

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

**UE : Immunologie-Virologie
Année Universitaire 2017-2018, 1^{ère} session.**

Date de l'épreuve : 9 Mai 2018.

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

Comme tous les *Herpesviridae*, le **HSV1** (herpes simplex virus 1) est un virus à ADN double brin enveloppé. Après l'étape d'entrée, la nucléocapside recouverte des **protéines du tégument** est libérée dans le cytosol. Bien que la plupart des protéines du tégument se dissocient de la nucléocapside à cette étape, certaines, dont la protéine pUL37, restent associées.

L'objectif des expériences décrites ci-après est de clarifier le rôle de cette protéine dans le cycle de multiplication du virus.

Q1) D'après vos connaissances, quel est le mécanisme d'entrée des virus enveloppés de type Herpès ? Présentez ce mode d'entrée (1 point).

Par une approche non décrite ici, les auteurs ont construit une souche virale HSV1 mutée au niveau de la protéine du tégument pUL37. Cette souche mutante, nommée R2, possède une protéine pUL37 mutée ponctuellement. Cette mutation ne modifie pas la conformation de pUL37, ni son incorporation dans les particules virales.

Dans l'expérience 1, des cellules PK15 (sensibles et permissives au virus HSV1) ont été infectées avec les souches virales sauvage (WT) et mutante (R2). Le diamètre des plages de lyse a été mesuré 4 jours post-infection (Figure 1).

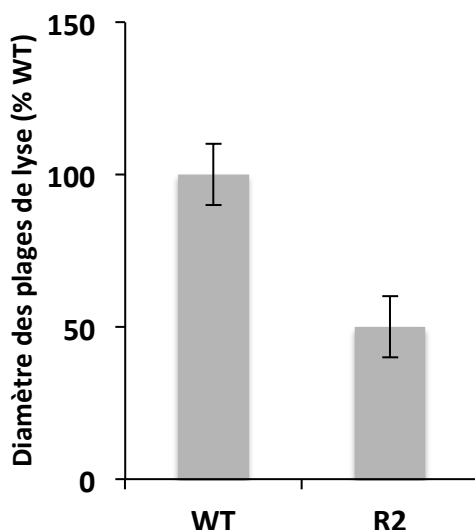


Figure 1 : Les diamètres relatifs des plages de lyse induites par les virus mutant R2 et sauvage WT ont été mesurés 4 jours post-infection.

Les diamètres des plages ont été compilés à partir de trois expériences indépendantes et sont présentés sous forme de pourcentage par rapport au diamètre moyen des plages mesuré avec l'échantillon sauvage.

Les barres d'erreur représentent les écarts-types.

Q2) Définir la notion de "Multiplicity of Infection" (M.O.I.). Selon vous, dans l'expérience décrite dans la figure 1, les auteurs ont-ils infecté les cellules à forte (10) ou faible (0,01) M.O.I. ? Justifiez votre réponse. (1 point)

Q3) Analysez les résultats présentés dans la figure 1 et concluez (1 point)

Après avoir constaté que les virus mutants R2 présentent des capacités d'entrée similaires à celles des virus sauvages (*expérience non montrée*), les auteurs ont infecté à nouveau des cellules PK15 avec les 2 types de virus (*expérience 2*) en absence ou en présence de nocodazole. Les niveaux d'expression des gènes précoces ont été mesurés à différents temps post-infection (Figure 2).

Q4) Quel est l'effet du nocodazole ? Quelle(s) étape(s) du cycle viral est/sont perturbée(s) par cet inhibiteur ? (1,5 points)

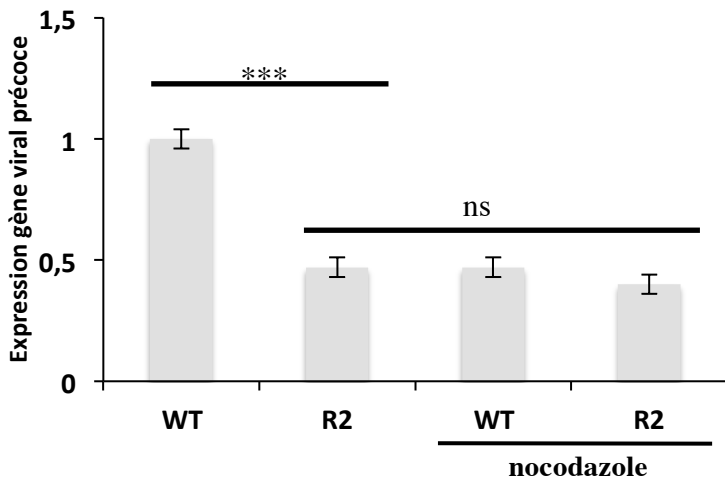


Figure 2 : L'expression du gène viral précoce IE180 a été quantifiée par qRT-PCR après 4 heures d'infection avec la souche virale sauvage (WT) ou mutante (R2) en présence ou non de 9µM de nocodazole.

Les résultats sont exprimés en quantité relative par rapport au niveau moyen observé lors de l'infection de type sauvage non traitée (fixé à 1). Les moyennes sont indiquées (les barres d'erreurs représentent les écarts-types).

**** : différence significative

ns : différence non significative

Q5) Analysez les résultats présentés dans la figure 2 et concluez. (2 points)

Q6) Ces résultats vous semblent-ils cohérents avec les observations faites dans l'expérience 1 ? Expliquez. (1 point)

Des expériences complémentaires, réalisées dans un modèle animal, ont révélé que la souche virale R2 est capable de se multiplier *in vivo* mais cette multiplication est restreinte au site d'inoculation et n'induit aucun symptôme chez les individus infectés.

Dans l'expérience 3, des souris ont été infectées avec une suspension de virus R2 (ou du tampon pour le groupe contrôle), puis 14 jours plus tard ces animaux ont été infectés avec une souche virale sauvage virulente. L'apparition des symptômes (affections oculaires dans le cas présent) a été suivie (Figure 3)

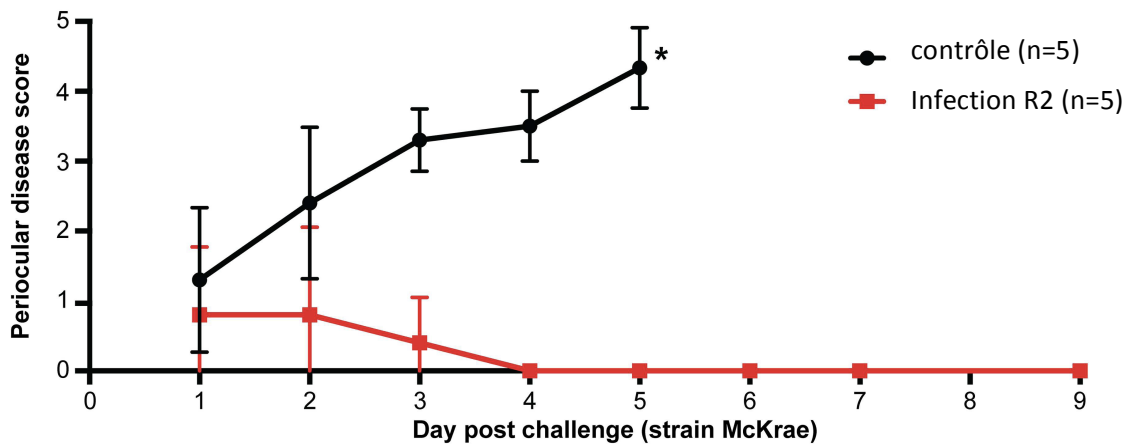


Figure 3 : Des souris ont été infectées (carrés) ou non (rond) avec la souche virale R2. 14 jours plus tard, les 2 groupes ont été infectés (*challenge*) avec une souche virale virulente (McKrae). Les symptômes oculaires ont été examinés quotidiennement suite à cette seconde infection et notés ainsi : 0 = aucun signe ; 1 = affection légère ; 2 = inflammation modérée des paupières ; 3 = inflammation importante des paupières ; 4 = yeux gonflés et fermés ; 5 = yeux gonflés fermés et lésions cutanées.

* animaux sacrifiés en raison de l'apparition de symptômes neurologiques importants.

Q7) Décrivez et expliquez les résultats présentés dans la figure 3. (1,5 point)

Q8) D'après ces résultats, la souche R2 se présente-t-elle comme une potentielle souche vaccinale ? Argumentez votre réponse. (1 point)

Inspiré de : Richards AL *et al.* (2017), PLoS Pathogens 13(12): e100674.
Pitts JD *et al.* (2014), Journal of Virology, 88(10):5462-73.

Sujet de Mr Oliver Nüsse à traiter sur une copie séparée

Depuis quelques années, les anticorps thérapeutiques attirent l'attention des chercheurs et de l'industrie pharmaceutique. La thérapie anticancéreuse est particulièrement visée par ces anticorps.

Q1) Rappelez la composition et la structure globale des anticorps et les rôles des différents domaines. (2 point)

Plusieurs principes de thérapie anticancéreuse à l'aide d'anticorps sont actuellement testés, une stratégie consiste à mobiliser des cellules du système immunitaire pour attaquer et tuer les cellules cancéreuses.

Q2) Expliquez quelles cellules immunitaires sont capables de tuer d'autres cellules de façon dépendante des anticorps. Par quels mécanismes? Comment un anticorps thérapeutique peut-il favoriser ce processus ? (2 points)

Parmi les problèmes avec ce type de thérapie, le développement d'une réponse immune contre l'anticorps thérapeutique a été décrit.

Q3) Pourquoi est-ce qu'un anticorps produit dans des conditions stériles d'une usine pharmaceutique et injecté chez un patient peut-il provoquer une réponse immunitaire et quelle réponse ? (1 point)

Une autre approche thérapeutique consiste à produire des anticorps bispécifiques qui reconnaissent deux antigènes différents, chaque antigène étant reconnu par un des domaines de reconnaissance de l'anticorps. Löffler et coll (Blood 2000) ont décrit l'efficacité d'un anticorps bispécifique contre CD19 et CD3. La molécule CD19 est spécifique des lymphocytes B, la molécule CD3 est spécifique des lymphocytes T.

Ils ont produit et purifié cet anticorps et testé si leur anti CD19xCD3 se fixe sur des lymphocytes (Fig 1, page suivante). Ensuite, ils ont examiné si les lymphocytes T tuent les lymphocytes B en présence de l'anti CD19xCD3 (Fig 2).

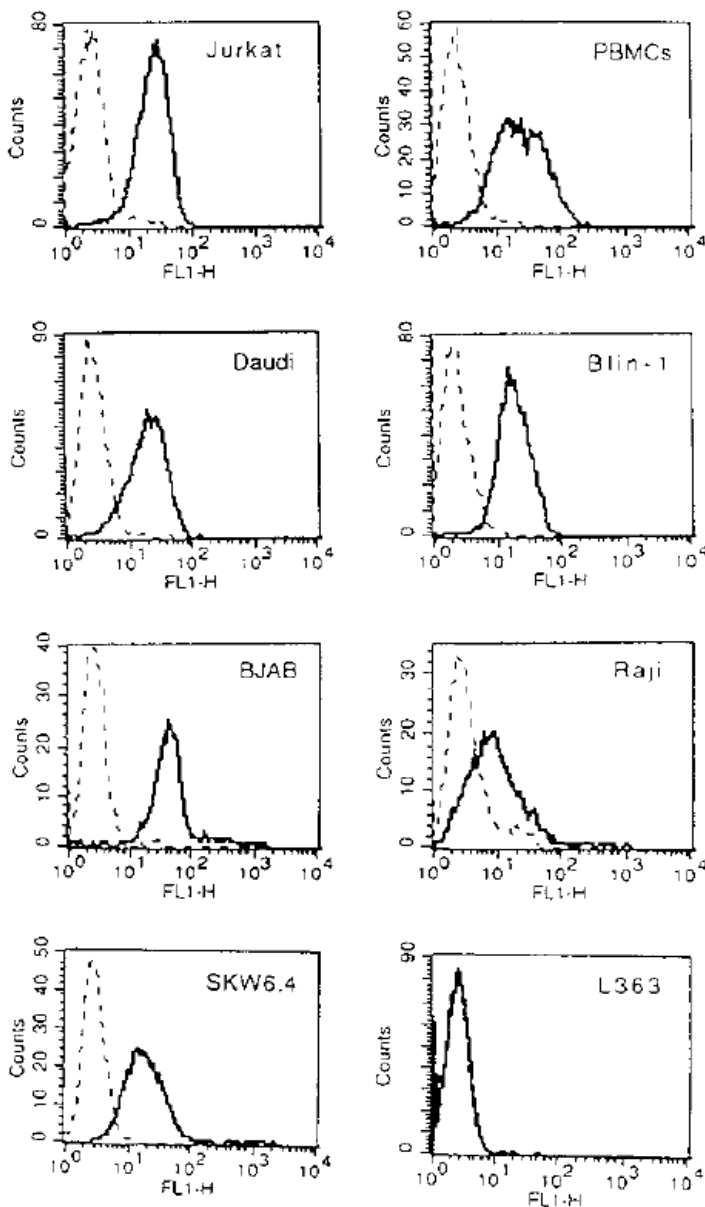


Fig 1) Fixation de l'anticorps CD19xCD3 sur différentes lignées de cellules et aussi des PBMC (cellules mononuclées du sang). Histogrammes (no de cellules en fonction de l'intensité de la fluorescence) obtenus par cytométrie en flux à l'aide d'un anticorps secondaire fluorescent. Les cellules Jurkat sont une lignée de cellules T. Les autres lignées dans cette figure sont des cellules B. La ligne pointillée dans chaque histogramme correspond au contrôle négatif avec un anticorps irrelevant.

Q4) Quel est l'intérêt de tester des lignées B et T ? (0,5 points)

Q5) Le profil du signal est un peu différent dans les PBMC, pourquoi ? (0,5 points)

Q6) Que peut-on conclure sur les cellules L363 en bas à droite ? (0,5 points)

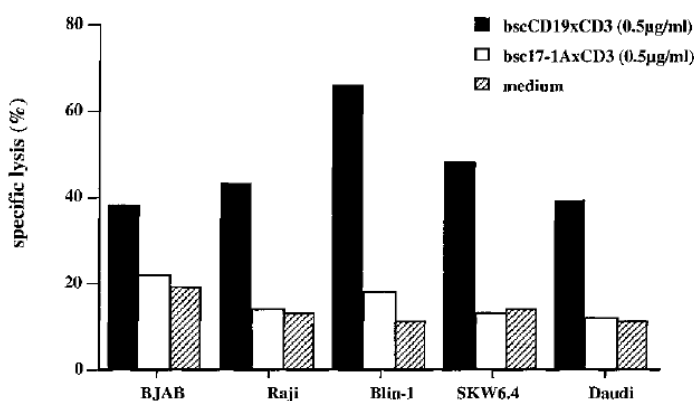


Fig 2) Cytotoxicité ("lysis") de lymphocytes T envers 5 lignées de lymphocytes B en présence de milieu (colonnes grises), d'un anticorps anti CD3 (colonnes blanches) ou de l'anti CD19xCD3 (colonnes noires).

Q7) Quels lymphocytes T sont capables de tuer les lymphocytes B, par quels mécanismes ? (1,5 points)

Q8) Interprétez la figure 2. (1 point)

Q9) Emettez une hypothèse sur le mécanisme d'action de l'anti CD19xCD3 dans cette expérience. (1 point)