

## CONCOURS GÉNÉRAL DES LYCÉES

—

SESSION 2016

—

**BIOTECHNOLOGIES**

(Classes de terminale STL)

PREMIÈRE PARTIE

Durée : 5 heures

*L'usage du dictionnaire « anglais-français » est autorisé***Consignes aux candidats**

- Ne pas utiliser d'encre claire
- N'utiliser ni colle, ni agrafe
- Numéroté chaque page en bas à droite (numéro de page / nombre total de pages)
- Sur chaque copie, renseigner l'en-tête + l'identification du concours :

Concours

C	G	L
---	---	---

Section/Option

B	I	O	T	E
---	---	---	---	---

Epreuve

0	0	1	0	1
---	---	---	---	---

Matière

B	I	O	T
---	---	---	---







## ***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* (*M. 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'incidence<sup>1</sup> 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 virulence<sup>2</sup> 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.

1. L'incidence d'une maladie est une évaluation statistique du risque, pour une personne ou une catégorie de personnes, de développer cette maladie. L'incidence est une des branches de l'épidémiologie. Elle se base sur des études statistiques.

<sup>2</sup> 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.

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<sup>ère</sup> expérience : réalisée sur des bactéries dépourvues de paroi : la coloration ne met en évidence que des corps bactériens roses ;
- 2<sup>ème</sup> expérience : réalisée sur une suspension de bactéries gram+ et gram-, incubées avec du lysozyme (enzyme qui catalyse l'hydrolyse du peptidoglycane) : la coloration ne met en évidence que des corps bactériens colorés en rose ;
- 3<sup>ème</sup> 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 **décrire** 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<sup>+</sup>.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 appartiennent 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 micro-organismes (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  $\text{g.L}^{-1}$  (équation aux grandeurs, équation aux unités, équation aux valeurs numériques) du milieu Middlebrook ADC.

### 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  $\mu_{\text{expo}}$  en  $\text{h}^{-1}$  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 ;
- $\mu_{\text{expo}}$  la vitesse spécifique de croissance en phase exponentielle exprimée en  $\text{h}^{-1}$ .

**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  $\beta$  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. Indiquer** 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.** A l'aide du **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 sa 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 des numéros associés.

D'après le **document 18.a** les sous-unités  $\beta$  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  $\beta$  de l'ARN polymérase par des interactions 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  $\beta$  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 bédaquiline, 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 :**



$$K_{\text{eq}} = 2 \cdot 10^5 \qquad \Delta G_1^{\circ} = - 30,5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \text{ (conditions standards)}$$

**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 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 par contact membranaire et 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'immunodéficience 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 MTBVACerp<sup>-</sup>.

- 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 immunodéficience, soit MTBVAC, soit MTBVACerp<sup>-</sup>, 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 MTBVACerp<sup>-</sup>, ou de BCG, ou de sérum physiologique (contrôle). Quatre semaines plus tard chaque souris est infectée par environ 10<sup>3</sup> CFU (*colony forming unit*) de mycobactéries virulentes.

Un mois plus tard, les souris sont sacrifiées, les poumons prélevés sur chacune d'elles, et les « unités formant colonie » (CFU) de *M. tuberculosis* virulente 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<sup>-</sup> 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'humain. Ces protéines possèdent de nombreux épitopes reconnus par les lymphocytes, induisant une forte production d'interféron gamma (IFN $\gamma$ ) chez l'animal.

Le nombre de lymphocytes producteurs d'IFN $\gamma$  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 $\gamma$  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.

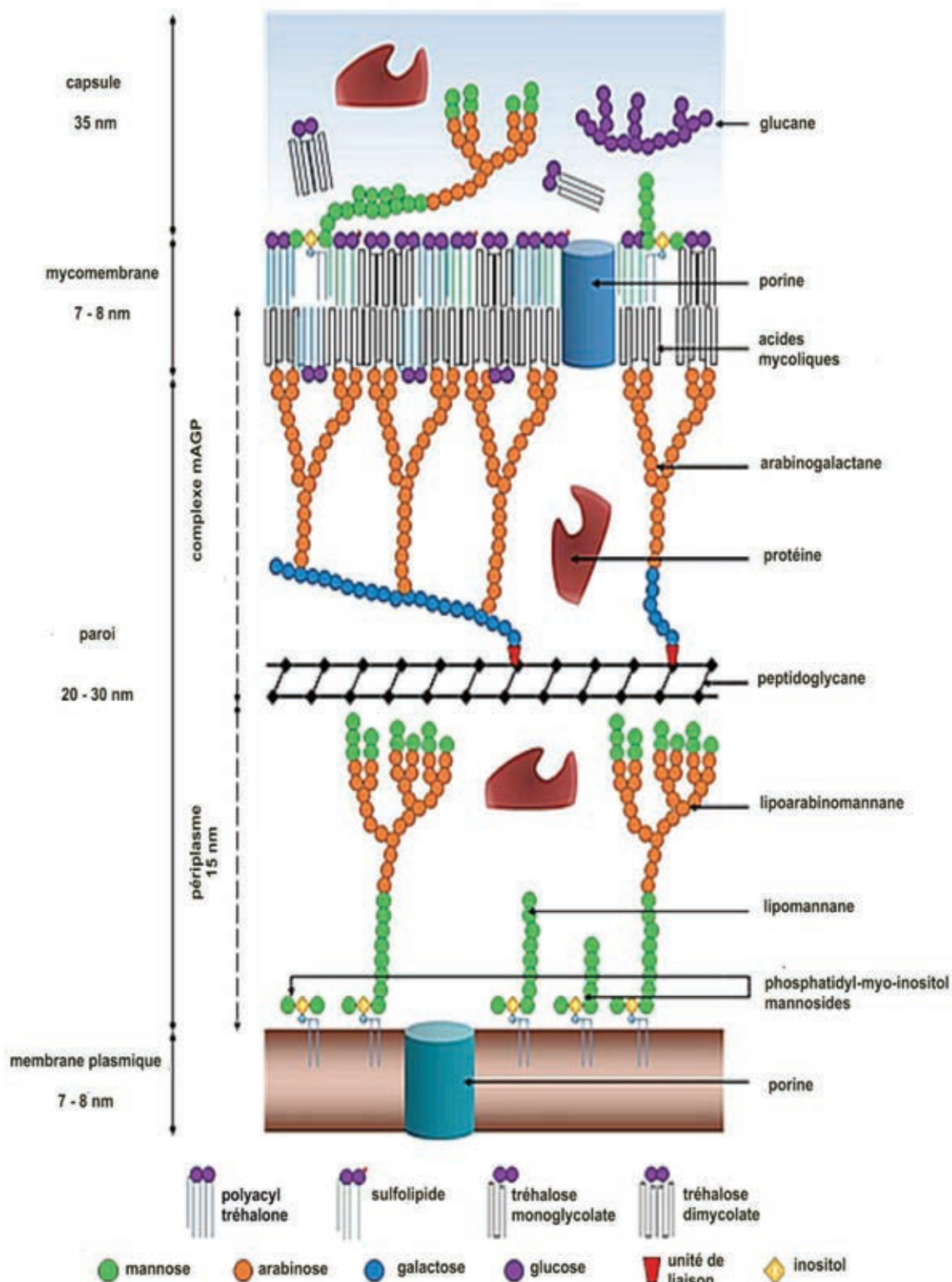
**Q65.** À l'aide des informations du **document 29**, reproduire et **compléter** le tableau suivant :

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



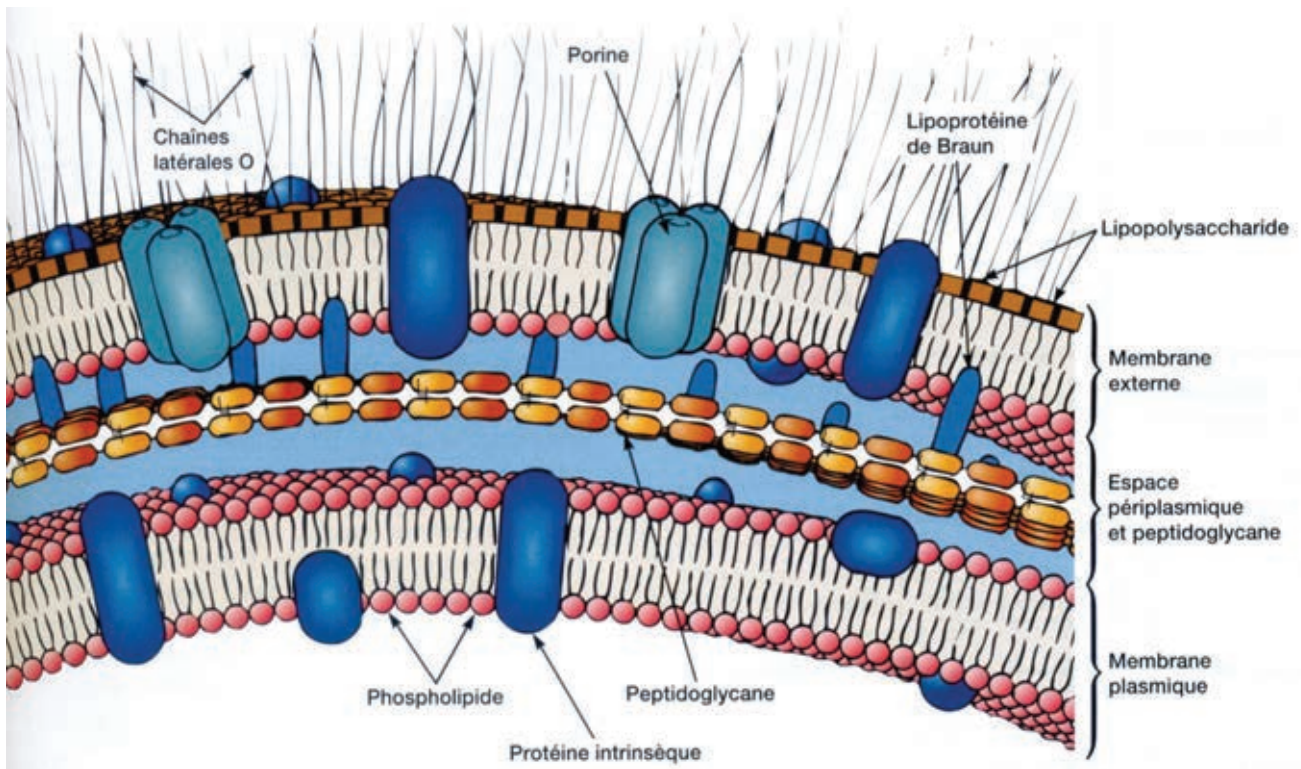
## ANNEXES

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

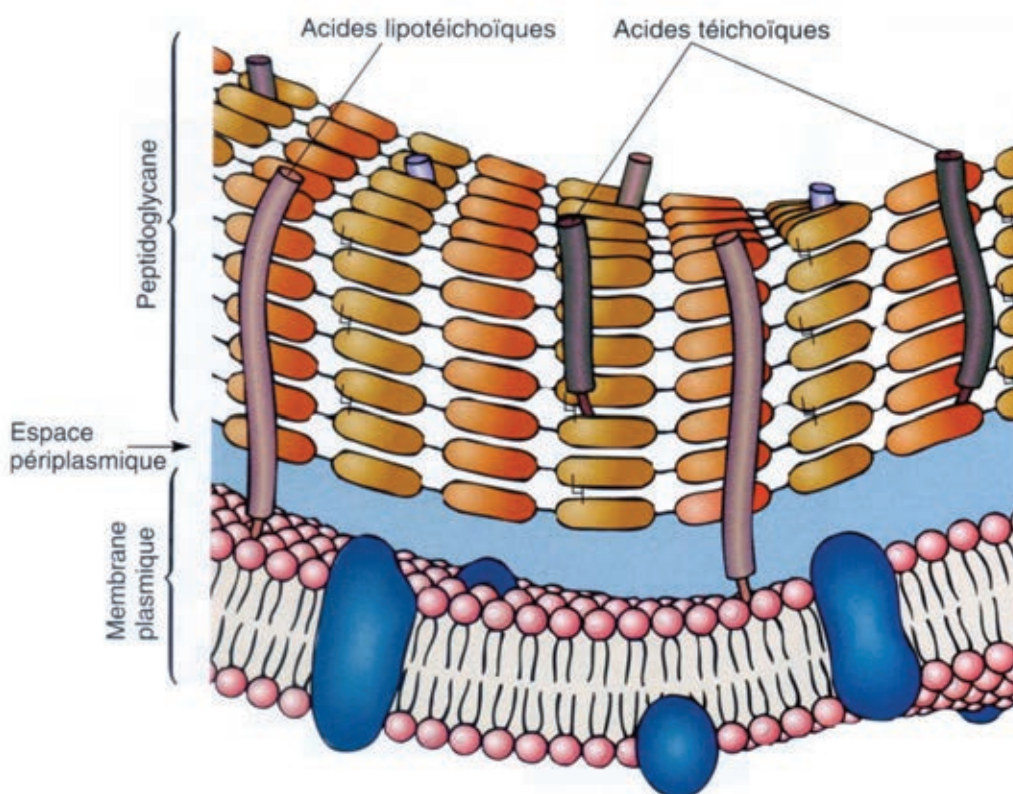


**Document 2** : structure schématique de l'enveloppe d'une bactérie Gram+ et d'une bactérie Gram- (*Microbiologie, Prescott-Harley-Klein, éd. de boeck*)

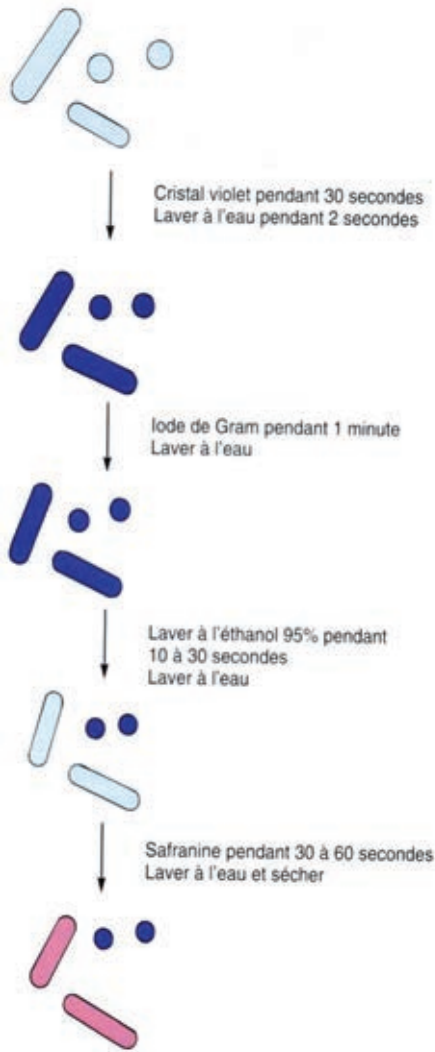
**2.a : l'enveloppe des bactéries gram-**



**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

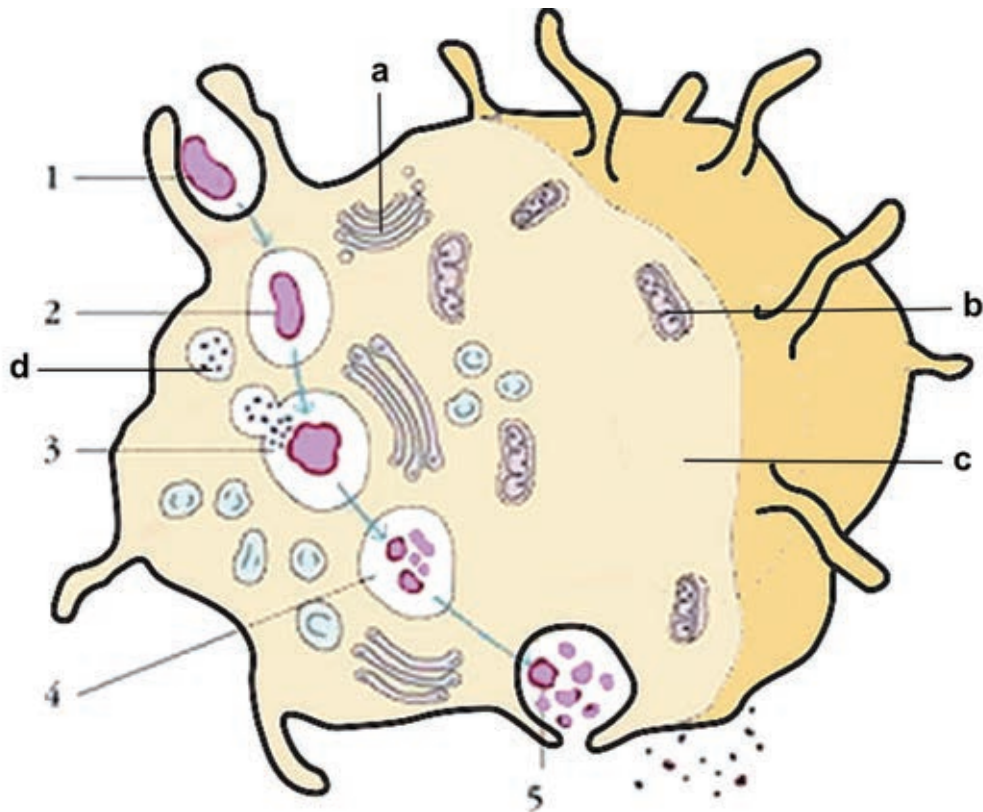
Le frottis observé au microscope à l'objectif X100 à l'immersion montre des bactéries colorées en violet, dites gram+ et des bactéries colorées en rose, dites gram-.

**Document 4 :** coloration de Ziehl Neelsen

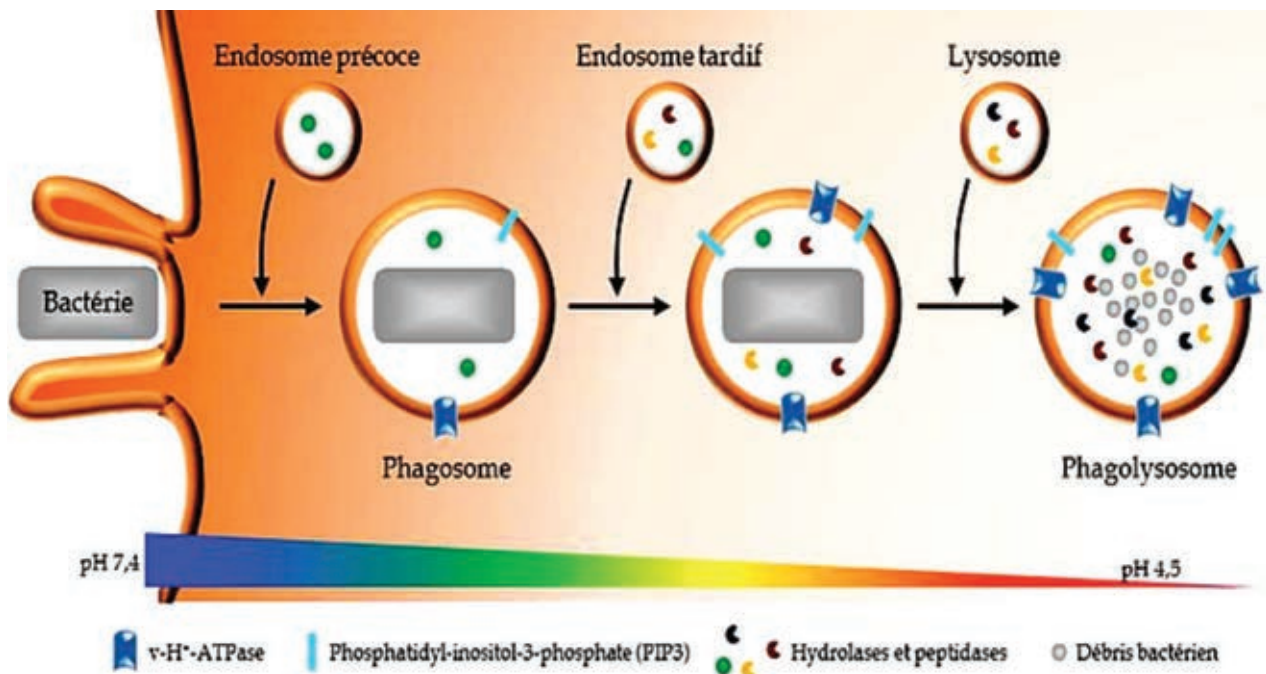
Étapes	Mode opératoire
1	Couvrir le frottis de fuchsine phéniquée (colorant rose), chauffer progressivement jusqu'à émission de vapeur pendant 10 minutes, rincer à l'eau
2	Recouvrir le frottis d'acide sulfurique à 25% pendant 3 minutes, rincer à l'eau
3	Couvrir d'alcool à 90° pendant 5 minutes, rincer 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<sup>+</sup>.ATPase** : pompe à protons permettant l'accumulation des protons (H<sup>+</sup>) 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

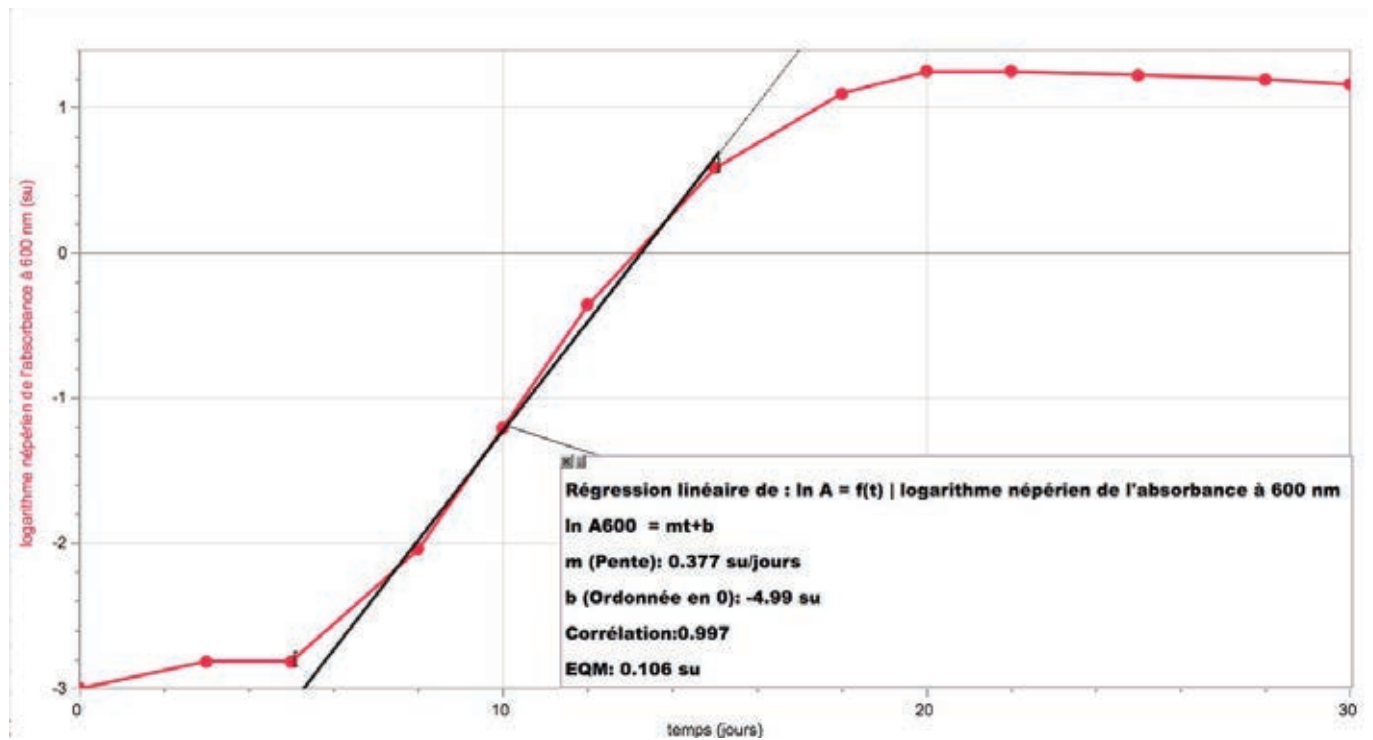
Milieu	Middelbrook 7H9	Milieu minimum
Température d'incubation	35°C	35°C
Durée	2 semaines	2 semaines
Source lumineuse	Non	Oui (étuve éclairée)
Turbidité à 600 nm	0,853	0,007

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

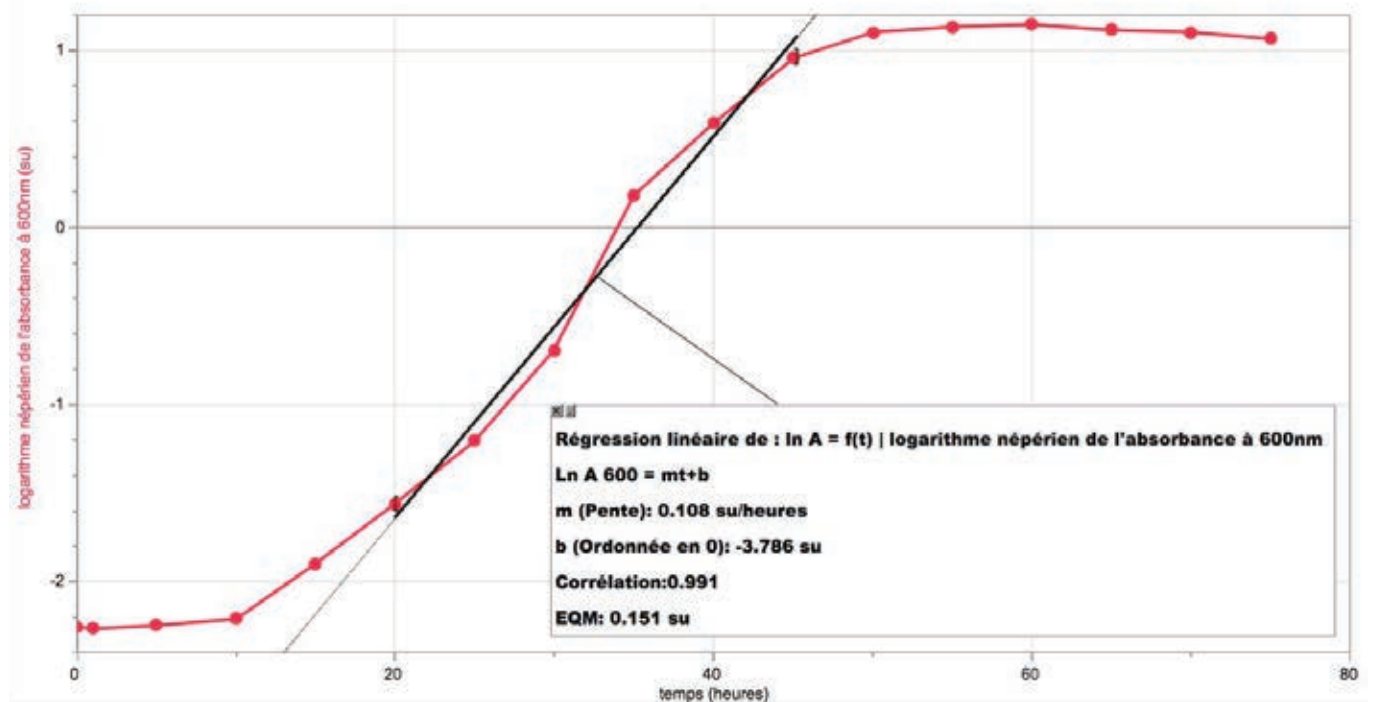
Classe du besoin	Nature du besoin	Type trophique
Source d'énergie	Rayonnement lumineux	Phototrophe
	Oxydation de composés organiques ou inorganiques	Chimiotrophe
Source de carbone	Minérale	Autotrophe
	Organique	Hétérotrophe
Facteurs de croissance	Nécessaire	Auxotrophe
	Non nécessaire	Prototrophe

**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





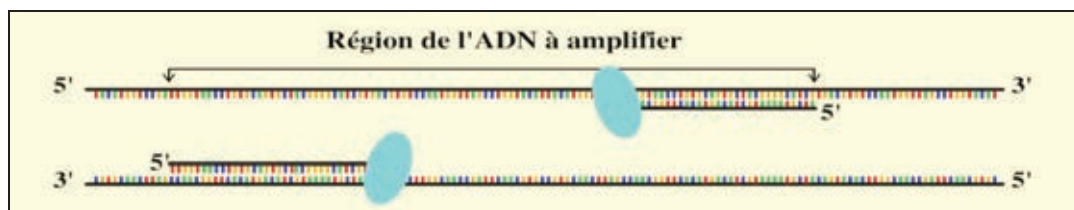
## Document 11 : principe général de l'ACP (ou PCR)

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.

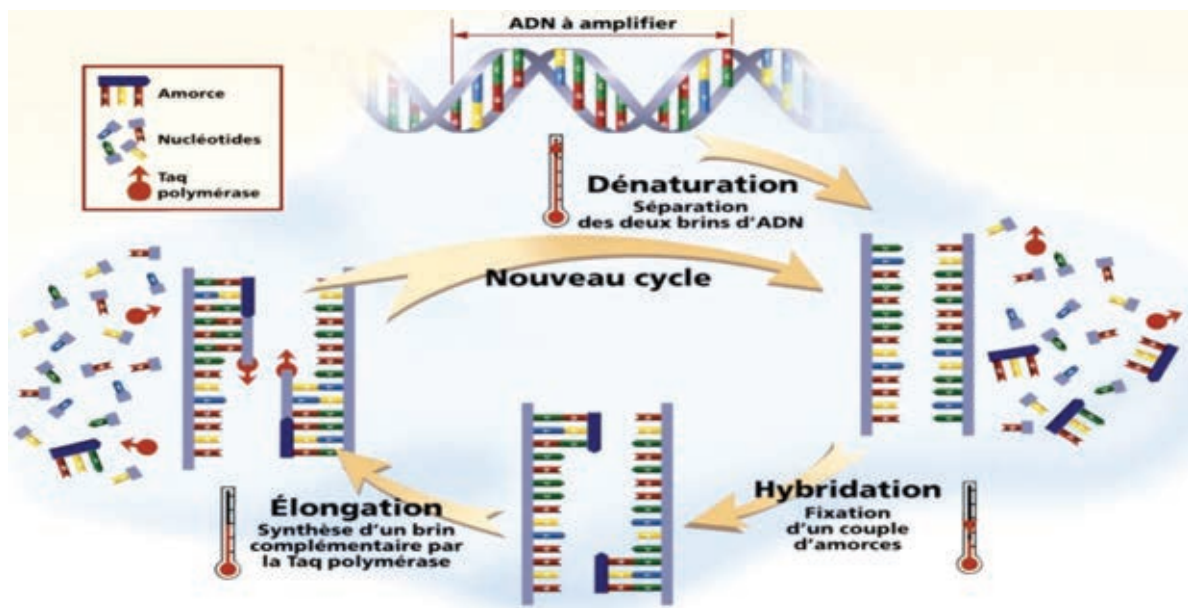
Le tout dans un milieu tamponné permettant d'optimiser l'ensemble des réactions.

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.

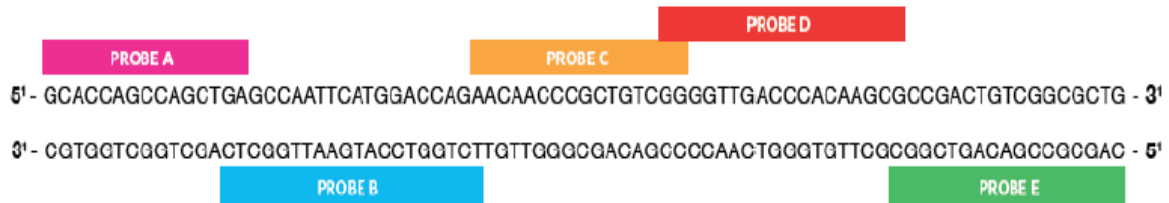


D'après : <http://www.gnis-pedagogie.org/biotechnologie-biologie-amplification-fragment-adn.html>

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)

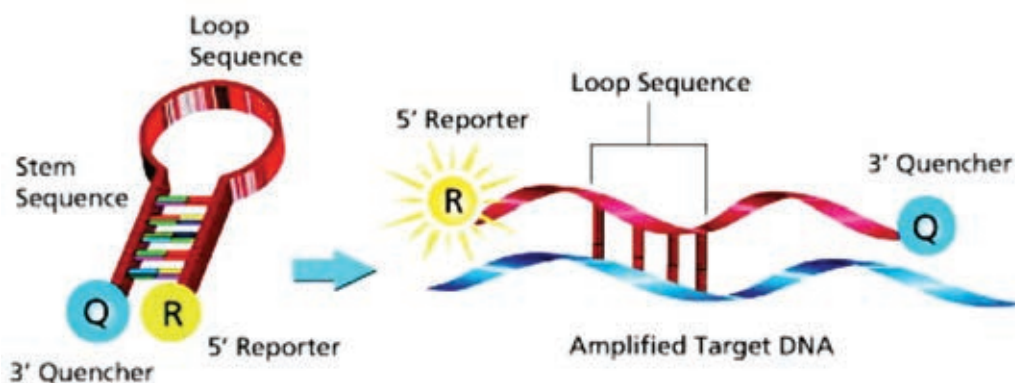
### 12.b : les sondes (« probe »)

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](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>

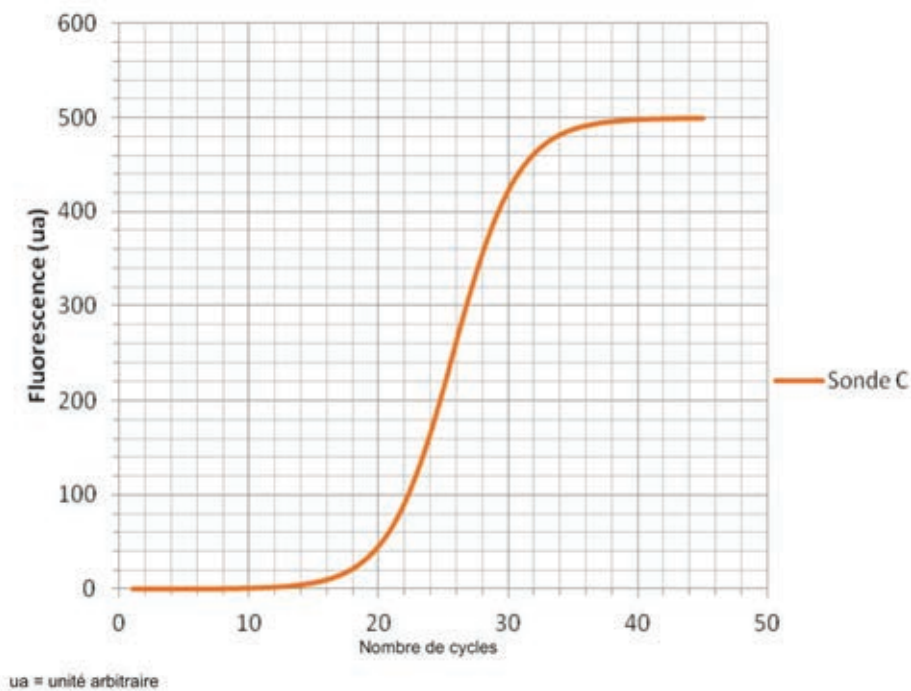
Chaque sonde (A, B, C, D ou E) porte un fluorophore (« Reporter ») différent dont les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont spécifiques

**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

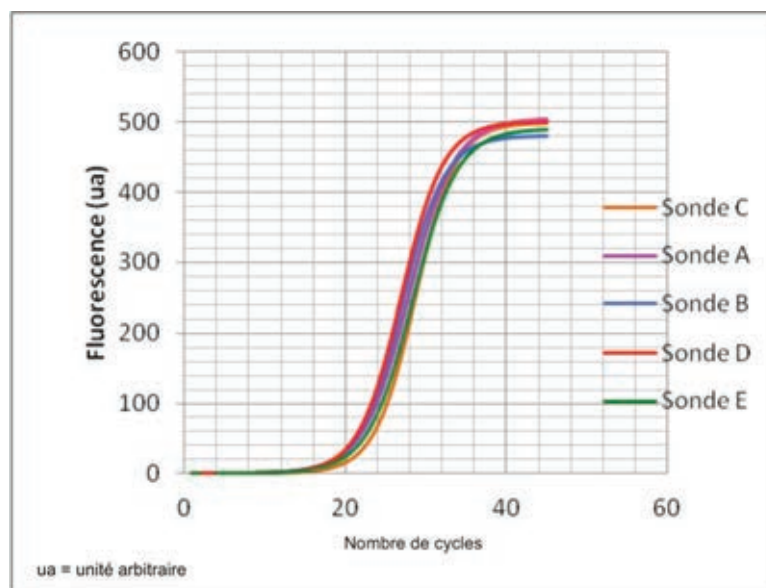
Analyse : PCR en temps réel, détection des amplicons (fragments d'ADN amplifiés) à l'aide de la sonde C



**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

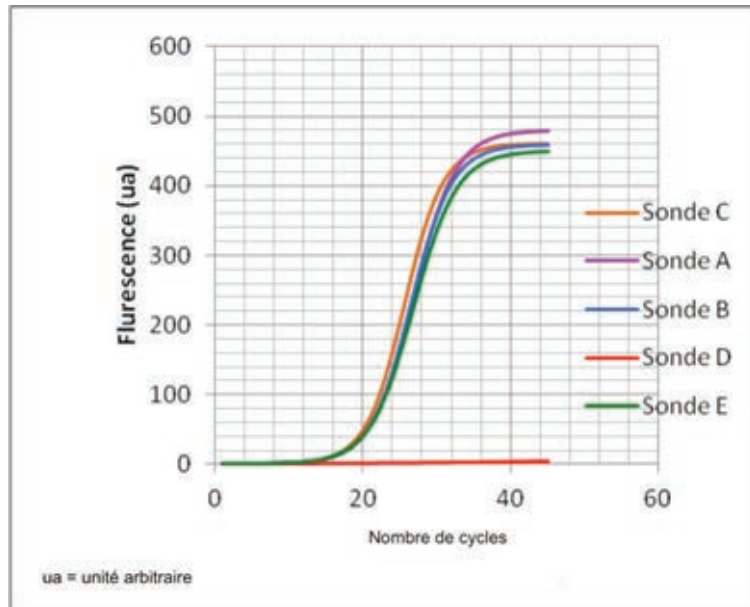




**13.c** : Échantillon : crachat

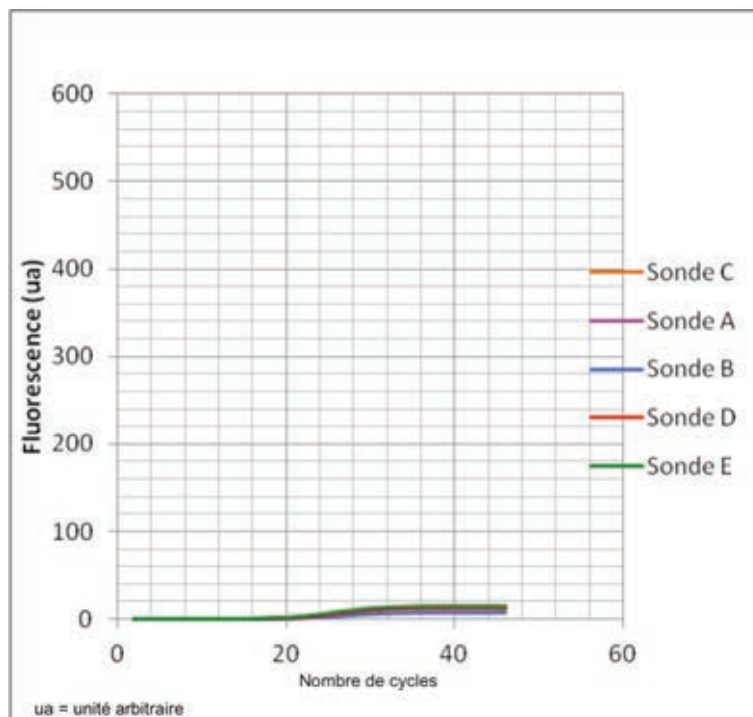
Analyse : PCR en temps réel, détection des amplicons à l'aide des 5 sondes A, B, C, D et E

Résultat : *Mycobacterium tuberculosis* résistant à la rifampicine

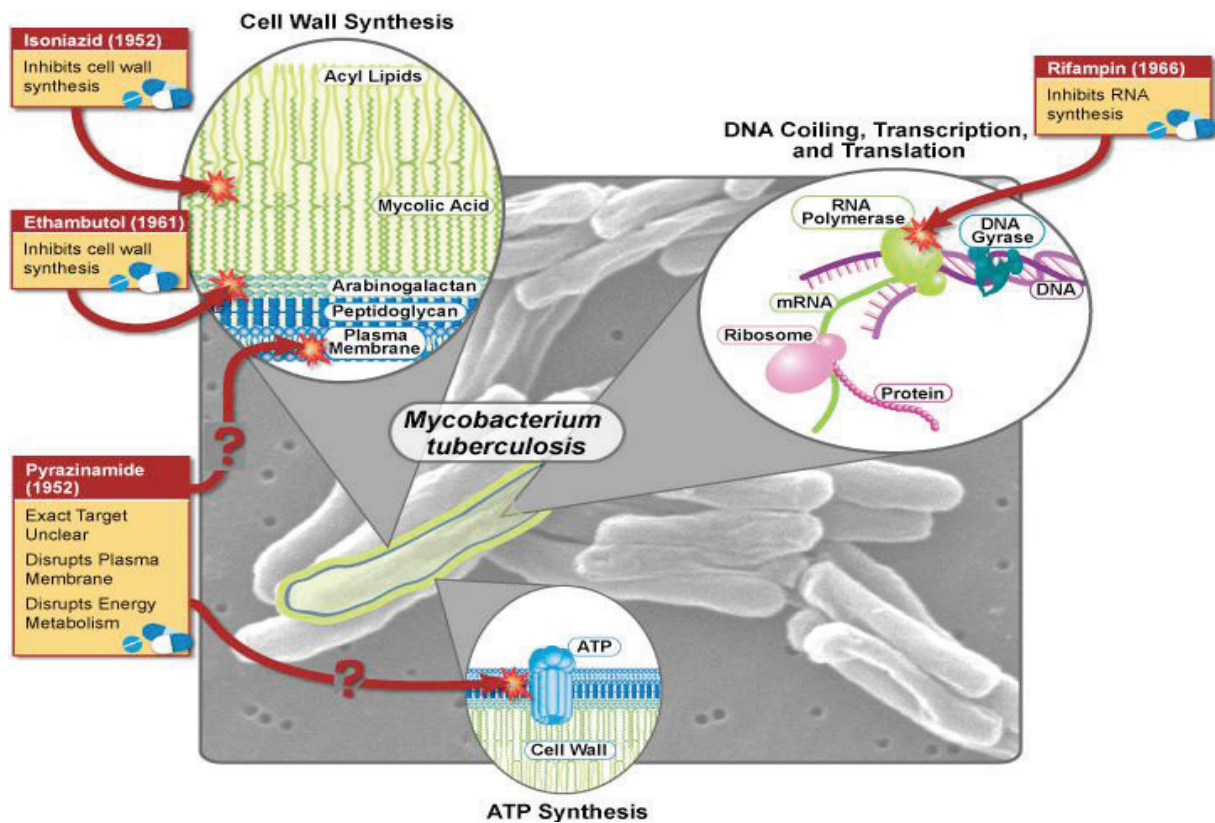


**13.d** : Échantillon : crachat X

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

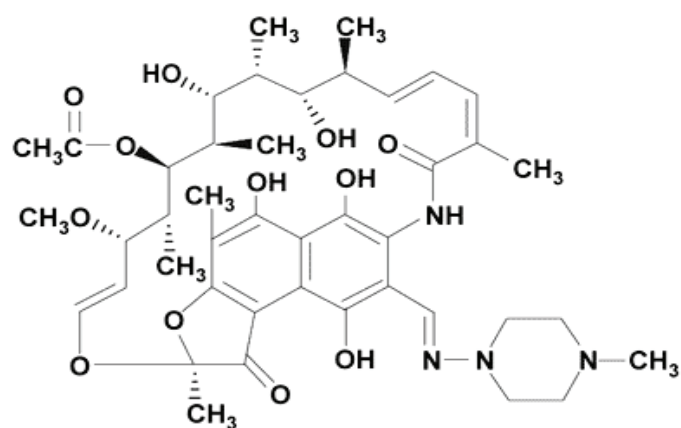


## Document 14 : mode d'action des quatre anti-tuberculeux standards



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 préalablement ensemencé 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.

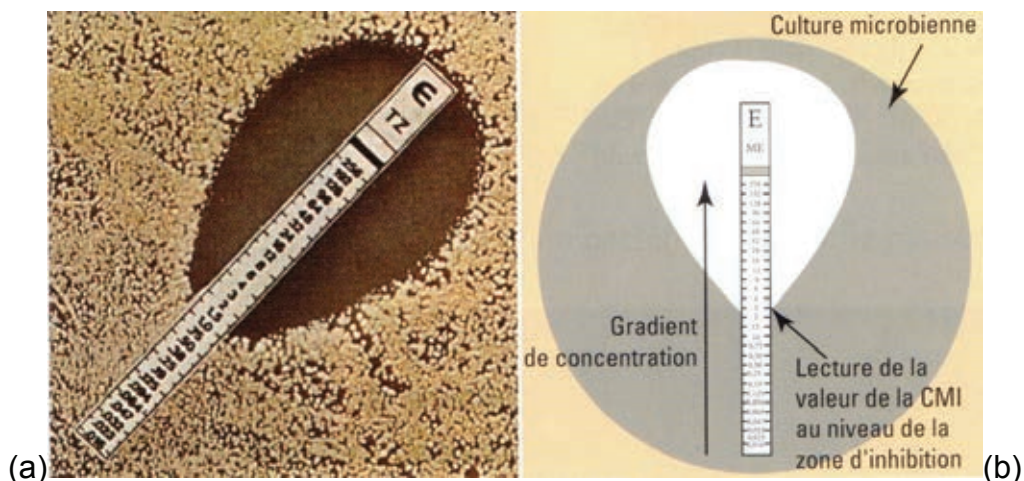


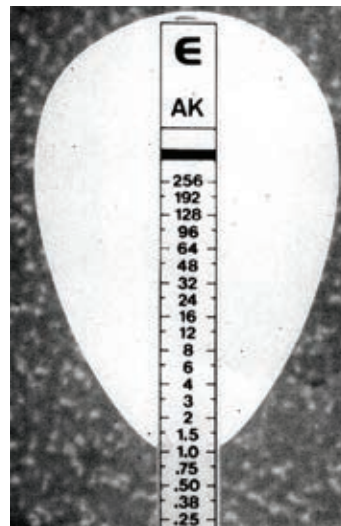
Photo de résultat d'un Etest® (a) et schéma du résultat d'un Etest® dans une boîte de Petri 90mm. D'après Microbiologie technique - Tome1, JN. Joffin et G.Leyral, édition 2009

### 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	$\text{CMI} < 0,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$	$\text{CMI} \geq 7,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$

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



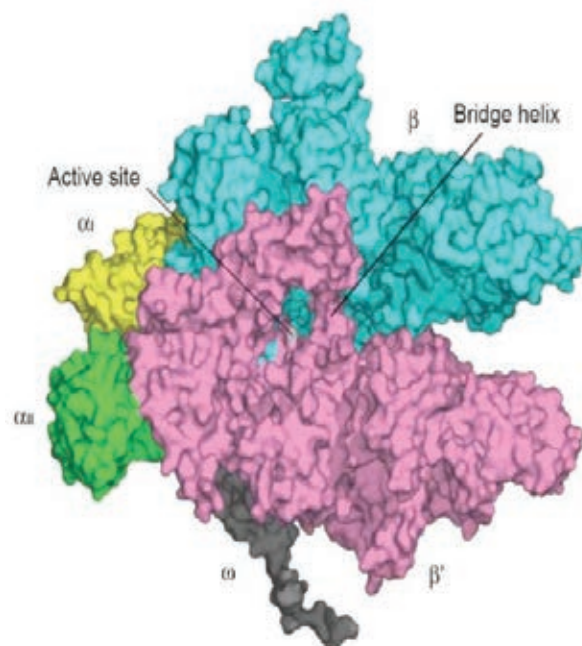
**Document 18** : présentation de l'ARN polymérase ADN dépendante

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

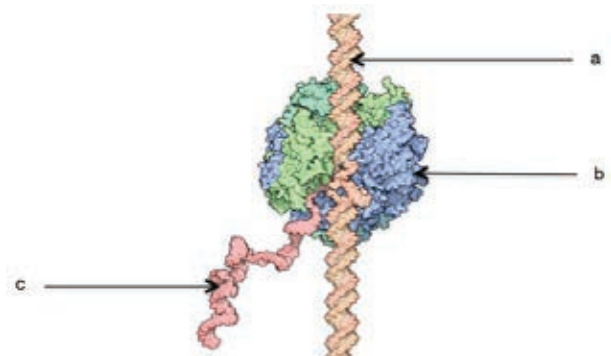
L'ARN polymérase bactérienne est un complexe enzymatique constitué de 6 sous-unités : 2  $\alpha$  ;  $\beta$  ;  $\beta'$  ;  $\sigma$  et  $\omega$ .

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  $\sigma$  se fixe sur l'ADN et recrute les autres parties du complexe enzymatique. Les deux sous-unités  $\alpha$  permettent de maintenir le brin d'ADN non-transcrit à l'écart. Les sous-unités  $\beta$  contiennent le site actif de l'enzyme. La sous-unité  $\omega$  participe à la liaison de l'enzyme sur la matrice d'ADN. Une fois l'ARN polymérase mise en place, la sous-unité  $\sigma$  se détache du complexe et  $\beta'$  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

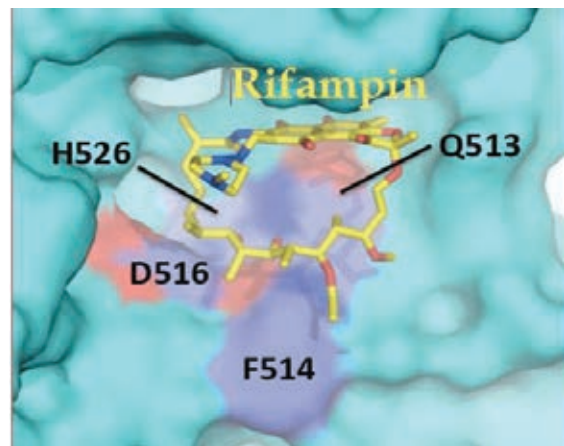




**Document 19** : complexe ARN polymérase-rifampicine

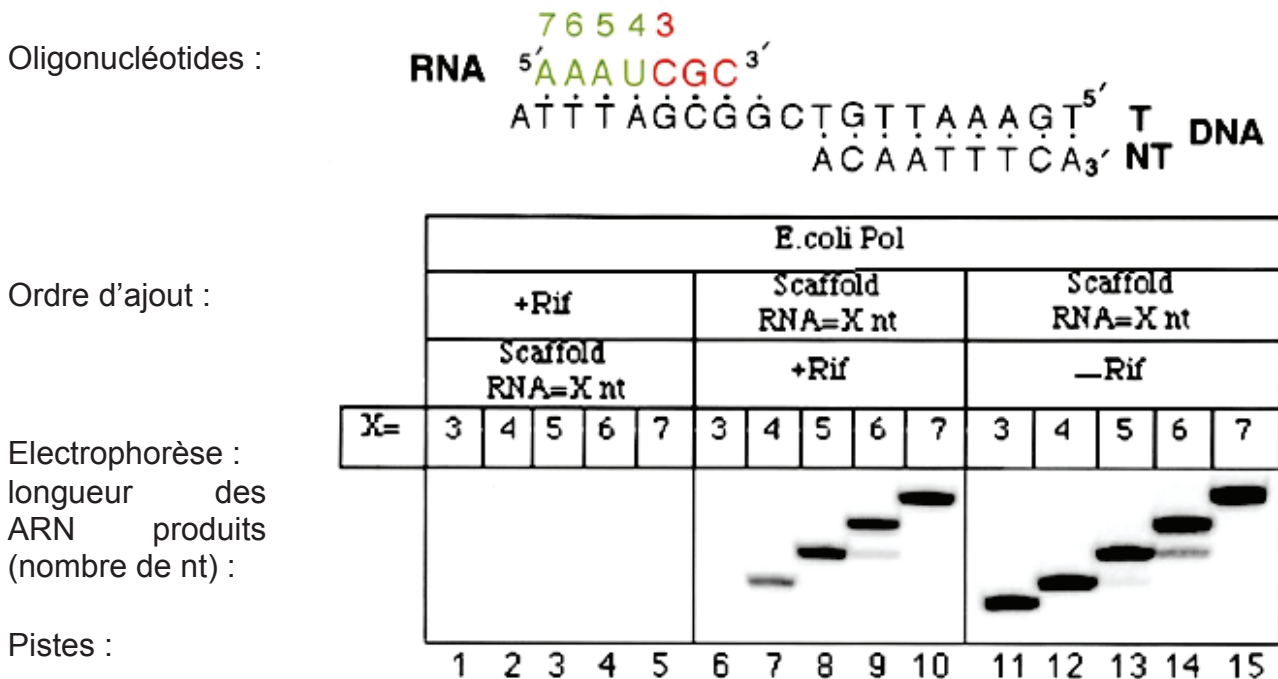
Au niveau de la sous-unité  $\beta$  de l'ARN polymérase, dans une zone adjacente au site actif, l'acide aminé histidine (H) en position 526 (H526) établit une liaison hydrogène avec la rifampicine. La fixation de la rifampicine entraîne un arrêt de l'élongation de l'ARN.

*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).



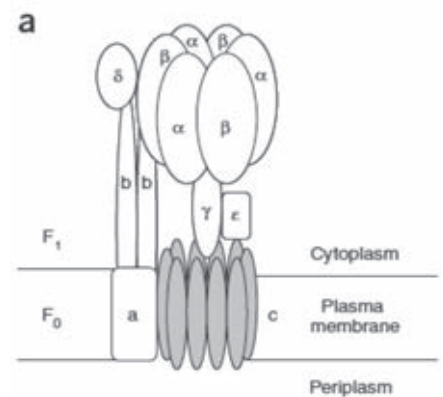
Le brin d'ADN matrice (noté T) est mis en présence d'oligonucléotides (notés X nt) dont la taille varie de X = 3 à X = 7 nucléotides selon l'expérience :

- 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.

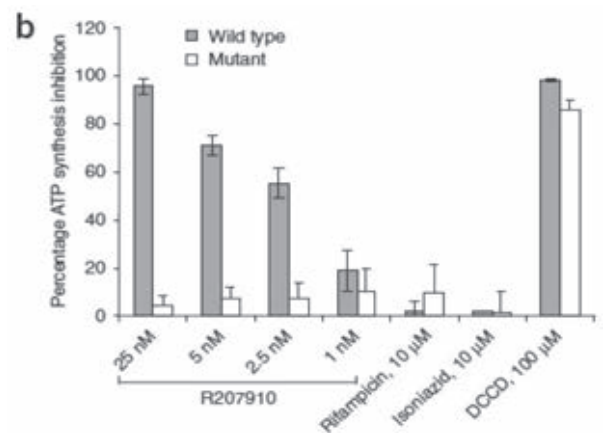
Les substrats (nucléotides triphosphate) et l'ARN polymérase active sont déjà présents dans le milieu réactionnel. Les nucléotides à Cytosine (C) sont marqués radio-activement afin de détecter les produits de l'élongation. Les ARN formés sont séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide (23%)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

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

- **a** ATP synthase has a transmembrane F<sub>0</sub> part (subunits a, b and c) and a cytoplasmic F<sub>1</sub> part (subunits  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ). 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 FoF<sub>1</sub>-ATP synthase.

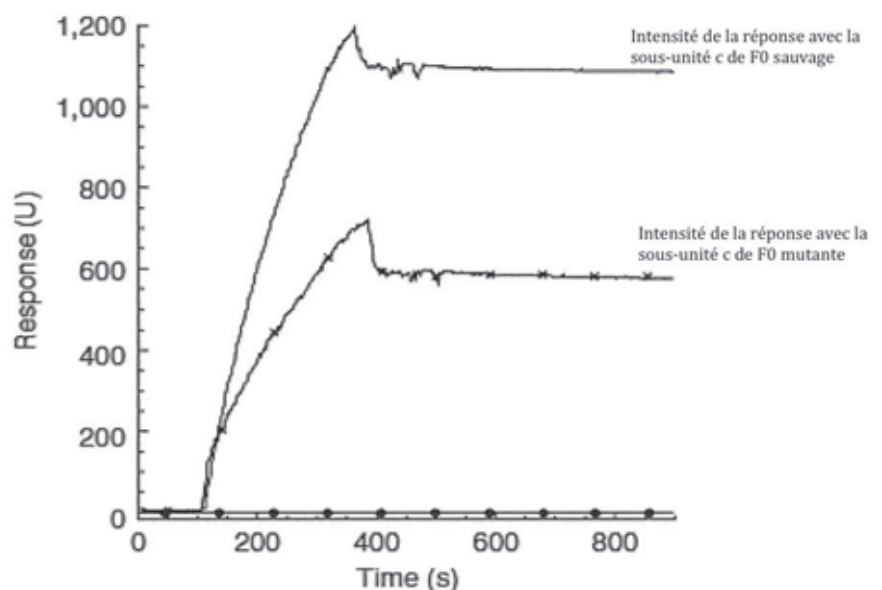
(Hélène Segala, caractérisation génétique, biochimique et structurale de l'ATP synthase des mycobacteries, la cible d'un nouvel antituberculeux de la famille des diarylquinolines, thèse doctorale, Université Paris 6, janvier 2012)

**Document 22** : résultats du test Biacore

Une sous-unité c de F<sub>0</sub> 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 mm<sup>2</sup> de surface de biocapteur.

(Koul et al, Nature chemical biology, brief communications, july 2007)

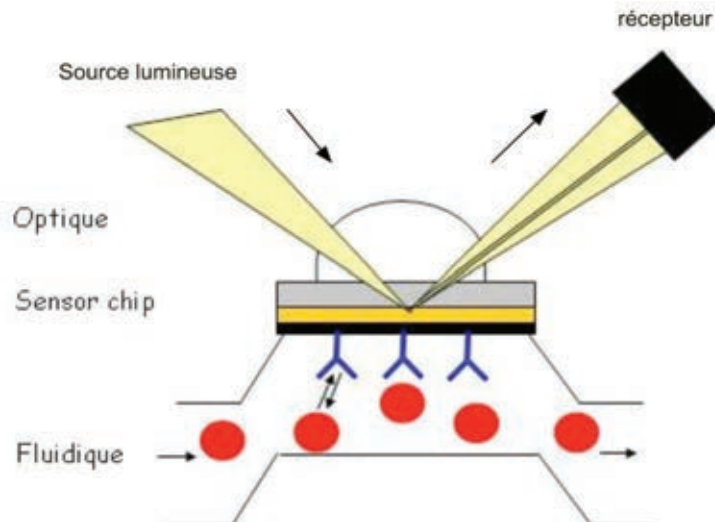


## Document 23 : principe du Biacore

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

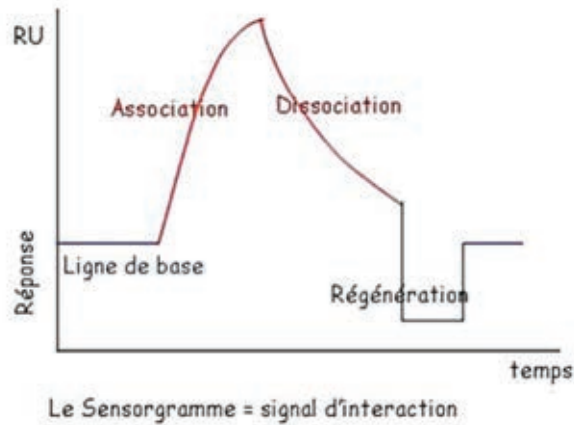
Elle contrôle l'injection (de 2 à 350 microlitres) et le débit d'injection (de 1 à 100 microlitres/minute) des réactifs ou du tampon à la surface du *sensorchip*. Elle est fabriquée dans du latex et comporte des séries de microcanaux et de valves. Elle comprend 4 micro-chambres « à ciel ouvert » qui 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.

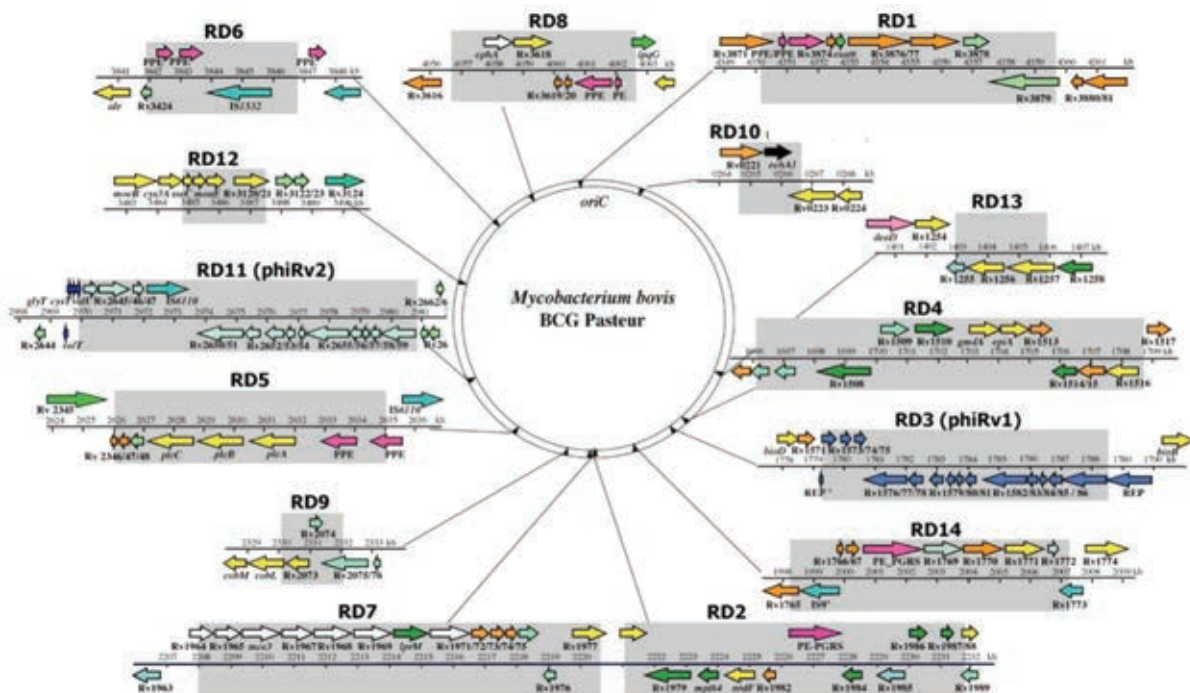
On peut également calculer des concentrations puisque pour une interaction donnée, l'intensité du signal est fonction de la concentration de la molécule injectée. Cette concentration peut être déterminée en utilisant une gamme étalon. Une méthode alternative de calcul repose sur la mesure de la vitesse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

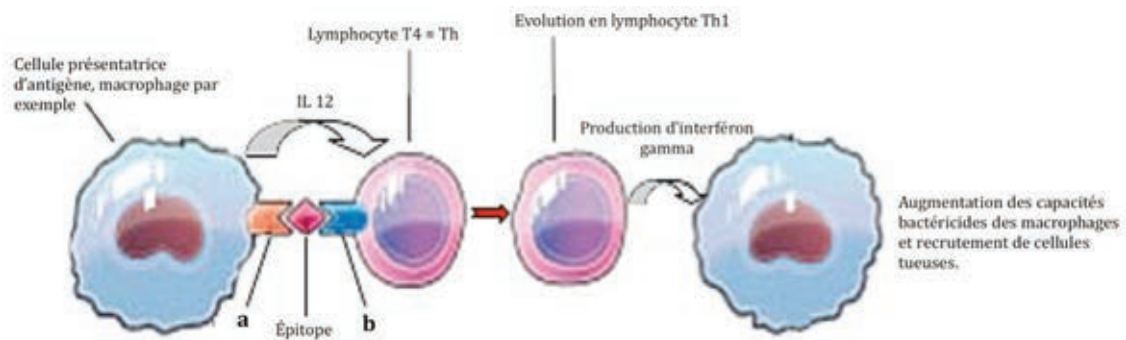


**Document 25** : expériences de ré-insertion dans le génome du BCG de certaines « régions de différence » suspectées d'être nécessaires à la virulence de *Mycobacterium tuberculosis*

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

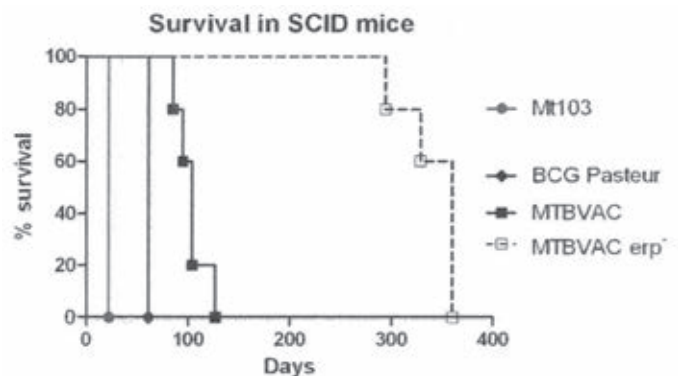
Région de différence ré-insérée dans le BCG	RD1	RD3	RD4	RD5	RD7	RD9
Restauration de la virulence chez des souris immunodéprimées	Oui	Non	Non	Non	Non	Non

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

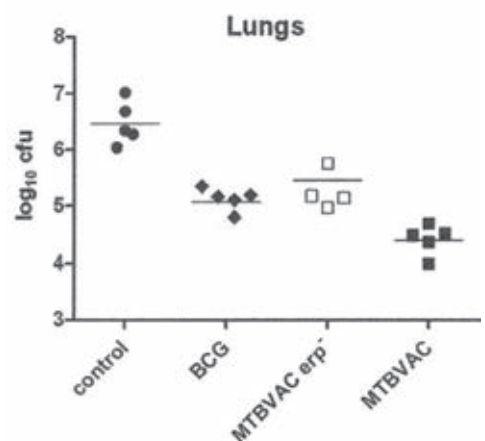


**Document 27** : expériences sur la souris (d'après l'article : « hyper-attenuated MTBVACerp mutant protects against tuberculosis in mice »)

**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*)

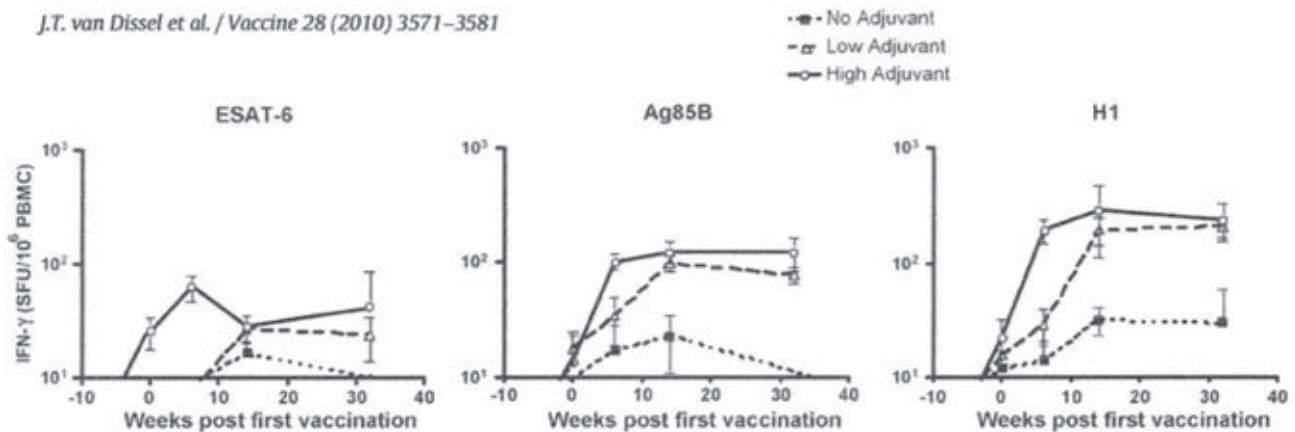
Chaque échantillon est décongelé, lavé puis séparé en trois aliquotes. Une aliquote est incubé en présence de l'hybride H1, une aliquote est incubé en présence de ESAT 6 seule, et la dernière en présence de l'Ag85B seul. Au bout de 12 heures les cellules sont transférées sur une microplaque dont les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

La présence d'IFN  $\gamma$  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-ori2crihan.fr/unspfi/Concours/2013\\_Angers\\_Oger\\_Goncalves\\_Boquel\\_Vaccination/co/hist\\_def4.html](http://unt-ori2crihan.fr/unspfi/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.