

# Thème 3-A TP2 : des anticorps contre le virus de la grippe...

Comment le virus de la grippe est-il neutralisé?

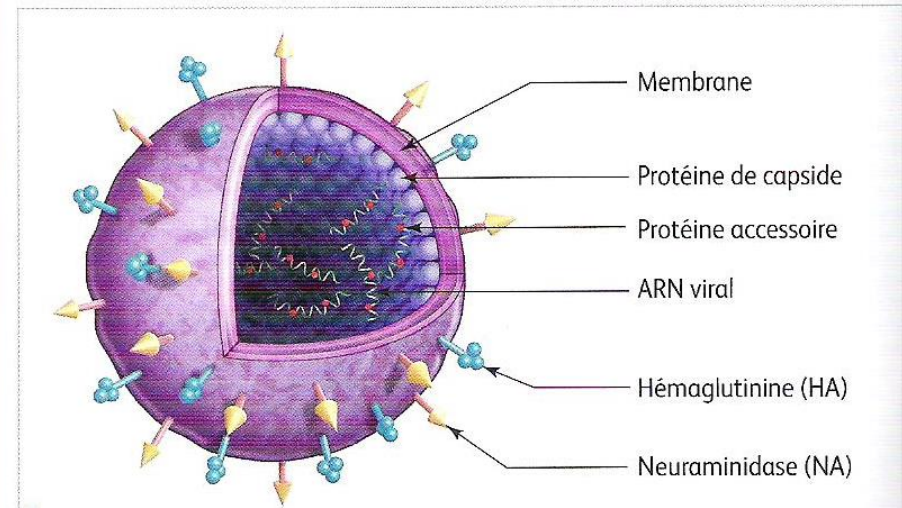


- Les épidémies de grippe surviennent chaque année, au cours de l'automne et de l'hiver, dans les régions tempérées. La grippe causée par un virus, se caractérise principalement par **l'apparition brutale d'une forte fièvre, de maux de tête et de douleurs musculaires et articulaires**. La plupart des malades **guérissent en une semaine sans** avoir besoin de **traitement médical**, signe que l'organisme a mis en route des mécanismes de défense efficaces.
- Célestine souffre d'une forte fièvre (39°C), de douleurs de type courbatures. Le médecin lui diagnostique une grippe et comme unique traitement lui préconise une semaine de repos. Elle appelle son amie Juliette, car elle ne comprend pas comment ses mastocytes, cellules dendritiques et autres granulocytes vont pouvoir venir à bout du virus grippal. Juliette rassure Célestine, en lui proposant de mener l'enquête sur le mode d'action de son système immunitaire dans le cas d'une infection grippale.
- Par une démarche d'investigation, aidez Juliette à rassurer Célestine sur l'efficacité de son système immunitaire.

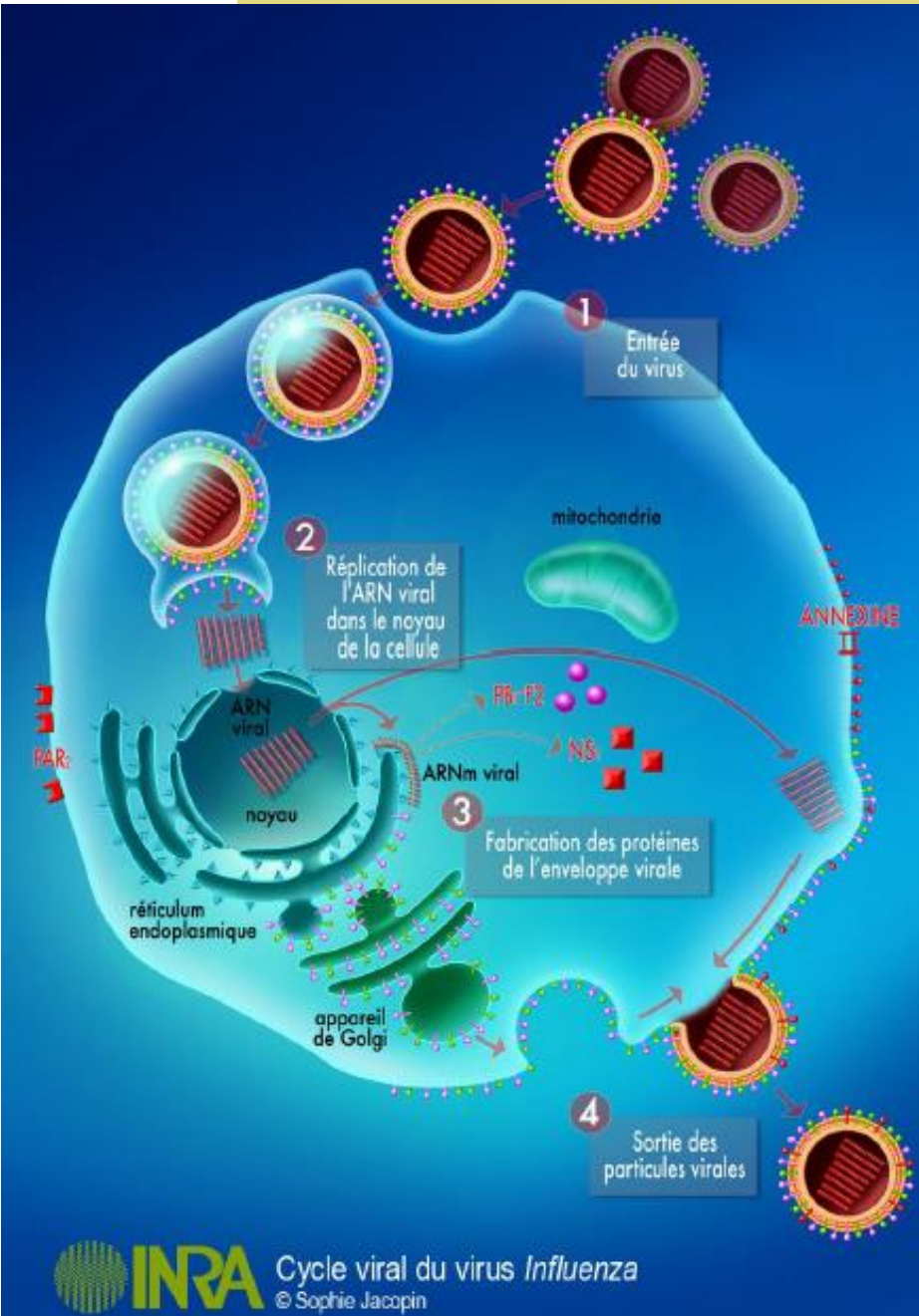
# Document 1 : le virus de la grippe

La grippe se caractérise par un brutal accès de fièvre, de la toux et des courbatures causés par l'infection de certaines cellules pulmonaires par le virus de la grippe. Ce virus, très contagieux, peut se transmettre à une personne saine par l'intermédiaire de petites gouttelettes d'eau que notre corps expulse lors d'un éternuement ou d'une toux.

Ce virus est une particule de 80 à 100 nm de diamètre délimitée par une membrane à l'intérieur de laquelle sont enchâssées de nombreuses protéines nécessaires à la fixation et à la pénétration dans les cellules cibles (hémagglutinine HA et neuraminidase NA). Au centre de la particule se trouvent huit molécules d'ARN simple brin protégées par une structure protéique appelée capsid. Chacun des ARN est accompagné de nombreuses protéines accessoires dont des réplisases qui servent à copier l'ARN viral en plusieurs exemplaires dans la cellule infectée.

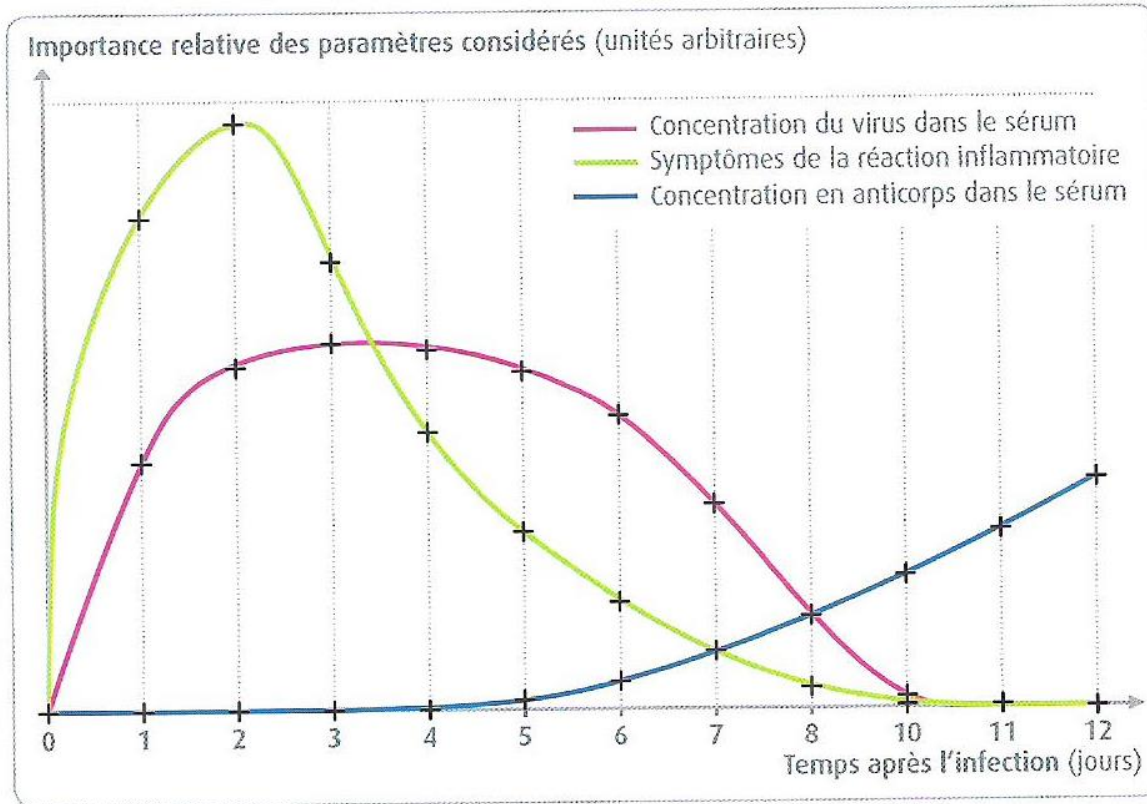


Les cellules hôtes du virus de la grippe sont essentiellement les cellules respiratoires



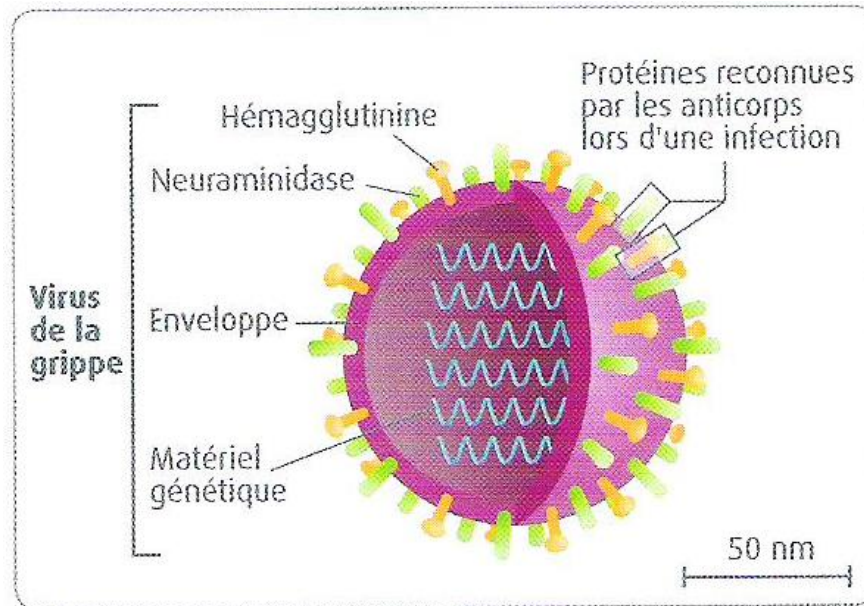
[http://www.inra.fr/la\\_sciences\\_et\\_vous/dossiers\\_scientifiques/maladies\\_emergentes/grippes\\_aviaires\\_et\\_animales\\_\\_1/le\\_virus\\_et\\_le\\_cycle\\_viral](http://www.inra.fr/la_sciences_et_vous/dossiers_scientifiques/maladies_emergentes/grippes_aviaires_et_animales__1/le_virus_et_le_cycle_viral)

# Document 2 : des modifications du sérum\*



**1** Suivi de quelques paramètres physiologiques au cours des 12 jours suivant une infection grippale. La grippe est une infection virale associée à une réaction inflammatoire au niveau de la muqueuse nasale et de la gorge. Hormis la fièvre, ses principaux symptômes sont un écoulement nasal abondant, des maux de gorge, des migraines, des nausées et des douleurs articulaires.

# Document 3 : les cibles des anticorps



**3** Les cibles des anticorps produits lors d'une infection grippale. Une grande partie des anticorps produits lors d'une réponse adaptative anti-grippe se fixent sur les protéines de l'enveloppe virale, en particulier sur l'hémagglutinine. Aucune protéine de ce type n'est produite par les cellules de l'organisme infecté. Les molécules qui déclenchent une réponse immunitaire adaptative sont qualifiées d'antigènes.

# Résultat de la détection de l'HCG par des anticorps anti-HCG



Goutte d'urine + Ac anti-HCG fixés à des billes de latex



Absence d'agglutination  
=> l'urine ne contient pas d'HCG

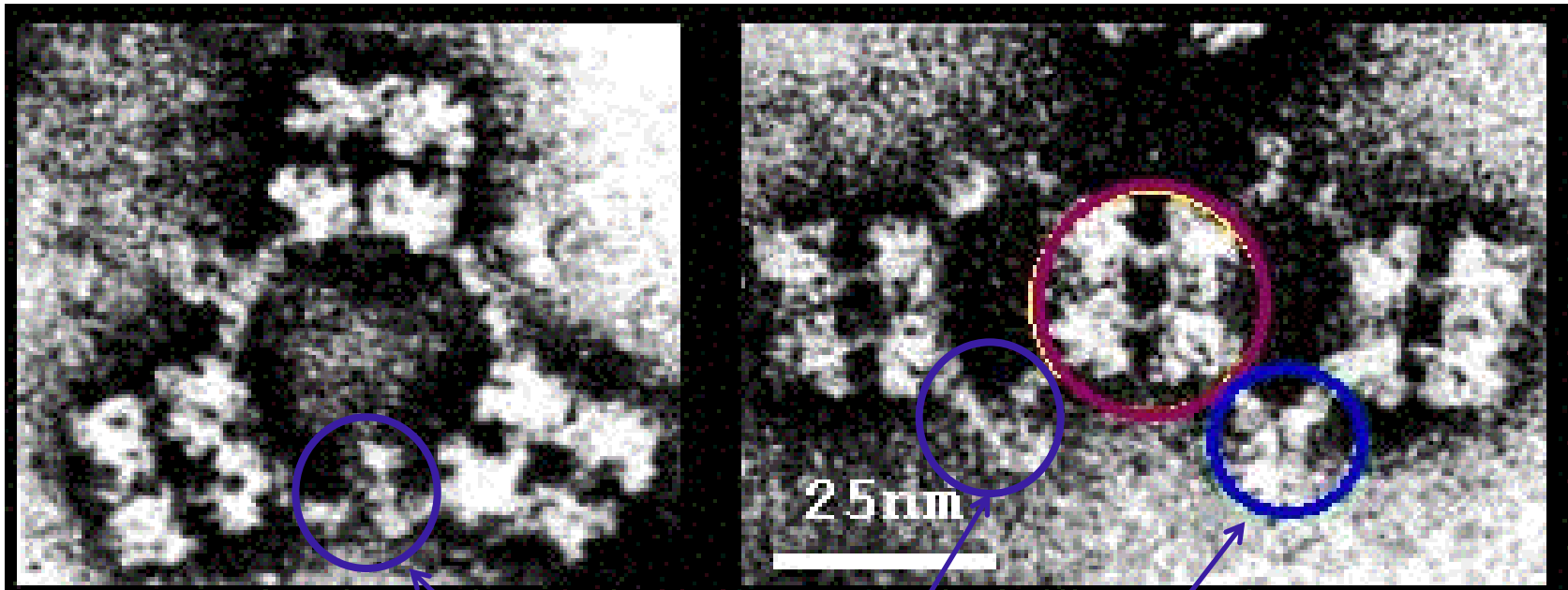
Goutte d'urine + Ac anti-HCG fixés à des billes de latex



Mise en évidence d'une agglutination  
=> l'urine contient de l'HCG

- L'action des anticorps

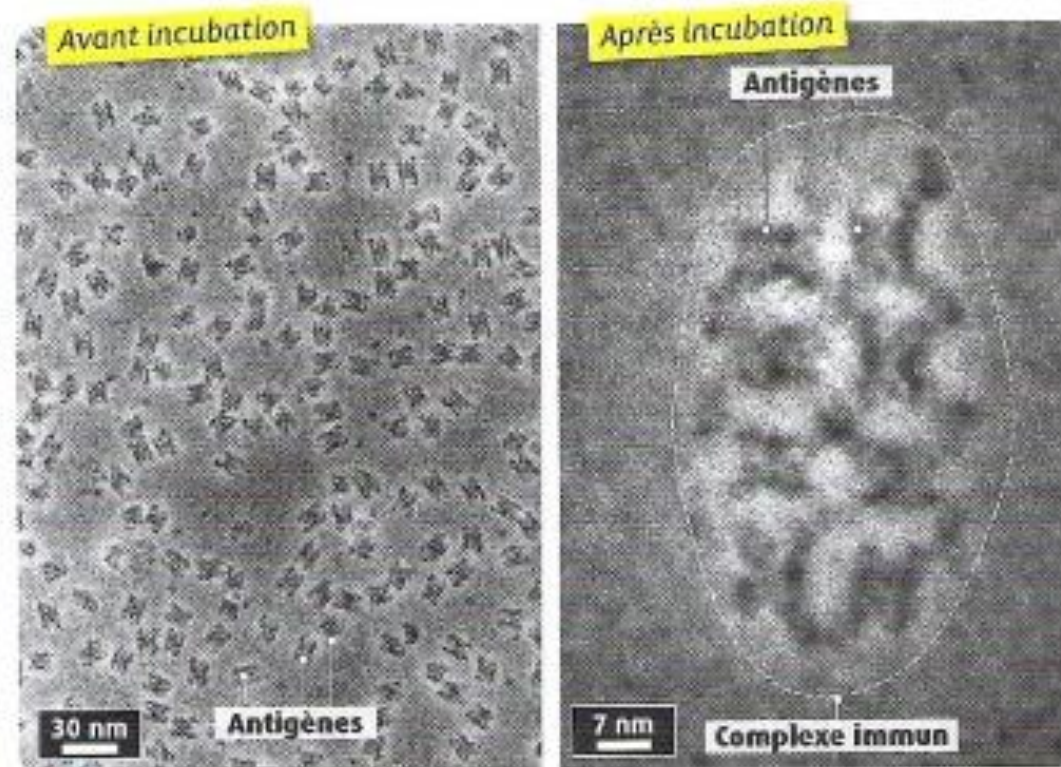
Photographie au microscope électronique à transmission  
d'anticorps fixés à leurs antigènes



Les anticorps semblent être plastiques (~flexibles)

↪ Mise en évidence d'un contact moléculaire donc d'une reconnaissance entre deux molécules.

# Mise en évidence d'une agglutination des antigènes en présence d'anticorps



**4** Des molécules d'antigène avant et après incubation avec un anticorps (clichés au MET). Cet anticorps se fixe sur l'antigène étudié. On observe que l'anticorps agglutine les molécules d'antigène. La structure ainsi formée est qualifiée de complexe immun.

# Mise en évidence de la spécificité des anticorps par l'étude du test d'Ouchterlony



**Matériel**



**Préparation des puits**

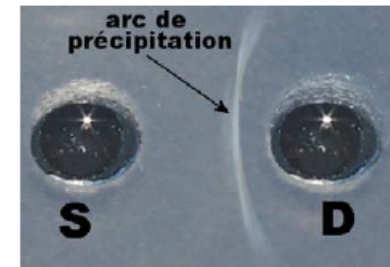
# Extrait d'une ECE

## Principe de la méthode d'Ouchterlony

C'est une méthode d'immunodiffusion sur gel : les solutions déposées dans les puits creusés dans le gel diffusent de façon homogène dans toutes les directions autour du puits. Deux auréoles de diffusion peuvent donc entrer en contact lorsqu'elles ont suffisamment progressé. Cette zone de contact reste invisible s'il n'y a pas de réaction entre les deux solutions. Quand il y a réaction entre les solutions, il se forme un arc de précipitation visible à l'œil nu. Celui-ci est dû à l'interaction entre de nombreux anticorps et les antigènes spécifiques, entraînant la formation de complexes immuns.

Le temps de réaction est de l'ordre de 24h : c'est la raison pour laquelle, après avoir réalisé le protocole avec des produits réels, vous disposerez, pour lire les résultats, d'une boîte préparée à l'avance. Ce temps de réaction est considérablement réduit avec les produits de substitution : c'est la raison pour laquelle, si vous avez utilisé des produits de substitution, vous pourrez lire vos résultats pendant la séance.

Exemple d'arc de précipitation obtenu entre un sérum S et une solution d'antigène D



## PROTOCOLE

**La manipulation des produits biologiques utilisés dans ce protocole nécessite le port de gants et de lunettes**

### I- Préparation de la boîte

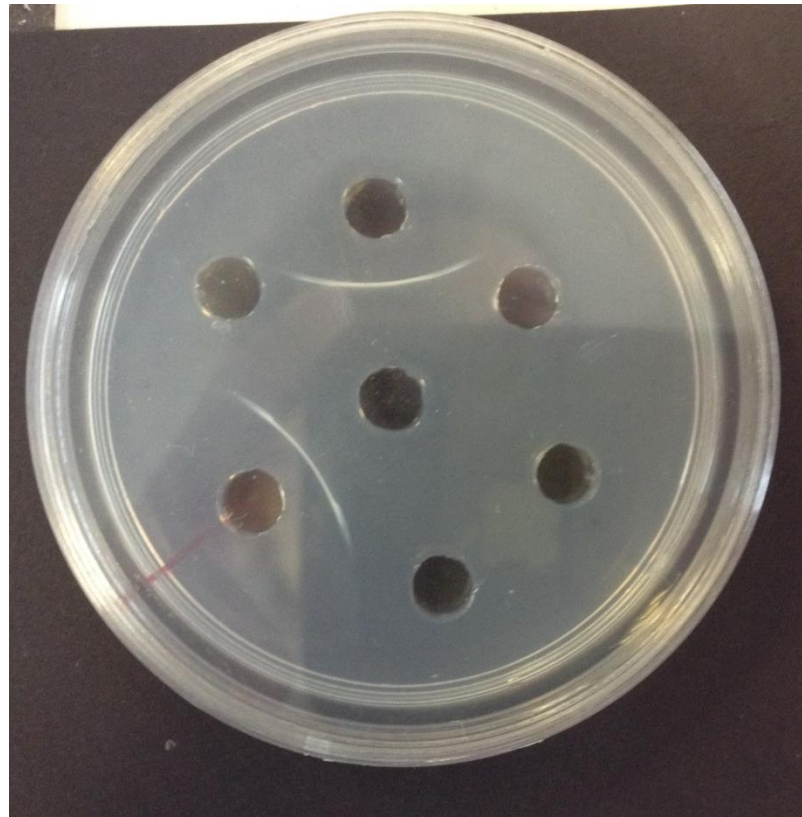
**utiliser** le gabarit de perçage qui vous est fourni sur demande, pour **réaliser** à l'aide du tube emporte pièce et éventuellement un cure-dent, les puits nécessaires dans le gel d'agar.

### II- Réalisation des dépôts

1. **Repérer** et **effectuer** les dépôts dans la boîte en respectant la disposition que vous avez proposée. NB : chaque puits doit contenir   $\mu\text{L}$  ou  gouttes.
2. **fermer** la boîte ;
3. **observer** vos résultats ou les résultats fournis.

# La spécificité de l'anticorps pour son antigène

La méthode de la double diffusion d'Ouchterlony



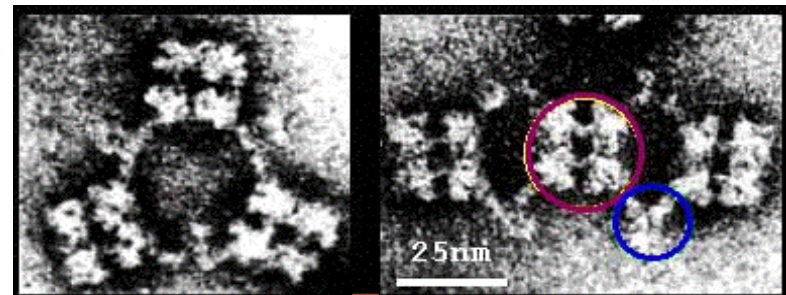
Après 1h : résultats de l'expérience

# Les Anticorps sont spécifiques d'un antigène donné

L'interprétation des résultats du test d'Ouchterlony a permis de mettre en évidence la spécificité d'un anticorps pour un antigène donné. En effet les Anticorps permettent une agglutination des antigènes par la formation de complexes immuns.

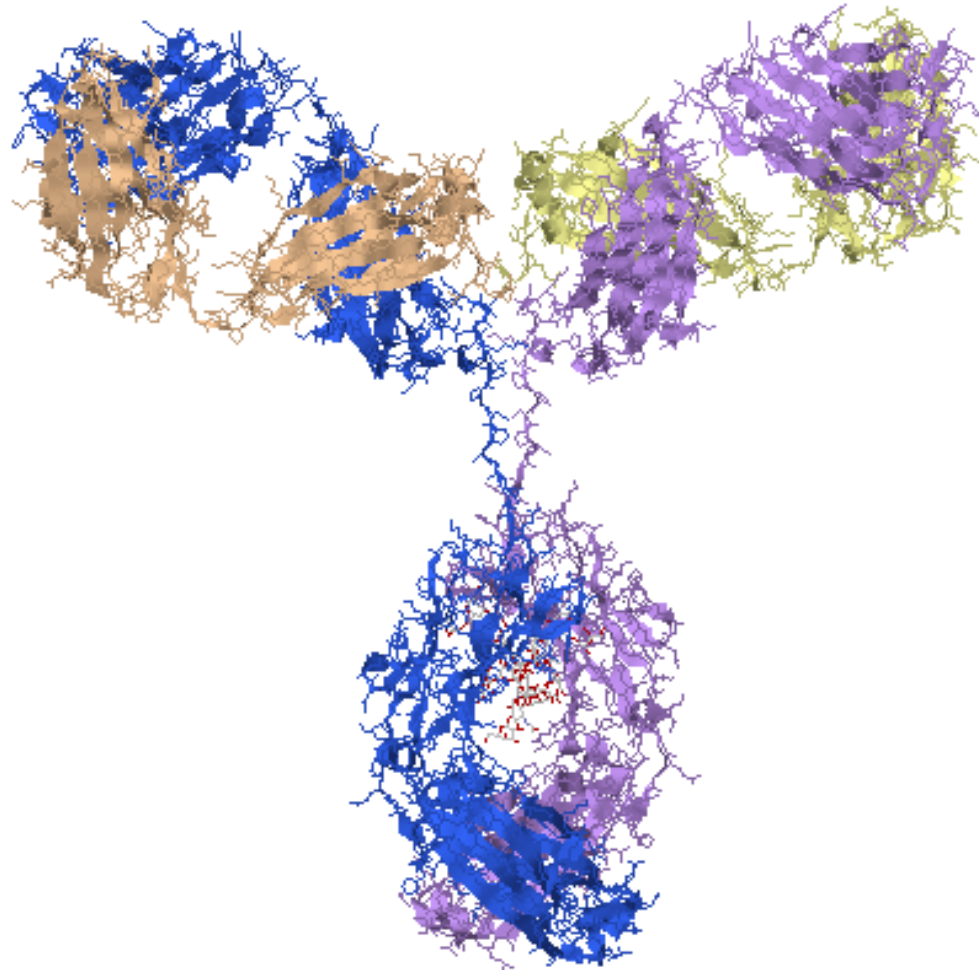


Agglutination de l'antigène HCG par les anticorps anti-HCG

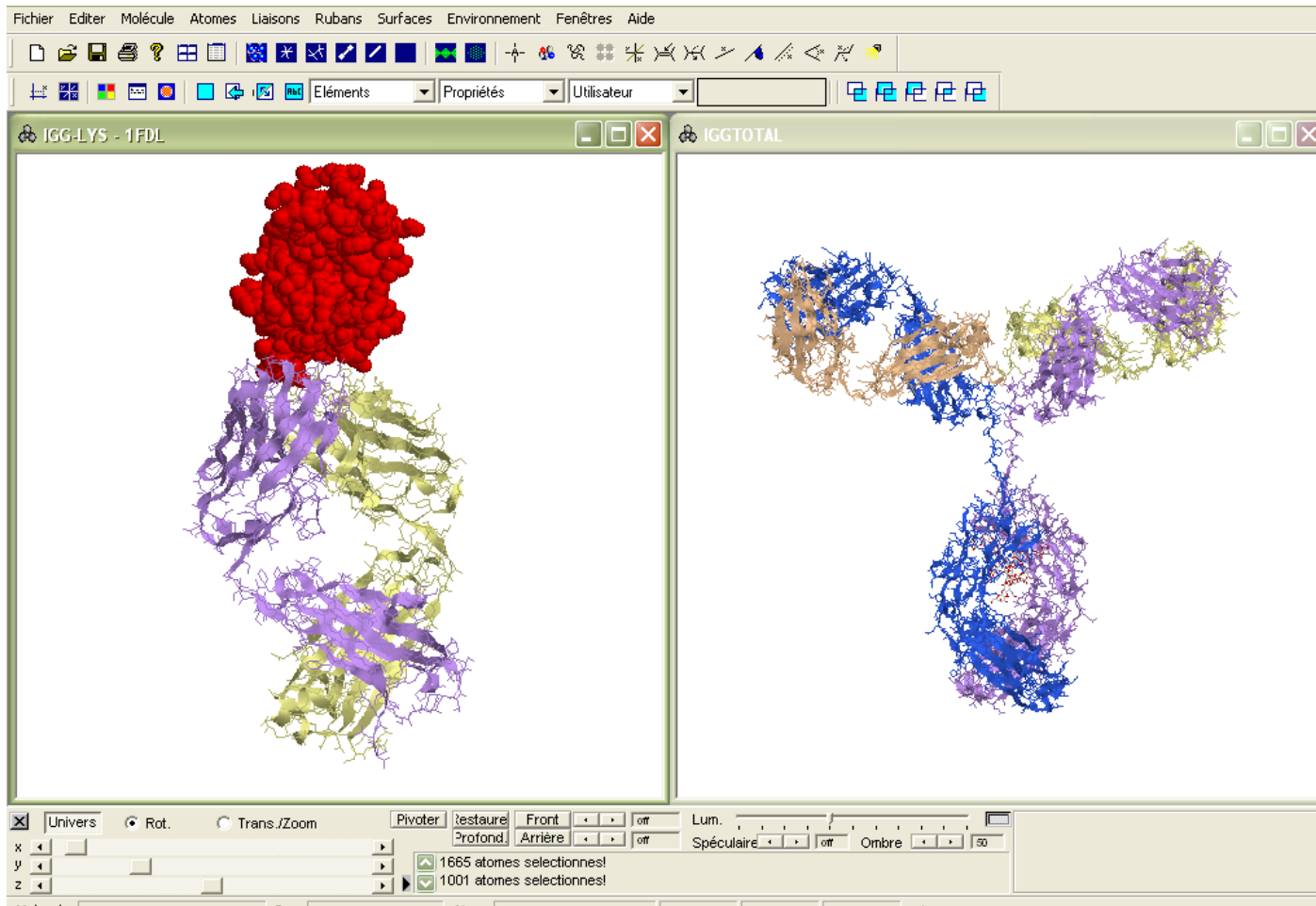


L'agglutination des antigènes passe par la formation de complexes immuns

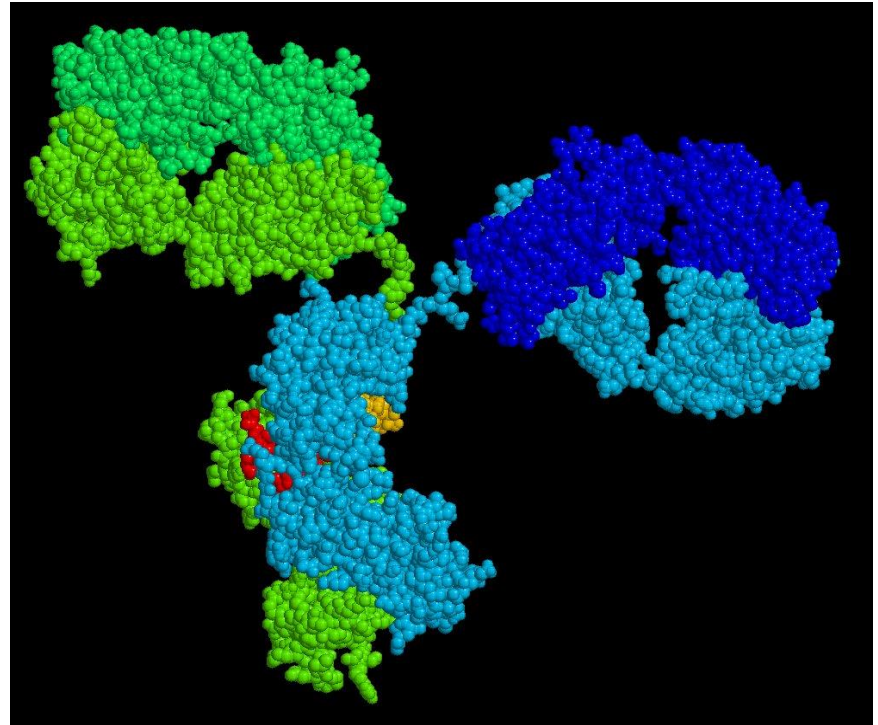
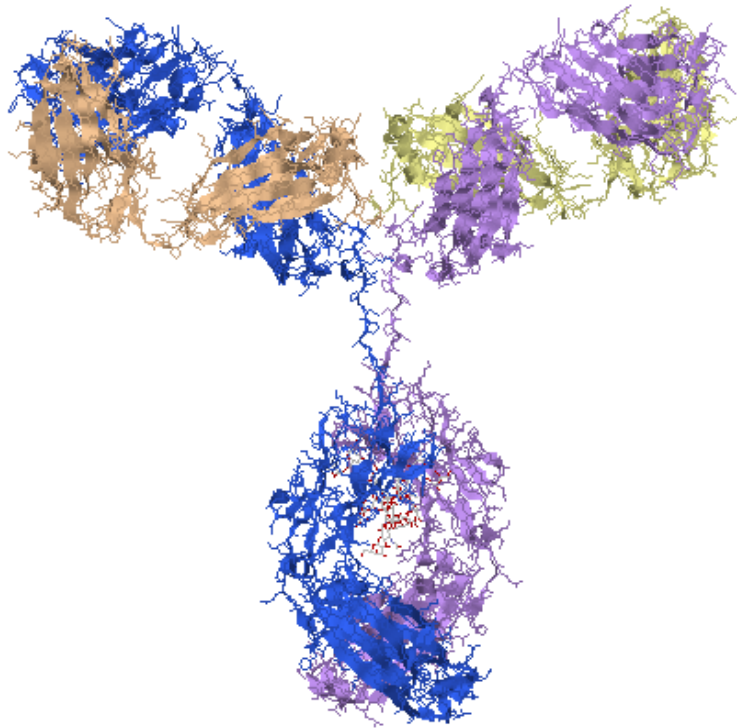
# Elucidation de la spécificité d'anticorps à un antigène via une étude moléculaire



# Mise en évidence de la zone de fixation de l'anticorps sur l'antigène



L'immunoglobuline présente la particularité d'être plastique (cf remarque du slide n° 8)



# Séquences peptidiques sur anagène des deux chaînes lourdes et des deux chaînes légères d'un même anticorps

Attention à modifier l'échelle sur anagène; ici on travaille sur des séquences peptidiques

The screenshot shows the 'CNDP-INRP Anagène - version de démonstration' software interface. The menu bar includes 'Fichier', 'Edition', 'Traiter', 'Informations', 'Fenêtre', 'Options', and 'Aide'. The toolbar contains various icons for file operations and sequence analysis. The main window is titled 'Affichage des séquences' and displays a sequence alignment. The top row shows residue positions from 204 to 237. Below this, four sequence lines are shown, each with a double-headed arrow indicating alignment. The first two lines (heavy chains) are identical: 'OrGlnThrTyrIleCysAsnValAsnHisLysProSerAsnThrLysValAspLysLysAlaGluProLysSerCysAspLysThrHisThrCysProProCy'. The last two lines (light chains) are identical: 'OoValThrLysSerPheAsnArgGlyGluCys'. The status bar at the bottom indicates 'Sélection : 0/4 lignes'.

- Les deux chaînes lourdes sont constituées d'environ 440 acides aminés
- Les deux chaînes légères de 220 acides aminés

# Comparaison des chaînes lourdes d'un même anticorps

The screenshot shows a sequence alignment interface titled "Comparaison simple". The top bar has a scale from 0 to 42. The main area displays three rows:

Row	Label	Sequence
1	Traitement	Comparaison simple de séquences peptidiques
2	igghsida.pro	GlnValGlnLeuValGlnSerGlyAlaGluValLysLysProGlyAlaSerValLysValSerCysGlnAlaSerGlyTyrArgPheSerAsnPheValIleHisTrpValArgGlnAlaProGlyGln
3	igghsida.pro	GlnValGlnLeuValGlnSerGlyAlaGluValLysLysProGlyAlaSerValLysValSerCysGlnAlaSerGlyTyrArgPheSerAsnPheValIleHisTrpValArgGlnAlaProGlyGln

The two protein sequences are identical. The status bar at the bottom indicates "Sélection : 0/3 lignes".

- Les deux chaînes lourdes d'un anticorps sont strictement identiques.

# Comparaison des chaînes légères d'un même anticorps

The screenshot shows a software interface for sequence comparison. At the top, a blue header reads "Comparaison simple". Below it is a horizontal scale from 0 to 120. The main area contains three rows of data:

Traitement	0	Comparaison simple de séquences peptidiques
igglsida.pro	0	GluIleValLeuThrGlnSerProGlyThrLeuSerLeuSerProGlyGluArgAlaThrPheSerCysArgSerSerHisSerIleArgSerArgArgValAlaTrpTyrGlnHisLysProGlyGln
iggmsida.pro	0	-----

At the bottom left, it says "Sélection : 0/3 lignes".

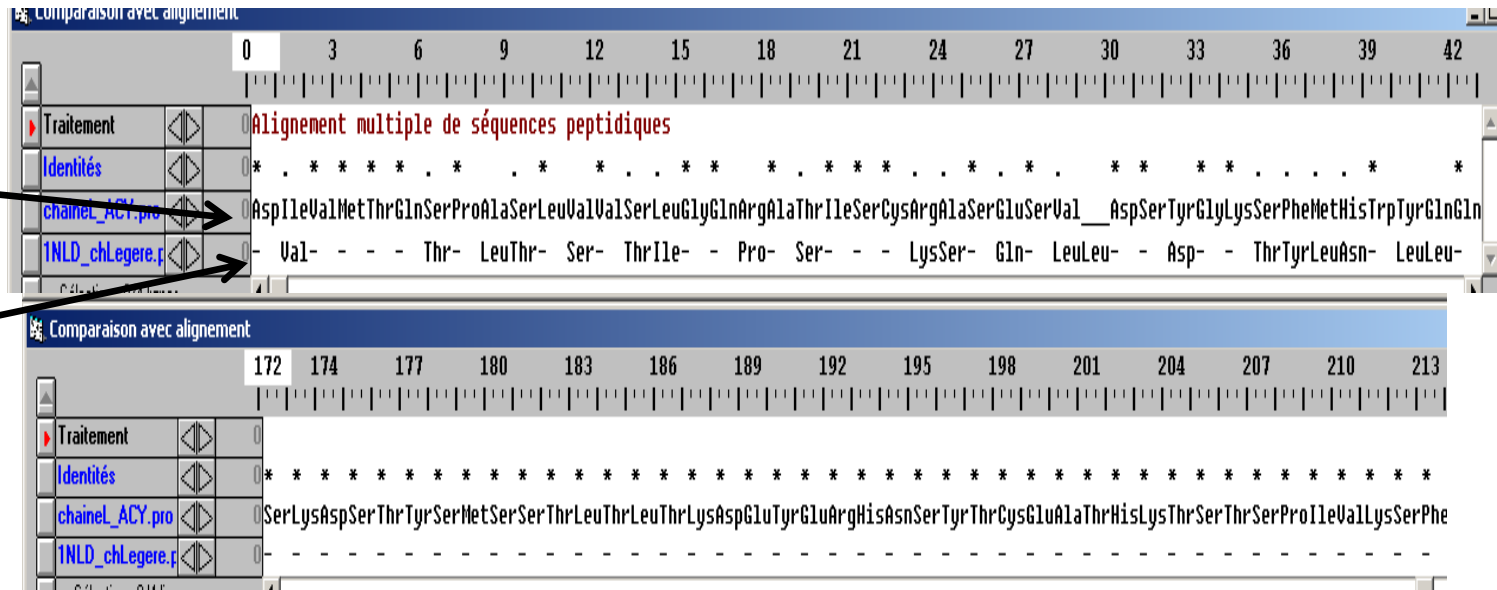
- Les deux chaînes légères d'un anticorps sont strictement identiques.

# Hypothèse expliquant la spécificité d'un anticorps pour un antigène donné

- On a vu grâce au logiciel Rastop, qu'il existait une complémentarité entre une partie de l'antigène et la partie terminale des 4 chaînes de l'anticorps.
- On sait qu'un anticorps est une protéine, et ainsi sa structure tertiaire est déterminée par sa séquence peptidique primaire.
- On peut donc supposer que la spécificité d'un Ac pour un Ag donné est due à une différence de séquence peptidique des 4 chaînes au niveau des premiers acides aminés de ces chaînes.



# Comparaison des chaînes légères de deux anticorps dirigés contre deux antigènes différents d'un même individu



Séquence peptidique de la chaîne légère de l'Ac anti-GP120

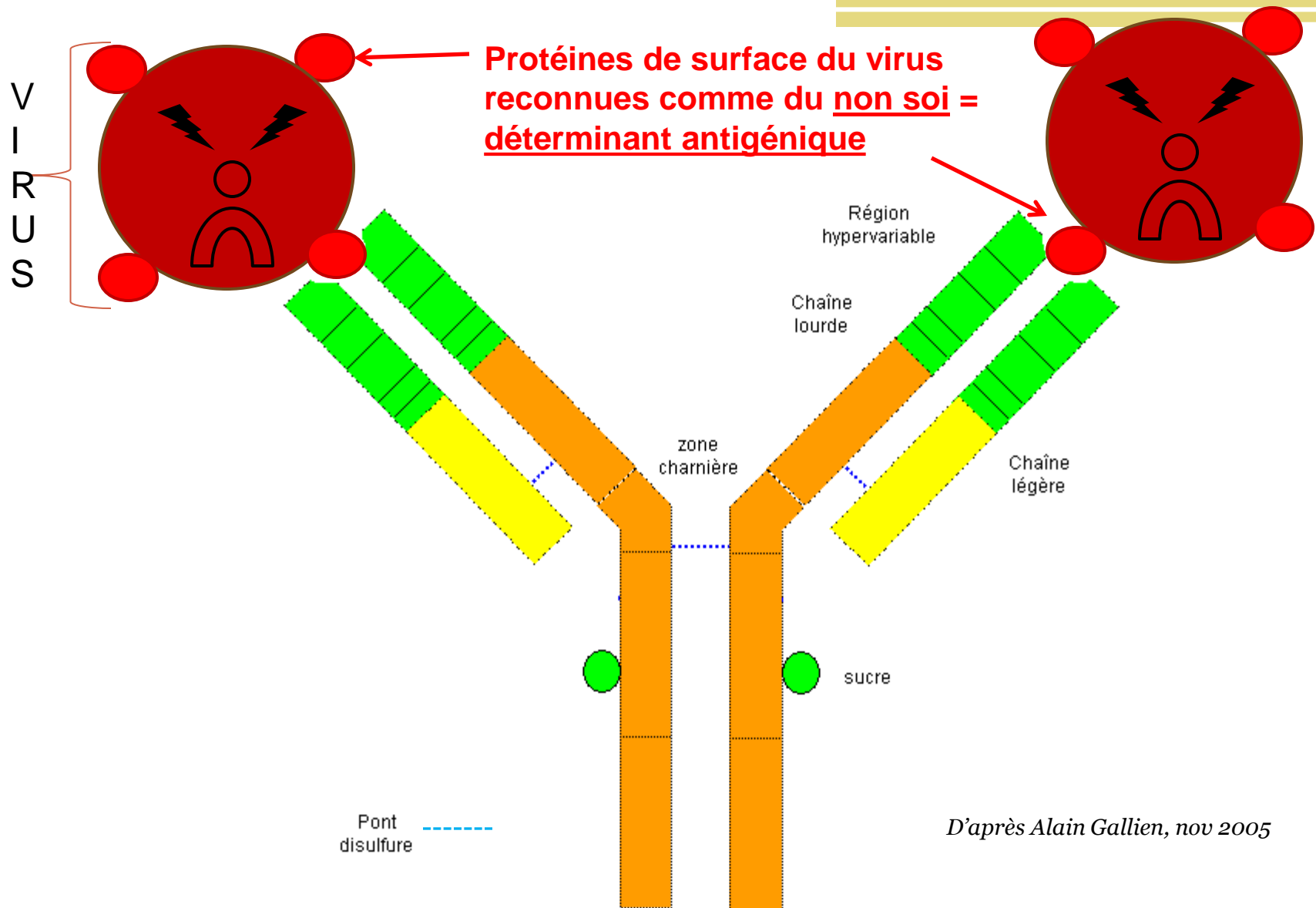
Séquence peptidique de la chaîne légère de l'Ac anti-GP41

- On observe une grande variabilité dans la séquence peptidique des 110 premiers acides aminés des deux chaînes légères (anti GP120 anti GP41).

# BILAN sur le rôle et la structure des anticorps

- Un anticorps est une protéine, constituée de 4 chaînes identiques deux à deux: deux chaînes lourdes de 440 aa et deux chaînes légères de 220 aa.
- Une chaîne légère est constituée de 2 sous-unités (de 110 aa chacune), une chaîne lourde de 4 sous-unités (de 110 aa chacune).
- La spécificité d'un anticorps pour un antigène donné repose sur une variabilité de la séquence en aa de la première sous-unité des chaînes lourdes et légères.
- Ainsi, cette variabilité dans la séquence primaire de cette sous-unité, permet une variabilité de la structure tridimensionnelle des extrémités de l'Ac spécifique d'un antigène donné.

# Schéma d'un anticorps spécifique d'un antigène donné



Deux virus neutralisés par un seul anticorps = agglutination formant un complexe immunitaire