

Licence Sciences de la Vie

**UE : Immunologie-Virologie
Année Universitaire 2023-2024, session 1**

Date de l'épreuve : 29 avril 2024

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 d'Immunologie proposé par Pierre Bobé (durée 1 h)

Question 1 (5 points)

Les cellules dendritiques (DC) jouent un rôle essentiel dans l'immunité adaptative. Au sein des tissus de l'organisme où elles résident, les DC présentent un phénotype immature et exercent des fonctions de sentinelles. Après avoir rappelé le rôle des DC matures dans l'activation de l'immunité adaptative, vous décrierez les principales étapes conduisant à la maturation des DC immatures en n'oubliant pas de préciser le rôle des récepteurs de l'immunité innée et des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité dans ce processus de maturation.

Exercice 1 (8 points)

Des cellules spléniques (DC) ont été traitées à 37°C avec le composé bactérien LPS (lipopolysaccharide). Les DC ont ensuite été marquées avec des anticorps monoclonaux dirigés contre les protéines membranaires CD3, CD11c, B7 et CD28. Les anticorps sont couplés à des fluorochromes différents afin de permettre une analyse par cytométrie en flux. Les résultats obtenus sont présentés Figure 1. CD3 est associé aux chaînes α et β du TCR (*T-cell receptor*) alors que CD11c est un marqueur des DC.

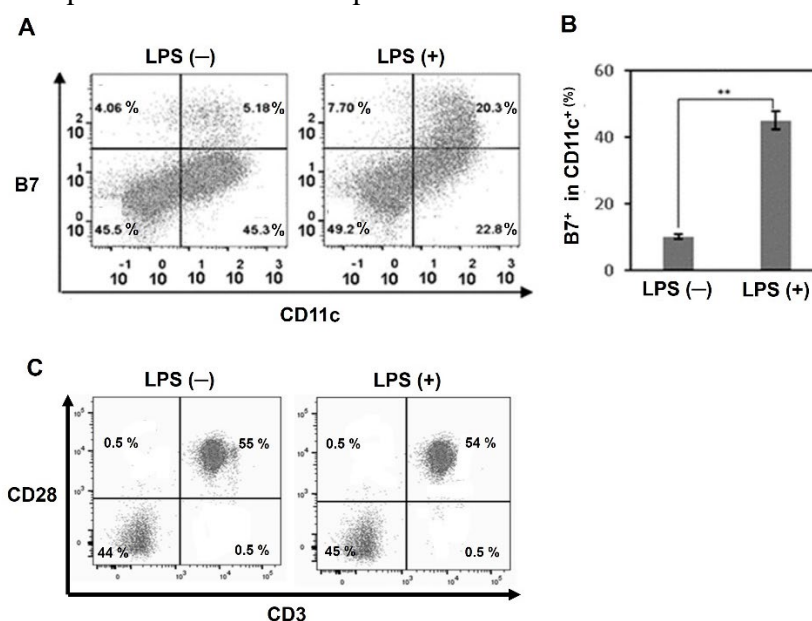


Figure 1. (A) Analyse par cytométrie en flux du pourcentage de cellules exprimant les molécules B7 en présence ou en absence de LPS. (B) Les histogrammes représentent la moyenne $\pm$ SD des pourcentages de cellules B7⁺ parmi les cellules CD11c⁺ obtenus lors de plusieurs expériences indépendantes. (C) Analyse par cytométrie en flux du pourcentage de lymphocytes T exprimant les molécules CD28 en présence ou en absence de LPS. LPS (-) : cellules dendritiques non traitées par du LPS ; LPS (+) : cellules dendritiques traitées par du LPS. ****P < 0,01.**

Question 2 (4 points). Analyser l'ensemble des résultats présentés figure 1.

Question 3 (4 points). En vous basant sur l'analyse des résultats de la figure 1 ainsi que sur vos connaissances, vous décrierez le rôle des molécules CD28 et de B7 dans l'activation des lymphocytes T. La notion de signal 1 et de signal 2 est attendue dans votre réponse. Vous pouvez vous aider de schémas pour répondre à cette question.

Exercice 2 (7 points)

Des mutations du gène codant pour la protéine de membrane CTLA4 altèrent gravement la régulation normale du système immunitaire entraînant une hypertrophie de la rate (splénomégalie) et des ganglions lymphatiques (adénopathies) et des maladies auto-immunes. Afin de comprendre le rôle de CTLA4 dans la régulation de la réponse immunitaire, des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) d'un individu normal ont été stimulées *in vitro* par un antigène puis le taux d'expression des molécules CTLA4 a été analysé par western blot (Figures 2A et 2B). Des PBMC stimulés ont également été marquées avec des anticorps monoclonaux fluorescents dirigés contre les molécules CD3 et CTLA4 et analysées par cytométrie en flux (Figures 2C et 2D). Dans une autre expérience, des PBMC ont été stimulées *in vitro* par des anticorps agonistes de CD3 et de CD28 en présence de concentrations croissantes de protéine CTLA4 recombinante et les taux d'IL-2 dans les surnageants de culture ont été analysés par ELISA sandwich (Figure 2E).

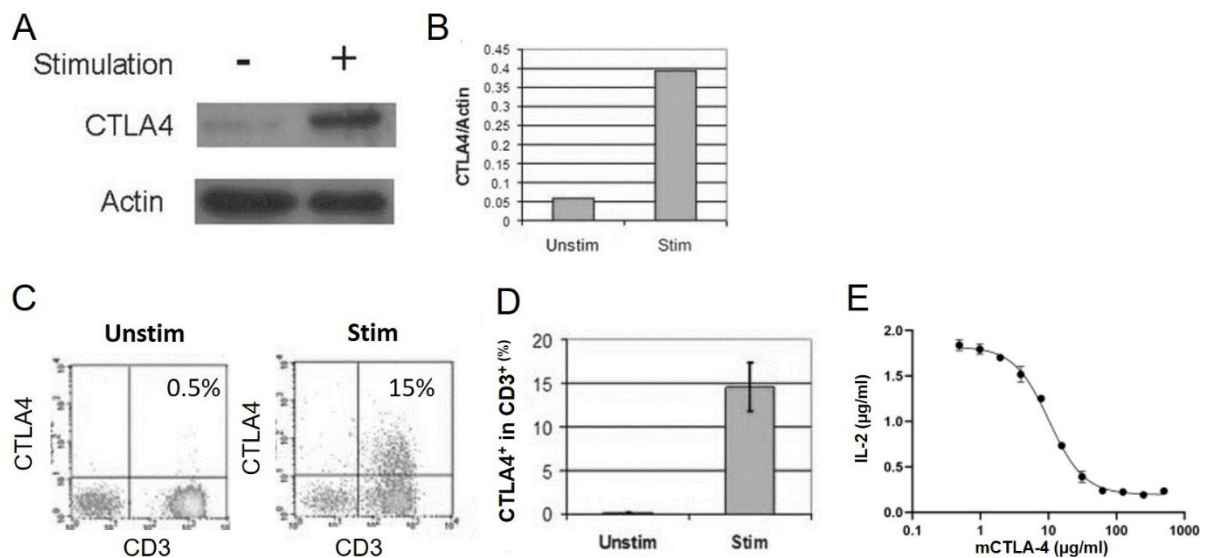


Figure 2. (A) Analyse par western blot du taux d'expression de la protéine CTLA4 dans des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) après (Stim) ou sans (Unstim) stimulation par un antigène. (B) Mesure densitométrique de l'intensité du signal de CTLA4 présenté en (A) à l'aide du logiciel ImageJ. Les niveaux d'expression de CTLA4 sont normalisés par ceux de l'actine. (C) Analyse par cytométrie en flux de l'expression des protéines CTLA4 dans des PBMC après (Stim) ou sans (Unstim) stimulation par un antigène et marquage avec des anticorps monoclonaux fluorescents anti-CD3 et anti-CTLA4. (D) Les histogrammes représentent la moyenne $\pm$ SD du pourcentage de PBMC CTLA4⁺ parmi les PBMC CD3⁺ issus de 12 individus normaux. (E) Des PBMC ont été stimulés par des anticorps agonistes de CD3 et de CD28 en présence de concentrations croissantes de protéine CTLA4 recombinante (mCTLA-4) et les taux d'IL-2 dans les surnageants de culture ont été quantifiés par ELISA sandwich.

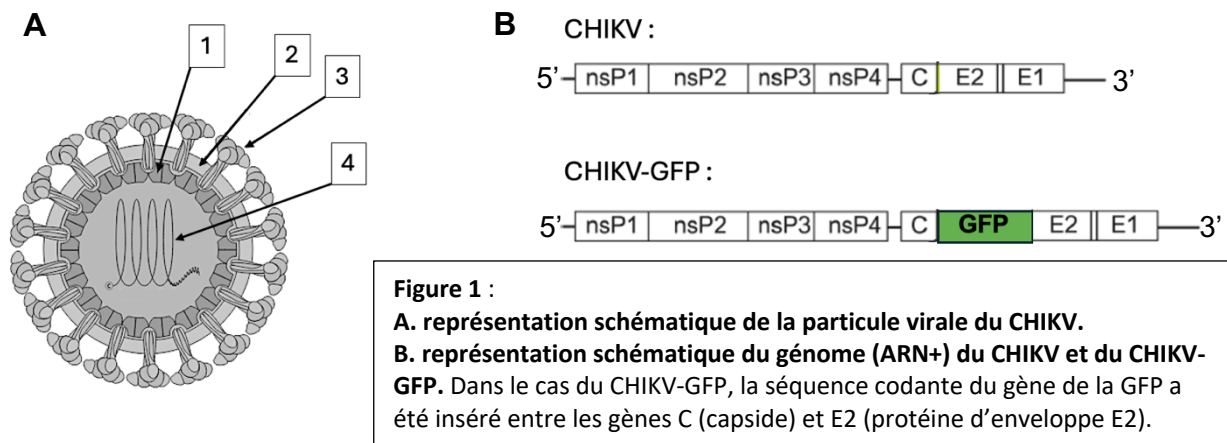
Question 4 (3 points). Analyser l'ensemble des résultats présentés figure 2.

Question 5 (4 points). En vous basant sur l'analyse des résultats de la figure 2 ainsi que sur vos connaissances, vous décrirez le rôle joué par les molécules CTLA4 lors de l'activation des lymphocytes T. Vous pouvez vous aider de schémas pour répondre à cette question.

Sujet de virologie proposé par C. LAGAUDRIERE (Durée 1 heure)

Toutes vos réponses doivent être justifiées

Le virus du chikungunya (CHIKV) appartient à la famille des *Togaviridae* (classe IV de la classification de Baltimore). Il s'agit d'un virus enveloppé à ARN simple brin positif. Le génome code pour des protéines non structurales (nsP1 à 4) qui constituent le complexe « Réplicase » et 3 protéines structurales (la protéine de capsid C et les protéines d'enveloppe E1 et E2 associées sous forme de trimères à la surface du virion). Ces protéines sont synthétisées sous forme de 2 précurseurs polyprotéiques (polyprotéines nsP1234 et pC/E2/E1).



Question 1 (2 points). **Sur votre copie, indiquez à quoi correspondent les structures désignées par les flèches 1 à 4 sur le schéma présenté dans la figure 1A.**

Le cycle viral débute par une endocytose suivie de la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de l'endosome. Le génome est alors libéré dans le cytoplasme.

Question 2 (5 points). **Présentez, à l'aide d'un schéma légendé, les étapes de réplication et expression du génome de ce type de virus. Vous prendrez soin de préciser la chronologie de ces étapes.**

Le CHIKV provoque chez les patients des douleurs articulaires aiguës qui peuvent être persistantes. Les études réalisées dans des modèles murins ont montré que les lymphocytes CD8+ ne permettent pas de contrôler efficacement l'infection au niveau des articulations. Afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans cette persistance, les auteurs ont examiné la présentation des antigènes par les molécules de complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) dans le contexte de l'infection virale.

Pour mémoire, les molécules du CMH-I sont constituées d'une chaîne lourde associée à une chaîne légère (la β 2-microglobuline ou β 2m). Dans leur forme mature, exprimée à la surface des cellules, elles sont chargées en peptides.

Question 3 (2 points). **Expliquez brièvement quelle est la fonction des molécules du CMH-I.**

Pour cette étude les chercheurs ont utilisé des cultures de cellules primaires d'origine murine dérivées de tissus prélevés au niveau de la cheville. Les infections ont été réalisées avec un virus CHIKV recombinant (nommé CHIKV-GFP) dont le génome a été modifié en introduisant le gène codant pour la GFP (Green Fluorescent Protein ; cf figure 1B).

Question 4 (2 points). **D'après les informations fournies sur le CHIKV en introduction, expliquez en quoi le modèle cellulaire choisi est pertinent (adapté) dans le contexte de cette étude ?**

Dans une première expérience, les chercheurs ont mesuré la quantité de molécules de CMH-I exprimées à la surface de cellules infectées ou non avec le CHIKV-GFP (résultats présentés en figure 2).

Question 5 (3 points). **Indiquez à quoi correspondent les cellules positives pour le marquage GFP (cellules GFP^{pos}). Analysez les résultats de la figure 2 et concluez.**

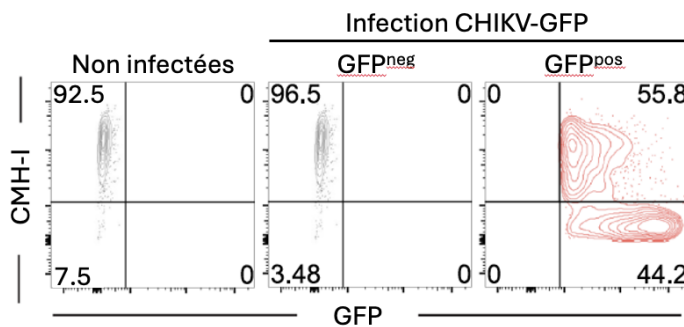


Figure 2 : Les cellules ont été infectées ou non avec le CHIKV-GFP (MOI 1). A 24h post-infection, les cellules ont été marquées à l'aide d'un anticorps anti-CMH-I couplé à un fluorophore. Les intensités de fluorescence ont été analysées par cytométrie en flux. En abscisse : intensité de fluorescence GFP ; En ordonnée : intensité de fluorescence du marquage anti-CMH-I. Pour les cellules infectées, les résultats obtenus pour les cellules GFP négatives (neg) et GFP positives (pos) sont présentés sur des graphes indépendants. Les chiffres indiquent le pourcentage de cellules comptabilisées dans le cadran correspondant.

Par une technique non décrite ici, les chercheurs ont ensuite quantifié les molécules du CMH-I chargées en peptide à la surface de cellules exprimant la protéine virale nsP2 ou une forme mutante de nsP2. Les résultats sont présentés dans la figure 3.

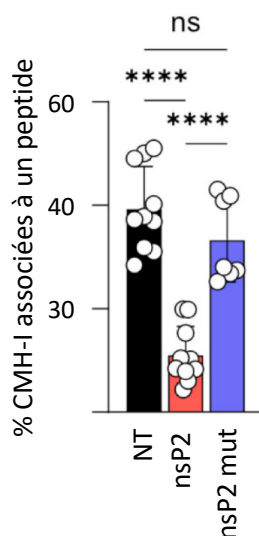


Figure 3 : Les cellules ont été transfectées ou non avec un plasmide permettant l'expression de la protéine virale nsP2 sauvage (nsP2) ou mutante (nsP2 mut). A 24h post-infection. Le pourcentage de CMH-I matures (CMH-I associées à un peptide) exprimées à la surface cellulaire a été mesuré. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du test *t* de Student (ns : non significatif ; ****, $P < 0,0001$). Les barres d'erreur correspondent aux déviations standard.

Question 6 (3 points). **Analysez les résultats de la figure 3 et concluez en précisant l'effet de la protéine nsP2 sur la maturation des CMH-I.**

Par la suite, les auteurs ont montré que la concentration intracellulaire de CMH-I est identique dans les trois types cellulaires : cellules non transfectées, cellules transfectées avec un plasmide d'expression nsP2 sauvage ou nsP2 mutante.

Question 7 (3 points). **En tenant compte de cette dernière donnée, proposez différents mécanismes d'action permettant d'expliquer l'effet de nsP2 sur les molécules du CMH-I. (Vous pouvez formuler votre réponse sous forme d'un schéma légendé).**