

UNITE D'ENSEIGNEMENT

IMMUNOLOGIE-VIROLOGIE

L3 Biologie Santé

Travaux Dirigés

2024-2025

Travaux dirigés Immunologie n°1

Anticorps monoclonaux

Présentation orale

Vous aurez 15 minutes pour présenter, de manière didactique pour l'auditoire, la méthode d'obtention d'anticorps monoclonaux par la technique de phage display.

Vous présenterez :

- les méthodes de clonage et d'expression
- Les méthodes de sélection et de criblage
- Les méthodes « d'amélioration » des anticorps obtenus
- L'intérêt scientifique et technique qu'a pu apporter cette technique.

Pour vous aider vous pourrez vous reporter à la référence : Antibody Phage Display: Technique and Applications. Christoph M. Hammers and John R. Stanley. Journal of Investigative Dermatology (2013) 134, e17. doi:10.1038/jid.2013.521. Disponible sur eCampus.

Exercice 1 : L'immunisation

Dans le but de produire des anticorps d'intérêt, un animal est immunisé, par voie sous-cutanée, à diverses reprises avec l'antigène en solution en présence d'adjuvants. Un schéma d'immunisation type est donné dans le tableau figure 2.

Day	0	7	15	21	28	35	40-fusion
Injection	1st	2nd	3rd	4th	5th	6th	
sera	Pre-immune						

Figure 1: Schéma d'immunisation

• Question 1 :

Quels anticorps sont trouvés dans le sérum d'un animal non immunisé, d'un animal immunisé par l'injection d'une protéine purifiée ?

• Question 2 :

Pourquoi, avant de prélever les lymphocytes, immunise-t-on l'animal avec l'antigène contre lequel on veut obtenir des anticorps monoclonaux ?

• Question 3:

Pourquoi n'obtient-on pas directement l'anticorps souhaité à partir du sang de l'animal immunisé ?

• Question 4 :

En faisant appel à vos notions d'organisation anatomique du système immunitaire, dites en quoi le lieu d'administration de l'antigène est important ?

• Question 5 :

Définissez la notion d'adjuvant.

Exercice 2 : Spécificité et cross-réactivité

Au XVIII^{ème} siècle, la variole, maladie mortelle et très contagieuse causée par l'infection par le virus « smallpox » provoquait des ravages sur divers continents.

Le virus de la vaccine également appelé « cowpox » est responsable de la variole bovine qui peut provoquer chez l'Homme une maladie de la peau avec apparition de croutes qui régresse en 2 semaines. Lors d'une expérience historique réalisée en 1796, le médecin britannique Edward Jenner inocula au jeune James Philips, du pus prélevé sur la main d'une jeune femme contaminée par le virus de la vaccine. Deux mois plus tard, Jenner inocula à James Philips, du virus de la variole humaine « smallpox ». Le jeune garçon ne développa aucun symptôme et fut ainsi déclaré « vacciné ».

• Question 1 :

Schématisez la procédure expérimentale de la vaccination réalisée par Jenner.

• Question 2 :

A l'aide de schémas clairs et du vocabulaire adapté expliquez ce qu'est la spécificité d'un anticorps et ce qu'est une réaction croisée. (Il est attendu que vous utilisiez par exemple les termes d'anticorps, antigènes, épitope et paratope dans vos légendes).

Exercice 3 : Coopérations cellulaires

Les splénocytes d'une souris normale sont prélevés et mis en culture 30min. dans une boîte de Pétri en plastique. Les cellules adhérentes ou en suspension sont alors réparties dans des milieux contenant des globules rouges de moutons (GRM). Quatre jours après, on recherche dans chacune des conditions la présence d'anticorps anti-GRM (Figure 2).

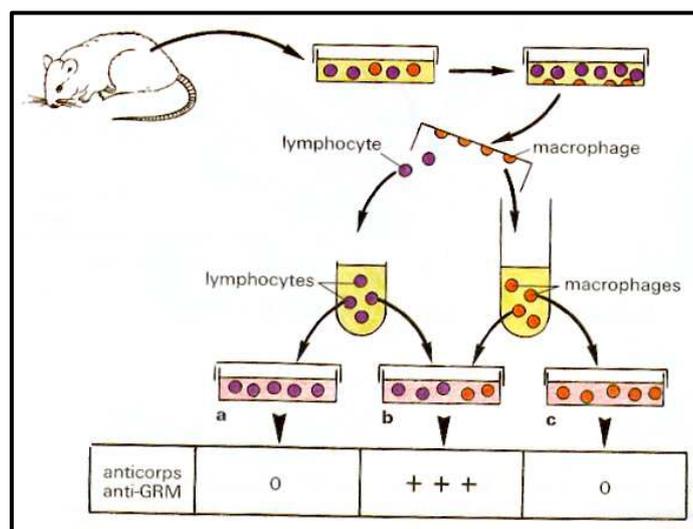


Figure 2 : Schéma expérimental de l'analyse de la production d'immunoglobuline par les populations de cellules spléniques.

• **Question 1 :**

A quoi sert l'étape de culture dans du plastique? Que montre cette expérience ?

• **Question 2 :**

En vous servant de cette expérience, expliquer les interactions cellulaires qui permettront aux cellules B de monter une réponse anticorps lors de l'immunisation.

Exercice 4 : Anticorps monoclonaux et applications thérapeutiques.

A- Obtention d'hybridomes

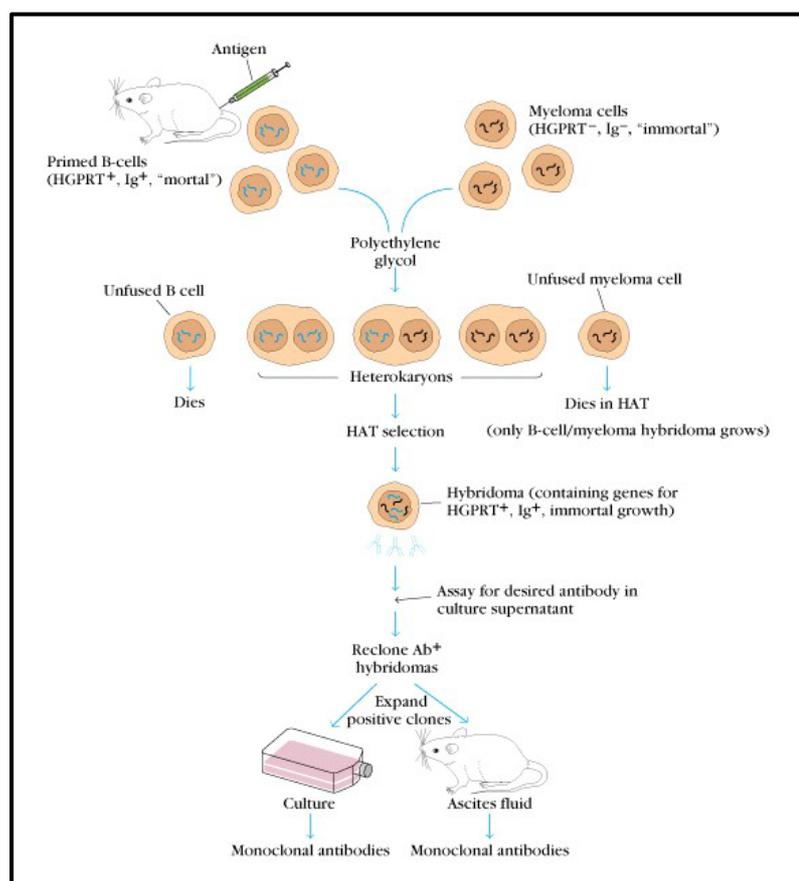


Figure 3 : Schéma du protocole expérimental d'obtention d'hybridomes.

• **Question 1 :**

Expliquer en quoi consiste la fusion (définir un plasmocyte, un myélome, un hybridome).

• **Question 2 :**

Pourquoi utilise-t-on des cellules spléniques pour les fusions ?

• **Question 3 :**

Pourquoi utilise-t-on un myélome comme partenaire de fusion ?

• **Question 4 :**

Quel autre tissu lymphoïde pourrait être utilisé pour les fusions chez la souris ou l'Homme ?

• **Question 5 :**

Pourquoi utilise-t-on un animal hyper-immunisé ?

B- Principe de la sélection en milieu HAT

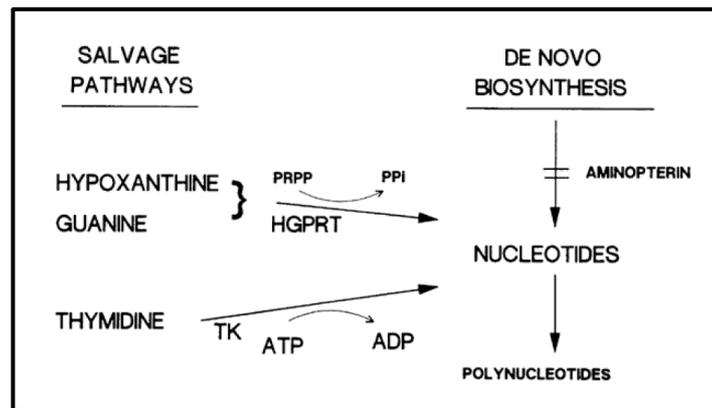


Figure 4 : Schéma récapitulatif de l'anabolisme des nucléotides.

• **Question 1 :**

Quel est le rôle du milieu HAT dans la sélection des hybridomes ?

• **Question 2 :**

Quelles caractéristiques doivent présenter les myélomes utilisés pour l'obtention des anticorps monoclonaux ?

C- étapes de criblage et de clonage des hybridomes

• **Question 1 :**

Comment se fait la sélection des hybridomes producteurs d'anticorps ?

• **Question 2 :**

Pourquoi faut-il cloner l'hybridome ?

• **Question 3 :**

- Pourquoi, après le clonage, l'anticorps est-il dit monoclonal ?
- Rappeler ce qu'est un serum polyclonal.
- Avantages respectifs des anticorps monoclonaux et polyclonaux ?

D- Applications thérapeutiques

Lors de l'utilisation d'anticorps monoclonaux, issus d'animaux, à visée thérapeutique il a été mis en évidence une production d'anticorps humain anti-animal chez les patients. (Anti-Antibody Response, AAR). Il a été montré qu'en modifiant la séquence des anticorps thérapeutiques il était possible de diminuer l'AAR. Ces modifications et les types d'anticorps générés sont résumés dans la figure 5.

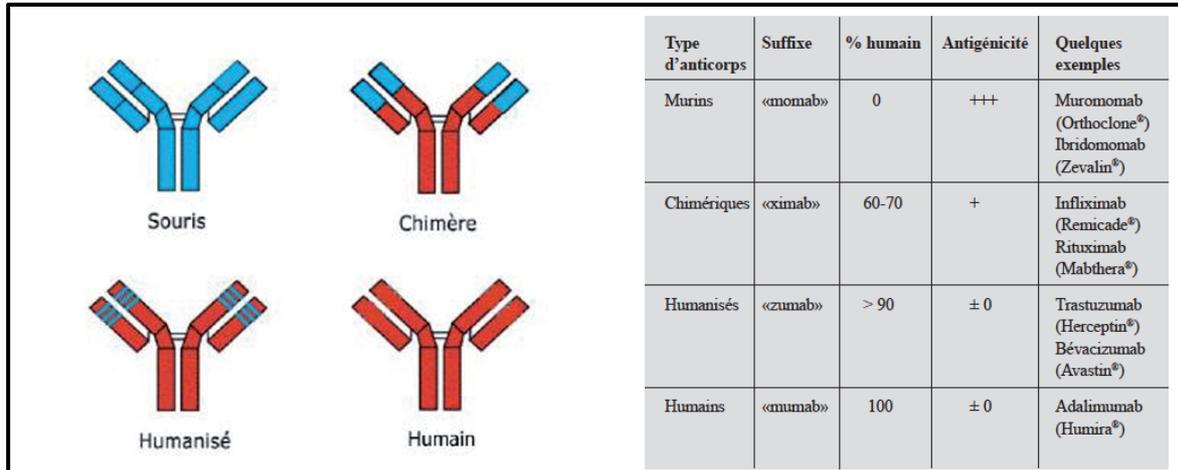


Figure 5 : Représentation schématique de divers type d'immunoglobulines à usage thérapeutique. Composition, nomenclature et propriétés.

• Question 1 :

Quel est le principe de l'humanisation d'un anticorps? Définissez ce qu'est un anticorps chimérique, un anticorps humanisé et un anticorps humain.

• Question 2 :

Quelles méthodes ont été utilisées pour l'obtention de ces « nouveaux » anticorps?

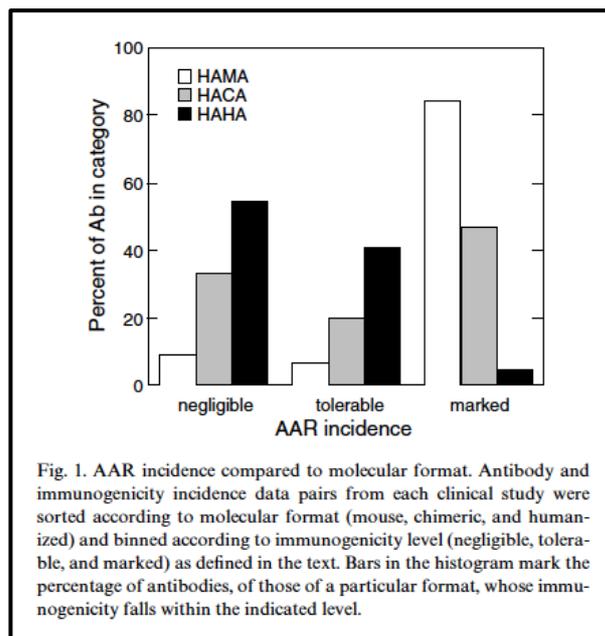


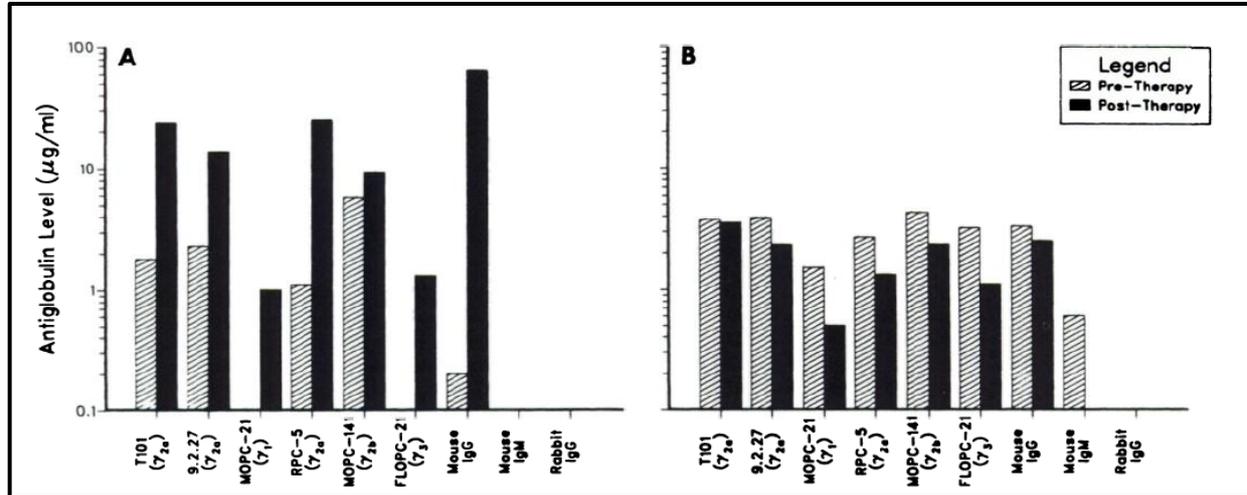
Figure 6 : Représentation des Réponses Anti-Anticorps (AAR) chez l'Homme en fonction de l'origine des immunoglobulines administrées.

Question 3 :

Commentez la figure 6 et expliquez ce que sont des HAMA, HACA et HAHA.

Question 4 :

Quelles réactions sont mises en jeu lors de l'injection à un humain d'un anticorps thérapeutique d'origine murine ?



Des patients atteints de lymphome T cutané (CTCL) ont été traités par l'anticorps murins T101. La présence d'IgG ou d'IgM a été mesurée à partir du serum de ces patients avant et après traitement. La spécificité de ces immunoglobulines est mesurée contre l'anticorps T101 et contre d'autres immunoglobulines comme indiqué figure 7.

Figure 7 : Mesure de la spécificité des IgG (A) et IgM (B) de patients avant et après traitement par T101. La spécificité est mesurée contre diverses immunoglobulines comme indiqué.

• Question 5 :

Analysez la figure 7 et commentez les résultats.

• Question 6 :

Que peut-on conclure quant à la spécificité des HAMA ?

• Question 7 :

Cela peut-il avoir une incidence sur d'autres traitements futurs chez ces mêmes patients ?

Travaux dirigés Immunologie n°2

Techniques Immunologiques

1^{ère} partie : exposé oral

Sujet : La chromatographie d'affinité

La chromatographie d'affinité à l'aide d'anticorps spécifiques est très utilisée pour purifier des macromolécules d'intérêt thérapeutique ou industriel. Après avoir présenté le principe de cette technique vous donnerez, en vous aidant d'exemples, ses avantages et ses limites par rapport à d'autres techniques de purification.

Vous disposez de 15 mn pour traiter le sujet en vous appuyant sur un support projeté (format powerpoint ou pdf).

Les techniques immunologiques sont très utilisées dans des domaines aussi variés que l'histologie/cytologie (immunocytochimie/immunohistochimie), la biochimie (western blot, chromatographie d'affinité, immunoprécipitation), la biologie moléculaire (criblage de banque d'expression), le dosage de cytokines, d'hormones ou encore d'antigènes viraux dans un fluide biologique (ELISA, RIA) ou encore le tri cellulaire (FACS, particules magnétiques). Ces méthodes peuvent être qualitatives ou quantitatives (dosage par compétition). Elles reposent sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques de l'antigène d'intérêt ou bien de sera issus d'animaux préalablement hyperimmunisés avec cet antigène.

Le marquage des cellules ou des macromolécules par ces anticorps peut être de type direct c'est-à-dire que seul l'anticorps spécifique de l'antigène est utilisé ou bien de type indirect c'est-à-dire que le complexe antigène-anticorps est révélé par un second anticorps. Dans le cas du marquage direct, l'anticorps est directement couplé à des molécules fluorescentes, des microparticules d'or ("immunogold"), des particules magnétiques ou encore une enzyme (phosphatase alcaline, peroxydase). Dans le cas du marquage indirect, c'est l'anticorps secondaire qui est couplé.

Exercice 1 : Sérums polyclonaux et anticorps monoclonaux

Quels sont les avantages et les inconvénients des anticorps monoclonaux sur les sérums polyclonaux dans les techniques de western blot et de chromatographie d'affinité ? La question concerne aussi bien les anticorps utilisés dans un marquage direct qu'en marquage indirect.

Exercice 2 : Interaction antigène anticorps

Un laboratoire a un doute sur le contenu en anticorps de deux flacons. Le flacon noté A est censé contenir un anticorps dirigé contre la molécule Y alors que le flacon noté B devrait contenir un anticorps dirigé contre la molécule Z.

Un gel d'agar, permettant la diffusion des molécules solubles, est coulé dans deux boîtes de Pétri en y générant 5 puits de dépôt qui sont réalisés comme indiqué sur la figure 1.

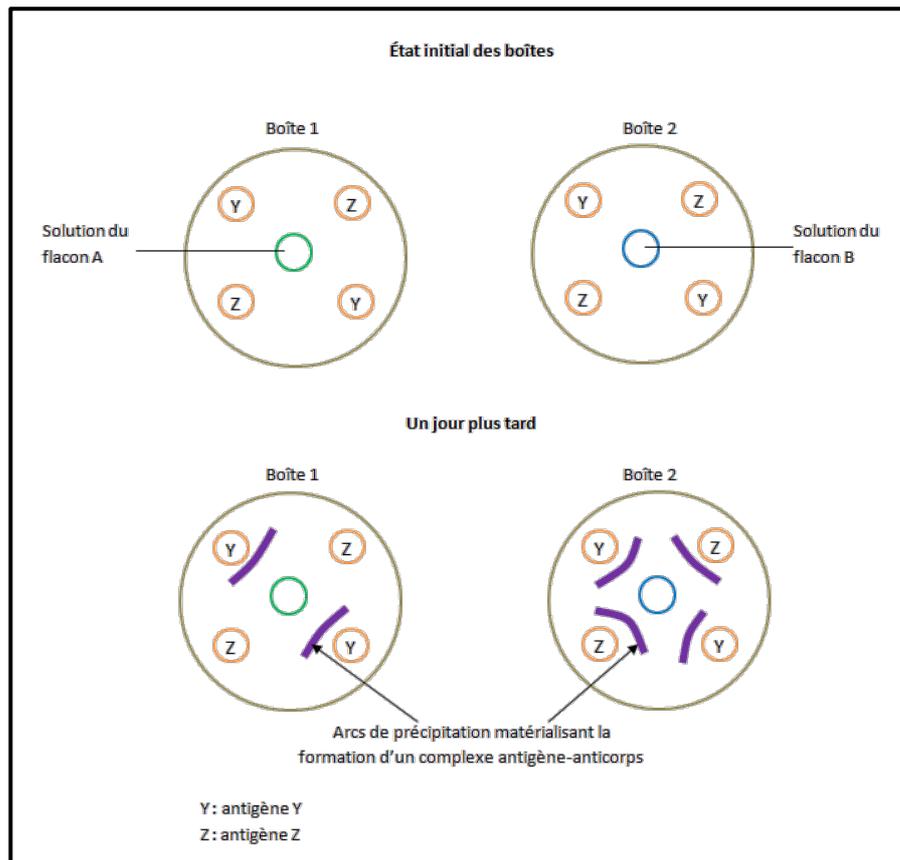


Figure 1 : Représentation schématique de l'expérience réalisée. Des gels d'agar sont réalisés dans des boîtes de pétri. Les puits centraux reçoivent des solutions d'anticorps tandis que les puits périphériques reçoivent des solutions d'antigènes.

• **Question 1 :**

Expliquez le principe de cette expérience.

• **Question 2 :**

A partir des informations apportées par la figure 1, indiquez le contenu de chacun des flacons.

• **Question 3 :**

A l'aide d'un schéma, représentez la structure d'un anticorps, légendez les différentes régions et indiquez les régions impliquées dans des interactions moléculaires.

Exercice 3 : classes et sous-classes isotypiques

Les caractéristiques structurales des anticorps permettent de les répartir en classe (isotype) et en sous-classe dans le cas de certains isotypes.

Donnez les caractéristiques structurales et fonctionnelles propres à chaque isotype et aussi aux sous-classes mais uniquement dans le cas des IgG. Vous n'oublierez pas de discuter la notion d'affinité et d'avidité des anticorps pour leur antigène.

Exercice 4 : méthodes de détection immunologique (1)

Le diagnostic biologique des maladies infectieuses bactériennes, virales, parasitaires ou mycosiques fait appel à deux grands types de méthodes :

- des méthodes directes visant à rechercher l'agent pathogène en cause ou un de ses composants,
- des méthodes indirectes qui mettent en évidence la réponse de l'hôte à l'infection.

Décrivez les techniques immunologiques que vous proposez d'utiliser pour réaliser ces deux diagnostics biologiques.

Exercice 5 : méthodes de détection immunologique (2)

Dans le cas d'infection à VIH, la technique la plus utilisée est le test ELISA (Figure 2-A). La séropositivité est ensuite confirmée par un western blot en utilisant des protéines virales recombinantes (Figure 2-B).

• Question 1 :

D'après les résultats d'ELISA et de western blot obtenus avec les sérums des individus A, B et C (Figure 2), quelles conclusions peut-on tirer concernant la sensibilité et la spécificité de ces deux tests.

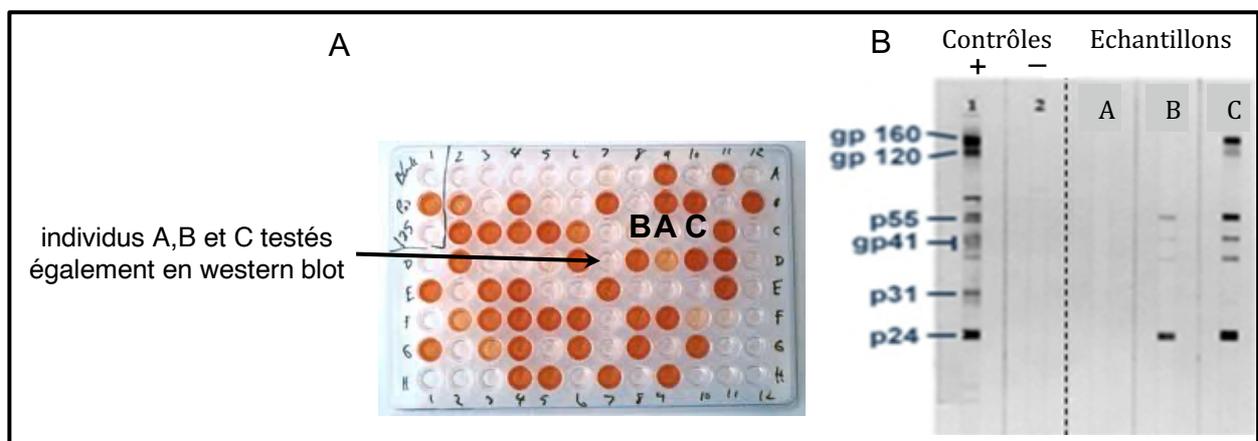


Figure 2 : Résultats des tests ELISA et Western Blot réalisés sur les échantillons des patients A, B et C.

Sur la Figure 3 sont présentés les résultats concernant l'évolution de différents marqueurs virologiques chez un individu infecté par le VIH et non encore traité.

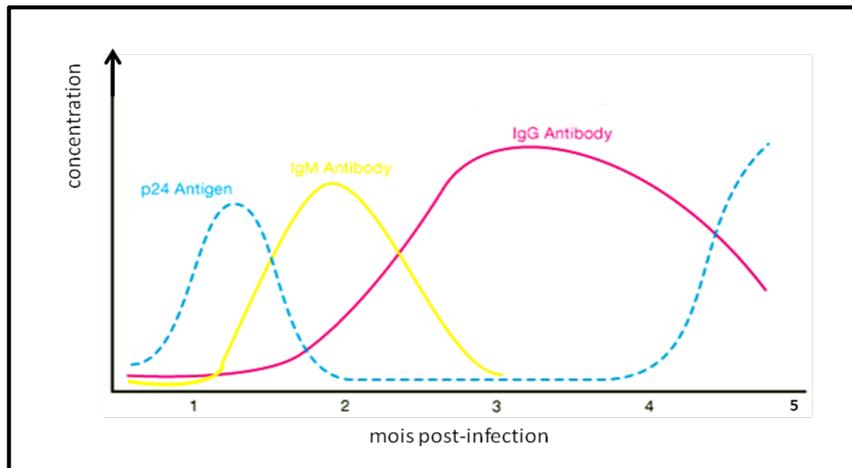


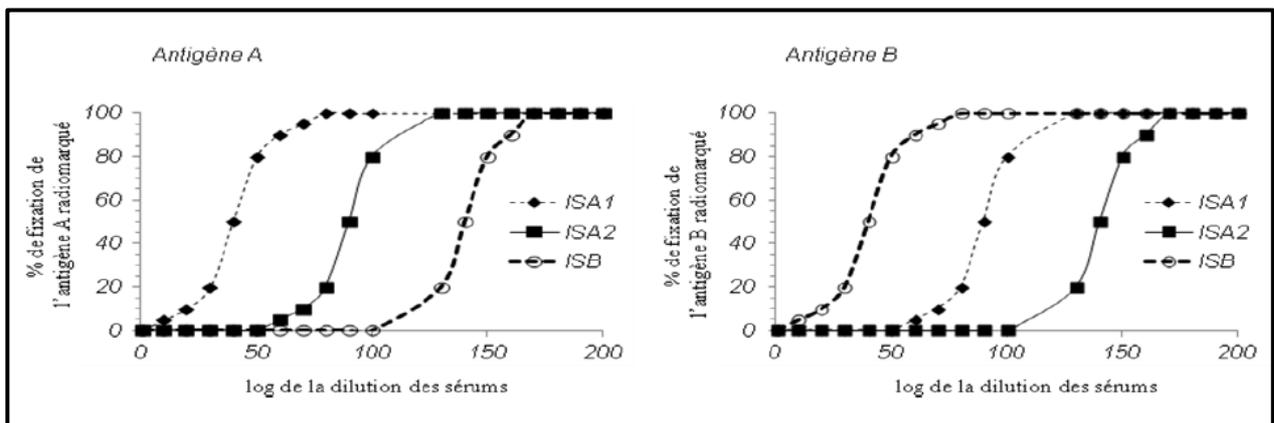
Figure 3 : Evolution de marqueurs chez un individu infecté par HIV.

• **Question 2 :**

Commenter cette figure, en particulier commenter la phase de latence de production des anticorps ainsi que les classes d'anticorps produites.

Exercice 7 : spécificité des anticorps

La spécificité des anticorps utilisés est déterminante. Il ne faut pas qu'il y ait de réactions croisées avec d'autres ligands potentiels. Deux immunsérums, ISA1 et ISA2, ont été préparés contre l'antigène A et un immunsérum, ISB, a été préparé contre l'antigène B. On veut s'assurer de la spécificité des immunsérums et rechercher la possibilité de



réactions croisées. Pour ce faire, on étudie la fixation des antigènes A et B radiomarqués aux anticorps présents dans chacun des immunsérums (Figure 4).

Figure 4 : Mesures de la fixation des Antigènes A ou B radiomarqués aux immunsérums.

Dans une deuxième série d'expériences, la fixation des antigènes A et B radiomarqués aux anticorps présents dans chacun des immunsérums ISA1, ISA2 et ISB est réalisée en présence d'un excès d'antigènes A ou d'antigènes B non marqués (Figure 5)

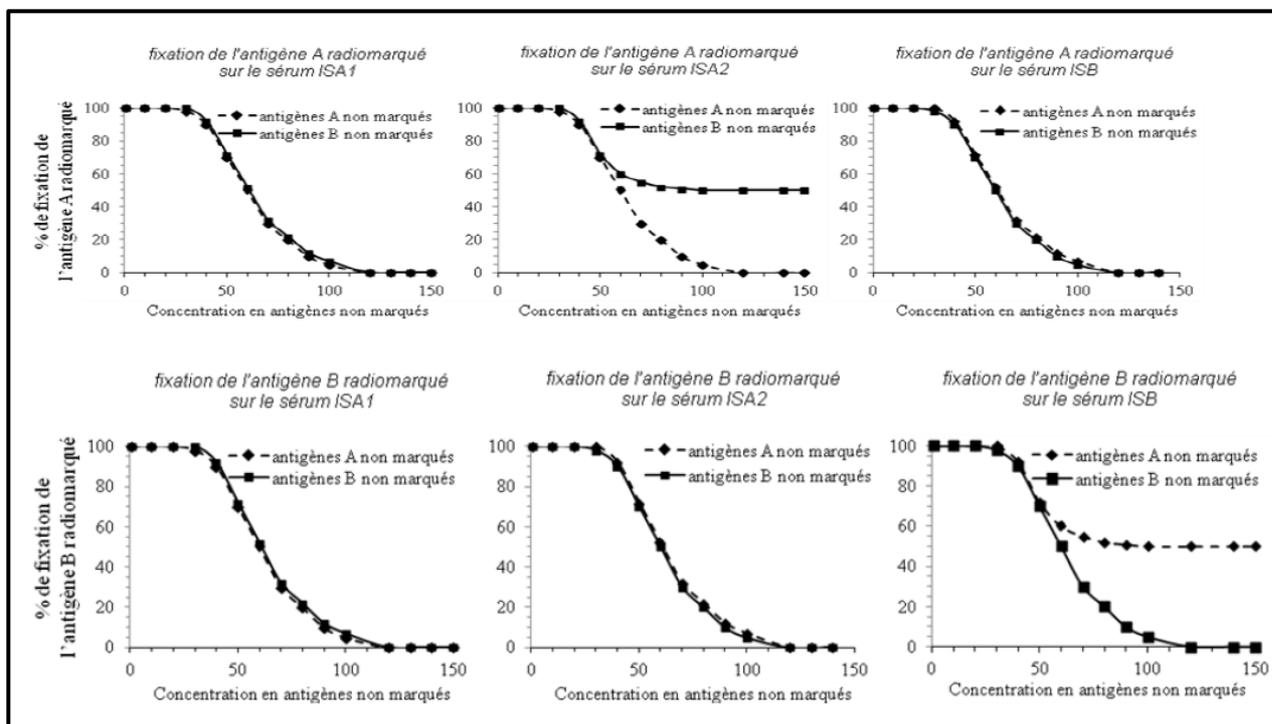


Figure 5 : Mesures de la fixation des Antigènes A ou B radiomarqués aux immunosérums en présence d'excès d'antigènes non marqués.

Quelles conclusions peut-on tirer de ces expériences concernant la spécificité de ces sérums ?

Exercice 8 : déterminants antigéniques

L'*alpha-fœtoprotéine* (AFP) est une des principales protéines sériques produite par le foie durant la vie fœtale (PM 70 kDa). Sa réexpression chez l'adulte est le plus souvent associée à une situation pathologique en particulier d'hépatocarcinome. Pour étudier cette protéine, les auteurs de cette étude (*d'après Nomura et al., Molecular Immunology, 1992, 19: 1691-1697*) ont immunisé des souris BALB/c contre l'AFP afin de produire des anticorps monoclonaux. Après sélection des hybridomes par le milieu HAT et criblage par une technique immunologique, on dénombre 432 hybridomes sécrétant d'anticorps monoclonaux anti-AFP. Un clonage des hybridomes sécrétant est enfin réalisé.

Parmi 432 hybridomes sécrétant d'anticorps monoclonaux anti-AFP, les auteurs ont étudié la spécificité de quatre d'entre eux dénommés : 2051, 2053, 2062 et 2066 tout d'abord par un test d'inhibition (Figure 6).

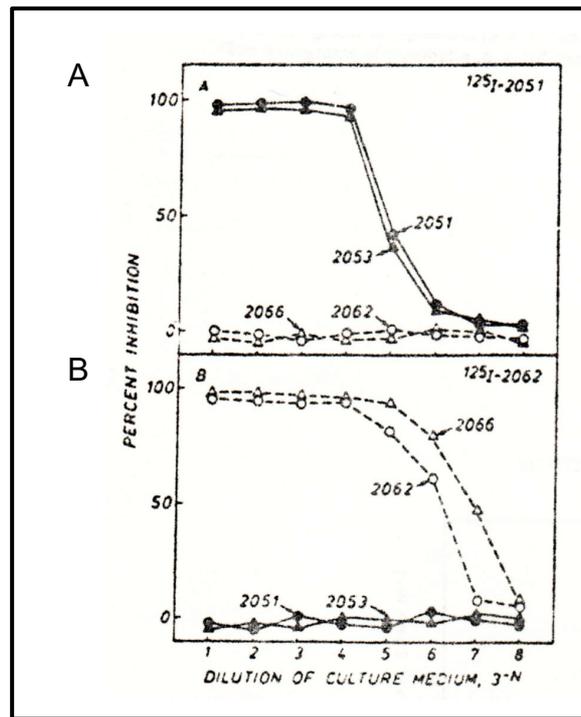


Figure 6. L'AFP a d'abord été immobilisée dans les puits de plaques de 96 puits. La capacité de fixation des anticorps monoclonaux anti-AFP, 2051 (A) et 2062 (B), marqués à l'iode 125 a ensuite été testée par compétition avec des dilutions en série au tiers du surnageant de culture des 4 lignées d'hybridomes (2051, 2053, 2062, 2066) sécrétant des anticorps anti-AFP. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la fixation de l'anticorps marqué sur l'AFP en l'absence de surnageant compétiteur.

• Question1 :

Les quatre anticorps monoclonaux anti-AFP reconnaissent-ils tous les mêmes déterminants ?

Un test « sandwich » est ensuite utilisé pour affiner cette étude dont les résultats sont présentés dans le Tableau 1. Le test « sandwich » utilisé dans cette étude peut-être schématisé comme suit :

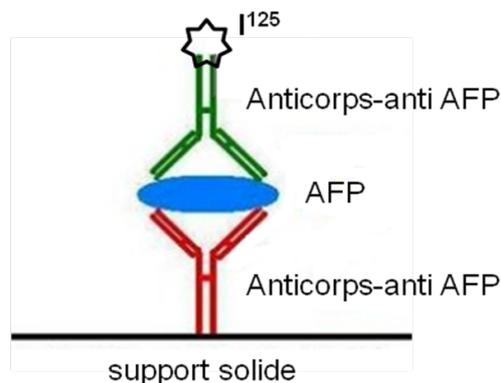


Table 1 : Solid-phase radioimmunoassay of α -foetoprotein employing monoclonal anti-AFP antibodies*									
Solid-phase anti-AFP	Radiolabelled anti-AFP								
	^{125}I -2051**			^{125}I -2062**			^{125}I -rabbit anti-AFP***		
	AFP (+)	AFP (-)	Δ cpm	AFP (+)	AFP (-)	Δ cpm	AFP (+)	AFP (-)	Δ cpm
2051	186	73	113	10,607	42	10,565	6,932	119	6,813
2053	214	83	131	11,521	64	11,457	6,894	127	6,717
2062	6,846	49	6,797	98	69	29	5,814	81	5,733
2066	6,934	52	6,882	101	74	27	5,986	88	5,898

*Four batches of monoclonal anti-AFP in solid-phase were incubated with 25 μl of a solution containing AFP (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or 25 μl of buffer. The bound AFP was detected by radiolabelled mouse monoclonal anti-AFP (2051 or 2062) or rabbit anti-AFP. The count in the presence of AFP minus the count in the absence of AFP (Δ cpm) is the specific uptake of radiolabelled antibody by AFP.

**Five nanograms of γ -globulin (3×10^4 cpm) were used.

***Ten nanograms of γ -globulin (6×10^4 cpm) were used.

Tableau 1 : Résultat du test sandwich réalisé avec les différents anticorps décrits.

• Question 2 :

Comparez les capacités de fixation à l'AFP des anticorps polyclonaux de lapin et des anticorps monoclonaux. Expliquez les différences observées.

L'AFP a ensuite été soumise à une réduction par des doses croissantes de DTT suivie par une alkylation par l'iodoacétamide. Les auteurs ont alors étudié la reconnaissance de l'AFP, en fonction de son état de dénaturation, par deux des anticorps monoclonaux radiomarqués (2051 et 2062). Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 7.

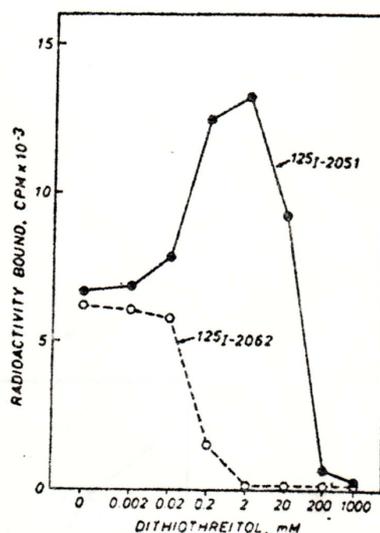


Figure 7 : Analyse de la liaison des anticorps 2051 et 2062 radiomarqués à l'AFP traitée par des doses croissantes de DTT et alkylée.

• **Question 3 :**

Que pouvez vous conclure concernant les épitopes reconnus par ces deux anticorps monoclonaux.

L'AFP réduite et alkylée a ensuite été utilisée dans un test sandwich avec uniquement l'anticorps 2051 en tant que réactif à la fois fixé sur le support solide et radiomarqué (même principe que pour le Tableau 1). Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure-8.

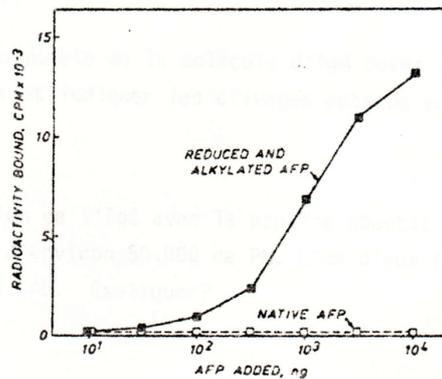


Figure 8 : Liaison de l'AFP native ou réduite et alkylée à l'anticorps 2051.

• **Question 4 :**

Commenter les résultats de la Figure 8 et indiquer s'ils sont ou non en accord avec les hypothèses que vous avez émises à la Figure 7.

Travaux dirigés Immunologie n°3

Présentation antigénique (CMH, apprêtement, présentation)

1^{ère} partie : Exposé oral

Sujet : Décrire comment obtenir la lignée de souris B10.D2 congénique pour le H-2. Vous pourrez vous servir des documents fournis sur eCampus ou de tout document que vous jugerez utile.

- Rogner *et al.* Congenic mice: cutting tools for complex immune disorders. Nat. Rev. Immunol 2003; 3:243-252.

- Montagutelli *et al.* Utilisation des lignées congéniques chez la souris ? Médecine Sciences 2004, 20: 887-93.

Vous disposez de 15 minutes pour traiter le sujet en vous appuyant sur un support projeté (format power point ou pdf).

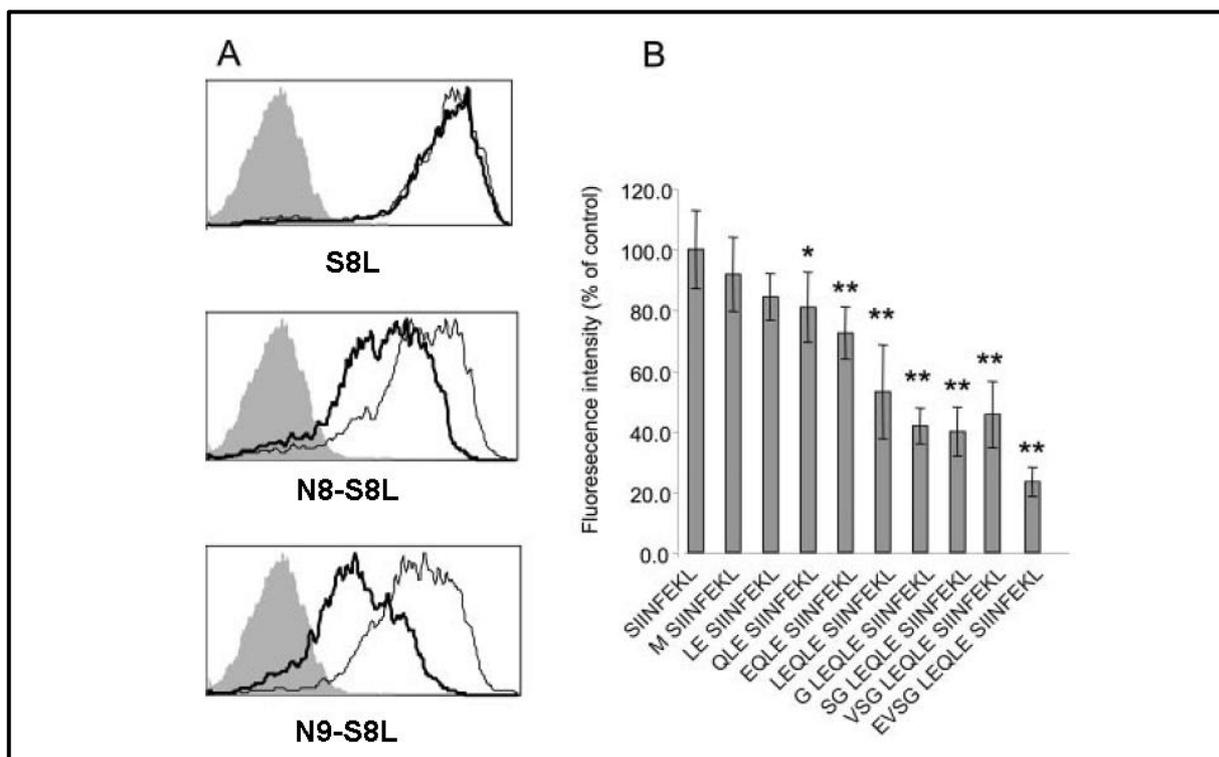
Exercice 1 : Terminologie

Définir les termes suivants en prenant des exemples dans le système du complexe majeur d'histocompatibilité de la souris et de l'homme : allélisme, multiallélisme, polygénie, polymorphisme, haplotype.

Exercice 2 : Apprêtement de l'antigène (d'après York *et al.* J. Immunol. 2006)

Dans les expériences suivantes, des chercheurs se sont intéressés au rôle de la peptidase TPPII (tripeptidyl peptidase II) dans la présentation des antigènes en utilisant comme antigène modèle l'ovalbumine. Des cellules HeLa transfectées par des SiRNA dirigés contre TPPII ou des SiRNA contrôle ont été transfectées 2 jours plus tard par les différents plasmides décrits dans le **tableau 1**. Ces plasmides possèdent une cassette d'expression codant pour l'ovalbumine ou son épitope immunodominant (SIINFEKL, S8L; épitope strict ou étendu en N-terminal) et codent également pour la GFP. Le lendemain, la présence à la surface des cellules de l'épitope immunodominant S8L associé à la molécule H-2K^b du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I a été recherchée par

Plasmid Name	Peptide Sequence	Notes ^a
pUG-S8L	SIINFEKL	8-mer; mature epitope
pUG-M-S8L	M SIINFEKL	9-mer
pUG-N2-S8L	LE SIINFEKL	10-mer; natural OVA sequence
pUG-N3-S8L	QLE SIINFEKL	11-mer; natural OVA sequence
pUG-N4-S8L	EQLE SIINFEKL	12-mer; natural OVA sequence
pUG-N5-S8L	LEQLE SIINFEKL	13-mer; natural OVA sequence
pUG-N6-S8L	G LEQLE SIINFEKL	14-mer; natural OVA sequence
pUG-N7-S8L	SG LEQLE SIINFEKL	15-mer; natural OVA sequence
pUG-N8-S8L	VSG LEQLE SIINFEKL	16-mer; natural OVA sequence
pUG-N9-S8L	EVSG LEQLE SIINFEKL	17-mer; natural OVA sequence
pUG-N10-S8L	DEVSG LEQLE SIINFEKL	18-mer; natural OVA sequence



cytométrie en flux après marquage des cellules à l'aide de l'anticorps 25.D1.16 spécifique de la combinaison H-2K^b - S8L (**Figure n°1**).

Tableau 1 : Description des plasmides d'expression utilisés et des séquences peptidiques exprimées.

Figure 1 : **(A)** Histogrammes des cellules GFP⁺ traitées par les siRNA TPPII (trait épais) ou les siRNA contrôle (trait fin) et transfectées avec le plasmide indiqué. Les histogrammes en grisé correspondent aux cellules transfectées avec un plasmide contrôle. **(B)** Les résultats de fluorescence obtenus avec les différents plasmides testés pour les cellules traitées par les siRNA TPPII sont exprimés en % de la fluorescence obtenue par rapport aux cellules traitées par les siRNA contrôle. * ou **, statistiquement significatif par rapport au contrôle. N, nombre de résidus en N-terminal.

• **Question 1** :

Rappelez à quoi correspond un siRNA et sa fonction.

• **Question 2** :

Pourquoi les auteurs précisent-ils que les histogrammes présentés correspondent à des cellules GFP⁺ ?

• **Question 3** :

Quelles différences observez-vous entre les cellules traitées par les siRNA TPPII et celles traitées par les siRNA contrôle ?

• **Question 4** :

Pouvez-vous en déduire un rôle de TPPII dans l'apprêtement de l'antigène ?

Dans une seconde série d'expériences, les auteurs ont traité les cellules HeLa par des siRNA anti-TPPII ou/et des siRNA dirigés contre une autre peptidase, ERAP1 (endoplasmic reticulum aminopeptidase 1). La présence à la surface des cellules de l'épitope immunodominant S8L associé à la molécule H-2K^b a été recherchée comme décrit précédemment (**Figure n°2**).

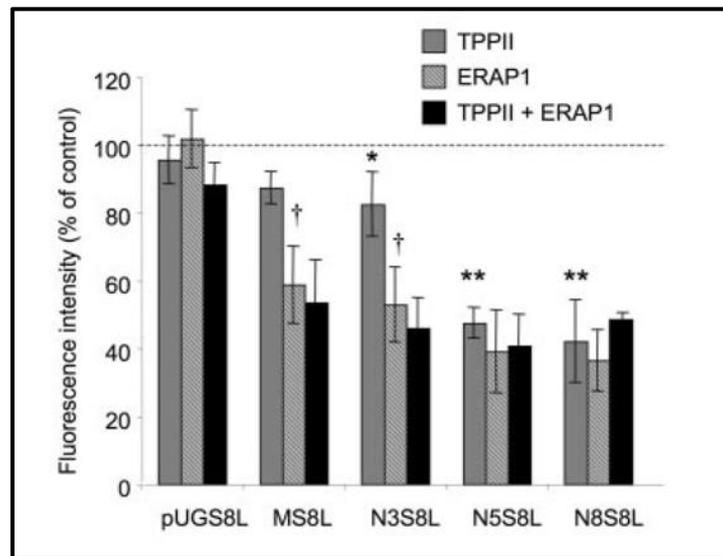


Figure n°2 : Les cellules transfectées avec des siRNA spécifiques de TPPII, d'ERAP1 ou avec les 2 types de siRNA ont été ensuite transfectées avec les différents plasmides décrits. Le lendemain, les cellules ont été marquées avec l'anticorps 25.D1.16 et analysées par cytométrie en flux. Les intensités moyennes de fluorescence sont exprimées relativement aux résultats obtenus dans la condition siRNA contrôle.* ou **, différence significative entre les conditions siRNA TPPII et siRNA contrôle ; †, différence significative entre conditions siRNA TPPII et siRNA ERAP1.

• **Question 5 :**

Comparez les effets des siRNA TPPII et des siRNA ERAP1.

Quels sont les effets du traitement combiné par les 2 types de siRNA ?

Pouvez-vous en déduire des informations sur le fonctionnement de TPPII et d'ERAP1 dans l'apprêtement des peptides ?

Exercice 3 : Présentation antigénique (d'après Pasetto *et al.* J. gen. Virol. 2012)

Dans les expériences suivantes, des souris transgéniques pour la molécule HLA-A2 ont été immunisées par administration intramusculaire d'un plasmide recombinant pour la protéine NS3 du virus de l'hépatite C (VHC) de génotype 1b. Puis les splénocytes de ces animaux ont été fusionnés au thymome BW5147 et, après sélection, différents hybridomes T ont été obtenus. Ces hybridomes ont ensuite été caractérisés dans différentes expériences.

Dans une première expérience, les hybridomes ont été mis en présence de la lignée cellulaire T2 qui exprime les molécules HLA-A2. Cette lignée avait été préalablement incubée avec ou sans peptide CINGVCWTV ou KLVALGVNAV, et la production d'IL-2 dans le surnageant a été mesurée par ELISA (**Figure n°3**). Les peptides NS3-1073 (CINGVCWTV) et NS3-1406 (KLVALGVNAV) sont dérivés de la séquence de la protéine NS3 du virus de l'hépatite C de génotype 1b.

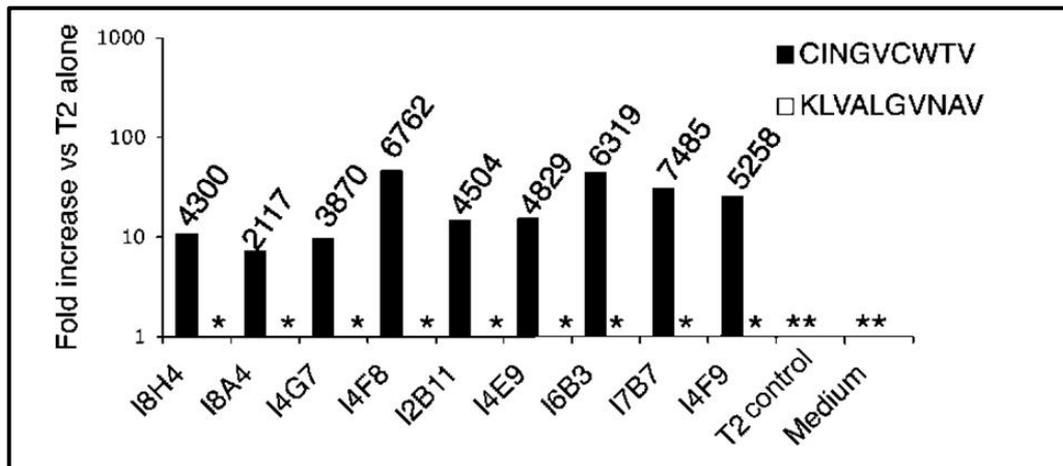


Figure n°3 : «Fold-increase» indique le rapport de concentration de cytokines produites dans la co-culture en condition avec peptide (CINGVCWTV ou KLVALGCVNAV, 1mg/mL) par rapport à celle produite dans la condition sans peptide. La quantité absolue de cytokine (pg/mL) est également indiquée au-dessus des histogrammes. *T2 control* et *Medium* correspondent respectivement aux conditions « sans hybridome » et « sans hybridome et sans cellules T2 » ; *, non détecté.

• **Question 1 :**

Expliquez en quoi consiste un hybridome T et son intérêt en immunologie ?

• **Question 2 :**

Pourquoi utiliser des cellules T2 ?

• **Question 3 :**

Pouvez-vous indiquer quels sont les paramètres régulant la production d'IL-2 par les hybridomes T dans la figure n°3 ?

Dans une autre expérience, les hybridomes T ont été incubés avec des cellules T2 en présence de différentes doses du peptide CINGVCWTV (**Figure n°4**).

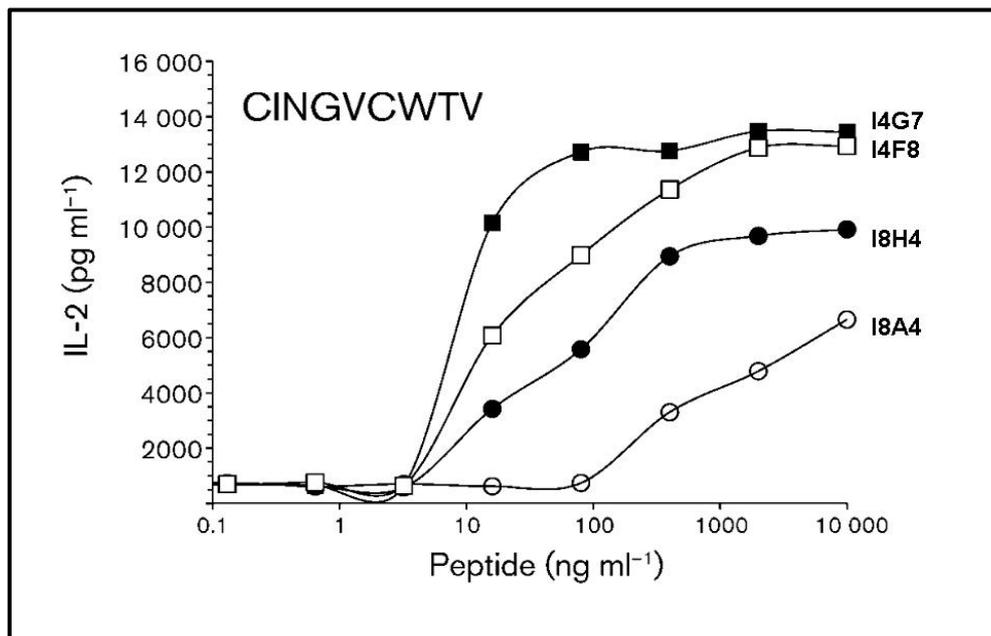


Figure n°4 : Production d'IL-2 dans les co-cultures d'hybridomes T et de cellules T2.

• **Question 4 :**

Que pouvez-vous déduire sur la qualité des interactions des hybridomes T avec les cellules T2 ?

• **Question 5 :**

Proposez une ou des hypothèses expliquant le comportement des hybridomes sachant que leur analyse phénotypique par cytométrie en flux indique qu'ils expriment à 51% (I8H4), 82% (I8A4), 88% (I4G7) and 93% (I4F8) le complexe TCR/CD3.

Dans l'expérience suivante, les hybridomes T ont été incubés avec des cellules T2 mais en présence de différents peptides dérivés du peptide CINGVCWTV (**Figure n°5**).

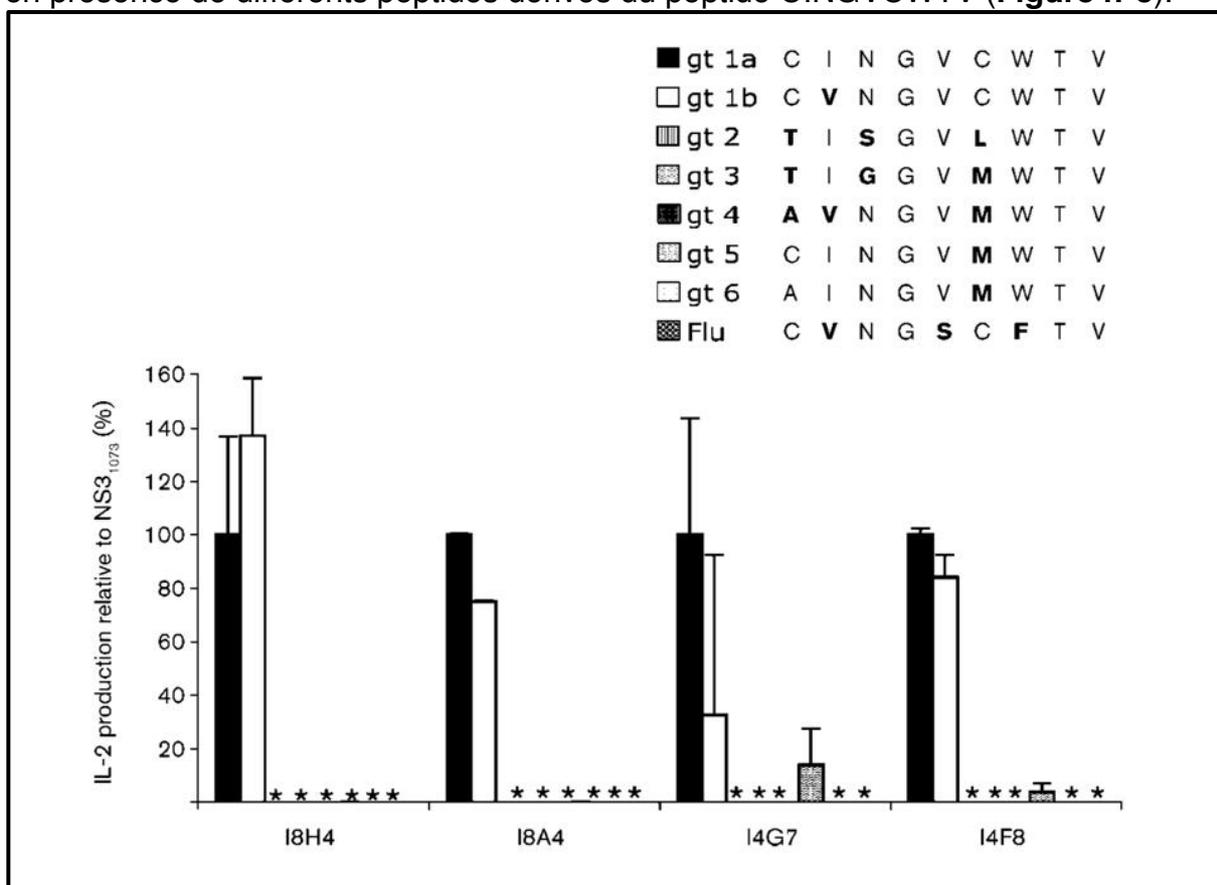


Figure n°5 : Production d'IL-2 dans les co-cultures d'hybridomes T et de cellules T2 préalablement chargées avec différents peptides (10 mg/mL). Les résultats (moyennes ± écarts-types) sont exprimés en pourcentage des résultats obtenus dans la condition peptide NS3₁₀₇₃ du génotype 1a du virus du VHC. Les séquences des peptides NS3 de différents génotypes (gt 1a à gt 6) du VHC et la séquence du peptide neuraminidase 231 du virus de la grippe (Flu) sont indiquées. *, non détecté.

• **Question 6 :**

Proposez des hypothèses pour expliquer pourquoi l'IL-2 est produite lorsque les co-cultures sont réalisées en présence de certains peptides mais pas avec d'autres ?

Puis, les chercheurs ont poursuivi la caractérisation des hybridomes T en réalisant l'expérience décrite en **Figure n°6**.

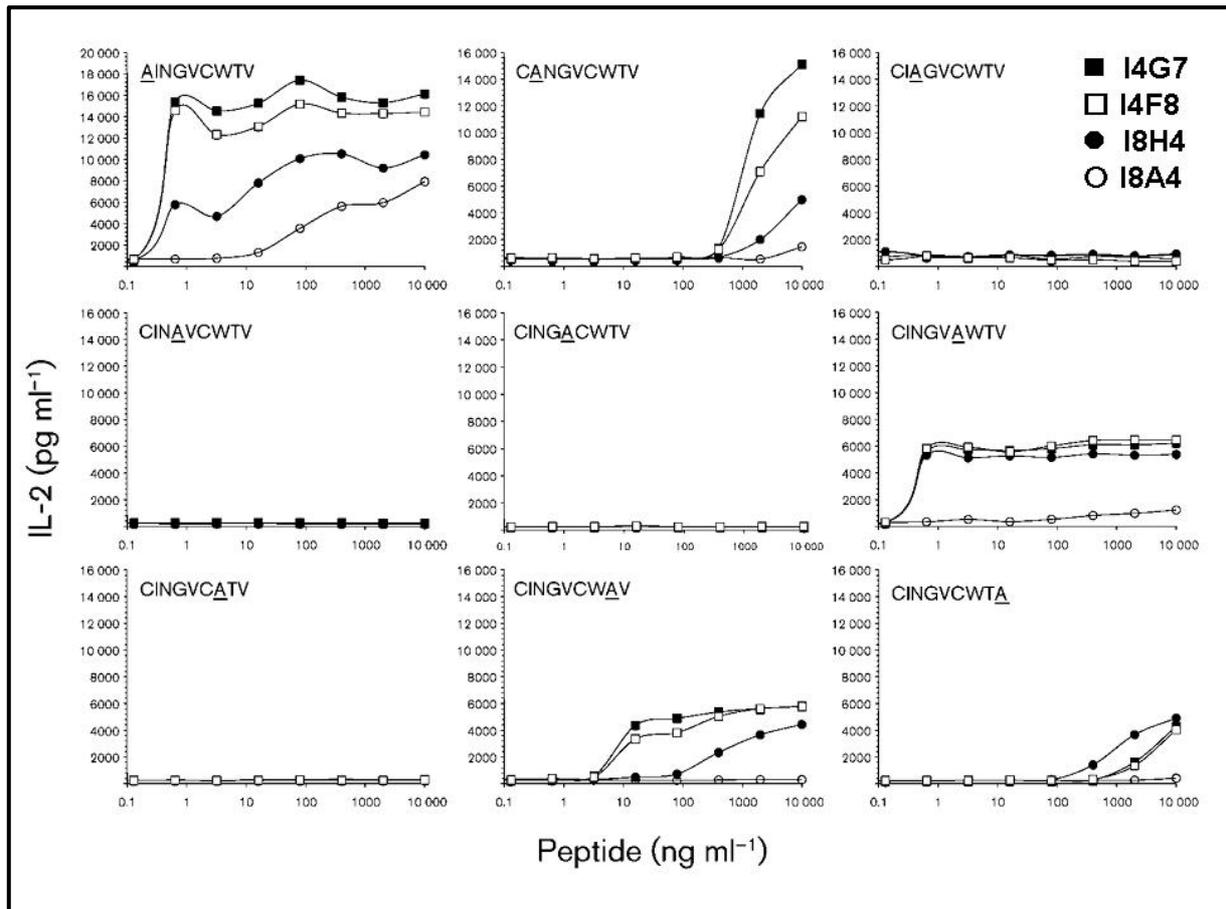


Figure n°6 : Production d'IL-2 dans les co-cultures d'hybridomes T et de cellules T2 préalablement chargées avec des peptides à différentes concentrations. La séquence des peptides utilisés est indiquée au-dessus de chaque graphique.

• **Question 7 :**

Quels sont les points communs entre les différents peptides et le peptide NS3₁₀₇₃ ?

• **Question 8 :**

Analysez les résultats et indiquez quelles informations sont apportées par cette expérience ?

• **Question 9 :**

Les résultats présentés permettent-ils de discriminer entre les hypothèses formulées dans votre analyse de l'expérience précédente ?

Travaux dirigés Immunologie n°4

Cytométrie en flux et analyse des réponses cellulaires

1ère partie : Exposé oral

Sujet : Le tri cellulaire par cytométrie en flux : Rappelez le principe de cette technique, présentez-en l'intérêt et les limites et comparez-la à d'autres méthodes de tri cellulaire.

Vous disposez de 15 minutes pour traiter le sujet en vous appuyant sur un support projeté (format powerpoint ou pdf).

Exercice 1 :

La prolifération cellulaire peut être analysée par cytométrie en flux grâce l'étude de la dilution du marquage par le carboxyfluorescéine diacétate succinimidyl diester (CFSE), qui forme des liaisons covalentes avec les protéines cellulaires. Le principe de cette technique repose sur le marquage fluorescent des cellules dont la prolifération doit être suivie, par exemple de lymphocytes T (LT). Lors de la division cellulaire, les protéines marquées sont réparties de façon égale entre les cellules filles, qui sont donc deux fois moins fluorescentes que la cellule mère (voir Figure 1A). L'intensité de fluorescence des cellules, mesurée par cytométrie en flux, reflète donc le nombre de divisions des cellules marquées initialement.

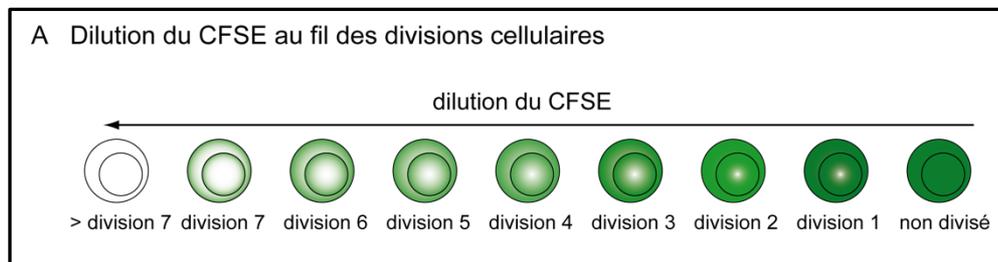


Figure 1 : A. Représentation schématique de la dilution du CFSE au fil des divisions cellulaires.

Des LT CD4 OT-II, spécifiques d'un peptide de l'ovalbumine de poule (OVA) ont été isolés et marqués avec du CFSE. Après lavage, les LT ont été injectés à des souris C57Bl/6 naïves par voie intraveineuse à raison de $5 \cdot 10^6$ cellules par souris. Ces souris ont ensuite été immunisées avec différentes quantités d'ovalbumine. Trois jours plus tard, les rates des souris ont été collectées et les splénocytes ont été marqués avec la combinaison d'anticorps suivante :

- anti-CD3 PE
- anti-CD4 APC
- anti-V α 2-PerCP

On précise que l'anti- V α 2 marque notamment le TCR spécifique de l'ovalbumine de poule exprimé par les LT OT-II.

L'analyse des résultats obtenus par cytométrie en flux est présentée dans la figure 2.

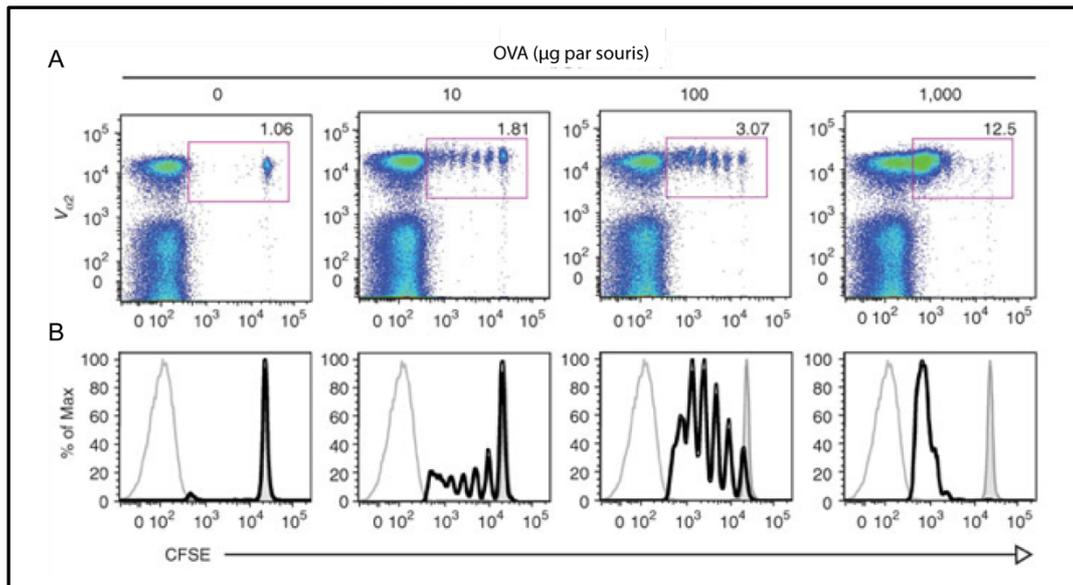


Figure 2 : Des souris C57Bl/6 ont reçu chacune 5.10^6 LT OT-II marquées au CFSE. La prolifération de ces cellules suite à l'injection de différentes doses d'OVA aux souris a été représentée sous forme de « dot plot » (A) ou d'histogrammes (B). **A.** les pourcentages indiqués correspondent aux pourcentages de cellules présentes dans le cadre rose. **B.** Histogrammes présentant le profil CFSE des LT CD4⁺ OT-II à chaque dose d'OVA (traits noirs épais). Sur les trois histogrammes de droite, le profil CFSE obtenu pour la souris n'ayant pas reçu d'OVA est rappelé (histogramme gris plein). La fluorescence des LT CD4 endogènes est représentée par les histogrammes gris vides.

• **Question 1 :**

Faites un schéma récapitulatif du protocole expérimental utilisé.

• **Question 2 :**

Quelles cellules retrouve-t-on dans le cadre rose figure 2A ?

• **Question 3 :**

Analysez et interprétez les résultats de cette expérience. Que pouvez-vous conclure ? Quelle(s) limite(s) de cette technique est(sont) mise(s) en évidence ?

Adapté d'après Quah BLC *et al.*, Nature Protocols 2007, 2: 2049 - 2056.

Afin d'analyser les cytokines produites par les LT CD4 activés, des souris sont injectées avec 5.10^6 LT CD4 OT-II marqués au CFSE puis immunisées avec $100 \mu\text{g}$ d'OVA. Les splénocytes sont collectés 3 jours après l'injection d'OVA et cultivés *in vitro* pendant 6 heures en présence du peptide dérivé de l'OVA dont sont spécifiques les LT OT-II, dans un milieu qui contient une drogue qui bloque l'exocytose (bréfeldine A). Ces cellules sont ensuite marquées avec les anticorps dirigés contre les antigènes membranaires CD3, CD4 et V α 2 puis perméabilisées et incubées avec des anticorps spécifiques de l'IL-2 et de l'IFN- γ . Leur phénotype est analysé par cytométrie en flux (figure 3).

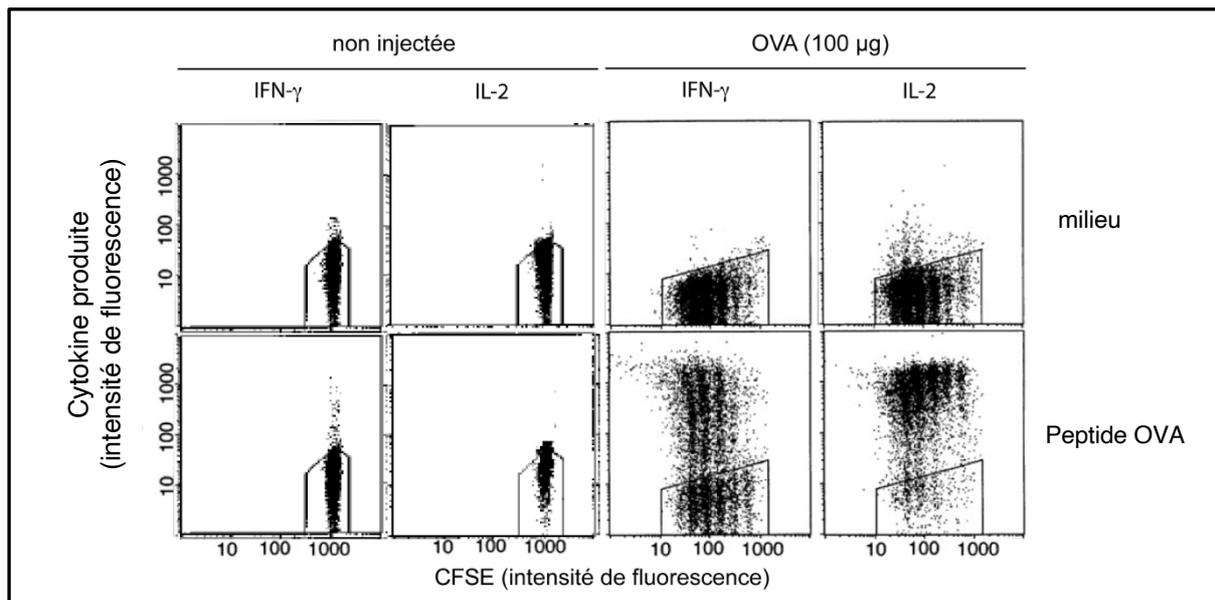


Figure 3: Des souris C57Bl/6 ont reçu chacune $5 \cdot 10^6$ LT OT-II marquées au CFSE. La fluorescence CFSE des cellules et leur production de cytokines suite à l'injection de $100 \mu\text{g}$ d'OVA aux souris ont été représentées sous forme de « dot plot » après un fenêtrage sur les cellules OT-II. Au dessus des dot plots sont indiqués le traitement reçu par la souris et le marquage réalisé. A droite des dot plots figure le traitement réalisé *in vitro*.

• **Question 4 :**

Quel est l'objectif de l'incubation de 6 heures en présence de peptide OVA et de bréfedline A ?

• **Question 5 :**

Analysez et interprétez les résultats de cette expérience.

Adapté d'après Bird *et al.*, Immunity, 1998. Vol 9 :229–237.

On analyse à présent le contenu en ADN des LT OT-II à différent temps suite à leur activation. Pour cela, les LT sont incubés en présence d'anti-CD3 et d'anti-CD28 pendant différents temps puis récoltés et fixés en éthanol à 90%. Les LT sont alors incubés avec de l'iodure de propidium ($20 \mu\text{g/ml}$) puis analysés au cytomètre.

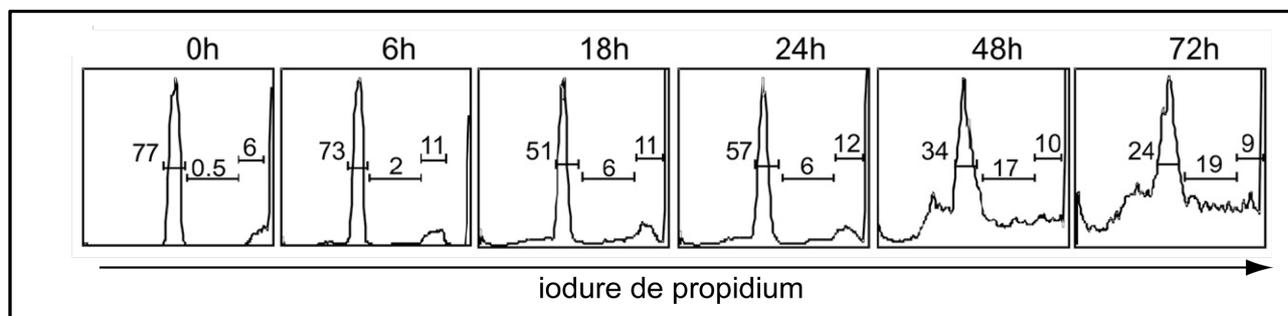


Figure 4 : Histogrammes de cellules marquées à l'iodure de propidium après stimulation pendant différents temps. Les pourcentages de cellules en phase G0-G1, S et G2-M sont indiqués.

• **Question 6 :**

A quel constituant cellulaire l'iodure de propidium s'associe-t-il ? Quelle est la conséquence de cette liaison ? Pourquoi a-t-on fixé les cellules avec de l'éthanol ?

• **Question 7 :**

Quelles sont les régions correspondant aux phases G0-G1, S et G2-M sur les histogrammes ?

• **Question 8 :**

Analysez et interprétez les résultats de cette expérience.

Adapté d'après Shi et al., J. Immunol, 2009, vol 183:4493-4501.

Exercice 2 :

Des chercheurs ont étudié le rôle de l'interaction CD40/CD40L dans la réponse des lymphocytes T cytotoxiques (CTL). Dans ce système expérimental, des souris C57Bl/6 normales ou déplétées en lymphocytes T (LT) CD4⁺ ont été infectées par un adénovirus (Ad5E1). La rate de ces animaux a été prélevée 2 semaines plus tard. Les splénocytes ont été cultivés pendant 6 jours avec des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) infectées avec le même virus et irradiées. A l'issue de cette culture, l'activité cytotoxique des CTL contre des cibles infectées par l'Ad5E1 et chargées en chrome radioactif a été mesurée (figure 1 a et b). Les auteurs ont également traité les souris dépourvues en LT CD4⁺ et infectées par le virus par un anticorps agoniste de CD40 (figure 1c).

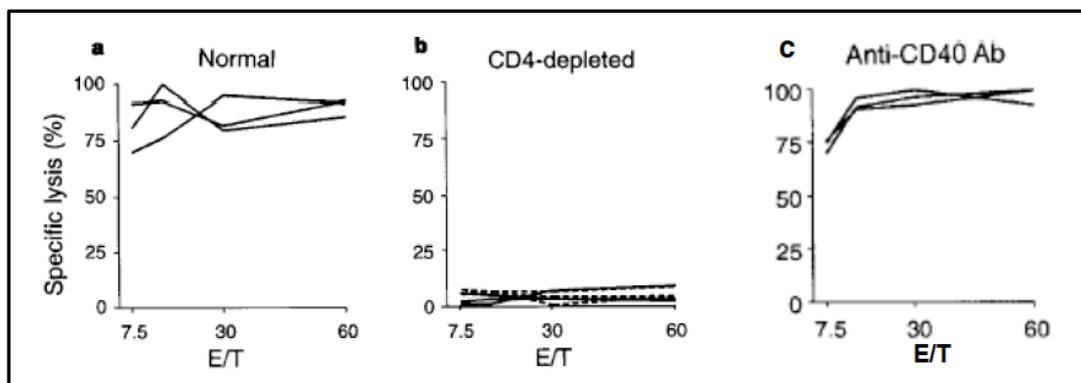


Figure 1 : Les splénocytes de souris C57Bl/6 normales (a) ou déplétées en LT CD4⁺ (b) immunisées avec le virus ont été testées pour leur capacité à lyser des cellules infectées à différents rapports effecteurs-cibles (E/T). (c) La même expérience a été réalisée avec des splénocytes de souris C57Bl/6 déplétées en cellules CD4⁺ et injectées avec des anticorps agonistes de CD40. Chaque courbe correspond à une souris individuelle.

• **Question 1 :**

Qu'est-ce qu'un anticorps agoniste ?

• **Question 2 :**

Analysez et interprétez cette expérience. Que pouvez-vous conclure de l'analyse de ces résultats quant au rôle de l'interaction CD40/CD40L dans l'activation des CTL ? Quel phénomène ces expériences mettent-elles en évidence ?

Afin de déterminer la nature de la cible de l'anticorps anti-CD40, ces expériences ont été reproduites avec des souris dépourvues de lymphocytes B (souris $\mu\text{MT}^{-/-}$). Les résultats sont présentés dans la figure 2.

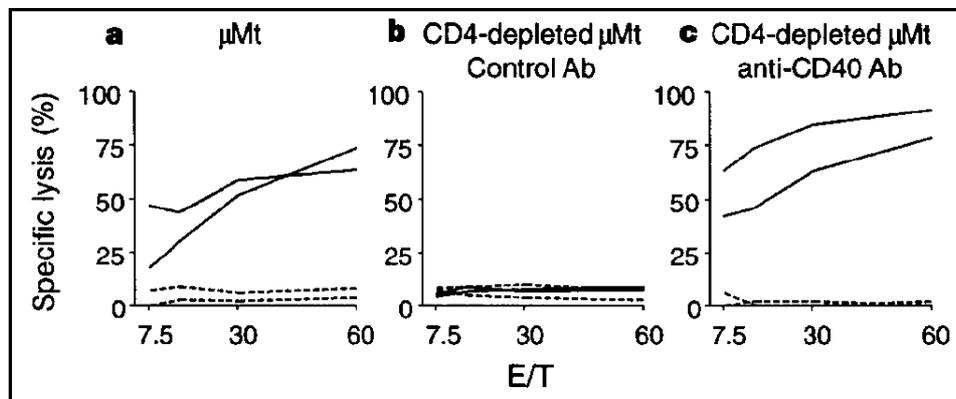


Figure 2 : Des souris $\mu\text{MT}^{-/-}$ normales (notées μMT) (a), déplétées en LT CD4⁺ (b) ou déplétées en LT CD4⁺ et injectées avec des anticorps agonistes de CD40 (c) ont été immunisées avec le virus Ad5E1. L'activité cytotoxique des CTL de ces souris a été testée comme dans la figure 1. Chaque courbe correspond à une souris individuelle. Ab : anticorps.

• **Question 3 :**

Analysez et interprétez cette expérience. Quelle conclusion pouvez-vous tirer de ces résultats quant à la nature de la cellule cible de l'anticorps anti-CD40 ?

Afin de compléter cette étude, un autre groupe de chercheurs a testé l'activation de LT CD8⁺ P-14 spécifiques d'un peptide dérivé de la glycoprotéine du virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) par des cellules dendritiques normales (WT) ou issues de souris génétiquement déficientes en CD40 ($\text{CD40}^{-/-}$). Pour faire cette expérience, ils ont purifié et marqué au CFSE des LT CD8 P-14 avant de les injecter à des souris receveuses C57Bl/6 normales. Le lendemain, ils ont injecté des cellules dendritiques WT ou $\text{CD40}^{-/-}$ chargées ou non avec le peptide gp33 du LCMV reconnu par les LT P-14. Le nombre de LT P-14 chez les souris receveuses et leur profil d'activation ont été analysés par cytométrie en flux après marquage des splénocytes avec des anticorps anti-CD3, anti-CD8 et anti-IFN- γ (figure 3).

• **Question 4 :**

Que permet la procédure expérimentale adoptée par les chercheurs ?

• **Question 5 :**

Analysez et interprétez les résultats de la figure 3. Proposez un modèle concernant le rôle de CD40 dans l'activation des LT cytotoxiques en intégrant l'ensemble des résultats obtenus ?

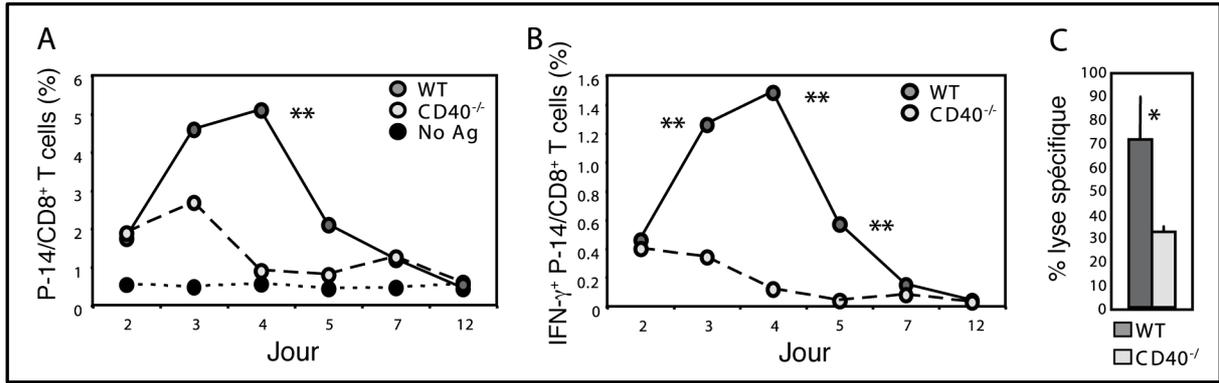


Figure 3 : Des souris C57Bl/6 ont reçu $2 \cdot 10^6$ LT P-14 marquées avec du CFSE à J-1. A J0, les souris ont reçu $5 \cdot 10^5$ cellules dendritiques WT ou CD40^{-/-} chargées en peptide gp33. Un lot de souris a reçu des cellules dendritiques non chargées en antigène (no Ag). Détermination de la fréquence des LT P-14 (A) et de la fréquence des LT P-14 productrices d'IFN- γ parmi les splénocytes (B) à différents temps. (C) Mesure de l'activité cytotoxique des LT CD8⁺ spécifiques du LCMV observée à J4 post-immunisation pour les lots de souris ayant reçu les cellules dendritiques WT et CD40^{-/-}

TD de virologie N°1
Mécanisme d'entrée des virus

1^{ère} partie : Exposé oral :

Sujet : Quantification des particules virales infectieuses.

A l'aide des documents fournis sur Ecampus, ou tout document que vous jugerez utile et pertinent, vous présenterez la méthode de titration des virus par cytométrie en flux. Vous expliquerez les avantages et inconvénients de cette méthode et vous la comparerez à la méthode traditionnelle de « plaque assay ».

Vous disposez de 15 minutes pour traiter le sujet en vous appuyant sur un support projeté (format pdf de préférence ou ppt).

EXERCICES

Internalisation d'un virus à enveloppe, le virus de la forêt de Semliki SFV

Pré-requis :

- Connaître les différentes étapes d'un cycle viral type
- Mécanismes d'entrée des virus dans les cellules hôtes
- Marquage métabolique
- Mécanismes d'endocytose

En préambule, répondez aux questions suivantes :

- *Quel(s) est(sont) le(s) mécanisme(s) d'entrée des virus enveloppés dans la cellule ?*
- *Où précisément, dans la cellule hôte, sont synthétisées les différentes protéines des virus enveloppés?*

Pénétration du virus

Nous allons étudier dans des cellules rénales en culture, les premières étapes de la pénétration d'un virus à ARN enveloppé, le virus de la forêt de Semliki (SFV). La souche virale est entretenue au laboratoire par infection de ces cellules en culture à 37°C, les virus nouvellement synthétisés sont libérés dans le milieu de culture entre 4 et 6 heures après le début de l'infection. Pour étudier le mécanisme d'entrée, du SFV ayant incorporé de la méthionine ³⁵S a été utilisé.

Question 1 :

- Comment prépare-t-on des virus marqués par de la méthionine ^{35}S ? Quel type de molécule sera marquée ?

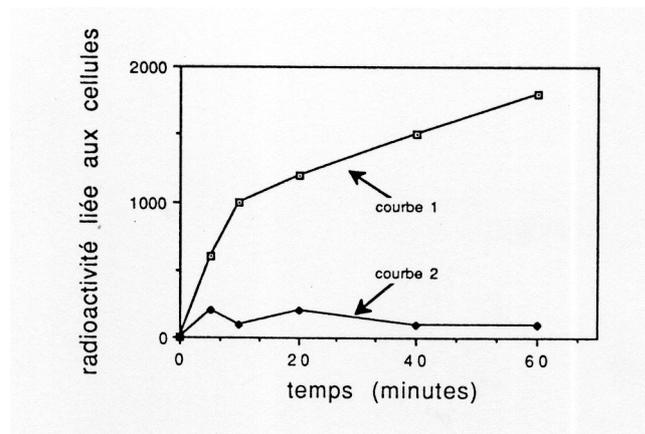
Expérience 1 : fixation du virus

Des boîtes de pétri contenant des cellules rénales (tapis confluents) sont placées à 4°C et les cellules sont recouvertes par une suspension de SFV marqués radioactivement par de la méthionine ^{35}S . Après différents temps de contact, les cellules sont lavées puis traitées ou non (à froid) avec une faible concentration de protéase, traitement ayant pour conséquence la libération des particules virales liées à la surface des cellules. La radioactivité restant alors associée aux cellules est quantifiée. La courbe 1 de la figure 1 correspond aux cellules non traitées par la protéase, la courbe 2 aux cellules traitées par la protéase.

Question 2 :

- Décrivez la figure, puis interprétez ces résultats

Figure 1



Expérience 2 :

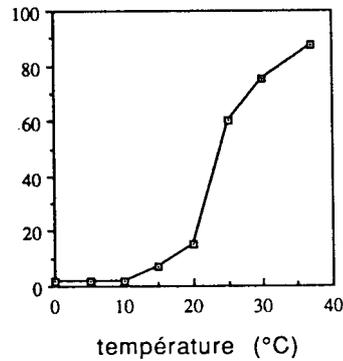
Du SFV radioactif est mis en contact avec des tapis cellulaires confluents pendant 1 heure à 4°C . Les cellules sont ensuite lavées. Une des boîtes sera utilisée tel que (elle servira d'échantillon témoin). Les autres tapis cellulaires sont recouverts de milieu de culture et replacés à des températures comprises entre 4 et 37°C pendant une période de 30 minutes. A la fin de cette incubation, les tapis cellulaires subissent un traitement protéasique à froid de façon à détacher les virus de la surface des cellules. La radioactivité restant associée aux cellules après ce traitement est mesurée par scintillation liquide. Elle est exprimée sur la figure 2 en % de la radioactivité de l'échantillon témoin.

Question 3 :

- Descrivez la figure, puis interprétez ces résultats.
- Les résultats de l'expérience 1 et 2 vous permettent-ils de préciser le mode de pénétration de ce virus ?

Figure 2

Radioactivité associée aux cellules



Une observation au microscope électronique indique que dès le passage à 37°C, les particules virales internalisées sont localisées dans des vésicules caractérisées par un contour épaissi, situées sous la membrane plasmique. Très rapidement, les particules virales sont retrouvées dans un compartiment de plus grande taille, dont l'analyse cytochimique montre que son pH est acide mais qu'il ne contient pas (ou peu) d'hydrolases.

Question 4 :

- Quel est le nom des vésicules et de ce compartiment cellulaire dans lequel se retrouvent les virus ?

Libération de la nucléocapside dans le cytoplasme

Expérience 3

Du chlorure d'ammonium (NH_4Cl) est ajouté au milieu de culture des cellules infectées afin d'augmenter le pH des compartiments intracellulaires sans modifier les toutes premières étapes de l'internalisation des virus.

Une même quantité de SFV est laissée en contact avec les tapis cellulaires confluents pendant 1h à 4°C. Après lavage, les cellules recouvertes de milieu de culture sont incubées à 37°C (t_0) et réparties en plusieurs lots qui recevront du NH_4Cl à différents temps après le passage à 37°C (voir tableau 1). Après 5 heures d'incubation (temps requis pour un cycle viral), la concentration en virus dans le surnageant de culture est déterminée. **En absence de traitement au NH_4Cl la production virale est de 10^8 particules virales/ml à $t_0 + 5\text{h}$.** Les résultats obtenus en présence de NH_4Cl ajouté dès t_0 ou à différents moments après t_0 sont présentés dans le tableau 1.

Tableau 1

	Moment de l'addition du NH_4Cl après t_0 (exprimé en min)					
	t_0	t_0+2	t_0+4	t_0+10	t_0+20	t_0+40
Production virale à $t_0+5\text{h}$ (en particules virales/ml)	$5 \cdot 10^5$	$7 \cdot 10^5$	10^6	$3 \cdot 10^7$	$5 \cdot 10^7$	$7 \cdot 10^7$

Question 5 :

- Quel est l'effet du NH_4Cl sur la production virale ?*
- A quel moment doit-on ajouter du NH_4Cl pour que cet effet sur la production virale soit maximal?*
- A quel moment doit-on ajouter du NH_4Cl pour observer une production virale au moins 100 fois plus faible que celle produite par les tapis cellulaires non traités ?*
- Indiquez parmi les différentes étapes du cycle viral, celle qui pourrait être affectée par le traitement à pH basique, en précisant les raisons de votre choix : fixation virale, endocytose par vésicules recouvertes, libération de la nucléocapside dans le cytoplasme, réplication, transcription et traduction du génome viral et/ou bourgeonnement des particules virales.*

Expérience 4

L'expérience suivante qui analyse *in vitro* les interactions liposomes-virus, va permettre de suivre l'effet du pH sur le mécanisme de fusion membranaire. Cette expérience a nécessité l'utilisation de SFV dont le génome a été marqué radioactivement.

Question 6 : *Que faut-il ajouter au milieu de culture des cellules infectées pour obtenir du SFV dont le génome soit radioactif ?*

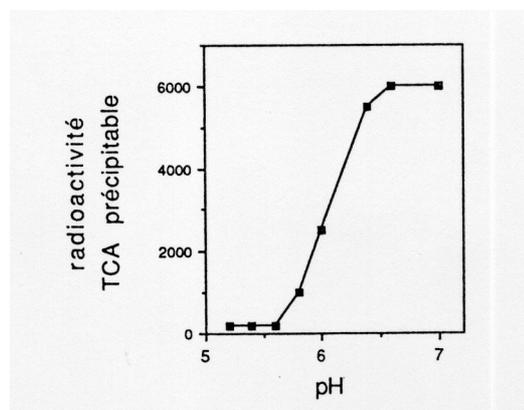
Une suspension de ce virus marqué (correspondant à 12000 cpm) est séparée en deux fractions égales dont l'une est traitée par un détergent (échantillon 1) et l'autre non (échantillon 2). Ces deux fractions sont incubées avec de la RNase à 37°C pendant 15 min. On ajoute ensuite à froid de l'acide trichloroacétique (TCA) à 10%, pour précipiter les macromolécules. La radioactivité des culots obtenus après centrifugation est mesurée par scintillation liquide.

Dans le cas de l'échantillon n'ayant pas subi le traitement par le détergent (échantillon 2) toute la radioactivité incorporée (6000 cpm) est retrouvée dans le culot, alors que pour l'échantillon 1, la radioactivité du culot n'est que de 200 cpm.

Question 7 : Dans quelles conditions la particule virale est sensible à la RNase ? Expliquez.

On sait fabriquer des vésicules lipidiques artificielles (liposomes) dont la membrane est constituée des principaux phospholipides de la membrane plasmique et dont la lumière peut contenir un type donné de molécule soluble. Dans le cas de cette expérience, les liposomes renferment une RNase insensible aux variations de pH. Ces liposomes sont mis en présence de particules virales dont le génome est marqué (6000 cpm par échantillon), ceci dans des tampons de pH variant de 5 à 7. Après 15 min d'incubation à 37°C, les échantillons sont précipités par du TCA 10%. La radioactivité des culots est mesurée par scintillation liquide (figure 4).

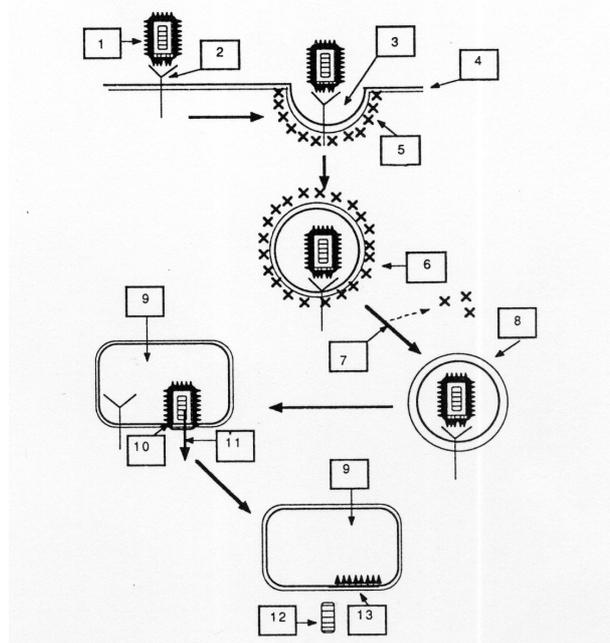
Figure 4



Question 8 :

- Commentez les résultats obtenus et reliez-les avec les phénomènes observés dans l'expérience 3, sachant que le pH de l'endosome précoce est environ de 6.
- Légendez le schéma de la figure 5.

Figure 5



TD de virologie N°2

Identification d'un récepteur viral et Identification d'un virus

1^{ère} partie : Exposé oral

Sujet : Après avoir donné la définition de la **multiplicité d'infection** (en anglais « m.o.i. », multiplicity of infection), vous expliquerez :

- quelle multiplicité d'infection doit-on choisir pour que 99% des cellules soient infectées ?
- l'intérêt sur le plan expérimental d'utiliser de faibles ou de fortes m.o.i.

Vous pourrez vous servir des documents fournis sur Ecampus ou tout document que vous jugerez utile et pertinent.

Vous disposez de 15 minutes pour traiter le sujet en vous appuyant sur un support projeté (format power point ou pdf).

EXERCICES

1 - Caractérisation du récepteur cellulaire du SARS-CoV-2 :

Pré-requis :

- *Notion de récepteur viral*
- *Définition cellules sensible vs résistante à un virus donné*
- *Expression ectopique d'une protéine cellulaire (cellule transfectée)*

En préambule, répondez à la question suivante :

Par quels mécanismes les virus enveloppés quittent-ils la cellule ? Comment acquièrent-ils les spicules ?

Exercice :

D'après : Hoffmann, M., et al. (2020). SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. Cell S0092867420302294.

Les expériences qui suivent visent à caractériser une des premières étapes du cycle de multiplication du SARS-CoV-2, un virus enveloppé à ARN simple brin positif.

Pour cette étude, les chercheurs ont utilisé 3 types de particules virales dérivées d'un rhabdovirus¹ dites « pseudotypées » (VSVpp) : ces particules expriment au niveau de leur enveloppe soit la glycoprotéine G (protéine d'enveloppe naturelle du VSV), soit la protéine S (protéine

¹ VSV (virus de la stomatite vésiculeuse) : virus enveloppé à ARN négatif non segmenté. Parmi les hôtes naturels du VSV figurent les bovins, les porcs, les chevaux et d'autres mammifères, ainsi que leurs insectes vecteurs. Le large tropisme cellulaire de ce virus en fait un virus modèle pour de nombreuses applications de recherche fondamentale.

d'enveloppe du SARS-CoV-1²), soit la protéine d'enveloppe S2 (protéine d'enveloppe du SARS-CoV-2). De plus, le gène de la luciférase a été inséré dans le génome de ces différents virus pseudotypés.

A l'aide de ces 3 types de VSVpp, les chercheurs ont réalisé une première expérience, dont le mode opératoire et les résultats sont présentés dans la figure 1.

Figure 1 :

Des lignées cellulaires d'origine animale (Vero et BHK) ont été infectées avec les particules VSVpp exprimant à leur surface :

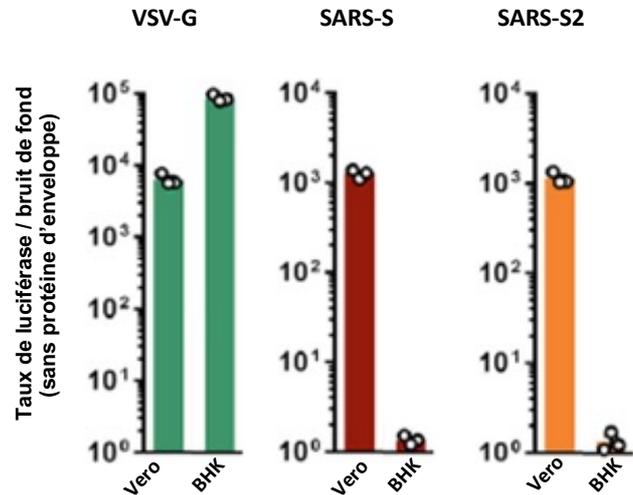
- soit la glycoprotéine G du VSV (VSV-G),
- soit la protéine de surface du SARS-CoV-1 (SARS-S),
- soit la protéine de surface du SARS-CoV-2 (SARS-S2)

Le gène codant pour la luciférase a été inséré dans le génome de ces virus RHAB-pp.

16 h après l'infection, l'activité de la luciférase a été mesurée dans les lysats cellulaires.

Les signaux obtenus pour les particules ne portant pas de protéine d'enveloppe (« bruit de fond » ; non montrés) ont été utilisés pour la normalisation, ainsi les résultats sont exprimés en « taux de luciférase par rapport au bruit de fond »

La moyenne de trois expériences indépendantes est indiquée. Les barres d'erreur indiquent les écart-types.



Question 1 :

- a. Présentez la structure des particules virales VSVpp à l'aide d'un schéma légendé.
- b. Quel(s) paramètre(s) du cycle réplcatif viral permet de suivre la mesure d'activité luciférase dans ces expériences ?
- c. Quel est l'objectif des manipulations réalisées dans l'expérience 1 ?
- d. Décrivez et expliquez les résultats présentés dans la figure 1, puis faites une conclusion (Vous préciserez entre autres quelles sont les cellules sensibles aux différents VSVpp).

Les chercheurs ont ensuite répété cette expérience (Figure 2A) avec les cellules BHK transfectées avec des plasmides d'expression de différentes protéines de surface :

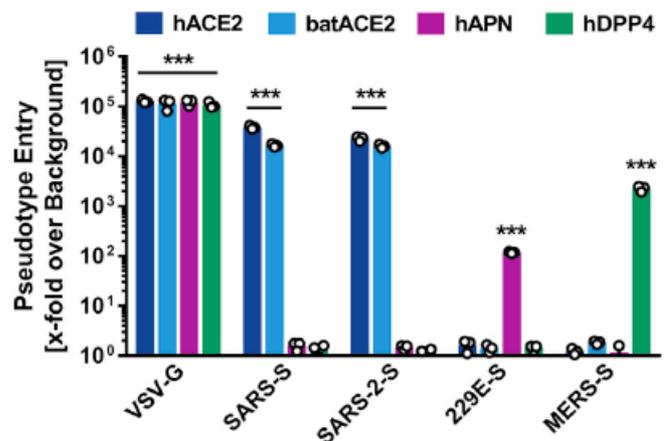
- hACE2 : récepteur connu du SARS CoV-1 (protéine humaine),
- batACE2 : récepteur connu du SARS CoV-1 (protéine de chauve-souris),
- hAPN : récepteur du coronavirus HCoV-229E (protéine humaine ; le HCoV-229E est un coronavirus humain connu depuis les années 60),
- hDDP4 : récepteur du coronavirus MERS-CoV (protéine humaine ; MERS-CoV : « Middle East respiratory syndrome coronavirus », détecté pour la première fois en 2012 en Arabie Saoudite).

² SARS : « severe acute respiratory syndrome coronavirus », virus qui a émergé en Chine en 2002.

Figure 2 : Des cellules BHK-21 exprimant transitoirement les protéines de surface suivantes : ACE2 d'origine humaine (hACE2) ou de chauve-souris (batACE2), APN d'origine humaine ou DPP4 d'origine humaine, ont été infectées avec un virus VSV pseudo-typé exprimant :

- soit la glycoprotéine G du VSV (VSV-G),
- soit la protéine de surface du SARS (SARS-S),
- soit la protéine de surface du SARS-CoV-2 (SARS-2-S)
- soit la protéine de surface du HCoV-229E (229E-S).
- soit la protéine de surface du MERS-CoV(MERS-S),

16 h après l'infection, l'activité de la luciférase a été mesurée dans les lysats cellulaires et les résultats sont analysés comme dans la figure 1.
 (***) ou (****) indique que les résultats sont statistiquement significatifs.



Question 2 :

- Descrive les résultats présentés dans la figure 2. Vous préciserez quels sont les contrôles de l'expérience.
- Que pouvez-vous conclure de ces résultats quant au rôle des protéines ACE2 d'origine humaine ou chauve-souris dans l'infection par le SARS-CoV-2 ?

En parallèle, l'expérience a été faite sur des cellules Vero en présence (ou non) de 2 doses d'anticorps dirigés contre la protéine de surface ACE2. Les résultats sont présentés dans la figure 3.

Figure 3
 Des cellules Vero non traitées ou pré-incubées avec 2 ou 20 mg/mL d'anticorps anti-ACE2 ou d'anticorps de contrôle irrélevant («control» 20 mg/ml) ont été infectées avec les VSVpp VSV-G, MERS-S, SARS-S ou SARS-S2 (cf fig1 et 2A).

16 h après l'infection, l'activité de la luciférase a été mesurée dans les lysats cellulaires.

Les signaux obtenus pour cellules non traitées ont été utilisés pour la normalisation, ainsi les résultats sont exprimés en « taux de luciférase par rapport au bruit de fond ».

(***) indique que les résultats sont statistiquement significatifs.

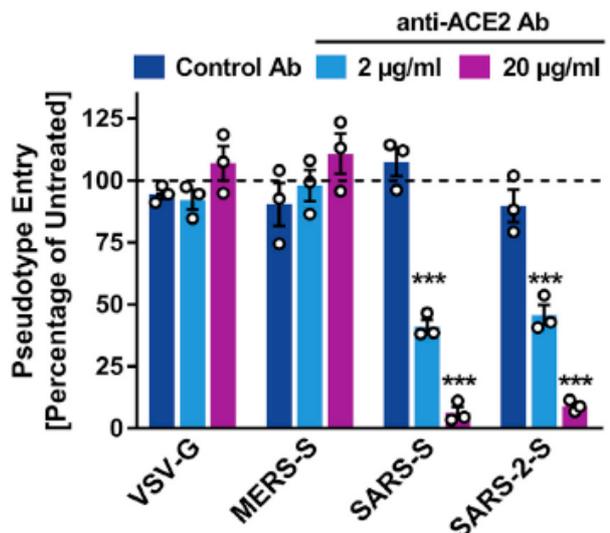
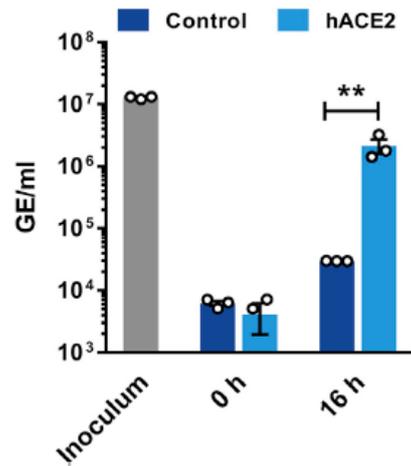


Figure 4 :

Des cellules BHK-21 transfectées avec un plasmide codant pour hACE2 ou la DsRed (« control ») ont été infectées par le SARS-CoV-2 et lavées. Les équivalents de génome dans les surnageants de culture ont été déterminés par RT-PCR quantitative.

Les résultats sont exprimés en Equivalents Génome /ml (GE/ml).

(**) indique que les résultats sont significativement différents.

**Question 3 :**

- Quel est l'objectif de cette expérience ? Pourquoi les chercheurs ont-ils utilisé les cellules de la lignée Vero et non pas celles de la lignée BHK ?*
- Décrire les résultats présentés dans la figure 3. Vous préciserez quels sont les contrôles de l'expérience.*
- Ces résultats sont-ils en accord avec les conclusions faites à la question 2b ? Expliquez.*

Par ailleurs, des infections avec le virus SARS-CoV-2 ont été réalisées sur des cellules BHK transfectées avec le plasmide d'expression de hACE2 ou un plasmide exprimant une protéine fluorescente (la mCherry). Les résultats sont présentés dans la figure 4.

Question 4 :

- Expliquez en quoi les mesures par RT-PCR quantitative permettent de quantifier les particules virales produites ? Indiquez deux autres méthodes de quantification des virus. Auraient-elles pu être utilisées dans le cas présent ?*
- Décrivez et analysez les résultats présentés dans la figure 4. En quoi cette expérience complète-t-elle les résultats précédents (figures 2 et 3).*

Question 5 : *Discutez l'intérêt selon vous de caractériser le(s) récepteur(s) d'un virus.*

1 - Identification d'un virus

D'après Villoing, S., Bearzotti, M., Chilmonczyk, S., Castric, J., and Bremont, M. (2000). Rainbow Trout Sleeping Disease Virus Is an Atypical Alphavirus. *Journal of Virology* 74, 173–183.

La maladie du sommeil de la truite arc en ciel est un problème dans les élevages de salmonidés de par le monde. Les expériences qui suivent ont permis de caractériser l'agent pathogène responsable. Les principaux symptômes de cette maladie sont des troubles du comportement, les animaux restants couchés sur le côté dans le fond des bassins. Au niveau histologique, des lésions sont observées dans le pancréas, le cœur et les muscles dans les phases finales de la maladie (Villoing et al., 2000).

Question 1 :

- a. *Rappelez brièvement quels sont les composants d'un virus (enveloppé ou non).*
- b. *Quelles hypothèses peut-on faire quant à l'étiologie d'une maladie touchant des animaux d'élevage ? Comment trancher entre ces hypothèses ?*

Diverses observations ont rapidement conduit les chercheurs à conclure qu'un agent pathogène était impliqué.

Question 2 :

- a. *Comment démontrer le caractère infectieux ?*
- b. *De quelle nature peut être cet agent pathogène ? Quelles expériences proposez-vous pour définir la nature de cet agent infectieux ?*

Afin d'isoler cet agent pathogène, les auteurs ont entrepris de le produire en quantité dans un système cellulaire *in vitro*.

Question 3 :

- a. *Selon vous, quel type cellulaire est adapté pour cette étude ?*
- b. *Comment vérifier que ces cellules sont bien infectées ?*

Des cellules de la lignée RGT2 ont été infectées avec des extraits de pancréas issus de truites malades et observées au microscope photonique (Figure 1A) et en microscopie électronique (Figure 1B).

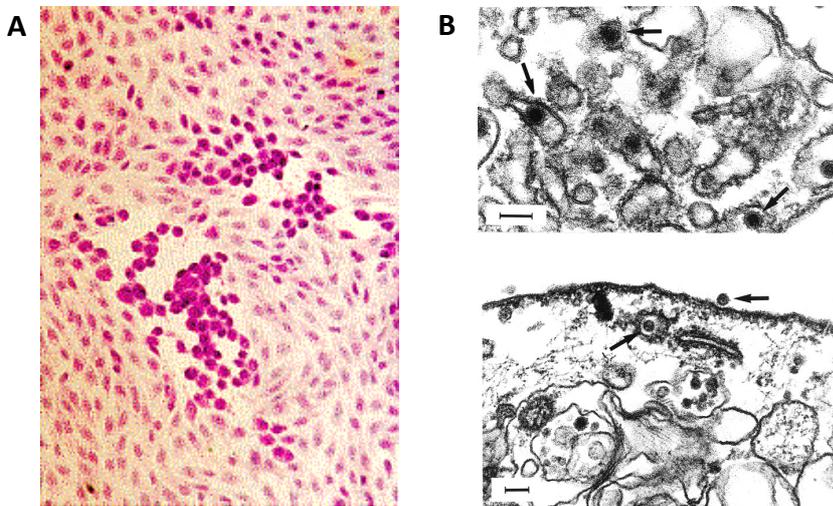


Figure 1 :

A. Cellules RGT2 infectées. Observation au microscope après 10 jours de culture à 10°C.

B. Cellules RGT2 infectées et fixées avec 1,25 % glutaraldéhyde, puis 1%OsO₄ et incluses en Epon. Les sections ont été colorées avec de l'acétate d'uranyle avant observation au microscope électronique. Barre d'échelle = 100 nm.

Question 4 : Analysez les résultats de la figure 1.

La titration de ce virus, nommé SDV (Sleeping Disease Virus), a été réalisée ainsi :

Les cellules RGT2 ont étéensemencées en plaque 24 puits, puis infectées avec des dilutions en série de suspension virale. Après adsorption, les cellules ont été recouvertes d'agarose (0,3%) et les plaques ont été placées à 10°C ou 14°C. Après 7 jours de culture, l'agarose a été éliminé délicatement et les cellules ont été surinfectées avec un deuxième virus, le virus VHSV (viral hemorrhagic septicemia virus ; virus lytique). Après 3 jours, les cellules vivantes ont été visualisées à l'aide d'une coloration au crystal violet. Les résultats sont présentés dans la figure 2. Cette méthode est appelée « titration inverse » et les résultats sont exprimés en « RPFU » (« reverse plaque forming unit ») /ml.

Question 5 :

- a. Pourquoi titrer le virus ?
- b. Expliquez le principe de la méthode employée ici (Figure 2).

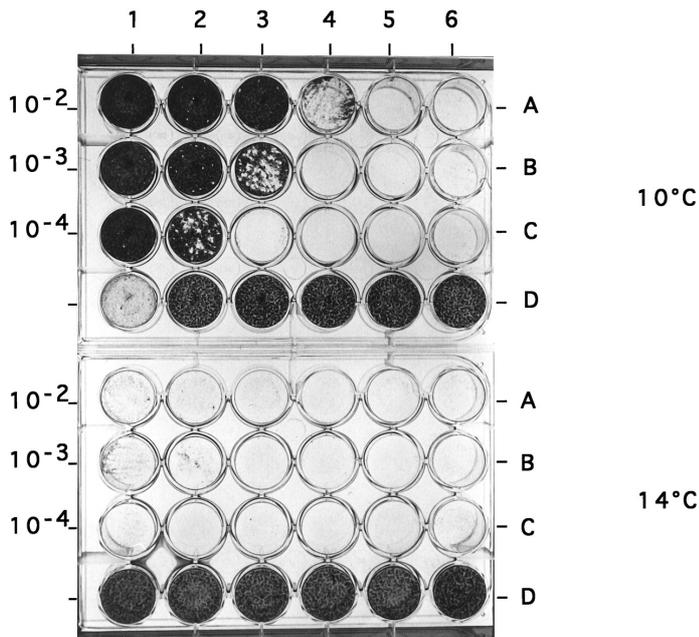


Figure 2 :

Rangées A à C : cellules RGT2 infectées par des dilutions en série de SDV (inoculum dilué comme indiqué sur la gauche puis de 10^{-2} à 10^{-6} colonnes 1 à 6 respectivement). Les cellules ont été infectées par le VHSV puis colorées au crystal violet.
Rangée D : cellules non infectées (sauf puits 1 de la plaque 10°C : cellules infectées par le VHSV)

Dans les 2 expériences qui suivent les auteurs utilisent divers virus comme contrôle :

- l'IPNV (infectious pancreatic necrosis virus), virus non-enveloppé,
- le VHSV (viral hemorrhagic septicemia virus), virus enveloppé,
- le SaHV-1 (salmoid herpes virus 1), virus enveloppé.

Expérience 1 : l'effet de différents pré-traitements physico-chimiques des particules virales avant infection des cellules RGT2 a été testé :

- Absence ou présence de chloroforme,
- Différents pH,
- Différentes températures.

TABLE 1. Stability of SDV exposed to chloroform or various temperatures and pHs

Virus	Titer ^a (log ₁₀ PFU/ml) under the indicated conditions									
	Chloroform		pH			Temp (°C)				
	-	+	3	7	11	10	15	25	37	45
SDV	5.7	2.4	1	5.7	4.3	5.3	5.3	5.3	5.0	0
VHSV	7.7	<1.0	3	7.7	4	ND ^b	ND	ND	ND	ND
IPNV	8.2	7.9	8.2	8.2	ND	ND	ND	ND	ND	ND

^a Each experiment was done in triplicate.

^b ND, not done.

Question 6 :

- a. Analysez les résultats présentés dans le tableau I. Quelle(s) information(s) fournit cette expérience sur le SDV ? De quel autre résultat pouvez-vous rapprocher cette conclusion ?

- b. *A partir des données vues en cours (Classification des virus), à quelle famille de virus pourrait appartenir le SDV ?*

Expérience 2 : des infections par le SDV ont été réalisées en absence ou présence de 1mM BrdU. En contrôle, une infection a été réalisée en présence de 1mM BrdU et de thymidine. Les résultats sont présentés dans le tableau 2.

TABLE 2. SDV replication in the presence of BrdU

Virus	Titer ^a (log ₁₀ PFU/ml) with:		
	No addition	1 mM BrdU	1 mM BrdU + THY
SDV	5.4	5.7	5.8
SaHV-1	2	0	2
IPVN	5.7	5.5	6.5

^a Each experiment was done in triplicate.

Question 7 :

- a. *Qu'est-ce que le BrdU ? Dans quel but a été réalisée cette expérience ? De quelle nature est le génome des virus utilisés comme témoins (SaHV-1 et IPNV).*
- b. *Analysez les résultats présentés dans le tableau 2 et concluez.*

Dans le but de mieux caractériser le génome viral, des cellules RGT2 ont été marquées métaboliquement avec de la [5,6-³H]uridine et infectées par le SDV. Les ARN totaux isolés à partir des cellules et les ARN récupérés dans le surnageant de culture ont été séparés sur gel d'agarose et analysés par autoradiographie (figure 3).

Question 7 : *Analysez les gels présentés dans la figure 3. Vous préciserez à quoi correspondent les différentes espèces moléculaires indiquées par des flèches (18S, 28S, 5kb et 12kb).*

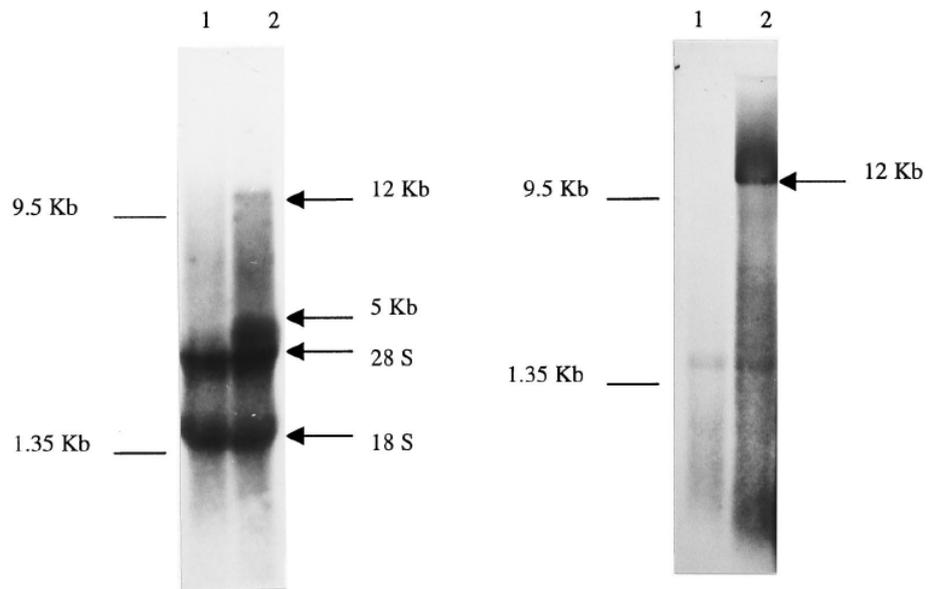


Figure 3

(a) Total RNA from metabolically [5,6-³H]uridine-labeled mock-infected (lane 1) or SDV-infected (lane 2).

(b) RNA extracted from supernatant of mock-infected (lane 1) or SDV-infected (lane 2) cells.

Les tailles des espèces majoritaires sont précisées.

TD de virologie N°3

Virus et cytosquelette

1^{ère} partie : Exposé oral :

Sujet : Vous exposerez le principe des **techniques de microscopie de fluorescence et de microscopie électronique** appliquées à la détection des virus et de leurs composants.

Vous disposez de 15 minutes pour traiter le sujet en vous appuyant sur un support projeté (format power point ou pdf).

EXERCICE

Utilisation du cytosquelette lors de l'infection virale : Transport du virus de l'herpès vers le noyau

D'après Sodeik, B., Ebersold, M.W., and Helenius, A. (1997). Microtubule-mediated Transport of Incoming Herpes Simplex Virus 1 Capsids to the Nucleus. *Journal of Cell Biology* 136, 1007–1021.

Pré-requis :

- Structure des particules virales des virus Herpès
- Cycle viral des virus Herpès
- Organisation et fonctions des différents types d'éléments du cytosquelette
- Principe des techniques de microscopie de fluorescence et électronique

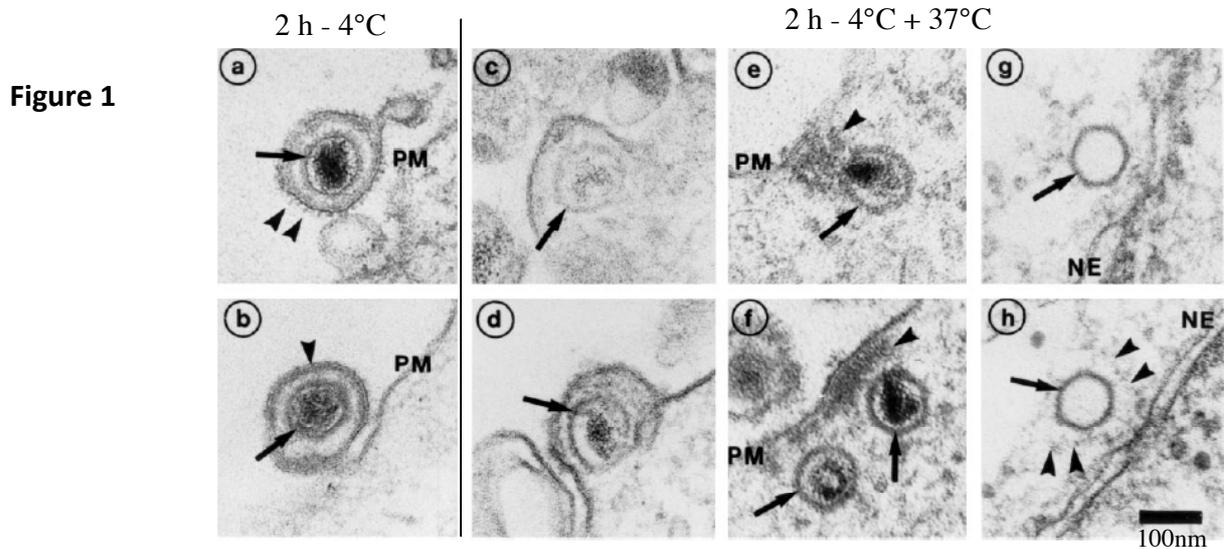
Le virus de l'herpès possède un génome à ADN linéaire double brin de 200 kb et a un diamètre d'environ 300 nm. Cette étude analyse comment ce virus peut se déplacer dans le cytoplasme pour atteindre le noyau (lieu de réplication du génome viral).

L'expérience suivante a été réalisée : un stock viral de l'herpès simplex de type 1 (HSV-1) est utilisé pour infecter des cellules de singes (cellules épithéliales Véro) à une m.o.i. de 500 (nombre pfu rapporté au nombre de cellules). Les virus sont mis en contact avec les cellules pendant 2 h à 4°C, Certains échantillons sont ensuite fixés et observés en microscopie électronique (Figure 1, a-b), d'autres échantillons sont mis à 37°C pendant 30 min (Figure 1, c-f) ou 60 min (Figure 1, g-h) avant fixation.

Question 1 :

- a. Indiquez l'intérêt du mode opératoire utilisé.

b. Nommez les principaux constituants du virus qui sont indiqués par des flèches et concluez sur le mode d'entrée du virus.



En parallèle, les mêmes cellules, infectées par le virus et incubées pendant 2H à 37°C, sont fixées et une immunofluorescence est réalisée avec des anticorps dirigés contre la capsid du virus (figure 2b, blanc) et contre la tubuline (figure 2a, gris). Ces cellules infectées sont également visualisées en microscopie électronique (figure 2c, d et f).

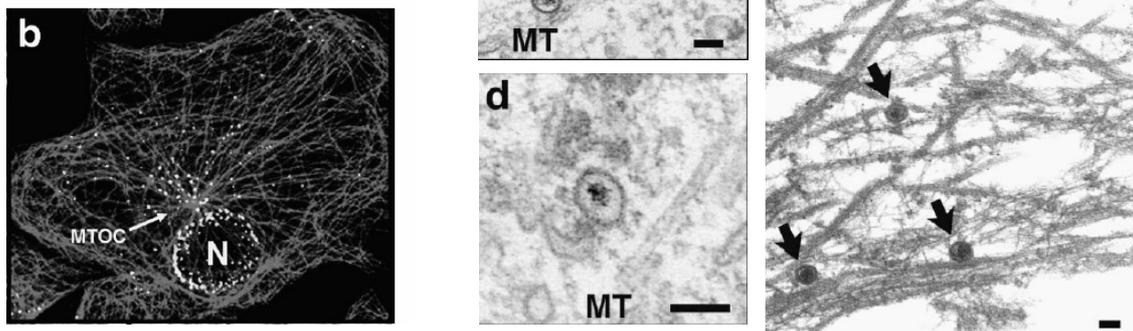
Question 2 :

- Définir la structure MTOC en figure 2b ainsi que les structures (MT) visualisées en figure 2c, d et f.
- Décrivez et interprétez les résultats présentés dans la figure 2.
- Quelles expériences proposeriez-vous pour démontrer le rôle spécifique de ces structures dans le transport du virus ?

Figure 2 :

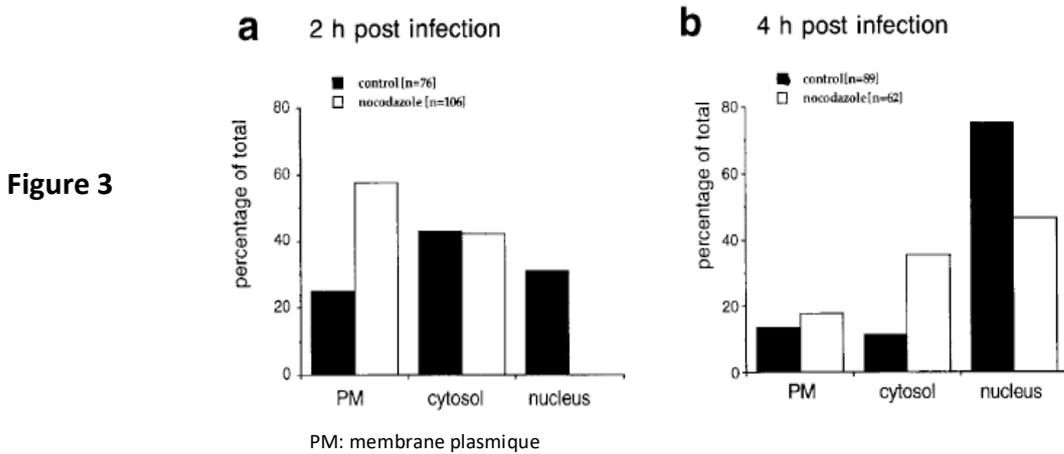
a : immunofluorescence
c, d et f: microscopie électronique

N : noyau



Des cellules infectées sont traitées par du nocodazole puis observées en microscopie électronique. 2 heures et 4 heures après infection, la quantité de capsid virale présente à la membrane plasmique, dans le cytoplasme ou niveau du noyau a été déterminée en analysant 50 micrographies électroniques aléatoires obtenues pour chaque point temporel et pour les deux traitements (avec et sans nocodazole). (Figure 3a et b).

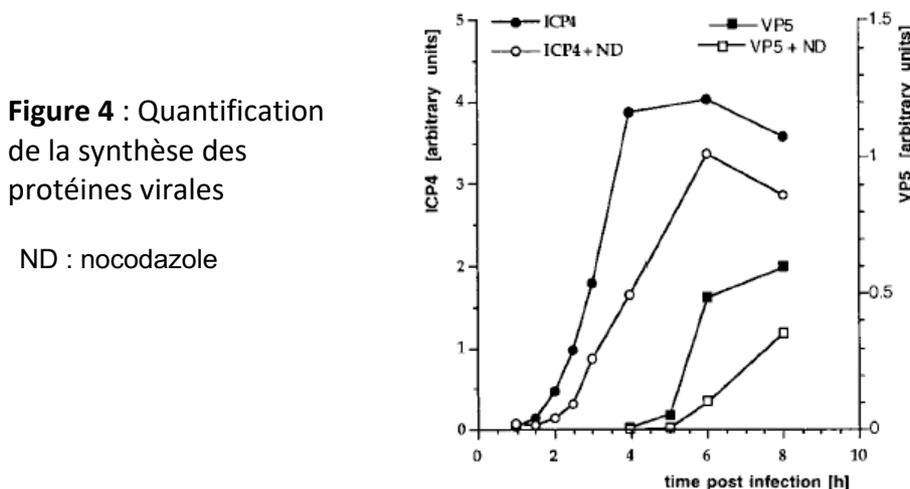
Question 3 : Analyser l'effet du nocodazole sur la distribution de la capsid. Quelle conclusion pouvez-vous faire ?



Le virus de l'Herpès synthétise des protéines précoces et des protéines tardives.

Question 4 : Définissez les notions de protéine précoce et protéine tardive.

La synthèse des protéines précoces et tardives du virus de l'Herpès est analysée à différents temps après infection et en présence ou absence de traitement au nocodazole. Pour cela, les protéines sont extraites des cellules et la présence des protéines virales précoces (ICP4) et tardives (VP5) est mesurée à l'aide d'anticorps spécifiques dirigés contre ces protéines (Figure 4).



Question 5 : Décrivez et interprétez les résultats présentés dans la figure 4. Qu'en concluez-vous ?

TD de virologie N°4

Echappement au système immunitaire

Virus de l'Herpes et stratégies d'échappements – Ex. du virus de Kaposi

1^{ère} partie : Exposé oral

Sujet : Obtention d'un virus recombinant fluorescent.

A partir des documents fournis sur Ecampus, ou tout autre document que vous jugerez utile ou pertinent, vous expliquerez comment obtenir un virus recombinant exprimant une protéine fluorescente et présenterez l'intérêt d'un tel outil.

Vous disposez de 15 minutes pour traiter le sujet en vous appuyant sur un support projeté (format power point ou pdf).

EXERCICE

D'après :

Haque, et al Major histocompatibility complex class I molecules are down-regulated at the cell surface by the K5 protein encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus-8 J Gen Virol 2001

Coscoy, L., Sanchez, D.J., and Ganem, D. (2001). A novel class of herpesvirus-encoded membrane-bound E3 ubiquitin ligases regulates endocytosis of proteins involved in immune recognition. J Cell Biol 155, 1265–1274.

Hewitt, E.W., Duncan, L., Mufti, D., Baker, J., Stevenson, P.G., and Lehner, P.J. (2002). Ubiquitylation of MHC class I by the K3 viral protein signals internalization and TSG101-dependent degradation. The EMBO Journal 21, 2418–2429.

Pré-requis :

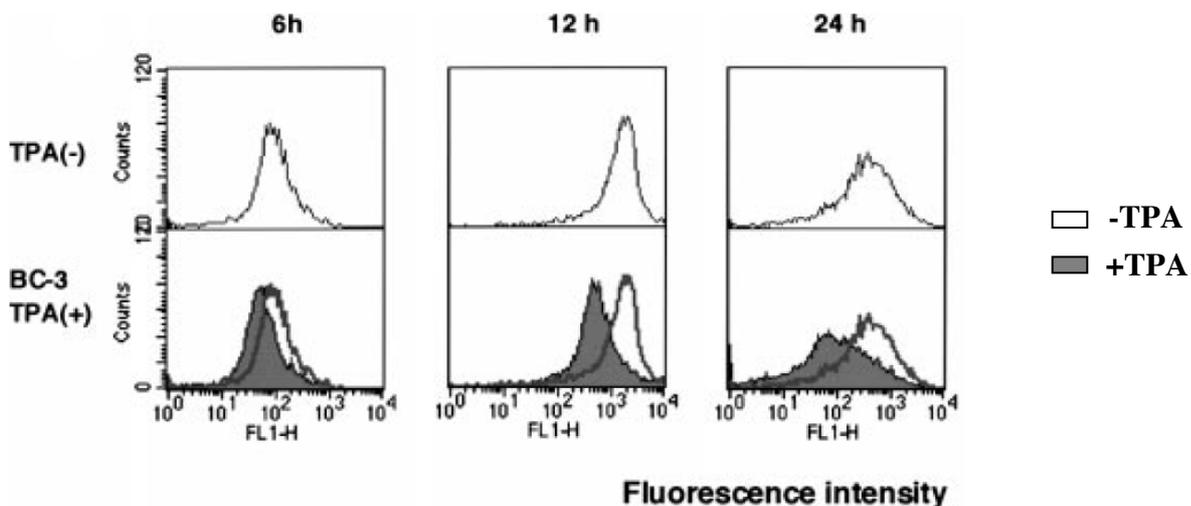
- *Fonctions des molécules du CMH-I*
- *Mécanismes d'apprêtement et de présentation des antigènes par les molécules du CMH-I*
- *Mécanismes de biosynthèse et expression des protéines membranaires*
- *Modifications post-traductionnelles (en particulier : glycosylation, ubiquitination)*

Le virus de Kaposi (KSHV), autrement appelé HHV-8 (Human Herpesvirus 8), est un virus lymphotrope de la famille des herpes gamma qui est très répandu au sein de la population humaine (séroprévalence entre 10 % -Europe, Amériques, Asie- et 50% -Afrique) et à l'origine de diverses pathologies y compris le sarcome de Kaposi, un cancer très fréquent chez les individus immunodéprimés (VIH+, greffés).

Des chercheurs ont essayé de comprendre comment le KSHV peut établir une infection persistante et asymptomatique dans la majorité des porteurs en dépit d'une réponse immunitaire efficace. Ils ont utilisé comme modèle les cellules de la lignée BC-3 (Body cavity based-lymphoma

cell line 3) qui contiennent le virus sous forme latente. Lorsque des agents inducteurs comme le butyrate de sodium ou le 12-O-tétradécanoylphorbol 13-acétate (TPA) sont ajoutés sur ces cellules, le virus est réactivé et provoque la lyse cellulaire au bout de 48h. Dans l'expérience de la figure 1, les cellules BC-3 exposées au TPA (+) pendant des temps différents ont été fixées, marquées avec des anticorps monoclonaux dirigés contre les molécules de CMH de classe I (CMH-I) et couplés à un fluorochrome (FITC), puis analysée par cytométrie en flux. Des cellules non traitées (-TPA) ont été étudiées en parallèle.

Figure 1



Question 1 :

- a. Pourquoi les chercheurs ont-ils choisi de suivre l'expression des CMH-I ?
- b. Expliquez l'expérience et analysez le résultat.
- c. Proposez différents mécanismes d'action expliquant ce résultat.

L'expérience suivante permet d'éliminer certaines de ces hypothèses. Les auteurs ont placé les cellules BC-3, traitées ou non au TPA, dans un milieu contenant de la méthionine radioactive (« pulse » de 15 min). Ce marquage est suivi d'une chasse (« chase ») d'une durée variable (30 ou 120 min). Des extraits protéiques sont réalisés puis immunoprécipités par un anticorps reconnaissant les molécules du CMH-I et digérés ou non par l'endoglycosidase H (endoH). Les extraits sont ensuite déposés sur un gel SDS-PAGE puis une autoradiographie est réalisée (figure 2).

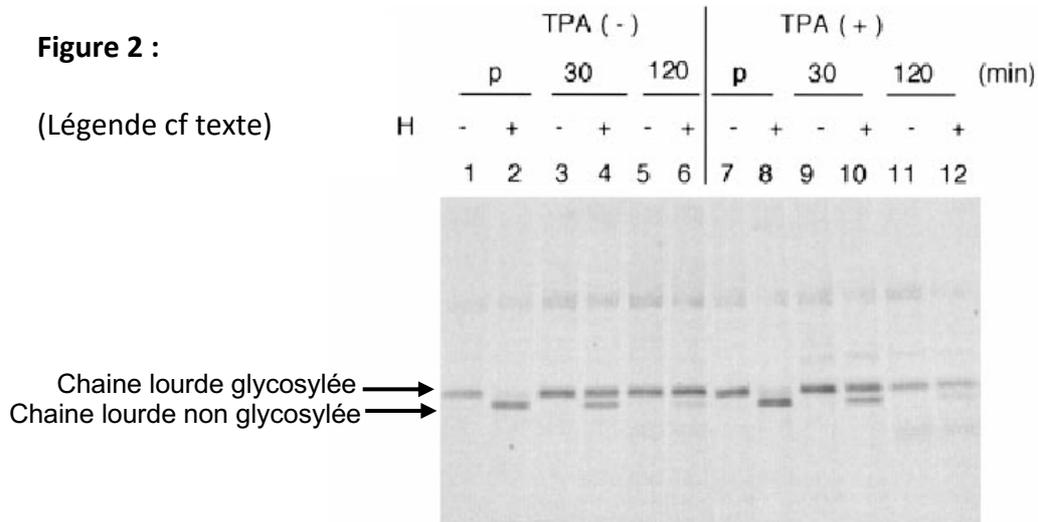
Rq : L'endo H est une enzyme couramment utilisée pour suivre le transport des glycoprotéines du RE dans l'appareil de Golgi. En effet, cette enzyme clive spécifiquement les N-Glycosylations immatures retrouvées dans le RE ou le cis-Golgi. Les glycosylations maturées (plus complexes) qui se forment dans le trans-Golgi sont résistantes à l'action de l'EndoH.

Question 2 :

- a. Expliquez l'intérêt de l'expérience et de l'utilisation de l'endoH,
- b. Commentez les résultats obtenus. Quelle(s) hypothèse(s) retenez-vous ?

Figure 2 :

(Légende cf texte)



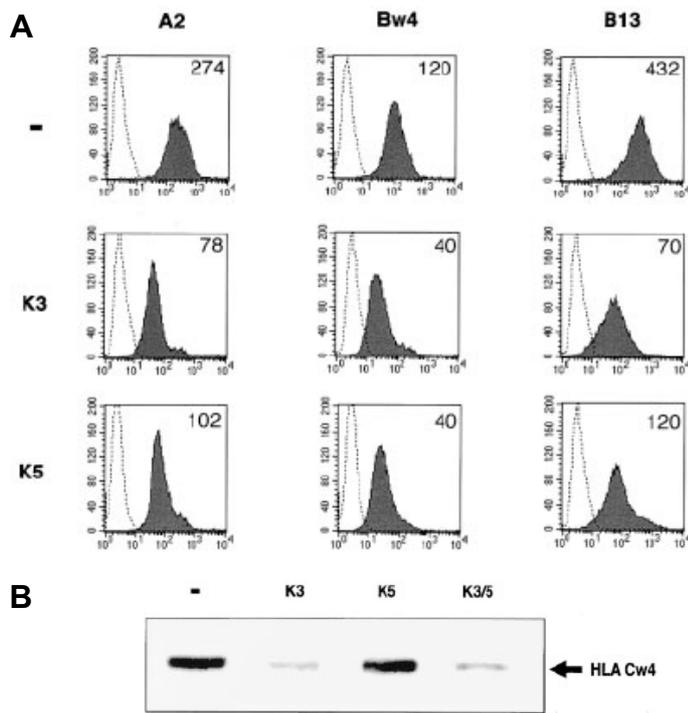
Pour expliquer cette observation, les chercheurs ont proposé comme hypothèse que les protéines K3 et K5 soient impliquées. Ces protéines sont transmembranaires et exprimées précocement lors de l'infection.

Question 3 : Justifiez ce choix.

Dans la suite des expériences, les auteurs utilisent des lignées lymphocytaires parentales BJAB (-) ou BJAB exprimant stablement les protéines virales K3 (BJAB-K3) ou K5 (BJAB-K3). L'expression des HLA A2, Bw4 et B13 à la surface de ces cellules est analysée par immunofluorescence et cytométrie de flux (figure 3A). En parallèle, l'expression des HLA Cw4 est analysée en Western Blot (figure 3B).

Figure 3 : Analyse des cellules BJAB (-), BJAB-K3 et BJAB-K5

A. Les cellules ont été marquées avec des anticorps dirigés contre les molécules HLA A2, B13 ou Bw14 (histogrammes pleins) ou un anticorps contrôle (histogrammes en pointillés) et couplés à un fluorochrome. Après marquage, les cellules ont été analysées par cytométrie de flux. Le chiffre en haut à droite indique l'intensité moyenne de fluorescence.



B. Les cellules ont été lysées et les protéines totales (équivalent 10^5 cellules) ont été séparées par SDS-PAGE. Après transfert sur une membrane de nitrocellulose, l'expression des protéines HLA Cw4 a été analysée par western blot.

Question 4 :

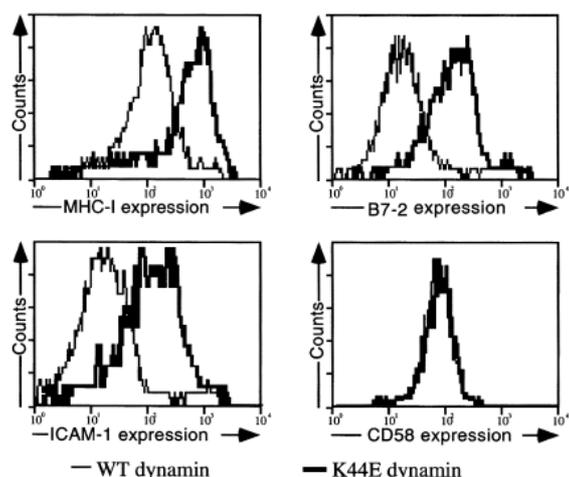
- Que permettent de conclure ces deux expériences ?
- Quelle pourrait être la conséquence de cette modulation des CMH-I sur l'activité des lymphocytes T cytotoxiques ?
- Cet effet pourrait-il être différent sur d'autres cellules du système immunitaire ?

Pour comprendre les mécanismes qui permettent à ces deux protéines virales de diminuer l'expression des molécules du CMH-I, différentes expériences ont été entreprises.

Premièrement, l'expression de surface des molécules CMH-I, ICAM-1, B7-2 et CD58 (intégrine) a été mesurée dans les lignées BJAB-K5 qui co-expriment la dynamine WT (sauvage) ou la forme mutante K44E (mutant dominant négatif de la dynamine dont l'expression abolit l'endocytose).

Question 5 : Décrivez puis analysez les résultats de la figure 4. Qu'en concluez-vous ?

Figure 4 : Les cellules BJAB-K5 exprimant la dynamine WT (sauvage) ou mutante K44E ont été analysées par immunofluorescence et cytométrie de flux à l'aide d'anticorps dirigés contre les molécules CMH-I (= MHC-I), B7-2, ICAM-1 ou CD58.

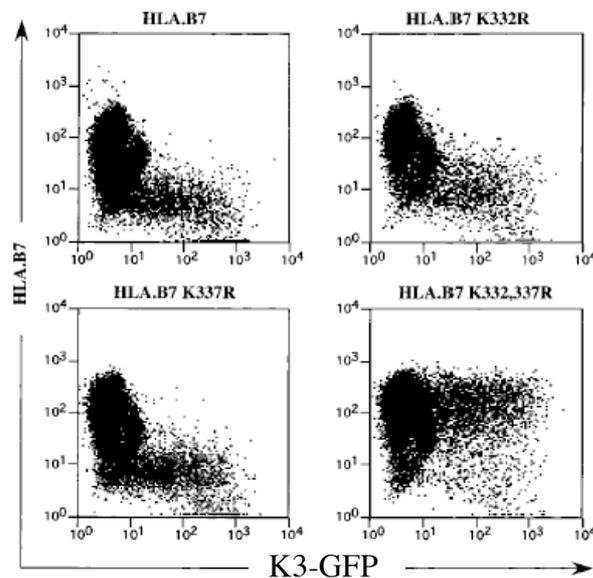


Deuxièmement, pour caractériser le mécanisme d'action de la protéine virale K3 sur l'expression des protéines HLA (CMH-I), des mutants ponctuels de la protéine HLA-B7 ont été construits : La lysine 332 et/ou la lysine 337 dans la région cytoplasmique de HLA-B7 ont été mutées en arginine. Les constructions résultantes ont été exprimées de façon stable dans les cellules BJAB exprimant K3-GFP (K3 fusionnée à la protéine fluorescentes GFP). L'expression de la protéine GFP-K3 et des différentes molécules HLA-B7 a été analysée par immunofluorescence et cytométrie de flux (figure 5).

Question 6 : *Décrivez et analysez les résultats de la figure 5.*

Figure 5

(Légende, cf texte ci-dessus)



Question 7 : *Quel type de modification(s) post-traductionnelle(s) peut être observé au niveau des résidus lysine ? Précisez-leur(s) rôle(s) biologique(s).*

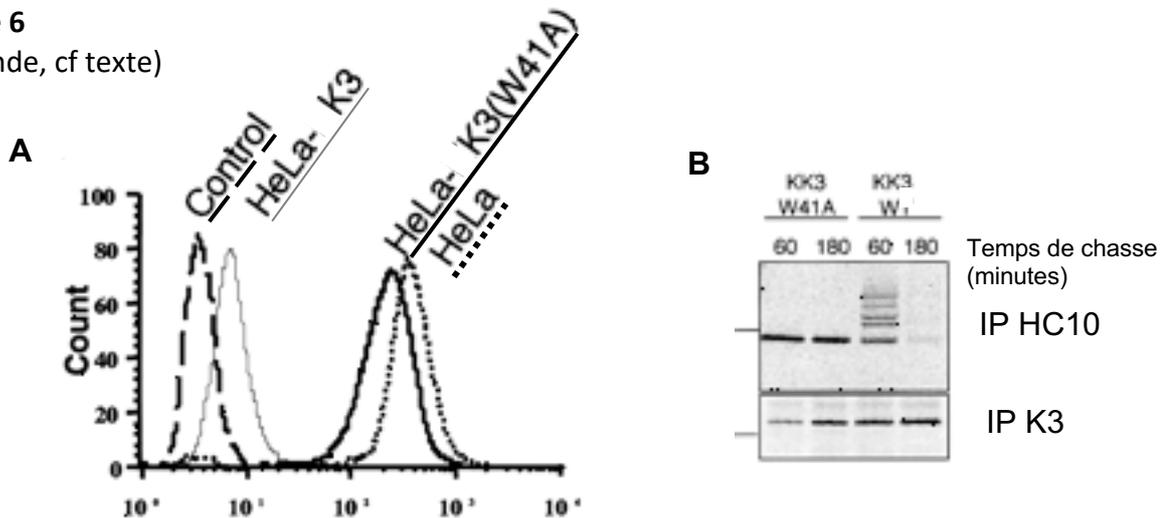
Les chercheurs ont aussi étudié le comportement de la protéine virale K3 contenant la mutation W41A au niveau du domaine cytoplasmique. L'expression des CMH-I à la surface des cellules HeLa, HeLa-K3 (WT) et HeLa-K3 W41A a été analysée par immunofluorescence et cytométrie de flux (figure 6A). En parallèle, (figure 6B), les cellules sont cultivées dans un milieu contenant de la méthionine radioactive (5 min, pulse) puis placées dans un milieu non marqué pendant 60 ou 180 min (chasse) avant d'être lysées. Les protéines sont immunoprécipitées par un anticorps reconnaissant la protéine K3. Après élution, une deuxième immunoprécipitation est réalisée avec un anticorps reconnaissant soit la protéine K3 (IP K3), soit les protéines du CMH-I (IP HC10). Les protéines immunoprécipitées ont été analysées par SDS-PAGE suivi d'autoradiographie.

Question 8 : Décrivez et analysez les résultats de la figure 5.

Formulez une hypothèse quant au mécanisme de modulation de l'expression de surface des CMH-I induit par les protéines virales K3

Figure 6

(Légende, cf texte)



Une dernière expérience consiste à examiner l'effet de l'abolition de l'expression de la protéine cellulaire TSG101 sur l'activité de K3. TSG101 est une protéine impliquée dans la reconnaissance des protéines ubiquitinées au niveau des endosomes tardifs (signal d'adressage aux lysosomes). L'abolition de son expression est réalisée par la technique d'interférence à l'ARN et vérifiée par western-blot (figure 7A). La quantité de CMH-I à la surface de ces cellules est alors analysée par immunofluorescence et cytométrie en flux (figure 7B : Les cellules ont été marquées avec un anticorps anti-CMH-I couplé à un fluorochrome puis analysées par cytométrie en flux (figure 7B). Les cellules HeLa marquées avec un anticorps (contrôle isotype) ont été utilisées comme contrôle.

Question 9 :

- Analysez les résultats présentés dans la figure 7 (A et B).
- A l'aide d'un schéma, expliquez le mode d'action de la protéine K3 sur l'expression des molécules de CMH-I.

Figure 7 (Légende, cf texte)

