

***Mycobacterium tuberculosis* : quelques aspects de la lutte contre la tuberculose...**

La tuberculose est une maladie infectieuse humaine causée par des mycobactéries du complexe *tuberculosis*, dont la principale est *Mycobacterium tuberculosis*. Elle se manifeste essentiellement sous forme d'infection pulmonaire mais aussi extra-pulmonaire (osseuse, méningée, ganglionnaire et urogénitale).

Elle est actuellement la deuxième cause de décès par infection dans le monde, juste après le SIDA et avant le paludisme : 1,5 million de personnes par an, majoritairement en Asie et en Afrique.

Dans les pays occidentaux l'incidence¹ de la tuberculose est faible, mais la situation pourrait changer suite à l'apparition de souches de *Mycobacterium tuberculosis* multirésistantes ou ultrarésistantes aux antibiotiques (souches MDR : *multidrug resistant*, et XDR : *extensively drug resistant*) et à son caractère social (maladie de la pauvreté et du manque d'hygiène).

Le traitement classique de la tuberculose fait appel à quatre antibiotiques principaux administrés en bi-, tri- ou quadrithérapie : l'isoniazide, la pyrazinamide, l'éthambutol et la rifampicine. Pour être efficace le traitement doit être suivi pendant plusieurs mois. De nombreux malades ne le menant pas à son terme, des souches bactériennes résistantes à un, plusieurs, voire tous les antibiotiques disponibles ont été peu à peu sélectionnées. De nombreuses recherches sont lancées pour découvrir de nouvelles molécules actives.

La prévention de la maladie repose actuellement sur un unique vaccin « historique » mis au point par Calmette et Guérin au début du XXIème siècle : le BCG. Ce vaccin se révèle fréquemment inefficace chez les adultes et dangereux chez les enfants séropositifs pour le VIH. De nouveaux vaccins sont à l'étude afin d'améliorer ou de remplacer le BCG.

Ce sujet va d'abord explorer quelques particularités de *Mycobacterium tuberculosis* ainsi qu'une méthode d'identification de la bactérie, puis il s'intéressera au mode d'action de quelques antibiotiques et se terminera par la vaccination antituberculeuse.

1. *Mycobacterium tuberculosis* une bactérie singulière

La pathogénicité de *Mycobacterium tuberculosis* est liée à sa capacité à se développer dans les macrophages et à échapper aux défenses immunitaires pendant l'infection et pendant son état de dormance. Plusieurs études ont montré le rôle primordial de l'enveloppe de la bactérie dans la virulence² de celle-ci.

1.1. Structure des enveloppes et colorations

1.1.1. Une structure particulière

L'enveloppe des mycobactéries est composée de 4 parties (**document 1**) :

- une membrane plasmique, constituée principalement de phospholipides et de porines, reliée à la paroi par des lipoarabinomannanes (ManLAM) ancrés dans la membrane par des PIM (phosphatidyl-myo-inositol) ;
- une paroi, constituée d'une couche rigide de peptidoglycane reliée aux acides mycoliques de la mycomembrane par un polysaccharide majeur : l'arabinogalactane ;
- une membrane externe appelée mycomembrane constituée d'acides mycoliques (longs acides gras de 70 à 90 atomes de carbone spécifiques des mycobactéries) qui s'organisent, repliés en forme de W, en une monocouche côté externe dans laquelle sont enchâssées des protéines (porines) et sur lesquelles s'ancrent des glycolipides ;
- une capsule, le compartiment le plus externe, constituée principalement de protéines et de polysaccharides.

La comparaison de cette structure particulière aux enveloppes des bactéries plus connues comme *Escherichia coli* (bactérie gram-négative ou gram-) et *Staphylococcus aureus* (bactérie gram-positive ou gram+) est riche d'enseignements (**document 2**).

Q1. Proposer un rapprochement structural argumenté entre les mycobactéries et les bactéries gram+ ou gram- (**documents 1 et 2**).

1.1.2. Des propriétés tinctoriales particulières

Grâce à la présence d'acides mycoliques dans la mycomembrane, l'enveloppe des mycobactéries est imperméable à de nombreuses substances. Cette propriété a été mise à profit pour distinguer les mycobactéries des bactéries usuelles gram+ et gram- grâce à la coloration de Ziehl Neelsen.

La coloration de Gram

La coloration de Gram, développée en 1894 par le médecin danois Christian Gram, est la méthode de coloration la plus largement répandue en bactériologie : elle divise les bactéries en deux classes, les gram+ qui ne sont pas décolorées par l'alcool et les gram- qui le sont (**document 3**).

Pour tenter de comprendre les mécanismes de la coloration de Gram, celle-ci est mise en œuvre dans trois situations particulières :

- 1^{ère} expérience : réalisée sur des bactéries dépourvues de paroi : la coloration ne met en évidence que des corps bactériens roses ;
- 2^{ème} expérience : réalisée sur une suspension de bactéries gram+ et gram-, incubées avec du lysozyme (enzyme qui hydrolyse le peptidoglycane) : la coloration ne met en évidence que des corps bactériens colorés en rose ;

² Pouvoir pathogène d'un micro-organisme, dû à sa capacité d'invasion, d'infection d'un organisme vivant et aux conséquences nocives qu'elle entraîne.

- 3^{ème} expérience : réalisée sur une suspension de bactéries gram+ et gram-, la décoloration par l'alcool étant prolongée pendant 1 minute : tous les corps bactériens sont roses.

Q2. Interpréter chacune de ces expériences.

Q3. Indiquer le nom de la structure moléculaire responsable de la coloration différentielle.

Q4. À l'aide des interprétations faites précédemment, des différences structurales d'enveloppes (**document 2**) et du principe de la coloration de Gram (**document 3**), **émettre** une hypothèse expliquant la différence de perméabilité à l'alcool chez les gram+ et les gram-.

Q5. Sachant que les acides mycoliques rendent l'enveloppe des mycobactéries imperméable à l'alcool, **déduire** la couleur de ces bactéries après une coloration de Gram.

Q6. Comparer cette réponse à celle faite à la question **Q1**.

La coloration de Ziehl Neelsen

La coloration de *Ziehl Neelsen* s'appuie sur la propriété tinctoriale caractéristique de toutes les mycobactéries : l'acido-alcool-résistance liée à la présence de la mycomembrane. Ces bactéries sont appelées Bacilles Acido-Alcool-Résistants (BAAR).

Q7. À l'aide du protocole de la coloration de Ziehl Neelsen (**document 4**), **préciser** dans un tableau (selon le modèle ci-dessous) la couleur des bactéries gram+, gram- et des mycobactéries.

étapes	bactérie gram+	bactérie gram-	mycobactéries
1			
2 et 3			
4			

Q8. Déduire de ces résultats l'intérêt de cette coloration pour la recherche de *M. tuberculosis* dans des prélèvements tels que des crachats.

La mise en évidence de « BAAR » dans un crachat oriente le diagnostic mais ne suffit pas pour conclure à une tuberculose, des études complémentaires doivent être conduites.

Q9. Justifier cette affirmation.

1.2. Une autre singularité : la résistance de *M. tuberculosis* à la phagocytose

La pathogénicité de *M. tuberculosis* est en grande partie liée à la capacité de ce micro-organisme à survivre dans le macrophage au sein du phagosome.

1.2.1. Macrophage et phagocytose

Les macrophages détectent la présence des microorganismes pathogènes et les ingèrent dans un phagosome afin de les éliminer. Au cours de sa maturation, le phagosome acquiert une grande variété de composés, chimiques et enzymatiques, qui permettent de tuer et dégrader les microorganismes phagocytés et de générer des antigènes qui sont présentés au système immunitaire adaptatif.

Le **document 5** présente la structure schématique d'un phagocyte.

Q10. Reporter les lettres a à d sur la copie et **nommer** les structures cellulaires correspondantes.

Q11. Reporter les numéros 1 à 5 sur la copie et **commenter** succinctement les étapes correspondantes.

Le **document 6** détaille les principaux phénomènes observés lors de la maturation du phagosome en phagolysosome.

Q12. Dégager les mécanismes biochimiques et leurs interrelations conduisant à la destruction de la bactérie.

1.2.2. Mécanisme de résistance de *M. tuberculosis* à la maturation du phagosome

L'étude de la résistance de *M. tuberculosis* à la phagocytose a mis en évidence plusieurs molécules mycobactériennes impliquées :

- ManLAM, constitutive de l'enveloppe de la bactérie, qui bloque la synthèse de PIP3 ;
- SapM, protéine sécrétée par la bactérie qui dégrade le PIP3 en PI ;
- PtpA, protéine sécrétée par la bactérie qui induit l'exclusion des v-H⁺.ATPases de la membrane phagosomale.

Q13. Expliquer les mécanismes de résistance à la maturation du phagosome de *M. tuberculosis* en reliant ces données à celles apportées par le **document 6**.

Conclure quant à la conséquence.

1.3. Les conditions culturelles des mycobactéries

L'étude d'un microorganisme nécessite des informations sur les conditions de culture. Les mycobactéries sont des microorganismes exigeants et la mise au point de milieux de culture a été une étape délicate. Le milieu de Middlebrook permet la multiplication de *Mycobacterium tuberculosis*.

1.3.1. Étude d'un milieu de culture pour mycobactéries : le milieu de Middlebrook

Le **document 7** donne la composition d'un milieu de culture utilisé pour le développement de *Mycobacterium tuberculosis*. Il s'agit du milieu de Middlebrook 7H9.

Q14. Schématiser les étapes de la préparation de 1 litre de milieu complet.

Q15. Justifier la nature solide ou liquide du milieu de Middlebrook.

Q16. Justifier la nature synthétique ou empirique du milieu de Middlebrook.

Q17. Identifier la(es) source(s) de carbone présente(s) dans ce milieu.

Q18. Préciser la nature minérale ou organique des sources d'azote présentes dans le milieu complet.

Q19. Nommer la catégorie de biomolécules à laquelle appartient la biotine et la pyridoxine.

Le **document 8** présente les conditions de culture de *M. tuberculosis* sur deux milieux.

Rappel : un milieu minimum est un milieu qui satisfait les besoins élémentaires des microorganismes (source de carbone, source d'azote, source d'énergie).

Q20. Analyser les résultats présentés dans le **document 8** et, à l'aide du **document 9**, **déterminer** les types trophiques de *M. tuberculosis*. **Justifier** la réponse.

Q21. Calculer la concentration massique finale en albumine en g.L⁻¹ (équation aux grandeurs, équation aux unités, équation aux valeurs numériques).

1.3.2. Comparaison de la croissance de *M. tuberculosis* et *M. smegmatis*

Mycobacterium smegmatis est une souche très utilisée en laboratoire de recherche car elle n'est pas pathogène et donc de manipulation aisée contrairement à *M. tuberculosis*.

Les documents 10.a et 10.b présentent les courbes de croissance de ces deux souches de mycobactéries en milieu de Middlebrook 7H9.

Q22. Repérer sur le document 10.b les différentes phases de la croissance et **compléter**, après l'avoir reproduit sur la copie, le tableau suivant :

Phase	Durée	Nom
1		
2		
3		
etc.		

Q23. Extraire du document 10 la vitesse spécifique de croissance μ_{expo} en h^{-1} pour chacune des souches. **Exposer** la démarche suivie.

Q24. Calculer le temps de génération G en heure pour chacune des souches. **Comparer** les valeurs obtenues.

Rappel : le temps de génération représente le temps de doublement de la biomasse bactérienne

$$G = \frac{\ln 2}{\mu_{\text{expo}}}$$

avec :

- G le temps de génération exprimé en h ;
- μ_{expo} la vitesse spécifique de croissance en phase exponentielle exprimée en h^{-1} .

Q25. Déduire des résultats précédents l'intérêt d'utiliser *M. smegmatis* comme modèle expérimental d'étude de *M. tuberculosis*.

2. Identification moléculaire de *M. tuberculosis* et recherche des mutants multi-résistants aux antibiotiques

Il est important de disposer de tests permettant à la fois d'identifier *M. tuberculosis* et de mettre en évidence une résistance à la rifampicine en tant qu'indicateur de multi-résistance.

Ces tests reposent sur une amplification en chaîne par polymérase (ACP) ou « *polymerase chain reaction* » (PCR) en temps réel.

Le document 11 rappelle le principe général de la PCR.

Ces tests, assez complexes, permettent de réaliser en une seule opération, grâce à un module réactionnel, les étapes :

- de traitement de l'échantillon (crachats, lavage broncho-alvéolaire...);
- d'isolement des cellules bactériennes ;
- d'extraction de l'ADN ;
- d'amplification de l'ADN par PCR en temps réel.

Exemple : test Xpert MTB/RIF (Cepheid). Ce test est basé sur l'analyse d'une partie du gène de la sous-unité β de l'ARN polymérase (gène *rpoB*). Cette enzyme est composée de 6 sous-unités $\alpha_2\beta\beta'\omega\sigma$.

Dans ce test, la PCR est suivie par la mesure de la fluorescence au cours des cycles, grâce à un système de sondes qualifiées de « balises moléculaires » dont le principe de fonctionnement est exposé dans les **documents 12.b et 12.c**.

Q26. Préciser le rôle des amorces dans une PCR.

Le **document 13.a** présente la courbe de suivi d'une PCR réalisée avec un seul fluorophore (la sonde C) à partir de l'ADN de *M. tuberculosis* sauvage.

La fluorescence augmente et dépasse un seuil au-delà duquel le signal est considéré comme significatif. Ce seuil de 20 su (su = unité arbitraire) a été déterminé suite à la réalisation de tests complémentaires.

Q27. À partir du **document 13.a déterminer** le nombre de cycles nécessaires pour obtenir cette fluorescence seuil.

Q28. Citer un paramètre initial qui peut décaler ce nombre de cycles seuil. **Justifier** la réponse.

Q29. Schématiser la sonde C en fin d'amplification à une température de 50°C.

Le test XpertMTB/RIF utilise 5 sondes dont le rôle est décrit dans le **document 12**. Ces sondes sont présentes dans le mélange réactionnel de PCR.

Q30. Préciser l'intérêt d'utiliser plusieurs sondes dans ce test.

Plusieurs tests sont réalisés sur différents échantillons, les résultats sont présentés dans les **documents 13.b et 13.c**.

Q31. Justifier les résultats des analyses présentées dans les documents **13.b et 13.c**.

Interpréter l'absence de fluorescence de la sonde D pour *M. tuberculosis* résistant à la rifampicine.

En **déduire** la zone mutée du gène *rpoB* chez cette bactérie.

Le **document 13.d** présente le résultat d'un test effectué sur un crachat X.

Q32. Analyser le résultat de la PCR présenté sur le **document 13.d** et **conclure** quant à la nature de la souche éventuellement présente dans le crachat.

3. Les traitements antibiotiques

3.1. La rifampicine, un anti-tuberculeux de première ligne

Le schéma thérapeutique, inchangé depuis trente ans, comprend :

- deux mois de traitement par quatre antibiotiques (isoniazide, rifampicine, pyrazinamide, éthambutol) ;
- puis quatre mois de traitement supplémentaire par deux antibiotiques (isoniazide, rifampicine).

La durée du traitement est 60 fois plus longue que pour les autres maladies infectieuses bactériennes.

Par ailleurs l'augmentation du nombre de mycobactéries résistantes à plusieurs antibiotiques (isoniazide, rifampicine... *multidrug-resistant*) nécessite d'associer au moins trois médicaments.

Le **document 14** présente les quatre antibiotiques utilisés dans le traitement standard de première ligne de la tuberculose et leurs modes d'action.

Q33. À partir du **document 14**, **classer** les quatre antibiotiques selon la chronologie de leur découverte. **Indiquer** la cible thérapeutique de chacun.

Le **document 15** présente la molécule de rifampicine.

Q34. D'après le **document 15 expliquer** pourquoi la rifampicine peut aisément franchir les membranes cellulaires et ainsi agir sur le bacille tuberculeux intracellulaire.

Pour évaluer l'activité antibiotique de la rifampicine sur *M. tuberculosis*, on peut mesurer la concentration minimale inhibitrice ou CMI.

Rappel : la CMI correspond à la concentration en antibiotique la plus faible qui empêche tout développement bactérien visible dans des conditions standardisées, donc l'apparition d'un trouble ou le développement de colonies.

On peut utiliser la méthode Etest® (Bio-Mérieux) pour déterminer la CMI de la rifampicine pour *M. tuberculosis*.

Les caractéristiques de la méthode Etest® sont détaillées dans le **document 16**.

Le résultat d'un Etest® réalisé sur une souche de *M. tuberculosis* est présenté dans le **document 17**.

Q35. Déterminer la CMI de la rifampicine pour cette souche et **préciser**, en argumentant la réponse, si cette souche est sensible ou résistante à la rifampicine.

La rifampicine agit en inhibant une enzyme, l'ARN polymérase ADN-dépendante.

Le **document 18** présente la structure de cette ARN polymérase et le rôle de ses sous-unités dans la transcription de l'ADN.

Q36. Localiser la transcription de l'ADN au sein d'un organisme procaryote.

Q37. Définir une enzyme.

Dans la nomenclature des enzymes, l'ARN polymérase est caractérisée par les numéros suivants : EC. 2.7.7.6.

Q38. Préciser la signification générale de EC et de ces numéros.

D'après le **document 18.a** les sous-unités β renferment le site actif de l'ARN polymérase.

Q39. Lister, en les ordonnant, les différentes étapes se déroulant dans le site actif d'une enzyme.

Q40. Reporter sur la copie la signification des repères **a, b, c** du **document 18.b**.

La rifampicine se lie à la sous-unité β de l'ARN polymérase par des liaisons hydrogène avec certains acides aminés très proches du site actif, notamment l'histidine en position 526 (H526) comme indiqué sur le **document 19**.

Afin de comprendre le mécanisme d'action de la rifampicine, l'équipe d'Elizabeth A. Campbell de l'université Rockefeller de New York a mis en œuvre l'expérience décrite dans le **document 20**.

Le gène *rpoB* codant la sous-unité β de l'ARN polymérase d'*E.coli* présentant 91% d'homologie avec celui de *M. tuberculosis*, l'ARN polymérase d'*E.coli* est choisie comme modèle dans ces séries d'expériences.

Q41. Écrire la séquence, orientée dans le sens 5'-3', des 14 paires de bases de l'ARN produit, obtenu pour la piste 11 (en absence de rifampicine).

Q42. Expliquer le rôle des expériences correspondant aux pistes de 11 à 15.

Q43. Analyser les résultats des pistes 1 à 5 puis 6 à 10 et en **déduire** un mécanisme d'action possible de la rifampicine.

3.2. La bédaquilline, un nouvel antibiotique

Face à la récurrence de la résistance aux antibiotiques traditionnels et à ses conséquences sanitaires, de nouvelles molécules sont constamment synthétisées et testées dans les laboratoires de recherche pharmaceutique. Elles permettent d'explorer des modes d'action innovants. Parmi ces molécules, la bédaquiline a récemment obtenue (2014) une autorisation de mise sur le marché conditionnelle des instances européennes.

La bédaquiline agit sur l'ATP synthase mycobactérienne, enzyme indispensable à l'approvisionnement énergétique de *M. tuberculosis*.

3.2.1. L'ATP, une molécule énergétique

Il n'y a pas de réserve cellulaire d'ATP si bien qu'il doit être produit en continu afin de couvrir les besoins énergétiques cellulaires.

Q44. Donner la signification de l'abréviation « ATP ».

Q45. Citer la famille biochimique de l'ATP.

Équation et paramètres de l'hydrolyse de l'ATP :



$$K_{\text{eq}} = 2 \cdot 10^5$$

$$\Delta G_1^{\circ} = - 30,5 \text{ kJ/mol (conditions standards)}$$

Q46. Indiquer le sens de la réaction spontanée.

L'hydrolyse de l'ATP est exergonique et les cellules procaryotes comme les cellules eucaryotes utilisent cette propriété pour réaliser des réactions anaboliques endergoniques indispensables à leur existence. Ce mécanisme est appelé couplage énergétique.

Q47. Définir le terme exergonique et **justifier** l'expression « l'hydrolyse de l'ATP est exergonique ».

La réaction de synthèse d'une liaison peptidique entre la méthionine et la phénylalanine chez une bactérie est un exemple de l'utilisation de l'ATP.

Rappel : la liaison peptidique permet la polymérisation des acides aminés en peptides, polypeptides et protéines.

La formation d'une liaison peptidique est endergonique et la valeur de son enthalpie libre de formation est $\Delta G_2^{\circ} \approx 58,6 \text{ kJ.mol}^{-1}$.

Q48. Déterminer le nombre de molécules d'ATP hydrolysées nécessaires pour que la formation d'une liaison peptidique devienne thermodynamiquement possible.

Remarque : les données de l'énoncé sont mesurées dans les conditions standards. Les conditions standards permettent la comparaison entre différents systèmes biologiques, les conditions physiologiques sont éminemment différentes et ne sont pas prises en compte ici.

3.2.2. Bédaquiline et ATP synthase

Pour mettre en évidence la cible moléculaire de la bédaquiline, des mutants naturellement résistants à cet antibiotique ont été sélectionnés et leurs génomes entièrement séquencés (Andries, Verhasselt et al. 2005). Les différences notables résident au niveau du gène *atpE* codant pour la sous-unité c de l'ATP synthase (**document 21**). L'une de ces mutations est appelée D32V chez *M. smegmatis*.

Le **document 21** montre la structure de l'ATP synthase mycobactérienne ainsi que les résultats de l'inhibition de celle-ci par la bédaquiline (R207910) sur des souches sauvages et mutantes de *M. smegmatis*. L'isoniazide et la rifampicine sont des antibiotiques qui n'agissent pas sur l'ATP synthase.

Q49. Montrer à l'aide du **document 21** que la mutation présente chez *M. smegmatis* n'est pas silencieuse.

Q50. Préciser l'intérêt des essais réalisés avec l'isoniazide, la rifampicine et le DCCD (**document 21**).

Q51. À l'aide du **document 21**, **analyser** puis **interpréter** les résultats obtenus avec la bédaquiline.

Q52. Expliquer, à partir de l'analyse des **documents 22 et 23**, en quoi la technique du Biacore permet de confirmer l'interaction de la sous-unité c avec la bédaquiline.

Q53. En s'appuyant sur les réponses aux questions précédentes, **proposer** une explication brève à l'effet bactéricide que la bédaquiline exerce sur *M. tuberculosis*.

4. La vaccination

L'existence de souches de *M. tuberculosis* multirésistantes ou extrêmement résistantes aux antibiotiques, ainsi que la lourdeur des traitements curatifs proposés ne permettent pas d'envisager une diminution de l'incidence de la tuberculose sans la mise au point de vaccins préventifs efficaces.

Actuellement le seul vaccin autorisé est le BCG. Le BCG protège les jeunes enfants contre les formes méningées et les formes disséminées de la maladie avec une efficacité de 85 % et la protection des adultes contre les formes pulmonaires ne dépasse pas 50 %. De nombreuses recherches sont donc en cours pour créer de nouveaux vaccins visant à remplacer le BCG ou bien à renforcer son efficacité.

4.1. Le BCG, vaccin contenant le bacille de Calmette et Guérin

Tous les vaccins BCG actuels dérivent d'une souche originelle de *Mycobacterium bovis* dont les biologistes Albert Calmette et Camille Guérin réussirent à atténuer la virulence par 230 « repiquages » successifs en milieu bilié. La première vaccination d'un humain date de 1921. Les ADN de *M. tuberculosis* et de *M. bovis* sont similaires à plus de 99,9 %.

La vaccination consiste à introduire dans un organisme une préparation d'antigènes du microorganisme infectieux, rendue inoffensive, dans le but de déclencher une réaction immunitaire qui protégera contre une éventuelle infection naturelle.

Q54. Définir la notion d'antigène.

Q55. Expliquer pourquoi l'injection du BCG peut protéger d'une infection par *M. tuberculosis*.

La perte de virulence du BCG par rapport à *M. tuberculosis* et *M. bovis* est liée à des délétions successives dans son génome. Le **document 24** montre les différentes délétions présentes dans le génome de la souche Pasteur du BCG.

Q56. Définir une délétion.

Des expériences de ré-insertion de gènes dans des souches de BCG ont été menées pour savoir quelles étaient les zones ayant subi des délétions les plus importantes pour la virulence de *M. tuberculosis*. Les résultats sont reportés dans le tableau du **document 25**.

Q57. Interpréter ces résultats.

4.2. Études de deux « candidats vaccins »

Plusieurs vaccins potentiels sont en cours d'évaluation. Les essais doivent montrer que le vaccin n'est pas nocif pour la santé, qu'il entraîne bien une réponse immunitaire et que cette réponse permet de résister à une infection par *M. tuberculosis*.

4.2.1. Type de réponse immunitaire recherchée

La réponse immunitaire la plus efficace contre la tuberculose est la réponse spécifique à médiation cellulaire. Elle met en jeu différents types de cellules qui interagissent soit par contact membranaire soit grâce à des molécules messagères nommées cytokines.

Le **document 26** présente les coopérations cellulaires nécessaires à la réponse anti-tuberculeuse.

Q58. Nommer les deux éléments notés **a** et **b** sur le schéma.

4.2.2. Vaccin composé d'une souche de *M. tuberculosis* hyper-atténué

L'injection du BCG à des enfants infectés par le virus du SIDA peut aggraver l'immunodéficiency et entraîner une dissémination systémique du bacille. L'OMS déconseille donc la vaccination BCG dans ce contexte.

Pour essayer de développer un vaccin ne présentant pas ce risque, des chercheurs ont travaillé sur une souche de *M. tuberculosis* dont la virulence est atténuée par des mutations sur deux gènes nécessaires à la mise en place de certains lipides de paroi. Cette souche mutée est appelée MTBVAC.

À partir de cette souche les scientifiques ont créé un bacille tuberculeux hyper-atténué, grâce à une mutation supplémentaire dans le gène *erp* codant pour une protéine impliquée dans la multiplication intracellulaire de *M. tuberculosis*. Cette souche hyper-atténuée est appelée MTBVAC_{erp⁻}.

- Première expérience : pour savoir comment un organisme immunodéprimé réagit aux différentes souches de mycobactéries, on a injecté à des souris SCID (*severe combined immunodeficiency*), souffrant d'une grave immunodéficiency, soit MTBVAC, soit MTBVAC_{erp⁻}, soit le BCG, soit Mt103 souche virulente de *M. tuberculosis*. Le **document 27.a** montre les durées de survie des lots de souris après injection.
- Deuxième expérience : pour savoir si l'injection d'une des souches vaccinales peut conférer une protection contre une contamination ultérieure par *M. tuberculosis*, des lots de souris normales reçoivent d'abord une injection de MTBVAC, ou de MTBVAC_{erp⁻}, ou de BCG, ou de sérum physiologique (contrôle). Quatre semaines plus tard chaque souris est infectée par environ 10³ CFU (*colony forming unit*) de mycobactéries virulentes.

Un mois après, les souris sont sacrifiées, les poumons sont prélevés sur chacune d'elles, et les « unités formant colonie » (CFU) de *M. tuberculosis* virulente sont dénombrées. Les résultats figurent sur le **document 27.b**.

Q59. Présenter une analyse synthétique des résultats des expériences décrites dans le document 27.

Q60. En déduire s'il est envisageable de remplacer le BCG par MTBVAC ou MTBVACerp^r pour vacciner des enfants porteurs du VIH.

4.2.3. Vaccin « sous-unités protéiques »

Une autre possibilité de vaccin consisterait à injecter des fragments antigéniques purifiés de *M. tuberculosis*. Un « candidat vaccin » contenant un mélange protéique Ag85B-ESAT6 est en début d'essais cliniques chez l'homme. Ces protéines possèdent de nombreux épitopes reconnus par les lymphocytes, induisant une forte production d'interféron gamma (IFN γ) chez l'animal.

Le nombre de lymphocytes producteurs d'IFN γ peut servir d'indicateur pour évaluer l'efficacité d'une réponse immunitaire après vaccination (**document 26**).

Le but du premier essai sur l'être humain était de vérifier l'innocuité du vaccin et de savoir si un adjuvant était nécessaire dans la formulation et, si oui, à quelle dose.

Rappel : Adjuvant = molécule qui renforce l'efficacité de la réponse immunitaire à un antigène.

Trois formulations ont été testées :

- un vaccin contenant seulement des protéines résultant de la fusion de Ag85B et de ESAT6 (protéines hybrides nommées H1) ;
- un vaccin contenant H1 et l'adjuvant IC31 à faible dose ;
- un vaccin contenant H1 et l'adjuvant IC31 à forte dose.

Chaque mélange a été injecté à un groupe de volontaires en bonne santé, non contaminés par le bacille tuberculeux et non vaccinés par le BCG.

Chaque personne a reçu une première injection de vaccin au jour 0, puis une deuxième injection du même vaccin 2 mois plus tard.

Les trois formulations sont très bien tolérées.

Des prélèvements de sang de chaque sujet ont été pratiqués à des dates précises, les cellules mononucléaires sanguines ont été isolées, lavées et congelées pour que toutes les analyses soient faites en même temps, soit J0 + 8 mois.

Le protocole d'analyse permettant de dénombrer les cellules sécrétrices d'IFN γ ainsi que les résultats obtenus pour les trois types de vaccins sont présentés sur le **document 28**.

Q61. Nommer les cellules désignées par l'expression « cellules mononucléaires sanguines ».

Q62. À l'aide du **document 28**, et des connaissances personnelles, **expliquer** les phénomènes biologiques se déroulant durant l'incubation des cellules prélevées en présence des différents antigènes.

Q63. À partir de l'analyse des courbes obtenues après incubation des échantillons avec H1, **discuter** l'intérêt de l'adjuvant et de sa dose.

Q64. Désigner la protéine la plus immunogène du vaccin.

4.2.4. Avantages et inconvénients des deux types de vaccins

Le **document 29** résume certaines caractéristiques des différents types de vaccins utilisés pour prévenir les maladies infectieuses.

À l'aide des informations du **document 29**, reproduire et **compléter** le tableau suivant :

	Vaccin MTBVAC ou MTBVAC erp-	Vaccin Ag85B-ESAT6 avec IC31
Type de vaccin		
Principaux avantages		
Principaux inconvénients		