

SOMMAIRE :

Remerciements.....	ii
Sigles et abréviations.....	vi
Glossaire.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des tableaux.....	x
INTRODUCTION.....	1
GENERALITES.....	4
I. Généralités sur la tuberculose.....	5
1. Etiologie.....	5
2. Transmission	
épidémiologie.....	
3. Prévention	6
II. Généralités sur l'immunité anti-tuberculeuse.....	6
1. Immunité	à
cellulaire.....	
2. L'apoptose.....	9
3. Rôle de l'apoptose dans l'immunité anti-tuberculeuse	11
a. L'apoptose comme mécanisme de défense de l'hôte.....	11
b. Mécanismes anti-apoptotiques utilisés par <i>M. tuberculosis</i>	12
c. Apoptose des cellules immunitaires.....	12
d. Choix des marqueurs immunologiques à étudier.....	12
III. Généralités sur la PCR en temps réel.....	13
1. Définitions.....	13
2. Principe de l'analyse de la fluorescence avec les sondes TaqMan™	14
3. Applications de la PCR en temps réel.....	17
MATERIELS ET METHODES.....	18
I. Matériels biologiques.....	19
1. Recrutements des sujets de l'étude.....	19
2. Prélèvement de sang.....	19
II. Réactifs et tampons.....	19
1. Réactifs pour l'extraction des ARN.....	19
a. Le kit Paxgene™ Blood RNA (PreAnalytix™).....	19
b. La RNase-Free DNase I (Qiagen, réf 79254).....	20
2. Réactifs pour le dosage et le contrôle des ARN extraits.....	20
3. Réactifs pour la transcription reverse.....	21
a. Le kit Omniscript® Reverse Transcription.....	21
b. Amorce oligo(dT).....	22
c. L'inhibiteur de RNase.....	22
4. Réactifs de la PCR en temps réel.....	22
a. Les amores et les sondes.....	22

b. Le Master mix.....	23
c. Les ADN standards.....	24
III. Méthodes.....	24
1. Extraction des ARN totaux.....	24
a. Principe.....	24
b. Méthode d'extraction.....	24
i. Contrôle de l'activité des RNases : (Selon Sambrook et al., 1989).....	24
ii. Mode opératoire : (selon le manuel d'utilisation du kit Paxgene).....	25
c. Dosage des ARN extraits par spectrophotométrie.....	27
i.	27
Principe.....	27
ii. Technique.....	27
d. Détermination de l'intégrité des ARN extraits par électrophorèse sur gel dénaturant de Formaldéhyde-Agarose	28
(FA).....	28
i.	28
Principe.....	28
ii. Technique.....	28
2. Quantification des ARNm par la RT-PCR en temps réel.....	28
a. Transcription reverse.....	29
b. La PCR en temps réel.....	31
i. Appareillage : le Rotor-Gene 3000.....	31
ii. Principe de la quantification des produits PCR en temps réel.....	31
iii. Technique.....	35
iv. Analyse de la PCR en temps réel.....	37
3. Détermination de l'infection à <i>M. tuberculosis</i> chez les sujets	37
4. Analyse des données.....	38
RESULTATS.....	39
1. Mise au point de la technique de PCR en temps réel.....	40
2. Qualité des ARN extraits.....	41
3. Validation de l'utilisation du gène <i>HuPO</i> comme référence interne	42
4. Expression des marqueurs immunologiques chez les cas index, les témoins et les contacts	43
a. Expression des gènes des récepteurs 1 et 2 du TNF α (TNFR1 et TNFR2).....	43
b. Expression des gènes apoptotiques codant pour FLICE et FLIPs.....	45
5. Expression des marqueurs immunologiques selon la sensibilité aux antigènes de <i>M. tuberculosis</i>	47
6. Expression des marqueurs immunologiques selon les résultats des tests IDR.....	49

DISCUSSION, CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	51
DISCUSSION.....	52
CONCLUSION.....	54
PERSPECTIVES.....	54
ANNEXES.....	55
Annexe I : Réactifs pour le dosage des ARN.....	56
Annexe II : Réactifs pour l'électrophorèse des ARN en gel de formaldéhyde-agarose.....	56
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	58
RÉSUMÉ	67

SIGLES ET ABREVIATIONS

ADN	: Acide désoxyribonucléique
Ag	: Antigène
Bax	: Bcl-2-associated X protein
Bcl	: B Cell-Leukemia/Lymphoma
CD	: Classe de différenciation
CD95-L	: Classe de différenciation 95-Ligand
CFP 10	: Culture filtrate protein 10
CPA	: Cellule Présentatrice d'antigène
DEPC	: diethylpyrocarbonate
DNase	: Désoxyribonucléase
dNTP	: Désoxynucléoside-triphosphate
ELISPOT	: Enzyme-linked Immunospot
ESAT 6	: Early secreted antigenic target 6-kd protein
FA	: Formaldéhyde-Agarose
Fas-L	: Fatty acid synthetase-Ligand
Flice	: Fas-associated Death Domain protein (FADD)-Like interleukine convertase.
IDR	: Intradermoréaction
IL	: Interleukine
Kb	: Kilobases
M	: Molaire
µg	: Microgramme
µl	: Microlitre
 mM	: Millimolaire
MVA	: Modified Vaccinia Virus Ankara
N	: Normale
ng	: Nanogramme
nm	: Nanomètres
oligo(dT)	: Oligo(désoxyribothymine)
pb	: Paires de bases
PBMC	: Peripheral Blood Mononuclear cells
p19	: Protéine 19
PNT	: Programme National Tuberculose

GLOSSAIRE

- **Amplicon** : Produit d'amplification d'un ADN après la PCR
- **Corps apoptotiques** : Corpuscules en forme de petits ballonnets issus de la fragmentation du contenu cellulaire par bourgeonnement de la membrane cytoplasmique au cours de l'apoptose. Ces corpuscules seront absorbés par les cellules voisines, sans que le contenu cellulaire, éventuellement agressif, n'ait été éparpillé dans le milieu extracellulaire.
- **C_T(cycle threshold)**: Cycle seuil. Le cycle seuil reflète le nombre de cycles PCR à partir duquel la fluorescence générée coupe une valeur seuil. Ce cycle seuil correspond au logarithme du nombre initial de copies.
- **Référence interne** : C'est un ADN ou un ARN donné qui est naturellement présent dans les échantillons à analyser. En utilisant une référence interne, la quantification d'un ARNm peut être normalisé pour corriger les variations des ARN totaux d'un échantillon à un autre.
- **FRET**: "Fluorescence Resonance Energy Transfer". C'est l'interaction entre les états d'excitation électroniques de deux molécules fluorescentes. L'excitation est transmise d'un fluorophore, le donneur, à une autre, l'accepteur. Le FRET dépend de la distance et a lieu quand le donneur et l'accepteur sont très proches l'un de l'autre.
- **Housekeeping gene** : Gène exprimé naturellement, en abondance avec une expression constante, utilisé comme gène de référence pour la normalisation lors de la PCR en temps réel.
- **Nécrose** : Mort cellulaire non contrôlée résultant d'un traumatisme. La nécrose est caractérisée par la destruction du cytoplasme et la perte de l'intégrité membranaire, libérant dans l'environnement des enzymes toxiques à l'origine de lésions tissulaires.
- **Normalisation** : Un gène de contrôle exprimé à un niveau constant est utilisé pour normaliser les différences entre l'expression des gènes de différents échantillons.
- **R** : Coefficient de corrélation, utilisé pour analyser une courbe standard obtenue par régression linéaire. Lors de la quantification de gènes, il doit être supérieur à 0,99
- **Standard** : Echantillon de concentration connue utilisé pour construire une courbe standard. En utilisant des standards de concentrations variables, une courbe standard est construite, à partir de celle-ci, la quantité d'échantillons inconnus sera calculée.

LISTE DES FIGURES:

- 1.** Les effecteurs de l'immunité anti-tuberculeuse.
- 2.** Les facteurs apoptotiques cellulaires et leurs localisations.
- 3.** Schémas représentatifs des mécanismes de PCR quantitative en temps réel utilisant des fluorophores.
- 4.** Le mécanisme du FRET entre rapporteur et quencher.
- 5.** Principe de la PCR quantitative en temps réel (TaqMan™).
- 6.** Les étapes de l'étude de l'expression des gènes à partir de prélèvements sanguins.
- 7.** Principe de la synthèse du premier brin de l'ADNc par Transcription reverse.
- 8.** Le système Rotor-gene 3000 (RG 3000).
- 9.** Schéma représentant l'évolution du nombre d'amplicons et l'intensité de la fluorescence émise par rapport au nombre de cycle PCR.
- 10.** Caractéristiques d'une courbe d'amplification.
- 11.** Courbe d'amplification construite avec des ADN standards et la courbe standard correspondante.
- 12.** Courbe d'amplification (A) et courbe standard (B) obtenues lors de l'amplification d'une gamme de dilution d'ADN standards de HuPO.
- 13.** Electrophorèse des ARN sur gel dénaturant de formaldéhyde-agarose.
- 14.** Expression des ARNm de HuPO chez des patients tuberculeux (C), chez leurs contacts (X) et chez des témoins (T).
- 15.** Expression des ARNm de TNFR1 et TNFR2 chez des patients tuberculeux « C », leurs contacts « X » et des témoins « T » pour 10^5 copies de HuPO.
- 16.** Expression des ARNm de FLICE et FLIPs chez les patients tuberculeux « C », leurs contacts « X » et des témoins « T » pour 10^5 copies de HuPO.
- 17.** Expression du gène Flips selon la sensibilité aux antigènes de *M. tuberculosis* pour 10^5 copies de HuPO.

18. Expression du gène Flips selon la sensibilité au test IDR pour 10⁵ copies de HuPO.

LISTE DES TABLEAUX

1. Contenu d'un kit *Paxgene™ Blood RNA de PreAnalytix* (Qiagen, réf 79254).
2. Contenu d'un kit *Omniscript® Reverse Transcription* (Qiagen, réf. 205110).
3. Séquences des amorces et des sondes utilisées pour la PCR en temps réel.
4. Composition du *QuantiTect™ Probe PCR Master mix*.
5. Préparation du mix pour la transcription reverse avec le kit *Omniscrip® Reverse Transcription*.
6. Composition du mélange réactionnel pour la PCR des ADNc de FLICE et TNFR2.
7. Composition du mélange réactionnel pour la PCR des ADNc de HuPO, TNFR1 et FLIPs.
8. Température d'hybridation des amorces et des sondes et taille attendue des amplicons.
9. Quantification d'une gamme de dilution d'ADN standards avec deux témoins négatifs.
10. Comparaison de l'expression des marqueurs étudiés entre les différents groupes de sujets par les valeurs P.
11. Taux d'infection des sujets de l'étude d'après le test ELISPOT avec 3 antigènes spécifiques de *M. tuberculosis*.
12. Expression moyenne des marqueurs immunologiques par rapport à la sensibilité aux antigènes de *M. tuberculosis* chez tous les sujets.
13. Comparaison de l'expression des marqueurs immunologiques par rapport à la sensibilité aux antigènes de *M. tuberculosis* chez les sujets contacts de tuberculeux représentée par les valeurs P.
14. Expression des marqueurs selon les résultats des tests IDR.

INTRODUCTION

Introduction

La tuberculose occupe le premier rang mondial des infections d'origine bactérienne [C Parry et PD Davies, 1996]. Elle cause plus de 2 millions de décès chaque année et est responsable d'une morbidité importante. De plus, la tuberculose touche les adultes dans la période la plus productive de leur vie, entraînant des conséquences néfastes pour l'économie des pays touchés par ce fléau. L'ampleur de la maladie est par ailleurs aggravée par l'émergence de maladies touchant le système immunitaire comme le VIH-SIDA, ainsi que par l'apparition de souches multirésistantes aux antibiotiques qui rendent les traitements insuffisants pour contrôler la maladie [MC Raviglione, 2003]. La lutte contre la tuberculose nécessite de ce fait le développement de nouveaux traitements, de moyens de diagnostic rapide et de nouveaux vaccins.

Le vaccin BCG ou « Bacille de Calmette-Guérin » est le seul vaccin disponible à l'heure actuelle contre la tuberculose. Bien que protégeant des formes graves de la maladie chez le nourrisson, ce vaccin ne protège pas de l'infection par la bactérie [Bannon et al., 1999], et son efficacité chez l'adulte reste très controversée, allant de 0 à 85 % [Colditz et al., 1999]. De plus, le BCG peut être à l'origine d'effets secondaires chez les sujets VIH-séropositifs. Ces faits ont orienté les recherches vers la mise au point de vaccins plus efficaces contre la tuberculose [W.H.O. report, 1999]. Des candidats vaccins sont en cours de préparation, faisant appel à diverses approches pour induire une immunité protectrice [Nor et Musa, 2003; Tanghe et al., 1999]. Ces vaccins expérimentaux sont d'abord testés sur des modèles animaux et les plus prometteurs d'entre eux commencent maintenant à faire l'objet d'essai d'innocuité et d'immunogénicité chez l'homme [AM Ginsberg, 2002 ; Baldwin et al., 1998]. Pour évaluer l'efficacité d'un nouveau vaccin, il faut comparer le risque de développer la maladie chez un groupe de sujets ayant reçu ce candidat vaccin et un groupe de sujets non vaccinés ou vaccinés par le BCG. Or, le délai entre le moment de l'infection et le début de la maladie peut prendre plusieurs années [Kamath et al., 1999]. Par conséquent, l'évaluation chez l'homme d'un nouveau vaccin demandera de longues années de suivi. De plus, le coût des essais cliniques est élevé. Par ailleurs, le test d'intradermoréaction à la tuberculine (IDR), actuellement utilisé pour évaluer la protection par le BCG, n'est ni sensible ni spécifique [Andersen et al., 2000]. Une alternative est d'identifier des marqueurs de susceptibilité et des marqueurs immunologiques de protection pour évaluer les vaccins potentiels et tester leur efficacité lors des essais vaccinaux chez l'homme.

La présente étude fait partie du projet multicentrique « VACSIS » auquel participent trois institutions européennes (*University College London, Angleterre* ; *Statens Serum Institut, Copenhagen, Danemark* et *Institut Pasteur, Paris, France*) et quatre institutions

Introduction

africaines (*University of Zambia School of Medicine and University Teaching Hospital, Lusaka, Zambie* ; *Armauer Hansen Research Institute, Addis Abeba, Ethiopie* ; *MRC Laboratories, Banjul, Gambie* ; *Institut Pasteur de Madagascar*). Les objectifs de ce projet sont :

- d'une part, acquérir les données immunologiques et bactériologiques nécessaires pour la faisabilité d'essais vaccinaux en tuberculose ;
- d'autre part, identifier des marqueurs de protection contre la tuberculose.

Il s'agit plus spécifiquement de rechercher des marqueurs moléculaires associés à l'immunité anti-tuberculeuse dans les cellules du sang périphérique de patients tuberculeux pulmonaires à microscopie positive (TPM+), de leurs contacts (qui développeront ou non la maladie) et de sujets témoins sains.

Les travaux présentés dans ce mémoire ont pour but d'étudier l'expression de gènes codant pour des effecteurs de l'immunité (gènes de l'apoptose, cytokines,...) par l'analyse quantitative des ARNm (acides ribonucléiques messagers) selon la technique de Reverse Transcription-PCR quantitative (qRT-PCR) en temps réel. Des marqueurs de l'immunité anti-tuberculeuse seront recherchés en comparant :

- d'une part les résultats obtenus chez différentes cohortes de sujets (patients TPM+, contacts, sujets sains) ;
- d'autre part les résultats chez les sujets infectés et les sujets non infectés par *Mycobacterium tuberculosis*.

En préalable à l'étude, quelques généralités seront données, ainsi que des notions sur l'apoptose et son rôle dans l'immunité anti-tuberculeuse.

GENERALITES

I. GÉNÉRALITÉS SUR LA TUBERCULOSE :

1. ETIOLOGIE :

(A Raja, 2004)

La tuberculose est une maladie infectieuse d'origine bactérienne, causée par le genre *Mycobacterium tuberculosis* ou Bacille de Koch (BK). L'homme est le seul réservoir connu de la bactérie. Par ailleurs, *M. tuberculosis* est une bactérie aérobie obligatoire, et les complexes bactériens sont principalement retrouvés dans les voies respiratoires supérieures. La tuberculose est une maladie typique des poumons (forme pulmonaire) qui constituent à la fois la porte d'entrée de la bactérie et le lieu de dissémination de la maladie. Elle peut toutefois atteindre d'autres organes donnant lieu alors à une forme extra-pulmonaire.

M. tuberculosis est un parasite intracellulaire facultatif, infectant surtout les macrophages. Il possède un temps de génération lent, allant de 15 à 20 heures. Certaines propriétés de la bactérie sont dues à la concentration élevée en lipides dans la paroi bactérienne. Ces propriétés concernent non seulement les caractéristiques tinctoriales (ce sont des bacilles acido-alcool résistants ou BAAR visibles par microscopie), mais permettent aussi la survie de la bactérie dans son environnement (résistance naturelle aux antibiotiques, résistance à la destruction par les macrophages,...)

[<http://textbookofbacteriology.net/tuberculosis>].

2. TRANSMISSION ET EPIDÉMIOLOGIE :

(Dolin et al., 1999, WHO ,2005)

La transmission de la maladie se fait par voie aérienne, par l'inhalation de gouttelettes contenant les bactéries émises par un individu bacillifère, en toussant, en éternuant ou simplement en parlant. Les bactéries gagnent ensuite les voies aériennes supérieures où elles vont proliférer.

Le premier contact infectant d'un sujet avec *M. tuberculosis* est appelé « primo-infection tuberculeuse ». L'infection par la bactérie peut entraîner soit la tuberculose maladie, soit une infection persistante asymptomatique qui peut passer inaperçue tout au long de la vie du sujet. Cependant, chaque année, chez environ 8% des personnes immunocompétentes et 10% des personnes VIH-positives, l'infection latente peut être réactivée en tuberculose dite « secondaire ».

Généralités

On compte 8 millions de nouveaux cas de tuberculose et 2 à 3 millions de décès par an. Environ le tiers de la population mondiale est infecté. Plus de la moitié des cas recensés surviennent chez des sujets âgés de 15 à 49 ans, c'est-à-dire, les années les plus productives de la vie causant de graves impacts socio-économiques pour les pays touchés. La tuberculose est particulièrement néfaste pour les pays en voie de développement où l'on recense chaque année plus de 90% des nouveaux cas dans le monde.

A Madagascar, la tuberculose est une maladie endémique. D'après les données du Programme National Tuberculose (PNT- Ministère de la Santé et du Planning Familial), la prévalence de la tuberculose est passée de 33573 malades en l'an 2000 à 37600 en 2003. Les cas rapportés de la maladie ont été de 19773 cas en 2004, avec une incidence de 113 cas de tuberculose, toutes formes confondues, pour 100.000 habitants et le taux de mortalité estimé à 6%.

3. PRÉVENTION :

(MJ Bannon, 1999; Colditz et al., 1994 ; Okkels et al., 2003; AM Ginsberg, 2002 ; WHO, 1999 ; Chadha et al., 2004)

Pour prévenir la maladie, le vaccin BCG, variant atténué de la souche *M. bovis*, seul vaccin antituberculeux disponible à l'heure actuelle, a été utilisé depuis 1921 et reste largement utilisé dans le monde. Son efficacité est cependant très variable selon les populations étudiées (allant de 40 à 70% chez les enfants de 0 à 14 ans, et de 0 à 85% chez l'adulte). Par ailleurs, la vaccination par le BCG peut être à l'origine d'effets secondaires chez les sujets infectés par le VIH et les nouveaux nés de mères séropositives. Diverses stratégies ont été déployées pour la recherche de vaccins plus efficaces dont l'utilisation pourrait s'étendre aux sujets séropositifs. Plus d'une centaine de candidats vaccins ont été développés et testés sur des modèles animaux. Les plus prometteurs, comme celui préparé à partir d'un antigène bactérien exprimé dans des souches virales de *Vaccinia*, le MVA-Ag85A, ou la forme recombinante modifiée du BCG, rBCG30, vont entrer dans les essais de phase I pour les tests d'innocuité et d'immunogénicité chez l'homme.

II. GÉNÉRALITÉS SUR L'IMMUNITÉ ANTI-TUBERCULEUSE :

Comme *M. tuberculosis* est un parasite intracellulaire facultatif, l'organisme infecté se protège principalement par une immunité à médiation cellulaire [SHE Kaufmann, 2002].

1. IMMUNITÉ À MÉDIATION CELLULAIRE :

Après inhalation de gouttelettes infestées par des BK, le premier contact avec le système immunitaire se fait au niveau des macrophages alvéolaires. Les germes de *M. tuberculosis* sont alors internalisés par les macrophages. Ces derniers peuvent servir de refuge pour les bactéries. La plupart des bactéries internalisées vont en effet échapper à la lyse phagocytaire et utiliser le macrophage comme habitat pour se multiplier. La multiplication du bacille dans la vacuole du macrophage conduit à la destruction de celui-ci et à la libération de nombreux bacilles qui seront à leur tour phagocytés par d'autres monocytes et macrophages (figure 1a).

Les BK libres ou phagocytés vont s'extravaser vers le sang périphérique, puis migrer par voie lymphatique vers les ganglions lymphatiques drainants où ils vont interagir avec les différents types de lymphocytes T (CD4+ et CD8+) qui, activés, vont se multiplier localement. L'interaction entre les antigènes présentés par les cellules présentatrices d'antigènes, et les récepteurs des cellules T, vont servir de signal d'activation de celles-ci. Ces lymphocytes sensibilisés vont proliférer et secréter des lymphokines médiatrices comme le TGF-β [Boom et al., 1992]. Celles-ci vont notamment activer les macrophages qui vont produire l'IL-12 orientant les lymphocytes T CD4+ vers une différenciation en lymphocytes T auxiliaires ou T « helper » (Th) de type Th1 (Th « helper type 1 »). La réponse Th1 est notamment caractérisée par la sécrétion d'Interféron gamma (IFN γ) et de « Tumor Necrosis Factor alpha » (TNF α) [S Sharma et M Bose, 2001] (figure 1b).

L'IFN γ est une lymphokine activant les macrophages. Ces derniers enclenchent alors leur activité bactéricide et la phagocytose des pathogènes internalisés. L'IFN γ facilite aussi la prolifération des cellules T CD 4+ et des cellules T cytolytiques. Ces dernières ont une activité lytique directe sur les cellules infectées [Flynn et al., 1993]. L'IFN γ tient donc une place prépondérante dans l'immunité anti-tuberculeuse et peut, par ailleurs, servir pour le diagnostic de l'infection à *M. tuberculosis* [Schwander et al., 2000].

Le TNF α a la capacité d'induire la production de chémokines chez les monocytes/macrophages. De plus, il est impliqué dans l'expression de gènes d'oxydants cellulaires qui vont induire la mort ou la nécrose d'une cellule infectée et contribuer à la diminution et à la limitation du parasitisme intracellulaire de *M. tuberculosis* [Zganiacz et al., 2004]. Le TNF α est également à l'origine de la formation du granulome où l'environnement est très peu favorable à la multiplication des BK à cause du pH acide et de l'anoxie qui y subsiste.

D'autres effecteurs cellulaires interviennent dans l'immunité anti-tuberculeuse par leur activité cytolytique. Ce sont les cellules $T\gamma\delta$, les cellules NK (« natural killer »), et les cellules T CD8+. Le rôle de ces cellules est de réduire la prolifération des mycobactéries intracellulaires en éliminant leur habitat, c'est-à-dire la cellule infectée [Thoma-Uzynski et al., 2000] (figure 1c).

Selon la capacité des cellules du système immunitaire à contrôler la croissance des bacilles, la lésion tuberculeuse va s'étendre ou au contraire régresser. Dans environ 10% des cas, un sujet infecté échappera au contrôle immunitaire et développera la tuberculose maladie. Dans 90% des cas, la « tuberculose infection » est asymptomatique. L'organisme contrôlera la prolifération des bactéries et la lésion tuberculeuse va se calcifier. Cependant, certains bacilles ayant un métabolisme extrêmement ralenti pourront survivre. Ces bacilles, dits quiescents ou persistants (figure 1d), pourront se développer à nouveau sous l'influence de différents facteurs (induisant une baisse de l'immunité). Le sujet présentera alors une tuberculose secondaire [Mohan et al., 2001].

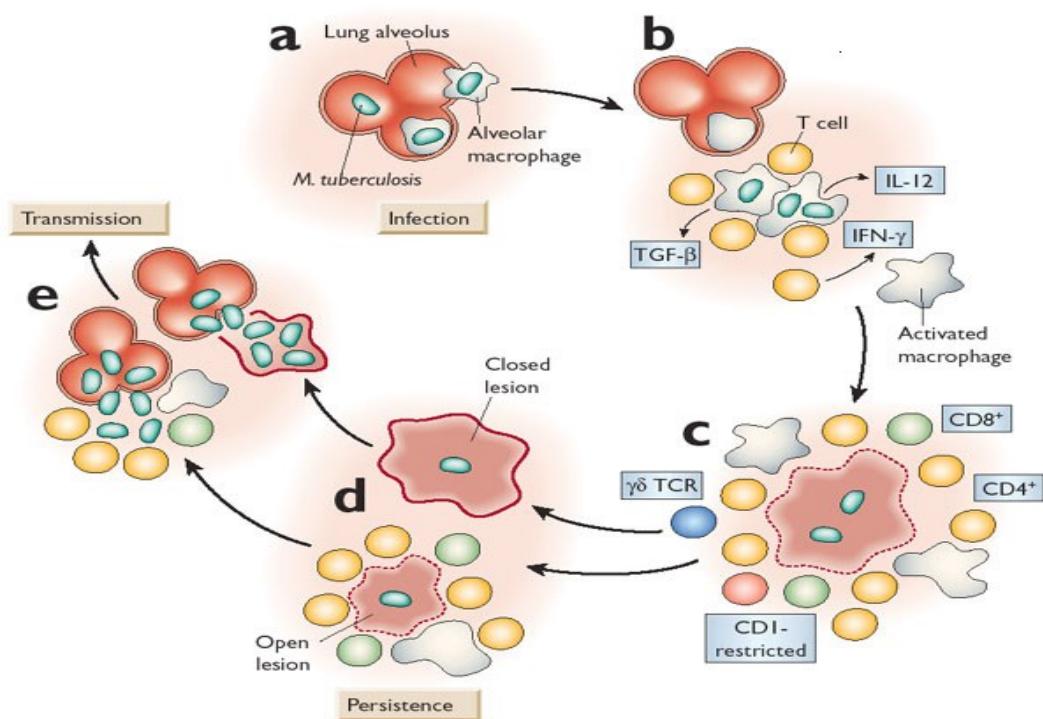


FIGURE 1. Les effecteurs de l'immunité anti-tuberculeuse. (a) *M. tuberculosis* libres et phagocytés dans les alvéoles pulmonaires. (b) Activation des cellules T par les CPA et libération des lymphokines. (c) Formation de lésions permettant de contenir l'infection. (d) Prolifération et transmission des bactéries en cas de défaillance du système immunitaire (tiré du site <http://www.nature.mg>).

2. L'APOTOSE :

(JC Ameisen, 2000 ; E White, 1996 ; M Holcik, 2001 ; Wanchu et al., 2004 ; Benesch et al., 2003)

L'apoptose, également qualifiée de "mort cellulaire programmée" ou de "suicide cellulaire", est définie comme étant l'autodestruction génétiquement programmée des cellules. Elle cause la mort de dizaine de milliards de cellules chaque jour chez les organismes.

L'apoptose est déclenchée par différents facteurs extracellulaires, intracellulaires, physiques ou chimiques, qui activent l'expression de gènes apoptotiques induisant une série de réactions cellulaires spécifiques en "cascade", entraînant des changements morphologiques de la cellule. L'issue de ces changements cellulaires est la mort de la cellule. Ces modifications cellulaires comprennent la compression cellulaire, la condensation de la chromatine, la fragmentation du noyau cellulaire et la formation des « corps apoptotiques » (issus du bourgeonnement de la membrane cytoplasmique).

Les stimuli à l'origine du phénomène d'apoptose peuvent être des facteurs de mort spécifiques, comme certains ligands spécifiques de mort cellulaire, les molécules Fas-L (ou CD95-L) et le TNF. Ce sont aussi les facteurs environnementaux ou les dommages subis par l'ADN entraînant la mort de la cellule endommagée. L'interaction des signaux de mort cellulaires avec leurs récepteurs cellulaires active certaines enzymes apoptotiques (figure 2a). Ces enzymes sont des caspases ou des interleukines convertases comme la protéine FLICE (Fas-associated DD protein(FADD)-Like Interleukine Convertase Enzyme), qui vont activer à leur tour d'autres enzymes. La cascade de réaction qui s'en suit va aboutir au clivage de protéines de régulation, et donner les changements typiques des cellules apoptotiques. D'autres protéines d'origine mitochondriale comme celles de la famille Bax favorisent aussi les réactions apoptotiques. Enfin, les stimuli peuvent aussi être des facteurs de survie des cellules, impliqués dans le développement normal d'un individu : les protéines inhibitrices des caspases, comme le FLIP (FLICE Inhibitor Protein), ou des protéines d'origine mitochondriale comme ceux de la famille Bcl-2 agissant vers la fin de la chaîne réactionnelle (figure 2b).

Le phénomène d'apoptose est particulièrement important dans le maintien de l'intégrité de l'organisme, et est tout aussi essentiel au développement normal. Le dérèglement de l'apoptose peut entraîner des troubles graves, allant de la létalité embryonnaire au cancer. L'apoptose joue aussi un rôle crucial dans la régulation du système immunitaire. En effet, elle intervient déjà dans la sélection et la différenciation des

Généralités

lymphocytes au niveau du thymus. Elle est également omniprésente dans la lutte de l'hôte contre certaines maladies, notamment dans l'élimination des cellules infectées par les pathogènes. Enfin, l'apoptose tient un rôle important dans l'inhibition de l'action des effecteurs cellulaires. La persistance incontrôlée de ces derniers peut en effet entraîner les maladies auto-immunes.

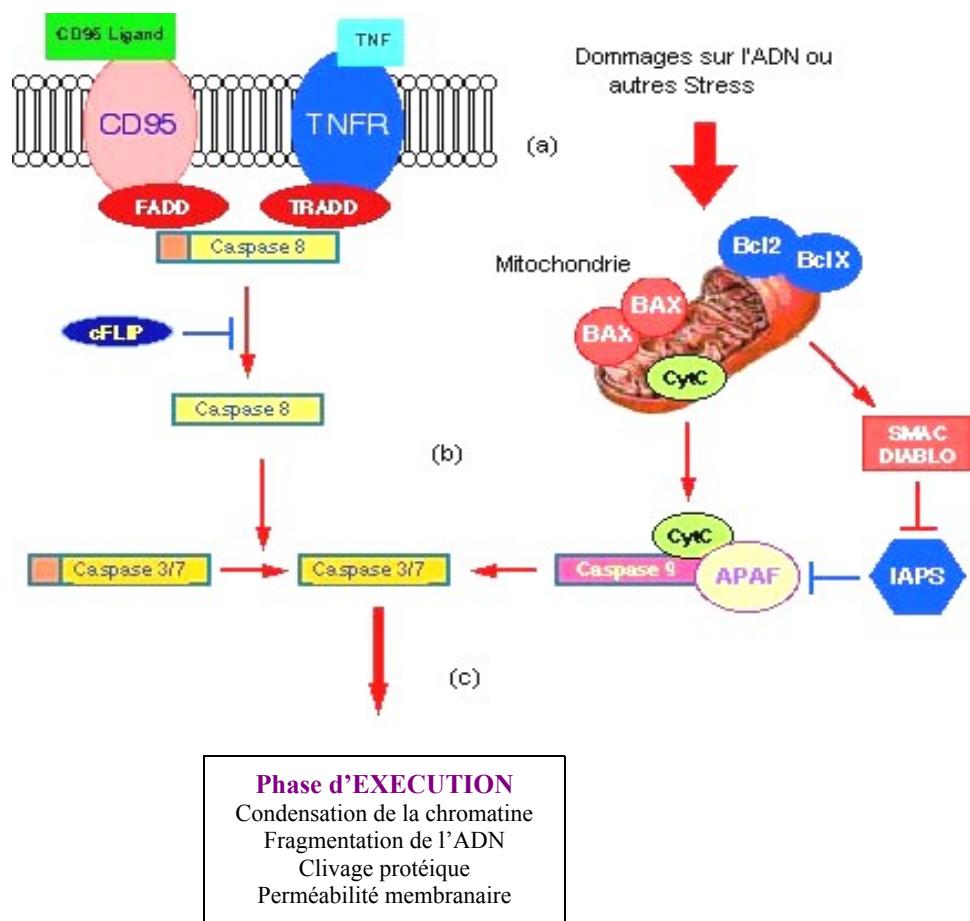


FIGURE 2. Les facteurs apoptotiques cellulaires et leurs localisations. (a) Fixation des ligands apoptotiques sur leurs récepteurs cellulaires. (b) Activation d'une cascade de réaction. (c) Exécution de l'apoptose.

3. RÔLE DE L'APOPTOSE DANS L'IMMUNITÉ ANTI-TUBERCULEUSE :

L'infection à *M. tuberculosis*, parasite intracellulaire, engendre essentiellement une immunité à médiation cellulaire et l'apoptose tient une place prépondérante dans la résistance de l'hôte infecté face à l'infection bactérienne [Rook et al., 2001].

a. L'apoptose comme mécanisme de défense de l'hôte :

L'apoptose est d'abord un mécanisme de défense de l'hôte contre *M. tuberculosis*. En effet, le système immunitaire de l'hôte induit l'apoptose des cellules infectées par la bactérie, limitant ainsi la croissance des microorganismes au sein de ces cellules [Gil et al., 2003]. L'apoptose est notamment observée au sein des macrophages alvéolaires humains parasités par le bacille de Koch [Keane et al., 1997], ainsi que dans les cellules mononucléées infectées du sang périphérique en général [Aleman et al., 2002].

L'induction de l'apoptose par *M. tuberculosis* se fait par la libération de médiateurs chimiques apoptotiques par les cellules infectées. Après s'être fixés sur leurs récepteurs cellulaires, ces ligands vont génétiquement activer la mort d'autres cellules infectées. Le TNF α sécrété par certaines cellules mononucléées induit, par l'intermédiaire de son récepteur cellulaire TNFR1, l'expression de certains gènes apoptotiques comme *Bcl-w* chez les cellules infectées [Spira et al., 2003].

Le contact entre *M. tuberculosis* et sa cellule hôte active aussi l'expression de gènes pro-apoptotiques chez les cellules infectées. Ces gènes codent notamment pour des effecteurs apoptotiques comme les protéines Bax, ou pour des protéines de la famille des caspases, comme la protéine FLICE liée au récepteur Fas [Oddo et al, 1998; Perskvist et al, 2002] (figure 2). Des observations faites chez des patients tuberculeux montrent également que l'interaction bactérie/cellule-hôte inhibe l'expression de gènes anti-apoptotiques (codant pour des protéines de la famille Bcl-2), favorisant ainsi la mort cellulaire [Fayyazi et al., 2000]. Certaines glycoprotéines de la paroi bactérienne, comme le p19, induisent également la mort cellulaire après s'être fixées sur un récepteur spécifique [Lopez et al., 2003]. Ces glycoprotéines induisent la libération d'interleukine (notamment l'IL-12) pouvant activer les macrophages et causer l'apoptose des cellules infectées [Dao et al, 2004]. La mort des cellules parasitées par *M. tuberculosis* réduit la viabilité des parasites, et permet ainsi d'annihiler leur multiplication [Aleman et al., 1997].

b. Mécanismes anti-apoptotiques utilisés par *M. tuberculosis* :

Afin d'échapper au système immunitaire de l'hôte, *M. tuberculosis* déploie des mécanismes anti-apoptotiques, préservant les cellules infectées de toute mort cellulaire. Ces mécanismes anti-apoptotiques assurent ainsi le parasitisme intracellulaire de la bactérie [Keane et al., 2000].

La bactérie peut en effet activer l'expression de gènes anti-apoptotiques, stoppant la mort cellulaire à différents niveaux. Ces gènes codent notamment pour des protéines inhibitrices de la famille Bcl-2 ou pour des inhibiteurs de caspases, comme la protéine FLIP. Sly et al. (2003) ont mis en évidence ce phénomène chez des macrophages infectés par des souches virulentes de *M. tuberculosis*, résistants à l'apoptose. Certains composants de la paroi bactérienne comme le lipoarabinomannane inhibent directement les effecteurs apoptotiques comme la protéine Bad par phosphorylation. *M. tuberculosis* préserve aussi son hôte par la production de cytokines ou de protéines anti-apoptotiques voire immunsuppressives. Certaines cellules infectées sécrètent en effet le récepteur circulant du TNF α , le TNFR2. Une fois libéré, ce récepteur neutralise le ligand TNF α et l'empêche de se fixer sur son récepteur cellulaire TNFR1, inhibant ainsi la mort de la cellule-hôte [Balcewicz-sablinsk et al., 1998].

c. Apoptose des cellules immunitaires :

Un autre moyen d'évasion de *M. tuberculosis* face au système immunitaire de son hôte est l'induction de l'apoptose chez les cellules immunitaires. Ce phénomène est notamment observé au niveau des lymphocytes T qui ont été sensibilisés à la bactérie. L'apoptose de ces cellules après contact avec des antigènes mycobactériens se fait par l'induction de gènes pro-apoptotiques codant pour des récepteurs cellulaires comme Fas ou CD 95 [Hirsch et al., 1999]. Les cellules T sont de ce fait plus réceptives à l'apoptose. Ce phénomène a été observé au niveau des lymphocytes T de patients tuberculeux chez lesquels on a constaté l'augmentation de l'expression de ces gènes par rapport à un groupe de sujets sains (Li et al., 1998).

d. Choix des marqueurs immunologiques à étudier :

A partir des différentes observations faites sur la relation entre l'apoptose et l'immunité anti-tuberculeuse, plusieurs marqueurs apoptotiques ont été choisis pour cette étude. Leur expression sera étudiée dans le but d'identifier lesquels sont associés à la

maladie ou au contraire à la protection contre la tuberculose. Ainsi, seront étudiés au cours de ce stage : le gène codant pour l'enzyme FLICE, appartenant à un domaine apoptotique cellulaire, et celui codant pour son inhibiteur, FLIPs (pour FLice Inhibitor Protein et Short). Ces deux protéines interviennent respectivement dans la mort des cellules infectées par les pathogènes [Gil et al., 2003 ; Keane et al., 1997] et dans l'évasion de l'immunité anti-tuberculeuse par les mycobactéries [Hirsch et al., 1999 ; Benesch et al., 1998]. De plus, seront étudiés ici, l'expression des gènes TNFR1 et TNFR2, codant pour les récepteurs 1 et 2 du TNF α . Ces récepteurs sont étroitement associés à l'immunité contre les parasites intracellulaires en général [Balcewicz-Sablinska et al., 1998 ; Spira et al., 2003].

III. GÉNÉRALITÉS SUR LA P.C.R. EN TEMPS RÉEL:

1. DEFINITIONS :

(Valasek et Repa, 2005 ; Higuchi et al., 1993 ; Collot et al., 2001 ; Holland et al., 1991).

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une technique d'amplification de gènes mise au point par Kary Mullis dans les années 80. La PCR quantitative, à l'origine de la PCR en temps réel, a été quant à elle développée par Higuchi et al. dans les années 1990 en associant la fluorescence d'un intercalant (le bromure d'éthidium) à la PCR classique.

La PCR en temps réel est une amplification d'ADN, c'est-à-dire une PCR classique, associée à une technique avancée de fluorométrie, permettant de suivre la progression de la réaction en temps réel. Cette fluorométrie se fait par le marquage des produits PCR avec des fluorophores lors des différentes étapes de la réaction. Ainsi, la PCR en temps réel traduit et analyse la fluorescence émise durant chaque cycle de PCR. Plusieurs types de marqueurs fluorescents sont utilisés pour la PCR en temps réel : les intercalants de l'ADN comme le SYBR Green I et les sondes oligonucléotidiques marquées avec des fluorophores (figure 3).

En 1991, Holland et al. ont développé la technique de PCR en temps réel en utilisant des sondes oligonucléotidiques spécifiques d'une région du gène cible, marquées avec des fluorophores sur les extrémités 5' et 3'. Ces sondes furent ensuite appelées sondes "TaqMan™"(de Thermus aquaticus et Pacman, du nom du célèbre jeu vidéo). L'utilisation de ces sondes oligonucléotidiques permet d'augmenter la spécificité et la sensibilité des

Généralités

réactions. Par la suite, différents types de sondes oligonucléotidiques ont été développés (figure 3 II et III).

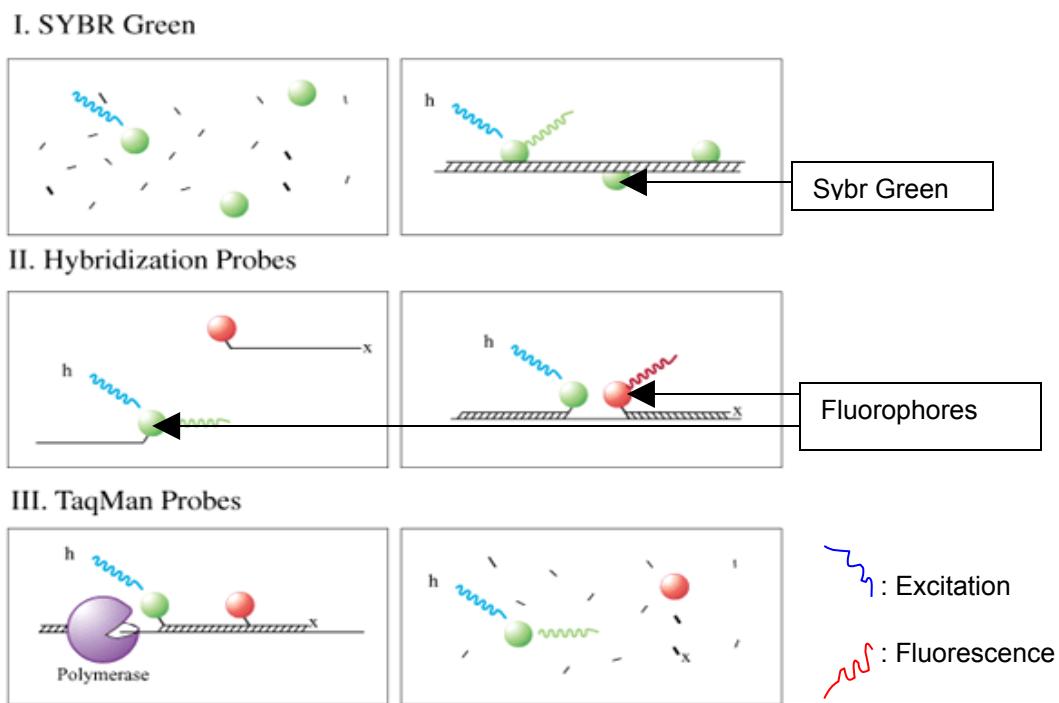


FIGURE 3. Schémas représentatifs des méthodes de PCR quantitative en temps réel utilisant des fluorophores (tirés du site <http://www.gene-quantification.de/chemistry.html>).

(I) Le SYBR Green (en vert), un intercalant qui ne fluoresce qu'après insertion dans le gène cible.

(II) Sondes d'hybridation marquées l'une avec une molécule donneuse d'énergie (en vert) et l'autre avec une molécule « rapporteur » (rouge). Quand les deux sondes se fixent sur la matrice, l'énergie de la molécule donneuse est transférée sur le rapporteur qui émet une fluorescence.

(III) Sonde oligonucléotidique bi-marquée avec un rapporteur en 5' (en vert) et un « quencher » (en rouge) ou sonde TaqMan (cf. §2)

2. PRINCIPE DE L'ANALYSE DE LA FLUORESCENCE AVEC LES SONDES TAQMAN™:

Les sondes TaqMan™ sont des oligonucléotides spécifiques du gène cible portant sur leur extrémité 5' un rapporteur fluorescent, et sur l'extrémité 3' un extincteur ou "quencher" (figure 5a). Ces marqueurs fluorescents sont choisis de manière à ce que le

Généralités

spectre d'émission du rapporteur chevauche le spectre d'excitation du quencher. Si les 2 marqueurs sont proches l'un de l'autre, l'énergie émise sera absorbée par le quencher au lieu d'être transformée en fluorescence (figure 4). Ce phénomène est appelé le « Fluorescence Resonance Energy Transfert » ou FRET. Par contre, si les 2 marqueurs sont éloignés, la fluorescence émise par le rapporteur peut être détectée et analysée.

Le principe de la PCR en temps réel avec les sondes TaqMan™ est basé sur la détection et la quantification de la fluorescence émise par le rapporteur après le clivage d'une sonde bi-marquée à chaque cycle PCR (figure 5b). L'augmentation de la fluorescence est proportionnelle à la quantité de produit PCR (figure 5c).

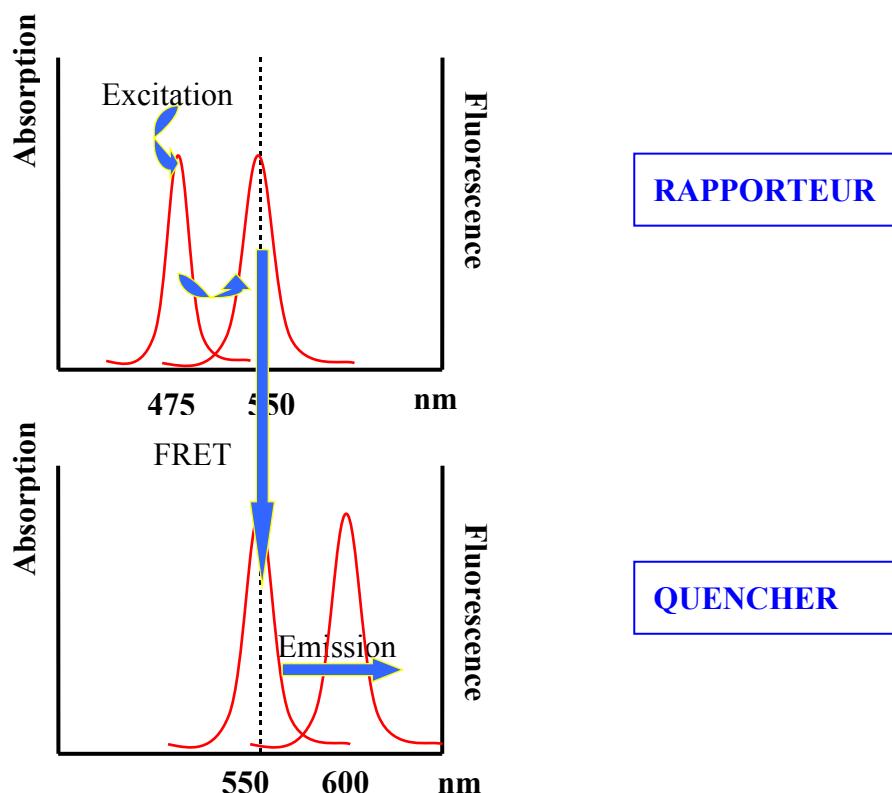


FIGURE 4. Le mécanisme du FRET entre rapporteur et quencher. Le spectre d'émission du rapporteur recouvre le spectre d'absorption du quencher. La flèche bleue indique le sens du transfert d'énergie.

Généralités

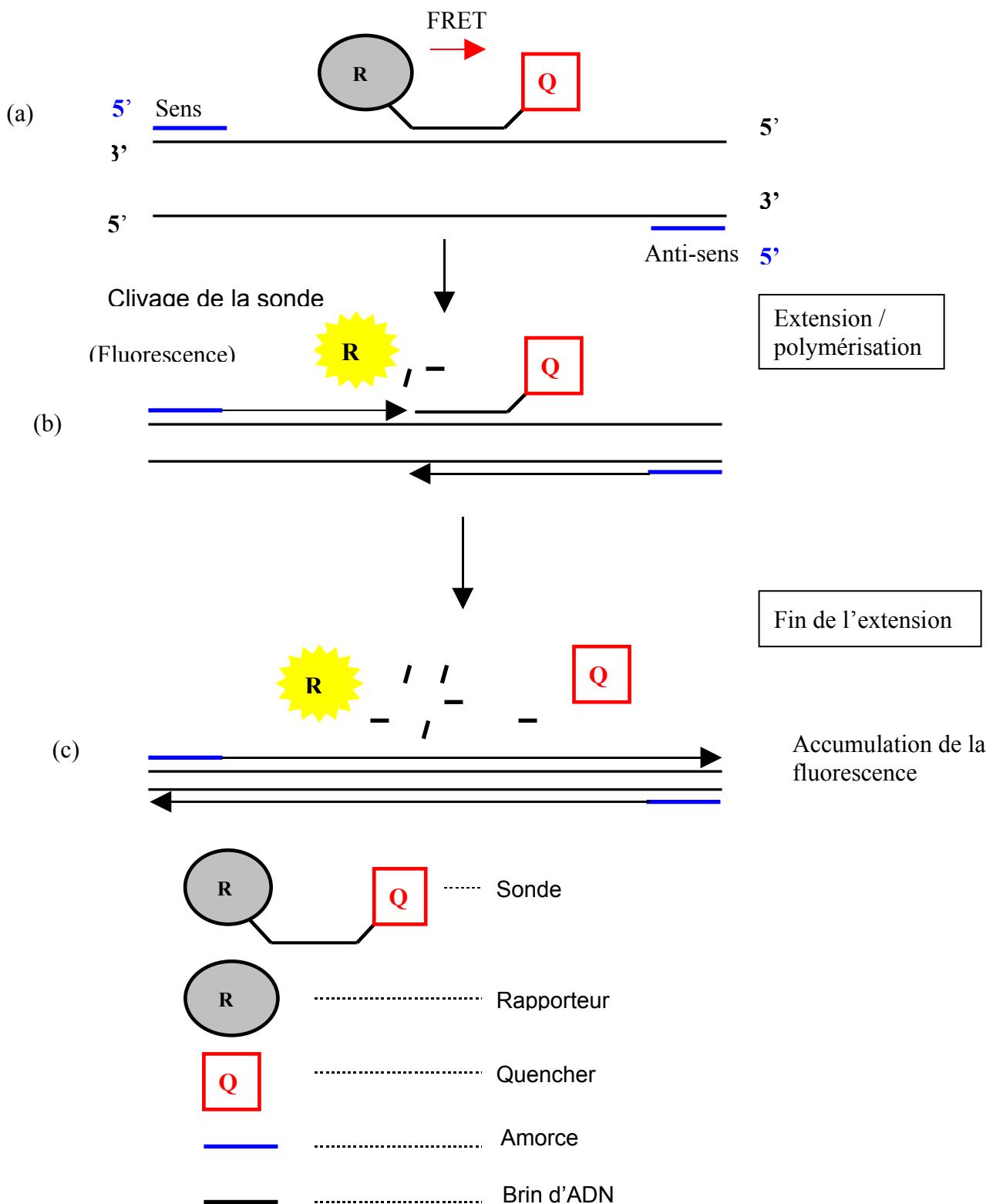


FIGURE 5. Principe de la PCR quantitative en temps réel (TaqMan). (a) hybridation de la sonde bi-marquée à l'ADN cible
 (b) au cours de l'elongation catalysée par la TaqPol, l'activité 5' nucléase déplace la sonde
 (c) lorsque la polymérisation est achevée, pour chaque molécule d'ADN synthétisée un rapporteur émet de la fluorescence.

3. APPLICATIONS DE LA PCR EN TEMPS REEL :

(Mackay et al., 2002 ; Valasek et Repa, 2005 ; Allens et McMurray, 2003 ; Bernard et Wittwer, 2002)

Actuellement, la PCR en temps réel connaît un essor considérable. Elle combine des techniques avancées de biologie moléculaire et de bioinformatique. Cette technique est utilisée dans le domaine du diagnostic moléculaire, pour la détection et l'identification de souches bactériologiques et virologiques. Elle est aussi largement utilisée en recherche biomédicale, en particulier pour l'étude des mutations génétiques et pour l'étude quantitative de l'expression de gènes. Allens et McMurray (2003) ont notamment utilisé la PCR en temps réel pour l'étude de l'expression de gènes de cytokines chez des modèles animaux lors de l'infection par *M. tuberculosis*. La PCR en temps réel est aussi beaucoup utilisée dans l'étude des gènes associés au cancer, en particulier les gènes de l'apoptose.

Au cours de cette étude, la PCR en temps réel sera utilisée pour étudier l'expression de gènes associés à l'apoptose, chez des patients tuberculeux et leurs contacts, par la quantification des ARNm produits dans le sang total. Pour ce faire, les ARNm des sujets seront extraits du sang périphérique, transformés en ADN complémentaires (ADNc), puis quantifiés par la technique de la PCR en temps réel, en utilisant des amorces et des sondes spécifiques des gènes étudiés.

MATERIELS ET METHODES

MATERIELS BIOLOGIQUES

1. RECRUTEMENT DES SUJETS DE L'ÉTUDE :

L'étude a été réalisée en collaboration avec le PNT après accord du Comité national d'éthique. Le recrutement des sujets a eu lieu dans la région d'Antananarivo. Les prélèvements ont été réalisés après obtention du consentement éclairé des sujets.

Trois cohortes d'individus ont été recrutées:

- un groupe de 12 patients TPM+ (cas index) du Dispensaire Anti-tuberculeux d'Antananarivo (DAT),
- un groupe de 40 sujets contacts proches de ces patients (de même maisonnée ou de même foyer),
- 4 sujets contrôles (témoins) non tuberculeux et n'ayant jamais été en contact avec un sujet tuberculeux, recrutés au centre anti-rabique de l'Institut Pasteur de Madagascar (IPM).

Pour chaque sujet, au moment de l'inclusion, une fiche portant les informations cliniques a été remplie par les médecins de l'étude. De plus, pour les sujets contacts et les sujets contrôles, un test d'intradermoréaction à la tuberculine (IDR) a été effectué.

L'âge moyen des sujets est de 23,6 ans [4 - 70 ans] et le sexe ratio (M/F) 1,17.

2. PRÉLÈVEMENTS DE SANG :

2,5 ml de sang ont été recueillis dans des tubes Paxgene™ Blood RNA (PreAnalytix, Qiagen, Valencia, USA, réf. 76115). Le sang peut y être conservé pendant 5 jours à température ambiante. Chaque tube Paxgene contient un mélange de réactifs assurant la stabilité et l'intégrité des ARN, ainsi qu'un bon rendement de l'extraction. Le sang doit être incubé au moins 2 heures dans le tube Paxgene avant d'être utilisé.

RÉACTIFS ET TAMPONS

1. RÉACTIFS POUR L'EXTRACTION DES ARN :

a. Le kit Paxgene™ Blood RNA (PreAnalytix™) :

L'extraction des ARN totaux à partir de prélèvements sanguins a été réalisée avec les Kits Paxgene™ Blood RNA (PreAnalytix, Qiagen, réf. 762125). Un kit contient les réactifs et

Matériels et méthodes

consommables nécessaires pour l'isolement d'ARN total à partir de sang humain collecté dans les tubes Paxgene™ Blood RNA. Les différents composants du kit sont donnés dans le tableau 1. Un kit permet l'extraction des ARN de 50 échantillons de sang.

Tableau 1. Contenu d'un kit Paxgene™ Blood RNA de PreAnalytix (Qiagen, réf 79254)

Désignation	Utilisation	Quantité pour un kit
BR1	tampon de suspension	20 ml
BR2	tampon de fixation	8 ml
Protéinase K	Elimination des protéines	2 x 1,4 ml
BR3 et BR4	tampon de lavage	45 ml + 11 ml
BR5	tampon d'élution	5 ml
RNase-free water	eau purifiée	280 ml
Colonne Paxgene	Contient la membrane en gel de silice	50 colonnes
Tube Processing	tube collecteur de surnageant (2 ml)	200 tubes
Microtube 1,5 ml	collecte d'éluats (1,5 ml)	50 microtubes

BR= Buffer Reagent

RNase = ribonucléase

b. La RNase-Free DNase I (Qiagen, réf 79254) :

La RNase (ribonucléase)-Free DNase I est fournie sous forme lyophilisée. Avant son utilisation, la DNase I a été reprise avec 550 µl d'eau RNase-free (selon les instructions du fabricant). Des aliquots de 50 µl ont été conservés à -20°C (solution stock), pour éviter la décongélation/recongélation des solutions, et éviter ainsi sa dégradation.

Le tampon de dilution (RDD ou Reagent for DNAse Digestion) de la DNase I a été conservé à +4°C.

2. REACTIFS POUR LE DOSAGE ET LE CONTRÔLE DES ARN EXTRAITS:

Pour le dosage par spectrophotométrie, les ARN ont été dilués dans un tampon Tris-HCl 10 mM à pH 7,5 (voir Annexe I).

Pour contrôler l'intégrité des ARN extraits, les réactifs suivants ont été utilisés :

- solution de sodium acétate 500 mM,
- solution d'EDTA 500 mM (pH 8)

Matériels et méthodes

- solution de bleu de bromophénol saturé en solution aqueuse.
- tampon 10X FA (formaldéhyde-agarose),
- tampon de migration 1X FA
- un tampon 5X pour ARN.

La composition de ces tampons est donnée en Annexe II.

3. RÉACTIFS POUR LA TRANSCRIPTION REVERSE:

a. Le kit Omniscript® Reverse Transcription :

La réaction de transcription reverse (RT) a été réalisée avec le kit Omniscript® Reverse Transcription (Qiagen, réf. 205110). Les composants du kit sont donnés dans le tableau 2. Il contient une transcriptase reverse nommée "omniscript reverse transcriptase" (ORT).

La transcriptase reverse est une enzyme multifonctionnelle d'origine virale possédant trois activités enzymatiques distinctes qui sont :

- une activité ADN-polymérasique ARN-dépendante, permettant la transcription de l'ARN matrice en ADNc à partir d'une amorce,
- une activité exoribonucléasique hybrido-dépendante ou RNase H, dégradant spécifiquement l'ARN des hybrides ARN:ADN formés.
- une activité ADN-polymérasique ADN-dépendante, permettant de synthétiser l'ADN double brin.

L'enzyme ORT utilisée permet une transcription reverse pour les ARN dont la quantité varie de 50 ng à 2 µg.

Tableau 2. Contenu d'un kit Omniscript® Reverse Transcription (Qiagen, réf. 205110)

Désignation du produit	Utilisation	Quantité
ORT	Enzyme utilisée pour la RT	800 unités (100 µl)
Tampon 10X RT	Tampon pour la RT	4 x 150 µl
dNTP (5 mM/désoxynucleoside)	Substrats pour la polymérisation	4 x 100 µl
Eau RNase-free	Eau purifiée pour les dilutions	4 x 1,1 ml

b. Amorce oligo(dT):

Matériels et méthodes

L'amorce utilisée pour la réaction de transcription des ARNm était un oligonucléotide ne contenant que des désoxythymidines, l'Oligo(dT)₁₅ Primer (Promega Corp., Madison USA., réf. C1101). Ces amores ont été fournies à une concentration de 100 µM et conservées à

-20°C

Avant utilisation, l'amorce oligo(dT)₁₅ a été diluée au 1/10^{ème} dans de l'eau RNase-free pour avoir une concentration de 10 µM.

c. L'inhibiteur de RNase :

Pour éviter la dégradation des ARN lors des réactions de transcription reverse, la RNasinine (« Recombinant RNasin® », Promega Corp., Madison U.S.A., réf. N2515) qui est un inhibiteur de RNase, a été utilisée. Elle a été fournie à la concentration de 40 unités/µl et conservée à -20°C.

Avant utilisation, la RNasinine a été diluée au 1/4 dans le tampon 1X RT (obtenu en diluant au 1/10 avec de l'eau RNase-free le tampon 10X RT) pour avoir une concentration finale de 10 unités/µl.

4. REACTIFS DE LA PCR ENTEMPS REEL :

a. Les amores et les sondes :

Les séquences des amores et des sondes (tableau 3) ont été déterminées par l'équipe de la *University College London*.

Les amores et les sondes ont été fournies sous forme lyophilisée.

Chaque amorce (Invitrogen™ life technologies, USA) a été reprise dans de l'eau purifiée HPLC (High Performance Liquid Chromatography, Labosi, réf. W/0106/15) pour avoir une solution stock de concentration 100µM. Ces solutions stocks ont ensuite été conservées sous forme d'aliquots de 5 µl à -20° C.

Les sondes ont été doublement marquées, avec un rapporteur, le FAM (6 carboxyfluorescéine) sur leurs extrémités 5', et un quencher, le TAMRA (6-carboxy-N,N,N',N'-tetraéthylrhodamine) à leurs extrémités 3' (Biosearch Technologies Inc., Novato USA). Chaque sonde a été reprise dans de l'eau purifiée HPLC de manière à avoir des solutions stocks de concentration 100 µM. Les solutions stocks ont ensuite été conservées sous forme d'aliquots de 5 µl à -20°C et à l'abri de la lumière.

Matériels et méthodes

Tableau 3. Séquences des amorces et des sondes utilisées pour la PCR en temps réel.

Marq.	Amorce sens (5'---->3')	Amorce anti-sens (5'---->3')	Sonde (5'FAM---TAMRA3')
HuPO	GCTTCCTGGAGGGTGCC	GGACTCGTTGTACCGTTG	TGCCAGTGTCTGCTGCAGATTGG
TNFR1	CGGTGGAAGTCCAAGCTCA	GGGACTGAAGCTGGGTTT	CTGAAAAGAGGGGGAGCTGAAGGA
TNFR2	ACCGTGTGTGACTCCTGTGA	TCCACCTGGTCAGAGCTACA	ACTGGGTTCCCGAGTGCTTGAGCT
FLIPs	GTTCAAGGAGCAGGGACAAG	ATCAGGACAATGGGCATAGG	TGGATTGCTGCTGGAGAACATTCC
FLICE	AAGTGCCCAAACCTCACAGC	GGGGCTTGATCTAAAATGA	ACTTGGATGCAGGGCTTGACCAC

b. Le Master mix

Le Kit QuantiTect™ Probe PCR (Qiagen Inc., réf. 204343) a été utilisé pour réaliser les réactions PCR. Le kit est constitué de :

- 2 x 2 ml d'eau RNase-free pour les dilutions,
- 3 x 1,7 ml de 2X QuantiTect™ Probe PCR Master mix (tableau 4).

Le kit a été conservé à -20°C, à l'abri de lumière.

Tableau 4. Composition du QuantiTect™ Probe PCR Master mix

Composant	Propriété
HotStart Taq® DNA Polymerase	Enzyme de la polymérisation, activée par élévation de la température à 95°C
Tampon QTP (KCl + (NH ₄) ₂ SO ₄)	Optimisation de l'hybridation des amorces et sondes
DNTP mix	Substrat pour la polymérisation
ROX™	Fluorescent, référence interne
MgCl ₂ 8 mM	Cofacteur de l'enzyme

c. Les ADN standards :

Les ADN standards des gènes étudiés utilisés comme contrôles positifs ont été clonés dans des plasmides par le Dr Louise Kim (*University College London*). Ainsi pour chacun des gènes à étudier, 40 µl de plasmide standard ont été fournis à raison de 2.10^9 copies/µl. Des aliquots de 2 µl ont été réalisés et conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

METHODES

1. EXTRACTION DES ARN TOTAUX :

a. Principe :

Les ARN sont principalement localisés au niveau du cytoplasme cellulaire. L'extraction de ces ARN commence donc par la lyse de la membrane cellulaire qui a lieu dans les tubes Paxgene™Blood RNA (Qiagen) dans lesquels le sang a été collecté.

Les acides nucléiques ont ensuite été récupérés par centrifugation et les protéines cellulaires détruites par la protéinase K. Après élimination des débris cellulaires et un traitement par l'éthanol, les ARN totaux ont été purifiés sur une membrane en gel de silice. Celle-ci est en principe suffisante pour isoler spécifiquement les ARN. Cependant, un traitement à la DNase a été réalisé afin de détruire toute trace d'ADN pouvant influencer les manipulations ultérieures.

Les RNases sont des enzymes très stables et très actives qui dégradent les ARN en quelques minutes et sont difficiles à éliminer. Pour obtenir un bon rendement de l'extraction des ARN, l'activité des RNases libérées après la lyse cellulaire doit être inhibée. De plus, en général il faut éviter toute contamination accidentelle par des RNases.

b. Méthode d'extraction :

i. Contrôle de l'activité des RNases : (Selon Sambrook, et al., 1989)

Les mains, la peau et la poussière étant les sources les plus importantes de RNases, le port de gants en latex et les changements fréquents de gants ont été de rigueur pour toutes les manipulations d'ARN.

Avant et après toute utilisation impliquant des ARN, les verreries ont été traitées avec un détergent liquide et rincées à l'eau distillée. Puis, elles ont été passées à l'autoclave 20 min à 120°C et séchées dans une poupinelle pendant 20 min à 180°C .

Matériels et méthodes

Le matériel en plastique utilisé doit être stérile. Les matériaux en plastique non stériles ont été rincés avec de la soude (NaOH 0,1 M), puis de l'EDTA 1mM, et enfin avec de l'eau stérile (Eau RNase-free). Les cônes à filtre et les tubes en plastique doivent être stériles et dépourvus de RNase (garantis sans RNases par le fabricant).

Toutes les solutions ont été préparées avec de l'eau RNase-free. Elles ont ensuite été traitées par le diethyl pyrocarbonate (DEPC) à 0,1% (soit 0,1 ml de DEPC dans 100 ml de solution), qui a la propriété d'inhiber l'action des RNases en se liant de manière covalente avec les groupements amines des enzymes. La manipulation du DEPC qui est un produit nocif et cancérogène, est faite sous hotte chimique (type Sorbonne). Le mélange a été agité vigoureusement, puis on a laissé agir le DEPC pendant 12 heures dans une étuve à 37°C. Les traces de DEPC ont ensuite été éliminées par traitement à l'autoclave à 120°C pendant 15 min.

ii. Mode opératoire : (selon le manuel d'utilisation du kit Paxgene™ Blood RNA)

- Obtention des acides nucléiques cellulaires

Le tube Paxgene™ Blood RNA contenant le prélèvement sanguin a d'abord été centrifugé pendant 10 min à 3000xg (environ 4000 rpm sur la centrifugeuse Jouan BR-13). Le surnageant a été jeté avec précaution. Le culot a alors été resuspendu dans 5 ml d'eau RNase-free et, pour éviter les contaminations, le capuchon du tube Paxgene a été changé. La suspension a été alors mélangée sur un vortex, puis centrifugée 10 min à 3000xg. Après élimination du surnageant, le culot obtenu a été repris avec 360 µl de tampon de suspension BR1, puis mélangé sur un vortex.

La solution obtenue a été transférée dans un microtube Eppendorf de 1,5 ml. Puis, 300 µl de tampon de fixation BR2 ont été ajoutés dans la suspension, suivis de 40 µl de Protéinase K. Le tout a été mélangé sur un vortex et incubé pendant 10 min à 55°C dans un bain-marie agité afin de laisser agir la protéinase K.

La solution a alors été centrifugée pendant 3 min à 12000 rpm dans une microcentrifugeuse (Eppendorf, réf. 5420) afin de séparer la phase liquide des débris cellulaires. Le surnageant contenant les ARN a été transféré dans un nouveau microtube de 1,5 ml.

- Isolement des ARN totaux

Chaque échantillon a d'abord été traité avec 350 µl d'éthanol absolu pour faciliter la fixation des ARN sur le gel de silice, puis centrifugé pendant 2 secondes afin de recueillir les gouttes de liquide sur la paroi des microtubes. 700 µl d'échantillon ont été déposés sur une colonne Paxgene™ placée sur un tube collecteur. La fixation des ARN sur la membrane en gel de silice a été faite par une centrifugation de 1 min à 8000xg (environ 10000 rpm dans la

Matériels et méthodes

microcentrifugeuse Eppendorf). Puis, le reste de l'échantillon a été appliqué sur la colonne, puis centrifugé à 8000xg pendant 1 min.

- Traitement à la DNase

La membrane de la colonne a été lavée avec 350 µl de tampon BR3 et une centrifugation à 8000xg pendant 1 min, puis placée sur un nouveau tube collecteur.

Pour le traitement d'un échantillon, 10 µl de la solution stock de DNase I ont été mélangés avec précaution à 70 µl de tampon de dilution RDD ; le tout a été déposé sur la membrane de la colonne Paxgene™, puis incubé 15 min à température ambiante. Un nouveau lavage a été ensuite effectué par addition de 350 µl de tampon BR3 sur la colonne Paxgene™ et une centrifugation de 1 min à 8000xg.

Deux lavages successifs ont été réalisés en déposant 500 µl de tampon de lavage BR4 sur la membrane puis en centrifugeant 1 min à 8000xg pour le premier lavage et 3 min à 10000xg pour le second. La colonne a été ensuite centrifugée 1 min à 10000xg afin d'éliminer toute trace de tampon de lavage.

- Elution et conservation des ARN :

Pour l'élution, 40 µl du tampon d'élution BR5 ont été déposés sur la membrane de la colonne Paxgene™, et l'élution faite par une centrifugation de 1 min à 8000xg. L'eluat a été recueilli dans un tube d'élution de 1,5ml. Afin d'avoir une concentration élevée en ARN, les 40µl d'eluat ont été réappliqués sur la membrane de la colonne Paxgene™ et celle-ci a été à nouveau centrifugée pendant 1 min à 8000xg.

Les 40 µl d'eluat collectés ont ensuite été incubés dans un bain-marie à 65°C pendant 5 min afin de dénaturer les structures secondaires éventuelles des ARN (qui peuvent altérer l'efficacité de la reverse transcription), puis placés immédiatement dans la glace pour les préserver de la dégradation.

Les ARN ont été conservés à -80°C sous forme d'aliquots de 5 µl. L'eluat obtenu contient l'ARN et le tampon d'élution utilisé qui n'influence pas les réactions ultérieures.

c. Dosage des ARN extraits par spectrophotométrie :

Pour une étude quantitative de l'expression des gènes, il est important de quantifier et de déterminer la pureté et la qualité des ARN.

i. Principe (Sambrook et al., 1989)

Les ARN ont la propriété d'absorber les rayons ultraviolets à une longueur d'onde de 260 nm grâce aux composés aromatiques trouvés dans leur structure moléculaire. La concentration des ARN a donc été déterminée en mesurant l'absorbance à 260 nm (A_{260}). Une unité d'absorbance à 260 nm correspondant à 40 µg d'ARN par ml de solution, à pH neutre, la concentration C des ARN est obtenue par la relation :

$$C = 40 \text{ µg/ml} \times A_{260} \times \text{Facteur de dilution}$$

D'autre part, la pureté des ARN vis-à-vis des contaminations protéiques ou phénoliques dans une solution a pu être déterminée en mesurant le rapport entre l'absorbance à 260 nm et celle à 280 nm (A_{260}/A_{280}). Une solution pure d'ARN a un rapport A_{260}/A_{280} situé entre 1,7 et 2,1 dans les conditions où les dilutions sont faites à l'aide d'un tampon Tris-HCl à pH 7,5 [Wilfinger et al., 1997].

ii. Technique

Les manipulations doivent se faire autant que possible sur de la glace afin de minimiser l'action des éventuelles RNases et préserver les réactifs. Les gants et les cônes utilisés lors des pipetages doivent être fréquemment changés.

Les aliquots d'extraits d'ARN à doser ont d'abord été décongelés sur de la glace, mélangés sur un vortex, puis centrifugés pendant 5 sec pour recueillir les liquides résiduels sur la paroi des tubes. Chaque échantillon d'ARN a été dilué en ajoutant 7 µl d'ARN dans 93 µl de tampon Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), mélangé sur un vortex, puis centrifugé pendant 5 sec et replacé sur la glace.

Chaque échantillon dilué a été transféré dans une cuve plastique à usage unique [Ultravette Micro, LABOSI, réf A1218097] et capuchonné pour éviter les contaminations. Une solution de 100 µl de tampon Tris-HCl 10 mM pH 7,5 a été utilisée comme blanc. Les mesures des absorbances à 260 nm, puis à 280 nm (A_{260} et A_{280}) ont été faites à l'aide d'un spectrophotomètre (Ultrospec Plus, LKB/Biochrom, réf. 4054 UV).

d. Détermination de l'intégrité des ARN extraits par électrophorèse sur gel dénaturant de Formaldéhyde-Agarose (FA)

i. Principe

L'intégrité des ARN totaux peut être déterminée par une électrophorèse sur gel dénaturant à base d'agarose associée au bromure d'éthidium. Comme 80 à 85% des ARN des cellules de mammifères sont composés d'ARN ribosomaux (ARNr), la visualisation de ces ARNr, qui doivent être bien distincts sur le gel, permet de vérifier la qualité des ARN totaux. Chez l'homme, les ARN 28S et 18S doivent donner des bandes de tailles respectives 5 Kb et 1,9 Kb. Si celles-ci ne sont pas bien distinctes mais apparaissent comme une traînée ou « smear » sur le gel utilisé, cela signifie que les ARN de l'échantillon sont dégradés.

ii. Technique

Pour préparer un minigel (taille 10x14x0,7 cm), 0,3 g d'agarose (Gibco BRL, réf. 15510-027) ont été mélangés à 10 ml de tampon 10X FA, puis le volume final a été ajusté à 25ml avec de l'eau RNase-free. Le tout a été chauffé dans un four à micro-onde pour faire fondre l'agarose. Après, addition de 450 µl de formaldéhyde 36% (Prolabo, réf. 20 910 294) et 1 µl de bromure d'éthidium 10 mg/ml, le gel a été coulé sur le support du gel et solidifié à température ambiante pendant 20 min. Puis, le gel a été équilibré dans le tampon de migration 1X FA pendant 30 min.

A chaque échantillon d'ARN, 1/4 du volume de tampon 5X pour ARN a été additionné et le tout déposé dans un puits du gel. 1 µl d'ARN 0,5-10 Kb *Ladder* (Invitrogen, réf. 15623-200) a été utilisé comme marqueur de taille des ARN.

L'électrophorèse a été réalisée sous une tension de 100 V pendant 20 min. Le gel a été visualisé sur un transluminateur à ultraviolets et pris en photo avec un appareil Polaroid MP4.

2. QUANTIFICATION DES ARN PAR LA RT-PCR EN TEMPS EN TEMPS REEL:

Comme l'ARN ne peut pas servir de matrice pour la PCR, la première étape de la RT-PCR (Reverse transcription-PCR) est la transformation de l'ARN matrice en ADNc ou transcription reverse (figure 6).

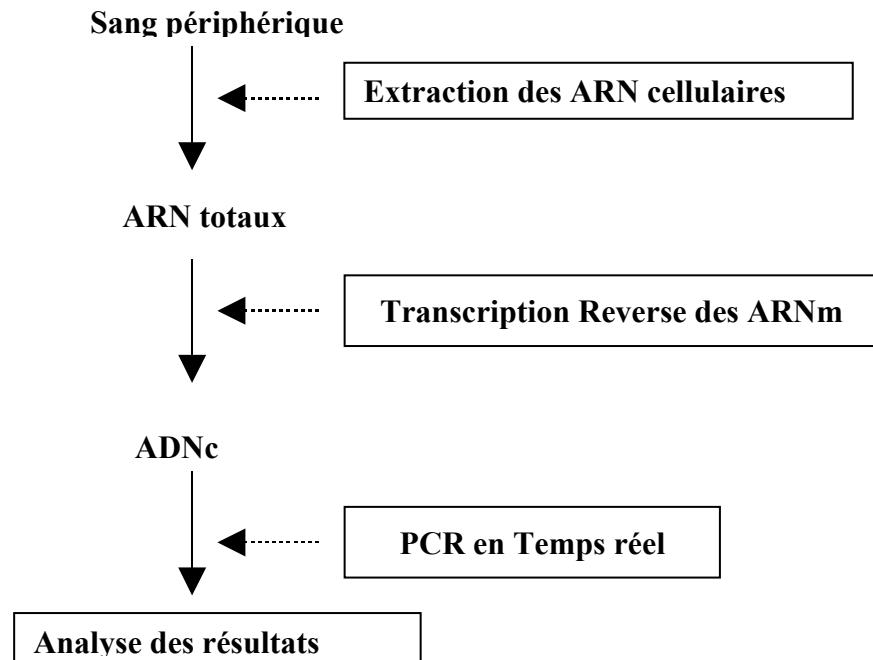


FIGURE 6. Les étapes de l'étude de l'expression des gènes à partir de prélèvements sanguins.

a. Transcription reverse :

Comme les ARNm sont caractérisés par la présence d'une queue poly(A) sur leur extrémité 3', ils peuvent être spécifiquement transcrits en ADNc en utilisant l'Oligo(dT)₁₅ comme amorce pour la transcriptase reverse (figure 7).

La transcription reverse a été faite suivant les instructions du kit *Omniscript® Reverse Transcription*. Brièvement, tous les réactifs nécessaires pour la réaction de reverse transcription ont d'abord été mélangés dans un mix (tableau 5). Pour chaque échantillon, 5 µl d'ARN ont été ensuite ajoutés à 15 µl de mix, le tout a été mélange et incubé à 37° C pendant une heure, dans un thermocycleur (Thermocycleur Flexigène).

A la fin de l'incubation, les tubes réactionnels ont été immédiatement placés dans la glace. Un volume de 80 µl d'eau purifiée HPLC a alors été ajouté dans chacun des produits obtenus pour avoir une dilution au 1/5, et des aliquots de 10 µl ont alors été réalisés. Les ADNc peuvent être ainsi conservés à –80° C pendant 6 mois.

Matériels et méthodes

Tableau 5. Préparation du mix pour la transcription réverse avec le kit Omniscript® Reverse Transcription.

Réactifs	Volume/réaction	Concentration finale (20µl de réaction)
Tampon 10x RT	2,0 µl	1x
dNTP 5mM	2,0 µl	0,5 mM
Amorce Oligo(dT) ₁₅ (10µM/µl)	2,0 µl	1 µM
Recombinant de RNAsIn (10 unités/µl)	1,0 µl	0,5 unités/µl
Omniscript Reverse Transcriptase (8 unités/µl)	1,0 µl	0,2 unités/µl
Eau RNase-free qsp	15 µl	

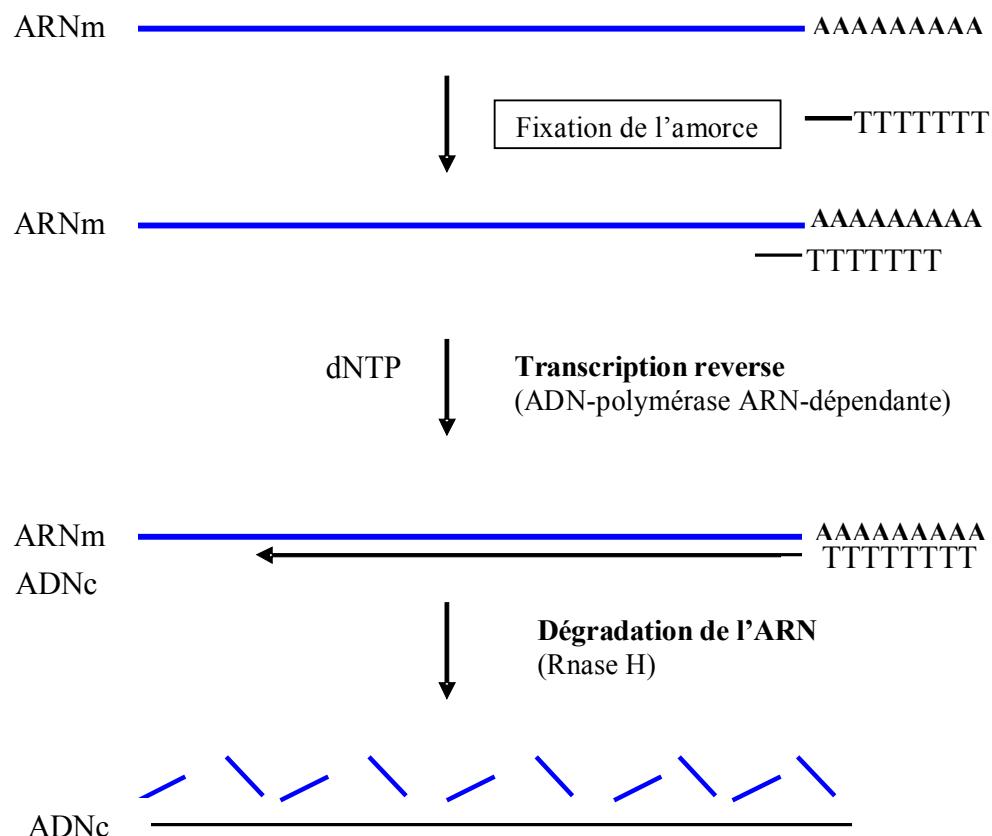


FIGURE 7. Principe de la synthèse du premier brin de l'ADNc par transcription réverse.

b. La PCR en temps réel :

La PCR a été réalisée dans l'appareil Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Sidney, Australie) avec la méthode et le principe de FRET des sondes oligonucléotidiques TaqMan™.

i. Appareillage : Le Rotor-Gene 3000

La machine Rotor-Gene 3000 est un appareil qui permet d'amplifier des gènes et d'analyser les produits de la PCR, en temps réel. L'amplification des gènes se fait dans un thermocycleur et la progression de chaque réaction est suivie grâce à un fluoromètre relié à un ordinateur (figure 8).

L'analyse des résultats de la PCR en temps réel a été réalisée avec le logiciel Rotor-Gene Version 6.0 (build 23).



FIGURE 8. Le système Rotor-Gene 3000 (RG 3000).

ii. Principe de la quantification des produits de la PCR en temps réel:

- La courbe d'amplification :

Pendant l'étape d'hybridation des amorces, la sonde bi-marquée s'hybride aussi à la matrice d'ADN et le phénomène de FRET a alors lieu (figure 5a). Lors de la phase d'extension, l'activité 5'→3'-exonucléasique de la polymérase utilisée va cliver la sonde cessant ainsi l'action extinctrice du quencher (figue 5b). Le rapporteur peut ainsi émettre une fluorescence détectable. La sonde étant associée de manière spécifique à un produit PCR et n'étant clivée que si elle s'hybride à sa matrice, l'augmentation de la fluorescence émise lors

Matériels et méthodes

de chaque étape est proportionnelle au taux de clivage de chaque sonde et par conséquent, au nombre d'amplicons (figure 9).

Les résultats sont collectés et analysés au cours de l'amplification, dont l'évolution peut être représentée par une courbe d'allure sigmoïde (figure 10). Cette courbe d'amplification représente la fluorescence émise par rapport au nombre de cycles de PCR. Elle est divisée en deux phases. La première phase correspond à une amplification exponentielle qui est modélisable car la quantité de fluorescence émise lors de cette phase est directement proportionnelle au nombre de fragments d'ADN amplifiés. En revanche, la deuxième phase, en plateau, correspond à un ralentissement de l'amplification [Swillens et al., 2004]. Une ligne seuil est choisie dans la phase exponentielle de la courbe d'amplification [Collot et al., 2001].

Le cycle seuil ou C_t ("cycle threshold") correspond à la valeur en abscisse du point d'intersection de la courbe d'amplification et de la ligne seuil. La valeur de C_t est proportionnelle au nombre initial de copies d'ADN cible.

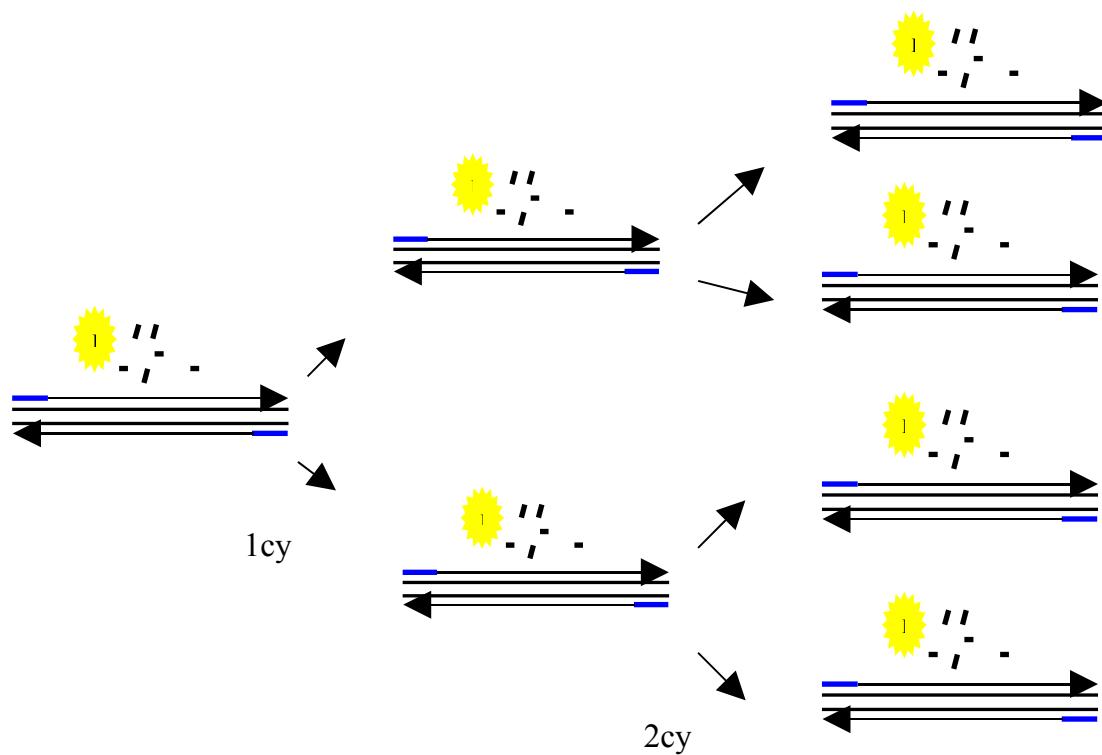


FIGURE 9. Schéma représentant l'évolution du nombre d'amplicons et l'intensité de la fluorescence émise (en jaune) par rapport au nombre de cycle PCR (Cy).

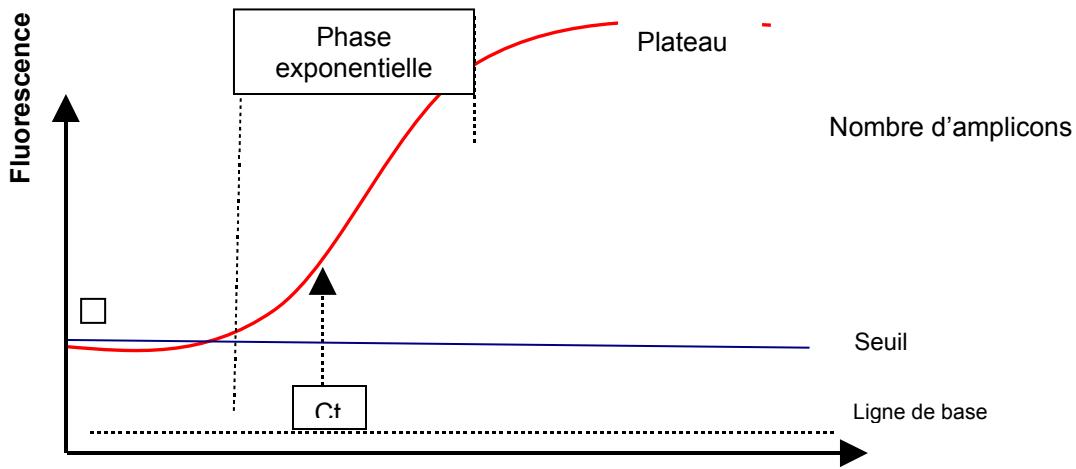


FIGURE 10. Caractéristiques d'une courbe d'amplification

- Courbe standard (ou étalon) :

Une courbe standard est construite à partir des C_t obtenus après amplification d'une gamme de concentrations connues d'ADN standard (figure 11). Ainsi, la quantité initiale d'ADN cibles de l'échantillon à analyser peut être déduite à partir des C_t de la courbe standard obtenue [M.W. Pfaffl & M. Hageleit, 2001], selon la relation définissant un lien entre le nombre initial de copies d'ADN cible, l'efficacité de l'amplification et le cycle seuil (C_t) :

$$\log (N_0) = -\log (E+1) C_t + \log (N_t) \quad (\text{R.G. Rutledge et C. Côté, 2003})$$

où : N_0 : nombre initial d'ADN cible

E : efficacité de l'amplification

C_t : cycle seuil de l'échantillon

N_t : nombre total d'amplicons à C_t

Cette relation est déduite de l'équation décrivant la réaction PCR : $N_t = N_0 (E+1)^{C_t}$ où $E=1$ quand l'amplification par PCR est parfaite. De cette même équation, on obtient le coefficient de corrélation de Pearson "R", qui donne la correspondance entre la quantité de fluorescence attendue et la quantité réelle obtenue après l'amplification des ADN standards (une correspondance parfaite entre valeur théorique et valeur trouvée équivaut à 1).

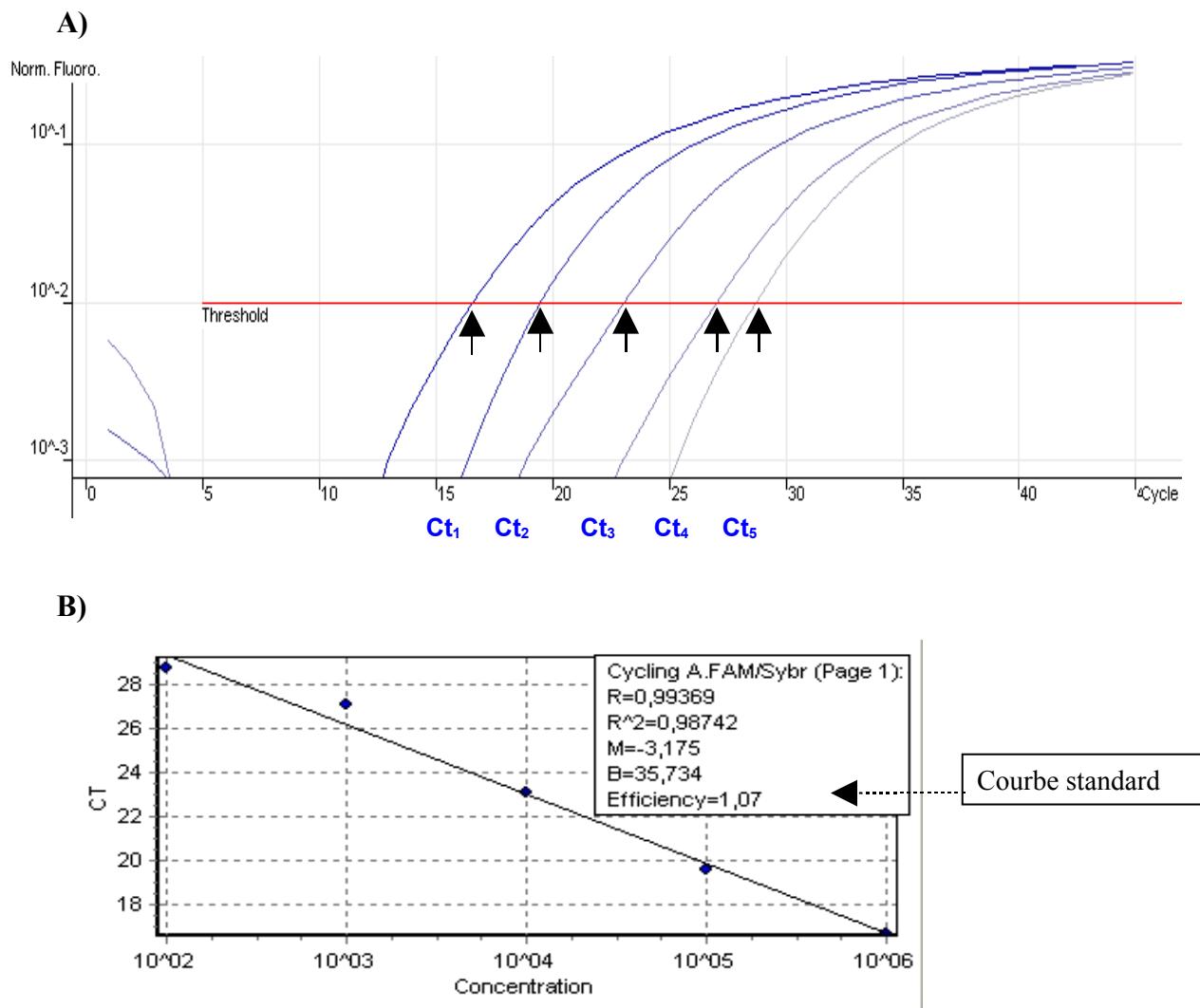


FIGURE 11. Courbes d'amplifications construites avec des ADN standards et la courbe standard correspondante. (A) Les C_t sont indiqués par des flèches sur les courbes d'amplifications.

(B) Courbe standard obtenue avec ces caractéristiques (pente M , coefficient de Pearson R et R^2 , $Nt=B$ et l'efficacité E).

- Quantification des ARNm par rapport à un contrôle endogène :

L'expression des gènes varie d'un individu à un autre. Pour que la RT-PCR en temps réel reflète les conditions réelles *in vivo*, la quantification des ARNm est normalisée par rapport à un gène de référence interne ou contrôle endogène appelé "Housekeeping Gene" (HKG) (S.A. Bustin, 2000 ; S.A. Bustin et T. Nolan ,2004 ; T.D. Schmittgen et B.A. Zakrajsek, 2000). Ces gènes de référence sont des gènes supposés être exprimés de manière constante et abondante chez tous les groupes expérimentaux, indépendamment de l'étude [Pfaffl et al., 2001; Vandesompele et al., 2002].

Matériels et méthodes

Pour l'étude de l'expression des gènes chez les patients tuberculeux et leurs contacts, le gène de référence utilisé est celui qui code pour la « Human Acidic ribosomal Protein » ou HuPO, protéine ribosomale intervenant dans la synthèse protéique [M Tchorzewski, 2002]. L'expression du gène codant pour HuPO se fait de manière constante, abondante et indépendante par rapport à la tuberculose [Dheda et al., 2004].

ii. Technique :

- Préparation du mélange réactionnel pour la PCR :

Pour éviter toute contamination éventuelle, la préparation de la réaction PCR a été effectuée dans 2 pièces différentes : 1) la salle « mix » où a été préparé le mélange de réactifs et, 2) la salle où a été faite l'addition des ADN.

Les solutions stocks (100 µM) d'amorces et de sondes ont d'abord été diluées avec de l'eau RNase-free pour avoir une solution de travail de concentration 20 µM.

La réaction PCR a été réalisée dans des tubes de 0,1 µl (Corbett Research, réf. ST-1004), dans un volume réactionnel de 12,5µl dont la composition est donnée dans les tableaux 6 et 7. Pour les témoins négatifs, 5 µl d'eau purifiée ont été utilisés à la place de l'ADNc :

- pour le témoin « mix », l'eau a été additionnée dans la salle « mix »,
- pour le témoin « addition d'ADN », l'eau a été additionnée dans la salle d'addition

Pour la construction des courbes standards, les plasmides (2.10⁹/µl) ont été dilués avec de l'eau HPLC selon une gamme de dilutions allant de 1/10³ à 1/10⁷ soit 10³ à 10⁷ copies de plasmides par réaction pour le gène *HuPO* ; et une gamme de dilutions allant de 1/10⁴ à 1/10⁸, soit 100 à 10⁶ copies par réaction pour les 4 marqueurs.

Tableau 6. Composition du mélange réactionnel pour la PCR des ADNc de *FLICE* et *TNFR2*.

Réactifs	Quantité/tube (µl)	Concentration finale par réaction
2X QTP PCR Master mix	6,25	1X
Amorce sens 20µM	0,250	400 nM
Amorce anti-sens 20µM	0,250	400 nM
Sonde	0,125	200 nM
ADNc	5,00	
Eau qsp	12,5 µl	

Matériels et méthodes

Tableau 7. Composition du mélange réactionnel pour la PCR des ADNc de *HuPO*, *TNFR1* et *FLIPs*.

Réactifs	Quantité/tube (μl)	Concentration finale par réaction
2X QTP PCR Master mix	6,25	1X
Amorce sens 20μM	0,313	500 nM
Amorce anti-sens 20μM	0,313	500 nM
Sonde 20μM	0,188	300 nM
ADNc	5,00	
Eau qsp	12,5 μl	

- Réalisation de la PCR en temps réel sur le Rotor-Gene 3000 :

Le Rotor « 72 puits » (« 72-well rotor ») du Rotor-Gene 3000 permet l'analyse de 72 échantillons. Chaque expérience comprenait :

- 30 échantillons d'ADNc différents en duplicate,
- une série de 5 dilutions des ADN standards en duplicate,
- deux témoins négatifs (témoin mix et témoin « addition d'ADN »).

L'amplification par PCR a été faite selon les étapes suivantes :

- une incubation de 15 min à 95° C pour activer la HotStart Taq DNA Polymérase,
- 45 cycles comprenant chacun
 - une dénaturation de 95°C pendant 10 sec,
 - une étape d'hybridation des amores et de la sonde de 20 sec (voir les températures d'hybridation pour chaque gène dans le tableau 8),
 - une étape d'extension de 72°C pendant 30 sec. L'acquisition de la fluorescence émise a été faite au niveau de l'étape d'extension de chaque cycle.

La technique a d'abord été mise au point avec les ADN standards fournis par le Dr Louise Kim (*University College London*). Pour chaque marqueur étudié, une PCR a été réalisée avec une gamme de dilutions d'ADN standard en duplicate et la courbe standard a été construite. Les résultats ont été comparés avec ceux obtenus par le Dr Louise Kim.

L'expression des ARNm des marqueurs ont été étudiés sur les prélèvements sanguins appartenant à 12 patients tuberculeux à microscopie positive, 40 sujets contacts et 4 contrôles.

Tableau 8. Température d'hybridation des amorces et des sondes et taille attendue des amplicons.

ADNc	Température d'hybridation (°C)	Taille de l'amplicon (pb)
HuPO	55	105
TNFR1	57	114
TNFR2	57	101
FLIPs	58	114
FLICE	59	102

iv. Analyse de la PCR en temps réel :

Les données de la fluorométrie obtenues lors de la PCR en temps réel ont été collectées et analysées sur le logiciel Rotor-Gene 6.0 (build 23). Pour toutes les réactions, la ligne seuil a été fixée à 10^{-2} dans la phase exponentielle de la courbe d'amplification. Les duplicates de la courbe standard ont été choisis de manière à obtenir le maximum d'efficacité de l'amplification.

Le logiciel donne les valeurs de Ct de chacun des échantillons amplifiés ainsi que les valeurs moyennes pour chaque duplicate et calcule alors le nombre de copies d'ADN initial.

3. DÉTERMINATION DE L'INFECTION À *M. TUBERCULOSIS* CHEZ LES SUJETS :

Afin d'évaluer le taux d'infection par *M. tuberculosis* de chaque sujet, le test ELISPOT a été effectué en parallèle avec la RT-PCR en temps réel par les techniciens de l'unité des mycobactéries de l'IPM.

Le test ELISPOT permet de dénombrer le nombre de cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) sécrétrices d'IFN γ , après stimulation de celles-ci par des antigènes spécifiques de l'infection par *M. tuberculosis* (CFP 10, ESAT 6 et le PPD). Ce test a été réalisé d'après les travaux de Mori et al. en 2004. Brièvement, les PBMC stimulés ont été déposées dans les puits d'une microplaquette marquée avec un anticorps anti-IFN γ . L'IFN γ sécrété par les cellules a alors été révélé à l'aide d'un anticorps α -IFN γ biotinylé et un conjugué streptavidine-phosphate alcaline. Chaque cellule secrétant de l'IFN γ est révélée par un spot. Un nombre seuil de spots a été défini pour déterminer la positivité de l'infection.

Matériels et méthodes

Il est égal à la somme de la moyenne + 3 écart-types du nombre des spots obtenus avec les PBMC non stimulées.

De plus, le test IDR a été effectué pour chaque sujet afin de connaître la sensibilité du système immunitaire à médiation cellulaire. Les résultats de l'IDR ont été notés (-) pour les sujets IDR négatifs, c'est-à-dire une IDR < 5mm, (++) pour une IDR comprise entre 5 et 14mm, et (+++) pour une IDR > 14mm. Les expressions des gènes à tester ont ensuite été analysées selon la sensibilité des sujets aux antigènes mycobactériens utilisés.

4. ANALYSE DES DONNÉES :

L'analyse des données a été faite avec le concours de l'unité d'épidémiologie de l'IPM.

Les résultats de la quantification des ARNm ont été sauvegardés sous fichier texte, puis ouverts sous le logiciel Excel. Le nombre initial de copies de chaque ADNc étudié a été normalisé par rapport au contrôle interne (HuP0). Ainsi, le nombre de copies d'ADNc cible a été rapporté à 10^5 copies d'ADNc de HuPO.

Tous les résultats (infection du sujet par *M. tuberculosis*, valeur normalisée de l'expression de chaque marqueur immunologique) ont été transférés dans un fichier ACCESS contenant les informations cliniques de chaque sujet.

Les données ont ensuite été transformées sous fichier d-Base, puis transférées sur le logiciel Epi Info version 6.04dfr (CDC, USA et OMS, Genève, Suisse).

Trois types d'analyse ont été effectués :

- étude de l'expression de chacun des marqueurs étudiés en comparant la moyenne des nombres de copies d'ADNc entre les 3 groupes de sujets (cas index, contacts et contrôles), puis entre les groupes pris deux à deux.

- analyse de l'expression de ces marqueurs en fonction du taux d'infection par *M. tuberculosis* (d'après les résultats des tests ELISPOT).

- analyse de l'expression des marqueurs en fonction des tests IDR.

Dans chaque groupe, nous avons calculé les intervalles de confiance à 95% de la moyenne des valeurs de l'expression de chaque marqueur. Une comparaison des moyennes obtenues par groupe a été réalisée et testée selon le test de Kruskal-Wallis et le test de Mann-Whitney pour les études entre 2 groupes. Une différence a été considérée significative pour $P < 0,05$.

RESULTATS

Résultats

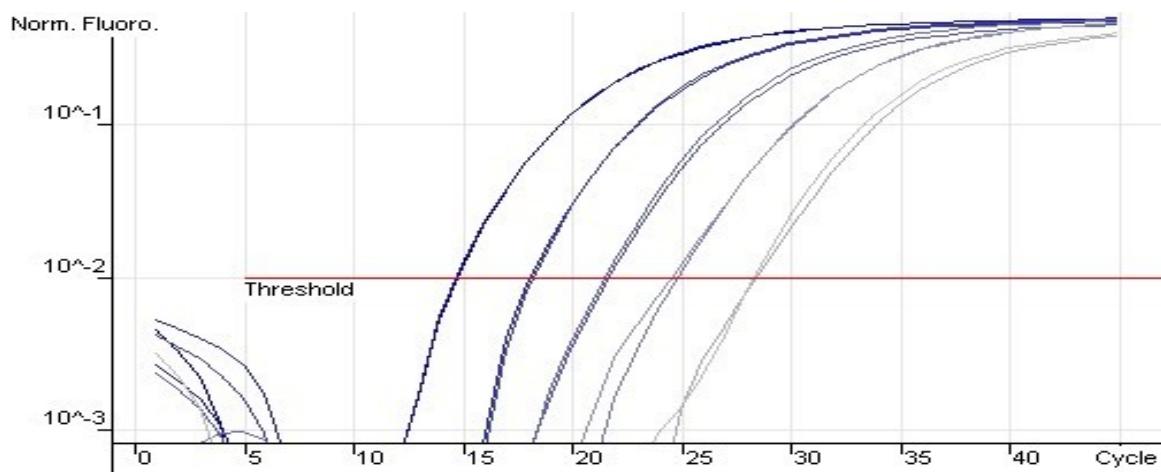
1. MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE DE PCR EN TEMPS REEL :

La méthode de PCR en temps réel a été dans un premier temps testée avec les ADN standards de HuPO et des 4 marqueurs TNFR1, TNFR2, FLIPs et FLICE. Les courbes standards ont été construites. Un exemple de courbe standard avec les ADN standards de HuPO est donné sur la figure 12 et la quantification est donnée dans le tableau 9.

Pour chacun des marqueurs, l'efficacité de la PCR a été supérieure à 90% et les coefficients de corrélation R et R^2 ont été supérieurs à 0,99.

Les résultats concordaient bien avec ceux obtenus par Louise Kim (*University College London*). La technique a donc pu être utilisée pour la quantification des ARNm.

A)



B)

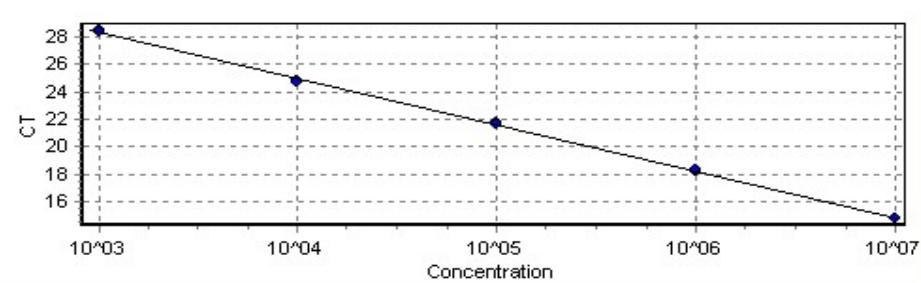


FIGURE 12. Courbes d'amplifications (A) et courbe standard (B) obtenues lors de l'amplification d'une gamme de dilution d'ADN standards de HuPO.

Résultats

Tableau 9. Quantification d'une gamme de dilution d'ADN standards avec deux témoins négatifs. La variation (% Var) entre le nombre de copies attendu (Given Conc.) et le nombre de copies observés (Calc Conc) est obtenue par extrapolation des valeurs des Ct sur la courbe standard.

No.	Colour	Name	Type	Ct	Given Conc (Copies)	Calc Conc (Copies)	% Var
H5		Hupo 1/10 ³	Standard	14,79	10 000 000	10 004 975	0,0%
H6		Hupo 1/10 ³	Standard	14,75	10 000 000	10 290 981	2,9%
H7		Hupo 1/10 ⁴	Standard	18,14	1 000 000	1 025 351	2,5%
H8		Hupo 1/10 ⁴	Standard	18,29	1 000 000	925 188	7,5%
I1		Hupo 1/10 ⁵	Standard	21,74	100 000	89 249	10,8%
I2		Hupo 1/10 ⁵	Standard	21,57	100 000	99 901	0,1%
I3		Hupo 1/10 ⁶	Standard	24,88	10 000	10 583	5,8%
I4		Hupo 1/10 ⁶	Standard	24,65	10 000	12 389	23,9%
I5		Hupo 1/10 ⁷	Standard	28,50	1 000	904	9,6%
I6		Hupo 1/10 ⁷	Standard	28,40	1 000	969	3,1%
I7		T Hotte	NTC				
I8		T mix	NTC				

2. QUALITÉ DES ARN EXTRAITS:

Les ARN totaux extraits à partir de prélèvements de sang périphérique avaient une concentration moyenne de 93 ± 53 ng/ μ l d'extraits. Afin de déterminer la contamination phénolique ou protéique, le rapport A_{260}/A_{280} a été calculé et une valeur moyenne de $2,2 \pm 0,33$ a été observée pour tous les extraits d'ARN obtenus, démontrant leur pureté.

Pour la majorité des ARN extraits, l'électrophorèse sur gel dénaturant à base de formaldéhyde-agarose a permis d'observer distinctement les 2 bandes correspondant aux ARNr 18S et 28S (figure 13), témoignant de l'intégrité et de la bonne qualité des ARN.

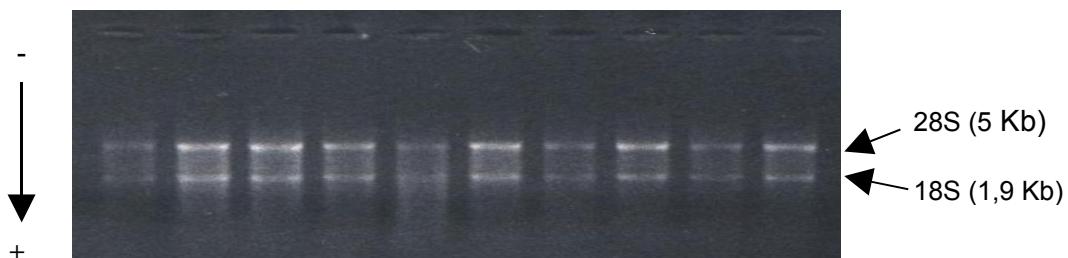


FIGURE 13. Electrophorèse des ARN sur gel dénaturant de formaldéhyde-agarose. Les 2 bandes visibles pour chaque échantillon correspondent aux ARNr 28S et 18S.

Résultats

3. VALIDATION DE L'UTILISATION DU GÈNE *HUPO* COMME RÉFÉRENCE INTERNE :

Les ARNm correspondant à l'expression du gène de référence interne, *HuPO* ont été détectés et quantifiés chez tous les sujets de l'étude.

Le nombre moyen de copies d'ADNc de *HuPO* (moyenne \pm écart-type) a été de :

- $209\ 544 \pm 196\ 309$ copies chez les cas index (n=12),

- $206\ 207 \pm 146\ 692$ copies chez les témoins (n=4),

- $218\ 591 \pm 207\ 307$ copies chez les sujets contacts (n=40, figure 14).

La comparaison du nombre moyen de copies d'ADNc de *HuPO* entre les 3 groupes de sujets n'a montré aucune différence significative ($P=0,9897$). Ces données ont donc permis de valider l'utilisation de ce gène comme référence interne pour normaliser la quantification de l'expression des marqueurs étudiés.

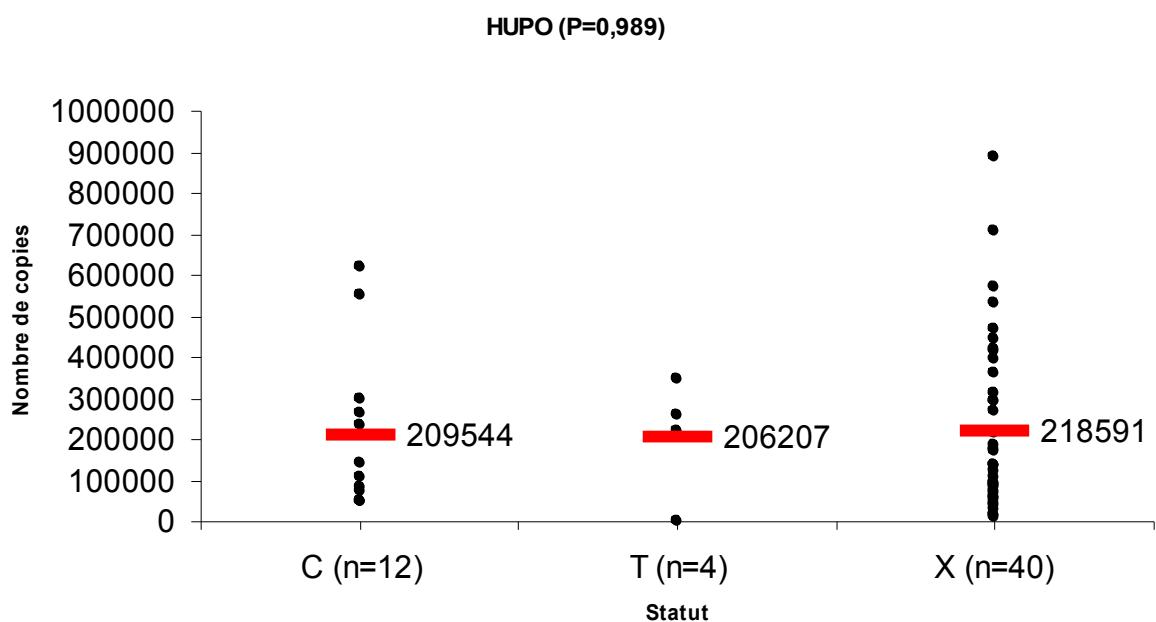


FIGURE 14. Expression des ARNm de *HuPO* chez des patients tuberculeux (C), chez leurs contacts (X) et chez des témoins (T). La barre rouge (—) représente le nombre moyen de copies obtenu pour chaque groupe.

Résultats

4. EXPRESSION DES MARQUEURS IMMUNOLOGIQUES CHEZ LES CAS INDEX, LES TÉMOINS ET LES CONTACTS :

a. Expression des gènes des récepteurs 1 et 2 du TNF (TNFR1 et TNFR2) :

La figure 15 montre les résultats de la quantification des ARNm sanguins correspondant aux récepteurs TNFR1 et TNFR2 chez les trois groupes de sujets.

Concernant le nombre de copies d'ARNm du gène *TNFR1*, pour 10^5 de copies d'ARNm de HuPO, on a observé une moyenne de :

- 897 ± 548 copies d'ARNm par sujet chez les cas index,
- 1273 ± 283 copies chez les témoins,
- 579 ± 685 copies chez les sujets contacts (figure 15A).

La comparaison du nombre moyen de copies de *TNFR1* entre les 3 groupes de sujets a montré une différence significative ($P=0,05$). Cette différence était plus marquée entre les sujets contacts et les témoins ($P= 0,04$), alors qu'aucune différence significative n'a été observée d'une part entre les témoins et les cas index ($P=0,27$), d'autre part entre les contacts et les cas index ($P=0,1$).

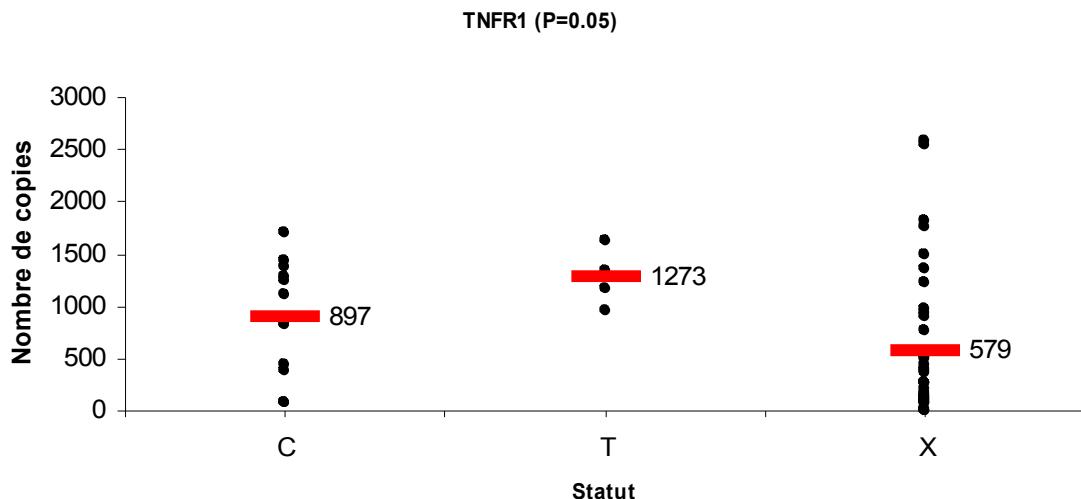
Concernant le nombre de copies d'ARNm du gène *TNFR2*, pour 10^5 de copies d'ARNm de HuPO, on a observé une moyenne de :

- 841 ± 1107 copies chez le groupe des cas index,
- 858 ± 390 chez les témoins,
- 363 ± 483 copies chez les contacts (figure 15B).

La comparaison du nombre moyen de copies de *TNFR2* entre les 3 groupes de sujets a montré une différence significative ($P=0,03$). Cette différence était plus marquée entre les sujets contacts et les témoins ($P= 0,03$), alors qu'aucune différence significative n'a été observée d'une part entre les témoins et les cas index ($P=0,39$), d'autre part entre les contacts et les cas index ($P=0,08$).

Résultats

A)



B)

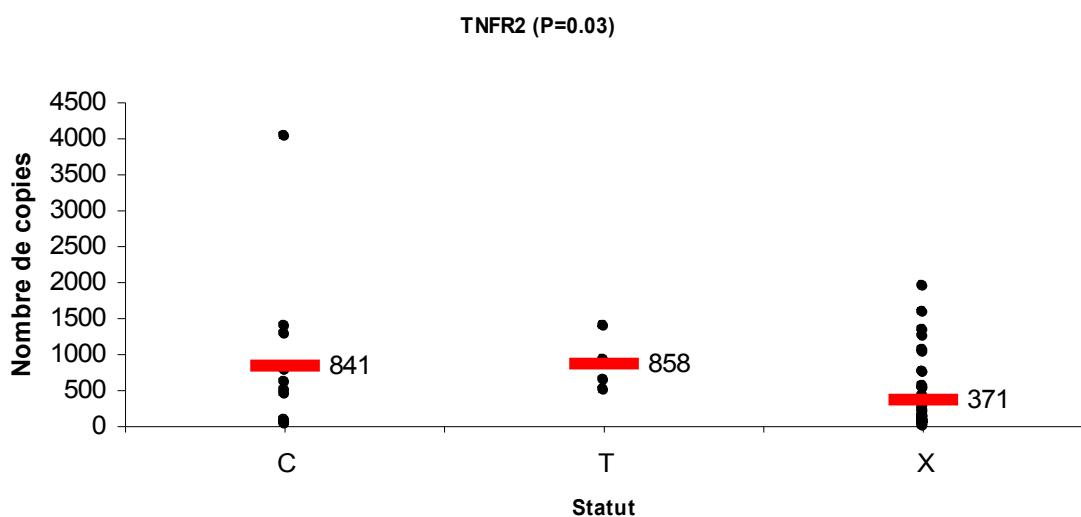


FIGURE 15. Expression des ARNm de TNFR1 et TNFR2 chez les patients tuberculeux « C », leurs contacts « X » et des témoins « T » pour 10^5 copies de HuPo. (A) Expression des ARNm de TNFR1. (B) Expression des ARNm de TNFR2. La barre rouge (—) représente le nombre moyen de copies obtenu pour chaque groupe. Une différence significative entre les trois groupes est donnée par une valeur de $P<0.05$.

b. Expression des gènes apoptotiques codant pour FLICE et FLIPs:

Résultats

Concernant le nombre de copies d'ARNm du gène *FLICE* (figure 16A), pour 10^5 de copies d'ARNm de HuPO, on a observé une moyenne de :

- 146 ± 128 copies d'ARNm par sujet chez les cas index,
- $338 \pm 106,5$ copies chez les témoins,
- 151 ± 186 copies chez les sujets contacts.

La comparaison du nombre moyen de copies de *FLICE* entre les 3 groupes de sujets a montré une différence significative ($P=0,04$). Cette différence était plus marquée entre les sujets contacts et les témoins ($P= 0,01$), d'une part et entre les témoins et les cas index ($P=0,04$) d'autre part. Aucune différence significative n'a été observée entre les contacts et les cas index ($P=0,63$).

Concernant le nombre de copies d'ARNm du gène *FLIPs* (figure 16B), pour 10^5 de copies d'ARNm de HuPO, on a observé une moyenne de :

- 323 ± 389 copies chez le groupe des cas index,
- 121 ± 104 chez les témoins,
- 199 ± 223 copies chez les contacts.

La comparaison du nombre moyen de copies de *FLIPs* entre les 3 groupes de sujets (tableau 10) n'a montré aucune différence significative ($P=0,56$). Aucune différence n'a été observée entre les sujets contacts et les témoins ($P= 0,56$), entre les témoins et les cas index ($P=0,39$), et entre les contacts et les cas index ($P=0,39$).

Tableau 10. Comparaison de l'expression des marqueurs étudiés entre les différents groupes de sujets par les valeurs P .

Marqueurs	C versus T	T versus X	X versus C
TNFR1	0,27	0,043*	0,1
TNFR2	0,39	0,03*	0,08
FLIPs	0,39	0,56	0,39
FLICE	0,039*	0,01*	0,63

*Variation significative ($P<0,05$)

A)

Résultats

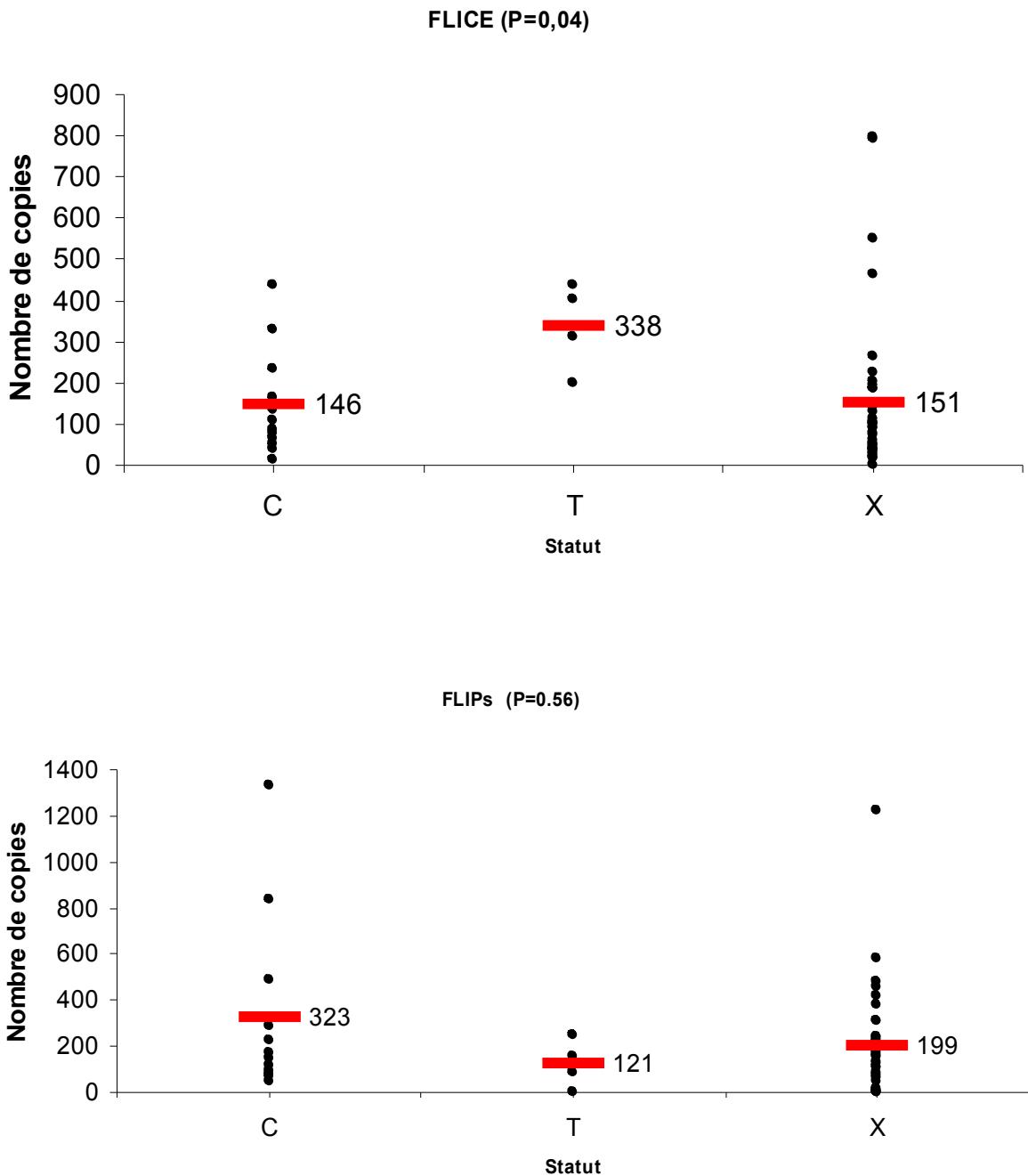


FIGURE 16. Expression des ARNm de *FLICE* et *FLIPs* chez les patients tuberculeux « C », leurs contacts « X » et des témoins « T » pour 10^5 copies de *HuPO*. (A) Expression des ARNm de *FLICE*. (B) Expression des ARNm de *FLIPs*. La barre rouge (—) représente le nombre moyen de copies obtenu pour chaque groupe. Une différence significative entre les trois groupes est donnée par une valeur de $P<0.05$.

5. EXPRESSION DES MARQUEURS IMMUNOLOGIQUES SELON LA SENSIBILITÉ AUX ANTIGÈNES DE *M.*

TUBERCULOSIS

Résultats

Le résultat des tests ELISPOT est donné dans le tableau 11. Les sujets ESAT6 positifs et/ou CFP10 positifs sont considérés comme infectés par les BK. L'expression des ARNm correspondant aux 4 marqueurs a été comparée entre les sujets infectés et non infectés (tableau 12).

Aucune différence significative n'a été observée dans l'expression des ARNm de TNFR1, TNFR2 et FLICE ($p>0,05$). Cependant, le nombre de copies moyen de FLIPs est significativement inférieur chez les sujets ESAT6 positifs ($P= 0,04$) et CFP10 positifs ($P= 0,04$, figure 17). Par contre la différence n'est pas significative avec le PPD ($p=0,20$).

Tableau 11. Taux d'infection des sujets de l'étude d'après le test ELISPOT avec 3 antigènes spécifiques de *M. tuberculosis*.

	Etat	CFP10	ESAT6	PPD	%(n=56)
Inclusion (J0)	Infecté	29	23	38	54%
	Non infecté	27	33	18	46%

Tableau 12. Expression moyenne des marqueurs immunologiques par rapport à la sensibilité aux antigènes de *M. tuberculosis* chez tous les sujets. Nombre de copies d'ARNm pour 10^5 copies de HuPO.

Marqueur		CFP 10		ESAT 6		PPD	
TNFR1	NI	1043 ± 1301	P= 0,12	875 ± 1228	P= 0,89	1186 ± 1516	P= 0,4
	I	581 ± 617		707 ± 639		624 ± 631	
TNFR2	NI	637 ± 855	P= 0,22	513 ± 787	P= 0,89	652 ± 952	P= 0,22
	I	374 ± 452		483 ± 514		429 ± 511	
FLIPs	NI	217 ± 339	P= 0,04*	207 ± 309	P= 0,04*	248 ± 394	P= 0,20
	I	222 ± 133		238 ± 185		206 ± 177	
FLICE	NI	189 ± 212	P= 0,61	168 ± 197	P= 0,74	228 ± 243	P= 0,19
	I	140 ± 133		157 ± 144		132 ± 125	

*Variations significatives ($P<0,05$). I=Infecté, NI= Non infecté

Résultats

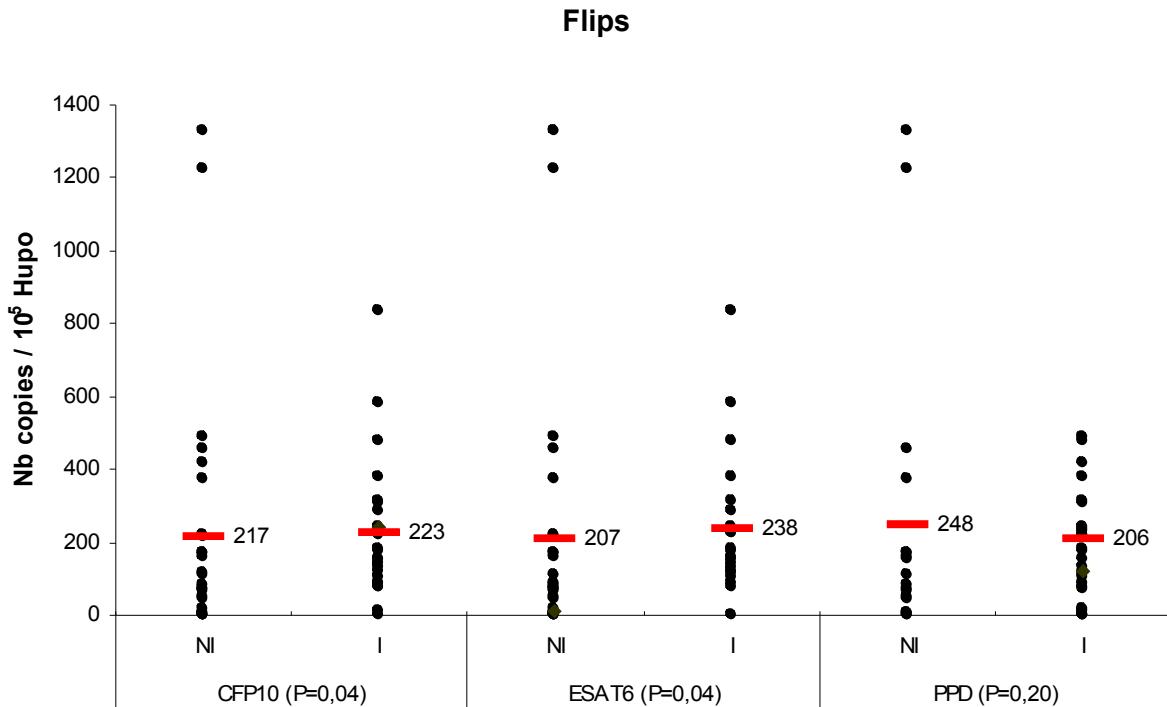


FIGURE 17. Expression du gène Flips chez les contacts selon la sensibilité aux antigènes de *M. tuberculosis* pour 10⁵ copies de HuPO. La barre rouge (—) représente le nombre moyen de copies obtenu pour chaque cas. Une valeur de $P < 0,05$ est considérée comme significative. NI= non infecté ; I= infecté.

Le tableau 13 représente la comparaison des résultats obtenus pour les sujets contacts uniquement. Aucune différence significative n'est constatée pour l'expression de chaque gène par rapport à la sensibilité aux antigènes mycobactériens ($P > 0,05$).

Tableau 13. Comparaison de l'expression des marqueurs immunologiques par rapport à la sensibilité aux antigènes de *M. tuberculosis* chez les sujets contacts de tuberculeux représentée par les valeurs P

Marqueur	CFP 10	ESAT 6	PPD
TNFR1	0,80	0,55	0,86
TNFR2	0,70	0,91	0,83
FLIPs	0,056	0,10	0,32
FLICE	0,82	0,82	0,57

Résultats

6. EXPRESSION DES MARQUEURS IMMUNOLOGIQUES SELON LES RÉSULTATS DES TESTS IDR :

Dix-sept sujets n'ont donné aucune réaction à l'IDR (-), 16 sujets ont donné une réaction positive (++) et 20 sujets une réaction très positive (+++). Le nombre de copies moyen des marqueurs par rapport au test IDR chez les 3 groupes de sujets est donné dans le tableau 14.

Tableau 14. Expression des marqueurs selon les résultats des tests IDR. Nombre de copies d'ARNm du marqueur pour 10^5 copies de HuPO.

Marqueurs	IDR -	IDR ++	IDR +++	P
TNFR1	942 ± 1573	922 ± 743	588 ± 649	0,340
TNFR2	447 ± 508	636 ± 622	451 ± 891	0,540
FLICE	218 ± 256	156 ± 138	135 ± 120	0,892
FLIPs	75 ± 88	217 ± 140	324 ± 357	0,001

En comparant les différentes moyennes des valeurs obtenues lors de la quantification des marqueurs selon la sensibilité au test IDR, aucune différence significative n'a été observée pour TNFR1, TNFR2 et FLICE ($p>0,05$). Cependant, une augmentation significative de l'expression de FLIPs a été observée chez les sujets IDR positifs ($P= 0,001$; figure 18). Cette augmentation était plus marquée chez les sujets contacts ($P=0,001$).

Résultats

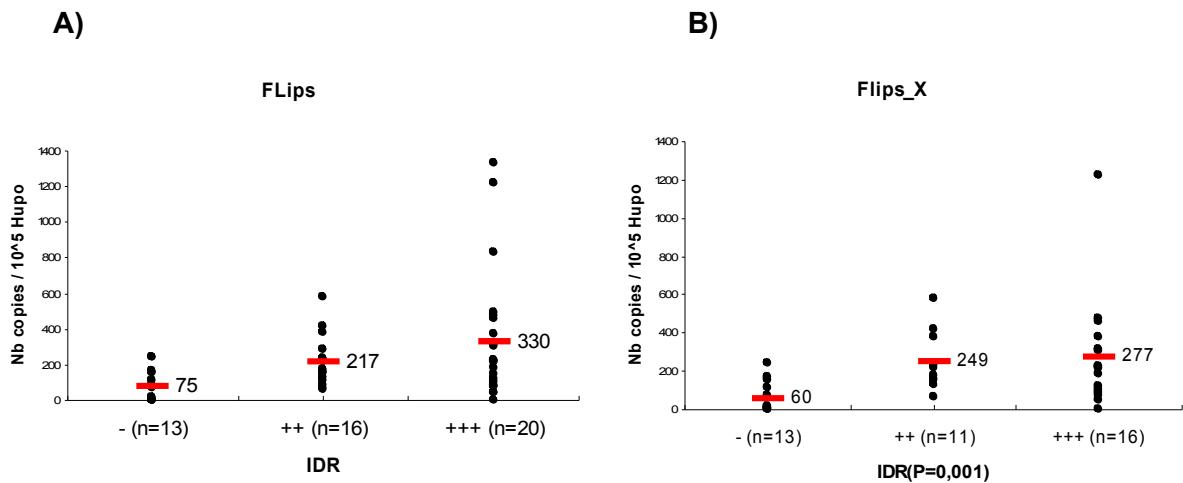


FIGURE 18. Expression du gène *Flips* selon la sensibilité au test IDR pour 10⁵ copies de HuPO. (A) Expression chez tous les sujets d'étude. (B) Expression chez les contacts. La barre rouge (—) représente le nombre moyen de copies obtenu pour chaque cas. Une valeur de P< 0,05 est considérée comme significative. -, IDR négatifs ; ++, IDR positifs ; +++, IDR fortement positifs.

DISCUSSION CONCLUSION ET PERSPECTIVES

DISCUSSION :

L'étude de l'expression de gène par la RT-PCR en temps réel a déjà été utilisée comme, par exemple, pour la recherche de marqueurs de viabilité de *M. tuberculosis* pour l'évaluation de l'efficacité de nouveaux traitements anti-tuberculeux [Hellyer et al., 1999 ; Desjardin et al., 1999]. Rappelons que cette technique requiert une bonne qualité de l'ARN, sans contamination par des ADN et l'utilisation d'un gène de référence interne. Nous avons obtenu une pureté et une qualité des ARN satisfaisantes au cours de cette étude. De plus, nos résultats ont confirmé que le gène *HuPO* pouvait être utilisé comme gène de référence interne pour l'étude de la tuberculose [Huggett et al., 2005].

Les marqueurs de protection potentiels dont l'expression a été quantifiée ici sont liés à la régulation ou jouent un rôle clé dans les phénomènes cellulaires de l'immunité anti-tuberculeuse. Les résultats ont montré que le gène codant pour le récepteur cellulaire du TNF α , le TNFR1 était moins exprimé chez les sujets contacts ($P=0,04$) par rapport aux témoins. De même, l'expression du gène codant pour le récepteur circulant du TNF α , le TNFR2 était significativement inférieur chez les sujets contacts ($P=0,03$). Le TNF α est impliqué dans la destruction du tissu pulmonaire par la réaction inflammatoire et les nécroses qu'il induit [Flynn et al., 1995]. Une augmentation de la production de TNF α a par ailleurs été observée chez des patients avec une tuberculose pulmonaire active et semble être associée à la maladie [Moura et al., 2004]. La faible production du TNFR1 chez les sujets contacts pourrait donc jouer un rôle de rétrocontrôle négatif sur le TNF α et être associée à la protection contre la destruction du tissu pulmonaire par ce dernier après contact avec *M. tuberculosis*. Il serait donc intéressant de vérifier cette hypothèse par une quantification de l'expression du TNF α . Le TNF α possède cependant certaines propriétés cruciales pour l'immunité anti-tuberculeuse. Il peut en effet induire à la fois la production de chémokines par les monocytes/macrophages et la formation d'intermédiaires bactéricides aidant dans la phagocytose [Mohan et al., 2001 ; Zganiacz et al., 2004]. Une absence de l'inhibition du TNF α par une faible production de TNFR2 pourrait ainsi contribuer à la protection de l'hôte contre *M. tuberculosis*. Comme le niveau d'expression de TNFR1 et TNFR2 est faible chez les sujets contacts de patients tuberculeux mais pas chez les témoins, on pourrait supposer que tous deux soient associés à la protection contre la tuberculose. Cependant, l'expression de ces deux marqueurs est statistiquement la même entre les cas index et les sujets contacts, ce qui laisserait supposer que c'est plutôt le contact avec le BK qui modulerait l'expression de ces 2 molécules. D'une part, un nombre plus élevé de sujets devra être testé, d'autre part, un suivi des contacts pour distinguer ceux qui développeront la tuberculose et ceux qui resteront sains permettra de vérifier si ces

Discussion, conclusion et perspectives

marqueurs ont un rôle dans la protection contre la maladie. Par ailleurs, d'après les résultats des tests ELISPOT et IDR, aucune différence significative n'a été observée dans l'expression de ces gènes entre sujets infectés et non infectés par *M. tuberculosis* ; l'expression de ces deux marqueurs ne peut pas être utilisée comme marqueur de l'infection.

L'apoptose étant étroitement associée à l'immunité anti-tuberculeuse et à d'autres maladies impliquant une réponse immunitaire à médiation cellulaire [Rook et al., 2001], l'expression du gène apoptotique *Flice* et celle de son inhibiteur *Flips* ont été étudiées. L'expression du gène *Flice* est significativement plus faible chez les cas index de tuberculeux et leurs contacts par rapport aux groupe de témoins ($P=0,04$). Bien que l'apoptose puisse être utilisée pour éliminer les cellules infectées par *M. tuberculosis* [Keane et al., 1997], une modération de la mort cellulaire par inhibition de l'expression de gènes apoptotiques comme *Flice* permettrait de préserver les cellules immunitaires et de les laisser agir plus efficacement contre les bactéries infectantes. En effet, l'interaction de *M. tuberculosis* avec l'hôte entraîne l'apoptose des cellules T par l'intermédiaire du Fas [Hirsch et al., 1999]. Ces résultats sont concordants avec les observations faites par Peter et al. (1997) sur l'inhibition de l'apoptose chez les cellules T périphériques par la diminution de l'expression de FLICE avec lequel les ligands Fas-L interagissent. Aucune différence significative n'a été cependant notée pour l'expression de ce gène par rapport à l'infection, ce qui suppose que FLICE n'aurait aucun rôle dans l'infection du sujet.

L'expression du gène anti-apoptotique *Flips* entre les différents groupes de sujets étudiés ne varie pratiquement pas. Cependant, l'expression de ce gène est significativement élevé lorsque les sujets sont infectés par *M. tuberculosis* et cela semble être plus accentué chez les sujets contacts ($P= 0,001$ avec le test IDR). L'inhibition de l'apoptose par l'expression du gène *Flips* est plus marquée chez les contacts infectés de patients tuberculeux, ce qui peut augmenter l'efficacité de la réponse immunitaire à médiation cellulaire chez ces derniers et assurer une protection plus efficace contre la maladie. Ces données semblent indiquer que FLIPs est plutôt associée à l'infection par *M. tuberculosis*. L'expression des ARNm de FLIPs est augmentée dans les cellules cancéreuses de moëlle osseuse et cela serait liée à un taux anormalement élevé de TNF α observé chez ces patients [Benesch et al., 2003 ; Wu et al., 2002]. La question qui se pose est la suivante : l'expression de FLIPs observée est-elle aussi régulée par l'augmentation du TNF α retrouvée chez les sujets infectés ?

Pour des raisons statistiques, l'étude devra être étendue à une population plus large et d'autres marqueurs potentiels devront aussi être testés. De plus, ces marqueurs devront être évalués par un suivi longitudinal des sujets infectés, principalement des sujets contacts qui développeront ou non la maladie.

CONCLUSION:

La mise en place de la technique de PCR en temps réel pour l'étude quantitative de l'expression des gènes a été réalisée avec succès. Par cette méthode, nous avons pu en connaître davantage sur le rôle de l'expression de gènes codant pour des protéines intervenant dans l'immunité anti-tuberculeuse. Il a été mis en évidence dans cette étude que d'une part les variations de l'expression des récepteurs cellulaires et circulants du TNF α , TNFR1, TNFR2 et FLICE, pourraient être associées à la protection contre la maladie, et d'autre part celle de la protéine anti-apoptotique, FLIPs, pourrait être liées à l'infection par *M. tuberculosis*. Un suivi de l'état de santé des sujets étudiés est nécessaire pour évaluer effectivement une relation entre l'expression de ces molécules et la protection contre la tuberculose. De plus, d'autres marqueurs potentiels, comme Bcl-2, Bax ou le TNF α , jouant un rôle dans l'immunité anti-tuberculeuse devront être étudiés.

PERSPECTIVES :

Nous envisageons à l'avenir de tester d'autres marqueurs immunologiques potentiels, avec de plus grandes cohortes. De plus, un suivi des sujets contacts sera effectué pendant 18 mois à partir de l'inclusion des sujets de l'étude. Une analyse multicentrique sera enfin effectuée afin de comparer les résultats des différentes institutions partenaires et d'identifier ainsi les marqueurs immunologiques de protection contre la tuberculose utilisables pour l'évaluation de nouveaux vaccins au cours d'essais cliniques.

ANNEXES

Annexe I : Réactifs pour le dosage des ARN

-Eau RNase-free

Eau distillée (ED).....	1 l
Diéthyl pyrocarbonate (DEPC) [Sigma, réf. D-5758].....	1 ml

La solution est incubée à 37°C pendant 12h, puis autoclavée pendant 15 minutes à 120°C et conservée à température ambiante.

-Tampon Tris[Hydroxyméthyl]aminométhane hydrochloride (Tris-HCl) 10 mM pH 7,5

Trizma® Hydrochloride [Sigma, réf.T-7149].....	0,16 g
Eau RNase-free q.s.p.....	100 ml

Le pH de la solution est ajusté à 7,5 avec du NaOH 10 N

Annexe II : Réactifs pour l'électrophorèse des ARN en gel de formaldéhyde-agarose :

i. Préparation des solution-mères

-Sodium Acétate 500 mM

Sodium acétate [Sigma, réf. S-2889].....	4,1 g
ED q.s.p.....	100 ml

-EDTA 500 mM (pH 8)

EDTA [Sigma, réf. E-5134].....	9,305 g
ED q.s.p.....	50 ml

Le pH de la solution est ajusté à 8 avec du NaOH 10N

-Bleu de bromophénol saturé en solution aqueuse

Bleu de bromophénol [Sigma, réf.B-6131]	
ED.....	1ml

La poudre de bleu de bromophénol est dissoute dans l'eau distillée et mélangée. On continue à rajouter de la poudre jusqu'à ce que le bleu de bromophénol ne puisse plus être dissout.

ii. Composition des tampons pour l'électrophorèse sur gel

-Tampon 10x FA (Formaldéhyde-agarose) pour le gel

Acide 3-[N-morpholino]propane sulfonique (MOPS) [Sigma, réf. M-8899]	4,19 g
EDTA 500 mM (pH 8)	2 ml
Sodium acétate 500 mM	10 ml
ED q.s.p.	100 ml

Le pH de la solution est ajusté à 7 avec du NaOH 10 N, et le tampon est traité au DEPC par addition de 0,1 ml DEPC pour 100 ml de solution, puis conservée à température ambiante, à l'abri de la lumière.

-Tampon de migration 1x FA

Tampon du gel 10X FA	25 ml
Formaldéhyde 36% (39% m/v) [Prolabo, réf. 20 910 294]	5 ml
Eau RNase-free q.s.p.	250 ml

La solution est protégée de la lumière et conservée à température ambiante.

-Tampon 5X pour ARN

Tampon pour gel 10X FA	4 ml
Formamide [Merck, réf. 851]	3,084 ml
Glycérol bidistillée 99,5% Normapur [Prolabo, réf. 24 388 295]	2 ml
Formaldéhyde 36% [Prolabo, réf. 20 910 294]	720 µl
EDTA 500 mM (pH 8)	60 µl
Bleu de bromophénol saturé en solution	16 µl
Eau RNase-free q.s.p.	10 ml

La solution est conservée à +4° C.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. ALEMAN M, GARCÝA A, SAAB MA, DE LA BARRERA S S, FINIASZ M, ABBATE E, SASIAIN MC. *Mycobacterium tuberculosis*-Induced activation accelerates apoptosis in peripheral blood neutrophils from patients with active tuberculosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2002; **27**
2. ALLEN SS, McMURRAY DN. Coordinate cytokine gene expression in vivo following induction of tuberculosis pleurisy in guinea pigs. *Infect Immun*. 2003; **71**(8) : 4271-4277.
3. AMEISEN JC. Le suicide des cellules et le système immunitaire. *Pour la Science*. 2000; **7629**: 54-61.
4. ANDERSEN P, MUNK ME, POLLOCK JM, DOHERTY TM. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet*. 2000; **356**: 1099-1104.
5. BALCEWICZ-SABLINSKA MK, KEANE J, KORNFELD H, REMOLD HG. Pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* evades apoptosis of host macrophages by release of TNF-R2, resulting in inactivation of TNF-a. *J Immunol*. 1998; **161**: 2636-2641.
6. BALDWIN SL, D'SOUZA C, ROBERTS AD, KELLY BP, FRANK AA, LUI MA, ULMER JB, HUYGEN K, McMURRAY DM, ORME IM. Evaluation of new vaccines in the mouse and the guinea pig model of tuberculosis. *Infect Immun*. 1998; **66** (6): 2951-2959.
7. BANNON MJ. BCG and Tuberculosis. *Arch Dis Child*. 1999; **80** :80-83
8. BENESCH M, PLATZBECKER U, WARD J, DEEG HJ, LEISENRING W. Expression of FLIP_{Long} and FLIP_{Short} in bone marrow mononuclear and CD34_b cells in patients with myelodysplastic syndrome: correlation with apoptosis Leukemia. *Nature*. 2003; **17**: 2460-2466.
9. BERNARD PS, WITWER CT. Real-time PCR technology for cancer diagnostics. *Clinical Chemistry*. 2002; 48 (8):1178-1185.

Références bibliographiques

10. **BOOM WH, CHERVENAK KA, MINCEK MA; ELLNER JJ.** Role of the mononuclear phagocyte as an antigen-presenting cell for human $\gamma\delta$ T cells activated by live *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 1992; **60** (9): 3480-3488.
11. **BUSTIN SA et NOLANB T.** Pitfalls of quantitative Real-time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction. *Journal of Biomolecular Techniques*. 2004; **15** (3): 155–166.
12. **BUSTIN SA.** Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2000; **25**: 169–193.
13. **CHADHA VK, SURYANARAYANA L, SURYANARAYAN HV, SRIKANTARAMU N, KUMAR P.** Protective effect of BCG among children vaccinated under universal immunization programme. *Indian J Pediatr*. 2004; **71**:1069-1074.
14. **COLDITZ GA, BREWER TF, BERKEY CS, WILSON ME, BURDICK E, FINEBERG HV, MOSTELLER F.** Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis: meta-analysis of the published literature. *Jama*. 1994; **271** (9).
15. **COLLOT S, ALAIN S, DENIS F, RANGER-ROGEZ S.** Quantification par PCR en temps réel, technologie TaqMan et applications en virologie. *Virologie*. 2001; **5**:439-448.
16. **DAO D N, KREMER L, GUERARDEL Y, MOLANO A, JACOBS WR JR, PORCELLI S A, BRIKEN V.** *Mycobacterium tuberculosis* lipomannan induces apoptosis and interleukin-12 production in macrophages. *Infect Immun*. 2004; **72** (4): 2067–2074.
17. **DESJARDIN LE, PERKINS MD, WOLSKI K, HAUN S, TEIXEIRA L, CHEN Y, JOHNSON JL, ELLNER JJ, DIETZE R, BATES J, CAVE MD, EISENACH KD.** Measurement of sputum *Mycobacterium tuberculosis* messenger RNA as a surrogate for response to chemotherapy. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999; **160**(1): 203-210.
18. **DHEDA K, HUGGET JF, BUSTIN SA, JOHNSON MA, ROOK G, ZUMLA A.** Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques*. 2004; **37**(1):112-4, 116, 118-9.

19. **DOLIN PJ, RAVIGLIONE MC, KOCHI A.** Global tuberculosis incidence and mortality during 1990-2000. *Bull World Health Organ.* 1994; **72** (2):213-20.
20. **FAYYAZI A, EICHMEYER B, SORURI A, SCHWEYER S, HERMS J, SCHWARZ P, RADZUN HJ.** Apoptosis of macrophages and T cells in tuberculosis associated caseous necrosi. *J Pathol.* 2000; **149**: 417-425.
21. **FLYNN JL, GOLDSTEIN MM, CHAN J.** Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity.* 2001; **2**(6): 561-72.
22. **FLYNN JL, CHAN J, TRIEBOLD KJ, DALTON DK, STEWART TA, BLOOM BR.** An essential Role for Interferon γ in Resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Exp. Med.* 1993; **18**: 2249-2254.
23. **GIL D, GARCIA LF, ROJAS M.** Modulation of macrophage apoptosis by antimycobacterial therapy: physiological role of apoptosis in the control of *Mycobacterium tuberculosis*. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 2003; **190**: 111-119.
24. **GINSBERG AM.** What's new in tuberculosis vaccines? *Bull World Health Organ.* 2002; **80**(6): 483-488.
25. **HELLYER TJ, DESJARDIN LE, HEHMAN GL, CAVE D, EISENACH KD.** Quantitative analysis of mRNA as a marker for viability of *Mycobacteria tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 1999; **37**(3): 518-523.
26. **HIGUCHI R, FOCKLER C, DOLLINGER G, WATSON R.** Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology.* 1993; **11** (9):1026-1030.
27. **HIRSCH CS, TOOSSI Z, VANHAM G, JOHNSON JL, PETERS P, OKWERA A, MUGERWA R, MUGYENYI P, ELLNER JJ.** Apoptosis and T cell hyporesponsiveness in pulmonary tuberculosis. *JID.* 1999; 179.

Références bibliographiques

28. **HOLCIK M.** Fatal embrace: structural basis of caspase inhibition. *Trends in Genetics*, 2001; **17** (5).
29. **HOLLAND PM, ABRAHAMSON RD, WATSON R, GELFAND DH.** Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'>3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991; **88**: 7276-7280.
30. **KAMATH AT, FENG CG, MACDONALD M, BRISCOE H, BRITTON WJ.** Differential Protective Efficacy of DNA vaccines Expressing secreted Proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 1999; **67** (4): 1702-1707.
31. **KAUFMANN SH E.** Protection against tuberculosis: cytokines, T cells, and macrophages. *Annals of the rheumatic diseases*. 2002; **61**: ii54-ii58.
32. **KEANE J, BALCEWICZ-SABLINSKA MK, REMOLD HG, CHUP GL, MEEK BB, FENTON MJ, KORNFIELD H.** Infection by *Mycobacterium tuberculosis* promotes human alveolar macrophage apoptosis. *Infect Immun*. 1997; **65** (1): 298-304.
33. **KEANE J, REMOLD HG, KORNFIELD H.** Virulent *Mycobacterium tuberculosis* strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages. *J Immunol*. 2000; **164**: 2016-2020.
34. **LI B, BASSIRI H, ROSSMAN MD, KRAMER P, EYUBOGLU AF-O, TORRES M, SADA E, IMIR TURGUT, CARDING S.** Involvement of the Fas/Fas Ligand pathway in activation-Induced cell death of Mycobacteria-reactive human $\gamma\delta$ T cells: A mechanism for the loss of $\gamma\delta$ T cells in patients with pulmonary tuberculosis. *J Immunol*. 1998; **161**: 1558-1567.
35. **LOPEZ M, SLY LM, LUU Y, YOUNG D, COOPER H, REINER NE.** The 19-kDa *Mycobacterium tuberculosis* protein induces macrophage apoptosis through Toll-like receptor-21. *J Immunol*. 2003; **170**: 2409-2416.
36. **MOURA EP, TOLEDO VP, OLIVEIRA MH, SPINDOLA-DE-MIRANDA S, ANDRADE HM, GUIMARAES TM.** Pulmonary tuberculosis: evaluation of interferon- γ levels as

Références bibliographiques

- an immunological healing marker based on the response to the bacillus Calmette-Guerin. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004; **99**(3): 283-287.
37. **MACKAY I M, ARDEN K R, NITSCHE A.** Real-time PCR in Virology. *Nucleic Acids Research*. 2002; **30** (6): 1292-1305.
38. **MOHAN VP, SCANGA CA, YU K, SCOTT HM, TANAKA KE, TSANG E, TSAI MM, FLYNN JL, CHAN J.** Effects of tumor necrosis factor alpha on host immune response in chronic persistent Tuberculosis: Possible role for limiting pathology. *Infect Immun*. 2001; **69**(3): 1847-1855.
39. **MORI T, SAKATANI M, YAMAGASHI F, TAKASHIMA T, KAWABE Y, NAGAO K, SHIGETO E, HARADA N, MITARAI S, OKADA M, SUZUKI K, INOUE Y, TSUYUGUCHI K, SASAKI Y, MAZUREK GH, TSUYUGUCHI I.** Specific detection of tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004; **170**(1): 59-64.
40. **NOR N M, MUSA M.** Approaches towards the development of a vaccine against tuberculosis: recombinant BCG and DNA vaccine. *Tuberculosis*. 2004; **84** (1-2): 102-109.
41. **ODDO M, RENNO T, ATTINGER A, BAKKER T, MACDONALD H R, MEYLAN PR A.** Fas Ligand-induced apoptosis of infected human macrophages Reduces the viability of intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*. 1998; **160**: 5448-5454.
42. **OKKELS L M, DOHERTY M, ANDERSEN P.** Selecting the components for a safe and efficient tuberculosis subunit Vaccine-recent progress and post-genomic insights. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2003; **4** (1): 1-15.
43. **PARRY C, DAVIES PD.** The resurgence of tuberculosis. *Soc. Appl Bacteriol Symp Ser*. 1996; **25**: 235-265.
44. **PETER ME, KISCHKEL FC, SCHEUERPFLUG CG, MEDEMA JP, DEBATIN KM, KRAMMER PH.** Resistance of cultured peripheral T cells towards activation-induced cell death involves a lack of recruitment of FLICE (MACH/caspase 8) to the CD95 death-inducing signalling complex. *Eur J Immunol*. 1997; **27**(5): 1207-12.

45. **PERSKVIST N, LONG M, STENDAHL O, L ZHENG.** *Mycobacterium tuberculosis* Promotes Apoptosis in Human Neutrophils by Activating Caspase-3 and Altering Expression of Bax/Bcl-xL Via an Oxygen-Dependent Pathway. *J Immunol.* 2002; **168**: 6358–6365.
46. **PFAFFL MW, HAGELEIT M.** Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR *Biotechnology Letters.* 2001; **23**: 275–282.
47. **RAJA A.** Immunology of tuberculosis. *Indian J Med Res.* 2004; **120**: 213-232.
48. **RAVIGLIONE MC.** The TB epidemic from 1992 to 2002. *Tuberculosis.* 2003; **83** : 4-14.
49. **ROOK GA W, ZUMLA A.** Advances in the immunopathogenesis of pulmonary tuberculosis. *Curr Opin Pulm Med.* 2001, **7**: 116-123.
50. **RUTLEDGE RG, CÔTÉ C.** Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Research.* 2003; **31** (16) :e93
51. **SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T.** Molecular Cloning - A Laboratory Manual. 2^e éd. New York: Cold Spring Harbor Press, 1989 (2.60-2.80).
52. **SCHMITTGEN TD, ZAKRAJSEK BA.** Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR *J. Biochem. Biophys. Methods.* 2000; **46** : 69–81.
53. **SCHWANDER SK, TORRES M, CARRANZA CC, ESCOBEDO D, TARY-LEHMANN M, ANDERSON P, TOOSSI Z, ELLNER JJ, RICH EA, SADA E.** Pulmonary mononuclear cell responses to antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in healthy household contacts of patients with Active Tuberculosis and healthy controls from the community. *J Immunol.* 2000; **165**: 1479-1485.

Références bibliographiques

54. **SHARMA S, BOSE M.** Role of cytokines in response to pulmonary tuberculosis. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2001; **19**(3): 213-219.
55. **SLY LM, HINGLEY-WILSON SM, REINER NE, MCMASTER WR.** Survival of *Mycobacterium tuberculosis* in Host Macrophages Involves Resistance to Apoptosis Dependent upon Induction of Antiapoptotic Bcl-2 Family Member Mcl-11. *The J Immunol.* 2003; **170**: 430–437.
56. **SPIRA A, CARROLL JD, LIU G, AZIZ Z, SHAH V, KORNFELD H, KEANE J.** Apoptosis Genes in Human Alveolar Macrophages Infected with Virulent or Attenuated *Mycobacterium tuberculosis* : A Pivotal Role for Tumor Necrosis Factor. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology.* 2003; **29**.
57. **SWILLENS S , GOFFARD J-C, MARECHAL Y, DE KERCHOVE D'EXAERDE A, EL HOUSNI H.** Instant evaluation of the absolute initial number of cDNA copies from a single real-time PCR curve. *Nucleic Acids Research.* 2004; **32** (6): e53.
58. **TANGHE A, LEFEVRE P, DENIS O, D'SOUZA S, BRAIBANT M, LOZES E, SINGH M, MONTGOMERY D, CONTENT J, HUYGEN K.** Immunogenicity and protective efficacy of tuberculosis DNA vaccines Encoding Putative Phosphate Transport Receptors. *J Immunol.* 1999; **162**: 1113-1119.
59. **TCHORZEWSKI M.** The acidic ribosomal P proteins. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002; **34**(8): 911-915.
60. **THOMA-USZYNSKI S, STENGER S, MODLIN R L.** CTL-Mediated killing of intracellular *Mycobacterium tuberculosis* is independent of target cell nuclear apoptosis. *J Immunol.* 2000; **165**: 5773-5779.
61. **VALASEK M A, REPA J J.** The Power of real-time PCR. *Advan. Physiol. Edu.* 2005; **29**: 151-159.
62. **VANDESOMPELE J, DE PRETER K, PATTYN F, POPPE B, VAN ROY N, DE PAEPE A, SPELEMAN F.** Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR

Références bibliographiques

- data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*. 2002; **3**(7): 0034.1–0034.11.
63. **WANCHU A, BHATNAGAR A, KUMAR B, BAMBERY P, SINGH S.** Caspase 1 and caspase 8 in HIV infected patients with and without tuberculosis. *J Postgrad Med*. 2004; **50**: 98-101.
64. **WHITE E.** Overview of Apoptosis. *Amersham Life Science: Apoptosis. Scientific Handbook and Catalogue*. 1996: 8-15.
65. **WILFINGER WW, MACKEY K, CHOMCZYNSKI P.** Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques*. 1997; **22**(3): 478-481.
66. **WORLD HEALTH ORGANISATION.** Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing. *W.H.O. Report* 2005.
67. **WORLD HEALTH ORGANISATION.** Report of the meeting of the working group on clinical trials of new TB vaccines. *W.H.O. Report* 1999.
68. **WU XC, ASSELIN E, TSANG BK.** Nuclear factor kappaB-mediated induction of Flice-like inhibitory protein prevents tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in ratgranulose cells. *Biol Reprod*. 2002; **67** 436-441.
69. **ZGANIACZ A, SANTOSUOSO M, WANG J, YANG T, CHEN L, ANZULOVIC M, ALEXANDER S, GICQUEL B, WAN Y, BRAMSON J, INMAN M, XING Z.** TNF- α is a critical negative regulator of type 1 immune activation during intracellular bacterial infection. *J. Clin. Invest*. 2004 ; **11** (3) :401–413.

Références bibliographiques

RESUME

La tuberculose reste toujours un problème de santé publique mondial. Le BCG, vaccin utilisé pour prévenir la maladie, a une efficacité très variable et de nouveaux vaccins sont en cours de développement. L'évaluation de l'efficacité de ces vaccins est difficile et peut prendre plusieurs années. Des marqueurs immunologiques de protection sont nécessaires pour une évaluation de nouveaux candidats lors des essais cliniques vaccinaux chez l'homme. Nous avons donc étudié des marqueurs potentiels en comparant l'expression des ARNm des cellules du sang périphérique des récepteurs TNFR1 et TNFR2 du TNF α , ainsi que les protéines apoptotiques FLICE et FLIPs chez plusieurs cohortes comprenant 12 patients tuberculeux, leurs contacts (n=40) et 4 témoins. Une comparaison a aussi été effectuée entre l'expression de ces marqueurs chez les sujets infectés et non infectés. Les ARNm ont été quantifiées par la Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction en temps réel. Les résultats obtenus ont suggéré que le TNFR1 et le TNFR2 pourraient être associés à la protection contre la maladie, que FLICE pourrait être associée à l'immunité contre *M. tuberculosis* et FLIPs pouvait être associé à l'infection par la bactérie. Cependant, un nombre plus important de sujets et de marqueurs de l'immunité anti-tuberculeuse méritent d'être étudiés.

Mots-clés : PCR en temps réel, tuberculose, immunité, marqueurs, apoptose

ABSTRACT

Tuberculosis remains a worldwide major public health problem. BCG, the vaccine which is used to prevent the disease has an efficacy that varies considerably. New tuberculosis vaccines have been developed. The evaluation of their efficacy is to carry out and might take several years. Surrogate markers of immunological protection are necessary to evaluate human vaccine trials. We have studied these markers by testing peripheral blood cells mRNA expression. Expression of TNF-receptors, TNFR1 and TNFR2 on one hand, and apoptotic proteins, FLICE and FLIPs on the other hand were compared between cohorts. These cohorts involved 12 tuberculosis patients, their household contacts (n=40) and 4 controls. Moreover, expression between infected and uninfected persons was compared. mRNA was quantified by Real-time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. The results suggest that TNFR1 and TNFR2 could be associated with the protection against TB, likewise FLICE could be associated with immunity against *M. tuberculosis* and FLIPs could be linked to infection with the bacteria. However, more cohorts of subjects, as well as other markers of anti-tuberculosis immunology should be studied.

Keywords : Real-time PCR, tuberculosis, immunity, markers, Apoptosis