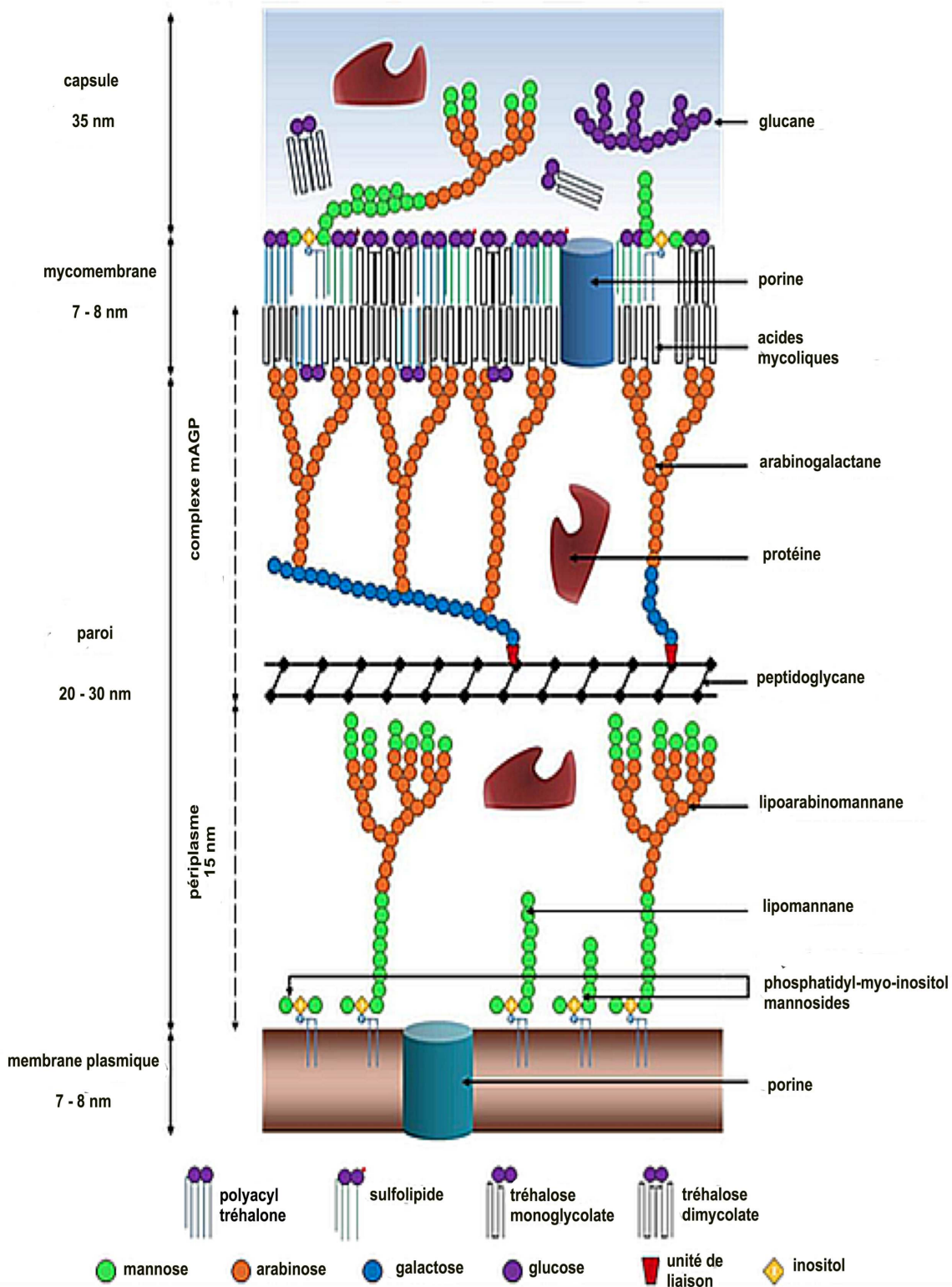


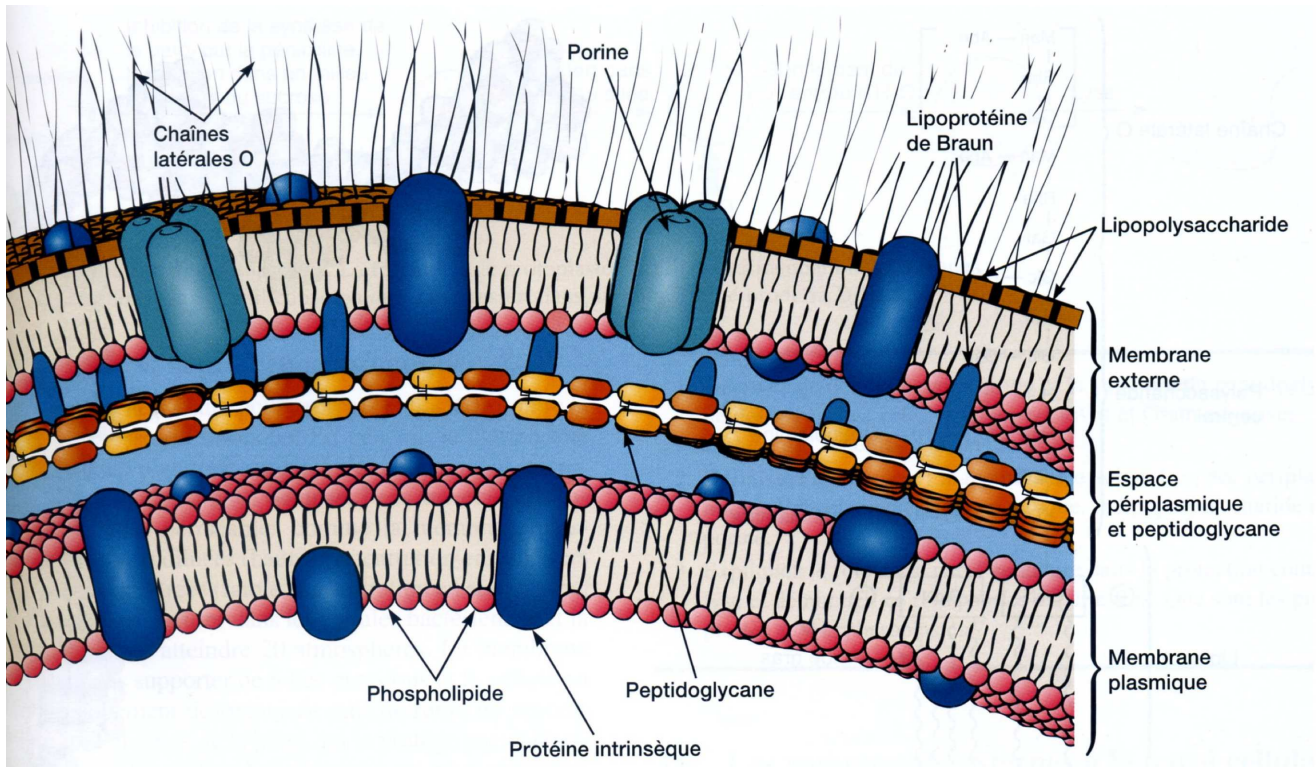
ANNEXES

Document 1 : structure schématique de l' enveloppe de *M. tuberculosis*. D'après Brennam & Nikaido, 1995 ; Zuberet et al., 2008 ; Sani et al., 2010

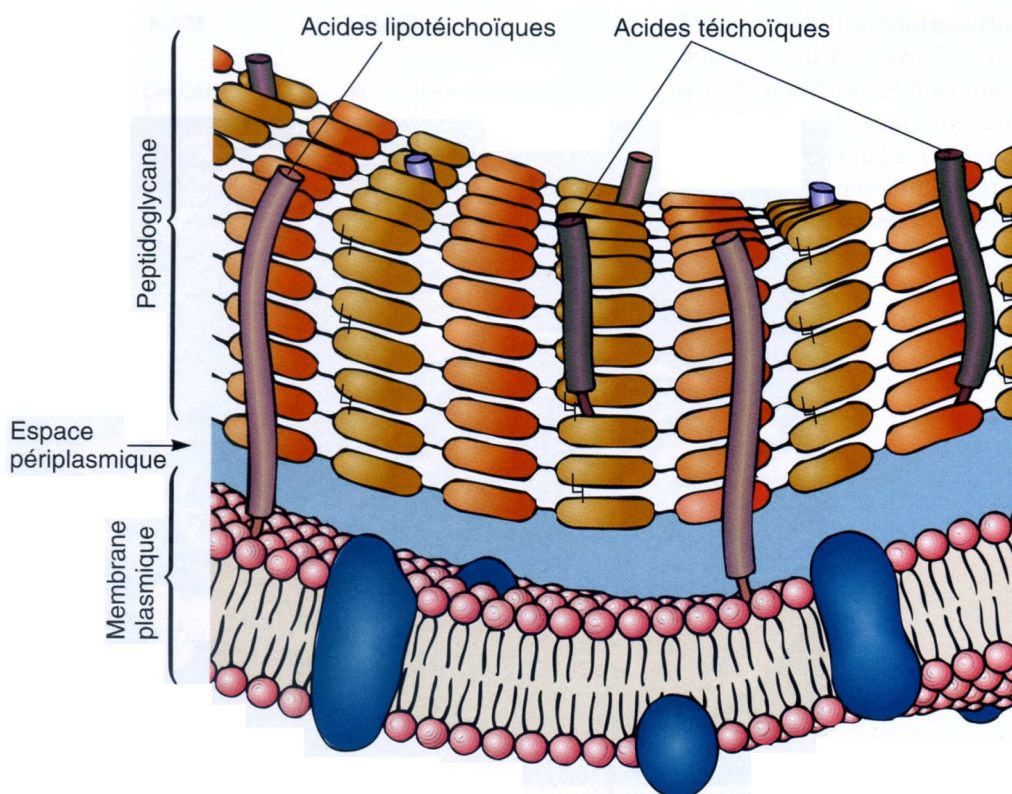


Document 2 : structure schématique de l'enveloppe d'une bactérie Gram+ et d'une bactérie Gram- (*Microbiologie, Prescott-Harley-Klein, éd. de boeck*)

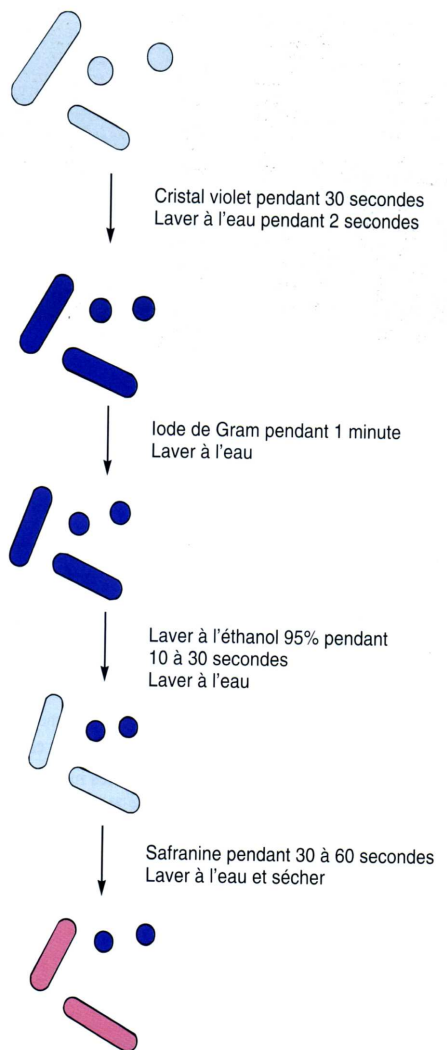
2.a : l'enveloppe des bactéries gram-



2.b : l'enveloppe des bactéries gram+



Document 3 : coloration d'un frottis par la technique de Gram (*Microbiologie, Prescott-Harley-Klein, éd. de boeck*)



Un mélange de bactéries (gram+ et gram-) est déposé sur une lame

Le cristal violet colore toutes les bactéries en violet

L'iode se combine avec le cristal violet et forme un complexe violet stable

L'alcool décolore les bactéries gram-

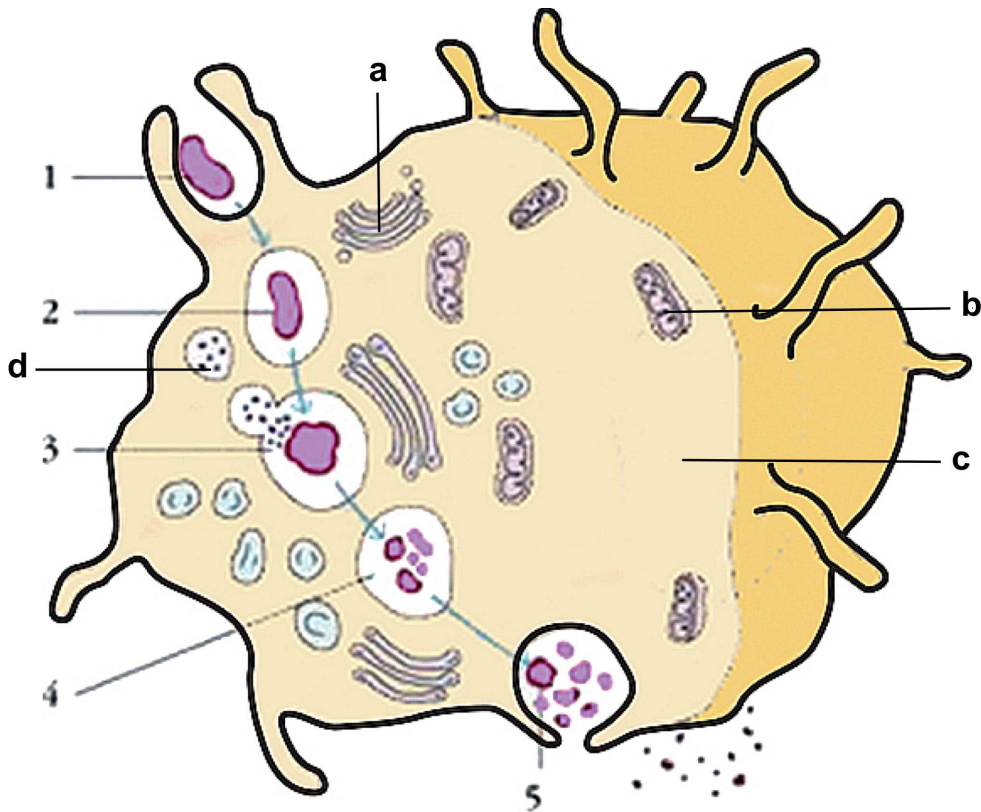
La safranine colore les bactéries décolorées par l'alcool

Le frottis observé au microscope à l'objectif X100 à l'immersion montre des bactéries colorées en violet, dites gram+ et des bactéries colorées en rose, dites gram-.

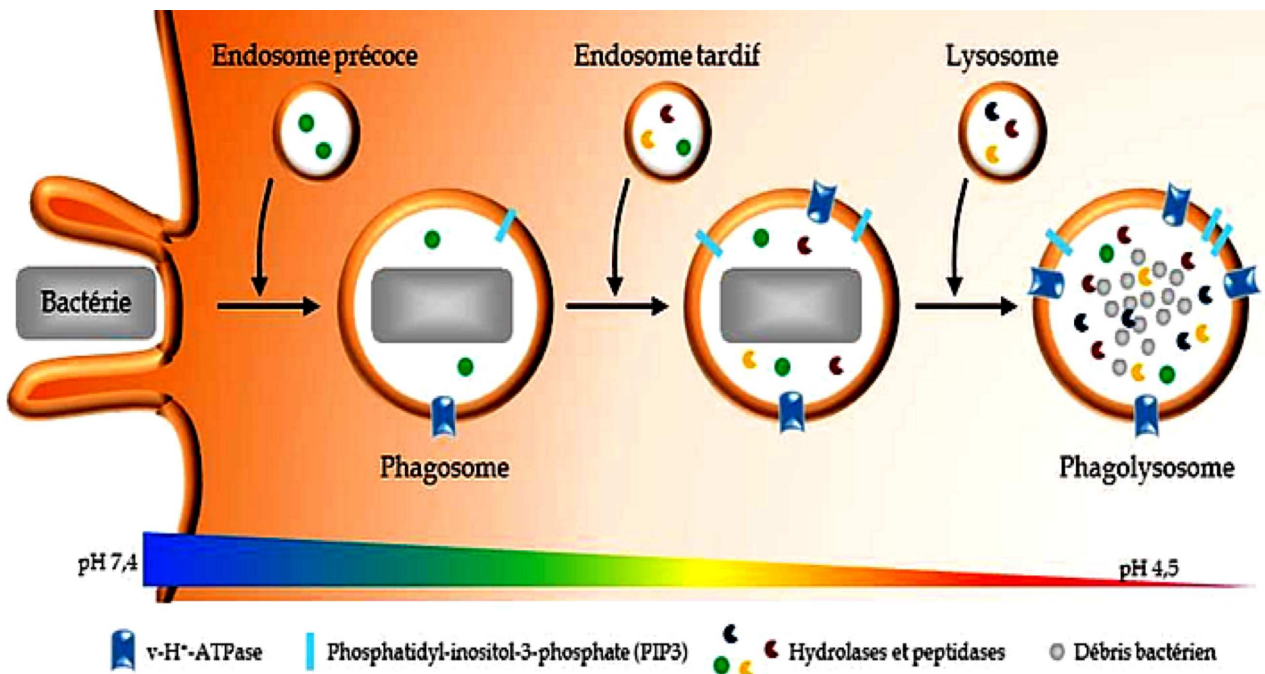
Document 4 : coloration de Ziehl Neelsen

Étapes	Mode opératoire
1	Couvrir le frottis de fuchsine phéniquée (colorant rose), chauffer progressivement jusqu'à émission de vapeur pendant 10 minutes, rincer à l'eau
2	Recouvrir le frottis d'acide sulfurique à 25% pendant 3 minutes, rincer à l'eau
3	Couvrir d'alcool à 90° pendant 5 minutes, rincer à l'eau
4	Recouvrir le frottis de bleu de méthylène (colorant bleu) pendant 30 secondes, rincer à l'eau

Document 5 : schéma simplifié de la phagocytose par une cellule phagocytaire, *extrait de l'asp*



Document 6 : endocytose et maturation du phagosome, *d'après Castagnier R., Université Toulouse, 2013*



- **v-H⁺.ATPase** : pompe à protons permettant l'accumulation des protons (H⁺) dans le phagolysosome
- **PIP3** : molécules indispensables à la fusion des endosomes et lysosomes avec le phagosome
- **Hydrolases et peptidases** : enzymes dont les pH optimaux sont d'environ 4,5

Document 7 : composition du milieu de Middlebrook 7H9

Document 7a : extrait de la fiche technique du milieu Middlebrook 7H9

Middlebrook 7H9 Broth Base with added supplement is recommended for cultivation and sensitivity testing of *Mycobacterium tuberculosis*.

Composition:

Ingredients	Grams/Litre
Ammonium Sulfate	0.5
Disodium Phosphate	2.5
Monopotassium Phosphate	1.0
Sodium Citrate	0.1
Magnesium Sulfate	0.05
Calcium Chloride	0.0005
Zinc Sulfate	0.001
Copper Sulfate	0.001
Ferric Ammonium Citrate	0.04
L-Glutamic Acid	0.5
Pyridoxine	0.001
Biotin	0.0005
Final pH 6.6 +/- 0.2 at 25°C	

Store prepared media below 8°C, protected from direct light. Store dehydrated powder in a dry place in tightly-sealed containers at 2-25°C.

Appearance: Light yellow colored, homogenous, free flowing powder.
Color and Clarity: Light amber colored, clear solution with a slight precipitate.

Directions:

Suspend 2.35 g of Middlebrook 7H9 Broth Base in 450 ml of distilled water. Add either 2 ml of glycerol (Fluka 49769) or 0.5 g of Tween 80 (Fluka 93780). Heat if necessary to dissolve the medium completely. Sterilize by autoclaving at 15 lbs. pressure (121°C) for 10 minutes. Cool to 45 °C or below and aseptically add 1 vial of Middlebrook ADC Growth Supplement (M0553). Mix well before dispensing.

Principle and Interpretation:

This medium contains many inorganic salts, which support the growth of *Mycobacteria*. Sodium citrate provides citrate ions in the medium, which retain inorganic cations in the solution. Middlebrook ADC Growth Supplement (Product No. M0553) contains bovine albumin, dextrose and catalase. Dextrose supplies energy, while albumin protects *Mycobacteria* from toxic agents and catalase splits toxic radicals.

Cultural characteristics after 2-4 weeks at 35-37°C.

Organisms (ATCC)	Growth
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37 RV (25618)	+++
<i>Mycobacterium smegmatis</i> (14468)	+++
<i>Mycobacterium fortuitum</i> (6841)	+++

Document 7b : extrait de la fiche technique du supplément Middlebrook ADC

Composition

Bovine albumin fraction V 2.5 g
Dextrose 1 g
Catalase 0.0015 g
Distilled water 50 ml

Store at 4°C.

Directions

Warm up the refrigerated supplement to 45-50°C. Aseptically add the contents of the vial to 450 ml of sterile Middlebrook 7H9 Broth Base (Fluka/Sigma M0178). Mix well and pour into sterile screw capped tubes.

Lexique : dextrose = glucose ; copper = cuivre ; below = en-dessous ; vial = dose

Document 8 : comparaison de la culture de *Mycobacterium tuberculosis*, sur deux milieux de culture liquides, suivie par turbidimétrie à 600 nm

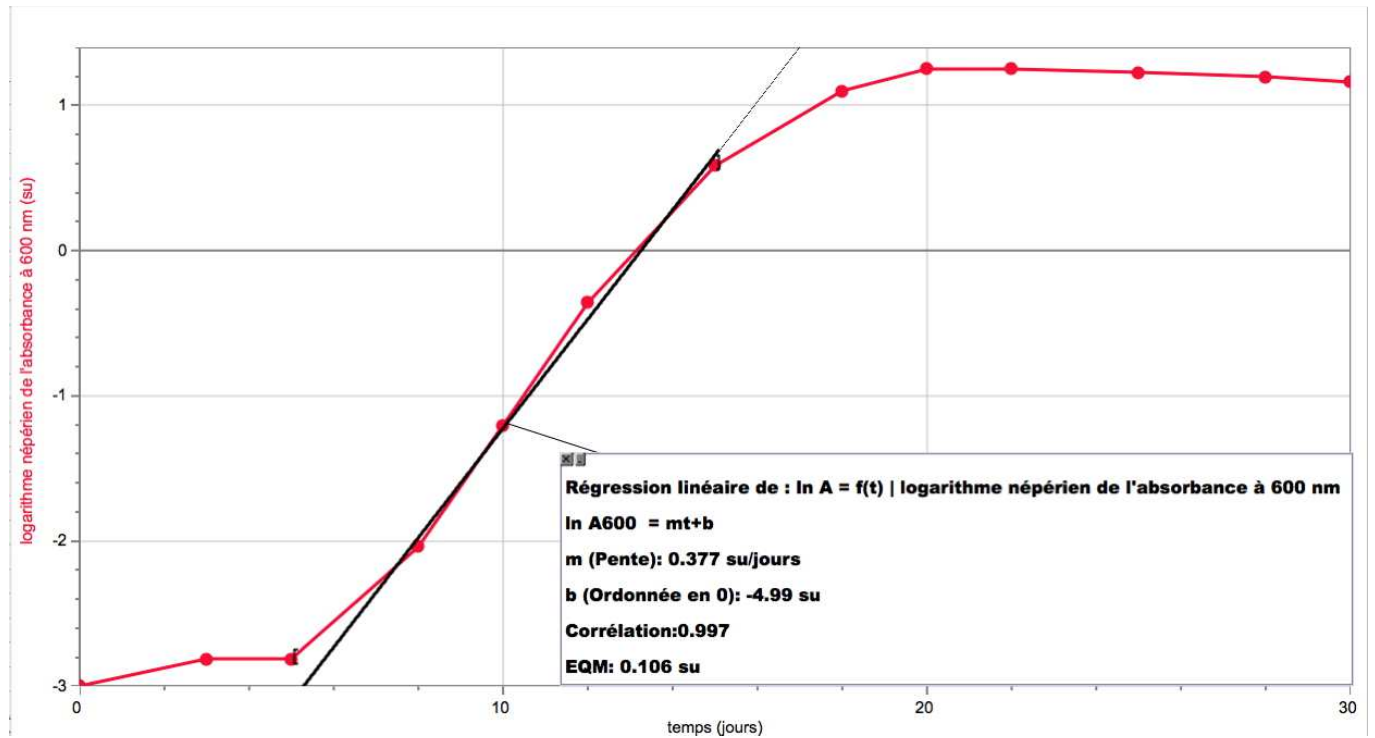
Milieu	Middelbrook 7H9	Milieu minimum
Température d'incubation	35°C	35°C
Durée	2 semaines	2 semaines
Source lumineuse	Non	Oui (étuve éclairée)
Turbidité à 600 nm	0,853	0,007

Document 9 : types trophiques des microorganismes en fonction de la nature du besoin

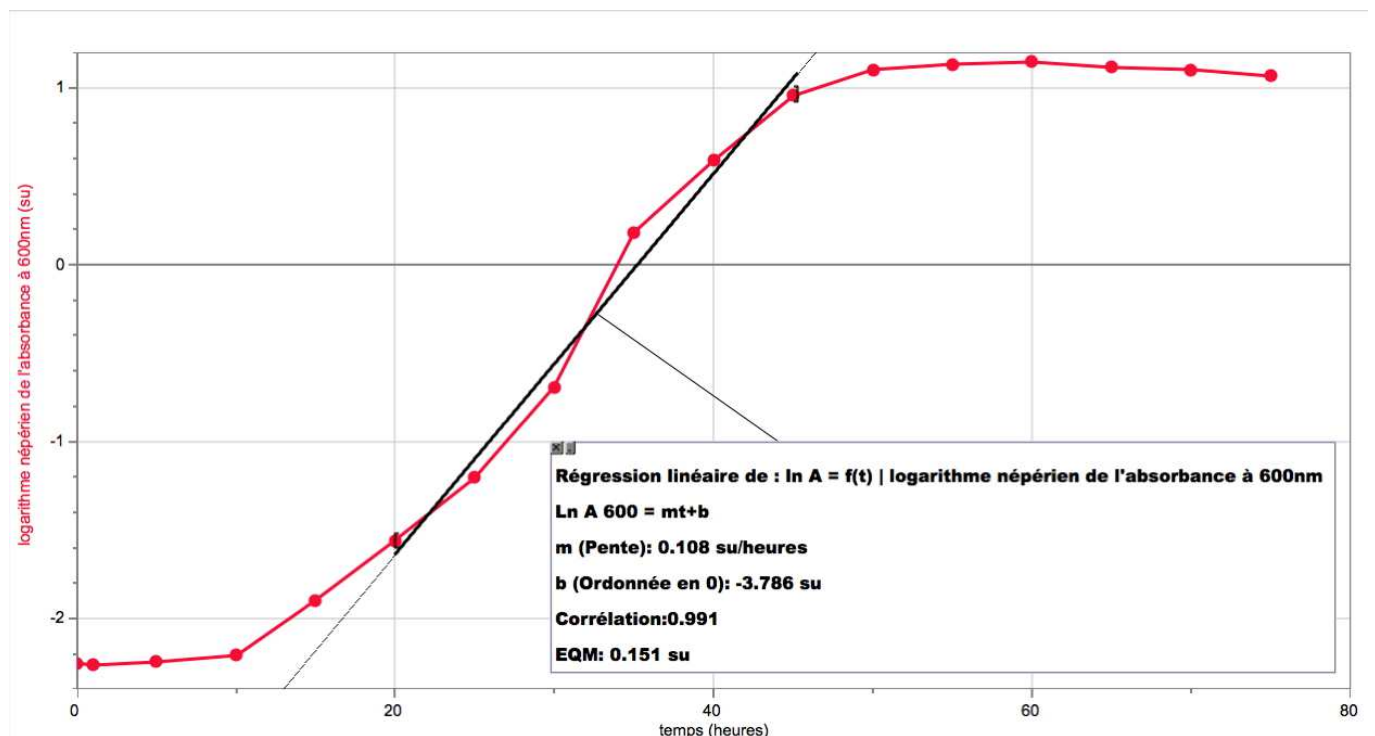
Classe du besoin	Nature du besoin	Type trophique
Source d'énergie	Rayonnement lumineux	Phototrophe
	Oxydation de composés organiques ou inorganiques	Chimiotrophe
Source de carbone	Minérale	Autotrophe
	Organique	Hétérotrophe
Facteurs de croissance	Nécessaire	Auxotrophe
	Non nécessaire	Prototrophe

Document 10 : courbes de croissance de *Mycobacterium tuberculosis* et *smegmatis*

10.a : courbe de croissance de *Mycobacterium tuberculosis* obtenue sur milieu Middlebrook 7H9 à 35°C



10.b : Courbe de croissance de *Mycobacterium smegmatis* obtenue sur milieu de Middlebrook 7H9 à 35°C



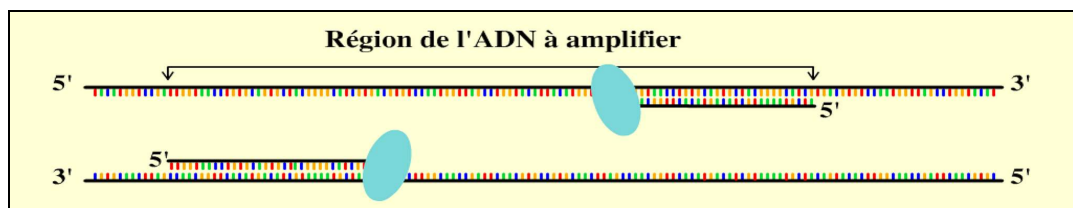
Document 11 : principe général de l'ACP (ou PCR)

La PCR est une réaction enzymatique qui permet de sélectionner puis d'amplifier un très grand nombre de fois un fragment d'**ADN** particulier, présent en très faible quantité au départ, parmi des millions d'autres fragments. Elle s'effectue grâce à 4 acteurs fondamentaux en 3 étapes répétées n fois.

Les acteurs de la PCR :

- **ADN cible** : fragment de taille variable, en général inférieur à 1200 pb ;
- **amorces** : fragments courts d'ADN, capables de s'hybrider de façon spécifique, grâce à la complémentarité des bases, sur l'un des deux brins d'ADN. Les amorces sont choisies de façon à encadrer la séquence d'ADN à amplifier. La taille de ces amorces est généralement d'une vingtaine de désoxyribonucléotides. De plus, les amorces sont en très forte concentration par rapport à celle de l'ADN à amplifier ;
- **enzyme** : une polymérase, c'est-à-dire qu'elle peut synthétiser un nouveau brin d'ADN à partir du brin d'ADN matrice après s'être fixée à une amorce, mais cette polymérase est thermorésistante, c'est la **Taq polymérase**.

Comme toutes les polymérases, la Taq (en bleu sur le schéma ci-dessous) catalyse l'ajout de dNTP sur l'extrémité 3'OH des amorces.

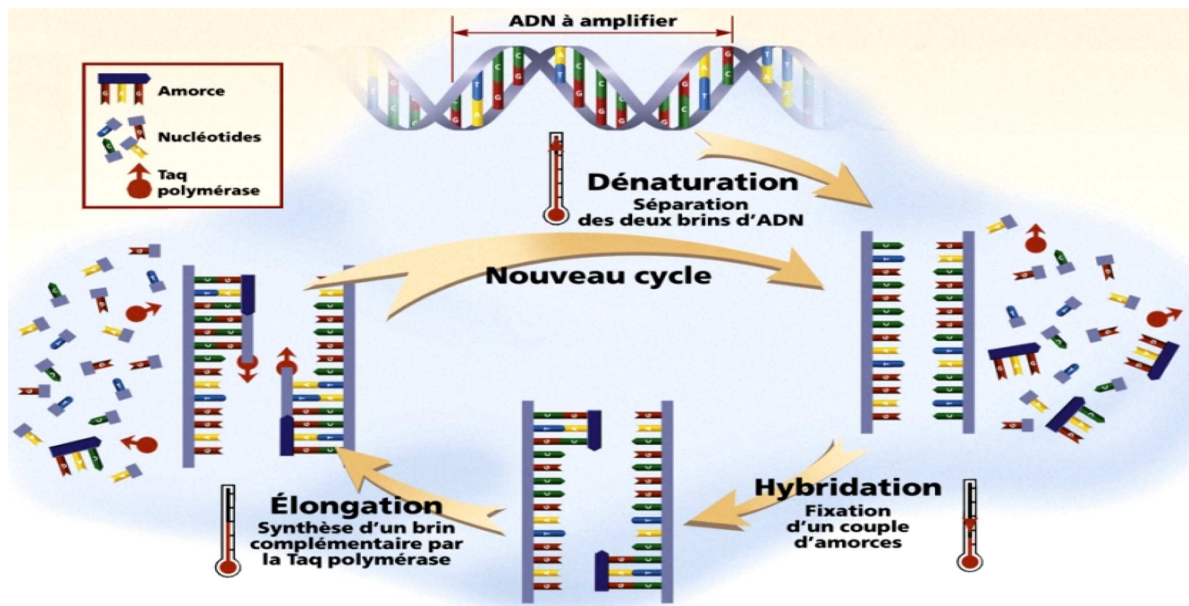


- **désoxyribonucléotides-Tri-Phosphates** (dNTP : dATP, dCTP, dGTP, dTTP) : substrats (en plus des amorces) de la Taq polymérase pour la synthèse du nouveau brin d'ADN complémentaire.

Le tout dans un milieu tamponné permettant d'optimiser l'ensemble des réactions.

Les 3 étapes de la PCR : automatisées, chacune d'entre elles correspond à une réaction particulière. Leurs durées sont brèves, la température étant le paramètre clé à maîtriser.

- (1) La dénaturation** (moins de 60 s) : à une température voisine de 94-96°C, il y a dénaturation de l'ADN double brin en ADN simple brin.
- (2) L'hybridation** (de 10 à 60 s) : la température est ensuite abaissée entre 50°C et 60°C, les amorces s'associent à leurs séquences spécifiques
- (3) L'élongation** (moins de 120 s), à 72°C, la Taq polymérase synthétise le brin complémentaire à l'ADN matrice, grâce aux dNTP libres présents dans le milieu réactionnel.

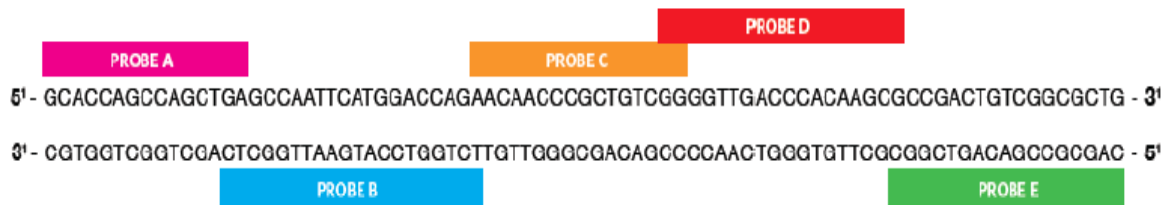


D'après : <http://www.gnis-pedagogie.org/biotechnologie-biologie-amplification-fragment-adn.html>

Le nombre de copies d'ADN obtenu (les amplicons) lors de n cycles est très grand : 2^n fragments d'ADN double brins sont obtenus au bout de n cycles soit plus de 10^6 au bout de 20 cycles.

Document 12 : fonctionnement des balises moléculaires

12.a : Région amplifiée, 81 pb, concentrant un très grand nombre de mutations du gène *rpoB*



(D'après la documentation Cepheid)

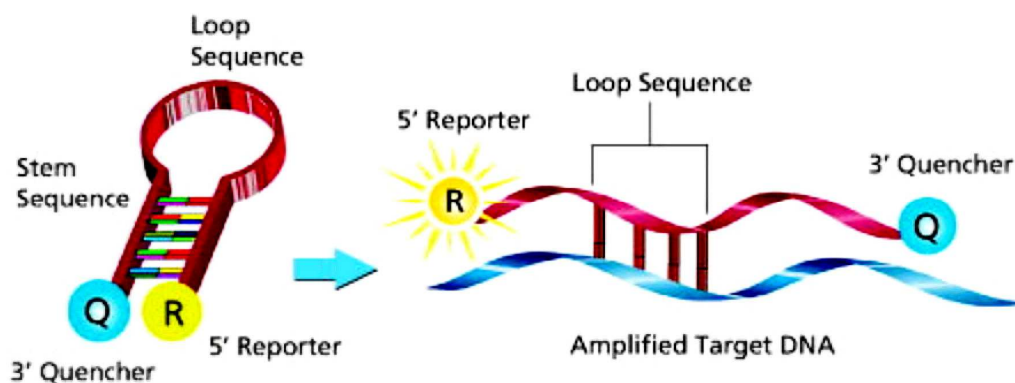
12.b : les sondes (« *probe* »)

Les 5 sondes ci-dessus s'hybrident seulement avec la séquence sauvage (non mutée) de *Mycobacterium tuberculosis*. L'hybridation n'est pas possible avec les souches mutantes (même si la mutation ne concerne qu'un seul nucléotide). L'hybridation d'au moins 2 sondes permet d'identifier *Mycobacterium tuberculosis*.

(Documentation Cepheid et http://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/reviews/k131706.pdf)

12.c : propriétés des sondes (ou balises moléculaires « *molecular beacon* »)

Ces 5 sondes sont constituées outre la séquence d'ADN simple brin, en 5' d'un groupement fluorescent (« *Reporter* »), en 3' d'un suppresseur (« *Quencher* ») de la fluorescence. Il atténue la fluorescence de R lorsqu'il est situé à proximité de R, typiquement sous la forme « épingle à cheveux » R et Q sont proches, R ne fluoresce pas.



D'après un document Sigma-Aldrich :

<http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/molecular-beacons.html>

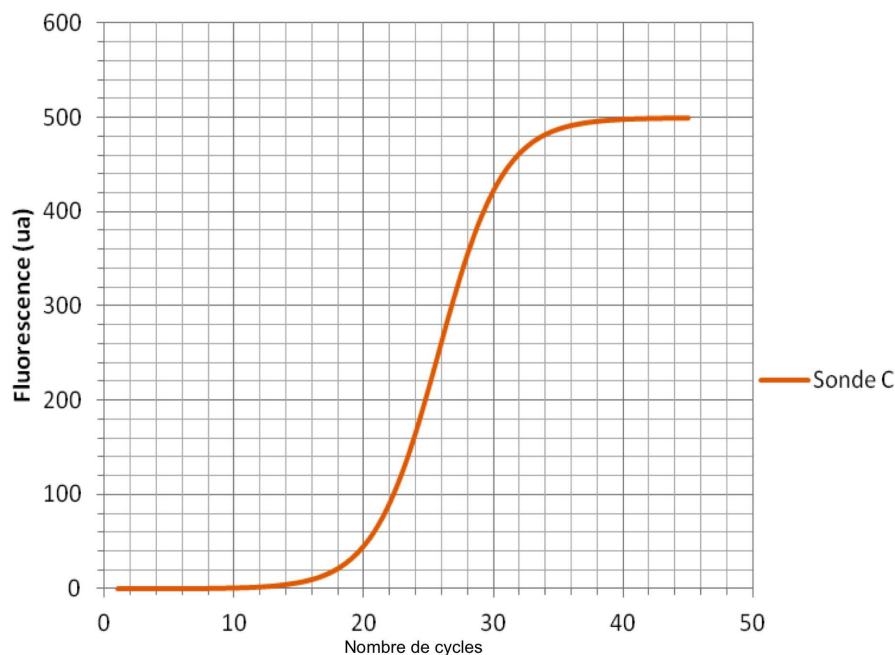
Chaque sonde (A, B, C, D ou E) porte un fluorophore (« *Reporter* ») différent dont les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont spécifiques

Document 13 : suivi de la fluorescence en fonction du nombre de cycles PCR

L'ensemble des tests présentés est validé par le contrôle interne et le contrôle des différentes sondes.

13.a : échantillon : *Mycobacterium tuberculosis* sauvage

Analyse : PCR en temps réel, détection des amplicons (fragments d'ADN amplifiés) à l'aide de la sonde C

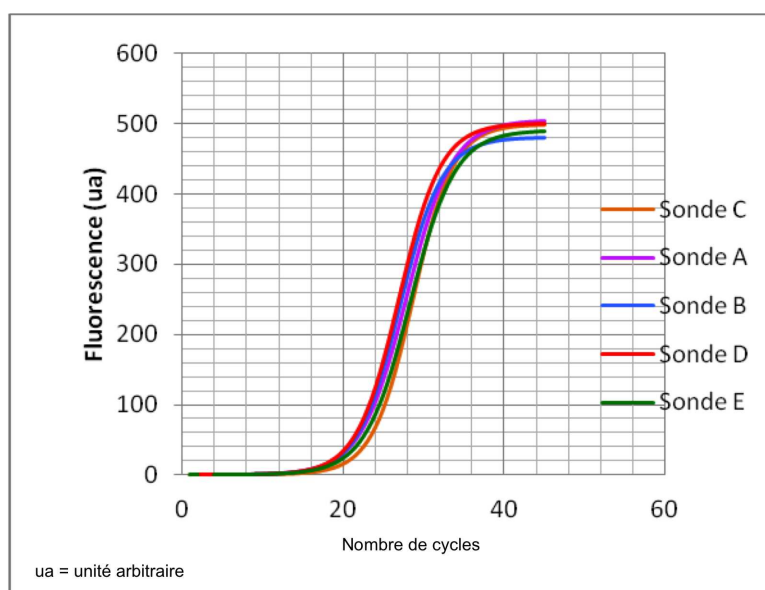


ua = unité arbitraire

13.b : échantillon : culture de mycobactéries

Analyse : PCR en temps réel, détection des amplicons à l'aide des 5 sondes A, B, C, D et E

Résultat : *Mycobacterium tuberculosis* sauvage

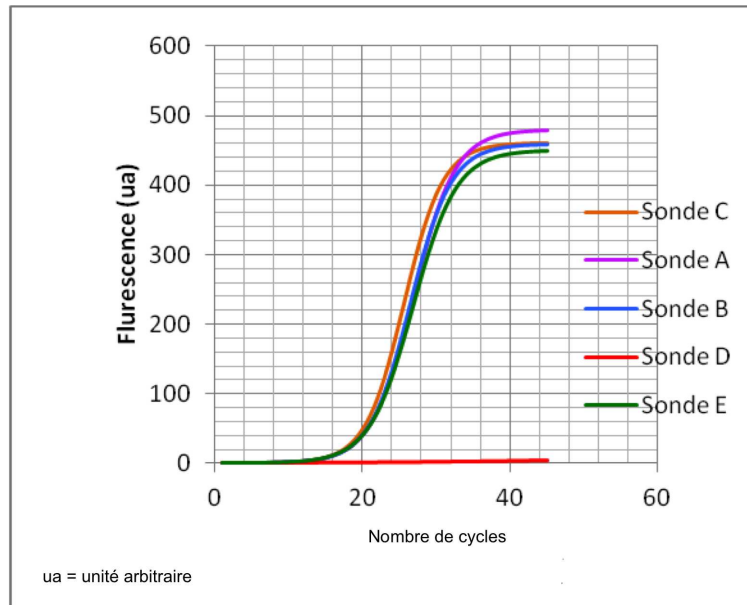


ua = unité arbitraire

13.c : Échantillon : crachat

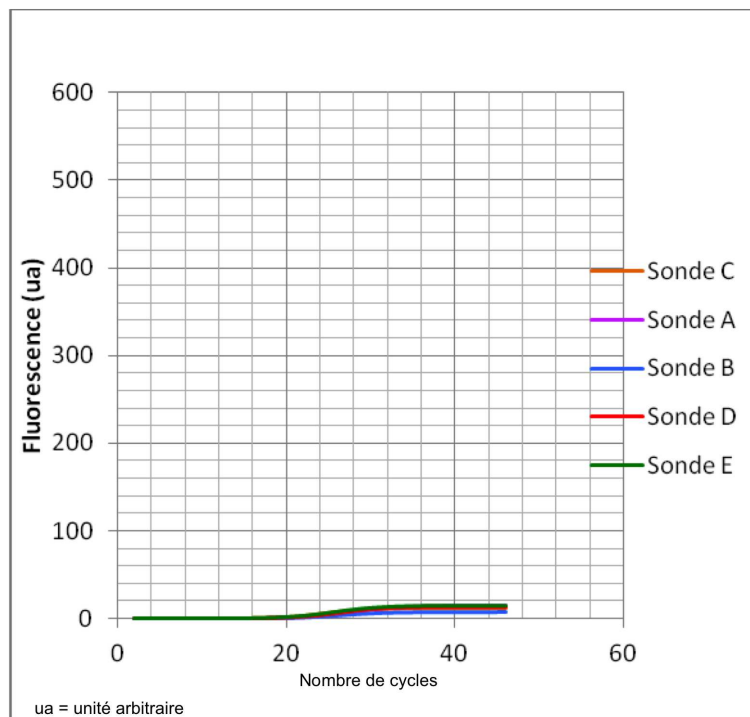
Analyse : PCR en temps réel, détection des amplicons à l'aide des 5 sondes A, B, C, D et E

Résultat : *Mycobacterium tuberculosis* résistant à la rifampicine

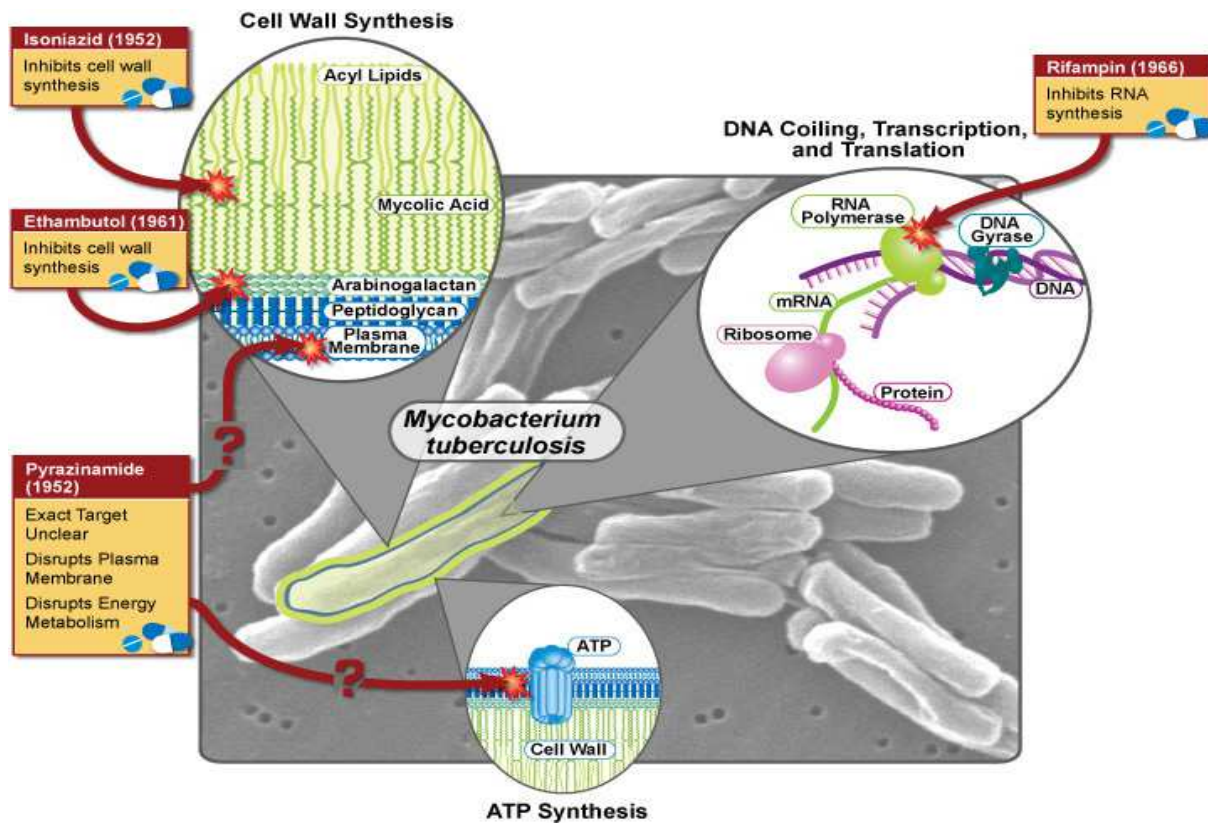


13.d : Échantillon : crachat X

Analyse : PCR en temps réel, détection des amplicons à l'aide des 5 sondes A, B, C, D et E

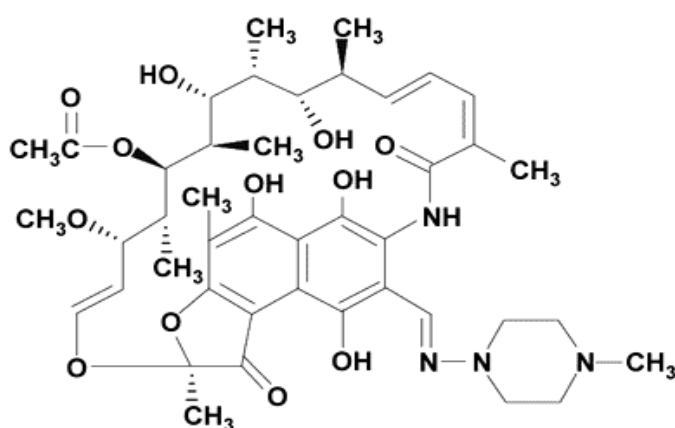


Document 14 : mode d'action des quatre anti-tuberculeux standards



Source : National Institute of Allergy and Infectious Diseases : <https://www.niaid.nih.gov/topics/tuberculosis/Understanding/WhatIsTB/ScientificIllustrations/pages/firstlineillustration.aspx>

Document 15 : la molécule de rifampicine



<http://www.123bio.net/cours/antibio/rifamycines.html>

Document 16 : méthode Etest® pour déterminer les CMI des différents antibiotiques pour les mycobactéries

Principe de la technique Etest® Bio-Mérieux

Le Etest® est une technique quantitative de détermination de la sensibilité aux antibiotiques. Ce système comporte un gradient d'antibiotique prédéfini, utilisé pour déterminer la CMI en $\mu\text{g.mL}^{-1}$ des différents antibiotiques pour les mycobactéries testées sur un milieu gélosé.

Etest® se compose d'une mince bandelette imprégnée d'un gradient exponentiel continu de l'antibiotique à tester. Ce gradient couvre une plage continue de concentrations en antibiotique allant de 0,016 à 256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Le Etest® associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide. Les bandelettes (supports inertes, hydrophobes, de 5 mm de largeur et de 50 mm de longueur) sont appliquées sur la surface d'un milieu gélosé préalablementensemencé avec un inoculum de la souche à étudier. Après incubation, l'inhibition de la croissance se traduit par une ellipse d'inhibition symétrique dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI exprimée en $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Une échelle de lecture, imprimée sur la bandelette, permet une lecture rapide.

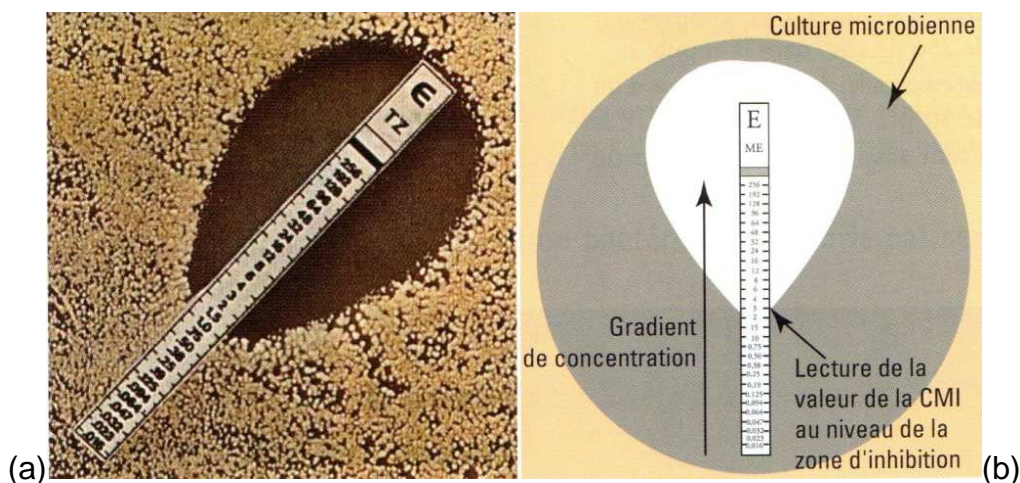


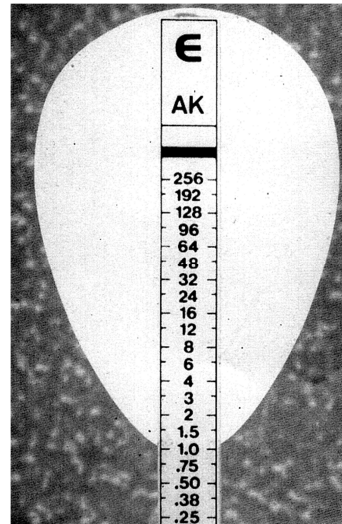
Photo de résultat d'un Etest® (a) et schéma du résultat d'un Etest® dans une boîte de Petri 90mm. D'après Microbiologie technique - Tome1, JN. Joffin et G.Leyral, édition 2009

Interprétation de la méthode Etest® pour la souche *Mycobacterium tuberculosis*

Concentrations critiques recommandées pour la méthode en milieu Middlebrook :

antibiotique testé	La souche est sensible à l'antibiotique si :	La souche est résistante à l'antibiotique si :
isoniazide	$\text{CMI} < 0,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$	$\text{CMI} \geq 0,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$
rifampicine	$\text{CMI} < 0,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$	$\text{CMI} \geq 1 \mu\text{g.mL}^{-1}$
éthambutol	$\text{CMI} < 7,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$	$\text{CMI} \geq 0,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$

Document 17 : résultat obtenu avec un Etest®
 Antibiotique testé : rifampicine
 Souche testée : *Mycobacterium tuberculosis*



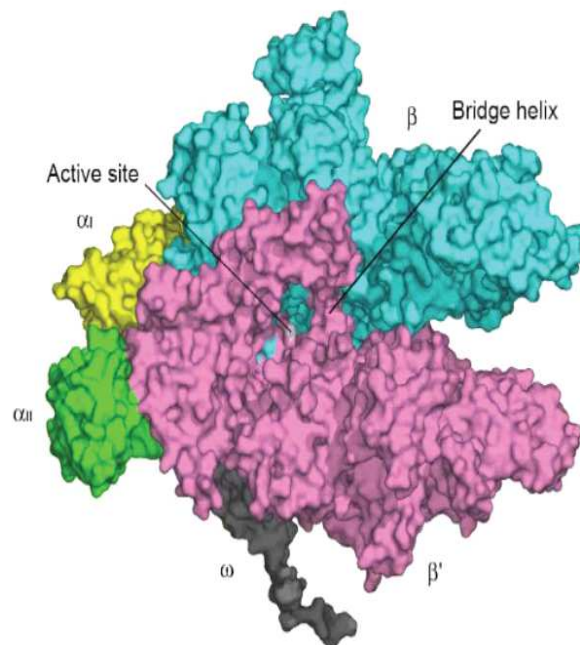
Document 18 : présentation de l'ARN polymérase ADN dépendante

Document 18.a : structure de l'ARN polymérase ADN dépendante et rôles de ses sous-unités dans la transcription de l'ADN

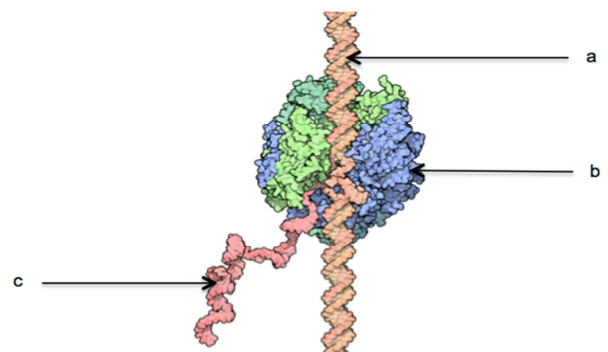
L'ARN polymérase bactérienne est un complexe enzymatique constitué de 6 sous-unités : 2 α ; β ; β' ; σ et ω .

Ce complexe enzymatique catalyse la réaction de transcription de l'ADN permettant la synthèse d'une molécule d'ARN. Lors de la transcription, les sous-unités ont des rôles différents. La sous-unité σ se fixe sur l'ADN et recrute les autres parties du complexe enzymatique. Les deux sous-unités α permettent de maintenir le brin d'ADN non-transcrit à l'écart. Les sous-unités β contiennent le site actif de l'enzyme. La sous-unité ω participe à la liaison de l'enzyme sur la matrice d'ADN. Une fois l'ARN polymérase mise en place, la sous-unité σ se détache du complexe et β' assure la liaison à l'ADN. L'ARN polymérase déroule ensuite la double hélice d'ADN sur 17 paires de bases environ. Puis, au cours de la phase d'élongation, l'ARN polymérase catalyse l'addition de nucléotides sur l'extrémité 3'OH du brin d'ARN en élongation.

(Source : Murakami, *J.Biol.Chem.* 2013)



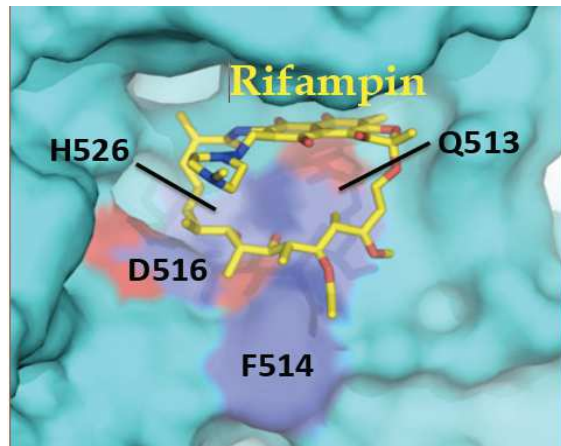
Document 18.b : l'ARN polymérase au cours de la phase d'élongation



Document 19 : complexe ARN polymérase-rifampicine

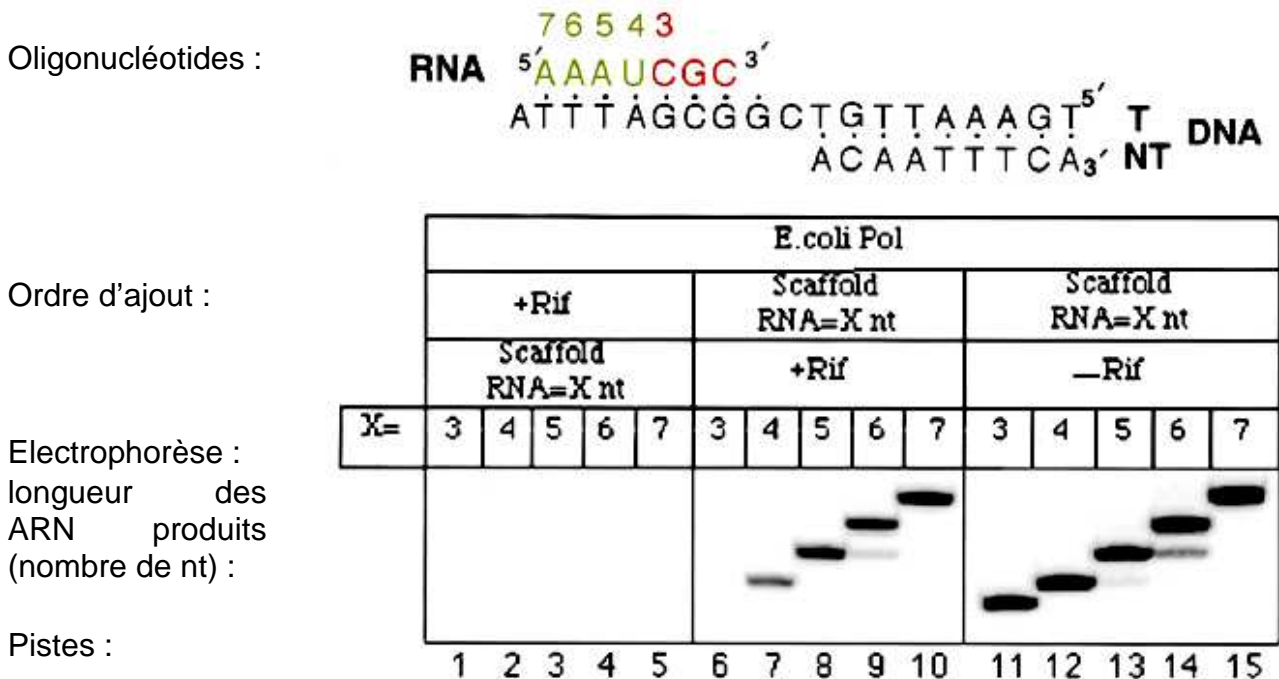
Au niveau de la sous-unité β de l'ARN polymérase, dans une zone adjacente au site actif, l'acide aminé histidine (H) en position 526 (H526) établit une liaison hydrogène avec la rifampicine. La fixation de la rifampicine entraîne un arrêt de l'élongation de l'ARN.

Nota bene : rifampin = rifampicine



Document 20 : détermination du mécanisme d'action de la rifampicine sur l'ARN polymérase d'*E. coli*

Tests de l'élongation de différents oligonucléotides en présence de la matrice d'ADN (brin T) et de Rifampicine (d'après : Elizabeth A. Campbell, N. Korzheva, A. Mustaev, K. Murakami, S. Nair, A. Goldfarb, and Seth A. Darst. Cell, Vol. 104, 901–912, March 23, 2001).



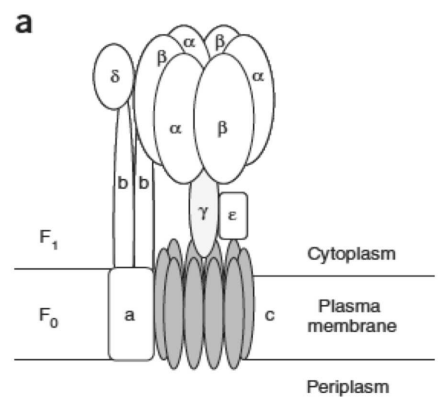
Le brin d'ADN matrice (noté T) est mis en présence d'oligonucléotides (notés X nt) dont la taille varie de X = 3 à X = 7 nucléotides selon l'expérience :

- Pistes 1 à 5 : élongation avec un oligonucléotide de longueur X, variant de 3 à 7 nucléotides (nt) ; rifampicine ajoutée en premier ;
- Pistes 6 à 7 : élongation avec un oligonucléotide de longueur X, variant de 3 à 7 nucléotides (nt) ; rifampicine ajoutée après l'oligonucléotide ;
- Pistes 11 à 15 : élongation avec un oligonucléotide de longueur X, variant de 3 à 7 nucléotides (nt), en absence de rifampicine.

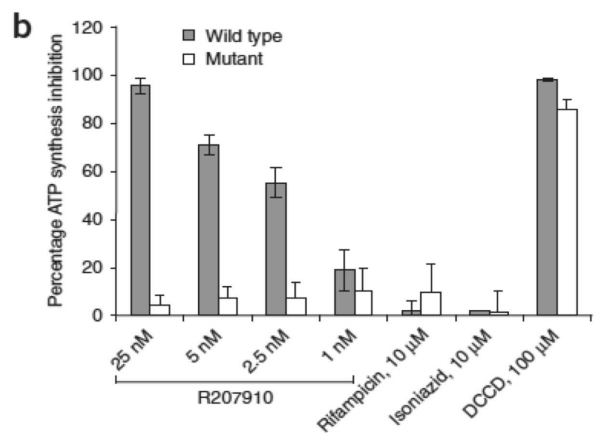
Les substrats (nucléotides triphosphate) et l'ARN polymérase active sont déjà présents dans le milieu réactionnel. Les nucléotides à Cytosine (C) sont marqués radio-activement afin de détecter les produits de l'élongation. Les ARN formés sont séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide (23%) puis détectés grâce au marquage radioactif.

Document 21 : ATP synthase subunit composition and inhibition by bedaquiline (R207910)

- **a** ATP synthase has a transmembrane F₀ part (subunits a, b and c) and a cytoplasmic F₁ part (subunits α, β, γ, δ, ε). The oligomeric subunit c (AtpE gene), forming a ring-like structure, is highlighted in gray.



- **b** Effect of on ATP synthase from wild-type or mutant (atpED32V) *M. smegmatis*; shown are mean values of three independent experiments. (Koul et al, Nature chemical biology, brief communications, july 2007)

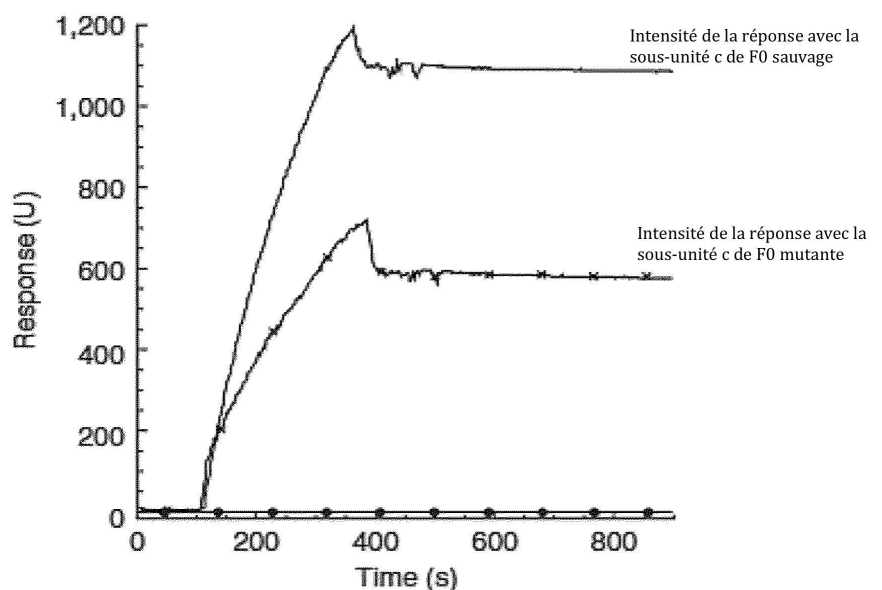


N.B. : rifampicin and Isonianiazid are antibiotics used against Mycobacterium while DCCD (N,N-dicyclohexylcarbodiimide) is a classical inhibitor of the FoF1-ATP synthase.

(Hélène Segala, caractérisation génétique, biochimique et structurale de l'ATP synthase des mycobacteries, la cible d'un nouvel antituberculeux de la famille des diarylquinolines, thèse doctorale, Université Paris 6, janvier 2012)

Document 22 : résultats du test Biacore

Une sous-unité c de F₀ purifiée à partir d'une souche sauvage (aucun symbole) ou mutante (x) de *M. tuberculosis* a été injectée sur un biocapteur Biacore comportant l'analogue de la bedaquiline R207910. Les données de contrôles (points) proviennent d'un biocapteur sans analogue de R207910. L'unité U de réponse équivaut à 1 pg de protéine sur 1 mm² de surface de biocapteur. (Koul et al, Nature chemical biology, brief communications, july 2007)

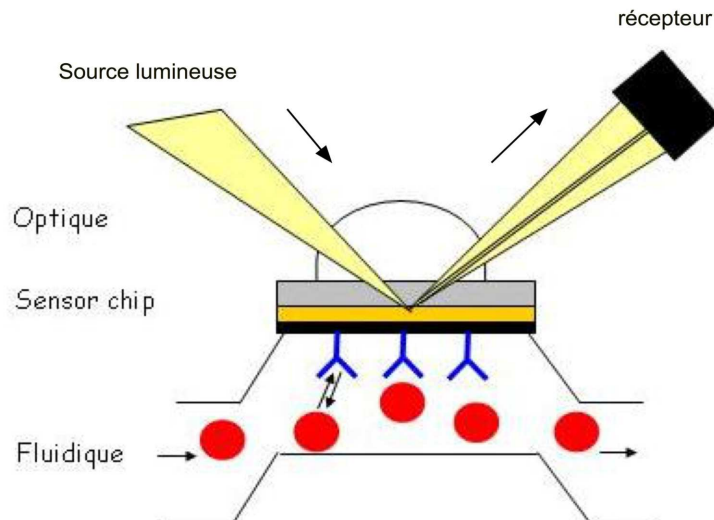


Document 23 : principe du Biacore

Le Biacore est un automate qui utilise la Résonance Plasmonique de Surface (SPR) pour mesurer en temps réel l'interaction entre biomolécules non marquées dans un débit continu de tampon.

Un des réactifs, par convention nommé ligand, est immobilisé sur une interface appelée sensor chip (biocapteur). L'autre partenaire, par convention nommé analyte, est injecté à débit constant par un circuit microfluidique au contact de cette interface. L'interaction entre le ligand et l'analyte est à l'origine d'un signal, proportionnel à la masse liée, qui permet de visualiser et de quantifier cette interaction.

Le système de mesure du Biacore est composé de trois éléments :



1. Le sensor chip

Il comprend une lamelle de verre sur laquelle est déposée une fine pellicule d'or, elle-même recouverte d'une couche de dextran carboxyméthylé sur lequel on couple de façon covalente la première molécule impliquée dans la réaction que l'on veut étudier. Après interaction, cette surface pourra être régénérée avec un tampon acide, basique ou salin. Le couplage peut se faire par les groupements amines, par les sucres ou par les groupements thiols selon des procédés de chimie classique. Le couplage peut également se faire par capture via un fragment Fc ou une biotine présents sur la molécule à immobiliser. Il existe également des sensor chips hydrophobes permettant de fixer des lipoprotéines, des liposomes, des préparations membranaires, ou, enfin, des sensor chips ne comportant qu'une pellicule d'or et autorisant des chimies d'immobilisation à façon.

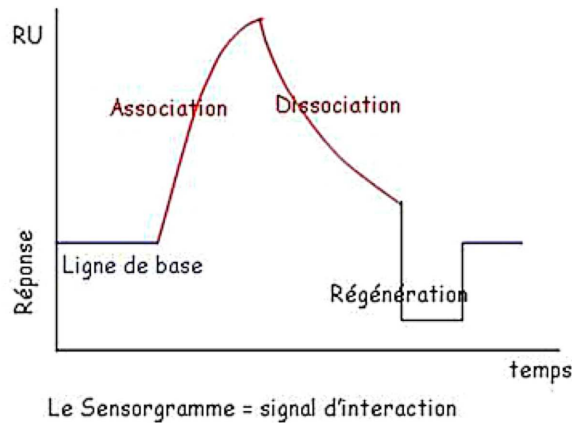
2. La micro-plaquette fluidique

Elle contrôle l'injection (de 2 à 350 microlitres) et le débit d'injection (de 1 à 100 microlitres/minute) des réactifs ou du tampon à la surface du *sensorchip*. Elle est fabriquée dans du latex et comporte des séries de microcanaux et de valves. Elle comprend 4 micro-chambres « à ciel ouvert » qui sont plaquées sur le sensor chip et qui délimitent ainsi quatre « Flow cells » d'environ 40 micromètres de hauteur. Quatre surfaces de travail sont ainsi disponibles par *sensorchip*.

3. L'unité optique

Le Biacore utilise le phénomène de résonance plasmonique de surface (SPR) pour détecter les interactions biomoléculaires. Une lumière polarisée envoyée sur un prisme, en contact direct avec la lamelle de verre de la surface du sensor chip, est totalement réfléchie. Le phénomène de résonance, lié à la présence de la feuille d'or sur le sensor chip, se caractérise par une chute de l'intensité de la lumière réfléchie à un certain angle (angle de résonance). Quand les molécules se fixent à la surface du biocapteur, l'indice de réfraction du milieu change. Ce changement entraîne un décalage de l'angle de résonance. L'enregistrement en continu de la variation de l'angle de résonance permet de suivre en temps réel la fixation des molécules injectées sur le biocapteur. La réponse est proportionnelle à la masse des molécules qui se lient au ligand immobilisé sur la surface du biocapteur. Le signal de résonance est exprimé en unités de résonance (RU).

Sa représentation au cours du temps est un sensorgramme.



Cette méthode d'analyse permet de calculer les vitesses d'association et de dissociation et d'en déduire les constantes d'affinité caractéristiques de l'interaction.

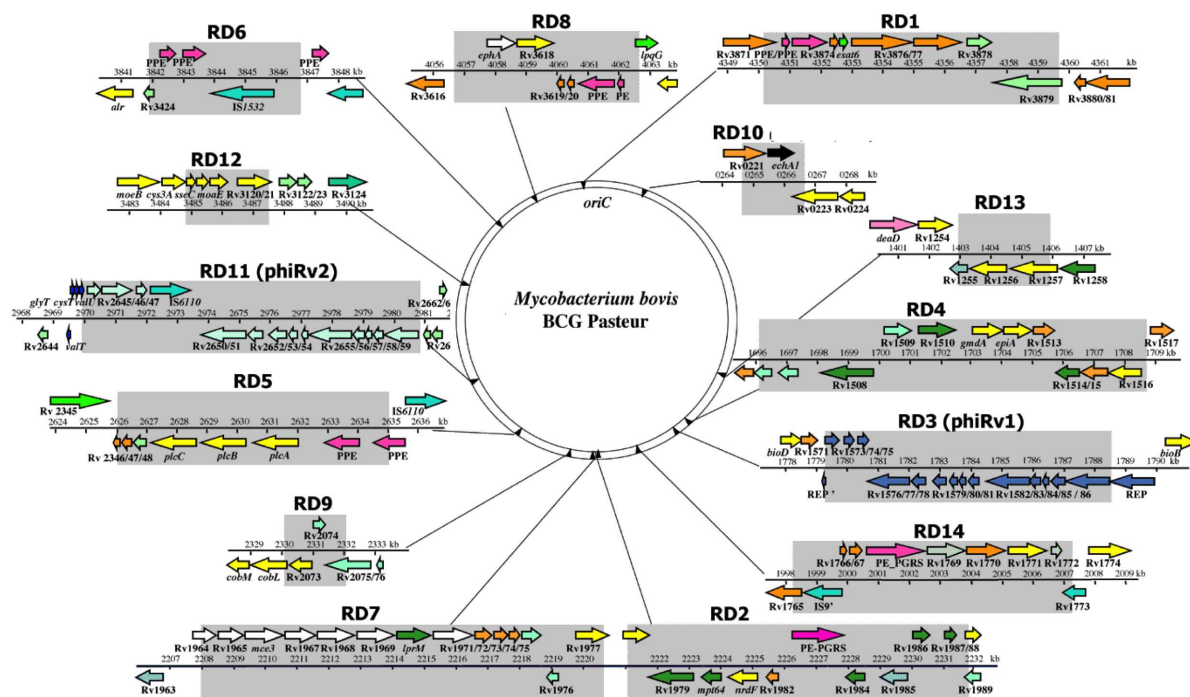
On peut également calculer des concentrations puisque pour une interaction donnée, l'intensité du signal est fonction de la concentration de la molécule injectée. Cette concentration peut être déterminée en utilisant une gamme étalon. Une méthode alternative de calcul repose sur la mesure de la vitesse de diffusion de l'échantillon et ne nécessite pas l'utilisation de gamme étalon.

Les études thermodynamiques de l'interaction sont réalisées en analysant la même interaction à différentes températures. Les constantes de cinétique d'association et de dissociation ainsi obtenues pour chaque température d'analyse vont permettre de calculer les paramètres thermodynamiques. Les paramètres thermodynamiques évalués par cette méthode en SPR sont comparables à ceux obtenus par la méthode de référence, la calorimétrie à titration isothermique.

INRA 2013 :

<http://www6.val-de-loire.inra.fr/paib/Presentation/Laboratoires/Interactions-Moleculaires/Principe-du-Biacore>

Document 24 : les délétions dans le génome du bacille atténué du BCG Pasteur. Elles sont nommées RD pour « région de différence »

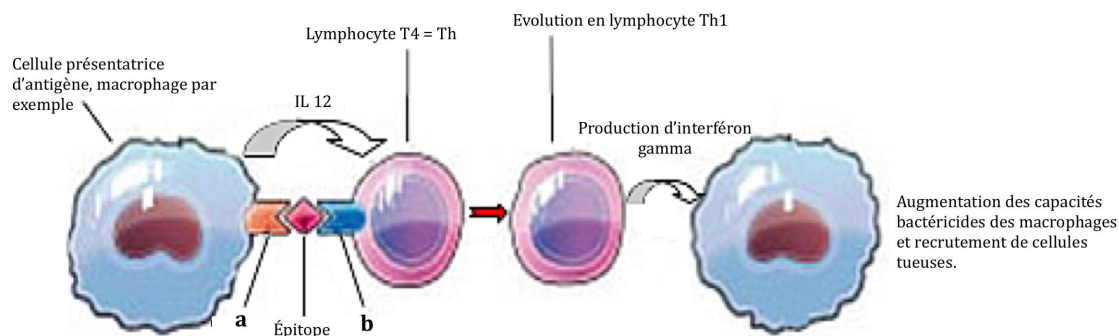


Document 25 : expériences de ré-insertion dans le génome du BCG de certaines « régions de différence » suspectées d'être nécessaires à la virulence de *Mycobacterium tuberculosis*

D'après l'article « Approches moléculaires de la tuberculose » - Inserm

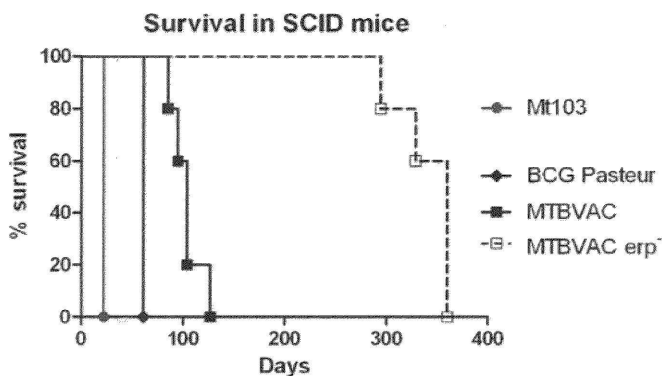
Région de différence ré-insérée dans le BCG	RD1	RD3	RD4	RD5	RD7	RD9
Restauration de la virulence chez des souris immunodéprimées	Oui	Non	Non	Non	Non	Non

Document 26 : point de départ de la réponse immunitaire anti-tuberculeuse (d'après Robbins and Cotran : *Pathologic basis of disease*)

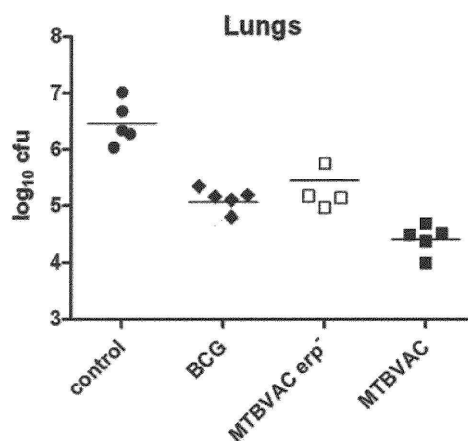


Document 27 : expériences sur la souris (d'après l'article : « hyper-attenuated MTBVACerp mutant protects against tuberculosis in mice »)

Document 27.a : survie des souris après injection de différentes mycobactéries



Document 27.b : nombre de CFU de *M. tuberculosis* dans les poumons de souris « vaccinées » par les différentes souches atténuées



Document 28

Document 28.a : protocole d'analyse d'un échantillon de cellules sanguines mononucléées (PBMC = *peripheral blood mononuclear cells*)

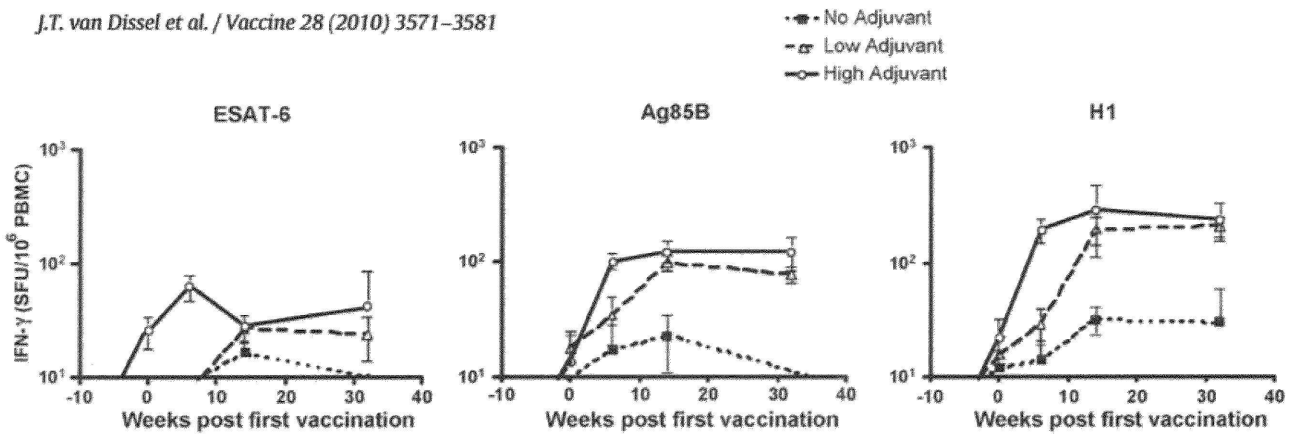
Chaque échantillon est décongelé, lavé puis séparé en trois aliquotes. Une aliquote est incubé en présence de l'hybride H1, une aliquote est incubé en présence de ESAT 6 seule, et la dernière en présence de l'Ag85B seul. Au bout de 12 heures les cellules sont transférées sur une microplaque dont les puits sont tapissés d'anticorps anti IFN γ .

La présence d'IFN γ produit par les cellules testées est détectée grâce à la formation de complexe antigènes-anticorps dans les puits, couplée à une réaction colorée. Chaque puits coloré est un « spot », et les résultats finaux sont exprimés en unités formant spot par million de cellules sanguines mononucléées, soit spot forming units / 10^6 PBMC.

Document 28.b : résultats

Les courbes sont des courbes « moyennes » obtenues à partir des résultats de l'analyse des échantillons sanguins de l'ensemble des membres de chaque groupe.

J.T. van Dissel et al. / Vaccine 28 (2010) 3571–3581



Document 29 : les différents types de vaccins

http://unt-ori2.crihan.fr/unsipi/Concours/2013_Angers_Oger_Goncalves_Boquel_Vaccination/co/hist_def4.html

- Vaccins vivants

Il s'agit de souches d'agents infectieux atténuées ayant perdu tout ou partie de leur virulence par adaptation à une espèce animale nouvelle ou à la culture de cellules. Il s'agit de mutants avirulents ou peu virulents, qu'on a sélectionnés à force de passage en série chez le nouvel hôte (lapin, œufs embryonnés) ou en culture de cellules mais qui ont conservé la propriété de se multiplier chez l'hôte naturel et donc d'y induire une *réponse immunitaire* de longue durée.

En général une seule administration de vaccin vivant atténué suffit pour parvenir à une immunité solide et durable ; il suffit d'inoculer une quantité minimale de vaccin vivant (ce qui n'est pas surprenant puisque l'agent infectieux se multiplie dans l'organisme du sujet qu'on vaccine). Il peut arriver qu'un micro-organisme atténué redevienne pathogène.

- Vaccins tués ou inactivés

Ils sont constitués d'agents infectieux dont on a supprimé toute virulence par inactivation chimique (formol, propiolactone) ou physique (rayonnements ou chaleur). Les micro-organismes inactivés ne sont plus capables de se multiplier, mais leurs protéines constitutives ont conservé leur pouvoir immunogène intact : inoculées à l'animal ou à l'Homme, elles provoquent une réponse immunitaire. Afin d'augmenter l'efficacité des vaccins inactivés, on leur ajoute des adjuvants de l'immunité, notamment de l'alun ou de l'hydroxyde d'alumine. Les vaccins inactivés nécessitent plusieurs inoculations (rappels espacés dans le temps).

- Vaccins sous-unités

Il s'agit de vaccins contenant les antigènes spécifiques de l'agent infectieux après extraction et modification ou fabrication *de novo* :

- vaccins constitués d'anatoxines toxines inactivées chimiquement ou par la chaleur (une toxine ainsi rendue inoffensive est alors fréquemment appelée un « toxoïde » ou plus généralement une « anatoxine »). Le tétanos ou la diphtérie sont deux exemples de maladies dont les symptômes sont dus à des toxines et contre lesquelles on produit des vaccins de cette façon ;
- vaccins constitués d'antigènes capsulaires (polysaccharides) ;
- vaccins recombinants : ils sont obtenus par génie génétique. Le gène codant un antigène donné peut être introduit dans une bactérie, une levure ou une cellule animale, qui vont servir d'« usines biologiques » pour la synthèse de l'antigène. Ces antigènes « recombinants » sont ensuite purifiés et peuvent servir de base à des vaccins moléculaires aussi appelés vaccins sous-unités. Il ne s'agit donc plus ici d'utiliser des germes entiers pour la vaccination, mais uniquement les molécules antigéniques des micro-organismes.

Ce type de vaccin induit le plus souvent une réponse immunitaire de type humoral et stimule faiblement la mémoire immunitaire.