrée chez les souris génétiquement délétées pour ce récepteur, celles-ci étant beaucoup plus sensibles à l'infection mycobactérienne, même face à une souche atténuée comme le BCG [131].

La molécule d'AraLAM stimule la production de TNF α , en interagissant avec le TLR2, alors que le ManLAM n'active ni le TLR4 ni le TLR2 [132, 215].

D'autres composants pariétaux mycobactériens induisent la synthèse de TNF α par les macrophages *via* le TLR2:

- la fraction lipidique totale de *M. tuberculosis*,
- le mycolylarabinogalactane-peptidoglycane, qui correspond en fait à une coupe transversale dans l'épaisseur complète de la paroi, le peptidoglycane mycobactérien seul étant probablement le ou l'un des composants de base à réagir avec le TLR2, comme chez les bactéries gram +,
- des lipoprotéines spécifiques de membrane, comme les lipoprotéines 19 et 38 kDa qui permettent en plus la synthèse de l'IL-12 p40 *via* le même TLR2 [73, 131, 175, 215].

Le TLR2 reconnaît également des facteurs mycobactériens relargués dans le milieu de culture de bacilles vivants. Ces facteurs mycobactériens, insensibles à la chaleur et de nature non protéique [132], comme le STF (Soluble Tuberculosis Factor), sont sécrétés dans le milieu extracellulaire par des bacilles vivants de *M. tuberculosis*. Le PIM de 6kDa et le PIM2 ont été identifiés comme des fractions du STF qui stimulent le TLR2 et induisent ainsi la synthèse de TNF α [105].

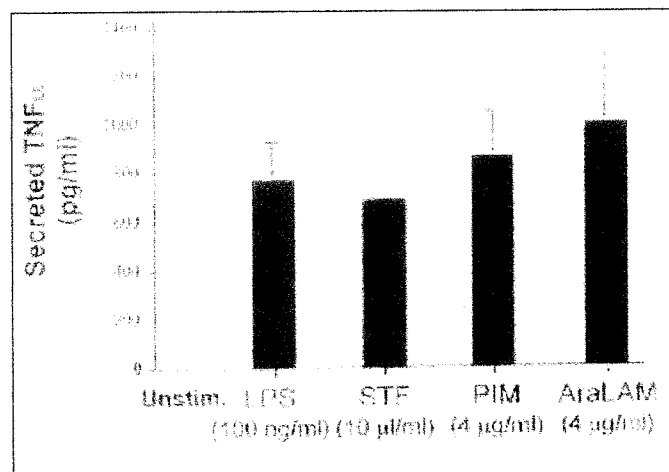


Figure 22: Sécrétion de TNF par les macrophages murins stimulés par diverses fractions mycobactériennes [105]. Comparaison avec le lipopolysaccharide des bactéries gram négatif.

L'AraLAM, le STF et les PIM sont également capables d'induire la transcription du gène de l'IL-1 β , mais cette transcription n'est pas suivie de traduction [105].

Les lipoprotéines mycobactériennes activeraient aussi le promoteur du gène de la Nitric Oxyde Synthétase inductible de type 2, toujours *via* le TLR2 [73, 215].

L'implication de nombreux autres TLR reste sans doute à découvrir dans la réponse cytokinique des macrophages infectés ou en contact avec des produits mycobactériens. Leur collaboration avec des récepteurs de la phagocytose, comme le CR3, n'a pas été mise en évidence jusqu'à présent, alors que cette hypothèse est une alternative à la coopération des TLR au niveau phagosomal, qui, elle, reste néanmoins à confirmer pour les mycobactéries.

L'expression des TLR à la surface des phagocytes *in vivo* et en fonction de leur état d'activation, ou au sein de lésions évolutives comme les granulomes reste également à déterminer [72].

2.2. Libération de cytokines activatrices par les phagocytes :

Les cytokines activatrices majeures de la réponse anti-tuberculeuse, IL-12, IL-18, TNF α et l'IFN γ , sont à la fois à l'origine de l'activation de macrophages ou de lymphocytes NK et de l'orientation de la réponse en cytokines des lymphocytes T spécifiques. Elles peuvent déclencher certains mécanismes bactéricides au sein des cellules phagocytaires. Ces cytokines sont ainsi un lien important entre les réponses immunitaires innées et acquises.

L'IL-12. Les mycobactéries sont puissamment inductrices d'IL-12 et ce, dans les huit heures qui suivent le début de l'infection L'IL-12 est sécrétée majoritairement par les cellules dendritiques présentes dans les zones T ganglionnaires et splénique, et par les cellules macrophagiques en contact avec des composés mycobactériens. [47, 72]. L'importance fonctionnelle de cette cytokine a été démontrée par les études réalisées sur des souris génétiquement délétées pour les gènes de l'IL-12 p40 ou pour le récepteur de la cytokine IL-12R, ou encore par l'étude de personnes présentant des déficits congénitaux au niveau de ces deux gènes. Les souris et personnes concernées se révèlent extrêmement sensibles aux infections mycobactériennes. Les personnes atteintes développent des BCGites disséminées qui peuvent être très graves chez les enfants vaccinés. Les souris mutées présentent une morbidité accrue et une multiplication bacillaire très intense de cent à quatre cents fois supérieure à celle mesurée chez leurs congénères sauvages [181].

L'IL-12 a pour action principale de stimuler la sécrétion de l'IFN gamma, cytokine essentielle dans la protection de l'hôte infecté, et stimuler celle de TNF α chez les cellules paracrines infectées ou naïves. Chez les lymphocytes Natural Killer, l'IL-12 entraîne également la sécrétion de GM-CSF, qui contribue, en retour à une activation partielle des macrophages environnants [46, 181, 203].

L'IL-18, est produite essentiellement par les macrophages sensibilisés aux mycobactéries vivantes ou aux fragments de bacilles. Son rôle principal mime celui de l'IL-12 : l'IL-18 induit la production d'IFN γ par les cellules NK et les lymphocytes Th1 de la réponse spécifique. Cette cytokine augmente aussi l'expression du ligand de Fas à la surface des lymphocytes NK [181]. L'IL-18 est notamment sécrétée au niveau des portes d'entrée des bacilles que sont les macrophages alvéolaires et les cellules épithéliales intestinales [203]. La délétion génétique de l'IL-18R chez la souris infectée provoque l'amoindrissement de l'activité cytolytique des NK et de leur production d'IFN γ [181, 203]. Les deux cytokines inductrices d'IFN γ sont libérées en bien moindres quantités quand les cellules phagocytaires

sont stimulées par des bacilles morts, ce qui pourrait être une des explications à l'inefficacité d'un vaccin utilisant du BCG tué [51].

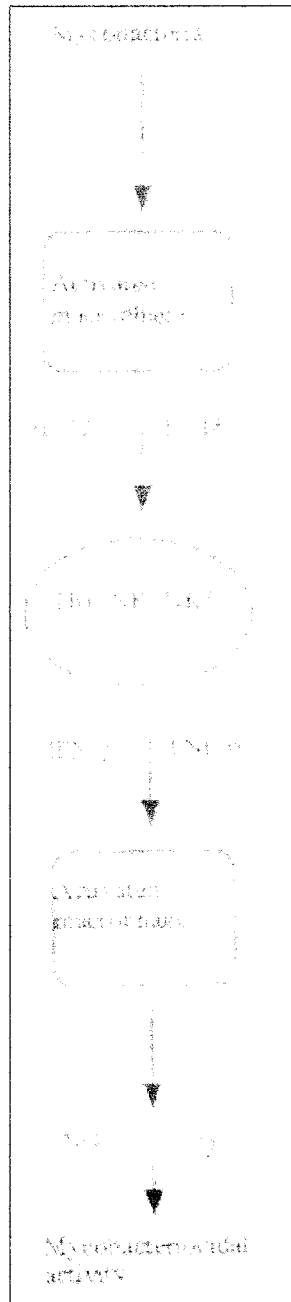


Figure 23: Rôles physiologiques de l'IL-12 et de l'IL-18 [203]. Activation des macrophages et déclenchement indirect de leurs fonctions mycobactéricides.

Le $\text{TNF}\alpha$ sécrété par les phagocytes permet l'activation et la migration des cellules dendritiques et macrophagiques de façon paracrine et autocrine lors de l'infection mycobactérienne ; il stimule également indirectement par le biais du récepteur CD40 la production d'IL-12 ; le TNF est une cytokine précurseur et facilitateur de la réponse spécifique de type Th1 [51]. Les souris délétées génétiquement pour le TNF ou pour son récepteur TNFRp55 montrent une réponse anti-mycobactérienne nettement retardée,

notamment par une mauvaise contention précoce de la multiplication bacillaire ; ceci entraîne une mort rapide des animaux après une augmentation massive de la charge bactérienne. Cette cytokine est absolument nécessaire dans la phase précoce de l'infection [46, 72, 94].

L'IFN γ . Les macrophages murins et humains infectés sont également capables de libérer de l'IFN γ , alors que l'on croyait cette propriété réservée aux cellules lymphocytaires [30, 70, 225]. Mais contrairement à la synthèse de TNF, qui se fait spontanément en présence des seules mycobactéries, la sécrétion d'IFN requiert, en plus des bacilles, une activation prolongée des macrophages producteurs par l'IL-12 [70].

Au sein des macrophages infectés par *M. tuberculosis* virulentes, la transcription de l'IFN γ est associée à une baisse de l'expression des gènes mycobactériens sans effet notable observé en terme de croissance bacillaire [30].

Le macrophage est ainsi capable de libérer les cytokines activatrices fonctionnelles d'une réponse de type 1 ; cette cellule est potentiellement un régulateur positif (voire un auto-régulateur), d'une réponse immunitaire protectrice mais ces capacités sont apparemment qualitativement ou quantitativement insuffisantes à éradiquer l'infection dans sa phase précoce, chez les personnes développant la maladie.

2.3. Modération de la réponse cytokinique de type 1 par les souches mycobactériennes virulentes :

M. tuberculosis et certaines souches «smooth» de *M. avium* se distinguent par une production moindre, voire dans certaines conditions, par une inhibition de la production, de TNF α et par leur capacité à induire chez les cellules phagocytaires présentatrices d'antigènes une synthèse accrue de cytokines immunomodératrices comme la PGE2, l'IL-6 et en particulier l'IL-10, l'IL-4 et le TGF β [224, 230]. Cette dernière cytokine, tout comme l'IL-10 et l'IL-4, contrecarre la synthèse et les effets du TNF, de l'IL-12 de l'IFN γ , mais également ceux de l'IL-2, qui est nécessaire à l'expansion clonale des lymphocytes naturels et sensibilisés aux antigènes mycobactériens. La PGE2 inhibe la synthèse de l'IFN γ par les cellules macrophagiques, dendritiques et les monocytes sanguins [224].

La virulence d'une espèce ou d'une souche mycobactérienne est inversement corrélée à sa capacité à induire la production de cytokines pro-inflammatoires. Si ces différences sont très probablement initiées dès le début de la réponse macrophagique innée, les conséquences en terme de multiplication bacillaire et de temps de survie des souris infectées ne deviennent néanmoins perceptibles que plus tard dans le déroulement de l'infection.

Certains antigènes pariétaux sont notamment à l'origine de ces synthèses préférentielles de cytokines « anti-inflammatoires ». Par exemple la molécule de ManLAM de *M. tuberculosis* est bien moins immunostimulante que celle d'AraLAM de *M. avium*. Les capping « mannose » recouvrent les terminaisons arabinofuranosyl, qui sont biologiquement actives, et interagissent avec les TLR2, d'où une synthèse plus faible de TNF α et d'IL-12 [224].

Il semble également y avoir des variations entre les LAM des différentes espèces ou souches et le pouvoir pathogène de celles-ci : le Man LAM du BCG, par exemple, n'est pas

aussi « immunosuppresseur » que celui produit par des souches virulentes de *M. tuberculosis* [38, 51, 202].

CYTOKINES PRODUITES :	STIMULATION DES MACROPHAGES PAR :	
	AraLAM de <i>M. avium</i>	ManLAM de <i>M. tuberculosis</i>
TNF α	+++	+ à +/-
IL-12	+++	+ ou -
IL-1	+	+ [46]
IL-6	+	++
IL-10	+	++ [224]
IL-4	+	++
TGF β	+ à ++ [90]	++ [90]

Tableau 4: Comparaison des pouvoirs inducteurs de cytokines du ManLAM et de l'AraLAM [38].

Le ManLAM peut être synthétisé et libéré en permanence par les mycobactéries abritées dans les phagosomes des cellules phagocytaires ; il peut également être exporté *via* les exosomes avec d'autres antigènes glycolipidiques comme le TDM ou les PIM, et modifier ainsi la balance de cytokines sécrétées par des cellules naïves néorecrutées. Ces cellules pourraient être de la sorte « préconditionnées » à modérer une réponse de type 1 innée, voire à favoriser le développement de la maladie sans passer par une phase de latence prolongée. Ce cas de figure pourrait ainsi correspondre aux personnes cliniquement atteintes dans l'année suivant la primo-infection, ce qui reste à démontrer *in vivo* [230].

2.4. Libération de chimiokines et recrutement cellulaire :

Les principales chimiokines sécrétées par les cellules mononuclées lors de l'infection mycobactérienne chez l'homme sont présentées dans le tableau ci-après.

Elles sont sécrétées, soit de façon autocrine, soit de façon paracrine en réponse aux cytokines pro-inflammatoires présentes sur le site inflammatoire initial. Les chimiokines agissent de façon dose dépendante et la concentration optimale pour attirer les cellules est tributaire de nombreux facteurs [72].

Type de chimio-cytokine	Sources de l'infection ¹	Cellules cibles ²
<i>CXC chemokines</i>		
MIP-1 α	M, E, N, P	M, T, E, P
MIP-1 β	M, T, E	M, E
MCP-1, 2, 3	M, T, E	M, T, E, P
RANTES	M, E, P	M, T, E, P
<i>CXC chemokines</i>		
IL-8	M, E, N, P	N, E, E, N, P
IP-10	M, E, P	M, E

¹ M: macrocytes/alveolar macrophages; N: neutrophils; E: endothelial cells; T: T lymphocytes; P: epithelial cells; M, P: alveolar macrophages; S: splenic macrophages; Ba: basophils; E: eosinophils; NK: natural killer cell; L: lymphocytes.

Tableau 5: Chimio-cytokines impliquées dans le recrutement cellulaire lors d'infection générant une HSR chez l'homme [205].

Rôle des co- inducteurs endogènes. Le TNF α et l'IL-1 sont des inducteurs majeurs et puissants de la synthèse de ces chimio-cytokines par les cellules du foyer infectieux mycobactérien [165]. L'IL-12 participe au recrutement de monocytes en stimulant la quantité de chimio-cytokines de type β ou C-C chimio-cytokines, qui attirent préférentiellement les cellules de la lignée monocyttaire [46]. Il semble que l'IL-1 induise plus particulièrement la synthèse de chimio-cytokines dévolues au recrutement de polynucléaires neutrophiles en réponse aux mycobactéries [106].

Très rapidement, deux heures après le début de l'infection à *M. tuberculosis* chez la souris, on assiste à la transcription des gènes des chimio-cytokines MIP-2, IP-10, MCP-1 et MIP-1 α . D'autres études *in vivo* révèlent que *M. tuberculosis* induit la synthèse de RANTES, MCP-3 et 5. Chez l'homme, on retrouve les mêmes chimio-cytokines, à l'exception de MIP-2. Au contact des mycobactéries, les cellules dendritiques s'activent de façon autocrine grâce aux elles synthétisent alors des chimio-cytokines comme MIP-1, et MCP-3 et MIP-2 [51].

En modérant la libération de TNF α et d'IL-1, les prostaglandines PGE2, et les cytokines TGF et IL-10 pourraient amoindrir le recrutement cellulaire. Pourtant, selon certains auteurs, la sécrétion de chimio-cytokines varierait peu en fonction de la virulence des souches de *M. tuberculosis* [72].

En plus des phagocytes, le TNF et l'IL-1 activent les cellules des tissus environnants comme les cellules épithéliales pulmonaires, les fibroblastes et les cellules endothéliales, qui sécrètent en retour de grandes quantités de chimio-cytokines. Le profil de chimio-cytokines sécrétées par les cellules cibles du TNF varie selon leur nature, leur degré de maturation et d'activation [51].

Induction de chimio-cytokines par les composants mycobactériens. Les macrophages humains stimulés par le LAM de *M. tuberculosis H37Rv* induisent la libération des chimio-cytokines IL-8, MIP-1 et MCP-1 *in vitro* [72]. Chez la souris, le LAM administré par aérosol, déclenche la synthèse de chimio-cytokines de type CXC, MIP-2 et KC, qui provoquent un afflux majeur de polynucléaires neutrophiles au niveau pulmonaire.

Il semble que le LAM induise la synthèse endogène d'IL-1 par les macrophages alvéolaires, qui sont ensuite autostimulés pour produire du TNF α et de l'IL-1 en plus grande quantité. L'IL-1 est un inducteur majeur de l'accumulation de neutrophiles dans l'inflammation tuberculeuse pulmonaire, et les polynucléaires recrutés sont eux-même une source d'IL-1. Ce mécanisme de double stimulation par ces deux cytokines pro-inflammatoires expliquerait ainsi l'inhibition incomplète de la sécrétion de chimiokines causée par l'inactivation du TNF ou celle de l'IL-1R [106].

Le ManLAM apparaît initialement comme une molécule inflammatoire et donc comme un signal envoyé au système de défense immunitaire. Le LAM conduit préférentiellement à la libération de chimiokines recrutant plutôt des PNN que des cellules mononucléées ; cet aspect « inflammatoire » du LAM, que l'on pourrait *a priori* estimer favorable à l'hôte, se révèle être en fait un facteur de virulence, car néfaste pour l'hôte sur un plus long terme.

L'AraLAM possède un pouvoir attractif supérieur sur les monocytes et un afflux important de cellules mononucléées sur le site infectieux limite les potentialités de croissance des mycobactéries [202].

On observe une relation inverse entre la virulence de souches produisant du ManLAM et la migration de lymphocytes T *in vitro* : *M. tuberculosis H37Rv*, *H37Ra*, et *Erdman* présentent des molécules de ManLAM capables d'induire le chimiotactisme vis-à-vis de lymphocytes T du sang, alors que le ManLAM de la souche *M. bovis BCG* semble en être incapable. Par contre, le surnageant de culture de macrophages infectés par *H37Ra*, contrairement à celui de *H37Rv* est incapable d'attirer les lymphocytes T *in vitro*. Comme les ManLAM de chacune des deux souches induisent un chimiotactisme correct, l'hypothèse d'un défaut dans le système d'exportation du ManLAM chez *H37Ra* est retenue pour expliquer la différence entre le chimiotactisme des deux souches jumelles [202].

Le Tréhalose Dimycolate (TDM) stimule *in vitro* la production de cytokines pro-inflammatoires TNF α , IL-6, IL-12 et se révèle être un puissant chémoattractant et activateur de monocytes. Cette molécule est sécrétée en permanence par la mycobactérie mais n'est pas nécessaire à sa croissance. Les mycobactéries dites « dégraissées » ont été dépourvues de leurs lipides externes et donc de TDM ; ces mycobactéries provoquent alors le recrutement majoritaire de polynucléaires par rapport aux monocytes sanguins, alors que les bacilles tuberculeux entiers, à l'instar du TDM seul, déclenchent un afflux préférentiel de monocytes.

Les mycobactéries dégraissées sont incapables de provoquer une réaction d'HSR. Elles induisent des lésions inflammatoires avec prédominance de PNN, qui sont des cellules inaptes à la présentation antigénique. La sensibilisation immunitaire cellulaire est ainsi rendue difficile voire impossible.

Le TDM apparaît ici comme un adjuvant utile pour la réponse protectrice de l'hôte et il pourrait être un des facteurs permettant le maintien et la cohésion des granulomes mycobactériens, grâce à sa synthèse continue couplée à son pouvoir chimiotactique sur les monocytes [120].

3. Apoptose non spécifique des phagocytes infectés :

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est un processus très complexe déclenché par des stimuli nombreux et variés, qui se traduit physiquement par la fragmentation de l'ADN cellulaire, l'invagination de la membrane plasmique et aboutit à la libération des vestiges cellulaires condensés en corps apoptotiques.

Longtemps sujet à caution, le rôle favorable à l'hôte de l'apoptose de phagocytes infectés par les mycobactéries est désormais largement reconnu : en emprisonnant les bacilles vivants dans les corps apoptotiques, l'apoptose du phagocyte empêche ainsi la dissémination des bactéries ; de plus, l'ingestion ultérieure de ces corps apoptotiques par des cellules naïves est suivie d'une destruction beaucoup plus efficace des mycobactéries ainsi piégées [60, 124, 131, 136]. Enfin, la mort de la cellule phagocytaire infectée prive les bacilles de leur niche protectrice au sein de phagosomes où règnent des conditions idéales pour leur multiplication et elle met fin à la libération de facteurs mycobactériens capables de détourner la réponse immunitaire au détriment de l'hôte. L'apoptose ne concerne d'ailleurs que les phagocytes hébergeant des mycobactéries vivantes [173].

Tous les mécanismes de l'apoptose sont loin d'être totalement élucidés. Les signaux de transduction liant le stimulus initial à la mort de la cellule font intervenir de nombreuses protéines et protéines kinases et impliquent des caspases (des cystéines protéases) variables selon le mécanisme déclenché. L'activation ou le blocage de l'apoptose d'une cellule résulte grossièrement de la rupture d'un équilibre maintenu entre des facteurs proapoptotiques et antiapoptotiques sous leur forme activée ou désactivée.

3.1. Apoptose spontanée infectieuse :

Dès les premiers jours de la primo-infection à *M. tuberculosis* et *M. avium*, l'apoptose des macrophages de souris dans les zones pulmonaires infectées est supérieure à celles restées saines. *In vitro*, les macrophages comme les cellules dendritiques infectées par l'une ou l'autre espèce subissent l'apoptose de façon accrue à partir du cinquième- septième jour post-infection [107, 136, 178].

Ce phénomène d'apoptose spontanée apparaît à un stade très précoce de l'infection et il ne résulte pas d'une multiplication intense des bacilles en position intracellulaire. Néanmoins, dans les conditions de laboratoire, la charge mycobactérienne intraphagocytaire semble être un facteur favorisant : plus le nombre de bacilles internalisés est grand plus l'apoptose des macrophages infectés est fréquente [178]. Cela suggère qu'*in vivo*, l'intensité de l'apoptose pourrait dépendre de la taille de l'inoculum aérien ou digestif, mais il est probable qu'une faible charge bactérienne initiale corresponde davantage aux caractéristiques naturelles de l'infection et que, dans ce cas, l'apoptose des phagocytes infectés puisse avoir lieu plus tardivement [136].

L'apoptose générée par l'infection mycobactérienne nécessite au moins le déclenchement de deux signaux de transduction distincts et indépendants : la libération de TNF α [60, 131] et l'activation de la phospholipase A2 cytosolique de groupe IV (PLA2c), qui catalyse la transformation de glycérophospholipides en acides gras ; ce second signal ne requiert aucune synthèse *de novo* de protéines [60, 72, 175].

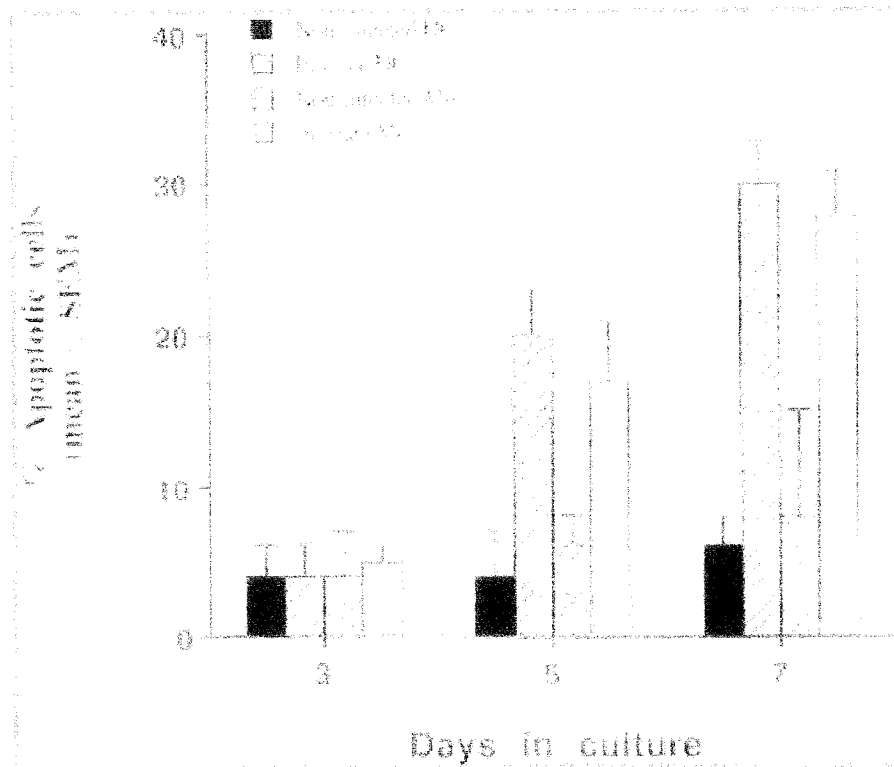


Figure 24: Apoptose des cellules dendritiques et macrophagiques infectées par *M. avium* [136]. Comparaison en fonction de la durée de culture des cellules ; en ordonnée, pourcentage moyen de cellules apoptotiques +/- écart-type.

Le TNF α libéré par la stimulation des TLR agit de façon autocrine ou paracrine en se fixant sur le récepteur de type I du TNF (ou TNFR1 de kDa) du phagocyte ; il induit ainsi l'activation de la caspase 8 puis de la caspase 3 [60]. Mais, seul, ce mécanisme dépendant du TNF α n'est pas capable de déclencher l'apoptose induite par *M. tuberculosis*. Il faut en plus la présence d'acide arachidonique, produit par la PLA2c.

L'acide arachidonique permet la synthèse de métabolites qui perturbent la chaîne respiratoire des mitochondries. Cette perturbation entraîne la libération dans le cytoplasme du cytochrome *c* qui permet l'activation de la procaspase 9 en caspase 9 active, qui, elle-même conduira à l'activation de la caspase 3. Les deux voies combinées du TNF α et de la PLA2c déclenchent l'apoptose spontanée des phagocytes infectés par les mycobactéries. Reste à connaître le signal envoyé par les mycobactéries pour activer la PLA2c.

Les métabolites de l'acide arachidonique peuvent également déclencher l'ouverture de canaux calciques transmembranaires et générer ainsi un afflux important d'ions calcium extracellulaires dans la cellule ; ces cations peuvent aussi désorganiser la chaîne respiratoire mitochondriale et conduire à l'apoptose [60].

Enfin, les métabolites oxygénés de l'acide arachidonique, comme le peroxyde d'hydrogène H₂O₂, libérés dans le milieu extracellulaire, peuvent se fixer de façon paracrine ou autocrine sur les récepteurs membranaires Fas (ou CD95) des phagocytes infectés par *M. tuberculosis*, ce qui déclenche le signal de mort *via* les caspases qui en dépendent [72, 114, 175, 178]. On constate que la stimulation des macrophages par l'infection mycobactérienne augmente l'expression membranaire de Fas. L'apoptose spontanée des phagocytes infectés ne s'accompagne pas de la mort des bacilles internalisés [114, 136].

3.2. Apoptose déclenchée par les lymphocytes NK:

Les lymphocytes NK arrivent sur le site infectieux, guidés par les chimiokines sécrétées par les phagocytes infectés ou sensibilisés par des composés mycobactériens. Les lymphocytes NK peuvent alors être activés à leur tour par les cytokines produites par les cellules phagocytaires.

La cytotoxicité des lymphocytes NK exprimée dans l'infection mycobactérienne ne semble pas requérir leur activation : *in vitro*, ces lymphocytes induisent au bout de 24 heures l'apoptose de macrophages infectés par *M. tuberculosis* H37Rv. L'apoptose induite par les NK nécessite un contact cellulaire direct mais elle se déroule selon un ou des mécanismes indépendants de l'exocytose des granules cytotoxiques, de l'interaction Fas-Fas ligand, et sans rapport avec la synthèse d'IL-12 ou d'IFN γ ; l'apoptose s'accompagne de la réduction à 70% des bacilles vivants internalisés. Les lymphocytes NK peuvent également inhiber la croissance intracellulaire de *M. avium* [27].

D'autres ligands capables d'initier l'apoptose sont présents à la surface des lymphocytes NK : le ligand de CD40, du TNF α intégré à la membrane des lymphocytes et le ligand TRAIL [27].

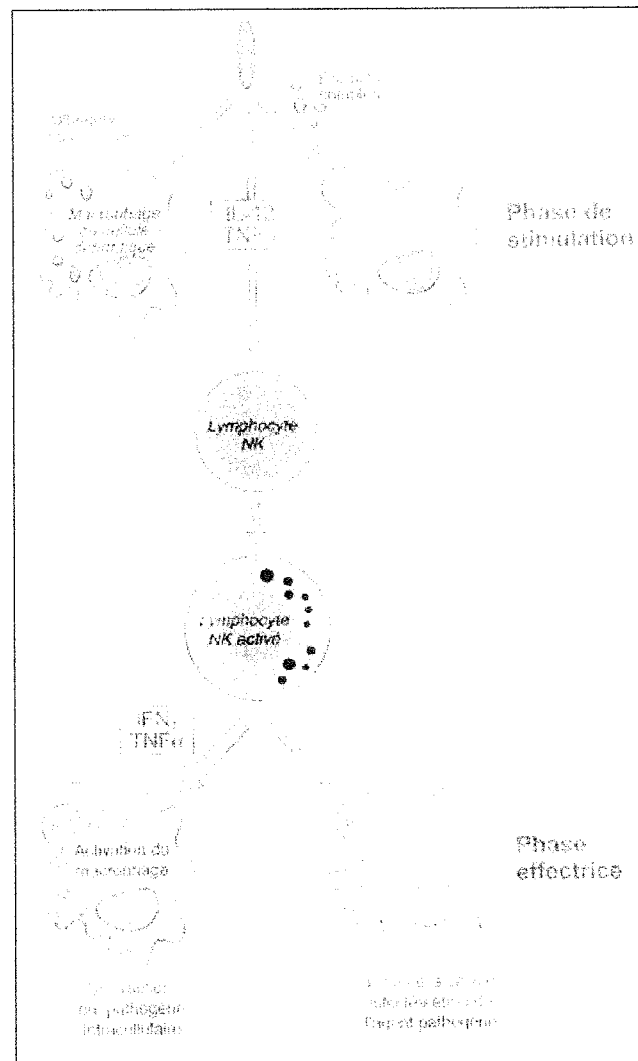


Figure 25: Fonctions activatrices et cytotoxiques des lymphocytes NK (In : Immunologie, 1999, Bach, p 135).

3.3. Apoptose déclenchée par l'ATP extracellulaire *via* les purinocepteurs :

L'apoptose de macrophages murins infectés, initiée par l'ATP extracellulaire (ATPe), a tout d'abord été mise en évidence *in vitro* sur des macrophages infectés par *M. bovis BCG* [114, 200], puis très rapidement confirmée pour des souches virulentes de *M. tuberculosis* internalisées par des macrophages humains [69, 111].

Ce mécanisme d'apoptose des macrophages infectés s'accompagne d'une chute rapide et marquée de la viabilité des bacilles phagocytés par ces cellules [69, 111, 114, 200]. Mais les signaux de transduction de l'apoptose et de la bactéricidie semblent actuellement diverger [69, 200].

In vivo, les molécules d'ATPe proviennent de la libération de contenus cytoplasmiques lors de l'apoptose d'autres phagocytes : apoptose spontanée naturelle ou infectieuse, ou apoptose déclenchée par l'action de lymphocytes cytolytiques comme les NK ; ces molécules d'ATP peuvent aussi provenir de cellules nécrotiques. Des macrophages stimulés par des composants extérieurs mycobactériens pro-inflammatoires (par exemple le LAM) peuvent aussi libérer de l'ATPe, qui peut ainsi agir également sur les macrophages de façon autocrine [111, 114]. Le fluide inflammatoire du foyer infectieux représente donc *in vivo* une source potentielle d'ATPe dès les premiers jours de la primo-infection, et cette source devrait croître avec la réponse immunitaire spécifique.

Les macrophages activés par les mycobactéries perdent leur capacité à lyser l'ATPe car les enzymes ecto-ATPases situées sur leurs membranes plasmiques voient leur expression diminuer suite à l'infection de la cellule [114]. Cela augmente d'autant la possibilité pour les molécules d'ATPe de stimuler efficacement les récepteurs purinergiques à la surface des phagocytes.

Ces récepteurs encore appelés purinocepteurs P2 sont des récepteurs extracellulaires transmembranaires spécifiques des nucléotides.

L'apoptose des phagocytes mononucléés initiée par l'ATPe semble dépendre du purinocepteur P2X7. Une faible quantité d'ATPe fixée sur les récepteurs P2X7 entraîne l'entrée d'ions calcium extracellulaires dans des canaux spécifiques du calcium, alors que l'ATPe, en se liant en grande quantité sur le P2X7, génère la formation de larges pores membranaires non spécifiques qui laissent passer des molécules hydrophiles de taille allant jusqu'à 900Da [11, 200]. Il en résulte un influx rapide dans le cytoplasme du phagocyte d'ions Ca^{2+} et Na^{+} et la sortie importante d'ions K^{+} vers le milieu extracellulaire [111].

L'apoptose du macrophage infecté a lieu environ trente minutes après la stimulation du récepteur P2X7, alors que l'ATPe seul n'a aucun effet sur des macrophages naïfs.

Il est extrêmement difficile de caractériser avec exactitude les signaux de transduction de ces récepteurs car leur stimulation s'accompagne de très nombreuses modifications biochimiques, variant en fonction des sous-types de purinocepteurs. Si plusieurs récepteurs sont activés en même temps, l'isolement d'un signal particulier s'avère compliqué surtout si les autres récepteurs stimulés n'ont pas encore été décrits ou impliqués dans l'événement cellulaire étudié (voir chapitre suivant sur la mycobactéricidie déclenchée par l'ATPe).

Figure 26: Structure des récepteurs de type P2X.

Ils sont formés de deux segments transmembranaires délimitant une boucle extracellulaire riche en résidus cystéines qui forment des ponts disulfures. Les extrémités NH₂ et COOH sont intracellulaires et contiennent des sites de liaisons pour des protéines kinases. L'ATPe s'attache à des sites de liaison dans les boucles extracellulaires. La perméabilité aux ions calcium extracellulaires varie selon le sous-type de récepteur ionotropique [11].

Le signal de transduction apoptotique issu du récepteur P2X₇ ne fait intervenir ni la PLC, ni la PLD (alors que ce purinocepteur est capable d'induire l'activation cette dernière enzyme), ni la protéine kinase C, ni les radicaux oxydants toxiques [111]. Ce signal est également indépendant de la libération de calcium depuis les réserves intracellulaires [111, 200].

L'IFN γ rend les macrophages beaucoup plus sensibles au signal généré par la liaison de l'ATPe sur le P2X₇ mais la cytokine n'est pas indispensable au mécanisme de l'apoptose.

Par ailleurs, le récepteur P2X₇ montre une expression et une sensibilité variables selon les individus, ce qui suggère une possible hétérogénéité d'origine génétique au sein de la population humaine, pouvant, peut-être, contribuer à expliquer les issues variables de la primo-infection [114].

3.4. Blocage de l'apoptose des phagocytes par les mycobactéries virulentes :

Les souches mycobactériennes virulentes induisent moins souvent l'apoptose des macrophages alvéolaires que leurs pendants avirulents. Les macrophages infectés par des souches virulentes de *M. tuberculosis* subissent d'ailleurs moins l'apoptose que les macrophages non infectés [107].

La modération du phénomène d'apoptose par les mycobactéries virulentes fait intervenir un mécanisme actif et sans doute prolongé car les mycobactéries tuées par la chaleur ne sont plus capables de s'opposer à la mort programmée des phagocytes [175].

Pour une même souche bacillaire, il semble que la charge bactérienne infectieuse du macrophage ou de la cellule dendritique soit un facteur favorisant le déclenchement de l'apoptose des phagocytes [136]. Mais, en comparant deux souches comme *H37Rv* et *H37Ra*, le nombre de bacilles présents dans la cellule n'est pas en relation avec la fréquence de l'apoptose subie : au contraire, les bacilles virulents se reproduisent beaucoup plus activement que les avirulents au sein des phagosomes [107, 173].

Le mécanisme d'évitement le plus étudié est la régulation négative de la voie d'apoptose liée à l'action du TNF α . De façon générale, il semble que les souches virulentes induisent une moindre libération de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines que les autres souches, associant ainsi la virulence à la capacité de modérer la réponse immunitaire destinée à combattre l'infection. [11].

Les souches virulentes de *M. tuberculosis* et *M. avium* sérovar 4 induisent la synthèse d'IL-10, qui, elle-même modère la production de TNF par le macrophage. En outre, cette cytokine modératrice déclenche à son tour la sécrétion de récepteurs leurres solubles extracellulaires tel le récepteur TNF α R de type II (TNFRII). Ces leurres bloquent par compétition les récepteurs efficaces de type I : ils fixent et neutralisent les molécules de TNF α environnantes et amenuisent voire abolissent ainsi l'action autocrine ou paracrine du TNF sur les phagocytes infectés.

On a également mis en évidence chez des macrophages infectés par *M. avium* sérovar 4, une hyposécrétion secondaire de TNF α , conséquence d'une synthèse de PGE2. La PGE2 entraîne une modification de la voie de synthèse du TNF α par le macrophage [75].

Le bacille aviaire sérovar 4 induit la libération d'une autre molécule inhibitrice de l'apoptose: il s'agit de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type 2 (PAI-2), qui est capable de bloquer l'apoptose des macrophages survenant avec une autre souche dans les 7 à 10 jours suivant l'infection [76].

D'autres mécanismes, indépendants du TNF α , participent également au blocage de l'apoptose. *In vitro*, les macrophages infectés par une souche virulente de *M. tuberculosis* montrent une plus faible expression du récepteur Fas sur leurs membranes plasmiques; cela limite naturellement les interactions possibles du récepteur avec des ligands de Fas susceptibles de déclencher le signal de transduction de l'apoptose [107, 175].

Très récemment, ont été mis en évidence des rôles possibles du ManLAM dans le blocage mycobactérien de l'apoptose phagocytaire.

Un des signaux de transduction de l'apoptose liée à l'infection par *M. tuberculosis* nécessite un influx d'ions calcium associé à de l'AMPc qui permet la translocation de la protéine de CREB (pour c AMP Responsive Element Binding Protein) vers le noyau du phagocyte, la protéine CREB étant phosphorylée après l'augmentation de la [Ca²⁺] cytoplasmique. La protéine CREB intervient dans la régulation de la transcription du gène codant pour Bcl-2, un facteur anti-apoptotique, et cette régulation négative s'effectue par un mécanisme dépendant de la protéine kinase C. La régulation négative de ce mécanisme entrave l'expression de Bcl-2, ce qui génère l'apoptose, sans faire intervenir le TNF α .

Or, le prétraitement *in vitro* de macrophages naïfs par du ManLAM supprime l'influx calcique initial normalement déclenché par le bacille phagocyté, d'où le blocage du signal en aval de la modulation par CREB de Bcl-2, transcription de Bcl-2 et inhibition de l'apoptose des macrophages [173]. Notons cependant que le ManLAM de *M. bovis* BCG est aussi efficace pour bloquer l'apoptose que celui de la souche *M. tuberculosis* H37Rv, ce qui rend

plus discutable la dichotomie avancée des capacités à inhiber l'apoptose en fonction de la virulence des souches ou espèces mycobactériennes.

Le ManLAM de *M. tuberculosis Erdman* promeut également la survie du phagocyte infecté en activant la phosphatidyl-3-kinase (PI-3-kinase). Cette kinase contribue indirectement à la phosphorylation de la protéine pro-apoptotique Bad, qui, sous cette forme, libère Bcl-2 et Bcl-XL. Ces deux molécules anti-apoptotiques sont ainsi libres à la surface des membranes mitochondriales et permettent la survie de la cellule [124]. Par ailleurs, le ManLAM étant capable d'inhiber la PKC, il pourrait peut-être intervenir aussi dans le mécanisme où la caspase 1 est activée par un signal dépendant de la PKC [228].

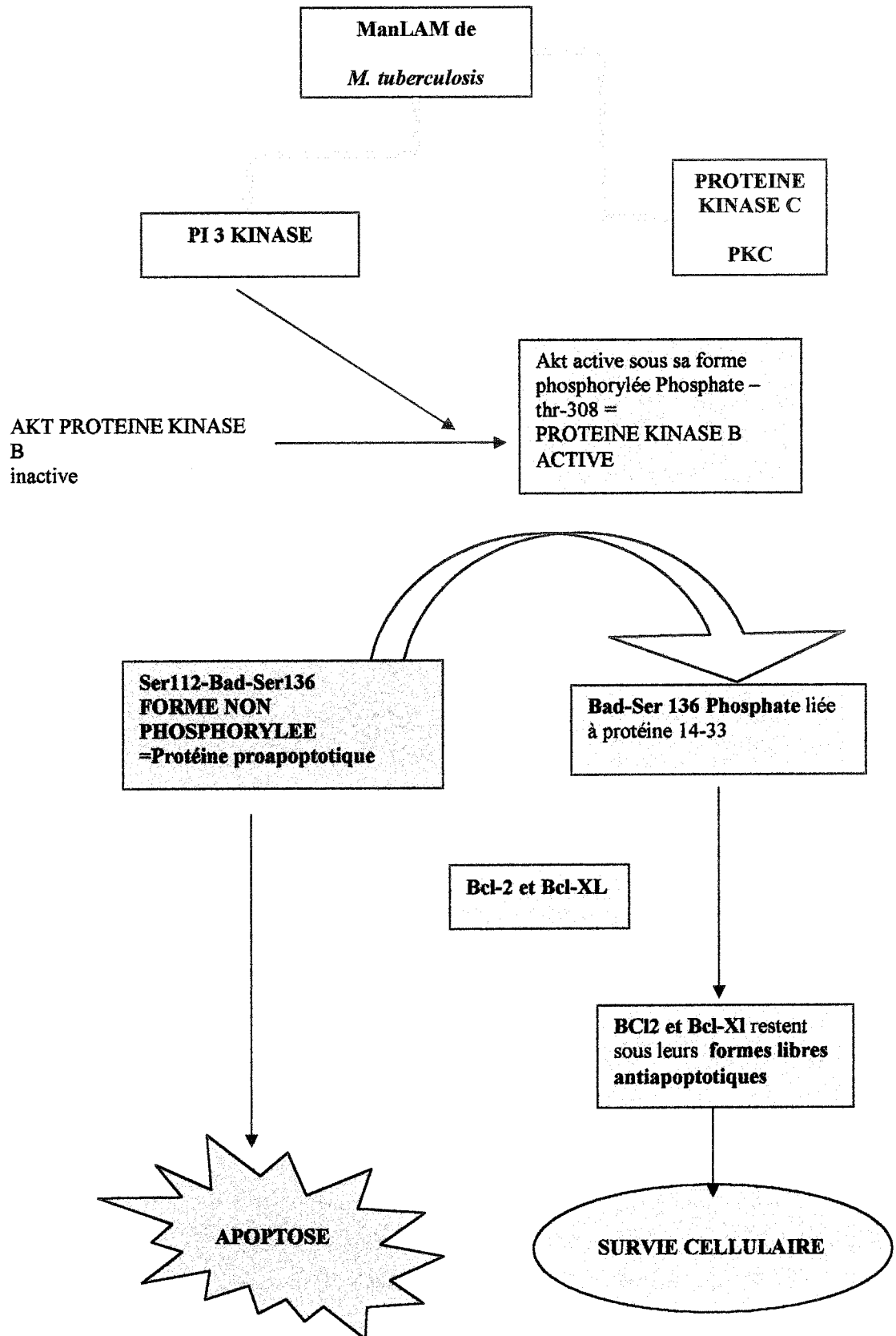


Figure 27: Blocage de l'apoptose phagocytaire par le ManLAM de *M. tuberculosis* activant la PI-3-kinase.

4. Mécanismes mycobactéricides au sein des phagocytes infectés :

4.1. Bactéricidie déclenchée par l'ATP extracellulaire *via* les purinocepteurs :

L'ATP extracellulaire déclenche, outre l'apoptose du macrophage infecté, la mort des bacilles internalisés mais le mécanisme létal fait intervenir un type de purinocepteur distinct des P2X liés à l'apoptose. Il s'agit d'un récepteur métabotropique de type « P2Y » qui active une phospholipase D [111].

Figure 28: Structure des récepteurs métabotropiques de type P2Y.

Ils contiennent 7 segments transmembranaires ; l'extrémité NH₂ est extracellulaire tandis que le COOH est intracellulaire comme les sites de liaisons aux protéines kinases G. Les P2Y sont activés par des nucléotides triphosphatés et sont le point de départ de signaux de transduction multiples comprenant l'activation, en aval des protéines G, de phospholipases comme la PLA₂, la phospholipase C ou la phospholipase D, ou encore d'autres kinases, selon le récepteur concerné [11].

Le couplage du récepteur à la phospholipase D se fait au niveau de sa portion intracytoplasmique grâce à une protéine G [200].

Le signal mycobactéricide lié à l'activation du P2Y nécessite l'augmentation de la concentration intracytoplasmique de l'ion calcium libéré par le réticulum endoplasmique. Cet influx calcique d'origine endogène s'accompagne de la coalescence des phagosomes contenant des bactéries isolées en une vacuole unique multibacillaire. Cet unique phagosome subit alors une maturation et une acidification « classiques » liées au recrutement de nombreuses pompes à protons ATPases. Quatre heures après l'exposition des macrophages à l'ATPe, les phagosomes expriment des marqueurs membranaires tardifs d'acidification sans que les mycobactéries montrent alors de dégâts morphologiques visibles. Mais deux heures plus tard, une désorganisation structurale très nette des bactéries est associée à la chute marquée de leur viabilité, montrant ainsi que l'ATPe est bien à l'origine d'un signal mycobactéricide et non bactériostatique : en 24 heures, 80% des mycobactéries tuberculeuses virulentes sont détruites [111, 200].

Dans le cas présent, il est clairement démontré que l'acidification phagosomale précède chronologiquement et détermine la mort des bacilles et non l'inverse [200].

En l'absence de calcium dans le milieu extracellulaire, l'activité de la PLD stimulée par l'ATPe est réduite mais non abolie, tout comme l'effet mycobactéricide associé. Le récepteur P2X7 n'est donc pas nécessaire au mécanisme mycobactéricide dépendant de fonctions endogènes initiées par la PLD [111].

Pour autant, la possibilité d'une participation parallèle du P2X7 dans le mécanisme bactéricide déclenché par l'ATPe n'est pas écartée. En effet, chez la souris, les macrophages génétiquement délétés en P2X7 présentent des capacités mycobactéricides ATPe-dépendantes inférieures à celles des macrophages témoins. De plus, la stimulation du P2X7 s'accompagne de l'augmentation de l'activité de la phospholipase D [111]. Or, la phospholipase D requiert le Ca²⁺ comme cofacteur d'activation, qui pourrait être délivré au cytoplasme *via* son passage par le canal ionique que constitue le P2X7 activé [200].

Par ailleurs, la PLD peut activer une sphingosine kinase qui catalyse la phosphorylation de la sphingosine en sphingosine -1-phosphate ; cette dernière molécule possède un récepteur propre à la surface du réticulum endoplasmique, auquel elle se lie pour déclencher la libération des réserves calciques intraréticulaires vers le cytoplasme ; ainsi la PLD couplée à la protéine G du métabocepteur est capable de générer indirectement un influx calcique intracytoplasmique par une voie métabolique distincte de celle de la phospholipase C [111, 133].

Le calcium extracellulaire, entré par le récepteur P2X7, pourrait ainsi participer à l'activation initiale de la PLD et permettre, ou du moins faciliter, le déclenchement complet du signal de transduction du métabocepteur P2Y, et par ce biais, le déroulement des réactions enzymatiques ayant lieu en aval du P2Y. L'influx calcique massif ainsi généré semble aussi efficace que celui déclenché par l'action de l'inositol 1,4,5-triphosphate sur le réticulum endoplasmique.

En promouvant indirectement un influx calcique, l'ATPe mime par ses effets ceux d'un ionophore du calcium sur la maturation du phagosome et la survie des mycobactéries internalisées. L'ATPe est ainsi capable d'inhiber de façon irréversible le blocage de la

maturation phagosomale assurée par les mycobactéries depuis le moment de leur phagocytose.

L'effet mycobactéricide de l'ATPe étant, en outre, inhibé par l'inactivation de la calmoduline [111, 200], il est plus que probable que le mécanisme déclenché par le P2Y implique en aval les mêmes protagonistes nécessaires à la réalisation des fusions KISS and RUN dans leur totalité, c'est-à-dire qu'il implique, en plus de l'activation de la calmoduline, celles de la calmoduline kinase II, la Pi-3-Kinase et de EEA1...

4.2. Synthèse par le phagocyte de radicaux libres toxiques :

Les cellules phagocytaires sont capables de synthétiser de nombreuses molécules à fonctions oxygénées et nitrées bactéricides en réponse à l'infection mycobactérienne, à condition d'être suffisamment activées par les cytokines de type 1 : $TNF\alpha$ et $INF\gamma$. [57, 72, 94, 118, 150, 175].

La formation de radicaux toxiques dès le début de la primo-infection est rendue possible par l'intervention des lymphocytes NK, qui une fois stimulés par les cytokines rapidement sécrétées par le phagocyte infecté (notamment l'IL-12), peuvent à leur tour libérer du $TNF\alpha$ et de l' $INF\gamma$ [72, 94, 111, 230]. Sous l'effet prolongé de l'IL-12, ces macrophages infectés peuvent devenir des sources autocrines d' $INF\gamma$, du moins *in vitro* [225].

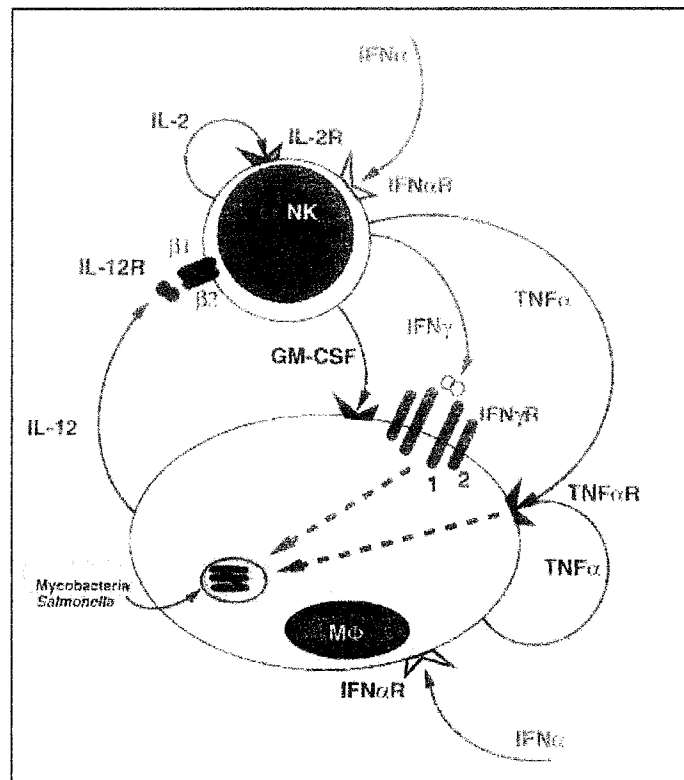


Figure 29: Activation non spécifique par les lymphocytes NK des macrophages infectés [94].

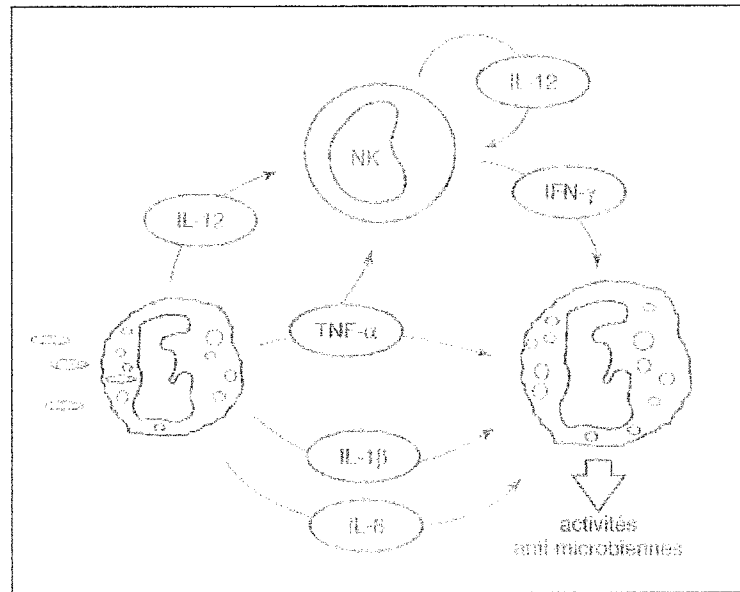


Figure 30: Activités bactéricides potentielles des macrophages au cours de la réponse innée [205].

Une réponse mycobactéricide innée, efficace, conduisant à la guérison complète du sujet infecté n'induit logiquement aucune mémoire immunitaire, le support cellulaire étant théoriquement assuré par les lymphocytes T déjà sensibilisés aux antigènes mycobactériens.

Le développement d'une telle réponse dès la phase précoce innée de l'infection pourrait alors expliquer l'impossibilité à mettre en évidence une réaction d'HSR chez des personnes saines ayant des contacts étroits et fréquents avec des patients contagieux, alors que les autres sujets de l'entourage deviennent réactifs à la tuberculine. On estime effectivement que seuls 30% des personnes exposées et donc considérées comme potentiellement contaminées répondent positivement à la tuberculine. Ces personnes contaminées qui n'expriment jamais d'HSR pourraient ainsi compter parmi elles des « super-réactifs » dans leur réponse non spécifique anti-infectieuse [230]. Ce pourrait être aussi une des explications à l'absence d'HSR chez certains humains sains régulièrement revaccinés au moyen du BCG.

Lorsque les macrophages baignent dans un milieu cytokinique favorable, l'activation des phagocytes infectés déclenche la maturation et l'acidification des phagosomes mycobactériens jusqu'au pH lysosomal normal de 5.3. Ces cytokines peuvent également activer des macrophages naïfs environnants qui phagocytent alors plus efficacement les mycobactéries libérées dans le milieu extracellulaire suite à l'apoptose de cellules phagocytaires voisines. Ces macrophages naïfs activés deviennent surtout capables d'assurer la maturation et l'acidification complètes des phagosomes mycobactériens, l'action du IFN γ permettant de contourner le blocage de maturation instauré par les mycobactéries vivantes internalisées.

Ainsi, on assiste tout d'abord à la coalescence des vacuoles contenant de bacilles isolés en de plus larges compartiments pluribacillaires, puis à la chute marquée de la viabilité des mycobactéries regroupées. Les mesures cinétiques réalisées sous microscope électronique montrent que, à l'instar de l'action de l'ATPe sur les macrophages infectés, l'acidification des phagosomes précède la mort des bacilles et non l'inverse [2, 72, 94].

Les radicaux toxiques nitrés. Les cytokines activatrices induisent la transcription de l'ADN codant pour l'enzyme « Nitric Oxyde Synthetase de type 2 inductible » (iNOS2) au sein des macrophages [143].

Cette NO synthétase est dépendante de la coenzyme NADPH mais indépendante du calcium. Elle catalyse la formation des radicaux issus du monoxyde d'azote NO. et NO-, qui sont les chefs de file d'autres dérivés toxiques. La synthèse du NO nécessite la capture de la L-arginine, qui est préférentiellement prélevée dans le milieu extraphagocytaire. L'INF γ stimule le transport de la L-arginine vers le cytoplasme [143, 155].

La régulation de l'induction de l'iNOS fait intervenir des signaux complexes activés par des composants mycobactériens, comme le ManLAM de *M. tuberculosis*.

L'ATPe peut aussi induire la synthèse de la NO synthétase en se liant aux purinocepteurs de la surface des phagocytes. D'autres produits mycobactériens comme le lipomannane, le PIM2 et des lipoprotéines bacillaires ont également la capacité d'induire directement ou indirectement la synthèse de l'iNOS [36].

Les mécanismes exacts de la toxicité des composés nitrés sur les mycobactéries ne sont pas bien connus, mais dans les conditions *in vitro*, ils sont capables, sous leur forme gazeuse ou liquide, de tuer directement le bacille de Koch [143, 175]. On sait qu'ils provoquent ultimement des dégradations irréversibles de l'ADN mais ils peuvent aussi inhiber ou activer diverses kinases, des caspases, des métalloprotéinases et des facteurs de transcription.

Ils modifient également la libération de cytokines et la production de prostaglandines par le phagocyte [175].

In vivo, les dérivés nitrés contribuent à une nette diminution de la charge mycobactérienne : les souris génétiquement délétées pour la iNOS2 subissent, à la fois dans les phases aiguë et chronique de l'infection, une prolifération accrue des bacilles tuberculeux et une mort prématurée.

Mycobacterium avium n'est guère sensible à la toxicité du NO et les souris mutantes délétées répondent même mieux à l'infection par le bacille aviaire, que les souris de type sauvage [143, 175]. Il semble que la production de dérivés nitrés occasionne plus de dégâts que de protection. En effet, les dérivés nitrés étant indistinctement toxiques vis-à-vis des cellules, procaryotes comme eucaryotes, seuls s'expriment des dégâts autotoxiques néfastes en l'absence d'un effet bactéricide favorable à l'hôte.

Le Rôle de la vitamine D3. La découverte de l'implication de la vitamine D dans la réponse protectrice contre *M. tuberculosis*, a permis de démontrer la capacité réelle des macrophages humains à synthétiser des dérivés nitrés mycobactéricides [72, 143, 168].

La vitamine D3, sous sa forme active de 1,25-dihydrocholécalférol, participe à l'activation de l'enzyme iNOS2 des macrophages humains [175]. Des cellules phagocytaires, stimulées par la seule vitamine D3, deviennent capables de synthétiser du NO et d'inhiber la croissance de *M. tuberculosis*. Néanmoins, la présence supplémentaire de l'interféron gamma augmente significativement la conversion, au sein du macrophage alvéolaire, de la 25 (OH) CC en sa forme ultime active, ce qui rend ces deux mécanismes complémentaires [171].

Le rôle protecteur de la vitamine D et son intérêt curatif dans la tuberculose maladie chez l'homme, avaient été soupçonnés, depuis des décennies, par les médecins prescripteurs de sanatorium, et de grand air au soleil et à la montagne. Mais ce n'est que maintenant que l'on commence à saisir par quels mécanismes cette vitamine confère effectivement une protection contre l'infection mycobactérienne.

Le NO est cependant toujours produit chez les patients dans la phase clinique de la tuberculose, ce qui suggère l'existence de mécanismes plus complexes que la simple synthèse du radical pour assurer une protection véritablement efficace contre les mycobactéries *in vivo*. Mais nous verrons qu'il existe sans doute une utilisation défectueuse de la vitamine D3 chez ces personnes [171, 175].

La vitamine D3 active également la synthèse de radicaux oxygénés comme l'ion superoxyde O_2^- ou le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . Leur production nécessite l'intervention de la PI-3-kinase et de la phagocyte oxydase « phOx » [171].

Les radicaux toxiques oxygénés. En présence de vitamine D3 et de mycobactéries tuberculeuses vivantes, les composants cytosoliques de la NADPHoxydase (ou phOx) p47 et p67 sont redistribués vers la membrane du phagocyte alors qu'ils ne se transloquent pas et ne sont pas activés pour synthétiser des radicaux libres quand les mycobactéries sont tuées; cet événement s'accompagne d'une activité mycobactéricide résultant de la synthèse d' O_2^- [194].

La maturation phagosomale et la fusion avec les lysosomes s'accompagnent du déclenchement de « l'explosion respiratoire », terme désignant les réactions enzymatiques conduisant à la synthèse des radicaux oxygénés. L'induction de ces réactions reste mal connue, elle pourrait être liée au signal transduit lors de la phagocytose des microorganismes. Il semble que les mycobactéries puissent à la fois inhiber la maturation du phagosome et l'explosion respiratoire consécutive à leur entrée dans les cellules phagocytaires [5, 136].

La superoxyde dismutase catalyse la formation du peroxyde d'hydrogène. Cette molécule n'est pas très efficace contre les microorganismes, mais son association au chlore, grâce à la myeloperoxydase, génère de l'acide hypochloreux, qui est hautement toxique [7, 53]. L'association des radicaux NO et O_2^- permet la synthèse de l' O_2NO^- , peroxyde nitrite qui est considéré comme le produit le plus toxique synthétisé par les cellules phagocytaires et plus mycobactéricide que chacun de ses deux précurseurs [143].

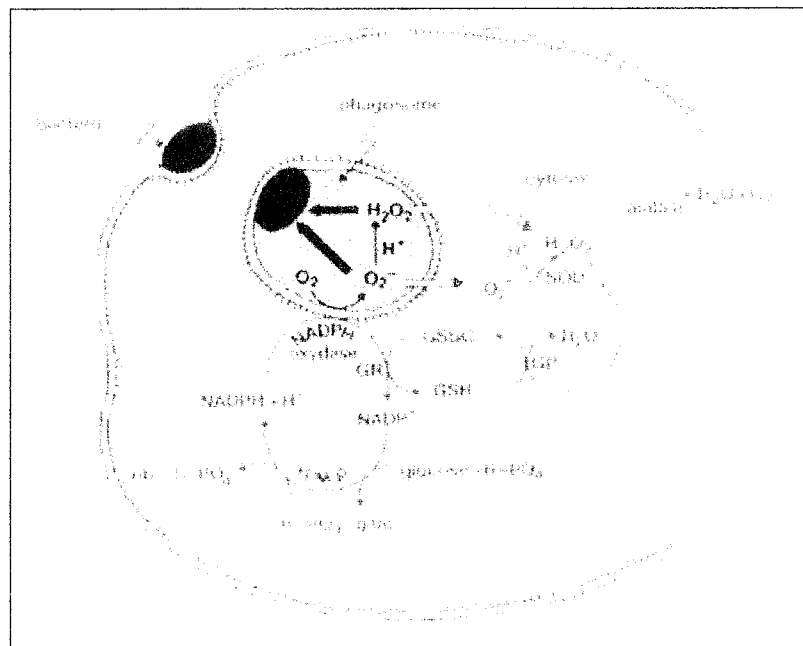


Figure 31: Métabolisme des radicaux oxygénés toxiques au sein du phagocyte [83].

Le mode d'action des radicaux oxygénés reste, malgré tout, mal connu. Une déficience génétique en NADPH oxydase n'entraîne qu'une très faible augmentation de la sensibilité des souris à l'infection tuberculeuse, ce qui suggère un rôle relativement mineur de ces radicaux dans la destruction des mycobactéries *in vivo* [72].

Malgré la haute toxicité potentielle de ces radicaux, *M. tuberculosis* et *M. avium* semblent y être relativement peu sensibles. Ces mycobactéries possèdent en effet les moyens de bloquer ou de perturber la formation ou l'action de ces molécules théoriquement bactéricides.

4.3. Résistance des mycobactéries aux processus bactéricides :

a) Résistance à la toxicité des radicaux libres :

Les mycobactéries piègent et désactivent les radicaux libres grâce aux molécules intégrées dans leur paroi ou libérées dans l'environnement péri-bacillaire : le LAM, les glycolipides phénoliques, les sulfolipides fixent ces radicaux et les empêchent ainsi d'atteindre directement la mycobactérie [72, 160, 166, 175].

Certaines mycobactéries possèdent des systèmes enzymatiques destinés à transformer ces radicaux libres en molécules moins toxiques. Certaines de ces enzymes catalysent des réactions identiques à celles de l'explosion respiratoire.

La catalase-peroxydase (codée par le gène *KatG*) catalyse la transformation de H₂O₂ en H₂O + O₂ et cette enzyme est considérée comme un facteur de virulence majeur. Cette enzyme est également responsable de l'activation de l'Isoniazid en sa forme efficace, ce qui rend *M. tuberculosis* sensible à cet antibiotique, alors que les membres du complexe *M. avium* y sont naturellement résistants. Néanmoins l'acquisition par ces bacilles de catalase de type A plasmidique reste possible [85, 98, 141].

Une autre enzyme, la superoxyde dismutase (SOD), convertit l'ion superoxyde en oxygène et peroxyde d'hydrogène, ce qui réduit les effets toxiques de cet ion, tout en prévenant la trop grande formation de peroxyde d'hydrogène par le biais d'autres réactions chimiques. La SOD empêche également la formation de produits plus toxiques résultant de l'association de l'ion superoxyde avec des dérivés nitrés. La superoxyde dismutase a une distribution beaucoup plus large que la catalase au sein du genre *Mycobacterium* : elle est présente chez tous les bacilles du complexe *tuberculosis*, chez *M. avium* et chez des espèces à croissance rapide, même avirulentes, comme *M. smegmatis* [160].

La superoxyde dismutase comprend deux composantes, la SOD A et la SOD C, codées par deux gènes distincts. Chez *M. tuberculosis*, la SOD A possède une activité très largement supérieure à celle de la SOD C. La SOD A est une protéine majeure excrétée dans le milieu extracellulaire, qui nécessite le manganèse et le fer comme co-facteurs. La SOD C est également détectable à la périphérie des bacilles mais elle est produite en bien moindre quantité; elle requiert du cuivre et du zinc pour son activation. Les bacilles mutés pour le gène *sod C* se montrent incapables *in vitro* de résister à l'ion superoxyde et sont bien plus sensibles que les souches sauvages au peroxyde nitrite. Cela suggère un rôle important de l'enzyme SOD C dans la résistance des bacilles tuberculeux aux molécules toxiques synthétisées par les phagocytes activés [160]. Néanmoins, des expériences chez la souris lui attribuent surtout

une importance lors de la phase tardive spécifique de l'infection (à la fin du deuxième mois post-inoculation) et pas lors de la réponse immunitaire innée [143]. Ceci est très probablement lié au fait que la sécrétion maximale d'IFN γ est réalisée *in vivo* par les lymphocytes T déjà sensibilisés aux antigènes mycobactériens, donc lors de la phase spécifique.

Le bacille de Koch est également assez résistant au peroxyde nitrite, propriété qui serait l'apanage des seules mycobactéries virulentes. *M. tuberculosis* possède le gène *Ahp* qui code pour une alkylperoxyde réductase. Cette enzyme dodécamérique appartient à la famille des peroxyrédoxines capables de réduire des molécules nitrées et soufrées très toxiques et des radicaux oxygénés comme H₂O₂. Cette enzyme convertit le peroxyde nitrite en nitrites par des mécanismes de catalyse complexes impliquant des flavoprotéines et des réductases associées à la NADPH). Par ailleurs, des gènes codant pour des nitrites et des nitrates réductases (respectivement *nirBD* et *narGHJI*) ont été identifiés lors du séquençage du génome de *M. tuberculosis H37Rv* [42, 143].

D'autres gènes de résistance aux produits nitrés sont actuellement étudiés : une protéine flavohémoglobine, codée par le gène *hmp*, protège la mycobactérie contre le NO et le S-nitrosothiol, en activant des mécanismes aérobie et anaérobie par lesquels le NO est catalysé en N₂O, ce qui limite ainsi la formation du peroxyde nitrite [143].

Enfin, les gènes *noxR1* et *noxR3* confèreraient au bacille une résistance accrue et transférable aux radicaux nitrés. La présence de ces gènes augmente la survie des bacilles face aux mécanismes bactéricides des macrophages, même lorsque ces cellules sont expérimentalement délétées en NOSynthétase et NADPHoxydase [143].

b) Perturbation du signal de transduction de l'IFN γ :

Le signal de transduction de l'IFN γ est activé par l'action d'un dimère d'IFN γ sur son récepteur tétramérique à la surface de la cellule. La transphosphorylation de plusieurs kinases, associées à la partie intracytoplasmique du récepteur, conduit à l'activation du facteur de transcription STAT-1, qui est actif sous sa forme dimérique et di-phosphorylée [94].

STAT-1 se lie à des co-activateurs de transcription comme CREB et la p300 [72]. L'importance de ce signal de transduction dans la défense contre les mycobactéries est soulignée par l'extrême gravité des infections mycobactériennes chez des individus déficients dans les gènes codant pour l'IFN γ ou son récepteur [57, 72, 94, 118, 150].

M. tuberculosis est capable d'empêcher les macrophages de répondre de façon adéquate à l'IFN γ en perturbant le signal. Les mycobactéries vivantes et des composants mycobactériens parviennent à perturber la liaison de STAT-1 phosphorylé à son homologue, ainsi que son association aux co-activateurs de transcription [72]. Le relargage constant de ces composants, notamment lipidiques, capables de franchir spontanément les membranes eucaryotes permettrait une inhibition continue du signal.

En outre, le LAM de *M. tuberculosis* induit l'activation d'une enzyme, la phosphotyrosine phosphatase SHP-1. Cette enzyme inhibe le signal de transduction de l'interféron en agissant par compétition avec les kinases JAK et en inhibant la MAPK [72, 94, 175].

III. LES EVENEMENTS DE LA PHASE IMMUNITAIRE SPECIFIQUE :

Chez la grande majorité des hôtes, sans doute dans au moins 70 cas sur 100, la contamination ne peut être stoppée lors de la réponse immunitaire innée.

Les sept à vingt-et-un premiers jours de la primo-infection sont caractérisés par une forte croissance des bacilles intracellulaires qui peuvent atteindre le nombre de 1000 à 10000 par foyer [49, 127, 128].

Les macrophages et cellules dendritiques transportent activement les mycobactéries phagocytées sur le site primaire de l'infection, en empruntant les voies lymphatiques vers le nœud satellite, le plus souvent pulmonaire ou mésentérique [128, 129]. Les cellules infectées, les bacilles ou particules mycobactériennes ayant gagné un capillaire sanguin, seront pris en charge par la rate [72, 175].

La réponse spécifique débute à la fois au sein du nœud lymphatique satellite et sur le site infectieux [49, 72, 128, 129].

1. Quels lymphocytes T pour quels antigènes mycobactériens ?

1.1. Antigènes peptidiques et lymphocytes TCR $\alpha\beta$ CD4+ :

Cette population lymphocytaire fut la première à être mise en évidence grâce aux expériences de transfert passif d'immunité, il y a plusieurs dizaines d'années. On pensait encore récemment qu'elle constituait la seule population responsable de la réponse anti-tuberculeuse protectrice. L'importance fonctionnelle de cette population lymphocytaire a été redémontrée plus récemment chez la souris à l'aide de déplétions ou de délétions génétiques visant le CD4+. Chez l'homme infecté par *M. tuberculosis*, la déplétion en lymphocytes CD4+ causée par le VIH au stade SIDA favorise l'apparition des symptômes cliniques de la tuberculose, et confirme ainsi le rôle protecteur des CD4+ face aux mycobactéries [72 129 175].

Les lymphocytes T $\alpha\beta$ CD4+ reconnaissent des antigènes exogènes peptidiques présentés après clivage par les molécules de classe II du CMH (mécanisme rappelé sur les schémas suivants).



Figure 32: Présentation des antigènes peptidiques exogènes par les molécules HLA de classe II.

L'antigène exogène est capturé par endocytose ou internalisé via un récepteur membranaire. Il est digéré en petits peptides grâce aux protéases des compartiments endolysosomaux secondaires acides. Les molécules de CMH II se forment au niveau du réticulum endoplasmique et s'associent sous la forme de complexes nonamériques : 3 chaînes invariantes Ii + 3 chaînes α + 3 chaînes β , puis elles transitent par l'appareil de Golgi. Les complexes se dirigent alors vers les compartiments des molécules de classe II du CMH (de type endosomal secondaire) grâce à un motif cibleur contenu dans l'extrémité N-terminale de la chaîne invariante chaperon de 31-33 kDa ; le site de fixation du peptide est protégé grâce au fragment CLIP (Class II associated Invariant chain Peptide) de la chaîne invariante.

La chaîne Ii est dégradée dans l'endosome MIIC (MHC Class II compartment) ; CLIP est séparé des chaînes $\alpha\beta$ par la protéine dimérique DM présente uniquement dans ce compartiment.

La molécule de classe II se lie au peptide et migre vers la membrane plasmique de la CPA pour une présentation aux lymphocytes T CD4+ (BACH JF, Immunologie, 1999).

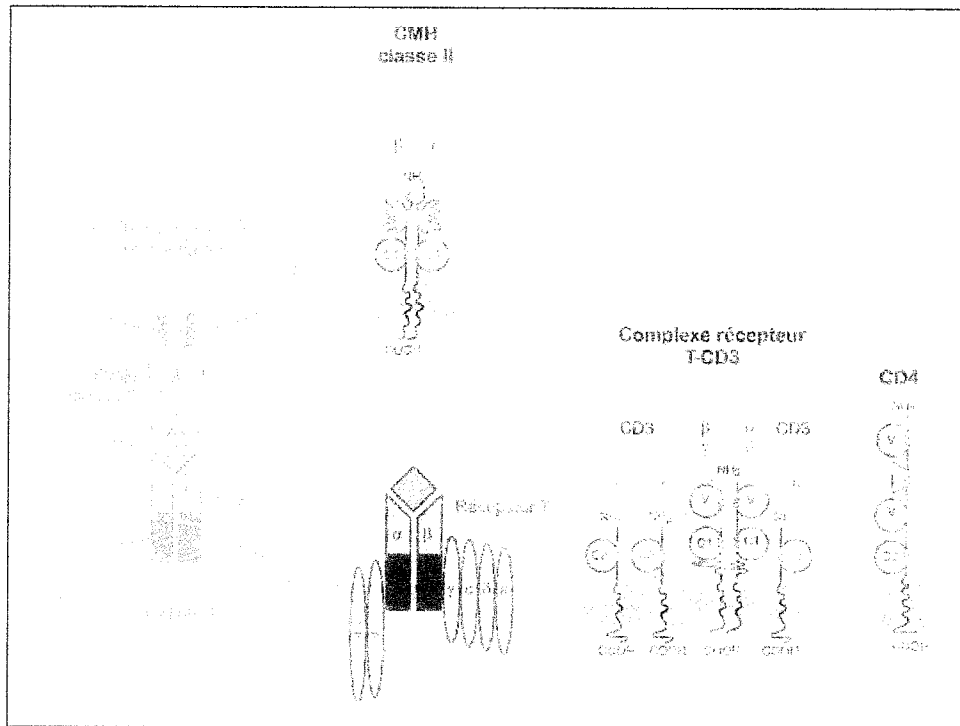


Figure 33: Interactions moléculaires de la CPA et du lymphocyte T CD4+.

Le dimère $\alpha\beta$ du TCR assure la reconnaissance de l'antigène. Le complexe CD3, formé de chaînes γ et δ uniques et de deux chaînes ζ et ϵ , permet la transduction intracellulaire du signal issu de la reconnaissance de l'antigène. Le corécepteur CD4+ se lie à la molécule de classe II de la CPA et s'associe au TCR par translation sur la membrane lymphocyte au moment de la reconnaissance antigénique qui est ainsi potentialisée. Sont représentées parallèlement les structures de ces molécules et récepteurs qui appartiennent tous à la superfamille des immunoglobulines, V désignant les parties variables et C les parties constantes (in BACH JF, Immunologie 1999, 3ème édition, Flammarion médecine Sciences).

Si les bacilles phagocytés bloquent la fusion phagolysosomale et donc leur dégradation enzymatique, comment les peptides mycobactériens peuvent-ils déclencher la prolifération des CD4+ restreints aux molécules du CMH II ?

Le phagosome mycobactérien n'est pas une vacuole hermétique. Il existe un flux sortant de molécules synthétisées par les bacilles qui franchissent la membrane phagosomale par des pores formés par les bactéries. Certaines sont précisément retrouvées dans les compartiments où transitent les molécules de classe II du CMH pour se lier aux antigènes. Ont été ainsi mis en évidence les transits de protéines mycobactériennes, comme les HSP de 12, 16, 65 ou 71 kDa, la superoxyde dismutase de 23 kDa de *M. tuberculosis*, ou encore des composants du complexe antigénique Ag85, qui partagent, avec la FAP de 45-47 kDa, la propriété de se lier à la fibronectine [134, 139, 214].

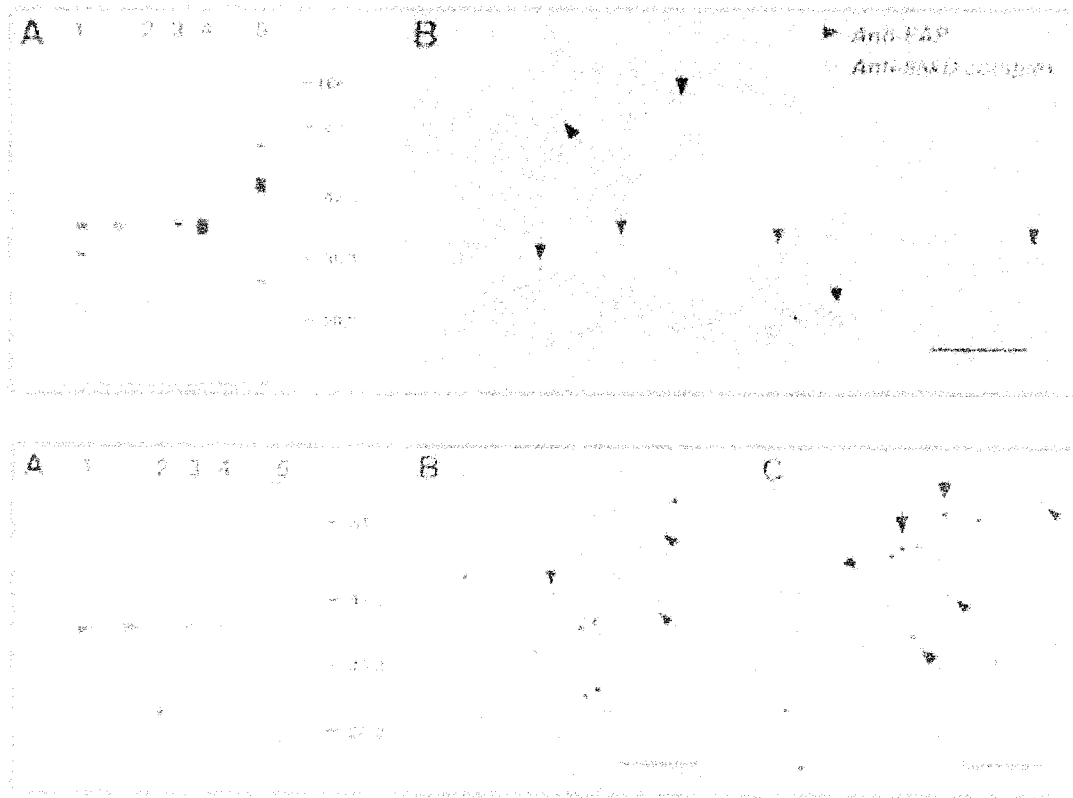


Figure 34: Identification et localisation de protéines mycobactériennes libérées depuis le phagosome.

Reconnaissance d'antigènes du complexe Ag85 kDa et de la Fibronectin Attachment Protein, puis mise en évidence de leur présence dans les vésicules multilamellaires et multivesiculaires lysosomales des compartiments de classe II du CMH à l'aide d'anticorps marqués [14].

Des peptides mycobactériens gagnent donc les compartiments de classe II, en l'absence de toute lyse de bacilles. Des lymphocytes CD4⁺ reconnaissent l'antigène de 30-32 kDa faisant partie du complexe antigénique Ag85, ce qui suggère que l'exportation des antigènes est associée à une présentation efficace aux cellules T par les molécules de classe II appropriées [211].

La membrane phagosomale exprime également des protéases en quantité suffisante pour cliver directement des protéines exogènes solubles. Les antigènes ainsi lysés s'associent aux molécules de classe II pour former des complexes qui sont transportés à la surface de la CPA et présentés aux cellules T. Ces protéases permettent ainsi un séquençage direct d'antigènes dans le phagosome en shuntant la digestion lysosomale classique.

Les antigènes sécrétés par les mycobactéries en position intracellulaire représentent une part essentielle des antigènes à l'origine de la réponse immunitaire spécifique protectrice. Les LT CD4⁺ ne réagissent que très faiblement aux antigènes issus des bacilles tuberculeux tués par la chaleur. [229]. Leur répertoire est par ailleurs extrêmement vaste et peut varier chez le même hôte au cours du temps [211, 212].

La sécrétion de cytokines est la fonction effectrice majeure des LT CD4⁺ TCR $\alpha\beta$. Cette sécrétion spécifique pourrait débuter dès la fin de la première semaine de la primo-infection et atteindrait son maximum vers la troisième-quatrième semaine, période qui

correspond à l'arrêt de la croissance puis à la baisse de la charge mycobactérienne de l'hôte [45, 128].

L'IFN γ et l'IL-12 sont essentielles à la transformation de Tho en lymphocytes de profil Th1 qui sont nécessaires à la réponse protectrice anti-mycobactérienne. L'IL-10 exerce un effet contraire et désamorce l'efficacité de l'immunité cellulaire [37].

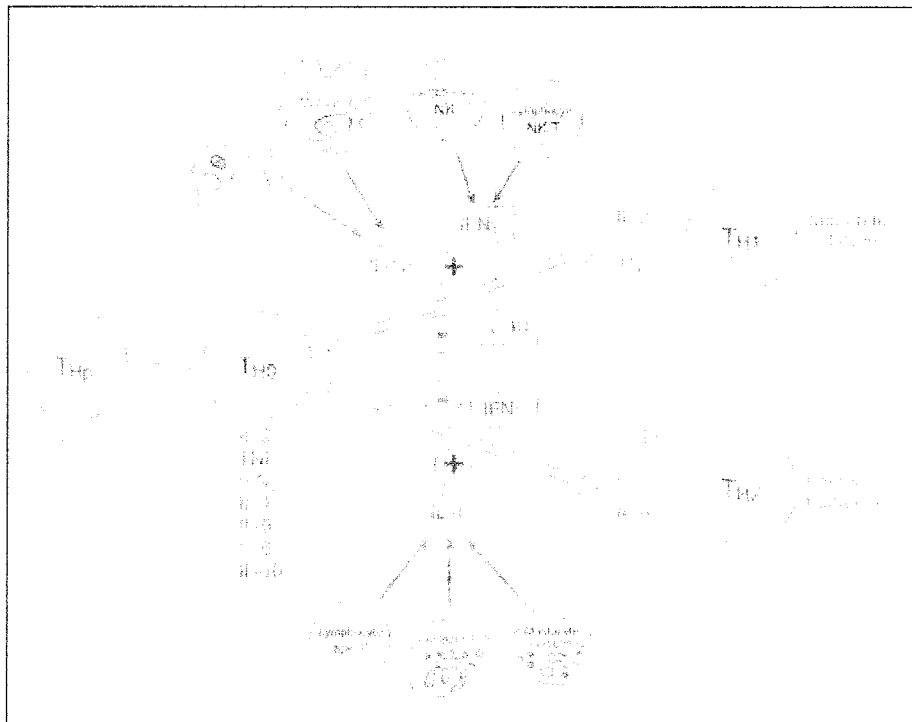


Figure 35: Différenciation des lymphocytes T CD4+ en sous-populations sécrétrices distinctes [37].

Lors de l'infection à *M. avium* chez la souris, les LT CD4+ assurent l'essentiel de la protection par une forte synthèse d'IFN γ , activée par la libération d'IL-12.

La délétion génétique du CD4+ ou du CMH de classe II chez la souris infectée, se traduit initialement par une très importante diminution de la production d'IFN γ ; mais après trois semaines, un phénomène de compensation s'installe grâce à la sécrétion active d'interféron par d'autres populations lymphocytaires.

Les LT CD4+ possèdent aussi des propriétés cytotoxiques vis-à-vis des phagocytes infectés. Ils agissent majoritairement sur les CPA par la voie apoptotique Fas-FasL [72, 191, 198]. *In vitro*, le blocage de la voie Fas-Fas-L entraîne une baisse globale de la cytotoxicité des lymphocytes CD4+ et CD8+ vis-à-vis des antigènes mycobactériens de 25% [191].

L'apoptose des cellules infectées par la voie Fas-FasL provoque la libération des mycobactéries phagocytées vers le milieu extracellulaire mais elles restent enfermées dans les corps apoptotiques [37]. On s'accorde actuellement sur l'absence de mycobactéricide associée au mécanisme apoptotique de Fas-Fas-L initié par les lymphocytes T. Il assurerait au mieux un effet bactériostatique [29, 72, 175, 198].

La libération de ces mycobactéries vivantes au sein des corps apoptotiques permettrait leur capture et leur destruction par des macrophages fraîchement recrutés et activés par l'IFN γ et d'autres cytokines de type I [72, 175].

Quelques rares clones cytotoxiques CD4⁺ montrent une très faible activité mycobactéricide qui s'avère, en fait, résulter de la sécrétion simultanée d'IFN γ par ces clones. Les clones non sécrétant n'exercent qu'une activité cytolytique déclenchée par la liaison de Fas-L sur la cellule présentatrice d'antigènes mycobactériens [191].

La reconnaissance antigénique peut également provoquer la libération de TNF α lymphocytaire soluble ou membranaire. Cette cytokine se lie au récepteur TNFRp55 des macrophages infectés et déclenche leur apoptose. Ce mécanisme ne semble pas non plus provoquer la mort des mycobactéries intracellulaires [55, 72].

La libération d'ATP suite à l'apoptose des CPA pourrait néanmoins concourir à l'activation ou la stimulation de mécanismes mycobactéricides dépendant des récepteurs purinergiques.

1.2. Antigènes peptidiques et lymphocytes TCR $\alpha\beta$ CD8⁺ :

Chez la souris, les délétions du CD8, de TAP1, de la β 2 microglobuline ou du CMH I ont entraîné, à des degrés divers, une plus grande susceptibilité à l'infection tuberculeuse des souris mutées et un temps de survie nettement raccourci comparé à celui des souris sauvages [197].

Par contre, les souris délétées pour la microglobuline ne sont pas plus sensibles à l'infection à *M. avium*, ce qui suggère que les deux espèces mycobactériennes mobilisent des effecteurs cellulaires distincts, ou bien les mêmes en des proportions sensiblement différentes, avec une population CD8⁺ minoritairement impliquée [196].

Entre la deuxième et la quatrième semaine post-infection, les lymphocytes CD8⁺ migrent vers les poumons selon une cinétique identique à celle des CD4⁺. Ces lymphocytes CD8⁺ attirés vers le site inflammatoire expriment un phénotype qui témoigne de leur activation [184].

Une fois prouvée l'existence d'une population de LT $\alpha\beta$ CD8⁺ restreints au CMH I en réponse à l'infection mycobactérienne, reste à comprendre comment des antigènes mycobactériens peuvent être présentés par les molécules du CMH de classe I, alors que cette voie est théoriquement inaccessible aux produits issus des vésicules phagosomales.

Les connaissances actuelles sur le déroulement de la voie classique de présentation des antigènes peptidiques aux cellules T sont résumées sur la figure suivante :

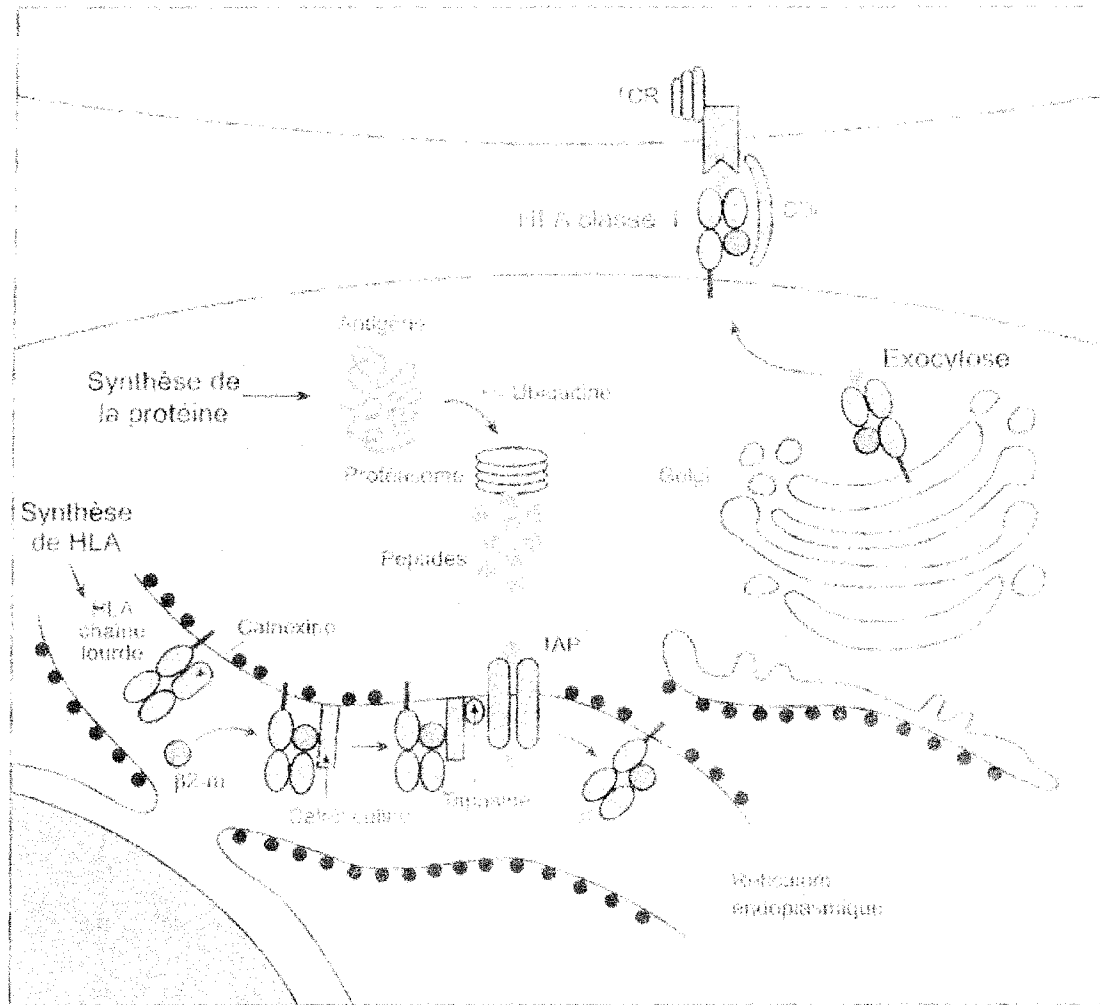


Figure 36: Voie de présentation de l'antigène peptidique par les molécules de classe I du CMH. (In : JF BACH 1999, Immunologie p 49).

Le protéasome est un système polyenzymatique qui clive la protéine cytosolique en petits peptides solubles. Ces derniers doivent gagner le reticulum endoplasmique de façon active, grâce au transporteur ATP dépendant « TAP », constitué de deux protéines TAP1 et TAP2, codées au niveau du CMH II. La chaîne lourde et la $\beta 2$ microglobuline s'associent au peptide au niveau du transporteur TAP. Puis le complexe ainsi formé et stabilisé gagne le Golgi pour une ultime étape de glycosylation de la chaîne lourde, avant son exposition à la surface de la CPA. Les protéines calnexine, calcitréculine et tapasine sont des protéines chaperon qui stabilisent les molécules de classe I jusqu'à leur appariement au peptide antigénique.

Les protéines sécrétées par les bacilles pourraient transiter par les pores de la membrane phagosomale et se retrouver libres dans le cytoplasme de la CPA. Elles peuvent alors être prises en charge par les protéasomes, comme le serait n'importe quelle protéine cytosolique endogène, et suivent le cheminement de la voie classique du CMH I : reticulum, Golgi, membrane plasmique de la CPA [196].

Pour certains auteurs, *M. tuberculosis* finirait par devenir un hôte cytoplasmique de la cellule phagocytaire, en conséquence de la lyse totale de la membrane phagosomale. Les protéines synthétisées et libérées par le bacille seraient directement relarguées dans le cytosol et prises en charge par les protéasomes. Mais si l'on observe effectivement, dans certains cas,

M. tuberculosis en position intracytoplasmique quatre à cinq jours après sa phagocytose, force est de constater que la présentation d'antigènes mycobactériens à des lymphocytes CD8⁺ est détectée dès la douzième heure post-ingestion [72].

Lorsque des antigènes peptidiques solubles sont phagocytés avec des bacilles tuberculeux et internalisés au sein des mêmes phagosomes, il semble que la mycobactérie facilite la présentation de ces antigènes par les molécules de classe I, grâce à un mécanisme dépendant de TAP, ce qui prouve que ces antigènes solubles gagnent le cytoplasme. Cet effet facilitateur de *M. tuberculosis* est proportionnel au degré d'infection du phagocyte et de la virulence de la souche bacillaire [72].

Parmi les antigènes mycobactériens reconnus par les CD8⁺ restreints au CMH I, on trouve par exemple, les lipoprotéines de 19 et 38 kDa, des protéines du complexe antigénique Ag 85 notamment Ag85 A, l'ESAT-6, des protéines de choc thermique HSP65 et 70 [196]. La plupart des molécules du CMH I classique identifiées chez les personnes infectées sont de l'haplotype HLA-A ou HLA-B.

Néanmoins cette population de lymphocytes CD8⁺ semble être très nettement minoritaire lors de la primo-infection tuberculeuse : dans les prélèvements sanguins de personnes PPD⁺, seuls 4% des clones des LT CD8⁺ étaient restreints au CMH I classique, ou CMH Ia, (comprenant chez l'homme HLA-A, HLA-B, HLA-C), contre 96% de clones restreints au CMH I non classique ou CMH Ib [73, 196, 198].

Ces lymphocytes CD8⁺ reconnaissent des antigènes mycobactériens générés dans le protéasome mais qui ne nécessitent pas le transporteur TAP. Les molécules présentatrices qui prennent ces antigènes en charge sont non polymorphes et comprennent également une chaîne de $\beta 2$ microglobuline [197]. Elles s'associent à de petits peptides à extrémités N-formyl produits par les mycobactéries. Plusieurs lignées de LT répondant à ces peptides particuliers ont été étudiées *in vitro* : la très grande majorité d'entre eux sont des LT CD8⁺, mais on trouve également quelques lymphocytes $\alpha\beta$ DN CD4-CD8- [72].

Les LT CD8⁺ restreints au CMH Ia et Ib sont capables de sécréter des cytokines de type 1 comme l'IFN γ , mais ils en libèrent moins que les CD4⁺ [72, 73, 175, 196]. On distingue des CD8⁺ sécréteurs de type 1 ou de type 2 appelés Tc1 et Tc2 par analogie aux CD4⁺ Th1 et Th2. L'antigène reconnu par le TCR du CD8⁺ joue là aussi un rôle important dans l'orientation du type sécrétoire [93].

Lors de l'infection mycobactérienne, l'exocytose de granules est la voie prépondérante de destruction des CPA par les LT CD8⁺ TCR $\alpha\beta$ restreints au CMH I [37, 72, 73, 191, 198]. Ces lymphocytes représentent la majorité des cellules T cytotoxiques retrouvées dans les poumons de souris infectées par *M. tuberculosis Erdman* [185]. Une proportion mineure de lymphocytes CD8⁺ détruit les CPA par la voie Fas-Fas-L [72, 73, 191].

Contrairement à ce mécanisme, l'action des granules sur la cellule cible s'accompagne de la mort des mycobactéries phagocytées.

Les granules cytotoxiques contiennent plusieurs enzymes. Les granzymes A et B sont des sérines estérases inductrices de l'apoptose de la cellule cible. La perforine entraîne la lyse de la cellule en provoquant des pores au sein de ses membranes plasmique et vésiculaires. La perforine n'entraîne que la lyse de la cellule sans déclencher la fragmentation de l'ADN, contrairement aux granzymes qui activent la cascade des caspases. Mais sans l'existence des pores créés par la perforine, les granzymes sont incapables de pénétrer dans la cellule [18].

Chez les lymphocytes granulaires humains, on a récemment découvert la présence d'une enzyme supplémentaire : la granulysine est une protéine dite « saponine-like » de 9 kDa, qui catabolise les sphingolipides, que l'on trouve dans les membranes eucaryotes. Utilisée seule *in vitro*, elle tue 90% des bacilles d'une culture de *M. tuberculosis* de façon dose dépendante mais elle se montre incapable de les détruire lorsqu'ils sont en position intracellulaire [65, 110]. Son association synergique avec la perforine permettrait à la granulysine d'accéder efficacement au cytoplasme de la cellule cible [185]. La granulysine atteint probablement les bacilles intraphagosomiaux, soit grâce à l'action de la perforine sur la membrane du phagosome, soit grâce aux pores formés préalablement par les hémolysines-like des mycobactéries phagocytées.

Au microscope électronique, on constate après 24 heures d'incubation de la granulysine avec les bacilles libres, un détachement de la membrane mycobactérienne externe ; au bout de 80 heures la membrane plasmique des bacilles se rompt, libérant alors le contenu cytosolique dans le milieu de culture. La lenteur relative du processus de lyse pourrait être liée à la très grande richesse en lipides de la membrane externe et de la paroi qui entourent la membrane plasmique des mycobactéries [65]. Au contact des mycobactéries, la granulysine affecte directement la membrane bactérienne en désorganisant les charges négatives des phospholipides, grâce à sa portion riche en arginine fortement cationique. Une fois la membrane plasmique mycobactérienne lésée, les éléments et les fluides intrabacillaires s'échappent vers le milieu extérieur [110].

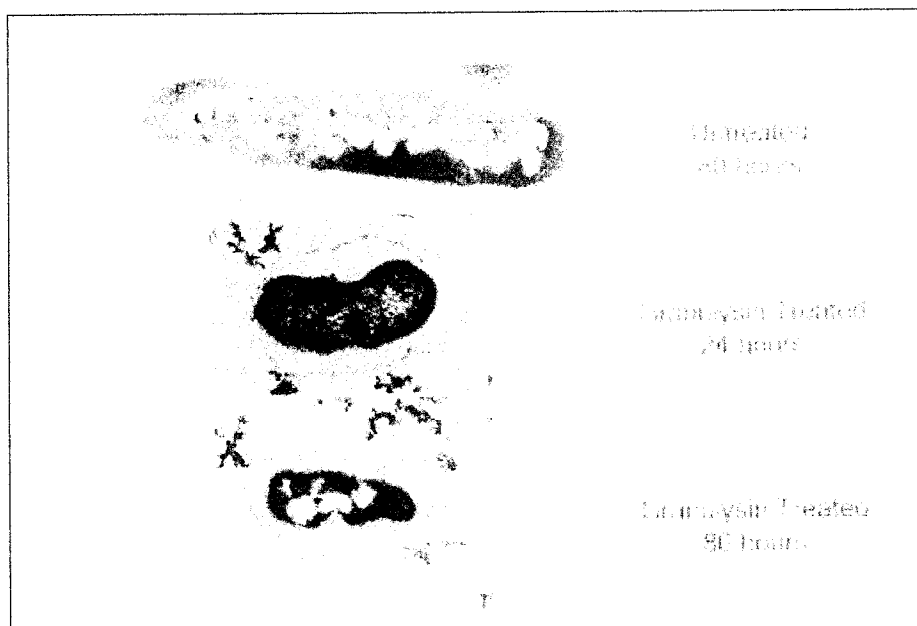


Figure 37: Effet létal direct de la granulysine sur *M. tuberculosis* [65]. Contrôle négatif à 80 heures ; effet après 24 heures, puis 80 heures de contact.

L'efficacité de la granulysine est dépendante du pH et décroît avec l'acidité. Le phagosome mycobactérien, qui possède un pH proche de la neutralité, apparaît dans ce cas précis défavorable aux mycobactéries qui vont y subir l'action quasi-optimale de la granulysine.

En activant une sphingomyelinase membranaire qui scinde les sphingomyélines en céramides, la granulysine pourrait également déclencher une des voies de l'apoptose conduisant à la disruption de la chaîne respiratoire mitochondriale [110].

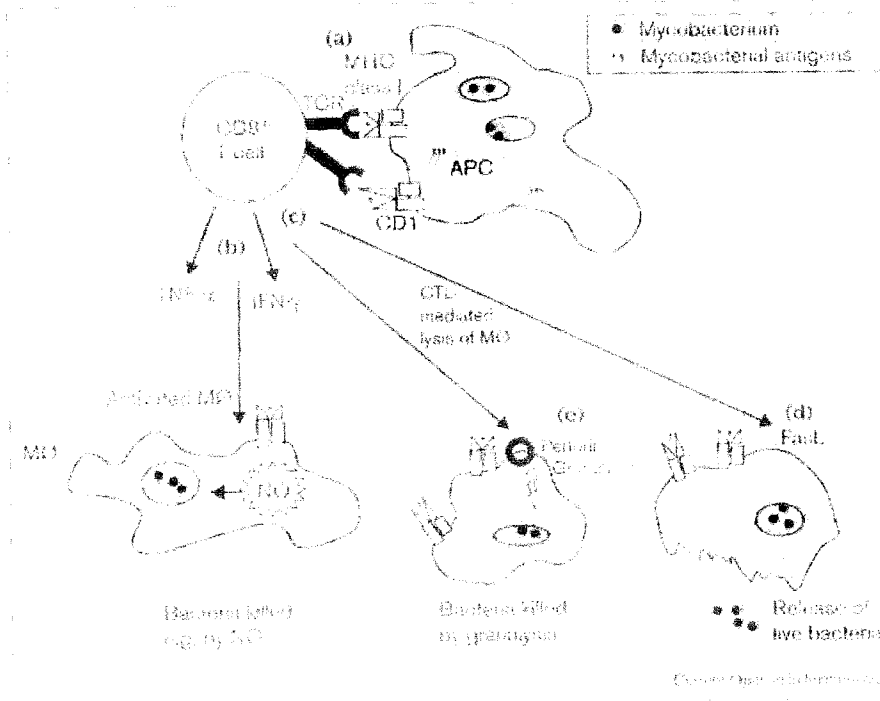


Figure 38: Mécanismes de protection face à *M. tuberculosis* identifiés chez les lymphocytes T CD8+ humains [73]. Libération de cytokines activatrices et production de radicaux nitrés ; destruction phagocytaire et bactéricidie via les granules cytotoxiques ; apoptose des phagocytes via la voie Fas-Fas-L libérant des bacilles vivants.

1.3. Antigènes non peptidiques et lymphocytes TCR αβ :

Il existe également des LT CD8+, restreints aux molécules CD1, qui reconnaissent des antigènes mycobactériens glycolipidiques présentés notamment par le CD1b et le CD1c [55, 72, 73, 198, 204, 214]. Cette population de lymphocytes reste cependant très minoritaire, elle est même inexistante chez certaines personnes saines infectées [196, 198].

En fait, les antigènes glycolipides présentés par les CD1a, b ou c (ou CD1d chez la souris), réagissent essentiellement avec des lymphocytes αβ DN et des lymphocytes NK T, qui possèdent à la fois les récepteurs KIR et KAR des cellules NK et un TCR à variation très limitée [214].

La prise en charge des antigènes lipidiques par les CD1 est rendue possible grâce aux capacités de ces antigènes à franchir passivement les bicouches membranaires de la cellule phagocytaire. Nous avons vu plus haut que les molécules de PIM, LAM et lipomannanes synthétisées en permanence par les mycobactéries, peuvent aisément sortir du phagosome, voire du phagocyte [166, 175]. Elles peuvent aussi franchir les membranes sous une forme encapsulée de petites vésicules appelées exosomes, qui circulent alors librement dans le

cytoplasme et s'intègrent éventuellement aux organites du réseau endolysosomal [38, 166, 202].

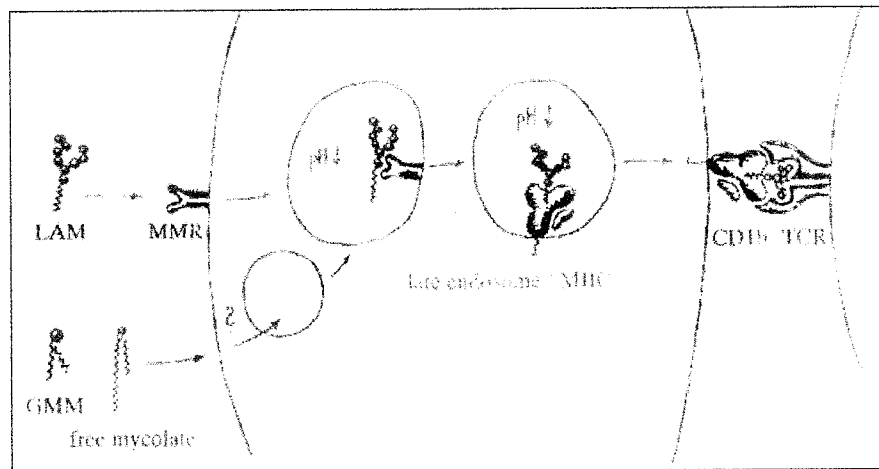


Figure 39: Exemple de transit et de capture d'antigènes mycobactériens lipidiques libres [214]. Fixation du LAM sur le récepteur Mannose (MMR) ; franchissement passif des mycolates libres. Traitement enzymatique à pH acide au sein des endosomes secondaires et compartiments de classe II.

On constate une accumulation de lipides et glycolipides mycobactériens sortis du phagosome, dans les compartiments multilamellaires et multivésiculaires de classe II, où ils sont associés aux CD1b et CD1c. C'est dans ces compartiments que l'on retrouve, par exemple, le Man LAM de *M. tuberculosis* et l'AraLAM de *M. avium* [14, 204]. Le CD1c est par ailleurs détecté à la surface du phagosome mycobactérien et pourrait ainsi s'associer directement aux antigènes glycolipidiques, dès la phagocytose, et transiter vers les vésicules du réseau endosomal secondaire, grâce à son motif cibleur ; le recours au traitement de l'antigène en milieu acide ne serait alors pas nécessaire [204].

Les lymphocytes $\alpha\beta$ restreints aux CD1 (essentiellement des LT DN) sont capables de libérer de l' $\text{IFN}\gamma$ [198].

Les cellules CD8+ qui reconnaissent les antigènes mycobactériens lipidiques présentés par les CD1 peuvent aussi lyser les macrophages infectés par *M. tuberculosis* grâce à la libération de granules [55]. Il semble que les lymphocytes DN restreints aux CD1 lysent les cellules infectées quasi-exclusivement par la voie Fas-Fas-L ; ils ne provoquent pas non plus la mort des mycobactéries internalisées [55, 198].

1.4. Antigènes non peptidiques et lymphocytes TCR $\gamma\delta$:

Outre les lymphocytes $\alpha\beta$ CD3+ DN et NK T, les antigènes lipidiques mycobactériens présentés par les CD1 sont reconnus par des lymphocytes CD3+ $\gamma\delta$ [198, 214]. La grande

majorité de ces lymphocytes est capable de reconnaître l'isoforme CD1c, c'est-à-dire celui des CD1 qui possèdent le plus large éventail de présentation antigénique [204].

Comparés aux LT $\alpha\beta$, les TCR des lymphocytes $\gamma\delta$ sont assez peu variables [23, 214]. Certaines sous-populations sont prédominantes dans les tissus épithéliaux respiratoires ou intestinaux, ou encore dans la rate : c'est le cas, par exemple des LT V γ 1 chez l'homme, qui sont par contre très minoritaires parmi les LT circulants [78]. On pense que ces lymphocytes tissulaires jouent le rôle de patrouilleurs, de défenseurs de première ligne qui se tiennent aux portes d'entrée les plus fréquentes des infections. Pour certains auteurs, ces lymphocytes agiraient en fait lors de la phase précoce de la réponse innée, car ces LT seraient capables de reconnaître et de réagir aux CD1c, en l'absence d'antigène associé à l'isotype [78, 214].

Chez la souris et chez l'homme, les LT $\gamma\delta$ sont les premiers lymphocytes à s'accumuler dans les lésions granulomateuses. La preuve de leur rôle dans la protection antimycobactérienne *in vivo* est apportée par les souris délétées pour le TCR $\gamma\delta$: elles succombent beaucoup plus rapidement à des inoculations massives. Lors d'infections tuberculeuses expérimentales classiques, elles abritent une charge bacillaire bien plus élevée que les souris sauvages dès les premiers stades et leurs granulomes ont une architecture atypique, désorganisée ; ils évoluent rapidement en lésions pyogènes constituées de nombreux granulocytes neutrophiles [198].

Chez l'homme, les $\gamma\delta$ T du sang circulant expriment un phénotype V γ 2 V δ 2 ou V γ 9 V δ 2 [23, 55, 198].

Ces derniers possèdent la particularité de réagir à de petits antigènes mycobactériens non peptidiques, qui contiennent des résidus nucléotides phosphates et que l'on a nommés TUB Ag 1 à 4. Ces petits antigènes phosphorylés ont un poids inférieur à 1 kDa. Les $\gamma\delta$ T reconnaissent ces antigènes sans le concours de molécules du CMH ou de CD1, malgré leur structure amphiphile (la tête étant hydrophile et la queue carbonée hydrophobe) [15, 214]. Une molécule peptidique mycobactérienne soluble de 10 kDa pourrait servir de transporteur et de molécule de présentation exogène à ces petits antigènes : elle contiendrait dans sa structure la totalité de TUB Ag 1 et de TUB Ag 3 et permettrait ainsi une expression plus stable de ces antigènes à la surface de la cellule phagocytaire. Le transporteur mycobactérien ne réagirait qu'avec des TCR de type δ 2. Il semble néanmoins qu'il y ait peu de spécificité clonale pour des motifs phosphates distincts [23]. Ces lymphocytes $\gamma\delta$ proliféreraient avant la vague des LT $\alpha\beta$ CD4+ et CD8+ [198].

Enfin, chez l'homme et la souris, les V γ 9V δ 2 reconnaissent aussi des HSP mycobactériennes, par exemple HSP 60 et 65. La présentation de ces antigènes peptidiques au TCR reste à découvrir, soit une nouvelle famille de molécules de présentation encore inconnue ou une participation des CD1 nécessitant une interaction spécifique avec le TCR. Il peut aussi n'y avoir aucune interaction entre les HSP et le TCR. Les LT V δ 1 réagissent par exemple aux mycobactéries tuées et à la tuberculine purifiée [23, 198]. Ces lymphocytes déclenchent une réaction croisée avec les HSP 60, 65 et 70 des cellules eucaryotes de l'hôte, protéines générées par les macrophages, à la suite du stress provoqué par leur infection [23, 211].

Les lymphocytes $\gamma\delta$ restreints au CD1c et CD1b produisent aussi de l'IFN γ [15, 23, 198, 214]. Individuellement, les cellules $\gamma\delta$ sont des sécréteurs très efficaces d'IFN γ , voire plus que les CD4+, mais ils sont très minoritaires dans les organes où ils ne représentent que 5 % des cellules T. Globalement, l'ensemble des $\gamma\delta$ T produit deux fois moins d'IFN γ que la population des CD4+ [23]. Les $\gamma\delta$ T stimulés par *M. tuberculosis* produisent très peu d'IL-2 et sont donc tributaires des autres lymphocytes pour proliférer ; ils peuvent aussi se multiplier grâce à l'IL-15, qu'ils synthétisent en grande quantité [229].

Les LT $V\gamma 9 V\delta 2$ ou $V\delta 1$ restreints aux CD1 sont capables de lyser les phagocytes infectés grâce à la libération de granules cytotoxiques [55, 72, 175, 198, 214].

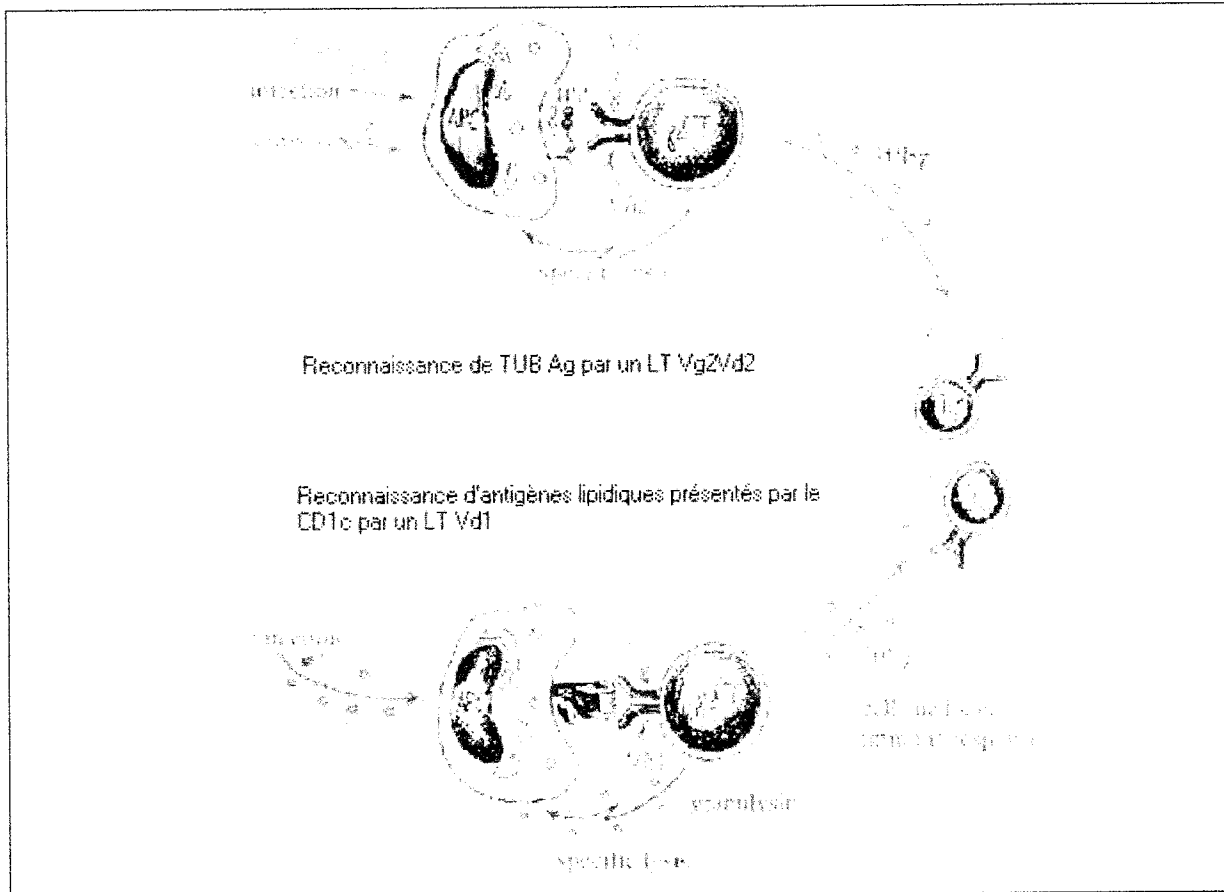


Figure 40: Reconnaissances antigéniques et fonctions des lymphocytes TCR $\gamma\delta$ [214]. Lyse spécifique des phagocytes infectés via la granulysine ou par contact Fas/FasL. Sécrétion d'interféron activant les lymphocytes helper et cytotoxiques environnants.

2. Perturbation de la réponse immunitaire spécifique par la mycobactérie :

2.1. Modération de la présentation antigénique par les CPA infectées :

La présence chronique de mycobactéries au sein des macrophages entraîne une diminution de l'expression membranaire des molécules de classe II du CMH et des CD1 a, b et c, alors que ce n'est pas le cas des cellules dendritiques infectées [51, 147]. On assiste au contraire à une augmentation de l'expression des molécules de classe I [51, 175].

Les bacilles tuberculeux vivants et leurs composants inhibent la capacité des macrophages à former des complexes associant un peptide et une molécule de classe II : selon certaines études, le blocage a lieu au niveau du transport post-golgien des molécules de présentation qui ne gagnent pas les vésicules secondaires et donc ne s'apparient pas avec les antigènes présents dans ces vacuoles [72] ; pour d'autres auteurs, le mécanisme de blocage fait intervenir un défaut de synthèse des molécules de classe II, mis en évidence chez les macrophages murins infectés par *M. tuberculosis* [145]. Cette activité inhibitrice sur la présentation de classe II est présente chez *M. avium*, chez *M. tuberculosis H37Rv* comme *H37Ra*. Le cytosol, la paroi, les membranes et filtrats de culture bacillaires possèdent chacun cette propriété inhibitrice. La lipoprotéine de 19 kDa bloque le processing des antigènes et l'expression des molécules du CMH de classe II par l'intermédiaire d'un signal dépendant du toll-like récepteur 2. En activant chroniquement le TLR2 depuis le phagosome, la lipoprotéine inhibe la détection par les LT CD4⁺ du macrophage infecté et favorise ainsi la persistance de l'infection mycobactérienne. Ce peut être une des explications à la survie de bacilles intracellulaires, et donc au maintien d'une infection latente, malgré une réponse T vigoureuse chez la grande majorité des hôtes [145].

On constate également une raréfaction des molécules de costimulation comme la B7-2 à la surface de la CPA, molécules qui activent le signal issu de la reconnaissance de l'antigène par le TCR et de la molécule du CMH avec le CD4⁺ ou le CD8⁺ [72, 175]. En l'absence de molécules de costimulation B7, qui se lient au CD28 du lymphocyte, le signal issu du TCR conduit à l'inactivation de la cellule T [37].

2.2. Sécrétion de cytokines inhibitrices :

Il existe des souches de *M. tuberculosis* particulièrement virulentes caractérisées par l'inhibition de la prolifération de cellules spécifiques d'une réponse de type 1. Par exemple, la souche hypervirulente *HN878* induit une très faible quantité de cytokines TNF α , IL-12 et IFN γ et une expansion très modérée des cellules immunitaires spléniques et ganglionnaires.

En fait ces souches induisent la production lymphocytaire d'IFN α/β , qui a un effet modérateur sur la sécrétion de cytokines par les cellules T et NK. Ces interférons agissent sur la synthèse, la translocation et la dégradation de NF-kB, ce qui explique la baisse de TNF α et l'IL-12. Ces interférons provoquent ultimement une diminution de la production de l'iNOS2. La virulence de ces souches particulières ne s'exprime qu'au moment de la phase spécifique de la réponse immunitaire et entraîne une réponse anti-tuberculeuse semblable à celle des souris SCID. A partir de la troisième semaine post-infection, ces souches provoquent une mortalité précoce avec une multiplication mycobactérienne sensiblement accrue [127].

Les mycobactéries induisent aussi la libération d'IL-10, de TGF β et de PGE2 qui désactivent les fonctions prolifératives et bactéricides des lymphocytes [72, 175, 230].

2.3. Stimulation de l'apoptose des lymphocytes T :

La présence chronique de mycobactéries entraîne l'augmentation de l'expression de Fas-L à la surface des cellules T TCR $\gamma\delta$, en particulier sur les lymphocytes V γ 9V δ 2 chez l'homme.

C'est la réaction du TCR avec l'antigène mycobactérien qui induit la multiplication des Fas-L sur le lymphocyte activé de façon chronique : le Fas-L réagit avec le Fas membranaire des leucocytes migrants au sein des lésions mycobactériennes et provoque la mort de ces lymphocytes T [23, 175, 198].

M. avium sérovar 1 souche 101 est capable de déclencher l'apoptose des LT CD8⁺ à partir de la troisième semaine post-infection chez la souris. *In vitro*, les lymphocytes T exposés à des macrophages infectés par *M. avium* subissent rapidement l'apoptose. Ce phénomène concerne les LT CD8⁺ et CD4⁺ mais avec une précocité supérieure pour les CD8⁺. Cela pourrait notamment expliquer l'apparente absence de rôle joué par cette population lymphocytaire dans l'infection par le bacille aviaire. Cette propriété est spécifique des bacilles vivants et virulents : *M. smegmatis* n'a aucun effet létal sur les lymphocytes T [172].

2.4. Diminution de l'apoptose spécifique des macrophages :

Les mycobactéries provoquent la baisse de l'expression des récepteurs Fas à la surface des macrophages qu'elles infectent. Ce mécanisme diminue sensiblement l'apoptose par contact cellulaire Fas-Fas-L initié par les lymphocytes T, notamment CD4⁺ [147].

3. La formation du granulome mycobactérien :

Le granulome est la signature histologique de la réponse immunologique cellulaire de l'infection mycobactérienne et de sa composante allergique associée, l'hypersensibilité retardée.

Le granulome se forme autour de macrophages qui restent infectés malgré ou en l'absence d'exécution de mécanismes mycobactéricides et cytolytiques de la réponse protectrice antérieure. Ces macrophages infectés chroniques vont se transformer en cellules épithélioïdes allongées de grande taille, au cytoplasme abondant. Ces cellules sont caractérisées par une sécrétion très active de cytokines et chimiokines contre une activité phagocytaire réduite comparée aux macrophages. La synthèse d'IFN γ par les lymphocytes T environnants favorise la transformation des macrophages en cellules épithélioïdes. Les cellules de Langhans résultent de la fusion de plusieurs cellules épithélioïdes en des cellules géantes et plurinucléées qui se regroupent en formation arrondie.

Les macrophages déjà infectés et les lymphocytes T activés déjà présents sur le site infectieux sécrètent des cytokines et chimiokines qui vont attirer par chimiotactisme de très nombreux monocytes et lymphocytes naïfs lymphatiques et sanguins qui se disposent à la périphérie du noyau épithélioïde. La présence de lymphocytes TCR $\gamma\delta$ limite l'accumulation de granulocytes neutrophiles et la nécrose tissulaire [179].

Les lymphocytes déjà en contact avec les antigènes mycobactériens présentés par les cellules macrophagiques, et qui possèderaient ainsi un phénotype « activation/mémoire » sécrètent en plus des cytokines particulières, le MIF (macrophage migration inhibitory factor) et le LIF (Leucocyte migration inhibitory factor) qui vont bloquer sur place les monocytes et

lymphocytes néorecrutés. Cela permet une croissance centrifuge du granulome, et non un va-et-vient permanent des cellules une fois activées [8, 112].

A la toute périphérie du granulome, des fibroblastes synthétisent du collagène, stimulés par l'IL-1 libérée par les macrophages et les monocytes du granulome naissant.

Granulome et bactériostatique. Les couches cellulaires qui s'accumulent progressivement autour du foyer infectieux pourraient participer à la limitation de la croissance des mycobactéries au sein du granulome. L'augmentation *in vitro* de la densité cellulaire de monocytes ou macrophages autour de phagocytes infectés accroît la formation des cellules géantes et entraîne une inhibition complète de la croissance des bacilles contenus dans ces cellules, qui finissent par subir l'apoptose. On suppose que les macrophages, placés dans des conditions de forte densité cellulaire, où les contacts membranaires semblent essentiels, libèrent alors des produits solubles, de petite taille, mycostatiques : l'ATP extracellulaire, ou des ions soumis à un mécanisme de capture, seraient des candidats potentiels [22].

Au sein des macrophages au centre des granulomes mycobactériens, l'expression de la NO synthétase inductible est permanente. Le blocage de cette enzyme entraîne une exacerbation de l'infection à *M. tuberculosis* avec une augmentation marquée de la charge bactérienne chez la souris, ce qui suggère un rôle bactériostatique du NO au sein du granulome tuberculeux. Par contre, chez des souris infectées par *M. avium*, dont la plupart des souches sont résistantes au NO, le blocage de l'enzyme provoque une modification de la composition cellulaire du granulome avec une augmentation des granulocytes et des lymphocytes B et T, sans aucun impact sur la charge mycobactérienne [62].

Les cytokines et chimiokines sécrétées en permanence par les cellules infectées ou activées permettent un recrutement et une activation continus, tant que les antigènes mycobactériens sont exprimés et présentés aux lymphocytes T [179].

Chimiokines et composition du granulome. Les chimiokines sont absolument essentielles à la constitution du granulome. Leur synthèse nécessite la présence de TNF α , qui joue un rôle d'inducteur et de régulateur [72].

La production de cytokines et chimiokines suscite en retour l'augmentation de l'expression des récepteurs CCR et CXCR notamment lymphocytaires. Les récepteurs comme le CCR1 avec ses ligands RANTES, MCP-2, ou MCP-3 jouent un rôle majeur dans le recrutement monocyttaire et lymphocytaire préférentiel. La délétion du CCR1 conduit à une augmentation de la composante neutrophilique du granulome mycobactérien et une aggravation marquée de la charge bactérienne [179].

En fait, l'action des chimiokines sur leurs récepteurs à la surface des lymphocytes et monocytes stimule l'expression membranaire des molécules d'adhésion cellulaire : adhésines, sélectines et intégrines. Par exemple, l'adhésine VCAM-1 est nécessaire à l'adhésion des lymphocytes sur des intégrines de l'endothélium inflammatoire et permet une diapédèse efficace des lymphocytes néorecrutés vers le granulome en formation. Le blocage des intégrines conduit à un recrutement à majorité neutrophilique et très faiblement lymphocytaire ; il entraîne la mort en deux semaines des souris infectées [179]. La délétion d'ICAM-1 chez la souris abolit la formation de tout granulome et empêche l'expression de l'HSR sans aucune conséquence néfaste, pendant les trois premiers mois de l'infection tuberculeuse. Mais elle se traduit un mois plus tard par la mort des souris avec une charge mycobactérienne très élevée et des plages de nécrose importantes et disséminées sans organisation compacte [180].

La réponse lymphocytaire est donc nécessaire et suffisante pour combattre l'infection durant les trois premiers mois mais elle n'est pas capable d'assurer sa contention par la suite sans la formation de granulomes compacts et de type majoritairement lympho-monocytaire.

Le granulome est donc nécessaire à la contention de l'infection dans la phase tardive de la réponse immunitaire protectrice. Il permet la circonscription des bacilles ayant survécu aux mécanismes létaux des phases précédentes et prévient ainsi la dissémination bactérienne. Il permet en outre de limiter l'environnement toxique nécessaire au contrôle de la croissance mycobactérienne et protège par cloisonnement les tissus sains adjacents au foyer infectieux.

L'accumulation cellulaire dense occasionne des contacts étroits entre macrophages et lymphocytes T, ce qui autorise une stimulation et activation continue des cellules par les antigènes mycobactériens.

4. Le devenir du complexe primaire :

Si le granulome ne se constitue pas d'une façon permettant la contention de l'infection, la lésion primaire peut être à l'origine d'une dissémination secondaire rapide, dans les semaines qui suivent la contamination. C'est le cas par exemple des humains déficients pour les cytokines activatrices ou leurs récepteurs, personnes chez lesquelles on assiste à une généralisation de l'infection par voie sanguine et lymphatique, qui peut devenir rapidement mortelle (méningite, péricardite, péritonite mycobactériennes) [57, 118, 150]. Les disséminations secondaires précoces resteraient néanmoins asymptomatiques chez une personne sur quatre, car elles parviendraient à contenir les multiples foyers bactériens grâce à une réponse spécifique multifocale accélérée. Ces personnes ne seraient pas contagieuses tant que ces lésions secondaires restent correctement circonscrites par les granulomes nouvellement constitués [128].

Les mycobactéries emprisonnées au sein d'un granulome lymphomonocytaire classique pourraient également être totalement détruites par les mécanismes bactéricides dont on ignore encore les modalités exactes. Ce granulome finirait par se calcifier et les antigènes mycobactériens seraient peu à peu éliminés par le turn-over cellulaire incessant des cellules phagocytaires mononucléées. Il est quasiment impossible d'estimer la fréquence de cette évolution granulomateuse particulière : pour certains auteurs, elle serait rarissime, pour d'autres, ce cas de figure ne se produirait pas et il s'agirait plutôt d'un granulome restant « étanche » et très stable dans le temps. L'infection mycobactérienne atteindrait un état de latence durable, voire définitif, et cette évolution caractériserait 90 % des personnes effectivement infectées par le bacille tuberculeux [45, 128].

On sait très peu de choses sur l'état de latence et, nous l'avons vu, sur les caractéristiques de la dormance des bacilles. En 2001, une équipe américaine a proposé, pour la première fois, un modèle statistique permettant d'envisager tous les cas d'évolution possibles de l'infection tuberculeuse chez l'homme, en étudiant les probabilités de tout événement pouvant résulter des principaux mécanismes cellulaires connus. Ce modèle ne prend en compte que les cytokines IL-12, IFN gamma, IL-4 et IL-10 mais il est déjà d'une très grande complexité. Il parvient à intégrer toutes les situations et évolutions que nous avons envisagées précédemment. Ce modèle s'appuie sur des comptages cellulaires et dosages de cytokines réalisés sur des prélèvements de lavages bronchoalvéolaires chez des

personnes PPD+ saines et malades. Selon ce modèle, l'équilibre du système immunitaire qui caractérise l'état de latence, est atteint en une année environ post-infection en moyenne, alors que l'infection est contrôlée dès la fin du troisième mois (ce qui correspond au laps de temps moyen nécessaire pour la constitution d'un granulome).

L'état de latence est caractérisé par une charge mycobactérienne très faible et très peu variable dans le temps : seules existeraient des modifications minimales correspondant à des poussées de croissance contrecarrées par les réponses du système immunitaire. Les mycobactéries extracellulaires seraient inexistantes, la charge bactérienne étant concentrée dans un petit nombre de macrophages infectés chroniques, avec très peu de macrophages activés. Le taux l'IL-4 serait très bas, et celui de IFN γ significatif mais contrôlé par l'IL-10, cette cytokine assurant ainsi la protection des tissus environnants [230].

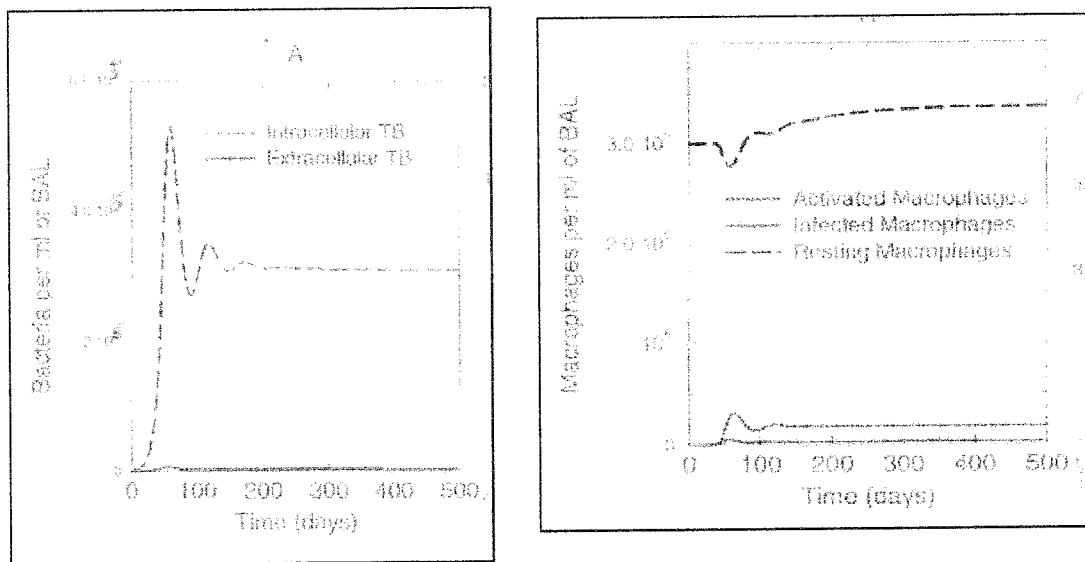


Figure 41: Modélisation de la localisation mycobactérienne et de l'activité macrophagique lors de l'état de latence chez l'homme [230].
a) Nombres de mycobactéries intracellulaires et extracellulaires par ml de liquide de lavage bronchoalvéolaire.
b) Nombre de macrophages au repos, infectés et activés par ml de liquide de lavage bronchoalvéolaire.

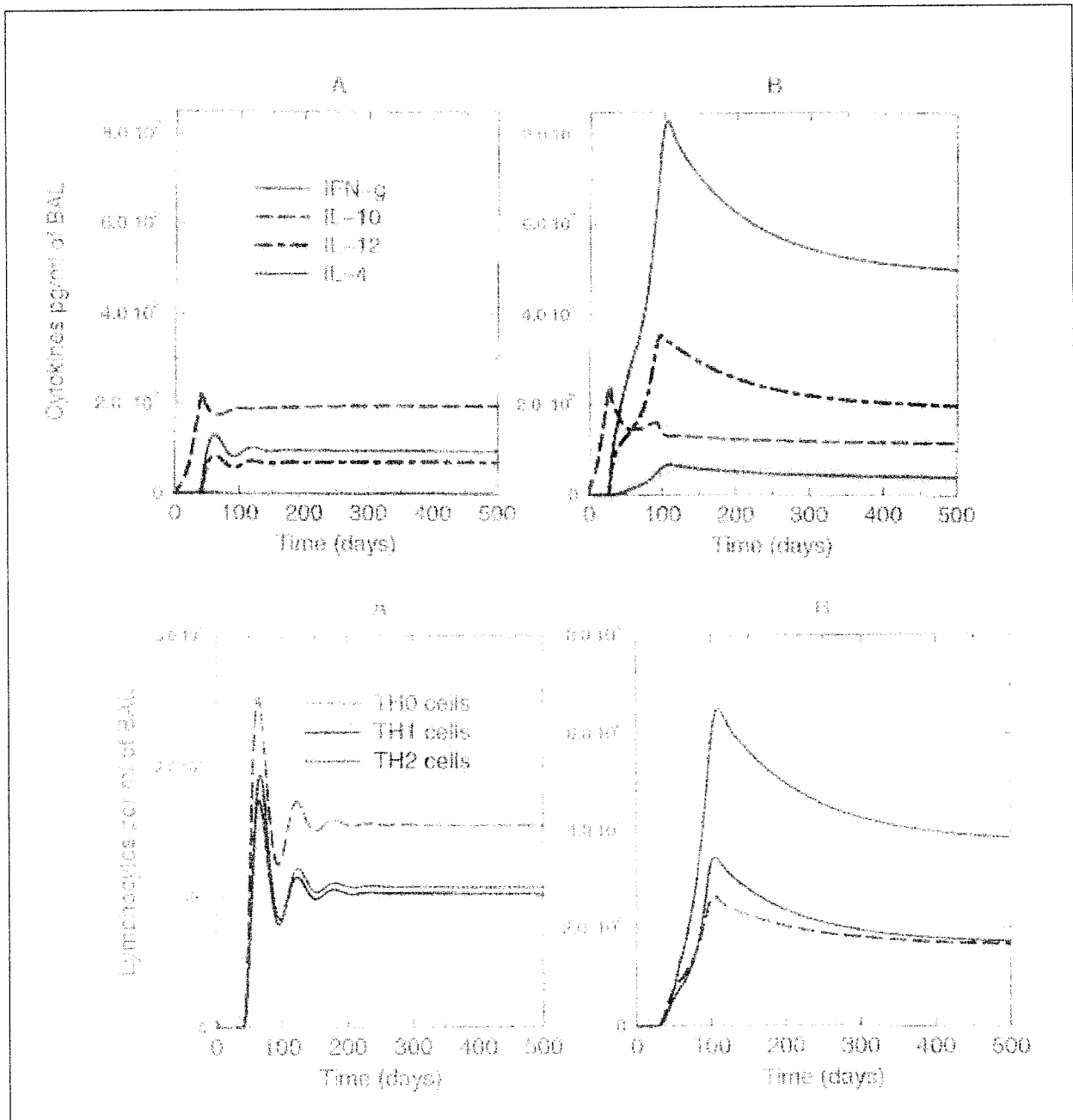


Figure 42: Comparaison des concentrations locales en cytokines et des populations lymphocytaires sécrétantes pendant l'état de latence (A) et la tuberculose active (B) [230].

Cet état de latence peut perdurer des années, des décennies, voire se maintenir jusqu'à la mort de l'hôte, qui reste sain. Mais pour 5 % (intervalle de 2-23 %) des personnes infectées immunocompétentes (le risque est estimé à près de 10 % par an pour une personne séropositive pour le VIH), cet état de latence va être modifié par divers facteurs qui vont entraîner la levée de dormance des bacilles, la réactivation des foyers infectieux et l'apparition des symptômes de la tuberculose [45, 128, 179].

TROISIEME PARTIE :

MECANISMES DE LA REACTIVATION ET DE LA PHASE
CLINIQUE DE L'INFECTION

I. LE REVEIL DE L'INFECTION MYCOBACTERIENNE :

La progression directe de la primo-infection vers l'expression clinique de symptômes de la mycobactériose, sans passer par une phase de latence, est rare mais possible, notamment dans le cas d'individus porteurs d'anomalies génétiques congénitales évoquées plus haut. Globalement, le risque de développer la maladie est estimé de 3 à 10 % dans les deux premières années suivant la contamination, puis ce risque décroît jusqu'à 0.05 à 1 % par an [228].

Une surcontamination par une nouvelle souche mycobactérienne à l'origine des symptômes déclarés semble encore actuellement un événement minoritaire dans les pays industrialisés mais elle progresse dans les régions endémiques et concerne plus particulièrement les personnes séropositives [175, 179].

Ainsi, chez les sujets immunocompétents, l'apparition de symptômes résulte encore, dans la grande majorité des cas, de la réactivation d'une infection dormante contractée souvent il y a plusieurs années [157, 179]. Il semble donc que la stérilisation définitive de la primo-infection soit extrêmement difficile à obtenir malgré une réponse immunitaire apparemment forte et adéquate, initialement développée chez ces personnes contaminées.

Comment les mycobactéries parviennent-elles à survivre, parfois pendant plusieurs décennies, chez des hôtes dont le système immunitaire exerce encore, théoriquement, une pression locale permanente afin de maintenir un milieu défavorable à leur croissance ? Ce point crucial de la pathogénie mycobactérienne reste à élucider. La localisation même des mycobactéries durant la phase de latence ne fait pas l'unanimité. Elles pourraient persister au sein des sites de calcification et de fibrose des granulomes, zones où l'oxygène disponible serait rare. Pour d'autres auteurs, la majorité des granulomes deviendraient stériles après quelques années alors que des tissus macroscopiquement sains hébergeraient des bacilles ; ces derniers s'abriteraient notamment dans les régions pulmonaires apicales ou subapicales, où la pression en oxygène est élevée mais la perfusion tissulaire faible, d'où une mauvaise redistribution locale des cellules immunitaires. Cela pourrait expliquer l'incapacité des antibiotiques efficaces contre les bactéries « anaérobie », comme le métronidazole, à tuer les mycobactéries pendant la phase de latence chez la souris [175, 228].

Dans quel état métabolique se trouvent les bacilles durant la période de latence. Il semble y avoir un lien certain entre l'oxygène disponible, le métabolisme et la croissance mycobactérienne. Si l'on baisse progressivement l'oxygène disponible sur des cultures bactériennes en laboratoire, les bacilles placés en condition d'anoxie adoptent un mode de survie anaérobie sans aucune réplication. Replacés en milieu aéré, ils resynthétisent immédiatement de l'ARN messager et se divisent au bout de huit heures de façon synchronisée [226]. D'après l'étude du génome de *M. tuberculosis H37Rv*, des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides mycobactériens joueraient un rôle important dans la variation du métabolisme bacillaire : la bactérie percevrait et réagirait à des stimuli extracellulaires émis par la réponse immunitaire de l'hôte ; elle serait alors capable de déclencher une adaptation à un milieu pauvre en oxygène pour devenir une bactérie microaérophile. Des protéine-kinases seraient stimulées au niveau de leur terminaison C transmembranaire et orchestreraient notamment des signaux de transduction modifiant les voies métaboliques. Les stimuli issus du milieu extrabacillaire agiraient sur les lipides et lipoprotéines de l'enveloppe mycobactérienne. Des gènes codant pour des protéines spécialisées dans la capture de l'oxygène ont également été identifiés [42, 174, 175].

L'accumulation de lymphocytes et de monocytes autour de petites colonies bacillaires entraîne une baisse nette de leur activité répliquative. Chez la souris, *in vivo*, la densité lymphocytaire au sein du granulome décroît en même temps que la maladie commence à se réactiver. Pour autant, une corrélation de type causal direct reste à démontrer : la désintégration du granulome précède-t-elle la reviviscence mycobactérienne ou en est-elle la conséquence ? Enfin, d'autres événements immunitaires encore non décrits pourraient intervenir [179].

On serait donc tenté d'entrevoir un lien entre l'intensité de la réponse immunitaire par le biais de la densité cellulaire péribactérienne, déterminant l'oxygène disponible pour les bacilles, lui-même conditionnant le métabolisme et donc la croissance des mycobactéries au sein des granulomes. Les bacilles pourraient donc sortir de l'état de dormance quand les conditions de l'inflammation locale au sein du granulome sont modifiées, même de façon temporaire, ce qui augmente l'apport d'oxygène et leur permet de se multiplier activement à nouveau [226].

Parmi les facteurs de réactivation, la cigarette, le diabète, la malnutrition, l'hémophilie, la présence d'un cancer ou d'une silicose pulmonaire peuvent multiplier jusqu'à trente fois le risque de développer une tuberculose clinique. Certaines personnes ne présentant aucun de ces facteurs exprimeront néanmoins les symptômes de la maladie [228].

Nous allons envisager les effets connus de trois facteurs identifiés comme causes majeures de réactivation de l'infection mycobactérienne dormante. Nous insisterons essentiellement sur les aspects concernant la surinfection par le virus VIH-1.

1. Effets de la co-infection mycobactéries/ VIH-1 :

Le virus du SIDA ou VIH-1 (pour Virus de l'Immunodéficience humaine), est responsable de 3 millions de morts par an et infecte aujourd'hui plus de 42 millions de personnes dans le monde. En multipliant par près de 170 le risque de développer une tuberculose maladie, ce virus est actuellement le premier facteur responsable du passage à l'expression clinique de l'infection, à la fois par réactivation et par le développement direct de la primo-infection [91, 95, 146, 168, 228]. Ce risque, pour une personne séropositive, est estimé entre 5 et 16 % par an [96, 157, 179].

La co-infection mycobactéries/VIH modifie parfois les symptômes de l'infection tuberculeuse et accélère très défavorablement son évolution, en l'absence de traitement adéquat (voir tableau suivant).

A un stade avancé du SIDA, l'apparition, à la faveur de l'immunodépression viro-induite, de mycobactérioses atypiques dues à des bacilles opportunistes comme *M. avium*, raccourcit très nettement l'espérance de vie des malades [41, 85].

	BACTERIE	INFECTANTE
HOTE	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. avium</i>
Homme séronégatif pour le VIH 1	<ul style="list-style-type: none"> *contamination par inhalations répétées d'aérosols infectieux [43, 45] *développement de la forme clinique dans 5 à 10% des cas [128, 230]. *atteinte pulmonaire prépondérante à 85% [50], seule forme contagieuse pour l'homme, dissémination possible dans 5% des cas (foie, rein, os, méninges...) [28] *dans pays développés : touche surtout personnes âgées ou très jeunes, ou jeunes adultes issu de milieux socioéconomiques défavorisés [12], immigrants venant de pays endémiques. * touche toutes les catégories d'âge dans les pays en voie de développement où la tuberculose est presque une épidémie. 	<ul style="list-style-type: none"> *infection rare même lors d'immunodépressions iatrogènes (greffes) *par inhalation d'aérosols formés par les douches, les eaux de surface par ingestion eau ou aliments contaminés [9, 41, 227] *formes pulmonaires possibles si immunodéficience locale ou pathologie intercurrente pulmonaire: tuberculose, cancer, fibrose [152]; pas de distinction possible à la radio /bacille de koch. *adénopathies cervicales chez l'enfant [104, 207, 231] *dissémination et généralisation possible mais rarissime (surtout lors immunodépression iatrogène) [85] *sérovars identiques à ceux trouvés dans l'environnement du malade [227] *sans doute de très nombreux porteurs asymptomatiques ; bactérie fréquemment retrouvée dans les selles sans aucun symptôme associé.
Homme séropositif pour le VIH 1	<ul style="list-style-type: none"> *passage à forme active dans 30% des cas (réveil de forme latente ou primo-infection) [43] *apparition précoce dans l'évolution du SIDA : parfois valeur des lymphocytes T4 normale *forme pulmonaire dans 25 à 38% des cas [41] *évolution très rapide vers des formes extrapulmonaires et disséminées dans 70% des cas [195] *forme généralisée prépondérante au stade SIDA [195] *parfois absence de réactions inflammatoires ; signes radiologiques non caractéristiques, formes exsudatives. *population de jeunes adultes ou tous les âges (Afrique, Asie du Sud Est) [12]. 	<ul style="list-style-type: none"> *développement surtout depuis les années 80 *contamination par ingestion supposée : eau circuits urbains, aliments ; tractus digestif colonisé dans 80% des cas, au stade SIDA [227] *formes disséminées à évolution rapide lors stade Sida avancé à 80 %, formes souvent sans granulome ni inflammation [231] *détecté dans 50% des cas lors de stades terminaux [41, 85] avec symptômes peu spécifiques *sérovars 1, 4, 8 en Europe et USA, différents des sérovars présents dans l'environnement des malades sidéens [13, 43, 104, 231]. *actuellement : coinfection en voie de régression dans les pays développés grâce aux thérapies antibiotiques et antivirales associées [33, 224].

Tableau 6: Principales caractéristiques épidémiocliniques des infections à *M. tuberculosis* et *M. avium* associées ou non à une co-infection par le VIH-1

Depuis 1993, l'expression clinique d'une tuberculose pulmonaire ou extrapulmonaire détermine pour le patient séropositif adulte, le passage au stade SIDA déclaré (catégorie C), quel que soit son nombre de lymphocytes CD4+ [33, 157]. Cette tuberculose, dite « secondaire », va accélérer la progression de la maladie virale, avancer l'apparition du stade terminal et raccourcir très sensiblement le temps de survie du patient [168]. En général, la tuberculose se manifeste tôt dans l'évolution de l'infection virale. Souvent, la population des CD4+ avoisine les 250 cellules par mm³, au lieu de plus de 500 T4 chez une personne séronégative [218].

Le diagnostic d'une mycobactériose extrapulmonaire ou disséminée à *M. avium*, caractérise également l'atteinte de la phase SIDA chez un individu séropositif, mais en général le nombre de CD4+ T est beaucoup plus bas : inférieur à 100 par mm³, le plus souvent entre 25 et 50 lymphocytes T4 par mm³. L'infection à *M. avium* aggrave également le pronostic vital des malades [44, 96].

L'hypothèse d'un réveil de multiples foyers dormants dans divers organes après une infection contractée antérieurement s'oppose à celle d'une primo-infection très récente permise par l'effondrement de l'immunité lié au SIDA. Cette dernière hypothèse s'accorde davantage avec les découvertes de colonisation gastrointestinale massive par *M. avium*, préalable à la dissémination, constatée chez les sujets co-infectés [48, 90, 233].

La présence du VIH semble être un facteur nécessaire et déterminant dans le développement de l'infection bacillaire : l'utilisation de thérapies HAART (pour Highly Active Anti Retroviral Therapy) diminue l'incidence de cette infection opportuniste sous sa forme disséminée, en améliorant l'immunocompétence des malades par diminution de la charge virale [172, 220]. De la même façon, le traitement intensif de la mycobactériose par antibiothérapie permet de limiter la virémie et la progression du SIDA, tout comme le traitement de la tuberculose maladie par les antituberculeux classiques [95, 220, 224].

La baisse du nombre de CD4 T de l'hôte apparaît comme le facteur le plus important dans le développement de l'infection disséminée à *M. avium*, mais le ou les mécanismes expliquant la sensibilité particulière à des sérovars spécifiques restent mal connus [172].

Les mycobactérioses du complexe MAC concernent des sérovars particuliers : les sérovars 1,4,8 aux USA et en Europe, qui ne sont pas retrouvés dans l'environnement du malade, contrairement aux sérovars environnementaux, comme 2 et 6, responsables des atteintes pulmonaires chez les personnes séronégatives. Les deux types d'infection semblent curieusement s'exclure mutuellement pour des raisons encore mal cernées. Semble encore plus contradictoire le fait que les sérovars 1,4, et 8 sont beaucoup plus virulents chez la souris *in vivo* tandis que les sérovars environnementaux se montrent incapables de proliférer [54].

Les bacilles aviaires de sérovars 1,4 et 8 infectent les macrophages résidents de la lamina propria du tractus digestif ; ces cellules servent de transporteurs et permettent aux bactéries d'atteindre les nœuds lymphatiques mésentériques puis le torrent circulatoire ; de là, les mycobactéries vont disséminer aisément dans tout l'organisme des personnes immunodéprimées [221]. Ces mêmes sérovars semblent par contre incapables d'établir une infection persistante chez les personnes immunocompétentes et sont éliminés, ou contenus sans jamais parvenir à disséminer [220].

On remarque que les souches aviaires isolées chez les sidéens ont une croissance beaucoup plus rapide que les souches environnementales et induisent de façon apparemment paradoxale, une sécrétion puissante et précoce de la fraction p40 de l'IL-12 ; cette dernière propriété augmenterait la virulence de ces souches par rapport aux souches environnementales. En fait, lors de la co-infection VIH-MAC, le VIH-1 bloque l'expression de la fraction IL-12 p35 ; or, en l'absence de cette fraction, l'excès de sécrétion d'IL-12 p40

exerce un retrocontrôle négatif sur la production d'IL-12 hétérodimérique biologiquement active par le macrophage infecté. Ces souches sont finalement moins efficacement détruites par le système immunitaire, qui ne reçoit pas, ou mal, un des signaux déclencheurs majeurs de la réponse de type 1 [90].

L'amointrissement des réponses immunitaires de type 1 explique l'émergence de la tuberculose maladie comme affection opportuniste lors de l'infection par le VIH-1. La réduction du nombre de LT CD4+, acteurs majeurs de la réponse protectrice anti-mycobactérienne, est la cause évidente du passage au stade clinique de l'infection bacillaire, mais des dysfonctionnements qualitatifs viro-induits, plus complexes et plus précoces au niveau des fonctions macrophagiques, permettent de comprendre le développement possible de la maladie au tout début de l'infection virale voire parfois sans aucune modification du nombre de lymphocytes T [217].

1.1. Co-infection au sein des cellules phagocytaires mononucléées :

Au début de l'infection virale, le VIH-1 et la mycobactérie partagent les mêmes cellules hôtes : macrophages résidents et notamment alvéolaires, monocytes. Le VIH est un retrovirus dont la glycoprotéine de surface gp120 se lie avec une forte affinité à l'antigène de membrane CD4 des cellules immunitaires humaines ; or, en plus des lymphocytes T restreints au CMH II, les cellules phagocytaires mononucléées comme les macrophages, monocytes, cellules dendritiques et cellules de Langerhans sont également porteuses de cet antigène et peuvent ainsi être colonisées par le VIH [33].

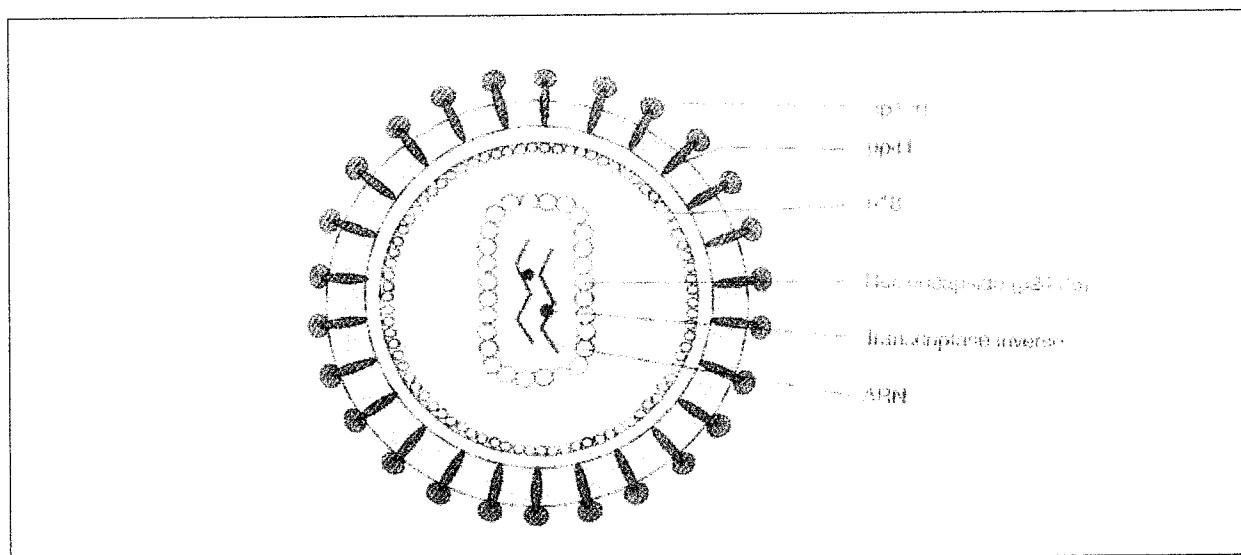


Figure 43: Structure du VIH-1 [33].

Lors de la contamination et au début de l'infection, les souches virales sont essentiellement monocytotropes et présentent un effet cytopathique faible, voire nul, vis-à-vis de ses cellules cibles, les phagocytes mononucléés. Premières cellules à être infectées par le

virus, elles vont constituer le principal réservoir et le vecteur majeur de contamination pendant toute la durée de l'infection. Comme pour les mycobactéries qui colonisent de façon durable les macrophages, les cellules de la lignée monocyttaire vont jouer un rôle majeur dans la dissémination des particules virales, car elles vont abriter une production de virus intense et persistante différente de celle ayant lieu au sein des lymphocytes T4 [33]. Le virus est également capable d'inhiber l'apoptose des phagocytes qu'il infecte.

Pour pénétrer dans leurs cellules cibles, les souches virales ont besoin d'un co-récepteur : dans le cas des souches monocytopropes, il s'agit du récepteur des chémokines β CCR5. Les souches virales deviennent par la suite à tropisme mixte ou exclusivement lymphocytotropes et utilisent alors le récepteur CXCR4 des chimiokines α pour pouvoir entrer dans les lymphocytes. Ce sont les interactions des lymphocytes avec les CPA infectées qui initient le processus d'infection lymphocytaire. Seuls les lymphocytes activés dans une réponse immunitaire permettront la réplication virale [220].

Lorsque le VIH-1 infecte un individu déjà porteur de *M. tuberculosis*, il va rencontrer des macrophages résidents hébergeant de façon chronique des mycobactéries. Or, celles-ci stimulent la production de cytokines pro-inflammatoires, notamment IL-1, IL-6 et TNF α . Il en résulte une activation du facteur de transcription NF-kB, qui migre vers le noyau du phagocyte co-infecté. Les portions LTR du génome viral sont structurellement très semblables aux régions de fixation normales de NF-kB, qui permet ainsi la transcription simultanée du provirus ADN du VIH-1 intégré dans le génome de la cellule phagocytaire [102, 116, 168].

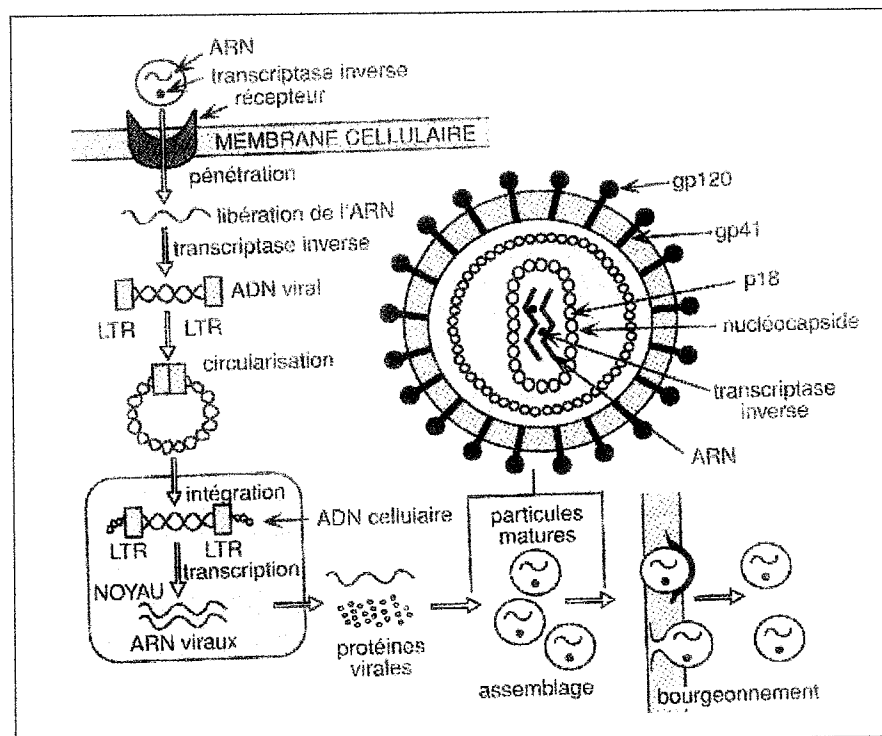


Figure 44: Cycle de réplication du VIH-1[33].

Le relargage de très nombreuses particules virales permet la contamination de proche en proche d'autres cellules avec une accélération de la production de virus dans les phagocytes déjà infectés par les mycobactéries [102, 167]. Les cytokines pro-inflammatoires, et particulièrement le $TNF\alpha$, sont aussi de puissants stimulateurs de l'expression des chimiokines et de leurs récepteurs dont le co-récepteur d'entrée CCR5. Par ailleurs, le VIH lui-même déclenche une libération accrue de chimiokines β comme les MIP, MCP-1 et surtout RANTES, qui sont des attracteurs puissants de cellules mononucléées naïves, cibles idéales pour de nouvelles colonisations virales ou mycobactériennes [220]. En outre, la seule phagocytose de *M. tuberculosis* par un macrophage déjà colonisé par le virus augmente l'activité répliquative du VIH-1 par stimulation de son promoteur [116]. Les mycobactéries peuvent augmenter jusqu'à 160 fois la charge virale [217].

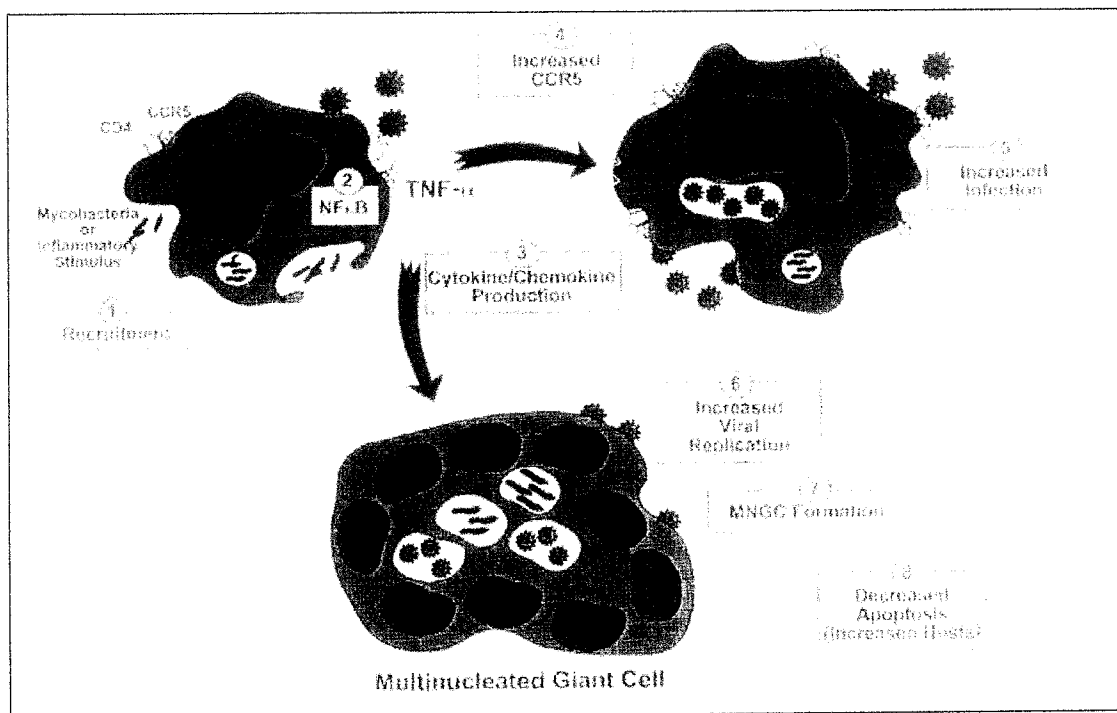


Figure 45: Co-activation de la colonisation des macrophages par le VIH-1 et les mycobactéries [220].

- 1) Phagocytose des mycobactéries.
- 2) Activation du NF- κ B et production de TNF et d'autres cytokines et chimiokines (3).
- 4) Augmentation de l'expression du CCR5 favorisant l'entrée du VIH dans le phagocyte (5).
- Augmentation de la répliquative virale (6).
- 7) Formation de cellules géantes plurinucléées.
- 8) Modération de l'apoptose phagocytaire permettant la formation d'un réservoir cellulaire infectieux.

Le VIH-1 induit également la libération accrue de $TGF-\beta$, qui désamorce les fonctions mycobactéricides des macrophages et favorise ainsi la multiplication intracellulaire des bacilles [220]. Il entraîne en plus une production plus importante d'IL-10 des macrophages et une diminution de celle d'IL-12, cytokine nécessaire à l'activation lymphocytaire dans la lutte contre les mycobactéries [217, 234].

1.2. Effets du VIH sur les fonctions lymphocytaires :

La liaison directe de la gp120 du virus sur le récepteur CD4 perturbe la présentation des antigènes mycobactériens aux cellules T restreintes au CMH II, qui, en association avec la diminution de l'expression des molécules du CMH II et B7 à la surface des monocytes, conduit à un affaiblissement de la réponse immunitaire [91].

L'altération des réponses spécifiques affecte les cellules infectées par le VIH-1 ainsi que les cellules saines. Globalement les lymphocytes répondent plus mal aux mitogènes et la population des cellules T « mémoire » CD45RO+, impliquées dans la maintenance de la cohésion des granulomes mycobactériens sont très rapidement touchées [218].

Les effets cytopathogènes directs des souches lymphocytotropes se manifestent plus tardivement, avec une atteinte plus particulièrement ciblée sur les cellules helper. Le VIH provoque directement l'apoptose du lymphocyte infecté, en stimulant les voies Fas-FasL et TNF-TNFR [217]. La gp120, qui se fixe sur le CD4, sensibilise les cellules infectées et non infectées à l'apoptose. L'adsorption de la gp120 entraîne également des phénomènes ADCC et des réactions autoimmunes par antigénicité croisée, qui aggravent la diminution de la population T4 [218].

L'atteinte initiale préférentielle des cellules helper provoque une désorganisation des réponses de toutes les autres populations lymphocytaires et entraîne des réponses aberrantes des CD8+ et des cellules NK. Ultimement émerge une réponse de type Th2 [218]. La carence en IFN γ aggrave à la fois l'infection mycobactérienne et l'infection virale [102].

Les conséquences cellulaires de la déplétion des populations CD4+ et CD8+ sur l'infection latente ont été étudiées *in vivo* chez la souris.

1.3. Apports des modèles expérimentaux de réactivation par déplétion lymphocytaire :

Chez la souris, des modèles expérimentaux de latence peuvent être obtenus après une infection par aérosol ou voie intraveineuse de mycobactéries tuberculeuses virulentes. On impose ensuite aux rongeurs soit une période de repos post-infectieux de 6 à 8 mois, soit un traitement antituberculeux 6 semaines après la primo-infection, associé à 2 mois de repos. Dans le premier cas, on obtient un modèle de latence post-immunologique, dans le second, une latence post-chimiothérapeutique. Dans les deux modèles, la charge mycobactérienne est devenue très basse voire indétectable [182, 216]. Pendant les phases de latence ainsi obtenues, le turn-over lymphocytaire est comparable à celui de l'état pré-infectieux [216].

On observe alors les effets de la déplétion de tel ou tel composant de la réponse immunologique par l'injection répétée d'anticorps monoclonaux spécifiques.

Les souris déplétées en lymphocytes CD4+ pendant la phase de latence meurent assez rapidement de tuberculose clinique aiguë, alors que le niveau d'IFN γ est sensiblement équivalent à celui des contrôles, après une courte période d'ajustement. Contrairement aux souris déplétées en TNF α , le niveau de l'enzyme iNOS2 reste inchangé en l'absence de lymphocytes T4 [137]. Par contre, la neutralisation spécifique de l'iNOS2 provoque une réactivation, mais plus progressive, de l'infection au niveau pulmonaire [182].

Dès la deuxième semaine de déplétion des T4, le nombre de bacilles tuberculeux augmente régulièrement dans divers organes, pour atteindre des taux jusqu'à 400 fois

supérieurs aux contrôles après deux mois d'administration d'anticorps anti-CD4. On observe en même temps une désorganisation progressive des amas lymphoïdes et une nécrose marquée des granulomes pulmonaires [182].

Ces résultats suggèrent que la réactivation par déplétion des LT4 n'est pas liée à un manque de production d'IFN γ par ces cellules, ni à la suppression subséquente de mécanismes mycobactéricides impliquant les réactifs nitrés. Les lymphocytes T CD4+ joueraient donc un autre rôle essentiel dans le maintien de l'état de latence. Ils pourraient intervenir dans une voie indépendante de l'IFN γ et des réactifs toxiques nitrés, pour activer des mécanismes mycobactéricides particuliers au sein des granulomes. Ils pourraient aussi jouer un rôle spécifique « helper » absolument nécessaire, vis-à-vis des LT CD8+ et de leurs activités cytolytiques et bactéricides conjuguées [182].

Selon plusieurs équipes indépendantes, les lymphocytes CD8+ seraient les véritables contrôleurs de l'infection latente à *M. tuberculosis*. Ils auraient une fonction prépondérante par rapport aux CD4+ pendant cette phase particulière de l'infection, contrairement à la phase post contamination où les LT4 sont indispensables.

Pendant la période de latence, les CD8+ produisent 5 à 6 fois plus d'IFN γ que les autres cellules. La déplétion spécifique des CD8+ provoque la réactivation de l'infection et le passage à la tuberculose clinique. La neutralisation totale de l'IFN γ mime exactement, selon ces équipes, les effets de la déplétion des CD8+ [216].

Il semble donc que les LT CD8+ soient la population qui sécrète majoritairement l'IFN γ pendant cette période mais que, malgré cette production, il faille la présence des lymphocytes CD4+, cellules nécessaires mais non suffisantes pour assurer le maintien de l'état de latence chez l'individu infecté. La production d'IFN γ par les CD8+ est indépendante de celle réalisée par les CD4+, mais dépléter les lymphocytes T4 avant qu'ait eu lieu la stimulation des lymphocytes par les antigènes mycobactériens abolit la synthèse d'IFN γ par les cellules CD8+ [186, 230].

2. Effets des substances immunomodératrices :

La prise de médicaments immunosuppresseurs ou immunomodérateurs multiplie par 15 le risque d'apparition d'une tuberculose clinique. Cela a été particulièrement bien observé chez les patients soumis à des traitements « anti-rejet » suite à une greffe d'organes : l'apparition des symptômes est notée relativement rapidement après l'instauration de la thérapie immunosuppressive [228].

Des molécules comme la cyclosporine A ont un effet très sélectif vis-à-vis des lymphocytes T. Elles bloquent notamment le signal de transduction émis lors de l'activation du récepteur TCR avec l'antigène, responsable de la synthèse d'IL-2. Elles se fixent sur des immunophilines intracellulaires des lymphocytes et inhibent l'activation du facteur de transcription NF-AT de ce gène. La prolifération lymphocytaire qui suit la présentation de l'antigène à la cellule T est ainsi désamorcée [7, 9].

Au sein du granulome mycobactérien, le recrutement efficace des cellules mononucléées entourant les bacilles nécessite une présentation antigénique permanente pour activer de façon prolongée la sécrétion de cytokines par les lymphocytes, d'où l'importance de l'intégrité de ce signal dans la cohésion granulomateuse [128, 175].

Les corticoïdes se fixent sur des récepteurs cytoplasmiques qu'ils activent alors et qui vont se transloquer vers le noyau de la cellule ; ces récepteurs s'ancrent alors à divers promoteurs de gènes dont ils régulent la transcription. Contrairement à la cyclosporine et les molécules apparentées, les corticoïdes comptent plusieurs cellules cibles. Ils inhibent de nombreuses fonctions des phagocytes mononucléés en limitant leur production de cytokines, notamment pro-inflammatoires, comme l'IL-1, l'IL-6 ou le TNF α , qui sont essentielles dans le recrutement cellulaire vers le foyer infectieux. Le mécanisme de cette inhibition est l'induction par les corticoïdes d'une protéine inhibant NF- κ B. Les corticoïdes entraînent aussi une baisse du nombre des monocytes circulants, nécessaires au turn-over des phagocytes au sein des granulomes mycobactériens. Ils perturbent également les signaux lymphocytaires des cellules helper et cytotoxiques producteurs d'IL-2 déjà engagées dans la réponse immunitaire, qui représentent leur deuxième cible cellulaire privilégiée [7, 9].

Les effets de leurs pendants naturels, les hormones corticosurréaliennes, ont été observés chez l'homme et l'animal depuis des décennies : la pauvreté, les périodes de guerre ou de famine, en déclenchant des réactions de stress organique favorisent la réactivation d'infections tuberculeuses latentes. Chez le bétail, le stress provoqué par un transport peut suffire à réactiver la maladie et révéler la présence de l'infection au sein du troupeau [202].

La stimulation prolongée de l'axe hypothalamo-hypophysaire entraîne une production accrue de cortisol. Ce glucocorticoïde naturel limite la sécrétion d'IL-12 par les cellules présentatrices d'antigènes et favorise la libération d'IL-10 qui est capable d'inhiber directement l'expression des molécules de CMH II sur les CPA et de modérer les fonctions des lymphocytes CD4+ [72]. Indirectement, ces modulations cytokiniques, induites par le cortisol, réduisent la libération d'IFN gamma ; elles limitent ainsi l'efficacité de la réponse de type 1, comme les mécanismes anti-mycobactériens au sein des macrophages infectés chroniques [175].

3. Effets du vieillissement : exemple de réactivation chez la souris âgée :

Avant l'épidémie de SIDA, la tuberculose était la « maladie des âges extrêmes » car elle touchait plus particulièrement les enfants et les personnes âgées. Ces dernières présentaient le plus souvent un réveil tardif d'une infection parfois contractée des décennies auparavant, tout en étant également beaucoup plus sensible à la primo-infection [45, 72].

Le modèle murin apporte quelques éléments de réponse sur les variations liées à l'âge. Chez la souris âgée (entre 18 et 24 mois), les lymphocytes CD4+ et CD8+ apparaissent plus tardivement sur le site de l'infection et ces cellules présentent alors un net déficit d'expansion clonale. Les lymphocytes montrent un défaut d'expression des marqueurs d'adhésion qui permettent normalement leur migration vers le foyer infectieux. Au niveau pulmonaire, on note comparativement une nette diminution du nombre de CD4+ présents, associée à une augmentation marquée des lymphocytes T $\gamma\delta$, qui est peut-être une réponse compensatrice au manque relatif de cellules helper.

La réponse en IFN γ des lymphocytes $\alpha\beta$ est différée et le déficit en cellules T recrutées conduit à une carence locale globale en IFN. Les macrophages des souris âgées produisent

également moins d'IL-12 face à *M. tuberculosis* que les jeunes souris. La production d'IFN γ est donc moindre par cellule activée [148].

Le transfert de cellules T issues de jeunes souris infectées protège efficacement la souris âgée du développement de la tuberculose maladie. En l'absence de ce transfert, la souris âgée est capable de ralentir la progression de l'infection mycobactérienne pendant les 60 premiers jours mais elle ne peut ensuite en empêcher l'évolution fatale. La baisse de l'immunité protectrice chez la souris âgée est donc liée à des variations subtiles mais qui se révèlent essentielles dans la phase de lutte tardive contre l'infection basée sur une réponse de type 1 intacte [148].

II. MECANISMES CELLULAIRES DE LA PHASE CLINIQUE :

1. Compartimentation apparente de la réponse immunitaire chez l'homme :

1.1. Activation et apoptose des cellules de type 1 sur le site infectieux :

Les patients atteints de tuberculose pulmonaire active présentent au départ une alvéolite caractérisée par la présence de nombreux lymphocytes T et de macrophages immatures. Ces cellules proviennent d'un recrutement actif et les LT4 et LT8 présentent une expansion focale importante, en particulier dans la zone pleurale. Elles produisent de l'IFN γ en réponse aux antigènes mycobactériens au sein du foyer infectieux et des nœuds lymphatiques satellites. Les deux populations lymphocytaires CD4 et CD8⁺ concourent avec la même intensité et la même fréquence à cette production [186]. Le niveau local d'ARNm d'IFN est très élevé au sein des lésions tuberculeuses, tout comme celui de l'IL-12 [92, 121].

On considère généralement que la phase clinique de l'infection tuberculeuse n'est pas caractérisée par l'émergence d'une réponse de type 2 et on ne détecte pas d'élévation des concentrations en cytokines comme l'IL-13, l'IL-15 ; les taux d'IL-4 restent bas [72, 73, 92, 121, 198, 235]. Une équipe britannique assure pourtant que la phase clinique s'accompagne d'une différenciation des cellules Th0 en Th2 et que la réponse lymphocytaire entraîne une augmentation de l'IL-4, mal détectée par les méthodes d'investigation utilisées par les autres chercheurs. Ces cytokines de type 2 modèreraient la réponse protectrice immunitaire en inhibant la transformation des lymphocytes Th0 en Th1 ; l'augmentation de la charge bactérienne au cours de la maladie serait l'un des facteurs permettant cette commutation [175, 183, 230].

Parallèlement à leur activation, les lymphocytes T subissent un phénomène progressif d'apoptose qui concerne à la fois les cellules $\alpha\beta$ CD4⁺ et CD8⁺ ainsi que les V γ 9 V δ 2. Ces dernières se montrent particulièrement sensibles à la mort cellulaire induite par leur activation au contact de l'antigène mycobactérien. Cette population lymphocytaire présente un taux de cellules apoptotiques doublé chez les malades comparé à celui des personnes PPD⁺. Tout comme les CD4⁺, les lymphocytes $\gamma\delta$ meurent par déclenchement de la voie d'apoptose Fas-Fas L mais ils sont touchés plus précocément et plus sévèrement [119]. Les lymphocytes CD4⁺ locaux subissent quatre fois plus fréquemment l'apoptose que ceux du secteur systémique ; la voie TNF α -TNF α R peut aussi entraîner la destruction de LT4, alors que les CD8⁺ meurent exclusivement par ce mécanisme dépendant du TNF α [109]. Chez les

personnes malades, les concentrations locales de TNF dans le fluide inflammatoire sont très largement supérieures aux taux systémiques [92].

Ces phénomènes d'apoptose semblent étroitement liés à la charge antigénique bactérienne car le traitement antituberculeux les réduit de plus de 50 % [92, 183].

Au fur et à mesure de la progression de l'infection, l'importance de l'apoptose des cellules T conduit à une baisse de la réponse immunitaire de type 1 malgré de fortes sécrétions initiales d'IFN γ . Pour certains, cette cytokine, serait au moins partiellement, responsable de l'apoptose des LT en favorisant la transcription de Fas, FasL et du TNF α [92].

En tous cas, la production élevée d'IFN γ au niveau local ne permet pas en phase précoce de l'infection, une destruction efficace des bacilles qui continuent à proliférer [121]. De plus, l'apoptose progressive des lymphocytes conduit à une baisse de la production d'IFN γ . La baisse d'IFN devrait, théoriquement selon cette hypothèse, limiter le phénomène d'apoptose lymphocytaire.

Or, cela ne se produit pas dans les modèles d'infection mycobactérienne poursuivie jusqu'au stade terminal. Pendant plus de 6 mois, les lymphocytes continuent à produire de l'interféron sans parvenir à juguler la progression de la multiplication mycobactérienne. A partir du huitième mois, il y a cessation brutale de la production d'IFN γ et le nombre de mycobactéries atteint plusieurs milliards dans les poumons des souris. On enregistre une corrélation entre la fréquence de l'apoptose des lymphocytes et la baisse progressive de la sécrétion d'interféron. La baisse de production d'IFN apparaît davantage comme la conséquence, plutôt que la cause, de l'importance de la charge mycobactérienne. Les cellules T pourraient devenir tolérantes suite à leur exposition à de très fortes doses d'antigènes de façon prolongée [80].

1.2. Du phénomène de suppression systémique à l'anergie :

Les cellules mononucléées du sang périphérique des malades ayant récemment développé les premiers symptômes de la tuberculose, subissent l'apoptose par les mêmes voies Fas-FasL, TNF α -TNFR. L'apoptose bactério-induite des lymphocytes CD4+ et CD8+ sanguins et des phagocytes mononucléés est dès le début de la phase clinique de fréquence supérieure à celle observée chez les personnes saines PPD+, mais inférieure à l'apoptose des cellules présentes sur les sites locaux infectés [92].

Outre une diminution de leur nombre, les cellules immunitaires systémiques présentent une hyporéactivité aux antigènes mycobactériens. La tuberculose maladie est caractérisée, au niveau périphérique, par une baisse, parfois très marquée, de la réponse immunitaire de type 1, sans émergence concomitante d'une réponse systémique de type 2 [235].

En comparaison avec des cellules prélevées chez des personnes PPD+, les cellules périphériques des malades sécrètent des quantités bien moindres d'IFN γ et d'IL-2 [121, 228]. La prolifération défectueuse des cellules T face aux antigènes mycobactériens est liée à cette réduction de la production d'IL-2 et de l'expression de son récepteur [109, 183, 186]. Normalement, la production d'IL-2 est amplifiée de façon autocrine suite à sa propre fixation sur l'IL-2 R, qui est constitué de 2 sous-unités : l'IL-2R α et l'IL-2R β [189].

On constate une élévation de l'IL-2R α dans le sang périphérique des malades liée à une surexpression de cette fraction à la surface des monocytes et à la libération de récepteurs soluble. Les monocytes piègent alors l'IL-2 sécrétée qui n'est plus disponible pour la

prolifération lymphocytaire : les monocytes sont qualifiés de cellules suppressives vis-à-vis des lymphocytes répondant aux antigènes mycobactériens [217, 224].

Les monocytes sanguins des malades agissent aussi *via* d'autres mécanismes. Au contact des mycobactéries, ils sécrètent de grandes quantités de TGF β et d'IL-10, induisant une diminution de la capacité blastogénique des cellules T et de leur sécrétion d'IFN γ . Le traitement antituberculeux entraîne une baisse de la sécrétion des cytokines suppressives par les monocytes, et restaure les propriétés prolifératives des lymphocytes ; la production d'IFN γ peut rester déprimée pendant plus d'un an, ce qui suggère l'existence d'un phénomène de suppression intrinsèque qui ne serait pas corrigé rapidement par le traitement antibactérien [217].

Les monocytes sanguins ont également une expression déficiente des molécules du CMH, notamment de HLA-DR et de celle des molécules de co-stimulation de la famille B7 [217, 224].

Or, en l'absence de signal de costimulation transmis avec celui formé par l'association de l'antigène et du TCR, la reconnaissance de l'antigène par le lymphocyte aboutit au blocage total du signal de transduction issu du TCR et donc de la prolifération qui devrait théoriquement en découler. On dit que le lymphocyte T se trouve en état d'anergie.

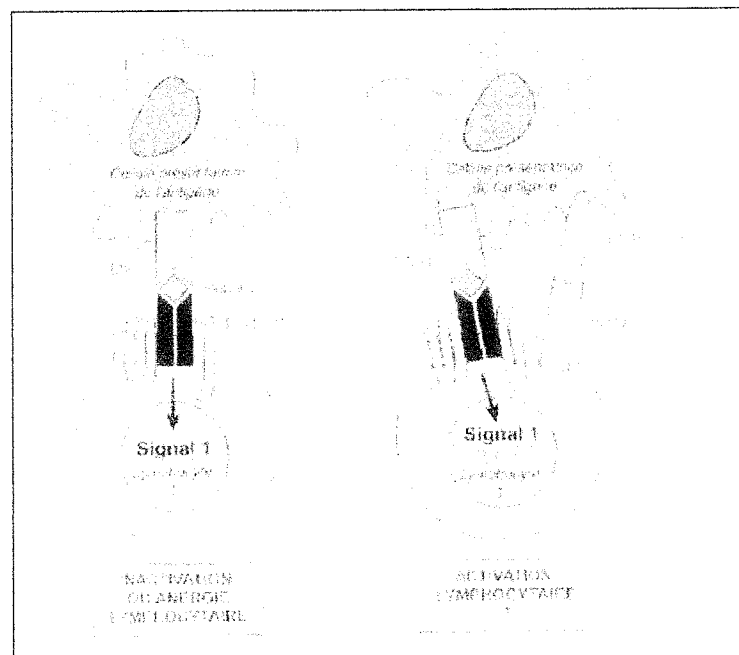


Figure 46: Anergie lymphocytaire T par absence de signal de co-stimulation (In : BACH, JF, 1999, p161).

L'anergie désigne *in vitro* un état des cellules T caractérisé par l'absence ou la diminution de sécrétions de cytokines lymphocytaires et de leur expansion clonale, suite à l'engagement de leur TCR face à des antigènes spécifiques [26, 91]. *In vivo*, l'anergie concerne sélectivement les clones de cellules T helper de type 1 [91]. L'incapacité des lymphocytes à réagir correctement aux antigènes mycobactériens se traduit par une atténuation ou une absence de réaction d'hypersensibilité retardée à la tuberculine du test

cutané. Près de 10 à 20 % des personnes ayant une tuberculose active présentent un test tuberculinique négatif, et la majorité des patients atteints de tuberculose miliaire sont anergiques. La tuberculose active génère une anergie spécifique aux antigènes mycobactériens, alors que le VIH-1 provoque une anergie généralisée [193].

Les lymphocytes CD4⁺ des personnes anergiques stimulés *in vitro* par la tuberculine ne produisent que de l'IL-10 et pas d'IFN, tandis que les cellules issues de patients non anergiques sécrètent de l'IL-10, de l'IFN et sont encore capables de proliférer. L'IL-10 d'origine lymphocytaire semble agir directement au niveau du signal du TCR en provoquant une phosphorylation défectueuse d'une des portions du TCR/CD3, et donc une activation non fonctionnelle de ZAP-70 et des kinases MAPK du signal de transduction. L'IL-10 induirait l'anergie lorsqu'elle est présente au moment de l'induction du signal TCR-antigène. La genèse de cellules T libératrices d'IL-10 et dont le TCR devient « résistant », réclame une stimulation antigénique spécifique chronique de cellules T naïves en présence d'IL-10 (qui peut être d'origine monocytaire au départ). L'anergie des cellules T contribue à la persistance des mycobactéries et permet leur croissance exponentielle extracellulaire durant la phase clinique [26].

2. Modifications endocrinologiques locales :

Les personnes atteintes de tuberculose active présentent un métabolisme anormal du cortisol. Les variations ne concernent ni le CRH, ni l'ACTH centraux, ni le métabolisme systémique. Seul le métabolisme périphérique du cortisol endogène est modifié. On enregistre un excès de cortisol au niveau local chez les malades tuberculeux [10].

Une enzyme réductase, la 11 β hydroxydésydrogénase de type 1 (11HSD1) catalyse la transformation de la cortisone inactive en cortisol actif au sein des tissus et est en équilibre avec la 11HSD de type 2 qui catalyse la réaction inverse par oxydation. Or, il semble que la réductase 11HSD1 soit régulée et stimulée par des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α et l'IL-1 β , abondamment produites par les phagocytes au contact des mycobactéries, d'où une concentration accrue de cortisol au niveau des tissus infectés [10, 174, 175]. Cet excès de cortisol, indirectement induit par les antigènes bacillaires, pourrait expliquer, selon ces auteurs, la désactivation des mécanismes mycobactéricides et l'augmentation de la production d'IL-10 et de TGF β , pendant cette phase de l'infection [175]. Le rapport cortisol/cortisone redevient normal chez les patients traités par les antituberculeux [10].

On note également chez les malades des variations d'autres hormones des corticosurrénales comme une baisse de la DHEA (déhydroépiandrosterone) et de la Δ 4 androstènedione, qui possèdent des propriétés antigluco-corticoïdes et des effets pro Th1 [175].

Selon l'équipe britannique évoquée plus haut, l'excès local de cortisol serait responsable de la commutation de la réponse immunitaire vers une production de cytokines de type 2 : IL-10, IL-4 et IL-5 notamment [175].

Le métabolisme de la vitamine D3 est également perturbé au sein de lésions tuberculeuses des malades. Les macrophages de ces patients expriment une 1- α hydroxylase qui convertit rapidement la 25-OH vitamine D3 en calcitriol. L'augmentation de ce dernier dans le milieu extracellulaire provoque une « hypocalcémie localisée ». Le calcitriol modère la production d'IL-12, inhibe celle de l'IFN γ et d'IL-2 et pourrait ainsi contribuer à l'affaiblissement de la réponse protectrice de type 1 au cours de la maladie [175].

3. Immunopathogénie des lésions tissulaires :

On a longtemps considéré que les dégâts tissulaires majeurs qui caractérisent la tuberculose maladie étaient les conséquences directes de la réponse immunitaire dirigée contre les bactéries. Les cellules T et macrophages activés, en produisant de l'interféron contribuent à la libération, dans l'environnement extracellulaire, de radicaux nitrés et oxygénés, qui sont aussi toxiques pour les cellules saines avoisinantes que pour les bacilles visés [230]. Néanmoins, vu que la synthèse d'interféron décroît progressivement au cours de la phase clinique de la maladie, cette cytokine ne suffit pas à elle seule à expliquer la destruction des tissus infectés.

Responsable, au moins partiellement, du syndrome cachectique qui touche les tuberculeux chroniques, le TNF α est également incriminé. Les patients les plus sérieusement atteints ont des taux plasmatiques de TNF α très élevés et toute augmentation de ce taux s'accompagne d'une aggravation de leur état de santé [175]. Considéré comme un facteur majeur de la nécrose tissulaire, le TNF n'est pourtant pas nécessaire à l'apparition de celle-ci, puisque des souris génétiquement délétées pour cette cytokine ou son récepteur présentent aussi des lésions nécrotiques lors d'infection à *M. tuberculosis*, avec des charges bactériennes très importantes. Par ailleurs, la neutralisation du TNF lors de la phase active de la maladie entraîne une mort systématique chez la souris, avec, là aussi, une intense prolifération des bacilles [72].

D'autres facteurs entrent donc en jeu. On s'est intéressé récemment à une famille d'enzymes capable de dégrader tous les constituants de la matrice extracellulaire. Les métalloprotéinases de la matrice (MMP) sont des endopeptidases cation (zinc, calcium) dépendantes, impliquées dans le remodelage tissulaire et l'inflammation chronique. Elles sont produites par différentes cellules dont les lymphocytes et les macrophages activés. La dégradation de la matrice extracellulaire produit des fragments aux propriétés chimiotactiques qui jouent un rôle dans le recrutement cellulaire et ces enzymes peuvent stimuler l'inflammation locale en déclenchant la sécrétion d'IL-1, d'IL-6 et de TNF α [130, 162].

M. tuberculosis provoque *in vivo* et *in vitro* la synthèse et la libération de métalloprotéinases MMP9 et MMP2 par les macrophages murins, et les patients atteints de tuberculose pulmonaire présentent un taux très important de MMP9 dans leur liquide de lavage bronchoalvéolaire [162]. *M. avium* sérovar 4 induit aussi une synthèse de MMP9 par les lymphocytes T, qui est 6 fois plus abondante que celle provoquée par un sérovar environnemental comme le sérovar 2 [54].

La production bactério-induite de MMP par les cellules hôtes est activée par les cytokines IL-1, TNF α ou le GM-CSF et, dans une moindre mesure, par l'IL-18. L'interféron gamma et les cytokines de type 2, comme l'IL-10, ont, au contraire, un effet modérateur, ces dernières agissant indirectement en diminuant la sécrétion de TNF α . La production excessive de MMP lors des phases tardives de l'infection mycobactérienne pourrait être liée à la baisse globale de synthèse de l'IFN γ par les lymphocytes T [162].

D'autres études ont montré que les bacilles pouvaient exprimer des propriétés cytotoxiques propres, indépendamment de toute synthèse réalisée par les cellules eucaryotes. Leur pouvoir cytopathogène semble proportionnel à la virulence des souches bactériennes et il entraîne notamment une nécrose des cellules épithéliales. Cette cytotoxicité se révèle indépendante de la libération de TNF α et repose, au moins partiellement, sur la libération de protéines mycobactériennes, qui restent à identifier [56].

Les mycobactéries ont également la capacité de lyser le collagène de la matrice extracellulaire des épithéliums, notamment pulmonaires, ou encore ceux des vaisseaux

sanguins et lymphatiques. Une métalloprotéinase de 75 kDa, dépendante du zinc, a été isolée et identifiée comme étant le produit d'un gène de virulence de *M. tuberculosis H37Rv*. Cette enzyme mycobactérienne possède une activité collagénolytique 4 fois supérieure à celle sécrétée par la souche jumelle avirulente *M. tuberculosis H37Ra*, ce qui pourrait expliquer, au moins partiellement, la capacité des bactéries pathogènes à disséminer aisément puis à former des lésions nécrotiques et des cavernes au sein des tissus lors de la phase aiguë [130].

CONCLUSION

La lutte contre l'infection mycobactérienne nécessite une réponse immunitaire de type 1 complète : présence et activation adéquate des cellules effectrices spécifiques et non spécifiques d'antigènes, libération de cytokines et instauration de mécanismes bactéricides. Même lorsque toutes ces conditions sont réunies, l'organisme semble néanmoins difficilement capable d'éradiquer définitivement cette infection : la stérilisation bactérienne totale est rare.

Les mécanismes cellulaires très complexes reposent sur des équilibres fragiles liant de très nombreux paramètres variables, ce qui rend l'étude de la pathogénie et de la réponse immunitaire très difficile à l'échelle des cellules et des molécules. La généralisation ou la transposition de résultats de laboratoire ou d'une espèce modèle à l'homme nécessitent la répétition d'expériences longues et les méthodes d'investigation peuvent conduire à des conclusions radicalement opposées, par exemple quant à l'émergence ou non d'une réponse de type 2 dans la phase clinique de la tuberculose.

Les mycobactéries virulentes sont parvenues à la fois à utiliser et à désactiver le système immunitaire de l'hôte à leur profit. Leur entrée dans les macrophages procède plus de la colonisation que d'un événement de phagocytose active de défense et les bacilles se sont assurés de nombreuses portes d'accès à l'intérieur de ces cellules. La capacité des mycobactéries à persister au sein des phagosomes est le point crucial de la pathogénie : cette propriété leur permet de constituer des réservoirs cellulaires utilisés au profit de leurs multiplication et dissémination mais surtout des abris efficaces contre les attaques des lymphocytes cytotoxiques. Les bacilles parviennent à leurrer le système immunitaire spécifique en bloquant la présentation de leurs antigènes à la surface des cellules parasitées, puis ils détruisent progressivement les effecteurs susceptibles, de les éradiquer.

Cette adaptation réussie à la vie parasitaire intracellulaire leur assure une survie prolongée pendant des périodes parfois extrêmement longues et autorise leur reviviscence tardive, qui est une caractéristique fondamentale de l'infection tuberculeuse.

Une meilleure connaissance des mécanismes exacts de la mise en dormance et de sa levée permettront peut-être l'émergence de traitements plus efficaces et la mise au point de vaccins pouvant prévenir la réactivation, ce que le BCG est incapable d'assurer. De nombreux essais vaccinaux ont été réalisés au moyen d'autres espèces mycobactériennes, de souches recombinantes, de vaccins moléculaires ou l'utilisation d'ADN nu codant pour des molécules immunogènes éventuellement associées à des gènes de cytokines de type 1. Si certains résultats se sont montrés encourageants chez la souris, aucun de ces vaccins ne surpassait l'efficacité du BCG actuel [1, 83, 101, 108].

La génomique comparative est une autre piste de recherche prometteuse, rendue possible par la maîtrise des séquençages systématiques des génomes des mycobactéries. La comparaison du génome de *M. bovis* à celui de *M. bovis BCG*, ou de *M. tuberculosis H37Rv* à *H37Ra* permettront de caractériser tous les gènes de virulence (et leurs produits) et d'obtenir éventuellement, après manipulations, soit des souches renforcées de BCG, soit des souches atténuées de *M. tuberculosis*. Si la connaissance des mécanismes cellulaires mis en cause dans l'infection mycobactérienne a énormément progressé ces dix dernières années, on pense que dix autres années pourraient être nécessaires avant la mise en place d'un nouveau vaccin ou de nouveaux traitements chez l'homme. Vu la gravité de la situation sanitaire, l'OMS estimait fin 2002, que d'ici 2020, près d'un milliard de personnes pourraient être nouvellement infectées avec 200 millions d'entre elles développant la forme clinique de la tuberculose. Trente cinq millions de personnes pourraient en mourir, si aucune amélioration n'était apportée dans la lutte contre le bacille [101].

AGREMENT ADMINISTRATIF

Je soussigné, P. DESNOYERS, Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que

Mlle PERROTEAU Cécile, Anne, Claudine

a été admis(e) sur concours en : 1991

a obtenu son certificat de fin de scolarité le : 12 juillet 1996

n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

Je soussignée, F. MESSUD-PETIT, Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, autorise la soutenance de la thèse de :

Mlle PERROTEAU Cécile, Anne, Claudine

intitulée :

« Les mécanismes cellulaires et moléculaires de l'infection mycobactérienne »

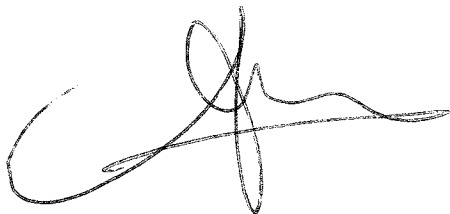
**Le Professeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Docteur Frédérique MESSUD-PETIT**



**Vu :
Le Directeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Docteur Pierre DESNOYERS**



**Vu :
Le Président de la thèse :
Professeur Antoine BLANCHER**



**Vu le : 22 MAI 2003
Le Président
de l'Université Paul Sabatier
Professeur Jean-François SAUTEREAU**



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **ABOLHASSANI, M., LAGRANDERIE, M., CHAVAROT, P., et al,** Mycobacterium bovis BCG Induces similar Immune Responses and Protection by Rectal and Parenteral Immunization Routes. *IAI*, 2000, **68**, 5657-5662.

2. **ADEREM, A., UNDERHILL, D.M.,** Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual. Rev. Immunology*, 1999, **17**, 593-623.

3. **APPELBERG, R.,** Protective Role of Interferon Gamma, Tumor Necrosis Factor alpha and Interleukin 6 in Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium avium Infections. *Immunobiology*, 1994, **191**, 520-525.

4. **ARANAZ, A., LIEBANA, E., PICKERING, X., et al,** Use of Polymerase Chain Reaction in the diagnosis of Tuberculosis in cats and dogs. *The Veterinary Record*, 1996, **138**, 276-280.

5. **ASTARIE – DEQUEKER, C., N'DIAYE, E. N., LE CABEC, V., et al** The Mannose receptor mediates uptake of pathogenic and non pathogenic mycobacteria and bypasses bactericidal responses in human macrophages. *IAI*, 1999, **67**, 469-477.

6. **AUCOUTURIER, P.** Molécules de reconnaissance. In BACH, J. F., Immunologie. Paris : Flammarion Médecine-Sciences, 1999, 5-23.

7. **BACH, J.F.,** Cellules de l'immunité. Cellules Phagocytaires. In BACH, J.F., Immunologie. Paris : Flammarion Médecine-Sciences, 1999, 3^{ème} édition. 84-87.

8. **BACH, J.F.,** Hypersensibilité non liée aux immunoglobulines E. In BACH, J.F., Immunologie. Paris : Flammarion Médecine-Sciences, 1999, 3^{ème} édition. 209-227.

9. **BACH, J.F.,** Le système immunitaire en action : défenses anti-infectieuses, rejet de greffes et immunité tumorale : immunité anti-bactérienne, immunité anti-virale. In BACH, J.F., Immunologie. Paris: Flammarion Médecine-Sciences, 1999, 3^{ème} édition. 169-172.

10. **BAKER, R.W., WALKER, B. R., SHAW, R. J., et al.** Increase cortisol: cortisone ratio in acute pulmonary tuberculosis. *Am J Resp Crit Care Med*, 2000, **162**, 1641-1647.

11. **BALCEWICZ – SABLINSKA, M.K., GAN, H., REMOLD, H.G.,** Interleukin 10 produced by macrophages inoculated with Mycobacterium avium attenuates mycobacteria-induced apoptosis by reduction of TNF-alpha activity. *J. Infect. Dis*, 1999, **180**, 1230-1237.

12. **BARNES, P.F., BARROWS, S.A.** Tuberculosis in the 1990's. *Annals of Internal Medicine*, 1993, **119**, 400-410.
13. **BARROW, W.N.** Contributing Factors of pathogenesis in the Mycobacterium avium complex. *Res. Microb.*, 1991, **142**, 427-433.
14. **BEATTY, W. L., RUSSELL, D.G.** Identification of Mycobacterial Surface Proteins Released into subcellular Compartments of Infected Macrophages. *IAI*, 2000, **68**, 6997-7002.
15. **BELMANT, C., ESPINOSA, E., POUPOT, R., et al.** 3 Formyl-1-Butyl Pyrophosphate: A novel Mycobacterial Metabolite-Activating Human $\gamma\delta$ T cells. *J Biol Chem*, 1999, **274**, 32079 – 32084.
16. **BENET, J.J.**, Les infections à mycobactéries atypiques chez l'animal. *Med. Mal. Infect.*, 1991, **21**, 26-34.
17. **BENET, J.J.**, La tuberculose. Cours des chaires des maladies contagieuses des Ecoles Nationales Vétérinaires Françaises, 1993, 152p.
18. **BERKE, G.** The CTL's Kiss of Death. *Cell.*, 1995, **81**, 9-12
19. **BERMUDEZ, L.E., GOODMAN, J.**, Mycobacterium tuberculosis Invades and Replicates within Type II Alveolar Cells. *IAI*, 1996, **64**, 1400-1406.
20. **BLOOM, B. R., MURRAY, C.J.L.** Tuberculosis: Commentary on a reemergent Killer. *Science*, 1992, **257**, 1055-1064.
21. **BLUNDEN, A.S., SMITH, K.C.** A pathological study of a mycobacterial infection in a cat caused by a variant with cultural characteristics between Mycobacterium tuberculosis and M. bovis. *The Veterinary Record*, 1996, **138**, 87-88.
22. **BOECHAT, N., BOUCHONNET, F., BONAY, M. et al.** Culture at high density improves the ability of human macrophages to control mycobacterial growth. *The JI*, 2001, **166**, 6203-6211.
23. **BOOM, W.H.** $\gamma\delta$ T cells and Mycobacterium tuberculosis. *Microbes and Infection*, 1999, **1**, 187-195.
24. **BOULAHBAL, F., ROBERT, J., TRYSTAM, D., et al.** La tuberculose humaine à Mycobacterium bovis en France durant l'année 1995. *BEH*, 1998, **48**, 207-208.
25. **BOULLIER, S., POQUET, Y. DEBORD, T., et al.** Regulation by cytokines (IL-12, IL-15, IL-4 and IL-10) of the V gamma 9 V delta 2 T cell response to mycobacterial phosphoantigens in responder and anergic HIV – infected persons. *Eur. J. Immunol*, 1999, **29**, 90-99.

26. **BOUSSIOTIS, V. A., TSAI, E.Y., YUNIS, E.J., et al.** IL-10 producing T Cells suppress immune response in anergic tuberculosis patients. *J Clin Invest*, 2000, **105**, 1317-1325.
27. **BRILL, K.J., LARKIN, R., CANADAY, D.H., et al.** Human Natural Killer cells Mediate Killing of Intracellular Mycobacterium tuberculosis H37Rv via Granule-Independent Mechanisms. *IAI*, 2001, **69**, 1755-1765.
28. **BURSAUX, E.** Tuberculose et VIH en France. *M/s*, 1994, **10**, 460-462.
29. **CANADAY, D.H., WILKINSON, R.J., LI, Q., et al.** CD4+ and CD8+ T cells kill intracellular Mycobacterium tuberculosis by a perforin and Fas/Fas - ligand - independent mechanism. *The JI*, 2001, **167**, 2734-2742.
30. **CAPPELLI, G., VOLPE, P., SANDUZZI, A., et al.** Human macrophage gamma Interferon decreases gene expression but not replication of Mycobacterium tuberculosis: analysis of the host-pathogen reciprocal influence on transcription in a comparison of strain H37Rv and CMT97. *IAI*, 2001, **69**, 7262 – 7270.
31. **CAROD, J.F.** (Page Consultée 09/09/2001). Mycobactéries, [en ligne]. Adresse URL : <http://www.citeweb.net/viro/bacterio/mycobactéries.html> ?
32. **CARTER, G.R., CHENGAPPA, M.M., ROBERTS, A.W.** Essentials of veterinary microbiology. Williams and Wilkins, Baltimore, 5th edition, 1995.
33. **CASSUTO, J.P., PESCE, A., QUARANTA, J.F.** SIDA et infection par le VIH. Paris: Masson, 3^{ème} édition, 1996. 288p.
34. **CAVAILLON, J.M.** Cytokines et allergie. In: CAVAILLON, J.M., Les cytokines. Paris : Masson, 1996. 523-534.
35. **CHAN, E.D., HEIFETS, L., ISEMAN, M.D.** Immunologic diagnosis of tuberculosis: a review. *Tuber. Lung Dis.*, 2000, **80**, 131-140.
36. **CHAN, E.D., MORRIS, K.R., BELISLE, J.T., et al.** Induction of inducible Nitric Oxide Synthetase: NO by lipoarabinomannan of Mycobacterium tuberculosis is mediated by MEK1-ERK, MKK7-JNF, and NF-κB Signaling Pathways. *IAI*, 2001, **69**, 2001-2010.
37. **CHATENOUD, L., DY, M.** Fonctions des cellules B et T. In: BACH, J.F., Immunologie. Paris: Flammarion Médecine Sciences, 1999. 109-137.
38. **CHATTERJEE, D., KHOO, K.** Mycobacterial lipoarabinomannan: an extraordinary lipoheteroglycan with profound physiological effects. *Glycobiology*, 1998, **8**, 113-120.
39. **CHRETIEN, J.** Tuberculosis today. *Eur. Resp. Journal.*, 1995, **8**, 617-619.
40. **CLARK, H.W., REID, K.B., SIM, R.B.** Collectins and innate immunity in the lung. *Microbes and Infection*, 2000, **2**, 273-278.

41. **COKER, R.J., HELLYER, T.J., BROWN, I.N., et al.** Clinical aspects of mycobacterial infections in HIV infection. *Res. Microb.*, 1992, **144**, 377-380.
42. **COLE, S.T., BROSCH, R., PARKHILL, J., et al.** Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, 1998, **393**, 537-544.
43. **COLLINS, F.M.** Antituberculous Immunity: New Solutions to an Old Problem. *Reviews of Infection Diseases*. 1991, **13**, 940-950.
44. **COLLINS, F.M.** Mycobacteria as cofactors in AIDS. *Res. Microb.*, 1992, **144**, 369-372.
45. **COLLINS, F.M.** Tuberculosis: The return of an old enemy. *Critical Reviews in Microbiology*, 1993, **19**, 1-16.
46. **COOPER, A.M., FLYNN, J.L.** The protective immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Current Opinion in Immunology*, 1995, **7**, 512-516.
47. **COOPER, A.M., ROBERTS, A.D., RHOADES, E.R., et al.** The role of Interleukin-12 in acquired immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunology*, 1995, **84**, 423-432.
48. **DABORN, C. J., GRANGE, J.M.** HIV/AIDS and its implications for the control of animal tuberculosis. *British Veterinary Journal*, 1993, **149**, 403-412.
49. **DANNENBERG, A.M.Jr.** Delayed type hypersensitivity and cell-mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunology Today*, 1991, **12**, 228-233.
50. **DELORMAS, P.** (Page consultée le 19/09/2001). Consultations du Corpus Medical. Pneumologie, [en ligne]. Adresse URL : [http:// www. santé. vjf-grenoble.fr/santé/corpmed/corpus/question/pneu069.htm](http://www.santé.vjf-grenoble.fr/santé/corpmed/corpus/question/pneu069.htm).
51. **DEMANGEL, C., BRITTON, W.J.** Interaction of dendritic cells with mycobacteria: where the action starts. *Immunology and Cell Biology*, 2000, **78**, 318-324.
52. **DERETIC, V., FRATTI, R.A.** *Mycobacterium tuberculosis* phagosome. *Mol. Microbiol.*, 1999, **31**, 1603-1609.
53. **DESCAMP-LATSCHA, B.** Cellules Phagocytaires. In : BACH, J.F., *Traité d'Immunologie*. Paris : Flammarion Médecine Sciences, 1993. 131-156.
54. **DEZZUTTI, C.S., SWORDS, W.E., GUENTHNER, P.C., et al.** Involvement of Matrix Metalloproteinases in Human Immunodeficiency Virus type I – Induced Replication by clinical *Mycobacterium avium* Isolates. *The J. of Infect. Dis.*, 1999, **180**, 1142-1152.

- 55. DIELI, F., TROYE- BLOMBERG, M., IVANYI, J., et al.** V γ 9/ V δ 2 T lymphocytes reduce the viability of intracellular Mycobacterium tuberculosis. *Eur. J. of Immunology*, 2000, **30**, 1592-1599.
- 56. DOBOS, K.M., SPOTTS, E.A., QUINN, F.D., et al.** Necrosis of Lung Epithelial Cells during infection with Mycobacterium tuberculosis is Preceded by Cell Permeation. *IAI*, 2000, **68**, 6300-6310.
- 57. DOFFINGER, R., ALTARE, F., CASANOVA, J.L.** Genetic heterogeneity of mendelian susceptibility to mycobacterial infection. *Microbes and Infection*, 2000, **2**, 1553-1557.
- 58. DOHERTY, M.L., BASSETT, H.F., QUINN, P.J., et al.** A sequential study of the bovine tuberculin reaction. *Immunology*, 1996, **87**, 9-14.
- 59. DRAPER, P.** The outer part of the mycobacterial envelop as permeability barriers. *Frontiers in Bioscience*, 1999, **3**, 1253-1261.
- 60. DUAN, L., GAN, H., ARM, J., et al.** Cytosolic phospholipase A2 participates with TNF α in the induction of apoptosis of human macrophages infected with Mycobacterium tuberculosis H37 Ra. *The JI*, 2001, **166**, 7469-7476.
- 61. EHLERS, M.R.W.** CR3: a general purpose adhesion recognition receptor essential for innate immunity. *Microbes and Infection*, 2000, **2**, 289-294.
- 62. EHLERS, S., KUTSCH, S., BENINI, J., et al.** NOS 2 derived Nitric Oxide regulates the size, quantity and quality of granuloma formation in Mycobacterium avium infected mice without affecting bacterial loads. *Immunology*, 1999, **98**, 313-323.
- 63. EHLERS, S., KUTSCH, S., EHLERS, E.M., et al.** Lethal granuloma disintegration in mycobacteria infected TNFRp55_/_mice is dependent on T cells and IL-2. *The JI*, 2000, **165**, 483-492.
- 64. EL-ETR, S.H., CIRILLO, J.D.** Entry Mecanisms of Mycobacteria. *Frontiers in Bioscience*, 2001, **6**, 737-747.
- 65. ERNST, W.A., THOMAS-USZYNSKI, S., TEITELBAUM, R., et al.** Granulysin, a T cell product, kills bacteria by altering membrane permeability. *The JI*, 2000, **165**, 7102-7108.
- 66. EUZEBY, J.P.** (Page consultée le 19/09/2001). Dictionnaire de bactériologie vétérinaire: Mycobacterium tuberculosis subsp. caprae, [en ligne]. Adresse URL: [http //www. bacterio. cict. fr /bacdico/mm/tuberculosiscaprae.html](http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/mm/tuberculosiscaprae.html).
- 67. EUZEBY, J.P.** (Page consultée le 07/06/2002). Dictionnaire de bactériologie vétérinaire. Quelques caractères permettant de différencier les mycobactéries du complexe « Mycobacterium tuberculosis », [en ligne]. Adresse URL: [http: // www. bacterio. cict. fr /m/mycobacterium. html](http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.html).

68. **FABRE, M., LECAUDEY, S.** (Page consultée le 09/09/01). Tuberculose et BK : diagnostic et identifications des mycobactéries [en ligne]. Adresse URL : <http://www.recherche-fr.com/bk/identif.htm>.
69. **FAIRBAIRN, I.P., STOBER, C.B., KUMARARATNE, D.S., et al.** ATP-mediated killing of intracellular mycobacteria by macrophages is a P2X(7)-dependent process inducing bacterial death by phagosome-lysosome fusion. *The JI*, 2001, **167**, 3300-3307.
70. **FENTON, M.J., VERMEULEN, M.W., KIM, S., et al.** Induction of gamma interferon production in human alveolar macrophages by *Mycobacterium tuberculosis*. *IAI*, 1997, **65**, 5149-5156.
71. **FERGUSON, J.S., VOELKER, D.R., Mc CORMACK, F.X., et al.** Surfactant Protein D Binds to *Mycobacterium tuberculosis* Bacilli and Lipoarabinomannan via Carbohydrate – lectin Interactions Resulting in Reduced Phagocytosis of the Bacteria by Macrophages. *The JI*, 1999, **163**, 2073-2080.
72. **FLYNN, J.L., CHAN, J.** Immunology of Tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.*, 2001, **19**, 93-129.
73. **FLYNN, J.L., ERNST, J.D.** Immune responses in tuberculosis. *Current Opinion in Immunology*, 2000, **12**, 432-436.
74. **FRATTI, R.A., BACKER, J.M., GRUENBERG, J., et al.** Role of phosphatidylinositol-3 kinase and Rab 5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest. *J. Cell. Biol.*, 2001, **154**, 631-644.
75. **GAN, H., NEWMAN, G.W., REMOLD, H.G.** Human macrophages acquire a hyporesponsive state of tumor necrosis factor alpha production in response to successive *Mycobacterium avium* serovar 4 stimulation. *IAI*, 1995, **63**, 1921-1926.
76. **GAN, H., NEWMAN, G.W., REMOLD, H.G.** Plasminogen activator inhibitor type 2 prevents programmed cell death of human macrophages infected with *Mycobacterium avium* serovar 4. *The JI*, 1995, **155**, 1304-1315.
77. **GARAPIN, A., MA, L., PESCHER, P., et al.** Mixed immune response induced by rodents with two naked DNA genes coding for mycobacterial glycosylated proteins. *Vaccine*, 2001, **19**, 2830-2841.
78. **GARCHON, H.J.** Récepteur à l'antigène des lymphocytes T. In: BACH, J.F., Immunologie. Paris, Flammarion Médecine Sciences, 3^{ème} édition, 16-23.
79. **GHEORGHIU, M.** BCG Induced Mucosal Immune Responses. *Int. J. Immunopharmac.*, 1994, **16**, 435-444.
80. **GILBERTSON, B., ZHONG, J., CHEERS, C.** Anergie, IFN γ Production and Apoptosis in Terminal Infection of Mice with *Mycobacterium avium*. *The JI*, 1999, **163**, 2073-2080.

81. **GOMES, M.S., PAUL, S., MOREIRA, A.L., et al.** Survival of Mycobacterium avium and Mycobacterium tuberculosis in acidified vacuoles of murine macrophages. *IAI*, 1999, **67**, 3199-3206.
82. **GRANGE, J.M.** Mycobacterium bovis infection in human beings. *Tuberculosis (Edinb)*, 2001, **81**, 71-77.
83. **GRANGE, J.M., STANFORD, J.L.** Dogma and innovation in the global control of tuberculosis: discussion paper. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 1994, **87**, 272-275.
84. **GRANGE, J.M., YATES, M.D.** Zoonotic aspects of Mycobacterium bovis infection. *Veterinary Microbiology*, 1994, **40**, 137-151.
85. **GRANGE, J.M., YATES, M.D., BOUGHTON, E.** The avian tubercle bacillus and its relatives. *Journal of Applied Bacteriology*, 1990, **68**, 411-431.
86. **GUERIN, I. de CHASTELLIER, C.** Disruption of the actin filament network affects delivery of endocytic contents marker to phagosomes with early endosome characteristics: the case of phagosomes with pathogenic mycobacteria. *Eur. J. Cell. Biol.*, 2000, **79**, 735-749.
87. **GUNNES, G. NORD, K., VATN, S., et al.** A case of the generalised avian tuberculosis in a horse. *The Veterinary Record*, 1995, **136**, 565-566.
88. **GUNN-MOORE, D.A., JENKINS, P.A., LUCKE, V.M.** Feline tuberculosis: a litterature review and discussion of 19 cases caused by an unusual mycobacterial variant. *The veterinary Record*, 1996, **138**, 53-58.
89. **HALBWACHS-MECARELLI, L.** Le Complément. In: BACH, J.F., *Traité d'Immunologie*. Paris : Flammarion Médecine-Sciences, 1993. 379-406.
90. **HARTMANN, P., PLUM, G.** Immunological Defense Mechanisms in Tuberculosis and MAC-Infections. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 1999, **34**, 147-152.
91. **HEDGE, H.R.** Anergy, AIDS and Tuberculosis. *Medical Hypothesis*, 1995, **45**, 433-440.
92. **HIRSCH, C.S., TOOSI, Z., JOHNSON, J.L., et al.** Augmentation of apoptosis and interferon gamma production at sites of active Mycobacterium tuberculosis infection in human tuberculosis. *J. Infect. Dis.*, 2001, **183**, 779-788.
93. **HOHN, H., KORTSIK, C., NILGES, K., et al.** Human Leucocyte Antigen-A2 restricted and Mycobacterium tuberculosis 19 kDa antigen specific-CD8+ T cell responses are oligoclonal and exhibit a T-Cell cytotoxic type 2 response cytokine-secretion pattern. *Immunology*, 2001, **104**, 278-288.
94. **HOLLAND, S.M.** Treatments of infections of the patients with Mendelian Susceptibility to Mycobacterial Infection. *Microbes and Infection*, 2000, **2**, 1579-1590.

95. **HOPEWELL, P.C., SANDE, M.A.** Impact of Human Immunodeficiency Virus Infection on the Epidemiology Clinical Features, Management and Control of Tuberculosis. *Clinical Infection Diseases*, 1995, **15**, 540-543.
96. **HORSBURGH, C.R.Jr.** Epidemiology of Mycobacterial Diseases in AIDS. *Res. Microb.*, 1992, **144**, 372-377.
97. **INSTITUT PASTEUR.** (Page consultée le 15/09/2001). Rapport d'activité de l'unité génétique mycobactérienne pour l'année 1999, responsable : GICQUEL Brigitte, [en ligne]. Adresse URL : <http://www.pasteur.fr/Gemyc.html>.
98. **INSTITUT PASTEUR.** (Page consultée le 29/08/2001). Rapport d'activité de l'unité de génétique moléculaire bactérienne pour l'année 2000, responsable : COLE Stewart, [en ligne]. Adresse URL : <http://www.pasteur.fr/recherche/RAR/RAR 2000./Lgmb.html>.
99. **INSTITUT PASTEUR.** (Page consultée le 29/08/2001). Rapport d'activité de l'unité de Physiopathologie de l'infection pour l'année 1998, responsable : MARCHAL Gilles, [en ligne]. Adresse URL : <http://www.pasteur.fr/recherche/RAR/>.
100. **INSTITUT PASTEUR.** (Page consultée le 29/08/2001). Site de l'unité de Génétique Mycobactérienne, [en ligne]. Adresse URL : <http://www.pasteur.fr/recherche/unités/Gemyc/>.
101. **INSTITUT PASTEUR PARIS.** (Page consultée le 07/11/2001). Tuberculose et vaccination, [en ligne] . Adresse URL : <http://www.pasteur.fr/actu/presse/com/dossiers/vaccins/tuberculose.html>.
102. **ISRAEL-BIET, D., CADRANEL, J.** HIV replication and pulmonary opportunistic infections. *Rev. Mal. Respir.*, 1998, **15**, 247-254.
103. **IVANYI, J.** T-Cell Fonctions in Tuberculosis. In: MUSTAPHA, A.S., AL-ATTIYAH, R.J., NATH, I., et al: T-Cell Subsets and Cytokines Interplay in Infections Diseases. Bâle: Karger, 1996. 27-34.
104. **JENKINS, P.A.** Mycobacteria in the environment. *Journal of Applied Bacteriology*, 1991, **70**, 137-142.
105. **JONES, B.W., MEANS, T.K., HELDWEIN, K.A., et al.** Different Toll-like receptor agonists induce distinct macrophages responses. *Journal of Leukocyte Biology*, 2001, **69**, 1036-1044.
106. **JUFFERMANS, N.P., VERBON, A., BELISLE, J.T., et al.** Mycobacterial Lipoarabinomannan Induces an Inflammatory Response in the Mouse Lung. A role for Interleukin-1. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2000, **162**, 486-489.
107. **KEANE, J., REMOLD, H.G., KORNFED, H.** Virulent Mycobacterium tuberculosis Strains Evade Apoptosis of Infected Alveolar Macrophages. *The JI*, 2000, **164**, 2016-2020.

108. **KIM, S.H., CHO, D., KIM, T.S.** Induction of in vivo resistance to Mycobacterium avium infection by intramuscular injection with DNA encoding interleukin-18. *Immunology*, 2001, **102**, 234-241.
109. **KREMER, L., ESTAQUIER, J., WOLOWCEUK, I., et al.** Ineffective Cellular Immune Response Associated with T Cell Apoptosis in Susceptible Mycobacterium bovis BCG-Infected Mice. *IAI*, 2000, **68**, 4264-4273.
110. **KRENSKY, A.M.** Granulysin: a novel antimicrobial peptide of cytolytic T lymphocytes and natural killer cells. *Biochem. Pharmacol.*, 2000, **59**, 317-320.
111. **KUSNER, D.J., ADAMS, J.** ATP-Induced Killing of Virulent Mycobacterium tuberculosis within Human Macrophages Requires Phospholipase D. *The JI*, 2000, **164**, 379-398.
112. **LAGRANGE, P.H.** Défenses anti-bactériennes. In: BACH, J.F. Traité d'Immunologie. Paris : Flammarion Médecine-Sciences, 1993. 627-647.
113. **LAGRANGE, P.H.** Les mycobactéries opportunistes. Réactions de l'hôte. *Méd. Mal. Infect.*, 1991, **21**, 35-45.
114. **LAMMAS, D.A., STOBER, C., HARVEY, C.J., et al.** ATP-induced killing of mycobacteria by human macrophages is mediated by purinergic P2Z (P2X7) receptors. *Immunity*, 1997, **7**, 433-444.
115. **LECLERC, C.** Sous-populations Th1 et Th2. In: CAVAILLON, J.M., Les Cytokines. Paris : Masson, deuxième édition, 1996. 383-400.
116. **LEDERMAN, M.M., GEORGES, D.L., KUSNER, D.J.** Mycobacterium tuberculosis and Its Purified Protein Derivative Activate Expression of the Human Immunodeficiency Virus. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 1994, **7**, 727-733.
117. **LEEMANS, J.C., JUFFERMANAS, N.P., FLORQUIN, S., et al.** Depletion of Alveolar Macrophages Exerts Protective Effects in Pulmonary Tuberculosis in Mice. *The JI*, 2001, **166**, 4604-4611.
118. **LEVIN, M., NEWPORT, M.** Inherited predisposition to mycobacterial infection: historical consideration. *Microbes and Infection*, 2000, **2**, 1549-1552.
119. **LI, B., BASSIRI, H., ROSSMAN, M.D., et al.** Involvement of the Fas/Fas-Ligand Pathway in Activation-Induced Death of Mycobacteria-Reactive Human $\gamma\delta$ T Cells: a Mechanism for the loss of $\gamma\delta$ T Cells in Patients with Pulmonary Tuberculosis. *The JI*, 1998, **161**, 1558-1567.
120. **LIMA, V.M.F., BONATO, V.L.D., LIMA, K.N., et al.** Role of Trehalose Dimycolate in Recruitment of Cells and Modulation of Production of Cytokines and NO in Tuberculosis. *IAI*, 2001, **69**, 5305-5312.
121. **LIN, Y., ZHANG, M., HOFFMAN, F.M., et al.** Absence of a Prominent Th2 Cytokine Response in Human Tuberculosis. *IAI*, 1996, **64**, 1351-1356.

122. **LINEHAN, S.A., MARTINEZ-POMARES, L., GORDON, S.** Macrophage lectins in host defense. *Microbes and Infection*, 2000, **2**, 279-288.
123. **LOTTEAU, V.** Entrée et survie de *Mycobacterium tuberculosis* dans les macrophages. *Médecine/Sciences*, 1994, **10**, 587-588.
124. **MAITI, D., BHATTACHARYYA, A., BASU, J.** Lipoarabinomannan from *Mycobacterium tuberculosis* promotes macrophages survival by phosphorylating Bad through a phosphatidyl inositol-3 kinase/Akt pathway. *J. Biol. Chem.*, 2001, **276**, 329-333.
125. **MALIK, Z.A., DENNING, G.M., KUSNER, D.J.** Inhibition of Ca²⁺ signaling by *Mycobacterium tuberculosis* is associated with reduced phagosome-lysosome fusion and increased survival within human macrophages. *The Journal of Experimental Medicine*, 2000, **191**, 287-302.
126. **MALIK, Z.A., IYER, S.S., KUSNER, D.J.** *Mycobacterium tuberculosis* phagosomes exhibit altered calmodulin-dependant signal transduction: contribution to inhibition of phagosome-lysosome fusion and intra cellular survival in human macrophages. *The JI*, 2001, **166**, 3392-3401.
127. **MANCA, C., TSENOVA, L., BERGTOLD, A., et al.** Virulence of a *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolate in mice is determined by failure to induce Th1 type immunity and is associated with induction of IFN α/β . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2001, **98**, 5752-5757.
128. **MARCHAL, G.** La réponse immunitaire au cours de la tuberculose. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1993, **4**, 216-224.
129. **MARCHAL, G.** Le réveil de la tuberculose. *La Recherche*, 1993, **24**, 380-388.
130. **MASSO, F., PAEZ, A., DIAZ de LEON, L., et al.** Collagen degrading activity associated with *Mycobacterium* species. *Thorax*, 1999, **54**, 439-441.
131. **MEANS, T. K., JONES, B.W., SCHROMM, A.B., et al.** Differential Effects of a Toll like receptor antagonists on *Mycobacterium tuberculosis*- induced macrophages responses. *The JI*, 2001, **166**, 4074-4082.
132. **MEANS, T.K., WANG, S., LIEN, E., et al.** Human Toll-Like Receptors Mediate Cellular Activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *The JI*, 1999, **163**, 3920-3927.
133. **MELLENDEZ, A., FLOTO, R.A., GILLOOLY, D., et al.** Fc γ R1 Coupling to Phospholipase D Initiates Sphingosine Kinase-Mediated Calcium Mobilization and Vesicular Trafficking. *J. Biol. Chem.*, 1998, **273**, 9393-9402.
134. **MIDDLETON, A.M., CHADWICK, M.V., NICHOLSON, A.G., et al.** The role of *Mycobacterium avium* complex fibronectine attachment protein in adherence to the human respiratory mucosa. *Mol. Microbiol.*, 2000, **38**, 381-391.

- 135. MINISTERE DU TRAVAIL ET DES AFFAIRES SOCIALES. DIRECTION GENERALE DE LA SANTE.** (Page consultée le 19/09/2001). Epidémiologie moléculaire de la tuberculose dans le département du Nord en 1995. *BEH* 30, 1997, [en ligne]. Adresse URL: <http://www.invs.santé.fr/beh/1997/9730>.
- 136. MOHAGHEGHPOUR, N., VOLLENHOVEN, A. GOODMAN, J., et al.** Interaction of Mycobacterium avium with Human Monocyte-Derived Dendritic Cells. *IAI*, 2000, **68**, 5824-5829.
- 137. MOHAN, V.P., SCANGA, C.A., YU, K., et al.** Effects of Tumor Necrosis Factor Alpha on Host Immune Response in Chronic Persistent Tuberculosis: Possible Role for Limiting Pathology. *IAI*, 2001, **69**, 1847-1855.
- 138. MONAGHAN, M.L., DOHERTY, M.L., COLLINS, J.D., et al.** The tuberculin test. *Veterinary Microbiology*, 1994, **40**, 111-124.
- 139. MONAHAN, I.M., BETTS, J., BANERJEE, D.K.** Differential expression of mycobacterial proteins following phagocytosis by macrophages. *Microbiology*, 2001, **147**, 459-471.
- 140. MOODY, D.B., BESRA, G.S., WILSON, I.A., et al.** The molecular basis of CD1-mediated presentation of lipid antigens. *Immunol. Rev.*, 1999, **172**, 285-296.
- 141. MUNDAYOOR, S., SHINNICK, T.** Identification of genes involved in the resistance of mycobacteria to killing by macrophages. *Ann. New York Acad. of Sci.*, 1993, 26-36.
- 142. MUZIO, M., MANTOVANI, A.** Toll-like receptors. *Microbes and Infection*, 2000, **2**, 251-255.
- 143. NATHAN, C., SHILOH, M.U.** Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationships between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, **97**, 8841-8848.
- 144. NCBI. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE.** (Page consultée le 07/06/2002). Taxonomy Browser for Mycobacterium, [en ligne]. Adresse URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Taxonomy/>
- 145. NOSS, E.H., PAI, R.K., SELLATI, T.J., et al.** Toll-like receptors 2-dependent inhibition of macrophage class II MHC expression and antigens processing by 19 kDa lipoprotein of Mycobacterium tuberculosis. *The JI*, 2001, **167**, 910-918.
- 146. O'BRIEN, R.J., PERRIENS, J.H.** Preventive therapy for tuberculosis in HIV infection: the promise and the reality. *AIDS*, 1995, **9**, 665-673.
- 147. ODDO, M., RENNO, T., ATTINGER, A.** Fas Ligand-Induced Apoptosis of Infected Human Macrophages Reduces the Viability of Intracellular Mycobacterium tuberculosis. *The JI*, 1998, **160**, 5448-5464.

148. **ORME, I.**, Mechanism underlying the Increased Susceptibility of Aged Mice to Tuberculosis. *Nutrition Reviews*, 1995, **53**, 35-40.
149. **ORME, I.M., ANDERSEN, P., HENRY BOOM, W.** T Cell Response to Mycobacterium tuberculosis. *The Journal of Infection Diseases*, 1993, **167**, 1481-1497.
150. **OTTENHOFF, T.H., de BOER, T., VERHAGEN, C.E., et al.** Human deficiencies in type 1 cytokine receptors reveal the essential role of type 1 cytokines in immunity to intracellular bacteria. *Microbes and Infection*, 2000, **2**, 1559-1566.
151. **OZINSKY, A., UNDERHILL, D.M., FONTENOT, J.D., et al.** The repertoire for pattern of recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between Toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, **97**, 13766-13771.
152. **PAPILLON, F., CHRETIEN, J.** Mycobactéries pulmonaires non tuberculeuses en dehors du SIDA. *Méd. Mal. Infect.*, 1991, **21**, 46-52.
153. **PASSMORE, J.S., LUKEY, P.T., RESS, S.R.** The human macrophage cell line U937 as an in vitro model for selective evaluation of mycobacterial antigen-specific cytotoxic T cell function. *Immunology*, 2001, **102**, 146-156.
154. **PASULA, R., WRIGHT, J.R., KACHEL, D.L. et al.** Surfactant protein A suppresses reactive nitrogen intermediates by alveolar macrophages in response to Mycobacterium tuberculosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 1999, **103**, 483-490.
155. **PEDEROY-KELLY, M., VENKETARAMAN, V., CONNELL, N.D.** Effects of Mycobacterium bovis BCG infection on regulation of L-arginine uptake and synthesis of reactive nitrogen intermediates in J 774.1 murine macrophages. *IAI*, 2001, **69**, 5823-5831.
156. **PEREIRA ARIAS-BOUDA, L.M., NGUYEN, L.N., HO, L.M.** Development of antigen detection assay for diagnosis of tuberculosis using sputum samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, **38**, 2278-2283.
157. **PERONNE, C.** Le couple tuberculose et infection à VIH. *Presse Med*, 1994, **23**, 731-733.
158. **PETHE, K., PUECH, V., DAFFE, M., et al.** Mycobacterium smegmatis laminin-binding glycoprotein shares epitopes with Mycobacterium tuberculosis heparin-binding haemagglutinin. *Molecular Microbiology*, 2000, **39**, 89-99.
159. **PEYRON, P., MARIDONNEAU-PARINI, L., STEGMANN, T.** Fusion of human neutrophil phagosomes with lysosomes in vitro: involvement of tyrosine kinases of the Src family and inhibition by mycobacteria. *J. Biol. Chem.*, 2001, **276**, 35512-35517.

160. **PIDDINGTON, D.L., FANG, F.C., LAESSIG, T., et al.** Cu, Zn, superoxide dismutase of *Mycobacterium tuberculosis* contributes to survival in activated macrophages that are generating an oxidative burst. *IAI*, 2001, **69**, 4980-4987.
161. **PIETERS, J.** Entry and survival of pathogenic mycobacteria in macrophages. *Microbes and Infections*, 2001, **3**, 249-255.
162. **QUIDING-JARBRINK, M., SMITH, D.A., BANCROFT, G.J.** Production of matrix metalloproteinases in response to mycobacterial infection. *IAI*, 2001, **69**, 5661-5670.
163. **RAO, M., STREUR, T.L., ALDWELL, F.E., et al.** Intracellular pH regulation by *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium bovis* BCG. *Microbiology*, 2001, **147**, 1017-1024.
164. **REVILLARD, J.P.**, Hypersensibilité retardée. In: BACH, J.F., *Traité d'Immunologie*. Paris : Flammarion Médecine-Sciences, 1993. 481-502.
165. **RHOADES, E.R., COOPER, A.M., ORME, I.M.** Chemokine Response in Mice Infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *IAI*, 1995, **63**, 3871-3877.
166. **RHOADES, E.R., ULLRICH, H.J.** How to establish a lasting relationship with your host: lessons learned from *Mycobacterium* spp. *Immunol. Cell. Biol.*, 2000, **78**, 301-310.
167. **RICH, E.A.** Pulmonary Immune Response to *Mycobacterium tuberculosis* and Human Immuno deficiency Virus. *Infection Agents and Disease*, 1996, **5**, 108-118.
168. **RICH, E.A., ELLNER, J.J.** Pathogenesis of Tuberculosis. In: FRIEDMAN, L.N. *Tuberculosis: Current Concepts and Treatment*. London: CRC Press, 1994. 27-51.
169. **RIEDER, H.L.**, Epidemiology of tuberculosis in Europe. *Eur. Resp. J.*, 1995, **8**, 620-632.
170. **ROBERT, J., TRYSTAM, D., TRUFFOT-PERNOD, J.** (Page consultée 19/09/2001) Surveillance de la tuberculose à bacilles multiresistants en France, en 1996 et 1997. *BEH*, 2000, **40**, [en ligne]. Adresse URL : <http://www.invs.santé.fr/beh/2000/0040/index.html>.
171. **ROCKETT, K.A., BROOKES, R., UDALOVA, I., et al.** 1-25 Dihydroxyvitamin D3 Induces Nitric Oxide Synthetase and Suppresses Growth of *Mycobacterium tuberculosis* in a Human Macrophage-like Cell Line. *IAI*, 1998, **66**, 5314-5321.
172. **ROGER, P.M., BERMUDEZ, L.E.** Infection of mice with *Mycobacterium avium* primes CD8+ lymphocytes for apoptosis upon exposure to macrophages. *Clin. Immunol.*, 2001, **99**, 378-386.
173. **ROJAS, M., GARCIA, L.F., NIGOU, J., et al.** Mannosylated lipoarabinomannan antagonizes *Mycobacterium tuberculosis*-induced macrophages apoptosis by altering Ca²⁺-dependent cell signaling. *J. Infect. Dis.*, 2000, **182**, 240-251.

174. **ROOK, G., BAKER, R., WALKER, B., et al.** Local regulation of glucocorticoid activity in sites of inflammation. Insights from the study of tuberculosis. *Ann. NY. Acad. Sci.*, 2000, **917**, 913-922.
175. **ROOK, G.A., SEAH, G., USTIANOWSKI, A.** Mycobacterium tuberculosis: immunology and vaccination. *Eur. Resp. J.*, 2001, **17**, 537-557.
176. **RUSSO, D.M., KOZLOVA, N., LAKEY, D.L., et al.** Naive Human T Cells Develop into TH1 effectors after stimulation with Mycobacterium tuberculosis-Infected Macrophages or Recombinant Ag85 Proteins. *IAI*, 2000, **68**, 6826-6832.
177. **SANGARI, F.J., GOODMAN, J., PETROFSKY, M., et al.** Mycobacterium avium Invades the Intestinal Mucosa Primarily by Interacting with Enterocytes. *IAI*, 2001, **69**, 1515-1520.
178. **SANTUCCI, M.B., AMICOSANTE, M.,CICCONI, R.** Mycobacterium tuberculosis-induced apoptosis in monocytes/macrophages : early membrane modifications and intracellular mycobacterial viability. *J. Infect. Dis.*, 2000, **181**, 1506-1509.
179. **SAUNDERS, B.M., COOPER, A.M.** Restraining mycobacteria: role of granulomas in mycobacterial infections. *Immunol. Cell. Biol.*, 2000, **78**, 334-341.
180. **SAUNDERS, B.M, FRANK, A.A., ORME, I.M.** Granuloma formation is required to contain bacillus growth and delay mortality in mice chronically infected with Mycobacterium tuberculosis. *Immunology*, 1999, **98**, 324-328.
181. **SAUNDERS, B.M., ZHAN, Y., CHEERS, C.** Endogenous interleukin 12 is involved in resistance of mice to Mycobacterium avium Complex infection. *IAI*, 1995, **63**, 4011-4015.
182. **SCANGA , C.A., MOHAN, V.P., YU, K., et al.** Depletion of CD4+ T cells causes reactivation of murine persistent tuberculosis despite continued expression of interferon gamma and nitric oxide synthetase 2. *J. Exp. Med.*, 2000, **192**, 347-358.
183. **SEAH, G.T., ROOK, G.A.** IL-4 influences apoptosis of Mycobacterium-reactive lymphocytes in the presence of TNF alpha. *The JI*, 2001, **167**, 1230-1237.
184. **SERBINA, N.V., FLYNN, J.L.** CD8+ T Cells participate in the memory immune response to Mycobacterium tuberculosis. *IAI*, 2001, **69**, 4320-4328.
185. **SERBINA, N.V., LIU, C., SCANGA, C.A., et al.** CD8+ CTL from lungs of Mycobacterium tuberculosis-infected mice express perforin in vivo and lyse infected macrophages. *The JI*, 2000, **165**, 353-363.
186. **SHAMS, H., WIZEL, B., WEIS, S.E., et al.** Contribution of CD8+ T Cells to gamma interferon production in human tuberculosis. *IAI*, 2001, **69**, 3497-3501.
187. **SHANG, X., QIU, B., FRAIT, K.A., et al.** Chemokine receptor 1 knockout abrogates natural killer cell recruitment and impairs type 1 cytokines in lymphoid tissue during pulmonary granuloma formation. *Am. J. Pathol.*, 2000, **157**, 2055-2063.

188. SHINNICK, T.M., HAROLDKING, C., QUINN, F.D. Molecular Biology, Virulence and Pathogenicity of Mycobacteria. *American Journal of Medicine and Science*, 1995, **309**, 92-98.
189. SHIRATSUCHI, H., OKUDA, Y., TSUYUGUCHI, I. Recombinant Human Interleukin 2 reverses in vitro-deficient cell-mediated immune response to tuberculin purified protein derivative by lymphocytes of tuberculous patients. *IAI*, 1987, **55**, 2126-2131.
190. SILVA, C.L. The potential use of heat-shock proteins to vaccinate against mycobacterial infections. *Microbes and Infection*, 1999, **1**, 429-435.
191. SILVA, C.L., LOWRIE, D.B. Identification and characterization of murine cytotoxic T Cells that kill Mycobacterium tuberculosis. *IAI*, 2001, **25**, 714-725.
192. SILVA, R.A., FLORIDO, M., APPELBERG, R. Interleukin-12 primes CD4+ T cells for interferon gamma production and protective immunity during Mycobacterium avium infection. *Immunology*, 2001, **103**, 368-374.
193. SLOVIS, B.S., PLITMAN, J.D., HAAS, D.W. The case against anergy testing as a routine adjunct to tuberculin skin testing. *JAMA*, 2000, **283**, 2003-2007.
194. SLY, L.M., LOPEZ, M., NAUSEEF, W.M., *et al.* 1 alpha, 25-dihydroxy vitamin D3 induced monocyte anti mycobacterial activity is regulated by phosphatidylinositol 3-kinase and mediated by the NADPH-dependent phagocyte oxidase. *J. Biol. Chem.*, 2001, **12**, 228-240.
195. SMALL, P.M., MOSS, A. (Page consultée le 02/01/1997). Stanford University, University of California. Molecular epidemiology and the new tuberculosis.[enligne]. AdresseURL:<http://molepi.stanford.edu/molepiandtb.article.html>.
196. SMITH, S.M., DOCKRELL, H.M. Role of CD8 T cells in mycobacterial infections. *Immunol. Cell. Biol.*, 2000, **78**, 325-333.
197. SOUSA, A.O., MAZZACCARO, R.J., RUSSELL, R.G. *et al.* Relative contributions of distinct MHC class I-dependent cell populations in protection in tuberculosis infection in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, **97**, 4204-4208.
198. STENGER, S., MODLIN, R.L. T cell mediated immunity to Mycobacterium tuberculosis. *Current Opinion in Microbiology*, 1999, **2**, 89-93.
199. STEWART, G.R., SNEWIN, V.A., WALZL, G., *et al.* Overexpression of heat shock proteins reduces survival of Mycobacterium tuberculosis in the chronic phase of infection. *Nat. Med.*, 2001, **7**, 732-737.
200. STOBER, C.B., LAMMAS, D.A., LI, C.M., *et al.* ATP-Mediated Killing of Mycobacterium bovis Bacille Calmette Guerin Within Human Macrophages is Calcium

Dependent and Associated with the acidification of Mycobacteria-Containing Phagosomes. *The JI*, 2001, **166**, 6276-6286.

201. STOKES, R.W., THORSON, L.M., SPEERT, D.P. Nonopsonic and opsonic Association of Mycobacterium tuberculosis with Resident Alveolar Macrophages is Inefficient. *The JI*, 1998, **160**, 5514-5521.

202. STROHMEIER, G.R., FENTON, M.J. Roles of lipoarabinomannan in the pathogenesis of tuberculosis. *Microbes and Infection*, 1999, **1**, 709-717.

203. SUGAWARA, I. Interleukin 18 (IL-18) and infection diseases with special emphasis on diseases induced by intracellular pathogens. *Microbes and Infection*, 2000, **2**, 1257-1263.

204. SUGITA, M., van der WEL, N., ROGERS, R.A., et al. CD1c molecules broadly survey the endocytic system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2000, **97**, 8445-8450.

205. TAZI, A., HANCE, A.J. Cytokines et Hypersensibilité retardée. *In* : Cytokines et Médecine interne, GALAVAUD, P., EMILY, D. Paris : Masson, 1997. 123-132.

206. THE SANGER CENTRE. (Page consultée le 30/08/2001). Mycobacterium tuberculosis H37Rv functional classification, [en ligne]. Adresse URL : <http://www.sanger.ac.uk/MTBH37RV/>.

207. THOREL, M.F. La Tuberculose et les Mycobactérioses. *Bull. Soc. Vét. Prat. de France.*, 1994, **78**, 409-422.

208. THORSON, L.M., DOXSEE, D., SCOTT, M.G., et al. Effect of Mycobacterial Phospholipids on Interaction of Mycobacterium tuberculosis with Macrophages. *IAI*, 2001, **69**, 2172-2179.

209. TOOSI, Z. Cytokine circuits in tuberculosis. *Infections agents and Diseases*, 1996, **5**, 98-107.

210. TSUJI, S., MATSUMOTO, M., TAKEUCHI, O., et al. Maturation of Human Dendritic Cells by Cell Wall Skeleton of Mycobacterium bovis BCG: involvement of Toll like Receptors. *IAI*, 2000, **17**, 945-951.

211. TSUKAGUCHI, K., BALAJI, K.N., HENRYBOOM, W. CD4+ $\alpha\beta$ T Cell and $\gamma\delta$ T Cell Responses to Mycobacterium tuberculosis. Similarities and Differences in Ag Recognition, Cytotoxic Effector Function and Cytokine Production. *The JI*, 1995, **154**, 1786-1796.

212. TSUYUGUCHI, I. Regulation of the Human Immune Response in Tuberculosis. *Infections Agents and Disease*, 1996, **5**, 82-97.

213. ULRICHS, T., ANDING, P., PORCELLI, S., et al. Increased Numbers of ESAT-6- and Purified Protein Derivative-Specific Gamma Interferon-producing Cells in Subclinical and Active Tuberculosis Infection. *IAI*, 2000, **68**, 6073-6076.

214. **ULRICHS, T., PORCELLI, S.A.** CD1 Proteins: Targets of T Cell Recognition in Innate and Adaptive Immunity. *Reviews in Immunogenetics*, 2000, **2**, 416-432.
215. **UNDERHILL, D.M., OZINSKY, A., SMITH, K.D. et al.** Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Immunology*, 1999, **96**, 14459-14463.
216. **van PINXTEREN, L.A., CASSIDY, J.P., SMEDEGAARD, B.H., et al.** Control of latent Mycobacterium tuberculosis infection is dependent on CD8 T cells. *Eur. J. Immunol.*, 2000, **30**, 3689-3698.
217. **VANHAM, G., TOOSI, Z., HIRSCH, C.S., et al.** Examining a paradox in the pathogenesis of human pulmonary tuberculosis: immune activation and suppression/energy. *Tuber. Lung. Dis.*, 1997, **78**, 145-148.
218. **VIARD, J.P.** Déficit Immunitaire, infection par le VIH et SIDA. In: BACH, J.F., *Immunologie*. Paris : Flammarion Médecine Science, 1999. 306-314.
219. **VINCENT, V.** Epidémiologie de la tuberculose chez l'homme. *Le Point Vétérinaire*, 1994, **159**, 41-44.
220. **WAHL, S.M., GREENWELL-WILD, T., PENG, G., et al.** Co-Infection with Opportunistic Pathogens Promotes Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection in Macrophages. *The Journal of Infectious Diseases*, 1999, **179**, 457-460.
221. **WAHL, S.M., GREENWELL-WILD, T., HALE-DONZE, H.** Permissive factors for HIV-1 infection of macrophages. *J. Leukoc. Biol.*, 2000, **68**, 303-310.
222. **WALLACE, D.** The resurgence of Tuberculosis in New York City: A mixed Hierarchically and Spatially diffused Epidemic. *American Journal of Public Health*, 1994, **84**, 1000-1003.
223. **WALLIS, R.S.** New Approaches to Identification of Antigens of Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Leukocyte Biology*, 1994, **55**, 575-579.
224. **WALLIS, R.S., ELLNER, J.J.** Cytokines and Tuberculosis. *Journal of Leukocyte Biology*, 1994, **55**, 676-681.
225. **WANG, J., WAKEHAM, J., HARKNESS, R., et al.** Macrophages are significant source of type 1 cytokines during mycobacterial infection. *J. Clin. Invest.*, 1999, **109**, 1023-1029.
226. **WAYNE, L.G.** Dormancy of Mycobacterium tuberculosis and latency of disease. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 1994, **11**, 908-910.
227. **WAYNE, L.G., SRAMEK, H.A.** Agents of Newly Recognized or Infrequently Encountered Mycobacterial Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 1992, **5**, 1-25.

228. **WEISSLER, J.C.** Southwestern Internal Medicine Conference: tuberculosis-immuno pathogenesis and therapy. *The American Journal of the Medical Sciences*, 1993, **305**, 52-65.
229. **WESCH, D., MARX, S., KABELITZ, D.** Comparative analysis of $\alpha\beta$ and $\delta\gamma$ T cell activation by Mycobacterium tuberculosis and isopentenyl pyrophosphate. *Eur. J. Immunol.*, 1997, **27**, 952-956.
230. **WIGGINTON, J.E., KIRSCHNER, D.** A model to depict cell mediated immune regulatory mechanisms during human infection with Mycobacterium tuberculosis. *The JI*, 2001, **166**, 1951-1967. 121
231. **WOLINSKY, E.** Mycobacterial diseases other than tuberculosis. *Clinical Infections Diseases*, 1992, **15**, 1-12.
232. **WORLD HEALTH ORGANIZATION.** (Page consultee le 19/09/2001). Global Tuberculosis Control, WHO Report 2001 [en ligne]. Adresse URL : <http://www.who.int/gtb/publications/globrep01>.
233. **YOUNG, L.S., BERMUDEZ, L.E., INDERLIED, C.B.** Mycobacteria and AIDS, treatment, prevention and future prospects. *Res. Microb.*, 1992, **142**, 420-424.
234. **ZHANG, M., GONG, J., IYER, D.V., et al.** T cell cytokine responses in persons with tuberculosis and human immunodeficiency virus infection. *J. Clin. Invest.*, 1994, **94**, 2435-2442.
235. **ZHANG, M., YUANGUANG, L., IYER, D.V., et al.** T cell cytokine responses in human infection with Mycobacterium tuberculosis. *IAI*, 1995, **63**, 3231-3236.
236. **ZIMMERLI, S., EDWARD, S., ERNST, J.D.** Selective receptors blockade during phagocytosis does not alter the survival and growth of Mycobacterium tuberculosis in human macrophages. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 1996, **15**, 760-770.

Toulouse, 2003.

NOM : PERROTEAU

PRENOM: Cécile

TITRE : LES MECANISMES CELLULAIRES ET MOLECULAIRES DE L'INFECTION MYCOBACTERIENNE.

RESUME :

En pénétrant dans les macrophages tissulaires, *Mycobacterium tuberculosis* et *M. avium* bloquent le signal calcique initiant la fusion phagolysosomale. Ils se multiplient dans un phagosome immature et sécrètent des antigènes présentés aux lymphocytes T $\alpha\beta$ CD4+, CD8+ et $\gamma\delta$. L'immunité protectrice est cellulaire et requiert la synthèse macrophagique puis lymphocytaire de cytokines de type 1. Les cellules T lysent les phagocytes infectés par exocytose de granules mycobactéricides ou contacts Fas-FasL. Les bacilles virulents inhibent l'apoptose des phagocytes et induisent la synthèse d'immunosuppresseurs. La constitution de granulomes lymphomonocytaires jugule efficacement l'infection dans 90% des cas. Le réveil de l'infection résulte d'un affaiblissement de l'immunité de type 1 -cas du VIH- qui s'aggrave pendant la phase clinique : la suppression progressive des fonctions T et l'apoptose lymphocytaire massive sont induites par la forte charge antigénique des phagocytes infectés chroniques.

MOTS-CLES: MYCOBACTERIES/ TUBERCULOSE/ IMMUNITE CELLULAIRE/ CYTOKINES DE TYPE 1 / CO-INFECTION VIH-1.

ENGLISH TITLE: CELLULAR AND MOLECULAR MECHANISMS OF MYCOBACTERIAL INFECTION

ABSTRACT:

Mycobacterium tuberculosis and *M. avium* enter the resident macrophages and prevent the calcium-dependent transduction signaling, which triggers phagolysosome fusion. The immature phagosome promotes active growth of bacilli which release antigens priming $\alpha\beta$ CD4+, CD8+ and $\gamma\delta$ T lymphocytes. The protective immune response requires type 1 cytokines by macrophages and T cells. Lymphocyte Fas/Fas-Ligand interactions and specific mycobactericidal granule exocytosis mediate infected macrophages cytolysis. Virulent strains inhibit macrophage apoptosis and bactericidal mechanisms by inducing immunosuppressive antagonist cytokine synthesis. Lymphomonocytic granuloma formation provides an efficient infection control in 90% of the hosts. Reactivation occurs as type 1 immunity decreases, especially in case of HIV co-infection. Active infection correlates with increased T cells apoptosis and T functions suppression, induced by large antigenic loads delivered from chronically infected phagocytes.

KEY WORDS: MYCOBACTERIA/ TUBERCULOSIS/ CELLULAR IMMUNITY/ TYPE 1 CYTOKINES / HIV-1 COINFECTION.