

**Licence : Sciences, Technologie, Santé. Mention : Biologie-Santé**

**UE : Immunologie-Virologie  
Année Universitaire 2016-2017, 1<sup>ère</sup> session.**

**Date de l'épreuve : 2 Mai 2017.**

**Durée : deux heures**

**Aucun document n'est autorisé**

**L'examen est constitué de deux parties :**

**Vous devez rendre 2 copies indépendantes,  
en reportant votre n° d'anonymat.**

## Sujet de Mme Lagaudrière à traiter sur une copie séparée

Les papillomavirus humains de type 16 (HPV16) sont des virus non enveloppés. Leur capsid est constituée de 2 types protéines, L1 et L2. Leur génome est une molécule d'ADN double brin circulaire, dont la réplication a lieu dans le noyau des cellules infectées.

L'entrée dans la cellule de ces virus est un mécanisme complexe qui implique des interactions entre des protéines virales et des molécules présentes à la surface de la cellule. Il a été démontré que les virions se fixent aux glucosaminoglycanes (GAGs) à la surface des cellules cibles. Cependant, les données de la littérature suggèrent que l'entrée de ces virus ne dépend pas uniquement de leur liaison aux GAGs.

**Question 1 : A l'aide d'un schéma légendé, présentez l'organisation structurale d'un virion HPV16 (1 point).**

**Question 2 : D'après vos connaissances, quel est le principal mécanisme d'entrée des virus non enveloppés ? Présentez ce mode d'entrée (2 points).**

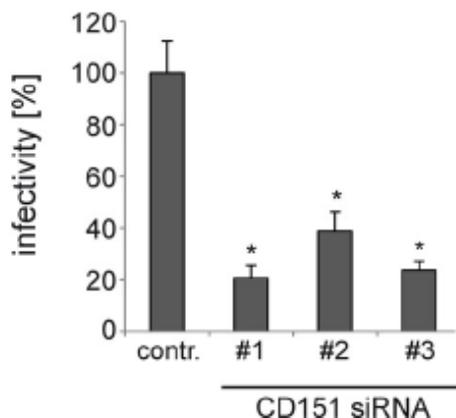
**Question 3 : Présentez les différentes étapes du cycle de multiplication d'un virus tel que le HPV16. (3 points)**

Dans le but de caractériser le ou les autres récepteurs impliqués dans l'entrée du HPV-16, les chercheurs se sont plus particulièrement intéressés à la protéine CD151. Par une technique non décrite ici, les chercheurs ont produit des pseudoparticules de HPV-16 (HPV-16 PsV). Ces HPV-16 PsV sont des particules constituées d'une capsid identique à celle du HPV-16 renfermant un plasmide d'expression du gène de la luciférase à la place du génome viral.

**Question 4 : Quelles étapes du cycle viral peuvent-elles être étudiées à l'aide des pseudoparticules HPV-16 PsV? Argumentez votre réponse. (2 points)**

Des cellules HeLa transfectées ou non avec des siRNA CD151 ont été infectées par des HPV-16 PsV. Le taux d'infectivité a été déterminé à partir de l'activité luciférase mesurée 24hr post-infection (Figure 1).

*(Des expériences de western-blot, non montrées, ont confirmé l'efficacité des siRNA anti-CD151).*



**Figure 1.** Cellules HeLa transfectées avec des siRNA contrôle (contr.) ou avec 3 lots différents de siRNA anti-CD151 (#1, #2 et #3).

Chaque type de cellules a été infecté avec les HPV-16 PsV 48h après la transfection et le taux d'infectivité mesuré 24 heures post-infection.

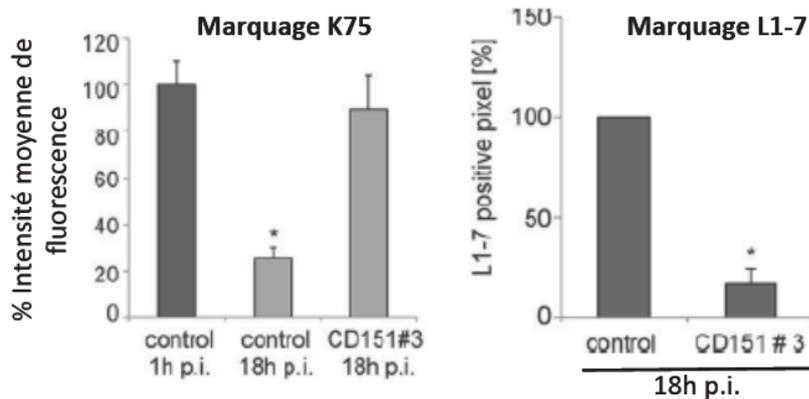
\* : résultats significativement différents du contrôle

**Question 5 : Quel est l'objectif de cette expérience ? Analysez les résultats présentés dans cette figure. Quelle conclusion pouvez-vous tirer de cette expérience ? (3 points).**

Dans l'expérience suivante, les cellules HeLa contrôle ou déplétées en CD151 ont été incubées avec les HPV-16 PsV pendant 1 ou 18 heures à 37°C. A la fin de l'incubation, les cellules ont été séparées en 2 lots et les protéines de capsid ont été détectées comme suit :

- lot 1 : marquage sur cellules non perméabilisées, avec l'anticorps K75 spécifique de la protéine de capsid L1 (détection par immunofluorescence et cytométrie en flux)
- lot 2 : marquage sur cellules fixées et perméabilisées, avec l'anticorps L1-7, anti-protéine L1 mais spécifique d'un épitope localisé à l'intérieur des capsides et inaccessible sur virions intacts (analyse par microscopie de fluorescence).

**Question 6 : Quelle est la localisation cellulaire des particules détectées par chacun de ces anticorps (K75 et L1-7) ? Expliquez. (2 points)**



**Figure 2 :** Cellules HeLa transfectées avec des siRNA contrôle (*contr.*) ou des siRNA anti-CD151 puis incubées 1h ou 18h avec des pseudoparticules HPV16. La détection de la protéine virale L1 a été effectuée selon 2 approches (cf texte).

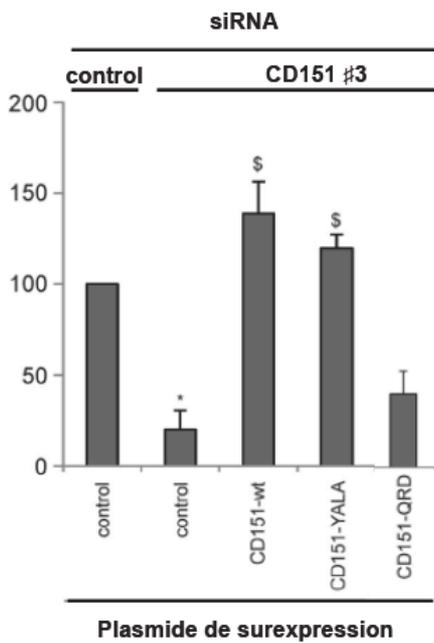
\* : résultats significativement différents du contrôle

**Question 7 : Analysez les résultats présentés dans la figure 2. Quelle conclusion pouvez-vous tirer de cette expérience ? (2,5 points)**

A la surface des cellules, la molécule CD151 est associée aux intégrines  $\alpha 3\beta 1$  et  $\alpha 6\beta 1$ .

Dans la dernière expérience, les chercheurs ont mesuré le taux de HPV-16 PsV internalisées dans des cellules HeLa qui surexpriment diverses formes de la protéine CD151 (Figure 3). Pour cela, l'expression de la molécule CD151 endogène est abolie par des siRNA, puis les cellules sont transfectées par l'ADNc codant pour :

- CD151 normale (wt),
- CD151-YALA : présence de mutations dans le domaine cytoplasmique impliqué dans l'endocytose de CD151,
- CD151-QRD : présence de mutations dans le domaine extracellulaire de CD151 qui abolissent l'interaction de CD151 avec les intégrines  $\alpha 3\beta 1$  et  $\alpha 6\beta 1/4$ .



**Figure 3** : Taux de HPV-16 PcV internalisées

\* et \$: résultats significativement différents du contrôle.

**Question 8 : Analysez les résultats présentés dans la figure 4. Quelle conclusion en tirez-vous ? (2,5 points)**

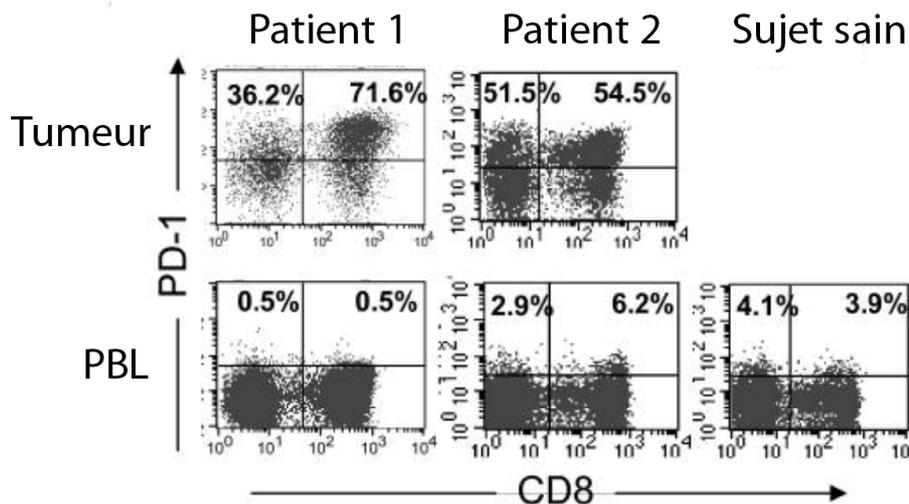
**Question 9 : D'après les données de l'énoncé et les résultats que vous avez analysés (figures 1 à 3), proposez un modèle rendant compte des mécanismes d'attachement et d'entrée de l'HPV-16 dans les cellules sensibles. (2 points)**

Ce problème s'inspire de Scheffer et al., Journal of Virology 2013

## Sujet de Mme Géraldine Schlecht-Louf à traiter sur une copie séparée

Des lymphocytes T (LT) spécifiques des antigènes tumoraux sont retrouvés dans les mélanomes. Pourtant, ces tumeurs ne sont pas contrôlées par le système immunitaire. Au cours de leurs travaux, des chercheurs se sont intéressés au possible rôle du récepteur PD-1 dans cette inefficacité de la réponse lymphocytaire T anti-tumorale.

I. Dans une première série d'expériences, les chercheurs ont analysé l'expression de PD-1 par les LT chez des patients atteints de mélanomes (Figure 1). Les résultats de cette expérience ont été confirmés chez de nombreux patients et il a été vérifié chez les patients que l'expression de PD-1 dans les tissus sains était semblable à celle observée dans le sang.



**Figure 1 :** Dot-plots présentant l'analyse par cytométrie en flux de l'expression des marqueurs CD8 et PD-1 les lymphocytes T (fenêtrage sur les cellules CD3<sup>+</sup>) isolés de mélanomes ou du sang périphérique (PBL = Peripheral Blood Lymphocytes) de deux patients (Patient 1 et 2) et d'un sujet sain. Les pourcentages de cellules positives sont indiqués dans les quadrants correspondant.

**Q1. Quels sont les phénotypes des cellules présentes dans les 4 quadrants (Bas Gauche, Bas Droite, Haut Gauche, Haut Droite) des dot-plots ? (2 points)**

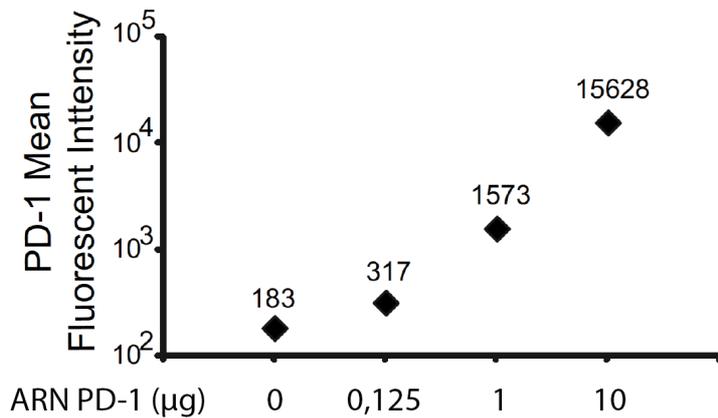
**Q2. D'après vos connaissances, quelles cellules retrouve-t-on dans les quadrants « Gauche » de ces dot-plots ? (1 point)**

**Q3. Analysez et interprétez cette figure en vous appuyant sur les données chiffrées indiquées dans les dot-plots. (4 points)**

II. Pour analyser les conséquences fonctionnelles de l'expression de PD-1 par les LT, un autre groupe de chercheur a utilisé des LT CD8 isolés de sang périphérique. Ces cellules ont été transfectées avec :

- 10 µg d'ARN codant les chaînes a et b d'un TCR spécifique de la molécule de CMH HLA-A2 présentant le peptide SLYNTVATL (S9L). Cette transfection permet aux chercheurs de faire exprimer un même TCR à tous ces LT.
- 0 µg ; 0,125 µg ; 1 ou 10 µg d'ARN codant PD-1.

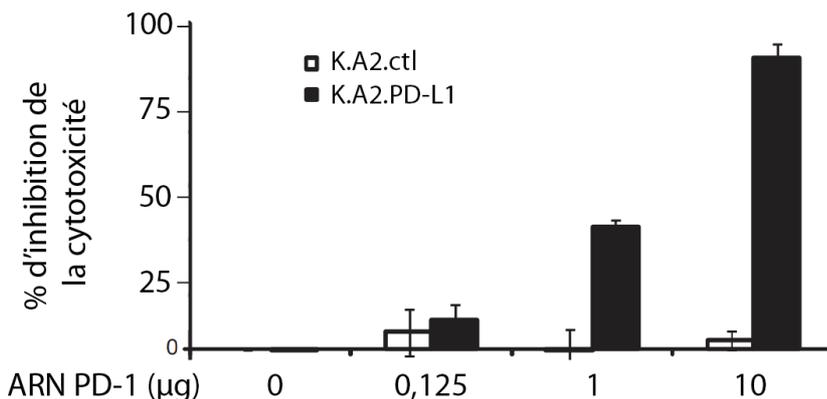
L'expression de PD-1 par les cellules exprimant le TCR spécifique S9L est ensuite analysée par cytométrie en flux (Figure 2).



**Figure 2 :** Intensité d'expression de PD-1 (PD-1 Mean Fluorescent Intensity) par les LT CD8 exprimant le TCR spécifique S9L pour chaque quantité d'ARN PD-1 utilisée. Les valeurs indiquées à proximité des symboles correspondent à l'intensité de fluorescence mesurée.

**Q4. Selon vous, quel est l'objectif des chercheurs dans cette expérience ? D'après les résultats présentés, que pouvez-vous conclure ? (2 points)**

Ces LT CD8 sont ensuite utilisées dans un test de cytotoxicité. Des cellules K.A2 qui expriment les molécules HLA-A2 sont utilisées comme cibles. Ces cellules sont transfectées avec un vecteur contrôle (cellules K.A2.ctl) ou avec un vecteur permettant l'expression de PD-L1, le ligand de PD-1 (cellules K.A2.PD-L1). Elles sont ensuite chargées en chrome radioactif et en peptide S9L puis mises en culture pendant 5 heures avec les LT CD8 présentés en figure 2. Les surnageants de culture sont récoltés et analysés avec un compteur de radioactivité.



**Figure 3 :** Inhibition de la cytotoxicité en fonction des cellules cibles et des LT CD8 utilisés.

**Q5. En vous basant sur vos connaissances, rappelez brièvement les mécanismes de cytotoxicité utilisés par les LT CD8 cytotoxiques. (2 points)**

**Q6. Pourquoi les auteurs ont-ils choisi d'utiliser les cellules K.A2 ? (1 point)**

**Q7. Faites un schéma des interactions entre :**

- les LT CD8 ayant reçu 0 µg d'ARN PD-1 et les cellules K.A2.ctl
- les LT CD8 ayant reçu 10 µg d'ARN PD-1 et les cellules K.A2.ctl
- les LT CD8 ayant reçu 0 µg d'ARN PD-1 et les cellules K.A2.PD-L1
- les LT CD8 ayant reçu 10 µg d'ARN PD-1 et les cellules K.A2.PD-L1

(3 points)

**Q8. Analysez et interprétez les résultats de la figure 3. Proposez au moins une hypothèse quant aux mécanismes qui pourraient expliquer ces résultats. (4 points)**

**Q9. Sachant que les cellules cancéreuses expriment PD-L1, quelle stratégie thérapeutique cette découverte vous fait-elle envisager pour le traitement des mélanomes ? (1 point)**