

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

**UE : Immunologie-Virologie
Année Universitaire 2018-2019, 1^{ère} session.**

Date de l'épreuve : 7 mai 2019.

Durée : 2 heures

Aucun document n'est autorisé

L'examen est constitué de 2 parties :

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

SUJET proposé par G. Schlecht (10 points)

Une avancée importante en immunothérapie des cancers a été réalisée récemment grâce aux cellules CAR T (*Chimeric Antigen Receptor* en anglais, pour récepteur à l'antigène chimérique). Ces cellules sont des lymphocytes T dont le récepteur est modifié génétiquement pour reconnaître des cellules cancéreuses et les tuer. Cette modification consiste en la fusion d'un domaine scFv (*single chain Fragment variable* en anglais, correspondant aux domaines V_H et V_L d'un anticorps de spécificité connue) avec le domaine de signalisation de la chaîne CD3zeta (ζ) du TCR (Figure 1).

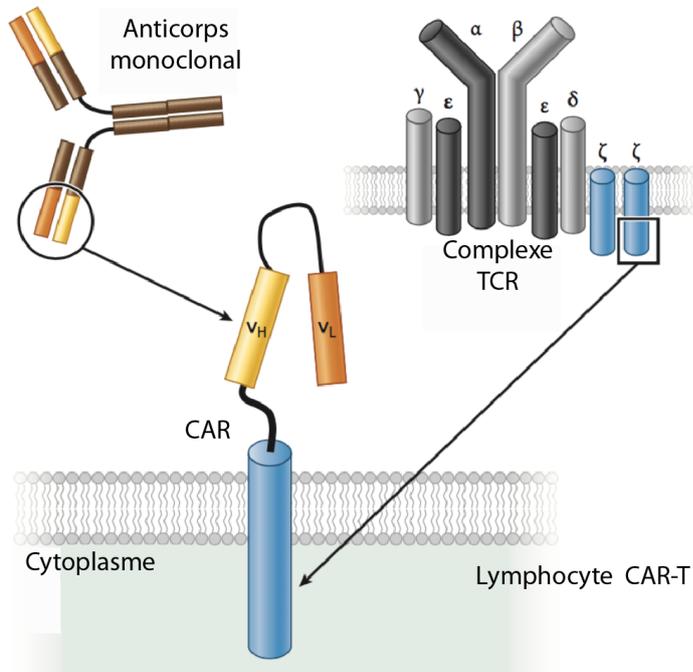


Figure 1 : Représentation schématique de la structure d'un récepteur CAR. Le CAR est obtenu par fusion d'un scFV avec le domaine de signalisation de la chaîne zeta (ζ) du TCR. La construction génétique codant pour le CAR est transférée dans des lymphocytes T pour obtenir les cellules CAR T.

Q1 (3 points) : En reproduisant et complétant le tableau ci-dessous, rappelez les caractéristiques des récepteurs à l'antigène des lymphocytes B (BCR) et T (TCR). En vous appuyant sur la figure 1 et le descriptif de l'introduction, déduisez les propriétés des récepteurs CAR et indiquez-les dans la colonne correspondante.

	BCR	TCR	CAR
Nature des antigènes reconnus			
Nature des cellules présentatrices de l'antigène si pertinent			
Domaines formant les site antigénique			
Nombre de sites de reconnaissance de l'antigène par récepteur			
Protéines assurant la signalisation en aval du récepteur			
Conséquences de l'activation du lymphocyte porteur du récepteur			

Des chercheurs ont créé des lymphocytes CAR T spécifiques de la molécule CD19, un marqueur de lymphocytes B (LB). Pour cela, ils ont fait exprimer la construction présentée en figure 1A dans des lymphocytes T (LT) et testé le phénotype et la fonctionnalité des lymphocytes CAR T obtenus (Figure 1 B-E).

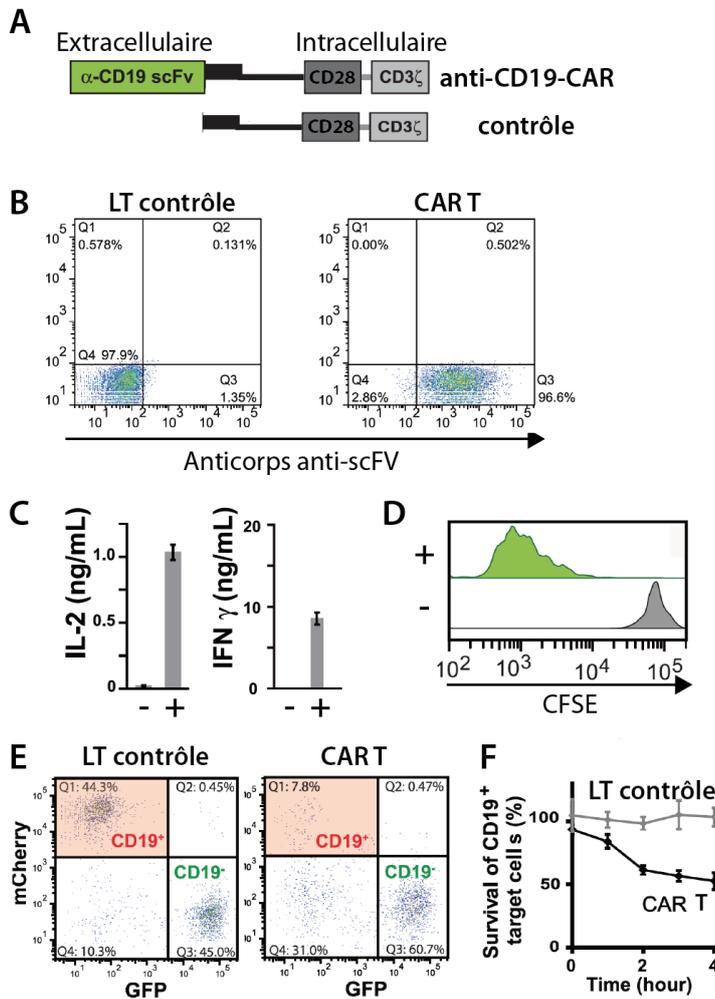


Figure 2 : Présentation et analyse des lymphocytes CAR T .

A. Schéma des constructions génétiques codant pour le CAR et contrôle. Les domaines intracellulaires codés par les constructions comportent le domaine de co-stimulation de CD28 et la chaîne CD3 ζ.

B. Des LT CD8 ont été transfectés avec les deux constructions présentées en A pour générer les LT contrôle et CAR T. Ces cellules ont été analysées par cytométrie en flux à l'aide d'anticorps anti-scFV.

C. Les lymphocytes CAR T ont été incubés en présence (+) ou en l'absence de cellules tumorales exprimant CD19 et la production d'IL-2 et d'IFN-γ a été mesurée.

D. Les lymphocytes CAR T ont été chargés en CFSE puis incubés en présence (+) ou en l'absence de cellules tumorales exprimant CD19 pendant 72 heures. La fluorescence CFSE a été analysée par cytométrie en flux.

E. Des cellules tumorales exprimant CD19 (CD19+) ou ne l'exprimant pas (CD19-) ont été modifiées génétiquement pour exprimer respectivement un fluorochrome rouge (mCherry) ou vert (GFP). Ces cellules ont été mélangées en nombre équivalent et incubées avec des LT contrôle ou CAR T pendant une nuit. Le mélange cellulaire a été analysé par cytométrie en flux. Les résultats sont présentés sous forme de dot-plot.

F. Une expérience similaire à celle décrite en E a été réalisée, mais analysée 30 minutes à 4 heures après l'ajout des lymphocytes. Le graphique présente la survie des cellules CD19+ en fonction du temps.

Q2 (2 points) : Rappelez quels sont les signaux requis pour l'activation complète d'un LT. Selon vous, pour quelle raison les auteurs ont-ils introduit un domaine correspondant au domaine intracellulaire de CD28 dans leur construction CAR ?

Q3 (1 point) : Analysez et interprétez les résultats de la figure 2B.

Q4 (3 points) : Analysez et interprétez les résultats des sous-figures 2C à 2F.

Q5 (1 point) : Que pouvez-vous conclure de l'ensemble de ces résultats ? Selon vous, quel est l'atout principal des lymphocytes CAR T ?

SUJET proposé par C. LAGAUDRIERE (10 points)

Les virus atténués suscitent un intérêt considérable en tant qu'agents anti-cancéreux. Ainsi, dans le cas du virus de la rougeole, des études préliminaires ont montré que la souche vaccinale MV a une activité anti-tumorale. Les résultats qui suivent, publiés dans la revue *Nature Biotechnology*, visent à modifier cette souche virale MV afin de l'optimiser en tant que virus oncolytique.

Un schéma de la structure de la particule virale est présenté dans la figure 1. Il s'agit d'un virus enveloppé dont le génome est une molécule d'ARN simple brin de polarité négative. Ce virus possède deux glycoprotéines d'enveloppe, l'hémagglutinine (H) et la protéine de fusion (F), qui sont responsables de la fixation et de la fusion membranaire, respectivement. Les deux récepteurs de ce virus, connus à ce jour, sont les molécules de surface CD46 (exprimé de manière ubiquitaire sur tous les types cellulaires) et SLAM (molécule d'activation exprimée sur les lymphocytes B et T).

Q1 (1 point) – Définir ce qu'est :

- a) une cellule sensible à un virus,**
- b) une cellule permissive à un virus.**

Q2 : Décrire brièvement, à l'aide d'un schéma légendé, les différentes étapes du cycle de multiplication de ce type de virus. Vous préciserez notamment le rôle de la protéine polymérase L et expliquerez pourquoi elle doit être incorporée dans le virion. (3 points)

Différents virus recombinants exprimant des protéines H modifiées ont été construits à partir de la souche virale MV. Ces différents virus sont présentés dans la figure 2.

Q3 : En modifiant la séquence de la protéine H et en fusionnant sa séquence à celle de scFv (anticorps simple chaîne) spécifiques de CD38 et de l'EGFR, quel est l'objectif des auteurs ? (1 point).

Les auteurs ont mesuré l'expression des molécules CD46, SLAM, CD38 et EGFR à la surface de différents types de cellules tumorales (Figure 3A), puis ils ont infecté ces cellules avec les virus recombinants. L'infection a été examinée par microscopie de fluorescence (Figure 3B).

Q4 : Analysez les résultats de la figure 3A. (1 point)

Q5 : Dans la figure 3B, d'où provient la fluorescence observée ? Analysez les résultats obtenus. Ces résultats sont-ils cohérents avec les données de la figure 3A et les caractéristiques des virus utilisés (cf figure 2) ? (2,5 points)

Dans une dernière expérience, les auteurs ont testé l'activité anti-tumorale des souches de virus MV1, MV3 et MV4 *in vivo*.

Q6 : Décrire et expliquez les résultats obtenus (Figure 4). (1,5 point)

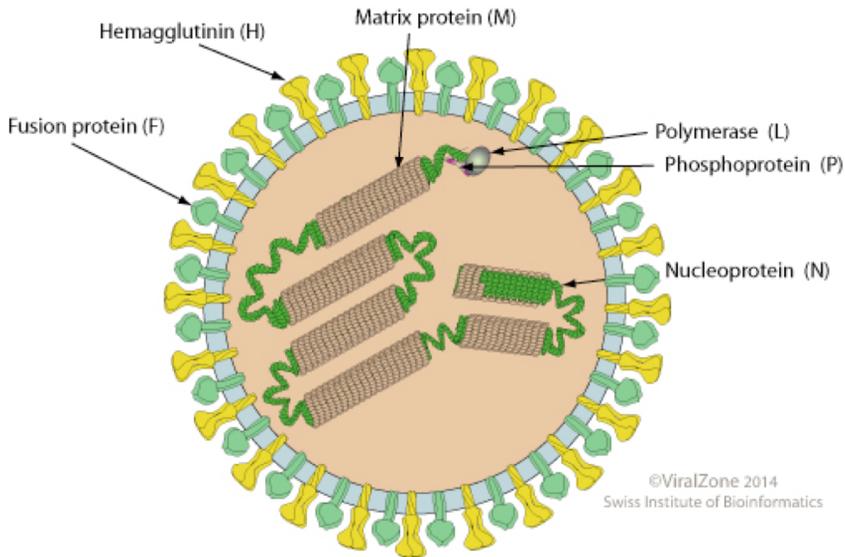


Figure 1 : Structure du virus de la rougeole

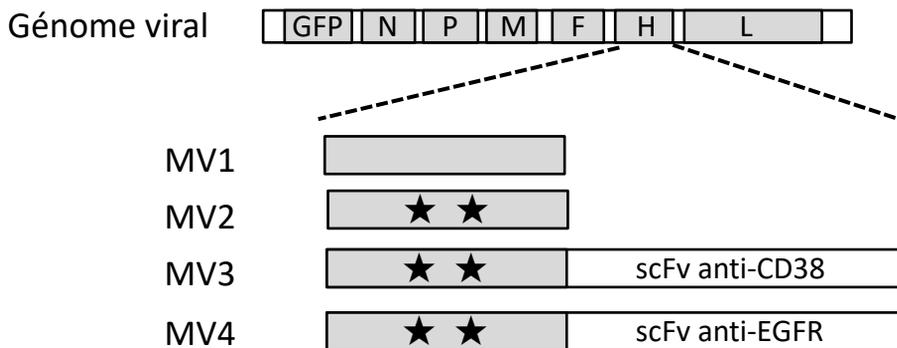
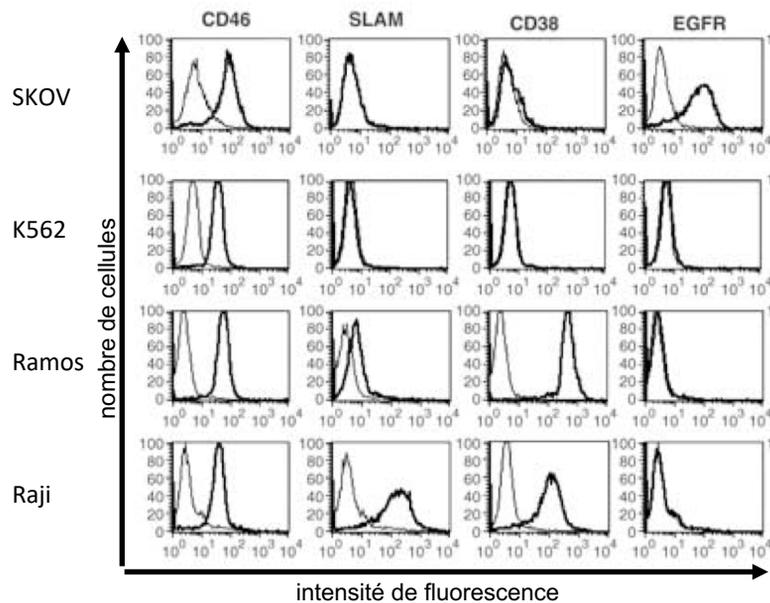


Figure 2 : Représentation schématique des génomes viraux recombinants montrant les modifications de la protéine H.

- Chaque génome présente une séquence additionnelle codant pour la protéine fluorescente GFP.
- Le virus MV1 correspond à la souche virale initiale (protéine H non modifiée).
- Les symboles (★) dans la séquence de la protéine H indiquent la présence de mutations ponctuelles qui abolissent l'interaction de la protéine H avec les récepteurs CD46 et SLAM.
- Une séquence codant pour un anticorps simple-chaîne (scFv) a été introduite à l'extrémité Cter de la protéine H. Selon les cas, le scFv est dirigé contre la protéine CD38 (virus MV3) ou le récepteur à l'EGF (virus MV4).

A.



B.

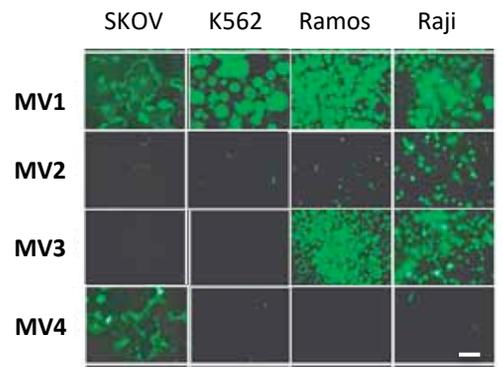


Figure 3 :

A. Expression de surface des molécules CD46, SLAM, CD38 et EGFR déterminée par immunofluorescence et cytométrie en flux (trait gras) à la surface de différentes lignées cellulaires (cellules SKOV, K562 et Ramos et Raji). Les contrôles négatifs (cellules incubées sans anticorps secondaires) sont indiqués en trait fins.

B. Infection de différentes lignées cellulaires par les souches virales modifiées (MV1, MV2, MV3 et MV4 cf figure 2). Les cellules ont été analysées par microscopie de fluorescence 48 heures post-infection (barre d'échelle : 200 μ m).

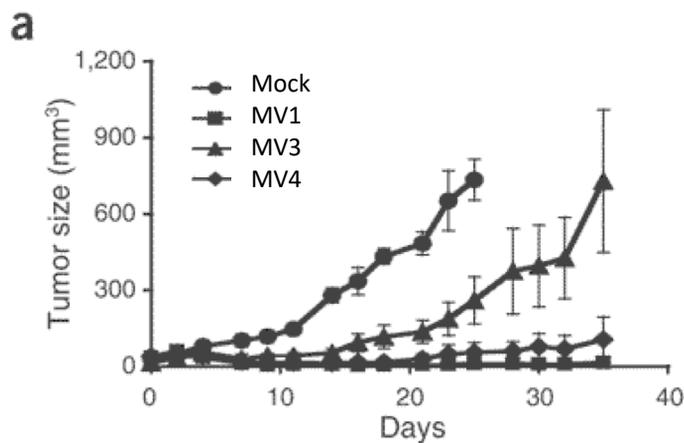


Figure 4 : Courbes de croissance tumorale de xénogreffes de cellules SKOV traitées par injection intratumorale de virus.

Les tumeurs sont établies en inoculant 5×10^6 cellules SKO dans le flanc droit des souris. 10 jours après l'inoculation, les souris ont reçu 6 injections intratumorales de chaque virus recombinants (MV2, 5 ou 7 dilués dans du milieu) aux jours : J0, 2, 4, 7, 9 et 11 . Les souris contrôles sont injectées seulement avec du milieu (Mock). Le volume des tumeurs (mm^3) a été mesuré trois fois par semaine.