

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

**UE : Immunologie-Virologie
Année Universitaire 2018-2019, 2^{ème} session.**

Date de l'épreuve : 18 juin 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 O. Nüsse (10 points)

Question A1 (4 points)

Expliquez la structure et la production des isotypes d'immunoglobulines ainsi que leur localisation dans l'organisme.

Question A2 (3 points)

Vous en avez assez de l'université et des examens à la chaîne. Vous créez votre entreprise de production d'anticorps. Hélas, votre banquier est prudent et il faut lui expliquer avec précision l'utilité de multiples immunisations, qui coûtent cher (hébergement et nourriture des animaux). Attention, lui aussi a fait une licence de biologie avant son MBA, il veut savoir ce qui se passe lors d'une deuxième et troisième immunisation.

Quelle est l'utilité de multiples immunisations pour la production d'anticorps en termes de quantité et qualité du produit ?

Quels mécanismes biologiques sont responsables de ces effets ?

Question A3 (3 points)

La technique "cytometric bead array", CBA, utilise des billes de latex fluorescentes couvertes d'anticorps afin de quantifier plusieurs cytokines en parallèle dans le même tube d'échantillon. Dans l'exemple ci-dessous, les billes ont 6 niveaux différents d'intensité de fluorescence, chaque niveau correspond à un type de bille couvert d'un anticorps spécifique. La fluorescence des billes est visible dans le canal FL3 d'un cytomètre en flux (Fig 1).

Le mélange des billes est incubé avec des échantillons comme le sérum humain. Les cytokines se fixent sur les anticorps (primaires) attachés aux billes. Ensuite on ajoute des anticorps secondaires contre les mêmes cytokines. Les anticorps secondaires s'attachent aux cytokines qui sont attachées aux billes via les anticorps primaires. Les anticorps secondaires sont marqués avec un fluorochrome visible dans le canal FL2 du cytomètre.

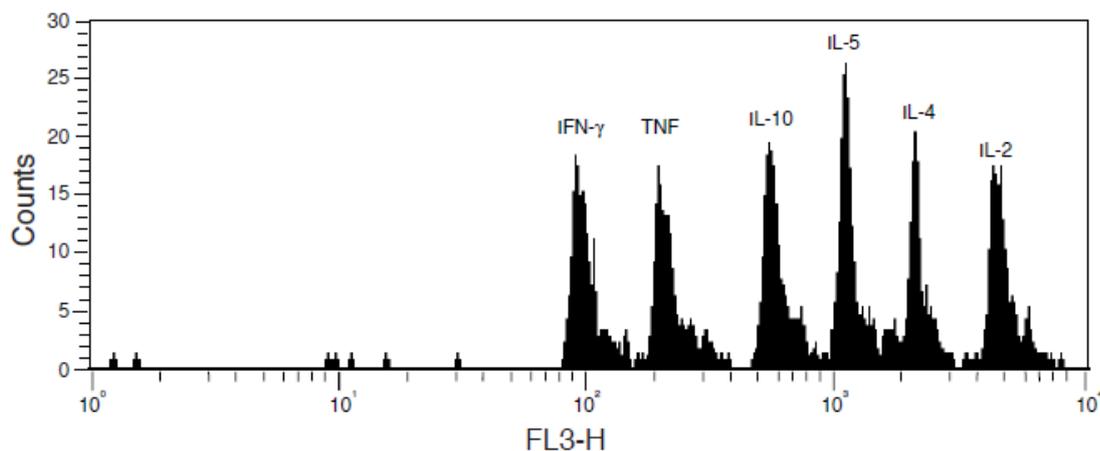


Fig1: Histogramme de nombres de billes avec 6 niveau de fluorescence, FL3 = fluorescence des billes.

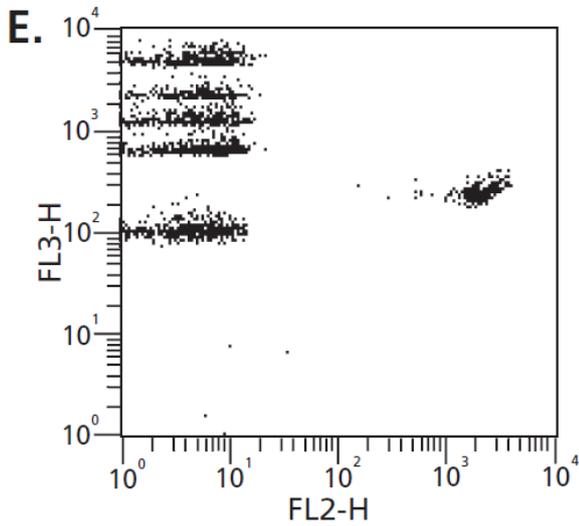


Fig2 Dotplot des fluorescences des billes (FL3) (comme dans Fig1) et des anticorps secondaires attachés (FL2). Les billes ont une faible autofluorescence dans le canal FL2.

Question 3a:

Les billes dans la Fig 2 ont été en contact avec une seule cytokine, laquelle ?

Question 3b:

Comment peut-on déterminer la concentration des cytokines dans l'échantillon avec cette technique ?

Question 3c:

Comparez cette technique de CBA avec la technique d'ELISA vue en TP.

Question 3d:

Dans l'exemple des figure 1 et 2, les billes ont la même taille. Quel serait l'intérêt de travailler avec des billes de taille différente ?

SUJET proposé par C. LAGAUDRIERE (10 points)

Le poxvirus « molluscum contagiosum virus » (MCV) est responsable de lésions cutanées qui peuvent persister des mois, voire des années, avec un minimum d'inflammation, ce qui suggère que ce virus a développé de solides stratégies d'évasion immunitaire.

Les virus de cette famille présentent deux types de particules infectieuses : les « virus matures » (MV) et les « virus enveloppés » (EV). Leur cycle de multiplication est présenté dans la figure 1.

Q1 (2,5 points) : Complétez la légende du schéma présenté dans la figure 1 (cadres 1 à 9).

Afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la persistance de ce virus, les auteurs se sont intéressés à la protéine virale MC80. Cette protéine présente des similitudes avec la chaîne lourde des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I). Cependant, contrairement aux CMH-I, cette protéine est retenue dans le réticulum endoplasmique et ne s'exprime pas à la surface cellulaire.

Dans une première expérience, les chercheurs ont mesuré la quantité de molécules de CMH-I exprimées à la surface de cellules exprimant ou non la protéine MC80. Cette analyse a été réalisée par immunofluorescence et cytométrie en flux (Figure 2).

Q2 (1 point) : Quelle est la fonction des molécules du CMH-I ?

Q3 (1,5 point) : Analysez les résultats de la figure 2.

Les chercheurs ont ensuite examiné la maturation des molécules du CMH-I dans les cellules exprimant MC80. Les résultats sont présentés dans la figure 3.

Q4 (1,5 point) : Analysez les résultats de la figure 3 et concluez en précisant l'effet de la molécule MC80 sur la biosynthèse des molécules du CMH-I.

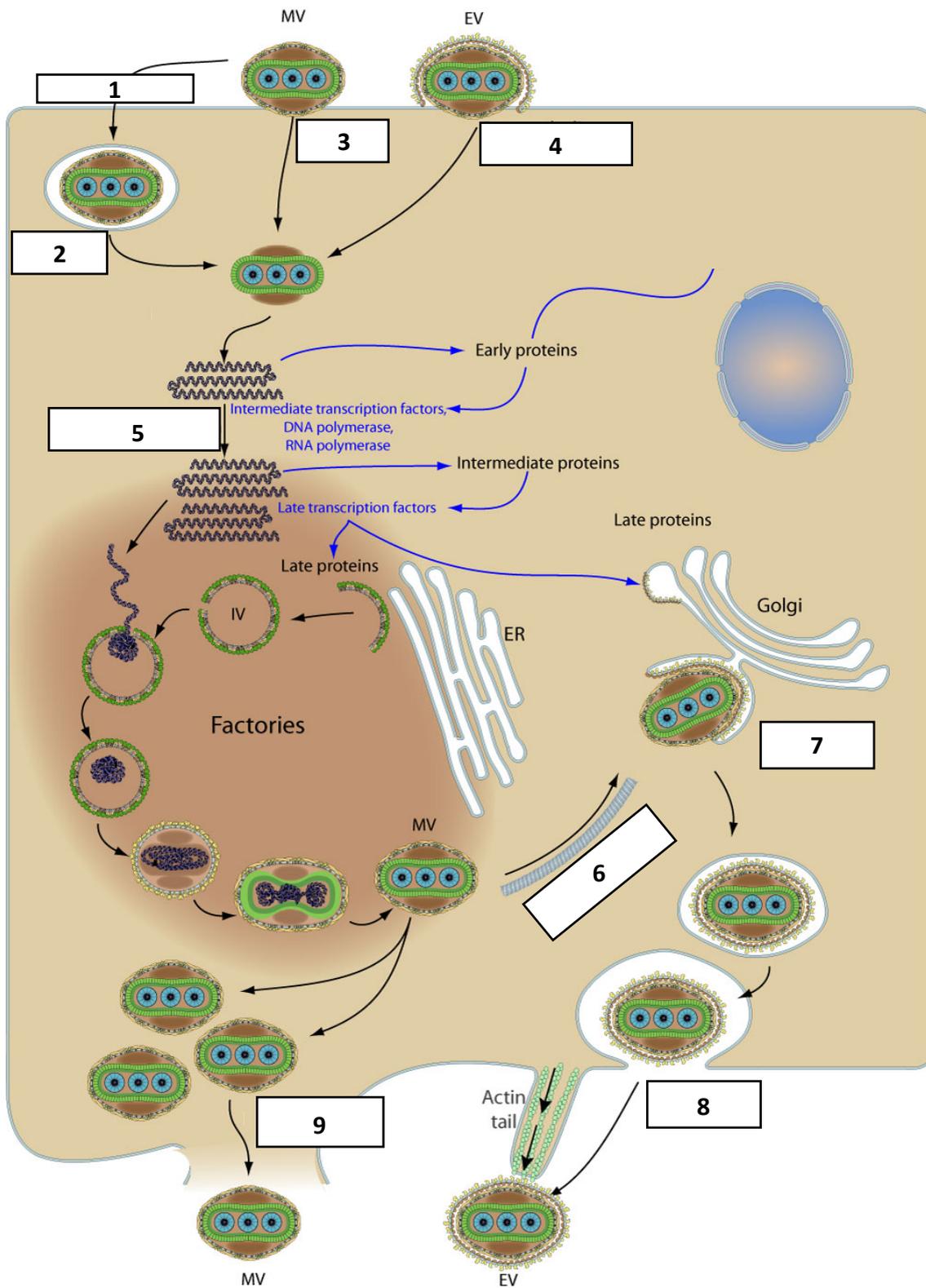
Dans une dernière expérience, les chercheurs ont examiné l'expression de surface des molécules du CMH-I dans des cellules de souris exprimant le peptide SIINFEKL spécifique des molécules de CMH-I H-2Kb. Pour ces expériences, ils disposent de 2 types cellulaires : l'un exprime le peptide au niveau du cytosol (Cyt-SIINFEKL) et l'autre exprime le peptide au niveau du réticulum endoplasmique (ER-SIINFEKL).

Q5 (1,5 point) : Analysez les résultats présentés dans la figure 4. Concluez en précisant l'effet de la molécule MC80 sur la maturation des molécules du CMH-I.

Q6 (2 points) : Connaissez-vous d'autres virus (ou famille virale) ayant des effets similaires sur l'expression des molécules du CMH-I ? Citez les et présentez brièvement un des mécanismes mis en jeu.

Librement adapté de : Harvey IB. et al. PLoS Pathogens 2019 ; 15(4): e1007711.

Figure 1 : Cycle de multiplication des Poxviridae



Adapté de <https://viralzone.expasy.org>

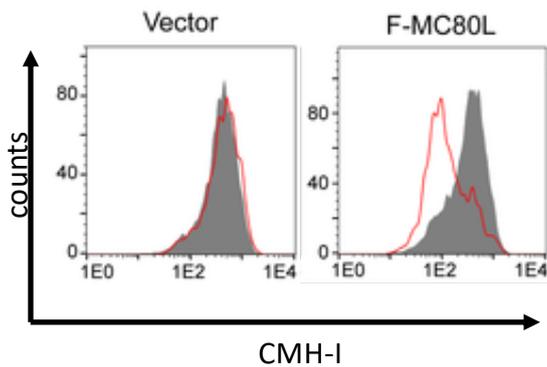


Figure 2 : Expression de surface des molécules du CMH-I. L'expression des molécules du CMH-I a été mesurée à la surface de cellules transfectées avec un plasmide contrôle (Vector) ou un plasmide permettant l'expression de la protéine virale MC80 (F-MC80L).

Les cellules ont été incubées avec un premier anticorps anti-CMH-I, puis avec un second anticorps dirigé contre le premier et couplé à un fluorochrome. Après lavage, la fluorescence des cellules a été quantifiée par cytométrie en flux.

Les histogrammes gris indiquent la fluorescence détectée sur ces mêmes cellules non transfectées.

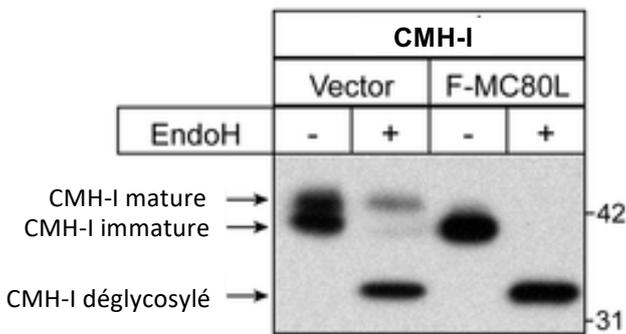


Figure 3 : Maturation des molécules du CMH-I. Les expériences ont été réalisées à partir de cellules transfectées avec un plasmide contrôle (vector) ou un plasmide permettant l'expression de la protéine virale MC80 (F-MC80L).

Après lyse des cellules, les molécules du CMH-I ont été immunoprécipitées à l'aide d'un anticorps spécifique (anti-CMH-I) et digérées (+) ou non (-) par l'endoglycosidase H (endoH). Les extraits ont été ensuite analysés par western-blot anti-CMH-I.

Pour mémoire : l'EndoH est couramment utilisée pour suivre le transport des glycoprotéines du RE dans l'appareil de Golgi. Cette enzyme hydrolyse les N-glycosylations. Les glycoprotéines ayant atteint l'appareil de Golgi sont résistantes à l'endoH.

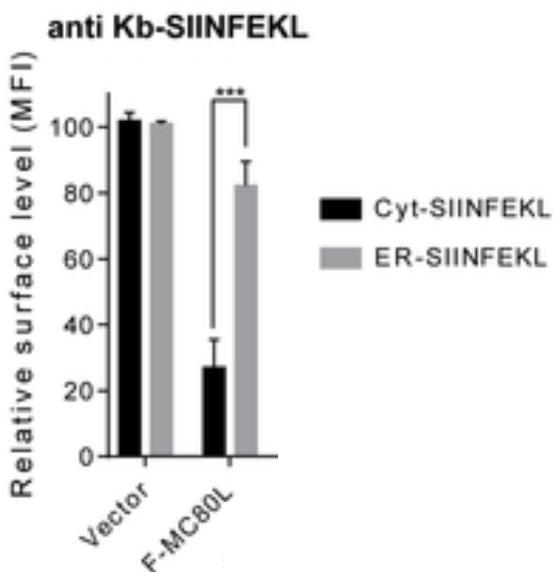


Figure 4 : Des cellules exprimant soit le peptide Cyt-SIINFEKL, soit le peptide ER-SIINFEKL (cf texte) ont été transfectées avec un plasmide contrôle (vector) ou un plasmide permettant l'expression de la protéine virale MC80 (F-MC80L). L'expression de surface des CMH-I a été mesurée par immuno-marquage (avec un anticorps anti-H-2Kb-SIINFEKL) et cytométrie en flux. Les résultats sont exprimés en intensité relative par rapport au contrôle (cellules non transfectées).

Les barres d'erreur représentent l'écart-type de deux expériences indépendantes.

*** = P<0.001