

Licence Sciences de la Vie, Mention : Biologie-Santé

UE : Immunologie-Virologie
Année Universitaire 2020-2021, 1^{ère} session.

Date de l'épreuve : 6 Mai 2021.

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 VIROLOGIE (Durée : 1 heure)

TOUTES VOS REPONSES DOIVENT ETRE JUSTIFIEES.

Le virus Nipah (NiV), identifié en 1999, est un virus émergent responsable d'encéphalites mortelles chez 70% des patients infectés. Il appartient à la famille des *Paramyxoviridae*, virus enveloppé à ARN simple brin négatif.

Le génome de ces virus code pour 5 protéines principales : deux protéines d'enveloppe (la glycoprotéine G et la protéine de fusion F), la protéine de matrice M, la protéine de capsid (nucléoprotéine N), la polymérase virale L et son co-facteur la protéine P. La capsid présente une symétrie de type hélicoïdale. L'entrée de ces virus met en jeu une fusion à la membrane plasmique.

Q1 (1 point) : Sous forme d'un schéma légendé, présentez la structure du virus NiV.

Q2 (2,5 points) : A l'aide d'un schéma légendé, décrivez les principales étapes du cycle de multiplication d'un tel virus.

Afin de caractériser le récepteur de ce virus, les chercheurs ont produit de manière recombinante, deux protéines de fusion :

- La protéine NiV-G-Fc composée de l'ectodomaine (partie extracellulaire) de la glycoprotéine G fusionné à la portion Fc d'une immunoglobuline G (IgG humaine)
- La protéine NiV-G-HA composée de l'ectodomaine (partie extracellulaire) de la glycoprotéine G fusionné au peptide HA (9 acides aminés).

Dans l'expérience 1, la fixation de la protéine NiV-G-Fc à la surface de cellules, permmissives ou non au NiV, a été analysée (Figure 1).

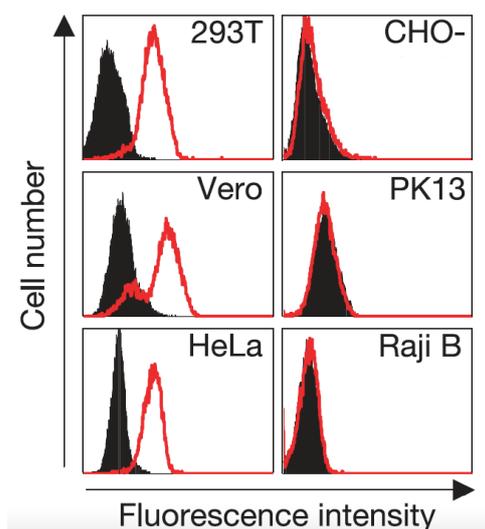


Figure 1 : Des quantités équivalentes de NiV-G-Fc (ligne épaisse) ou de Fc seul (histogramme plein) ont été incubées avec des cellules 293T, Vero, HeLa, cellules CHO, PK13 ou Raji. Puis les cellules ont été lavées et incubées avec un anticorps secondaire anti-IgG humaine conjugué à de la phycoérythrine (PE). A la fin de l'incubation, les cellules ont été lavées et les intensités de fluorescence ont été analysées à l'aide d'un cytomètre de flux.

Q3 (1,5 points) : Décrivez et analysez les résultats présentés dans la figure 1. Selon toute vraisemblance, quelles sont les cellules sensibles et permmissives au NiV ?

Par des approches biochimiques non décrites ici, les chercheurs ont identifié la protéine membranaire ephrinB2 parmi les protéines cellulaires co-précipitées avec la protéine NiV-G-Fc.

Dans l'expérience 2, un test ELISA a été mis en œuvre comme suit : des protéines ephrinB1-Fc et ephrinB2-Fc ont été incubées (séparément) dans des plaques recouvertes d'anticorps anti-Fc humains. Après lavages, une solution de protéines NiV-G-HA a été ajoutée à chaque puits. A l'issue de l'incubation, les puits ont été lavés et une solution d'anticorps anti-HA conjugué à la HRP a été ajoutée. Enfin, après une dernière série de lavages, une solution d'OPD (substrat de la HRP) a été ajoutée. Après arrêt de la réaction, l'absorbance a été mesurée à 490 nm. Les résultats sont présentés dans la Figure 2.

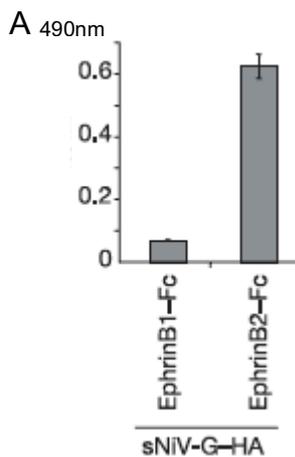


Figure 2 : Un test ELISA a été réalisé avec les molécules suivantes :

- Des anticorps anti-IgG humaine (anti-Fc),
- Des protéines de fusion ephrinB1-Fc et ephrinB2-Fc composées respectivement de la partie extracellulaire des protéines ephrinB1 et ephrinB2 fusionnées à la portion Fc d'une immunoglobuline G humaine,
- La protéine chimère NiV-G-HA,
- Des anticorps anti-peptide HA couplés à la HRP (Peroxydase).

Rq : ephrinB1 et ephrinB2 sont des protéines transmembranaires exprimées à la surface de divers types cellulaires. Au sein de cette famille de protéines, l'éphrine B1 est l'éphrine la plus proche de l'éphrine B2.

Q4 (1 point) : Expliquez à l'aide d'un schéma le principe du test ELISA mis en œuvre et précisez quel est l'objectif de cette expérience. Analysez les résultats obtenus.

Expérience 3 : les chercheurs ont utilisé des particules virales dérivées du VSV¹ dites « pseudotypées ». Ces particules présentent au niveau de leur enveloppe les protéines d'enveloppe G et F du NiV, mais sont dépourvues de la protéine d'enveloppe naturelle du VSV. De plus, ces virus VSV pseudotypés sont recombinants : le gène codant pour une protéine fluorescente rouge (RFP) a été inséré dans le génome. Les expériences réalisées avec ces virus VSV-RFP pseudotypés avec Ni-F/G sont présentées dans la Figure 3.

¹ VSV : Virus de la Stomatite Vésiculeuse, virus enveloppé à ARN négatif non segmenté. Le large tropisme cellulaire de ce virus en fait un virus modèle pour de nombreuses applications de recherche fondamentale.

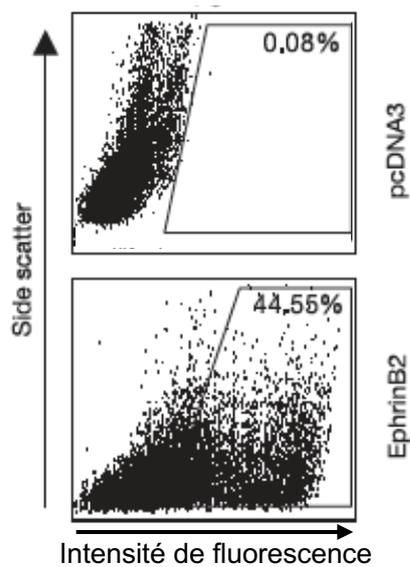


Figure 3A : Les cellules CHO ont été transfectées avec un plasmide d'expression de l'ephrinB2 ou un plasmide contrôle (pcDNA3) et infectées par le VSV-RFP pseudotypé NiV-F/G. La production de RFP a été analysée par cytométrie en flux 24 h post-infection. Le pourcentage de cellules RFP positives est précisé pour chaque condition.

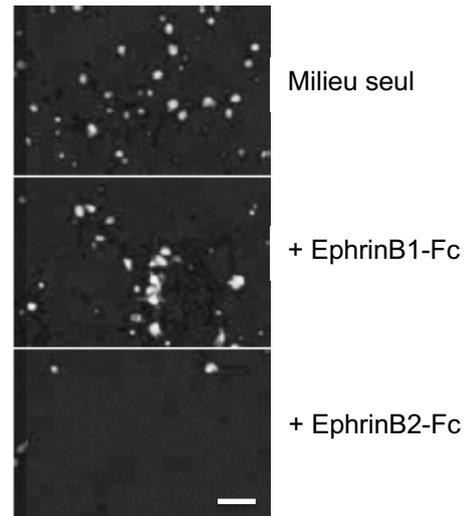


Figure 3B : Des virus VSV-RFP pseudotypés NiV-F/G ont été utilisés pour infecter des neurones en présence ou en l'absence d'ephrinB1-Fc ou d'ephrinB2-Fc (10 mg/ml). Les cellules ont été analysées par microscopie de fluorescence 24hrs post-infection. (barre d'échelle : 20µm).

Rq : les neurones sont sensibles et permissifs au NiV.

Q5 (1,5 points) : Après avoir précisé l'objectif de cette expérience, vous décrirez et analyserez les résultats présentés dans la figure 3A.

Pour cette expérience, les chercheurs auraient-ils pu utiliser des cellules 293T (cf figure 1) ? (Expliquez).

Q6 (1,5 points) : Après avoir précisé l'objectif de cette expérience, vous décrirez et analyserez les résultats présentés dans la figure 3B.

Proposez une expérience similaire permettant de confirmer ce résultat.

Q7 (1 point) : Ces travaux ont fait l'objet d'un article scientifique dont le titre est « *EphrinB2 is the entry receptor for Nipah virus* ». Au vu des résultats présentés (expériences 1 à 3), approuvez-vous ce titre ? Argumentez votre réponse.

Sujet très librement inspiré de Negrete et al., Nature, 2005.

SUJET IMMUNOLOGIE (Durée : 1 heure)

TOUTES VOS REponses DOIVENT ETRE JUSTIFIEES.

Les espoirs pour surmonter la pandémie de Covid-19 se portent sur une réduction de la transmission par des mesures d'isolement et de gestes barrières en combinaison avec une vaccination efficace d'une large majorité de la population. Les vaccins disponibles se concentrent sur la protéine S (spike) du SARS-CoV-2. Cette protéine de surface du virus interagit avec un récepteur des cellules de l'hôte et provoque l'entrée du virus dans la cellule.

Dans les médias publics, on parle beaucoup des anticorps contre le virus, produits après infection avec le virus ou après vaccination.

Q1 (1,5 point) : D'après vos connaissances sur les fonctions des anticorps, un anticorps contre la protéine S du virus nous protège par quel mécanisme ?

Un groupe de chercheurs dans un hôpital de Milan (Secchi, M et al. *J Clin Invest.* 2020) a analysé les anticorps contre la région de liaison au récepteur (RBD) des protéines S chez 575 patients Covid-19 et 480 contrôles (sérum collecté avant la pandémie). Ils ont distingué 3 isotypes, IgM, IgA et IgG et mesuré la quantité d'anticorps dans le sérum des patients par un nouveau test sur microplaques.

Q2 (2 point) : Quelles sont les différences entre les 3 isotypes ? Quel est l'intérêt particulier d'IgA pour un virus qui est transporté par l'air ?

Les résultats (figure ci-dessous) sont regroupés par semaine à partir du début des symptômes de la maladie. Pour chaque semaine et chaque isotype, le graphique donne un histogramme du nombre de sera (ordonnée) en fonction de l'intensité du signal d'anticorps (abscisse). Cette analyse ressemble à une analyse par cytométrie en flux, même si la technique est différente. Les barres horizontales en dessous de chaque histogramme montrent la moyenne d'intensité du signal. Les cercles en dessous de chaque histogramme montrent les valeurs par patient. A côté de chaque histogramme est noté le pourcentage des patients positifs pour l'anticorps et entre parenthèse le nombre des patients positifs par rapport le nombre total d'échantillons.

Q3 (0,5 points) : Que désigne la ligne pointillée verticale ? Comment a-t-elle été déterminée ?

Q4 (1 point) : Montrez avec un graphique l'évolution du taux de positivité de chaque isotype au cours du temps.

Q5 (1 point) : Commentez cette évolution dans le temps par rapport à vos connaissances sur la production des anticorps dans la réponse immunitaire.

Q6 (2 points) : Ici, les chercheurs ont mesuré la quantité d'anticorps au cours du temps de la maladie. Quelle autre propriété des anticorps a probablement évolué, comment et par quel mécanisme ?

Bien que le débat se concentre sur les anticorps anti-SARS-CoV2, la réponse immunitaire classique contre les virus est basée sur un autre mécanisme.

Q 7 (2 points) : Quel est le mécanisme immunitaire permettant d'éliminer les cellules infectées par un virus ?

