



**UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH**  
**FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES**  
**DEPARTEMENT DE BIOLOGIE**

**Projet de Fin d'Études**

Licence Sciences & Techniques

**Sciences Biologiques Appliquées et Santé  
(LST - SBAS)**

**Intérêt de la technique Quantiféron dans le diagnostic  
de la tuberculose latente.**

**Présenté par :** Amine CHAOUCH

**Encadré par :** Pr. M.Iraqi(FST Fès)

Dr. El Messaoudi(Institut Pasteur du Maroc)

**Soutenu le :** 07 Juin 2018

**Devant le jury composé de :**

Pr M.Iraqi

Pr. S.Guissi

Dr. Mly.ElMessaoudi

**Stage effectué à :** L'institut Pasteur du Maroc

**Année universitaire 2017-2018**

## Dédicaces

### *A mes chers Parents :*

*Vous aviez toujours été à là pour moi, comme vous m'aviez toujours offert les bonnes conditions pour poursuivre mes études, je ne saurai comment vous remercier pour tout ce que vous aviez fait pour moi.*

### *A mes sœurs :*

*Qui m'ont soutenu et orienté vers mes études.*

### *A mon oncle Lotfi :*

*Vous qui m'aviez beaucoup conseillé tout au long de mon cursus, je vous dédie ce travail comme je vous serai toujours reconnaissant.*

### *A ma tante Naima et mon oncle Hassan :*

*Je vous remercie pour vos prières qui m'ont beaucoup aidé.*

### *Au Docteur Giath Gazal :*

*Un grand merci pour le partage de votre savoir et de vos conseils ainsi qu'à l'aide apporter de votre part.*

*Sans oublier mes tantes Malika, Asmaa et mes oncles Hassan, Najib et Sakhi.*

## **Remerciements**

Je voudrai tous d'abord remercier Dieu pour sa miséricorde qu'il nous accorde.

Je tiens à remercier tous mes professeurs pour leur sérosité et le partage de leurs savoir.

Mes profonds remerciements vont aussi à mon encadrant interne Pr Iraqui, malgré les occupations qu'il assume, il a toujours eu le temps pour m'écouter, me conseiller et me corriger ce rapport.

A Dr El Messaoudi responsable du laboratoire de Mycobactérie et tuberculose à l'institut Pasteur Maroc, ainsi que Mr. Abdelmjid Laammal Mr.Fouad Chtioui et Madame Malika Messaoudi pour leur disponibilité.

Mes gratitudes vont à Professeur Sanaa Guissi Membre du jury, dont sa présence constitue pour moi un grand honneur. Veuillez accepter Madame le témoignage de mon immense gratitude.

Je remercie le Professeur A.Tazi Chef du département de la Biologie à la FSTF et le Professeur S.Haloti coordonnateur de la filière SBAS pour leurs aides.

Enfin je remercie mes parents, tous les membres de ma familles et amis pour leur soutien et leurs conseils.

## Résumé

La tuberculose est une maladie respiratoire fortement contagieuse qui s'attaque aux poumons et d'autres parties et organes du corps humain, elle est liée à la pénétration dans l'organisme du *Mycobactérium tuberculosis* ou bacille de Koch, le principal mode de transmission est la voie aérienne.

Notre étude a pour but de déterminer l'efficacité du Quantiféron dans le dépistage d'une réelle infection latente. Durant cette étude nous avons analysé 70 prélèvements du sang provenant de différents centres de diagnostic de la tuberculose et des maladies respiratoires et des hôpitaux de la ville de Casablanca et ses régions. En ce qui concerne la méthodologie, nous nous sommes intéressés à une technique usuelle utilisée dans le diagnostic de la tuberculose latente c'est le test Quantiféron qui permet de mesurer in vitro par technique ELISA la quantité d'IFN-gamma secrétée par les lymphocytes T, suite à une stimulation par des antigènes spécifiques du *Mycobactérium tuberculosis*, qui n'existe pas dans le vaccin BCG ce qui confère une spécificité plus élevée que le test Intradermoréaction (IDR), qui possèdent plusieurs inconvénients.

Le dépistage de la tuberculose latente est très important surtout chez les personnes qui suivent un traitement par corticoïdes ou anti-TNF car ils peuvent être à l'origine de l'activation d'une tuberculose active. Il est donc important de sensibiliser les gens en leurs expliquant l'importance du diagnostic de la tuberculose latente.

# Sommaire

AVANT PROPOS.....	1
LISTE DES ABREVIATIONS.....	
LISTE DES FIGURES.....	
LISTE DES TABLEAUX.....	
INTRODUCTION .....	1
<b>I. GENERALITES :.....</b>	<b>2</b>
<i>I.1. Historique :.....</i>	<i>2</i>
<i>I.2. Épidémiologie :.....</i>	<i>2</i>
I.2.1 Situation épidémiologique de la tuberculose au Monde :.....	2
I.2.2. Situation épidémiologique de la tuberculose au Maroc : .....	2
<b>II. CARACTERES GENERAUX DE <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i>.....</b>	<b>4</b>
<i>II.1. Hôtes et transmission .....</i>	<i>4</i>
II.1.1 Hôtes.....	4
II.1.2. Transmission :.....	4
<i>II.2. Caractères morphologiques : .....</i>	<i>5</i>
<i>II.3 Structure de l'enveloppe de Mycobacterium tuberculosis. ....</i>	<i>6</i>
<i>II.4. Caractères physiologiques .....</i>	<i>7</i>
<b>III- PATHOGENESE DE <i>M. TUBERCULOSIS</i> .....</b>	<b>7</b>
<i>III.1. Les Symptômes.....</i>	<i>7</i>
<i>III.2. Physiopathologie .....</i>	<i>7</i>
<i>III.3. La tuberculose pulmonaire : .....</i>	<i>8</i>
<i>III.5. La tuberculose extrapulmonaire.....</i>	<i>8</i>
<b>IV. REPONSE IMMUNITAIRE.....</b>	<b>8</b>
<i>IV.1. Réponse immunitaire innée contre <i>M. tuberculosis</i>.....</i>	<i>8</i>
<i>IV.2. Reponse immunitaire adaptative contre <i>M. tuberculosis</i>.....</i>	<i>9</i>
<b>V. DIAGNOSTIC DE LA TUBERCULOSE.....</b>	<b>10</b>
<i>V.1. L'examen radiologique : .....</i>	<i>10</i>
<i>V.2. Prélèvements .....</i>	<i>10</i>
<i>V.3. Méthodes conventionnelles.....</i>	<i>10</i>
V.3.1. Examen direct.....	10
V.3.2. Culture .....	10
<i>V.4. Examen moléculaire .....</i>	<i>11</i>
V.4.1. Test Hain .....	11
V.4.2. Test Xpert MTB\RIF (GENEXPERT).....	11
<i>V.5. Examen sérologique .....</i>	<i>12</i>

V.5.1. L'intradermoréaction à la tuberculine (IDR) .....	12
V.5.2. Les test interféron gamma release assays .....	12
<b>MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>14</b>
<b>I. RECHERCHE DE MYCOBACTERIES PAR EXAMEN AU MICROSCOPE .....</b>	<b>14</b>
<i>I.1. Préparation de frottis .....</i>	<i>14</i>
<i>I.2. Technique de coloration.....</i>	<i>14</i>
<i>I.3. Lecture .....</i>	<i>15</i>
<b>II. TECHNIQUES DE RECHERCHE DES MYCOBACTERIES PAR CULTURE (METHODE DE PETROFF) .....</b>	<b>16</b>
<b>III. ANTIBIOGRAMME DES MYCOBACTERIES .....</b>	<b>16</b>
<i>Principe.....</i>	<i>16</i>
<b>IV. QUANTIFERONTB-GOLD-IN TUBE .....</b>	<b>17</b>
<i>IV.1. Principe.....</i>	<i>17</i>
<i>IV.2. Matériel.....</i>	<i>18</i>
<i>IV.3. Méthodologie.....</i>	<i>18</i>
IV.3.1. Étape 1 : Prélèvement du sang.....	19
IV.3.2. Étape 2 : Technique ELISA .....	19
IV-3-3 Calculs et interprétation du test.....	22
<b>RESULTATS .....</b>	<b>24</b>
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>27</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>29</b>
<b>RESUME.....</b>	<b>30</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>31</b>
<b>WEBOGRAPHIE.....</b>	<b>34</b>

## **Avant propos**

Le projet de fin d'étude est une étape très importante dans la carrière d'un étudiant. Il permet de développer l'autonomie et la responsabilité ainsi d'affirmer le savoir-faire et d'acquérir des compétences qui vont nous servir au sein des entreprises par l'amélioration de l'esprit pratique. De plus, ce stage nous a donné la possibilité de contacter les patients et de les sensibiliser envers leurs maladies et le style de vie qu'ils doivent suivre pour une amélioration de leur santé et celle des personnes autour d'eux.

Au sein de la FST Fès, nous sommes amenés à effectuer un stage de deux mois pour développer nos acquis théoriques dans un milieu professionnel. Pour cela l'étudiant devra réaliser un projet visant à résoudre une problématique de façon exhaustive à l'aide des matériels appropriés et sous le contrôle d'un professionnel du domaine.

Le travail a été réalisé dans le laboratoire de Mycobactérie et Tuberculose de l'Institut Pasteur du Maroc à Casablanca du 04 avril au 21 mai 2018.

### **Présentation de l'institut Pasteur du Maroc :**

La présence Pasteurienne au Maroc remonte à 1910, date à laquelle l'Institut Sanitaire de Tanger ouvre ses portes. Mais ce n'est que le 14 juillet 1913 que cet institut sanitaire devient officiellement l'institut Pasteur de Tanger avec les missions de préparation des vaccins anti rabique et anti varioliques et de santé publique avec les services de vaccination et les laboratoires d'analyses bactériologiques médicales et vétérinaires. L'idée de créer un Institut Pasteur Marocain fut envisagée dès 1915. Mais ce n'est qu'en 15 Novembre 1929, que l'idée est concrétisée par la signature de la convention entre l'Institut Pasteur du Maroc avec le regroupement des deux Instituts de Casablanca et de Tanger. Le Décret Royal N° 176-66 du 23 Juin 1967 complété par celui de Novembre de la même année donne naissance à l'Institut Pasteur du Maroc avec le regroupement des deux Instituts de Casablanca et de Tanger. L'institut Pasteur de Casablanca jouit de l'autonomie dès sa création et est défini, au départ comme un centre de recherche scientifique, orienté sur la recherche humaine et vétérinaire, alors que celui de Tanger est axé sur la bactériologie appliquée.

### **Présentation du service :**

Le laboratoire des Mycobactéries et Tuberculose de l'IPM ne cesse de déployer tous ses efforts pour répondre aux demandes et besoins des patients de la région de Casablanca et ses environs.

## **Missions :**

Le laboratoire des Mycobactéries et Tuberculose (LM&TB) est une plateforme technique spécialisée en mycobactériologie pour répondre aux demandes de cliniciens de plus en plus exigeants la qualité et la rapidité dans les résultats. Le LM&TB est partenaire et scientifiques nationaux et internationaux. Les activités du LM&TB peuvent se répartir comme suit :

- **70%** d'activité de recherche et santé publique, en collaboration avec le programme national de lutte antituberculeuse (PNLAT) et les autres organismes partenaires.
- **30%** d'activité de service pour le compte du centre de Biologie Médicale.

Dans le cadre de ses activités de diagnostic, les prélèvements reçus au laboratoire proviennent des patients venant au CBM de l'institut, les autres demandes émanent des laboratoires privés et concernent surtout la réalisation des cultures et des tests de sensibilités aux antibiotiques. Les milieux les plus fréquemment utilisés au laboratoire sont les milieux solides (LJ). Ils sont fabriqués dans une unité de fabrication de milieux et réactifs de l'IMP.

Les analyses demandées concernent la microscopie à la recherche de bacilles tuberculeux, les cultures et les tests de sensibilités aux antibiotiques ou antibiogrammes. La majorité des prescripteurs sont les médecins des centres de diagnostic de la tuberculose et des maladies respiratoires (CDTMR). Par ailleurs, le LM&TB reçoit des demandes de diagnostic moléculaires et de test de détection de la production d'interféron gamma (Quantiféron).



## Liste des abréviations

ATB	:	Antibiotique.
BAAR.	:	Bacille acido-alcool-résistant.
BCG	:	Bacille de Calmette-Guerin.
BK	:	Bacille de Koch.
CDTMR	:	Centre de diagnostic de tuberculose et des maladies respiratoires.
DCS	:	Cellules dendritiques.
ELISA	:	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay.
INH	:	Isoniazide.
IDR	:	Intradermo-réaction.
IFN $\gamma$	:	Interféron gamma.
IGRA	:	Interféron gamma.
L-J	:	Löwenstein-Jensen.
LT	:	Lymphocyte T.
Min	:	Minute.
ml	:	Millilitre.
MPB	:	Méga Paire de Base.
MTB	:	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> .
OMS	:	Organisation Mondiale de la Santé.
PAMP	:	Patrons Moléculaires Associées aux Pathogènes.
PHA	:	Phytohémagglutine.
PRR	:	Pattern Recognition Receptors.
QTF	:	QuantiFERON-TB Gold In Tube.
SI	:	Séquence d'Insertion.
SIDA	:	Syndrome d'Immunodéficience Acquise.
TLR	:	Toll-Lik Receptor.
TNF $\alpha$	:	Tumor Necrosis Factor $\alpha$ .
$\mu\text{m}$	:	Micromètre.
VIH	:	Virus Immuno déficience Humaine.

## Liste des figures

Figure 1 : Mode de transmission du Bacille de Koch.....	5
Figure 2 : Bacilles de Koch en microscope optique.....	5
Figure 3 : Structure de l'enveloppe mycobacterienne.....	6
Figure 4 : Aspect des colonies du Mycobacterium tuberculosis à la culture sur le milieu Löwenstein-Jensen.....	11
Figure 5 : réaction suite à une injection intradermique.....	12
Figure 6 : Microplaque et configuration recommandée pour les tubes de valeur zéro, antigène TB et mitogène.....	21
Figure 7 : Graphique représentant le pourcentage des tests Quantiférons Positives, négatives et indéterminés.....	24
Figure 8 : Répartition selon les tranches d'âge.....	25

## Liste des tableaux

Tableau 1 : les proportions critiques.....	17
Tableau 2 : Préparation de conjugué.....	20
Tableau 3 : Calcul et Interprétation du test .....	23

## INTRODUCTION

Parmi les pathologies infectieuses les plus répandues, on trouve les infections respiratoires qui sont causées par des microorganismes tel que les virus, bactéries et champignons. La tuberculose est une maladie respiratoire fortement contagieuse qui s'attaque aux poumons et d'autres parties et organes du corps humain, elle est considérée comme étant un réel problème de santé public pour une majeure partie de la population mondiale. Selon les estimations de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) un tiers de la population mondiale serait infecté par la bactérie responsable de la tuberculose. La maladie serait à l'origine de 1,7 millions de décès pour la seule année 2016, dont 374000 décès de personnes atteintes d'une tuberculose associée à une infection par le VIH. Pour en finir avec cette maladie infectieuse, les chercheurs s'attèlent à la mise au point de nouveaux vaccins ainsi qu'au développement d'antibiotiques et d'outils diagnostics plus performants (1).

La tuberculose latente reste un problème de santé publique, son diagnostic et son traitement restent nécessaires afin d'éviter le développement d'une tuberculose maladie. Le seul test de diagnostic de la tuberculose infection latente actuellement disponible est l'Intra Dermo Réaction à la tuberculine (IDR) cependant ce test présente plusieurs limites, et de nombreux problèmes de spécificité particulièrement chez les patients vaccinés par le BCG. La création des tests immunologiques qui sont plus spécifiques, rapides et très sensibles, permettent un suivi et une évaluation de l'efficacité thérapeutique chez les patients atteints de tuberculose latente. Deux tests sont commercialisés : Le Quantiferon-TB-Gold-In Tube réalisable par un test Elisa et le T.SPOT-TB. Le Quantiferon-TB-Gold-In Tube est donc un test immunologique qui mesure la production de Cytokines, notamment l'interféron-gamma (INF- $\gamma$ ), libérées lors de l'activation lymphocytaire en présence d'antigènes spécifiques de *Mycobacterium tuberculosis*.

L'objectif de ce travail est de voir l'efficacité de la technique interféron gamma release assays (IGRA) dans le dépistage de la tuberculose latente.

## I. Généralités :

### I.1. Historique :

La tuberculose est une maladie apparue depuis plusieurs siècles. La tuberculose avait pour nom ‘‘ Phtisis ‘’, elle a été décrite par Hippocrate au VI siècle avant la naissance de Jésus. Le Chirurgien Pierre Desault est l’un des premiers à avoir mentionner la parenté entre la Phtisie pulmonaire et les formes ganglionnaires en 1773 et affirma que la lésion fondamentale de la phtisie est le tubercule. En 1882, Robert Koch met en évidence le bacille de tuberculeux à partir d’une culture sur un milieu au sérum de bœuf coagulé. En 1895, Wilhelm Röntgen a découvert les rayons X pour être l’outil de détection de la tuberculose. Le vaccin BCG a été mis au point par Calmette et Guérin (2). C’est un vaccin préparé à l’institut Pasteur de Lille, à partir d’une souche vivante mais atténuée de *M. Bovis* responsable de la tuberculose bovine. Calmette et Guérin réalisèrent 230 cultures successives de celle-ci sur un milieu a la pomme de terre contenant également de la bile et du glycérol. A l’heure actuelle le BCG est toujours assez efficace (3). Les premiers antituberculeux découverts par Waksman sont la streptomycine et l’isoniazide en 1943. D’autres antibiotiques se sont rajoutés à la liste en 1960 tel que la Rifampicine, La Pyrazinamide (2).

### I.2. Épidémiologie :

#### I.2.1 Situation épidémiologique de la tuberculose au Monde :

Selon les estimations données par l’OMS en 2016, il y’a eu près de 1,7 million de décès qui comprends 374000 de personnes VIH positive, contre 10,4 Million nouvelles personnes ayant contracté la maladie (90% sont des adultes et 65% d’entre eux sont de sexes masculins, 10 % vivant avec le VIH). La pharmacorésistance est une menace constante, en 2016, l’OMS a enregistré près de 600000 nouveaux cas de résistances à la rifampicine (qui est l’un des médicaments les plus efficaces du traitement, dont 490000 cas de tuberculose Multirésistante (TB-MR ) (1).

#### I.2.2. Situation épidémiologique de la tuberculose au Maroc :

L’OMS Déclare que le nombre de cas de tuberculose (TB) au Maroc était d’environ 37000 en 2014 (1) . En 2015, ce nombre est estimé à 30636 cas de tuberculeux, avec une incidence de 89\100000, le nombre de patients développant une TB-Multirésistante est 160 cas alors que le nombre de décès par la tuberculose a atteint 656 cas. 52% des cas de tuberculeux ont révélé une tuberculose extra-pulmonaire, alors que la tuberculose pulmonaire présente 48% des cas.

Les adultes dont l'âge est compris entre 15ans et 44 ans représentent environ 66,7% des cas d'infections, 60% de ces cas sont des hommes. La distribution géographique montre que 5 régions dénombrent à elles seules 80% des cas de tuberculose, avec une incidence dépassant la moyenne nationale. Ces régions sont représentées par Grand Casablanca avec 26% des cas, Rabat-Salé-Kenitra 18% des cas, Tanger-Tétouan-Al Hoceima 15% des cas, Fès-Meknès 12% des cas et Marrakech-Safi 9% des cas. Le nombre élevé de cas dans ces régions est dû à la forte densité démographique, à l'habitat insalubre et aussi la pauvreté.

En 2016, le taux de succès thérapeutique représente 88% grâce au diagnostic et au traitement adéquate (3).

- **Classification** : l'agent pathogène responsable de la tuberculose est une Mycobactérie, qui appartient à la famille des *Mycobacteriaceae*, ordre des *Actinomycetales*, classes des *Shizomycètes*. La famille des *Mycobacteriaceae* comporte un seul genre, le genre *Mycobacterium*. On compte à ce jour à peu près 130 espèces mycobactérienne, certaines sont pathogènes comme *M. tuberculosis* et *M. leprae* responsable de la lèpre. Les bactéries responsables de la tuberculose sont regroupées dans le complexe *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC). Ce complexe se compose de deux souches responsables de la tuberculose humaine : *M. tuberculosis* et *M. africanum*, et d'autres souches responsables de tuberculoses animales tel que *M. bovis*, *M. caprae*, *M. microti* et *M. pinnipedii* (4) (5).

La classification du *Mycobacterium* est basée sur trois grands critères :

- **L'acido-alcool-résistance** : les mycobactéries sont résistantes à la décoloration par l'action de l'association de l'alcool et l'acide, principe de base de la coloration de Ziehl-Neelsen, d'où l'appellation de bacilles acido-alcool-résistants (BAAR), c'est la présence d'une paroi très riche en lipides spécifiques et acides mycoliques qui font d'elle la paroi mycobactérienne la plus épaisse chez le monde bactérien (6).

- **Les acides mycoliques** : Ce sont des cires présentes dans la paroi des *Mycobacteriaceae*, elles sont constituées d'acides gras alpha-ramifiés et Beta-hydroxylés, contenant entre 70 et 90 atomes de carbones reliés par des ponts méthyléniques. La base de la classification des acides mycoliques repose sur les différents groupements chimiques portés par la chaîne principale, ils sont aussi importants pour l'architecture et la perméabilité de l'enveloppe mycobactérienne car ils représentent une barrière hydrophobe de diffusion. Ceci explique pourquoi les mycobactéries peuvent se colorer par la coloration de Ziehl-Neelsen (6).

- **Un contenu élevé en guanine-cytosine de leur ADN :** Le pourcentage en G+C de l'ADN des mycobactéries est compris entre 61% et 71%, sauf *Mycobacterium leprae* le pourcentage est compris entre 54% et 57%(6).

## II. Caractères généraux de *Mycobacterium tuberculosis*

### II.1. Hôtes et transmission

#### II.1.1 Hôtes

L'habitat de *Mycobacterium tuberculosis* est représenté par l'homme tuberculeux qui peut contaminer son entourage par l'émission de gouttelettes de salives qui contiennent des bacilles. *Mycobacterium leprae* est présent chez les humains. Les autres mycobactéries du groupe tuberculeux sont présentes chez des hôtes animaux. Les mycobactéries atypiques se trouvent dans l'environnement hydro-tellurique, la contamination de l'homme se fait de façon indirecte (7).

#### II.1.2. Transmission :

La tuberculose latente n'est pas contagieuse contrairement à la tuberculose active qui peut être contagieuse quand elle est située dans les poumons mais lorsque d'autres organes ou tissus intérieurs sont touchés comme les reins ou les os, la maladie n'est pas contagieuse. Lorsqu'une personne atteinte de la tuberculose pulmonaire tousse, des gouttelettes contenant des bacilles se projettent dans l'air, l'inspiration de ces microorganismes entraîne une infection (figure 1) (8). Le risque de contamination dépend de la concentration des mycobactéries dans l'air ambiante, de la durée d'exposition, de la virulence des micro-organismes, ainsi que l'état immunitaire de l'hôte. La transmission digestive, transcutanée et sexuelle sont des types de transmissions plus rares (9, 10).

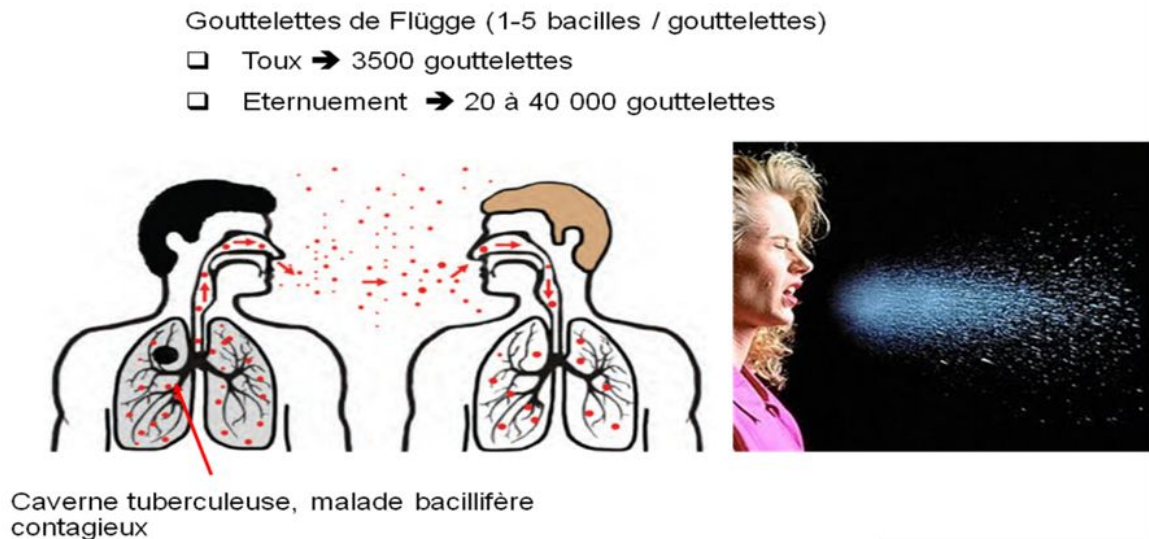


Figure 1 : Mode de transmission du Bacille de Koch.

## II.2. Caractères morphologiques :

Les bactéries *Mycobacterium tuberculosis* sont sous formes de bacilles fins immobiles, leurs dimensions varient de 0,2 à 0,3  $\mu\text{m}$  de longueur, légèrement incurvés et à bords arrondis, acapsulées, asporulées, aérobie intra cellulaire et extracellulaire. Bien qu'ils ont la structure d'une bactérie positive, ils se colorent difficilement par le biais de cette méthode. Ceci est dû au fait que la paroi cellulaire des mycobactéries soit très riche en lipides structuraux qui lui procurent une grande hydrophobicité. Mais colorées par la fuschine phéniquée à chaud selon la méthode de Ziehl-Neelsen, elle retient le colorant malgré l'action combinée des acides dilués et de l'alcool, après la coloration, les bacilles apparaissent sous forme de bâtonnets de couleur rose sur fond bleu (figure 2) (11, 12).

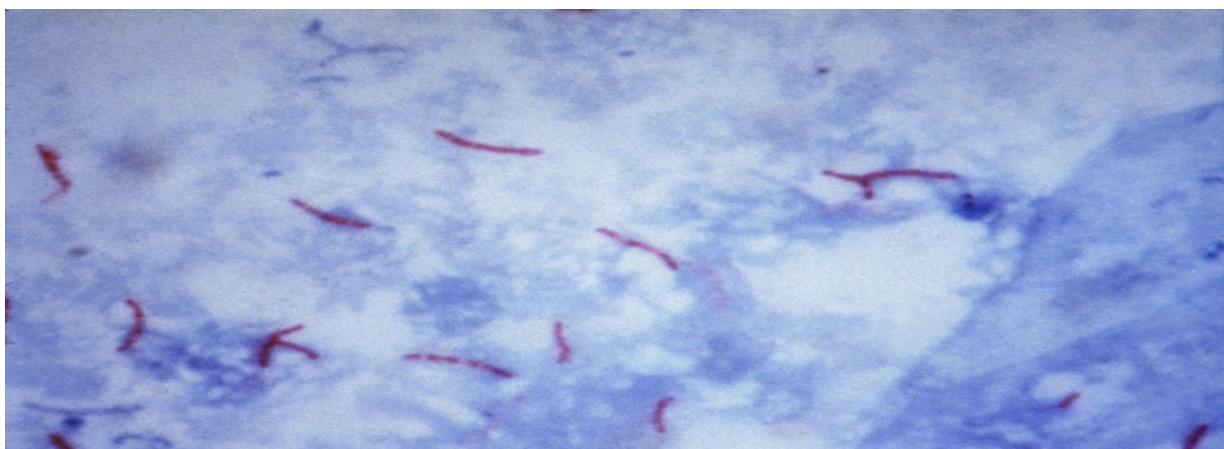


Figure 2 : Bacilles de Koch en microscope optique.



### II.3 Structure de l'enveloppe de *Mycobacterium tuberculosis*.

L'étude de la structure de l'enveloppe du bacille tuberculeux permet de comprendre la principale caractéristique bactériologique de *Mycobacterium tuberculosis* qui est l'acido-alcoolo-résistance. Ce caractère est lié à la composition spécifique de la paroi très riche en lipides qui constituent 60% de poids de l'enveloppe (13). Sa forte teneur en lipides la rend imperméable et lui confère une résistance à la plupart des antibiotiques et agent thérapeutique. L'enveloppe mycobactérienne est indispensable pour leur croissance chez l'hôte. Elle est constituée depuis le cytoplasme vers l'extérieur, d'une membrane plasmique caractérisée par une bicouche lipidique composée de phospholipides et protéines. Un espace périplasmique sépare la membrane plasmique du squelette, organisé en trois couches superposées, une première couche est constituée de peptidoglycane, lié par liaison covalente à la deuxième couche, l'arabinogalactane et la dernière couche est composée d'acides mycoliques, acides gras à très longues chaînes alpha-ramifiées et Beta-hydroxylées, liés aussi par liaison covalente à l'arabinogalactane. La surface hydrophobe formée par les acides mycoliques permet l'ancrage d'autres lipides, dits extractibles car ils peuvent être récupérés après traitements par des solvants organiques du fait de l'absence de liaisons covalentes (figure 3) (14).

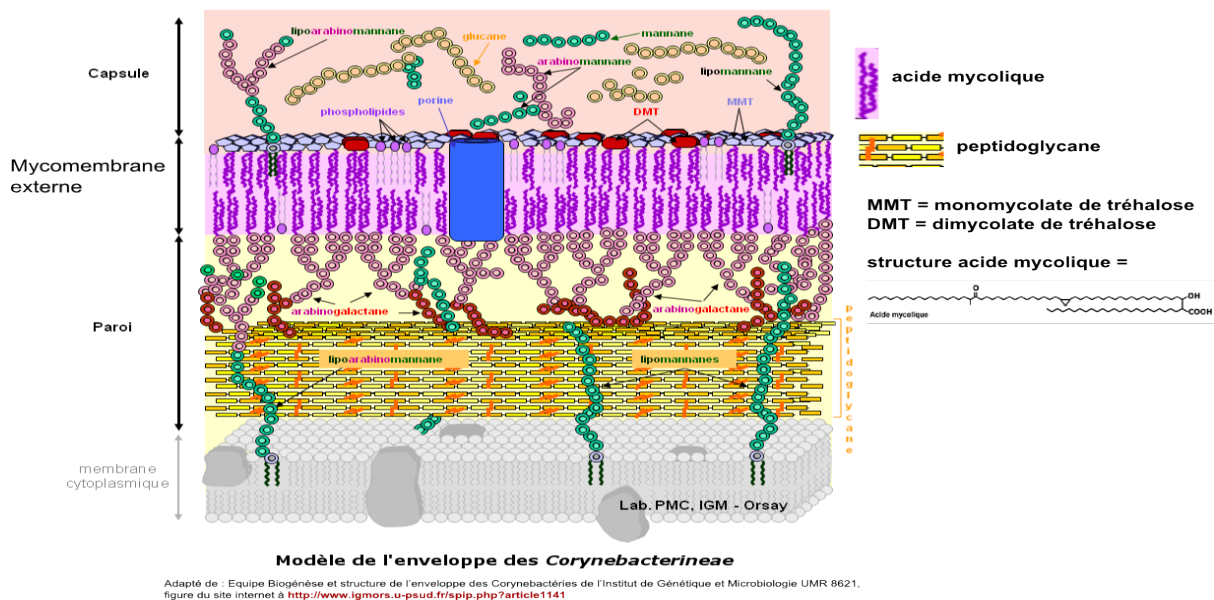


Figure 3 : Structure de l'enveloppe mycobactérienne.

## II.4. Caractères physiologiques

*Mycobacterium tuberculosis* est une bactérie exigeante qui nécessite de nombreux facteurs de croissance pour son développement. Le temps moyen de division est d'environ 20 heures ce qui explique l'évolution lente de la maladie, les délais de réponse des cultures, et la nécessité de prescrire des traitements de longue durée. *Mycobacterium tuberculosis* est une bactérie aérobie qui se localisera préférentiellement dans les tissus bien oxygénés ce qui explique la prépondérance des tuberculoses pulmonaires (15, 16, 17).

## III- Pathogénèse de *M. tuberculosis*

### III.1. Les Symptômes

Les symptômes de la tuberculose se manifestent sous forme de toux accompagnée d'expectorations parfois teintées de sang, la fièvre, les sueurs nocturnes, une perte de poids et d'appétit. Ces manifestations peuvent rester modérées pendant de nombreux mois. Cela peut inciter le malade à repousser le moment de consulter un médecin et peut se traduire par la transmission de la bactérie à d'autres personnes. Dans certains cas la tuberculose ne présente aucun symptôme, c'est la tuberculose latente.

### III.2. Physiopathologie

La tuberculose se transmet par voie aérienne via l'inhalation des gouttelettes porteuses de bacilles. Une fois le bacille tuberculeux pénètre au niveau de l'alvéole pulmonaire, les cellules immunitaires vont interagir en premier lieu, avec les macrophages alvéolaires jouent un rôle important dans la stimulation de la réponse adaptative. Ces macrophages phagocytent les bacilles tuberculeux suite à la reconnaissance des patrons moléculaires associés aux pathogènes (PAMP) à la surface de *Mycobacterium tuberculosis* par des récepteurs TLR 2 et TLR 4 est englobent le pathogène dans un phagosome. Mais, certaines souches de bacilles tuberculeux élaborent des substances permettant d'empêcher la formation de phagolysosomes. Les mycobactéries ont la capacité de résister aux mécanismes bactéricides du macrophage en empêchant la fusion phagosome-lysosome, ce qui va entraîner la multiplication de *Mycobacterium tuberculosis* dans le phagosome et par conséquent l'apoptose du macrophage infecté (18). La multiplication des bacilles libérés se fait à l'extérieur des cellules et vont être phagocytés par un nouveau macrophage recruté qui sera infecté par le bacille tuberculeux (19). Ce recrutement cellulaire permet à la fois de contenir l'infection et aussi d'acculer des cellules dendritiques qui une fois matures migrent vers les organes lymphoïdes secondaires ou elles

initient la mise en place de la réponse adaptative (20). Les chimiokines libérées par les macrophages infectés, favorisent la migration des lymphocytes au site d'infection et d'autres cellules tels que les cellules endothéliales et les fibroblastes qui s'organisent pour former un granulome. Au niveau des organes lymphoïdes secondaires l'interaction des cellules dendritiques avec les lymphocytes T (LTS) naïfs via le CMH-II permet leur activation en LTS effecteur CD4+ qui vont secréter de l'IFN- $\gamma$  ainsi que du TNF- $\alpha$  qui ont principalement une action synergique sur l'activation des mécanismes microbicides des macrophages. Les DCS activent les LTS CD8+ qui jouent un rôle primordial dans la neutralisation des cellules infectées et empêchent leur propagation (21).

### **III.3. La tuberculose pulmonaire :**

La tuberculose pulmonaire est une des premières causes de mortalité et de morbidité dans le monde en représentant 80% des formes cliniques (22). La manifestation radiologique de la tuberculose pulmonaire peut varier selon les facteurs liés à l'hôte, l'âge, et le statut immunitaire du sujet (23). L'infection se développe directement après la primo-infection qui désigne le premier contact à *Mycobacterium tuberculosis*, comme elle peut se développer après plusieurs années suite à la réactivation de l'infection latente, lors d'un affaiblissement du système immunitaire. La radiographie thoracique est utilisée comme un diagnostic de première intention malgré ses insuffisances pour le dépistage des formes actives chez les patients à risque (24).

### **III.5. La tuberculose extrapulmonaire**

La tuberculose pulmonaire est la forme la plus fréquente, cependant la tuberculose peut infecter n'importe quel organe du corps humain, en se propageant par la dissémination sanguine des bacilles tuberculeux à travers tout l'organisme qui donne des formes extrapulmonaires de la tuberculose (15% des cas) (25). Les nourrissons, les malades du Sida et les personnes souffrant d'une immunodéficience sont les plus affectés par la tuberculose extrapulmonaire. La meilleure technique de diagnostic de la tuberculose extrapulmonaire reste l'analyse de biopsie (26).

## **IV. Réponse immunitaire**

### **IV.1. Réponse immunitaire innée contre *M. tuberculosis***

La réponse immunitaire innée est une réaction rapide, non spécifique et sans mémoire, en réaction à une agression bactérienne. L'initiation de cette réponse fait intervenir les cellules

du système immunitaire inné qui ont la capacité de reconnaître des motifs produits par les bactéries. Les mycobactéries pénètrent dans les cellules hôtes de manière passive grâce à des récepteurs endocytaires intervenant dans les voies de phagocytose. La reconnaissance de *Mycobacterium tuberculosis* ou de ses produits est une étape cruciale pour la réponse immunitaire innée. Elle se fait par les PRR (Pattern Recognition Receptors) présents à la surface des cellules phagocytaires, lymphocytaires et épithéliales. Les PRR reconnaissent des motifs moléculaires, conservés dans l'évolution chez les agents pathogènes, appelés PAMP (Pathogen Associated Molecular Patterns). Après cette reconnaissance, les bacilles sont phagocytés par les macrophages à l'intérieur d'un phagosome et le lysosome, entraînant la multiplication de *Mycobacterium tuberculosis* dans le phagosome et par conséquent l'apoptose du macrophage infecté avec la libération des chimiokines qui favorisent la migration des lymphocytes vers le site d'infection pour déclencher la réponse adaptative (30).

#### **IV.2. Réponse immunitaire adaptative contre *M. tuberculosis***

Dans la majorité des cas, la réponse innée à elle seule ne suffit pas à contrôler l'infection. Lorsque les cellules dendritiques ont phagocyté un élément étranger, elles migrent vers les ganglions lymphatiques locaux afin de présenter les antigènes aux lymphocytes naïfs et permettre le développement de la réponse adaptative. Les lymphocytes T reconnaissent les antigènes mycobactériennes portés par des cellules présentatrices, telles que les cellules dendritiques. Les peptides antigéniques sont présentés par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de type I et II. Les lymphocytes T CD4, reconnaissant les antigènes présentés par les molécules du CMH-II, tandis que les lymphocytes TCD 8 reconnaissent les antigènes présentés par les molécules du CMH-I (30). Cette reconnaissance permet à la fois l'activation des lymphocytes T et leurs différenciations en cellules effectrices qui vont migrer vers le site de l'infection guidés par des gradients de chimiokines secrétées par les macrophages infectés. Les lymphocytes TCD 4 apparaissent précocement, libèrent des quantités importantes de l'interféron gamma qui permet d'activer les propriétés bactéricides des macrophages et de TNF-alpha qui joue un rôle essentiel dans la formation du granulome, et la destruction des bactéries intracellulaires. La combinaison de l'IFN- $\gamma$ , et du TFN- $\alpha$  inhibe la croissance du bacille au niveau des monocytes et des macrophages, en induisant la formation des dérivés nitrogènes NO (31).

## V. Diagnostic de la tuberculose

### V.1. L'examen radiologique :

La radiographie pulmonaire permet d'établir le bilan initial des lésions thoraciques pouvant être de morphologie et d'étendue variable, sans rapport avec l'intensité de la maladie. On retrouve trois types de lésions élémentaires : le nodule, l'infiltrat et la caverne. Dans sa forme pulmonaire, la tuberculose se manifeste par la présence d'infiltrats et de nodules principalement localisés dans les sommets des poumons et parfois associés à des cavernes (27).

### V.2. Prélèvements

Chez les sujets atteints de tuberculose pulmonaire, l'examen se fait à partir d'expectoration ou par tubage gastrique, aspirations bronchiques et au lavage broncho-alvéolaire. Pour la tuberculose extrapulmonaire, l'examen se pratique sur le pus, les urines, les liquides de ponction pleurale, le liquide de ponction péritonéale ...

### V.3. Méthodes conventionnelles

#### V.3.1. Examen direct

L'examen directe est considéré comme la méthode de diagnostic la plus ancienne qui repose sur l'indentification de mycobactéries dans les crachats des patients par observation microscopique (28). Les étalements sont réalisés de deux façons soit directement à partir d'une fraction purulente de l'expectoration, soit sur le culot de centrifugation du prélèvement après décontamination. La coloration de Ziehl-Neelsen est utilisée car le bacille est alcool-acido-résistant et possède une grande capacité de garder le colorant rouge malgré l'action combinée de l'acide et l'alcool (29).

#### V.3.2. Culture

*M. tuberculosis* est un microorganisme caractérisé par son exigence de culture et la lenteur de sa croissance (temps de génération est estimé à 20h) (29). Les mycobactéries sont aussi caractérisées par leurs exigences nutritives : elles ont besoin de milieux de cultures spécifiques. Le plus convenable est le milieu Löwenstein-Jensen, qui est à base d'œuf. Les colonies apparaissent de teinte crème-beige, sèches, à surface rugueuse en chou-fleur sur ce milieu (figure 4) . Après 3 à 4 semaines les colonies commencent à apparaître, mais ce délai peut être plus important quand les prélèvements sont paucibacillaires. La culture reste la

méthode de référence et c'est la seule méthode qui permet d'isoler des colonies bactériennes typiques (27).



Figure 4 : Aspect des colonies du *Mycobacterium tuberculosis* à la culture sur le milieu Löwenstein-Jensen.

## V.4. Examen moléculaire

### V.4.1. Test Hain

Ce test correspond à une amplification multiplex d'ADN couplée à une hybridation sur bandelettes et il est utilisé en routine pour l'identification des mycobactéries, mais aussi pour la détection de la résistance aux antituberculeux. Le principe de la détection de la résistance aux antibiotiques repose sur l'amplification de fraction de gènes codant pour la cible des antituberculeux et sur l'hybridation avec des sondes correspondant aux gènes sauvages ou aux gènes mutés présents sur la bandelette. Ce test permet à la fois de détecter la présence du complexe *M. tuberculosis* et la sensibilité aux deux antituberculeux majeur : la rifampicine et l'isoniazide (27).

### V.4.2. Test Xpert MTB/RIF (GENEXPERT).

Le Genexpert est un nouveau test moléculaire sensible et spécifique au *Mycobacterium tuberculosis*. Il s'agit d'une PCR en temps réel automatisée qui détecte la présence des fragments d'ADN du génome des mycobactéries du complexes tuberculosis dans un prélèvement clinique et en même temps leurs éventuelle résistance à la rifampicine en moins de deux heures (24). Ce test joue un rôle primordial dans le diagnostic précoce ainsi que la détection des cas de résistances à la rifampicine (27).

## V.5. Examen sérologique

### V.5.1. L'intradermoréaction à la tuberculine (IDR)

L'intradermoréaction à la tuberculine (IDR) permet de mettre en évidence une réaction cutanée après injection intradermique d'antigènes mycobactériennes, témoin de l'acquisition d'une immunité spécifique contre les mycobactéries. Cette technique est réalisée par une injection dans le derme à la face antérieure de l'avant-bras d'un volume exact de 0,1ml de la solution de tuberculine PPD, soit 5 unités de tuberculine liquide (27). La lecture se fait après 72 heures par la mesure du diamètre d'induration qui traduit le plus souvent une infection tuberculeuse récente. En effet, si le diamètre de cette induration est supérieur à 10 mm cela signifie la présence d'une infection tuberculeuse, si le diamètre est inférieur à 10 mm cela explique l'absence de l'infection (figure 5) (27).



Figure 5 : réaction suite à une injection intradermique.

### V.5.2. Les test interféron gamma release assays

Ces tests de libération d'interféron gamma permettent la détection d'une mémoire immunologique et sont destinés à faire un diagnostic d'infection tuberculeuse latente. Les tests IGRA reposent sur la détection de la production d'interféron gamma par les lymphocytes en présence de 3 protéines spécifiques de *Mycobacterium tuberculosis* : ESAT-6, CFP 10 et TB 7.7. Il existe deux familles de tests qui sont actuellement disponibles en France : Le Quantiferon basé sur la mesure de la production in vitro d'INF-gamma par test ELISA et le test appelé T-SPOT-TB basé sur une technique d'ELISPOT quantifiant le nombre de cellules mononuclées sanguines capables de produire de l'IFN-gamma. Un test immunologique négatif que ce soit une IDR ou un test IGRA, ne permet d'éliminer ni une tuberculose maladie, ni de

différencier une infection ancienne d'une infection récente. Ces tests jouent un rôle très important dans le diagnostic de l'infection tuberculeuse latente (27).



# Matériel et Méthodes

## Population d'étude

Le stage a eu lieu à l'Institut Pasteur du Maroc du 04 Avril au 21 mai au laboratoire de Mycobactéries et tuberculose. C'est une étude rétrospective qui a concerné 70 malades dont les prélèvements ont été reçus de différents Centres de Diagnostic de la tuberculose et des Maladies Respiratoires (CDTMR) de Casablanca ainsi que des hôpitaux, pendant l'année 2017.

## I. Recherche de mycobactéries par examen au microscope

### I.1. Préparation de frottis

L'étalement du crachat s'effectue sur des lames neuves qui doivent être bien dégraissées. Le numéro d'identification du crachat est marqué sur une extrémité de la lame avec un diamant marqueur. La préparation du frottis se fait près d'un bec bunsen (dans un rayon de 20 cm).

On Prélève avec une anse platine rigide, préalablement flambée et refroidie, une parcelle purulente ou hémorragique de crachat. Du choix de la parcelle dépend en grande partie le résultat de l'examen microscopique. Le contenu de l'anse est étalé en couche mince au centre de la lame sur une surface rectangulaire de 2 cm sur 1 cm. L'étalement terminé, l'anse est immédiatement plongée dans un flacon Erlenmeyer de 300 à 500 ml contenant du sable et de l'eau de javel (ou alcool) pour se débarrasser des particules qui restent collées à l'anse avant d'être flambée. Le frottis ainsi réalisé est laissé sécher à l'air pendant 15 à 20 mn. L'étalement une fois sec, est fixé par 3 passages rapides sur la flamme rouge du bec bunsen, frottis au-dessus.

### I.2. Technique de coloration

#### ➤ Étape 1 : coloration

- ⇒ Recouvrir la lame en totalité de fuchsine, chauffer doucement jusqu'à émission de vapeurs au moyen de la flamme d'un coton monté sur une tige, rampée dans l'alcool et flambée.
- ⇒ Laisser agir pendant 5 min.
- ⇒ Éviter l'ébullition et le dessèchement du colorant, si nécessaire, ajouter à nouveau la fuchsine pour que la lame soit toujours recouverte de colorant.

➤ **Étape 2 : Décoloration**

- ⇒ Laver immédiatement et délicatement à l'eau du robinet autant que possible à l'aide d'un flacon et non sous le jet du robinet qui risque de décrocher le frottis.
- ⇒ Ensuite, égoutter la lame et la recouvrir avec le mélange acide-alcool .
- ⇒ Laisser agir 3minutes.
- ⇒ Laver abondamment à l'eau, le frottis est alors incolore ou légèrement teinté en rose.

➤ **Étape 3 : contre- coloration**

- ⇒ Recolorer pendant une minute par la solution de bleu de méthylène.
- ⇒ Laver à l'eau et laisser sécher avant l'examen microscopique.
- ⇒ Examen microscopique des lames.

La lame colorée est examinée avec un objectif à immersion (x100) en plaçant la goutte d'huile à immersion sur l'extrémité gauche de la préparation. On explore chaque champ de la périphérie vers le centre à la recherche de bâtonnets fins, droits ou légèrement incurvés réguliers ou granuleux, isolés ou rassemblés en amas colorés en rouge sur fond bleu.

### **I.3. Lecture**

Lorsque les champs situés sur la première longueur du frottis sont examinés, on déplace d'avant en arrière le chariot de quelques millimètres et on recommence à parcourir une nouvelle longueur du frottis de droite à gauche.

Si le frottis est toujours négatif, on lit une 3<sup>ème</sup> longueur, l'ensemble correspond à 300 champs microscopiques environ, soit 100 champs environ par longueur.

Si la lame est positive on note exactement le nombre de bacilles rouges visibles par champs : on doit lire 10 champs, 100 champs ou 300 champs selon que le frottis est respectivement très riche (+++), moyennement riche (++) ou pauvre (+ ou négative).

## II. Techniques de recherche des mycobactéries par culture (Méthode de Petroff)

Les mycobactéries en général et *Mycobacterium tuberculosis* en particulier sont plus résistants que les bactéries usuelles aux désinfectants chimiques (NaOH, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, détergents). Cette plus grande résistance est employée pour sélectionner par divers procédés de décontamination les bacilles tuberculeux des autres bactéries dans les produits pathologiques contaminés.

La méthode de Petroff consiste à mettre le crachat dans un tube de centrifugation et ajouter deux fois son volume en hydroxyde de sodium à 4% pour éliminer les autres types de bactéries. Après il faut agiter sur agitateur de Kahn (agitateur va et vient) pendant 15 min, et le centrifuger à 3000 tours/ min pendant 15 minutes, pour séparer le culot du surnageant. Après, le culot est mis en suspension dans 2 ml d'eau distillée stérile et ensemencé dans plusieurs tubes de Löwenstein-Jensen à raison de 6 à 10 gouttes par tube à l'aide d'une pipette Pasteur.

## III. Antibiogramme des Mycobactéries

Le traitement de la tuberculose se fait par une prise combinée de 4 antibacillaires (phase initiale) et dure entre 6 à 12 mois. L'intérêt de l'antibiogramme est d'identifier le ou les ATB auxquels le bacille présente une résistance et d'aider à la prise en charge des tuberculeux qui ne répondent pas ou répondent au traitement. En outre, l'intérêt principal réside dans les études épidémiologiques pour la surveillance de la résistance du bacille tuberculeux aux différents antibiotiques.

### Principe

L'antibiogramme pour les souches de BK permet d'étudier la sensibilité du BK, aux quatre antibiotiques principaux (Isoniazide, Streptomycine, Rifampicine, et l'Ethambutol) utilisés dans le régime thérapeutique de première ligne conseillée par l'organisation mondiale de la santé (OMS).

La méthode des proportions consiste à ensemencer une suspension standardisée sur milieu Löwenstein -Jensen imprégné d'antibiotique, et comparer le rapport du nombre de souches résistantes par rapport à la population totale.

Si le rapport est inférieur à la proportion dite critique, on dit alors que la souche sur milieu témoin est sensible à un antibiotique donné mais s'il est supérieur à la proportion critique on parle de résistance.

Les milieux de culture utilisés sont :

-Milieu de Löwenstein-Jensen : tube témoin.

-Milieu de Löwenstein-Jensen imprégnés d'antibiotiques à des concentrations définies (tableau 1).

*Tableau 1 : les proportions critiques*

<b>Antibiotiques</b>	<b>Concentrations des antibiotiques représentés en Pourcentage</b>
INH	1%
Streptomycine	1%
Rifampicine	1%
Ethambutol	1%
Éthionamide	10%
Kanamycine	10%
Pyrazinamide	10%

## **IV. QuantiFERONTB-Gold-In Tube**

### **IV.1. Principe**

Le test QTF est la seule technique de diagnostic in vitro permettant de détecter le niveau de réponse immunitaire cellulaire à partir d'échantillons de sang totale. Les personnes exposées à une infection ont des lymphocytes T Spécifiques dans leur sang qui maintiennent une mémoire immunologique pour les antigènes. En effet, le test QTF est effectué en deux étapes. Dans un premier temps, le sang total est prélevé dans chacun des quatre tubes de prélèvement sanguin QFT, le premier est un tube contrôle négatif (tube Nul), il permet de s'affranchir des sécrétions non spécifiques d'IFN- $\gamma$  qui peut être déjà présent (lors de traitement ou d'infection virale). Le second et troisième tube, contiennent les antigènes spécifiques de *M. tuberculosis* (ESAT-6, CFP-10, TB 7. 7) qui sont absents de toutes les souches BCG et de la plupart des mycobactéries non tuberculeuses à l'exception *M. kansasii*, *M. szulgai* et *M. marinum*. Ils permettent de mettre

en contact les antigènes de *M. tuberculosis* et les lymphocytes T du patient ce qui provoque une restimulation rapide des cellules T effecteurs ainsi la production d'IFN- $\gamma$  en réponse de l'exposition à l'antigène est un marqueur spécifique pour la réponse immunitaire cellulaire contre ces antigènes. Le quatrième tube est le contrôle positif contenant de la phytohémagglutinine (PHA) (tube Mitogène). La PHA est un activateur non spécifique des LT qui permet de contrôler la capacité des LT à sécréter de l'IFN- $\gamma$

Après prélèvement, les tubes doivent être placés le plus rapidement possible à l'étuve (37°C) durant un temps pouvant aller de 16 à 24 h. Les tubes sont centrifugés, pendant 15 min (2000 à 3000 RCF) pour séparer les cellules du plasma. Le temps d'incubation doit être respecté pour éviter le risque de stimuler la sécrétion non spécifique d'IFN- $\gamma$  par les cellules mémoires en cas d'incubation trop longue. La quantité d'IFN- $\gamma$  présent dans le plasma est dosée par méthode ELISA. La densité optique (DO) obtenue est convertie en unité internationale (UI) grâce à une courbe d'étalonnage effectuée en parallèle.

#### IV.2. Matériel

Le test QTF est effectué en deux étapes. Dans un première temps le sang est prélevé dans des tubes spéciaux qui incluent un tube de valeur Zéro qui sert comme témoin, un tube antigène qui contient des antigènes spécifiques aux *M. tuberculosis*, et un tube mitogène qui permet de vérifier l'activité des lymphocytes T. La deuxième étape consiste à doser la concentration de l'IFN- $\gamma$  sécrétée par les lymphocytes à l'aide du technique ELISA. Pour effectuer ce test il est nécessaire d'avoir le kit d'ELISA qui se compose de plusieurs réactifs : le concentré de conjugué, la solution de substrat d'enzyme, le tampon de lavage concentré, solution de blocage d'enzyme, le diluent vert, et enfin 2 litres d'eau déionisée ou distillée.

**NB**: Les réactifs de kit doivent être stockés au réfrigérateur entre 2°C et 8°C et il faut protéger la solution de substrat et d'enzyme de la lumière directe du soleil.

#### IV.3. Méthodologie

Le test s'effectue en deux étapes. La première consiste à prélever et incuber le sang total du patient dans trois tubes différents (contrôle négatif, tube antigène tuberculeux et tube mitogène). Après une durée d'incubation de 16 à 24 heures, les tubes sont centrifugés puis le plasma est recueilli. La deuxième étape du test consiste à quantifier l'interféron gamma

dans le plasma par méthode ELISA. Le résultat doit être rendu de façon qualitative (positif, négatif ou indéterminé).

#### **IV.3.1. Étape 1 : Prélèvement du sang**

1-Pour chaque sujet, prélever 1 ml de sang par ponction veineuse directement dans Chaque tube de prélèvement sanguin QFT.

2-Immédiatement après avoir rempli les tubes, les secouer dix fois suffisamment fort pour s'assurer que toute la paroi interne du tube est tapissée de sang, afin de dissoudre les antigènes présents sur les parois du tube. Les tubes doivent être à une température de 17°C à 25°C au moment du remplissage.

3-Étiqueter correctement les tubes

4-Après les avoir remplis, secoués et étiquetés, les tubes doivent être transférés dans un incubateur à 37 °C

5-Après l'incubation, centrifuger les tubes pendant 15 minutes de 2 000 à 3 000 (g) pour séparer le plasma et les globules rouges.

6-récupérer le plasma après centrifugation

#### **IV.3.2. Étape 2 : Technique ELISA**

1-Tous les échantillons de plasma et réactifs (sauf le concentré de conjugué 100X) doivent être ramenés à température ambiante pendant au moins 60 minutes, avant d'être utilisés.

2-Reconstituer le standard lyophilisé du kit avec le volume d'eau déionisée ou distillée indiqué sur l'étiquette du flacon du standard. Mélanger doucement pour réduire la formation de mousse et pour garantir une solubilisation complète. La reconstitution du standard au volume indiqué produira une solution à une concentration de 8,0 UI/ml.

**Procédures recommandées pour les standards dupliqués :**

- a. Etiquetter les 4 tubes S1, S2, S3, S4
- b. Ajouter 150 µl de DV à S1, S2, S3, S4
- c. Ajouter 150 µl du standard du kit à S1 et mélanger soigneusement
- d. Transférer 50 µl de S1 à S2 et mélanger soigneusement
- e. Transférer 50 µl de S2 à S3 et mélanger soigneusement
- f. DV seul sert de standard zéro S4

Reconstituer le concentré de conjugué 100x lyophilisé avec 0.3 ml d'eau distillée.

Le conjugué concentré près à l'emploi est préparé en diluant la quantité requise du conjugué dans le diluant vert (tableau 2).

*Tableau 2 : Préparation de conjugué*

Nombre de bandelettes	Volume du concentré de conjugué 100X	Volume de diluant vert
2	10 µl	1 ml
3	15 µl	1.5 ml
4	20 µl	2 ml
5	25 µl	2.5 ml
6	30 µl	3 ml
7	35 µl	3.5 ml
8	40 µl	4 ml
9	45 µl	4.5 ml
10	50 µl	5 ml
11	55 µl	5.5 ml
12	60 µl	6 ml

- Ajouter 50 µl du conjugué concentré prêt à l'emploi fraîchement préparé dans les puits ELISA.
- Ajouter 50 µl d'échantillon de plasma dans les puits appropriés (figure 6).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	1 N	3N	5N	7N	9 N	11 N	13 N	15 N	17 N	19 N	21 N
B	S2	1 TB1	3 TB1	5 TB1	7 TB1	9 TB1	11 TB1	13 TB1	15 TB1	17 TB1	19 TB1	21 TB1
C	S3	1 TB2	3 TB2	5 TB2	7 TB2	9 TB2	11 TB2	13 TB2	15 TB2	17 TB2	19 TB2	21 TB2
D	S4	1 M	3 M	5 M	7 M	9 M	11 M	13 M	15 M	17 M	19 M	21 M
E	S1	2 N	4 N	6 N	8 N	10 N	12 N	14 N	16 N	18 N	20 N	22 N
F	S2	2 TB1	4 TB1	6 TB1	8 TB1	10 TB1	12 TB1	14 TB1	16 TB1	18 TB1	20 TB1	22 TB1
G	S3	2 TB2	4 TB2	6 TB2	8 TB2	10 TB2	12 TB2	14 TB2	16 TB2	18 TB2	20 TB2	22 TB2
H	S4	2 M	4 M	6 M	8 M	10 M	12 M	14 M	16 M	18 M	20 M	22 M

Figure 6 : Microplaque et configuration recommandée pour les tubes de valeur zéro, antigène TB et mitogène

3. Couvrir chaque microplaque avec un couvercle et incuber à température ambiante (22°C) pendant 120 min (2 heures).

4. préparation de la solution de lavage

- Ajouter 4 ml de la solution WASH dans 56 ml d'eau distillée.
- Mélanger la solution de lavage.

5. lavage

- Placer la microplaque dans un laveur automatique (Biotek)
- Mettre la solution de lavage à la disposition de l'appareil.
- Démarrer le lavage (6 cycles)
- Placer les microplaques face vers le bas sur une serviette absorbante sans peluche pour éliminer tout résidu de tampon de lavage

6. réaction enzymatique

- Ajouter 100µL de solution d'enzyme dans chaque puits et mélanger soigneusement.
- Couvrir la microplaque avec un couvercle.
- Incuber à une température ambiante (22°C) pendant 30 minutes.



**NB** : les microplaques ne doivent pas être exposées à la lumière directe du soleil pendant l'incubation.

#### 7. Arrêt de réaction

- Ajouter 50  $\mu$ l de solution de blocage d'enzyme à chaque puits et mélanger

**NB** : la solution de blocage d'enzyme doit être ajoutée aux puits dans le même ordre et à environ la même vitesse que pour le substrat.

#### 8. Mesure de la densité optique (DO)

- Mesurer la DO de chaque puits dans les 5 minutes de blocage de la réaction à l'aide d'un lecteur de microplaque équipé d'un filtre 450 nm et d'un filtre de référence de 620 nm à 650 nm.

→ Les valeurs DO sont utilisées pour calculer les résultats.

### **IV-3-3 Calculs et interprétation du test**

L'interprétation du test est réalisée soit à l'aide d'un logiciel qui permet de générer une courbe de standard et fournit un résultat de test pour chaque sujet, soit par la détermination des valeurs DO moyennes des répliquats du standard du kit sur chaque microplaque. Tracer une courbe de standard en traçant le  $\log(e)$  de la DO moyenne en fonction du  $\log(e)$  de la concentration IFN- $\gamma$  des standards en UT/ml (axe x), en mettant le standard zéro dans ces calculs. La courbe standard est utilisée pour déterminer la concentration IFN- $\gamma$  (UT/ml) de chacun des échantillons de plasma de test à l'aide de la valeur DO (tableau 3).

Tableau 3 : Calcul et Interprétation du test

Valeur zéro (UI/ml)	Antigène TB moins valeur zéro (UI/ml)	Mitogène moins valeur zéro (UI/ml)	Résultat QFT	Rapport/interprétation
$\leq 8,0$	$< 0,35$	$\geq 0,5$	Négatif	Infection à <i>M. tuberculosis</i> improbable
$\leq 8,0$	$\geq 0,35$ et $<$ 25% de la valeur zéro	$\geq 0,5$	Négatif	Infection à <i>M. tuberculosis</i> improbable
$\leq 8,0$	$\geq 0,35$ et $\geq$ 25% de la valeur zéro	Tous	Positif	Infection à <i>M. tuberculosis</i> probable
$\leq 8,0$	$< 0,35$	$< 0,5$	Indéterminé	Les résultats de la réponse des antigènes TB sont indéterminés
$\leq 8,0$	$\geq 0,35$ et $>$ 25% de la valeur zéro	$< 0,5$	Indéterminé	Les résultats de la réponse des antigènes TB sont indéterminés
$> 8,0$	Tous	Tous	Indéterminé	Les résultats de la réponse des antigènes TB sont indéterminés

## Résultats

### ➤ Pourcentage des résultats du test Quantiféron

L'étude concerne 70 échantillons sanguins qui ont bénéficié d'un test QTF durant l'année 2017 dans le but de dépister une infection tuberculose latente. Le résultat global du test QTF est donnée par la figure 7.

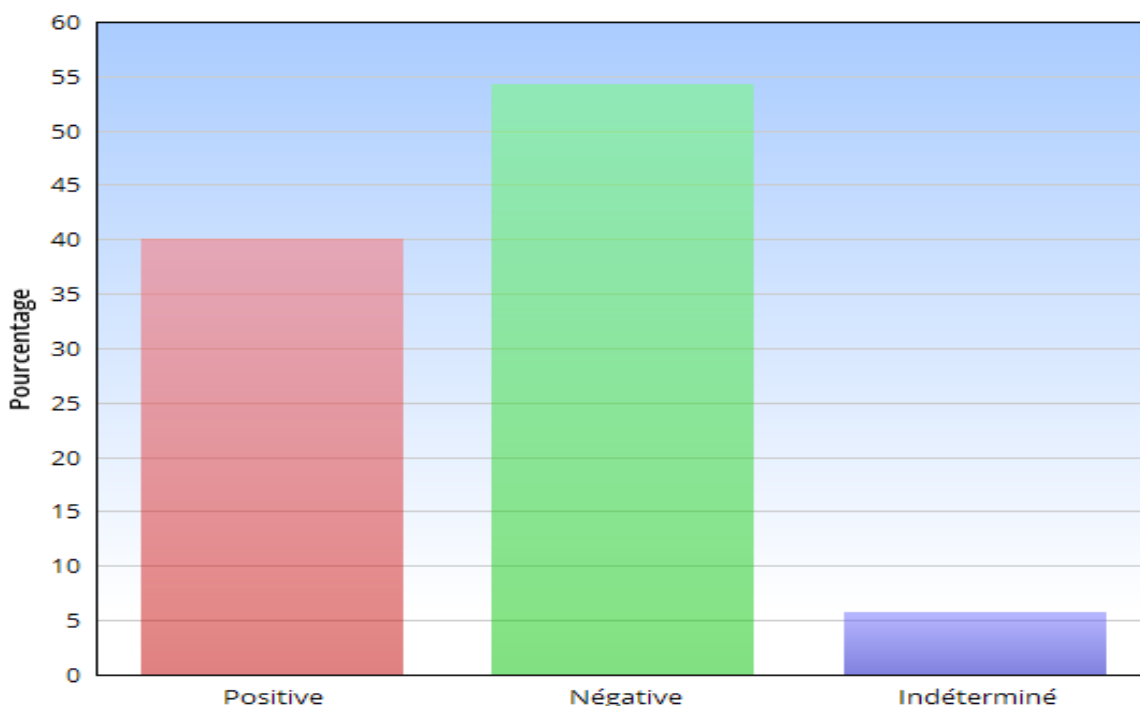


Figure 7 : Graphique représentant le pourcentage des tests Quantiférons Positives, négatives et indéterminés.

Les résultats du test ont montré que sur 70 patients soumis au test, 28 étaient positifs soit 40% de cas qui auraient une infection latente probable, contre 38 patients négatifs au test représentant un pourcentage de 54.28%. Quatre personnes ont montré des tests QTF indéterminé, soit 5,71% (voir figure).

Les résultats indéterminés pourraient être liés à une immunodépression, dus à une production d'interféron insuffisante dans le tube 'témoin positif', ou à une activité lymphocytaire réduite en raison d'une mauvaise manipulation de l'échantillon, d'un remplissage/mélange incorrect du tube mitogène ou de l'incapacité des lymphocytes du patient à générer IFN- $\gamma$ .

➤ Répartition selon la tranche d'âge

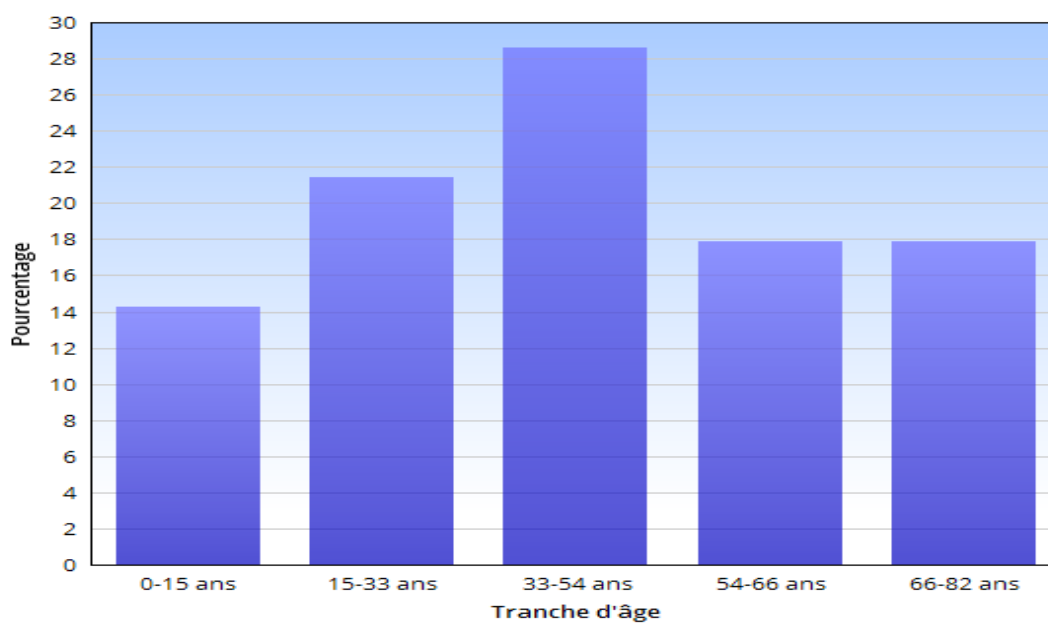


Figure 8 : Répartition selon les tranches d'âge.

Comme le graphique le montre, la tranche d'âge 33-54 ans représente le pourcentage le plus élevé avec 28,57% de cas positifs, alors que le pourcentage le plus faible est celui de la tranche d'âge 0-15 ans avec une valeur de 14,28% de cas positifs (voir figure 8). Ces résultats montrent que les enfants sont les moins exposés au germe *Mycobacterium tuberculosis*.

---

➤ **Répartition selon le sexe**

Le nombre de femme ayant été soumises au test est de 45 patientes, 18 étaient positives au test, soit 40%. Tandis que le nombre d'homme ayant été soumis au test est de 25 patients, 10 étaient positifs, soit 40%. L'analyse de ces résultats montre que le taux de positivité est le même chez les deux sexes.

## Discussion

L'intérêt du test QTF repose sur le diagnostic précoce d'une tuberculose latente. Ce test peut être utilisé comme aide au diagnostic d'une tuberculose active chez l'enfant de plus de 5 ans quand l'obtention d'une confirmation bactériologique est difficile et l'atteinte est extrapulmonaire ou il y a absence d'expectorations. Ainsi ce test est recommandé chez les jeunes patients vaccinés et avant la mise en route d'un traitement par les anti-TN, car en cas d'une infection latente les personnes suivant ce traitement ont un risque élevé de développer une tuberculose maladie par réactivation d'une infection latente (32).

Selon l'estimation de l'OMS, environ un tiers de la population mondiale est porteuse d'une tuberculose latente, ce qui signifie que ces personnes sont infectées par le bacille tuberculeux mais ne sont pas malades et ne peuvent pas transmettre la maladie. Ces sujets ont un risque de 10% de développer une tuberculose active chaque année soit 8 millions de nouveaux cas par an, avec 3 millions de cas de décès par an (33). Le risque de réactivation est élevé lors d'une altération de l'immunité à médiation cellulaire qui est due à facteurs physiologiques, pathologiques (infection par VIH, les insuffisances rénaux chroniques.) ou iatrogénique (patients sous immunosuppresseurs, sous corticoïdes et chez les transplantés). Ces sujets sont les plus prédisposés à développer des formes de tuberculoses plus sévères et mortelles s'ils ne sont pas traités ou traités tardivement. C'est pour cela il est important de faire un dépistage de cette infection de tuberculose latente par le QTF et non par le test cutané tuberculinique qui est habituellement négatif chez ce groupe de patients, et lorsqu'il est positif, le test pose des problèmes de lecture et d'interprétation par manque de spécificité ou de sensibilité. Au cours des six dernières années, des nouveaux tests sanguins prometteurs du diagnostic de l'infection tuberculeuse latente ont été développés dans les pays industrialisés connus sous le nom de test de libération d'interféron Gamma. Ces tests, qui ne sont pas encore disponibles au Maroc, reposent sur la mesure de l'interféron secrété par les lymphocytes T CD4+ en réponse à des antigènes spécifiques de *Mycobacterium Tuberculosis*. Au cours de cette étude, on a constaté que si l'on tient compte du nombre de patients soumis au test et celui positifs au test, nous allons retrouver que le pourcentage chez les deux sexes est similaire. En effet, parmi 70 patients soumis au test 45 sont des femmes dont 18 sont positives soit 40%, concernant les hommes, sur 25 patients soumis au test 10 sont positifs soit 40%, d'après ces résultats, le taux de positivité est égal chez les deux sexes. Concernant les tranches d'âges touchées par la tuberculose latente, la tranche 0-15 ans possède le taux de positivité le plus faible avec 14,28%.

Cela est expliqué par le fait que l'exposition des enfants au germe est faible car ils ne sont pas trop actifs et aussi parce que le vaccin BCG n'est réellement efficace que chez les enfants de 0 à 15 ans. Les résultats indéterminés sont constatés chez les personnes âgées de 54 ans et plus (50% des cas), cela peut être expliqué par une libération faible de l'interféron gamma qui serait en relation avec un système immunitaire affaibli.

Durant ce travail, l'utilisation du test QTF comme moyen de dépistage est très intéressant puisque 40% des cas n'ayant pas de symptômes se sont avérés positifs au test montrant qu'ils ont une tuberculose latente et présentant ainsi le risque de développer la maladie (33). En effet le test QTF présente plusieurs avantages comparés à l'IDR. Il s'agit d'un simple prélèvement veineux réalisé au cours d'une seule et unique consultation avec des résultats disponibles en 24-36 heures par contre l'IDR nécessite 2 consultations, l'une pour sa réalisation et l'autre pour sa lecture à 72 heures. L'analyse est standardisée, avec un contrôle positif et un autre négatif, afin de s'assurer du bon fonctionnement du système immunitaire. L'interprétation de ce test est objective par contre celle de l'IDR est subjective (la mesure du diamètre d'induration est souvent approximative). Ce dernier possède malgré tout l'avantage du faible coût et d'une absence de nécessité d'infrastructure particulière.

## Conclusion.

La tuberculose est une maladie infectieuse causée par *Mycobacterium tuberculosis*. Le contact avec la bactérie entraîne dans la majorité des cas une infection latente asymptomatique. Il existe toutefois un risque de réactivation essentiellement en cas d'immunodépression mais ce risque peut être efficacement prévenu par un traitement préventif antibiotique. La recherche de tuberculose latente se heurte toutefois à d'importantes difficultés de diagnostics mais la compréhension de l'immunité cellulaire et l'apport de la biologie moléculaire ont permis d'élaborer des tests sanguins qui mesurent *in vitro* la libération de l'interféron Gamma.

Nos résultats ont montré que parmi 70 patients soumis au test 45 sont des femmes dont 18 sont positifs soit 40% concernant les hommes, sur 25 patients soumis au test 10 sont positifs, soit 40%. La tranche d'âge 33-54 ans représente le pourcentage le plus élevé, avec 28,57% positifs cependant celle de 0-15 ans est la plus faible, avec seulement 14,28% de cas. Ces résultats concordent avec ceux de la littérature notamment avec les données de l'OMS sur l'émergence de cette maladie dans le monde (1).

Les résultats indéterminés présentent un taux de 5,71% et peuvent être liés au statut immunologique de l'individu tel que l'incapacité de LT à sécréter de l'INF- $\gamma$  ou l'immunodépression du sujet, mais aussi à un certain nombre de facteurs techniques.

Le test Quantiferon est recommandé avant la mise en route d'un traitement anti-TNF chez les patients ayant un rhumatisme ou sous traitement par les corticoïdes chez les personnes atteintes d'une infection virale car ces traitements affaiblissent les défenses immunitaires et exposent à d'importants risques d'infections qui peuvent provoquer le déclenchement de la tuberculose. D'après notre présente étude, le QTF reste le meilleur test de diagnostic d'une tuberculose latente, et la meilleure prévention d'une tuberculose maladie.

Il est à signaler que les patients soumis au test ont de nombreuses lacunes au sujet de la tuberculose et donc il est recommandé de les sensibiliser à ce problème pour diminuer le nombre de dégâts dus à cette maladie.



## Résumé

La tuberculose est une maladie respiratoire fortement contagieuse qui s'attaque aux poumons et d'autres parties et organes du corps humain, elle est liée à la pénétration dans l'organisme du *Mycobactérium tuberculosis* ou bacille de Koch, le principal mode de transmission est la voie aérienne.

Notre étude a pour but de déterminer l'efficacité du Quantiféron dans le dépistage d'une réelle infection latente. Durant cette étude nous avons analysé 70 prélèvements du sang provenant de différents centres de diagnostic de la tuberculose et des maladies respiratoires et des hôpitaux de la ville de Casablanca et ses régions. En ce qui concerne la méthodologie, nous nous sommes intéressés à une technique usuelle utilisée dans le diagnostic de la tuberculose latente c'est le test Quantiféron qui permet de mesurer in vitro par technique ELISA la quantité d'IFN-gamma secrétée par les lymphocytes T, suite à une stimulation par des antigènes spécifiques du *Mycobactérium tuberculosis*, qui n'existe pas dans le vaccin BCG ce qui confère une spécificité plus élevée que le test Intradermoréaction (IDR), qui possèdent plusieurs inconvénients.

Nos résultats ont montré que parmi 70 patients soumis au test 25 patients sont des hommes dont 10 sont positifs soit 40%, concernant les femmes le pourcentage est le même, sur 45 patientes 18 sont positives soit 40%. Les enfants de 0 à 15 ans ont le pourcentage de positivité le plus faible, avec un pourcentage de 14,28%, contrairement aux personnes âgées de 33 ans à 54 ans, qui ont un taux de positivités de 28,57%. Le dépistage de la tuberculose latente est très important surtout chez les personnes qui suivent un traitement par corticoïdes ou anti-TNF car ils peuvent être à l'origine de l'activation d'une tuberculose active. Il est donc important de sensibiliser les gens en leurs expliquant l'importance du diagnostic de la tuberculose latente.

## Références Bibliographiques

1. **WORLD HEALTH ORGANIZATION.**(2017). GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT 2017». S.I.: WORLD HEALTH ORGANIZATION.
2. **Cosivi O., Meslen F.X., Daborne C.J. et Grange J.M.** (1995). Epidemiology of *Mycobacterium bovin* in animals and humans, with particular reference to African. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz ;14 : 733-746.
3. **Ministere de la Sante du Maroc.** (2017), Direction de l'épidémiologie et de lutte contre les maladies.
4. **Meyer L, HUGO D.** (1980). Mycobactériologie en santé publique centre national de référence pour la tuberculose et mycobactéries.
5. **Abdou, Coulibaly.** (2006-2007). Suivi Du traitement Antituberculeux Au Centre de Sante de Reference Famory Doumbia de Segou . Thèse de Doctorat en Médecine à l'universite de Bamako.
6. **Arnaz A, Liebana E, Gomez E, Galan JC, et al.** (1999). A taxonomie study of a new member of the *mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in spain. Int J Syst Bacteriol ;49 :1263-1273.
7. **Carbonelle B, Dailloux M, Lebrun L, et al** (2003). Biologie médicale. Mycobactéries. Cahier de Formation ;29 : 158.
8. **Russell D.G.** (2007). Who puts the tubercle in tuberculosis? Nature reviews Microbiology 5, 39-47.
9. **Mathema B, Kurepina N, Fallows D, Kreiswirth BN.** (2008). Lessons from molecular epidemiology and comparative genomics Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine; 29(5) : 467-480.
10. **DONALD E et collaborateurs.** GUIDE DE LA TUBERCULOSE POUR LES PAYS À HAUTE PREVALENCE, 9.
11. **PICHARD. D. E et coll.** (2002). Tuberculose : maladies infectieuses. FMPOS.
12. **FLANDROIS JP.** (1997). *Mycobacterium tuberculosis* : Bactériologie médicale collection AZAY, presse universitaire de Lyon, 152-157.
13. **Anderson, R. J.** (1940). The chemistry of lipids of tubercle bacilli. Harvey Lect ;35 : 271-313.
14. **Daffe, Mamadou.** (2015). The tell Envelope of Tubercle Bacilli. Tuberculosis ;95 : 155- 58.

15. **Thomas CM, Nielsen KM.** (2005). Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat. Rev. Microbiol* : 3711-721.
16. **van Embden JD, MD Cave, Crawford JT, et al.** (1993). Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J. Clin. Microbiol* : 31406-409.
17. **Aranaz A, Liebana E, Galan JC, et al.** (1999). A taxonomic study of a new member of the *mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. *Int J Syst Bacteriol* ;49 :1263-1273.
18. **Chen M, Gan H, Remold HG.** (2006). A mechanism of virulence: virulent *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv, but not attenuated H37Ra, causes significant. *Am J Respir Crit Care Med* ;174 :1263-1273.
19. **Davis JM, Ramakrishnan L.** (2009). The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection; *PLoS Pathog* ; 136 : 37-49.
20. **Cooper AM.** (2009). Cell-mediated immune responses in tuberculosis. *Annual review of immunology*; 27 : 393-422.
21. **Gallegos AM, van H, Samstein M, et al.** (2011). A gamma interferon independent mechanism of CD4 T cell mediated control of *M tuberculosis* infection *in vivo*. *PLoS Pathogens*; 7 : 1002052.
22. **Deschaseaux C.** (2005). épidémiologie moléculaire de la tuberculose : étude des souches de *Mycobacterium tuberculosis* par la technique, 6110.
23. **Goo JM, Im JG.** (2002). CT of tuberculosis and non tuberculous mycobacterial infections. *Radiol Clin North Am*; 40 : 73-87.
24. **Abubakar I, Story A, Lipman M, Bothamley G, van Hest R, Andrews N.** (2010). Diagnostic accuracy of digital chest radiography for pulmonary tuberculosis in a UK urban population. *Eur Respir J*; 35 : 689-92.
25. **Hopewell PC, Jasmer RM.** (2005). Overview of clinical tuberculosis. In: *Tuberculosis. and the tubercle bacillus*. S.T.Cole, K.D.Eisenach, D.Eisenach, D.N.Mc Murray & W.R.Jacobs (eds). Washington, D. C: ASM Press, 15-31.
26. **Peto HM, Pratt RH, Harrington TA.** (2009). LoBue PA, Armstrong LR. Epidemiology of extrapulmonary tuberculosis in the United States, 1993-2006. *Clin Infect Dis*; 49 : 1350-7.
27. **Jabri HN, Lakhdar W, El Khattabi, Afif H.** (2016). Les moyens diagnostiques de la tuberculose . *Revue de Pneumologie Clinique*; 72(5) : 320-25.

28. **Small PM, Pai.** (2010). *M.Tuberculosis* diagnosis-time for a game change. *NE ngl J Med*; 363 : 1070-1.
29. **Niemann S, Richter E, Rusch S.** (2000). Differentiation among members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by molecular and biochemical features: evidence for two pyrazinamide-susceptible subtypes of *M. bovis* *J Clin. Microbiol*; 38 :152-157.
30. **Blackwell JM, Black GF, Sharpies C, Soo SS, Peacock CS.** (1999). Miller EN. Roles of Nrampl, HLA, and a gene (S) in allelic association with IL-4, in determining T helper subset differentiation. *Microbes and infection*; 1 : 95-102.
31. **Jounguy E, Cherradi LM, Altare F, Fondaneche MC, et al.** (1997). Partial Interferon- $\gamma$  receptor 1 deficiency in a child with tuberculosis bacillus Calmette-Guerin infection and a sibling with clinical tuberculosis. *Clin Invest*; 100(11) : 2658-64.
32. **Félicie CO.** (2010). Diagnostic de tuberculose latente chez des patients atteints de rhumatisme inflammatoire chronique candidats à une biothérapie : facteurs influençant le résultat d'un test de libération d'interféron gamma (T-SPOT.TB). Thèse de Doctorat en Médecine à l'université de LORRAINE.
33. **Mjid M, Cherif J, Ben Salah N, et al.** (2014). Épidémiologie de la tuberculose.

## Webographie

Figure 1 : [https://campus.cerimes.fr/microbiologie/enseignement/microbiologie\\_3/site/](https://campus.cerimes.fr/microbiologie/enseignement/microbiologie_3/site/)

Figure 2 : [https://fr.wikipedia.org/wiki/Coloration\\_de\\_Ziehl-Neelsen](https://fr.wikipedia.org/wiki/Coloration_de_Ziehl-Neelsen)

Figure 3 : [http://www.perrin33.com/microbiologie/lereste/enveloppesmicroorg\\_2.php](http://www.perrin33.com/microbiologie/lereste/enveloppesmicroorg_2.php)

Figure 4 : [https://fr.wikipedia.org/wiki/Mycobacterium\\_tuberculosis](https://fr.wikipedia.org/wiki/Mycobacterium_tuberculosis)

Figure 5 : [http://doctissimo.fr/sante/vaccination/impressionnante-reaction-test-sujet\\_148704\\_1.htm](http://doctissimo.fr/sante/vaccination/impressionnante-reaction-test-sujet_148704_1.htm)

