

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

**UE : Immunologie-Virologie
Année Universitaire 2016-2017, 2^{ème} session.**

Date de l'épreuve : 19 Juin 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

TOUTES VOS REPONSES DOIVENT ETRE JUSTIFIEES.

En 2012, le Moyen-Orient a été touché par une épidémie d'un nouveau coronavirus proche du SRAS¹, qui provoque des troubles respiratoires parfois mortels. Ce nouveau pathogène a été nommé hCoV-EMC. **Les premières expériences se sont portées sur l'identification du récepteur viral.**

Q1 (2 points) : Définissez ce qu'est le récepteur d'un virus.

Q2 (3 points) : Présentez, à l'aide d'un schéma correctement légendé, les différents mécanismes d'entrée des virus enveloppés.

La protéine virale qui reconnaît le récepteur est la glycoprotéine d'enveloppe « S1 ».

Les auteurs ont analysé par immunofluorescence et cytométrie en flux, la fixation de la protéine S1 (forme soluble produite de manière recombinante) sur différents types de cellules (Figure 1, panneaux de gauche). En parallèle, ces cellules ont été infectées avec le hCoV-EMC et les ARN viraux ont été quantifiés par RT-qPCR (PCR quantitative précédée d'une étape de transcription inverse) à 0, 20 ou 40 heures post-infection (Figure 1, panneaux de droite).

Q3 (4 points): Analysez les résultats présentés dans la figure 1 et concluez avec un paragraphe résumant l'ensemble de ces résultats. (vous préciserez quelles cellules sont permissives au hCoV-EMC).

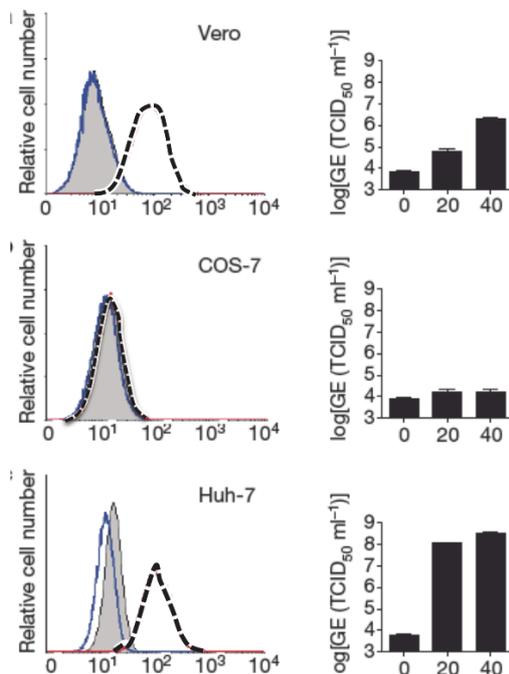


FIGURE 1

Panneaux de gauche : Analyse de la fixation de la glycoprotéine S1 de hCoV-EMC par immunofluorescence et cytométrie de flux (ligne pointillée) sur les cellules Vero, COS-7 et Huh-7. Témoins : protéine S1 du coronavirus félin (ligne noire) et cellules non infectées (grisé).

Panneaux de droite : Niveaux d'ARN viraux dans les surnageants de cellules infectées par le virus hCoV-EMC à 0, 20 et 40 heures après l'infection.

Les ARN ont été quantifiés par RT-qPCR et sont exprimés en « équivalents génomes » (GE/ml).

Types cellulaires utilisés :

- **COS-7** : fibroblastes de singe.
- **Vero** : cellules épithéliales de singe.
- **Huh-7** : cellules hépatocytaires humaines.

¹ SRAS est l'**acronyme** de : « **syndrome** respiratoire aigu sévère » caractérisé par une **pneumonie** atypique provoquée par la famille des **Coronavirus** connus pour provoquer les simples rhumes). Ce virus utilise le récepteur « **angiotensin un virus de issu converting enzyme 2** » (ACE2). La protéine virale qui reconnaît le récepteur cellulaire est la glycoprotéine S1.

Les coronavirus sont des virus enveloppés à ARN (+) non segmenté. Les données de la littérature concernant les virus de cette famille indiquent que d'une part l'entrée de ces virus est dépendante du pH (acidification des endosomes) et que l'enveloppe virale est dérivée de membrane du réticulum endoplasmique.

Q4 (4 points) : A l'aide d'un schéma légendé et en vous appuyant sur ces informations, présentez les principales étapes du cycle de multiplication d'un tel virus.

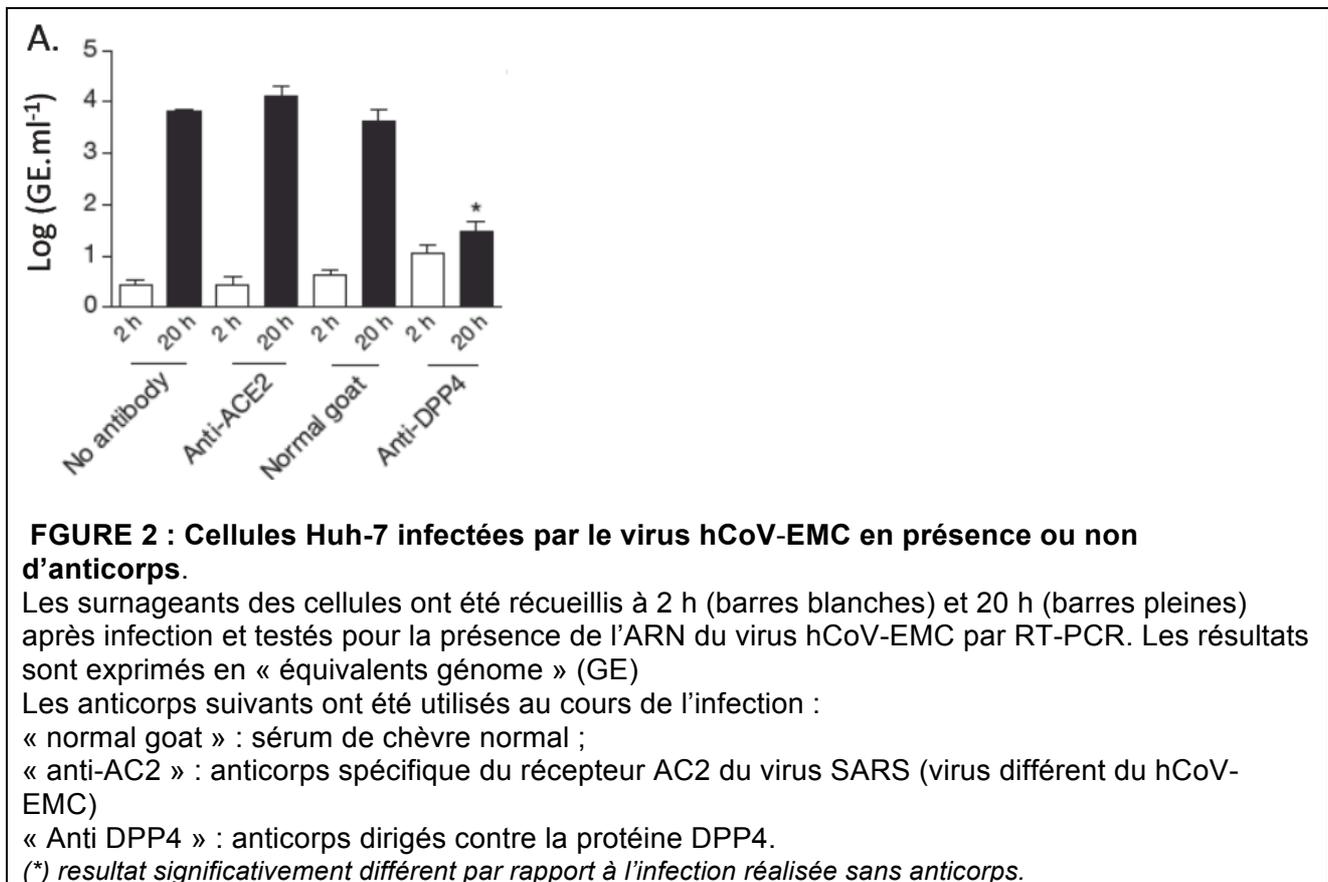
Des résultats de la littérature suggèrent que la protéine cellulaire DPP4 est impliquée dans l'infection par le virus hCoV-EMC. Cette protéine cellulaire est exprimée à la surface des cellules Huh-7, des Vero et des cellules épithéliales primaires de bronchioles, mais pas à la surface des COS-7.

La figure 2 montre les résultats d'expériences mises en oeuvre suite à ces publications.

Q5 (2 points) : Quel est l'objectif de l'expérience montrée dans la figure 2A ? Pourquoi les chercheurs utilisent-ils les cellules Huh-7 ?

Q6 (3 points) : Analysez et interprétez les résultats de la figure 2.

Q7 (2 points) : D'après ces données La protéine DPP4 est-elle un récepteur du virus hCoV-EMC ?



Sujet de Mr Oliver Nüsse à traiter sur une copie séparée

Le système immunitaire est organisé pour monter une réponse efficace contre différents types de menaces.

Q1 : Résumez les mécanismes de défense contre les infections bactériennes allant de la reconnaissance du pathogène jusqu'à son élimination. Quels sont les acteurs moléculaires et cellulaires de cette réponse ? (6 points)

Q2 : Qu'est-ce qui change dans cette réponse immunitaire s'il s'agit de la deuxième infection avec la même souche de bactérie ? (2 points)

La myéloperoxydase (MPO) fait partie de cette réponse. Elle catalyse la transformation d' H_2O_2 en HOCl.

Q3 : D'où vient l' H_2O_2 ? Quelle est la source ? (1 point)

Le rôle exact de la myéloperoxydase fait toujours débat. Afin d'analyser la corrélation entre l'infection par le pathogène *Salmonella enterica* et la présence d' H_2O_2 l'équipe a utilisé un biosenseur de H_2O_2 spécifique de *Salmonella*: Il s'agit d'une souche de *Salmonella* qui exprime la Green Fluorescent Protein (GFP) sous contrôle du promoteur de la catalase katGp spécifique de *Salmonella*. KatGp est contrôlé par le facteur de transcription OxyR qui est activé par l' H_2O_2 . La souche exprime également de façon constitutive une protéine rouge, la m-Cherry. De cette manière, en présence de *Salmonelles* vivante il y aura émission de fluorescence rouge et si *Salmonella* se trouve en présence d' H_2O_2 , il y aura émission de fluorescence rouge et verte. Des souris (normales "B6" ou déficiente en MPO "MPO^{def}") ont été infectés par cette souche de *Salmonella* et les bactéries ont été récupéré de la rate après 4 jours. La fluorescence des bactéries était analysée par cytométrie en flux.

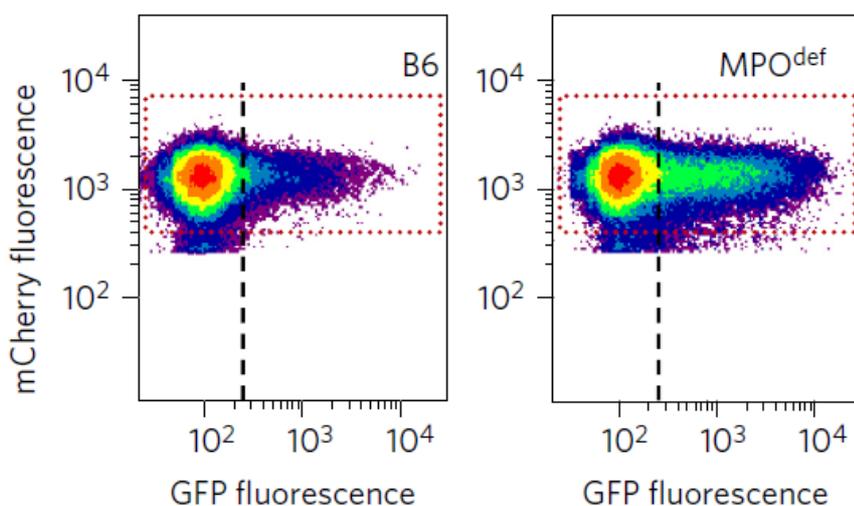


Fig 1 : Fluorescence rouge (mCherry) et verte (GFP) de bactéries après infection de souris B6 à gauche ou MPO^{def} à droite.

Q4 : A quoi pourrait correspondre la ligne verticale en pointillé ? (1 point)

Q5 : Décrivez la différence des cytogrammes entre les 2 types de souris. Expliquez cette différence en tenant compte de l'activité de la MPO. (3 points)

Q6 : Pour quantifier cette différence, il faudrait déterminer combien de bactéries sont devenues vertes et quel est le niveau de leur fluorescence. Décrivez les étapes d'analyse de cytométrie qui vous permettent d'obtenir ces deux informations. (3 points)

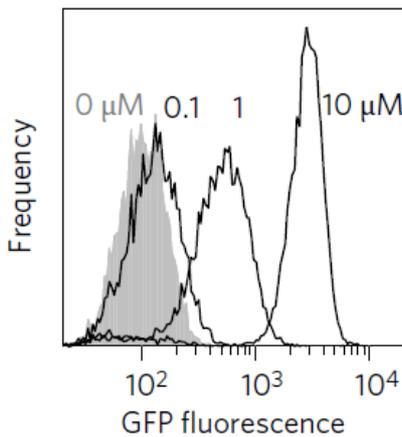


Fig 2: Niveau de fluorescence verte des *Salmonella* après une exposition in vitro à différentes concentrations d'H₂O₂ (0 à 10 μM).

Q7 : En comparant Fig 1 et 2, pourriez-vous estimer les concentrations d'H₂O₂ auxquelles les bactéries ont été exposées dans les souris B6 et MPO^{def} ? Décrivez brièvement la démarche et votre estimation. (2 points)

Notre système immunitaire possède plusieurs mécanismes de défense contre les diverses menaces. En cas d'infection par la voie digestive (comme pour le pathogène *Salmonella enterica*), un mécanisme spécifique basé sur des anticorps est mis en jeu. Il s'agit d'une sorte de défense avancée.

Q8 : Décrivez ce mécanisme de défense, les molécules et cellules impliqués. (2 points)

Ce problème s'inspire de Schürmann et al., Nature Microbiology 2017