

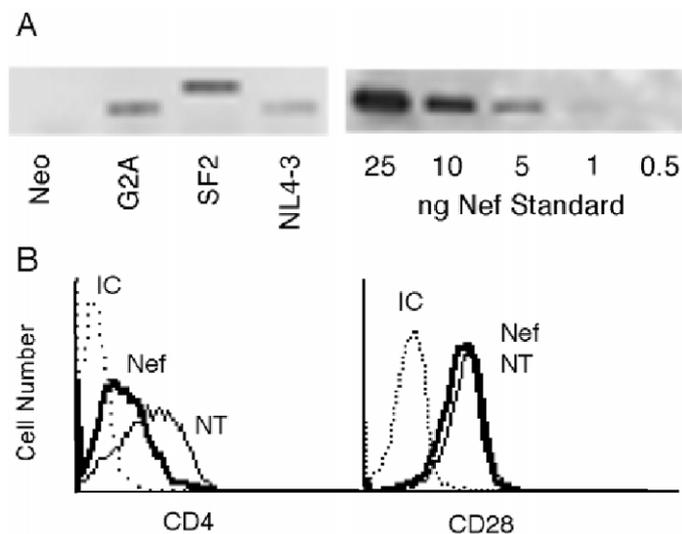
Infection par HIV

I.

(d'après Schrager *et al.* (1999) *P.N.A.S.* 96:8167)

La protéine virale Nef est exprimée précocement après infection par le VIH. Des études antérieures suggèrent que cette protéine est capable de promouvoir la réplication virale dans les cellules T. Ce processus nécessite que ces cellules T soient activées. Dans cette étude, on s'intéresse à l'effet de Nef sur l'activation des cellules T humaines. Des cellules de la lignée Jurkat (lignée de cellules T humaines) sont transduites par un vecteur rétroviral contenant le gène Neo (néomycine phosphotransférase, qui confère une résistance à la néomycine) seul, ou combiné à des protéines Nef du VIH myristylées (SF2 et NL43) ou mutante non myristylée (G2A). Les cellules transduites sont sélectionnées sur la base de leur résistance à la néomycine puis analysées. La **Figure 1A** montre le résultat d'une analyse par Western Blot de l'expression de Nef dans les cellules transfectées ($5 \cdot 10^6$ cellules par échantillon testé). La **Figure 1B** montre le résultat d'une analyse cytofluorométrique des cellules transfectées par SF2.

Figure 1



Question 1. Que peut-on conclure de ces résultats ?

Les cellules de Jurkat transduites sont activées par de la PMA (Phorbol Myristic Acetate à 10 ng/ml) et des anticorps anti-CD3 insolubilisés (1 μ g/puits), ou par PMA et PHA (Phytohémagglutinine 10 μ g/ml), ou par des anticorps anti-CD3 insolubilisés et des anticorps anti-CD28 solubles (0,33 μ g/puits). La sécrétion d'IL2 par ces cellules est mesurée par un test ELISA. Le résultat de cette expérience est montré sur la **Figure 2**.

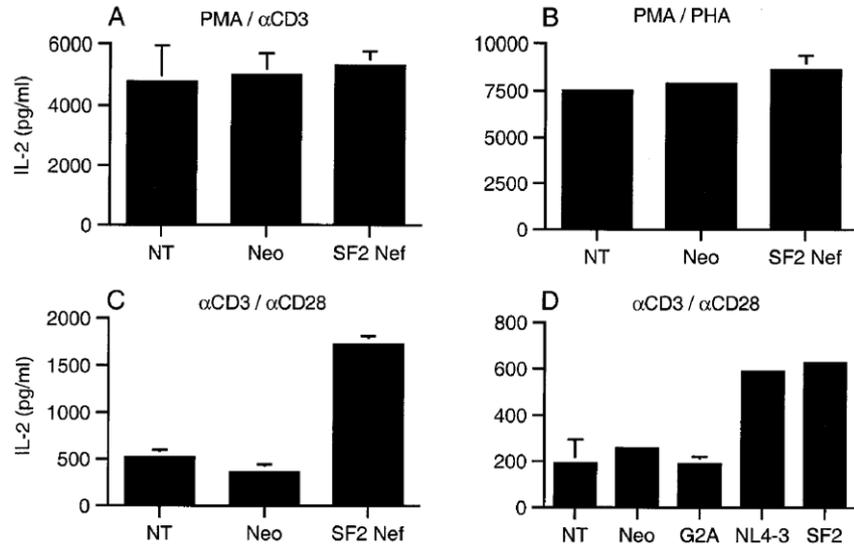
Question 2. Expliquez à quoi correspondent les différents modes de stimulation.

Question 3. Décrivez le test ELISA mis en œuvre dans cette expérience.

Question 4. Que peut-on conclure du résultat de cette expérience ?

Question 5. Quelles hypothèses peut-on formuler pour expliquer ce résultat ?

Figure 2



Les cellules transduites par NLA-3 (\blacktriangle), SF2 (\blacklozenge), G2A (\bullet) ou Neo (\blacksquare) sont stimulées par anti CD3 + anti-CD28. L'activation cellulaire est mesurée par un test ELISPOT pour l'IL-2. Le résultat de cette expérience est montré sur la **Figure 3A**. La **Figure 3B** montre la corrélation entre le nombre de cellules activées et la quantité totale d'IL-2 sécrétée.

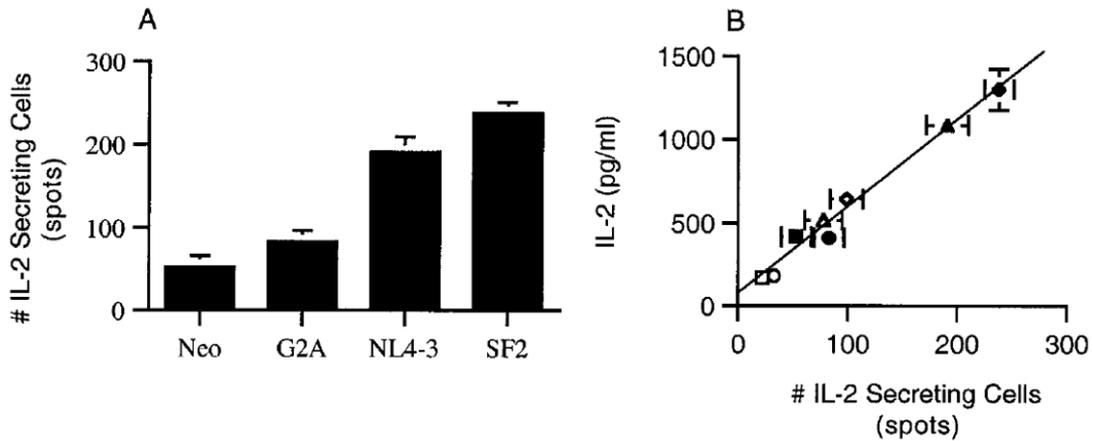


Figure 3

La quantité d'IL-2 sécrétée par chaque cellule activée est calculée. Elle est de 792 ± 236 fg pour les cellules transduites par le vecteur Neo contrôle, et de 547 ± 61 fg pour les cellules exprimant SF2.

Question 6. Ces résultats permettent-ils de préciser les hypothèses émises précédemment ?

Les mêmes expériences sont réalisées sur des lymphocytes T CD4 humains fraîchement isolés et transduits par les mêmes vecteurs. La **Figure 4A** montre le résultat d'une expérience de Western Blot sur ces cellule et la **Figure 4B**, l'analyse de ces cellules par cytométrie de flux.

Les cellules transfectées ou non (NT) sont stimulées par anti-CD3 + anti-CD28. La quantité d'IL-2 sécrétée par ces cellules après différents temps est mesurée par test ELISA. La **Figure 5** montre le résultat de cette expérience.

Question 7. Que suggère l'ensemble de ces résultats ?

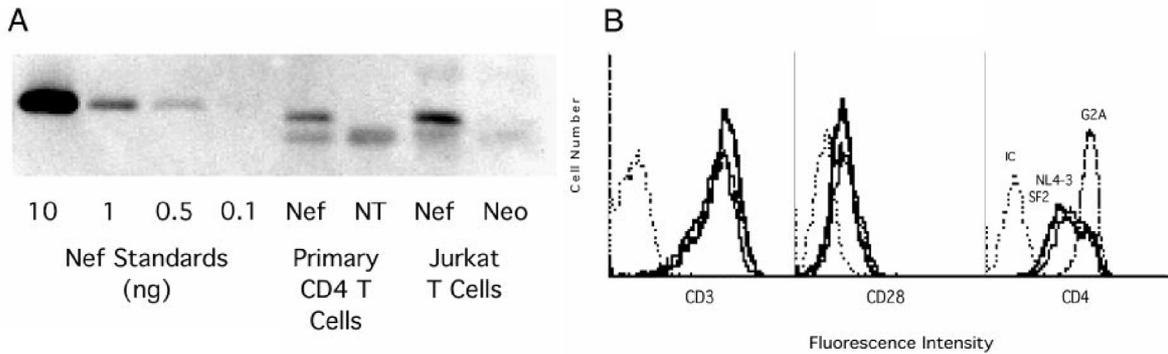
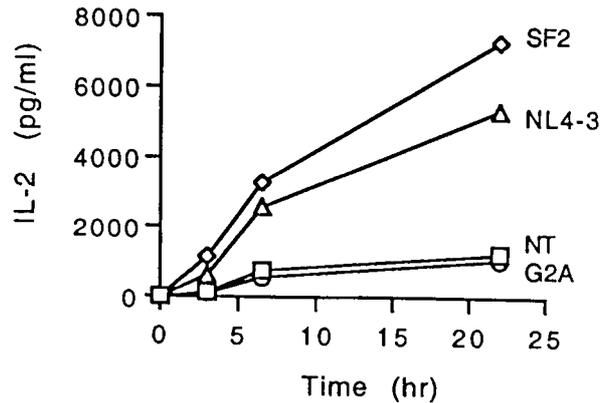


Figure 4

Figure 5



II.

(d'après De Maria *et al.* (1997) *P.N.A.S.* 94:10285 ; Cohen *et al.* (1999) *Immunity* 10:661)

Les KIRs (NK Inhibitory Receptors) sont des récepteurs inhibiteurs ayant pour ligands la molécule de classe I du CMH HLA-C, mais pas HLA-A ou HLA-B. On compte parmi ces récepteurs les molécules p58.1, p58.2, p70 et CD94/NKG2A. Ces récepteurs ont initialement été mis en évidence à la surface des cellules NK. Il a récemment été montré qu'une fraction des lymphocytes T α/β et γ/δ exprime ces récepteurs KIR, inhibiteurs de l'activation cellulaire. Dans cette étude, on s'intéresse à l'expression de ces récepteurs par les lymphocytes T de patients infectés par le VIH, et aux conséquences de leur expression. Le **Tableau 1** montre le pourcentage de cellules CD3⁺ du sang exprimant ces différents KIRs chez 14 patients infectés par le VIH.

Les lymphocytes T du patient 2 sont purifiés à partir d'un prélèvement de sang. On mesure l'activité cytotoxique de ces cellules non fractionnées, ainsi que celle des lymphocytes T CD8 purifiés à partir de cet échantillon sur des cellules cibles autologues infectées exprimant les protéines gag, pol, env et nef du VIH. L'activité cytotoxique est mesurée en absence (hachuré) ou en présence (noir) d'anticorps anti-p58.2. Le résultat de cette expérience est présenté sur la **Figure 6**.

La même expérience est réalisée avec deux clones (Sa 20 et Ni 15) de lymphocytes T CD3⁺p58.2⁺, dérivés respectivement à partir des patients 2 et 5. Le résultat de cette expérience est présenté sur la **Figure 7**.

La lignée de cellules 221 est une lignée de cellules T CD4. Ces cellules sont manipulées génétiquement de façon à exprimer, de façon stable, différentes molécules de CMH I (A2, B2705, Cw4). Les différentes lignées cellulaires obtenues sont infectées avec la souche NL-PI du virus HIV qui porte le gène reporter de la phosphatase alcaline placentaire (PLAP). Les cellules infectées expriment à leur surface la protéine PLAP. 48 heures après l'infection, on réalise une expérience de marquage en cytométrie de flux sur ces cellules avec un anticorps anti-CMH I (qui reconnaît tous les types de

molécules de CMH I) et un anticorps anti-PLAP. Le résultat de cette expérience est présenté sur la Figure 8.

Question 1. Que suggère l'ensemble de ces résultats ?

Tableau 1

Patient	% T de lymphocytes exprimant les NKR			
	p58.1	p58.2	p70	CD94/NKG2
1	24	34	32	18
2	11	12	13	12
3	2	3	3	4
4	2	9	9	5
5	ND	3	7	6
6	0	5	3	5
7	4	7	4	8
8	5	8	7	6
9	13	20	17	19
10	8	3	1	14
11	12	36	14	16
12	14	11	4	7
13	1	7	2	2
14	15	17	12	2

Figure 6

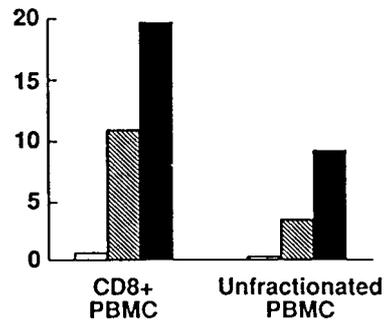


Figure 7

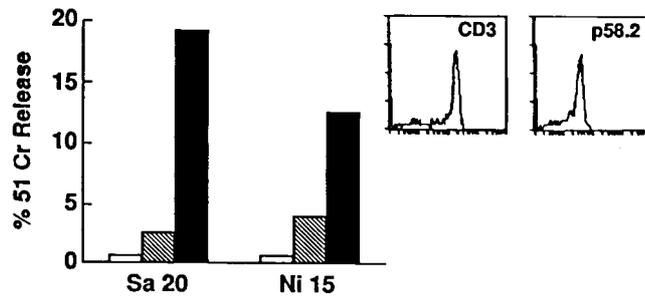
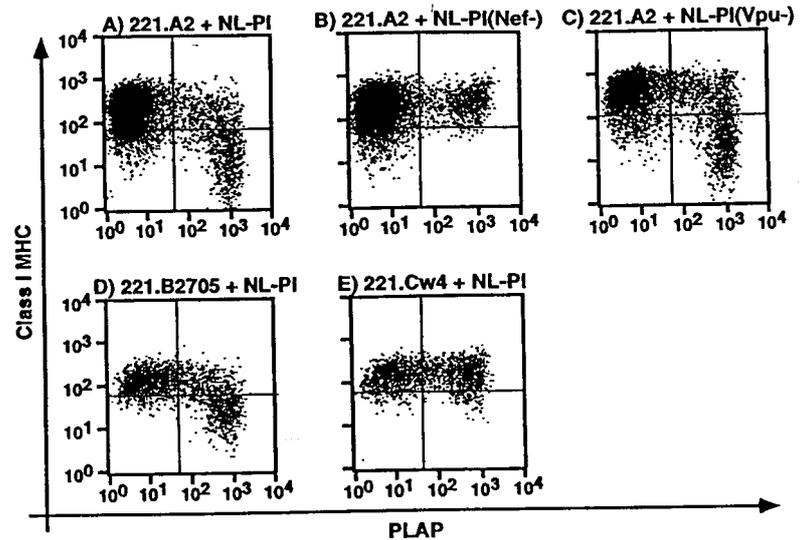


Figure 8



III.

(d'après Sol-Foulon et al. (2002) Immunity 16:145-155).

DC-SIGN, une lectine spécifique des cellules dendritiques favorise l'accrochage des lymphocytes T à la surface des cellules dendritiques. Cette fixation entre les lymphocytes T et ces cellules présentatrices d'antigènes professionnelles est un événement crucial dans l'initiation des réponses immunitaires. On étudie ici l'expression de DC-SIGN chez des cellules dendritiques infectées ou non par le VIH.

Des cellules dendritiques immatures ont été infectées par les souches de VIH NLAD8 et YU2, ou NLAD8 Δ nef et YU2 Δ nef pour lesquelles le gène nef a été délété. Sur la **Figure 9**, on observe en microscopie à fluorescence l'effet de l'infection des cellules dendritiques sur leur expression de DC-SIGN par comparaison à l'expression de la protéine virale Gag ; les cellules dendritiques non infectées (NI) servent de contrôle. Sur la **Figure 10** est observée en microscopie la fixation des lymphocytes T sur les cellules dendritiques infectées par différentes souches du VIH en présence ou non d'anticorps anti-DC-SIGN.

Figure 9

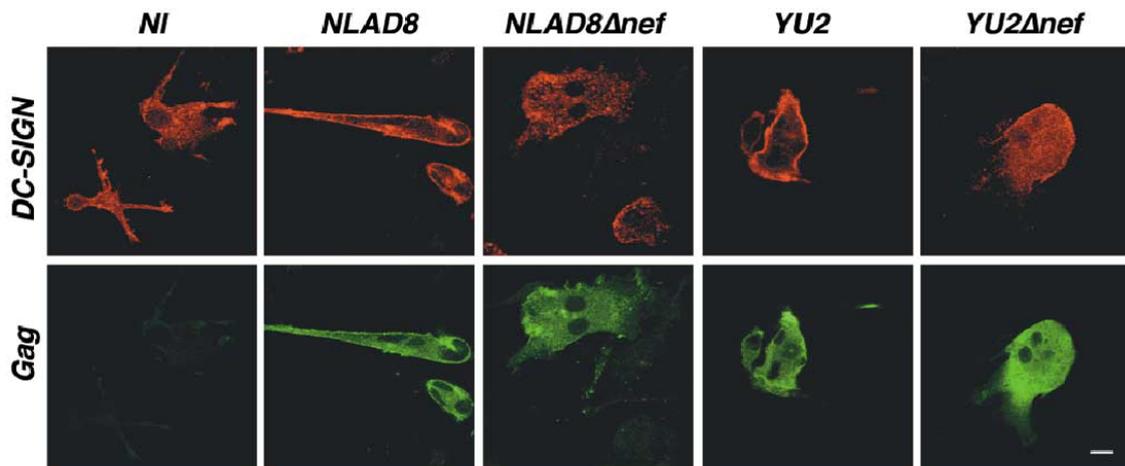
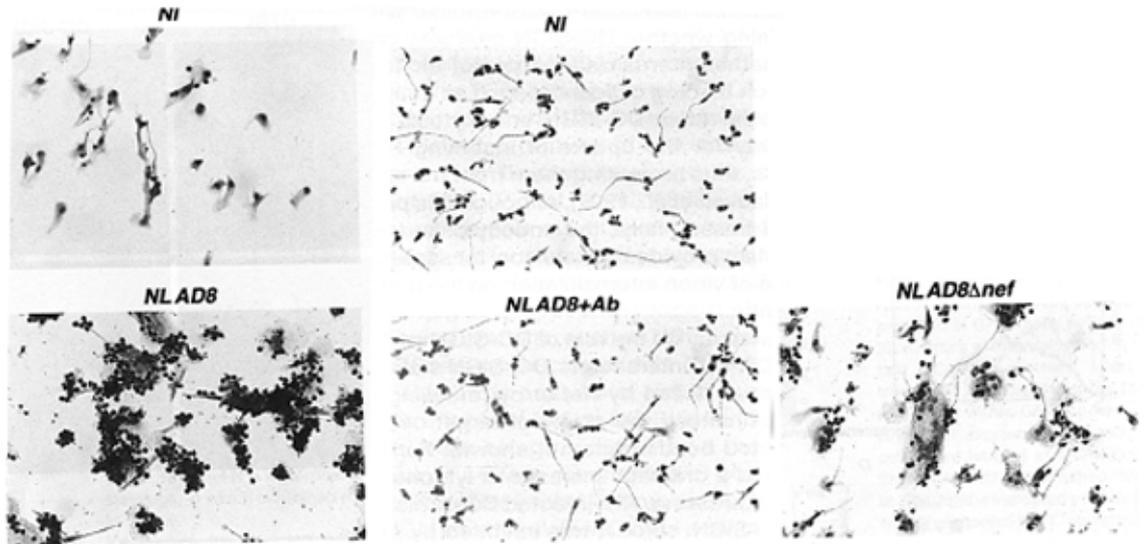


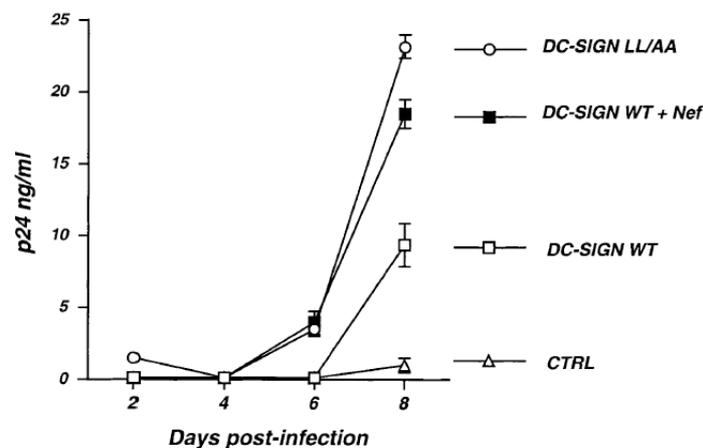
Figure 10



Question 1. Que concluez-vous de l'ensemble de ces résultats ?

Des cellules humaines HeLa, qui n'expriment pas CD4, ont été transfectées par un vecteur contrôle (CTRL), ou par un vecteur permettant l'expression de DC-SIGN sauvage (WT) ou de DC-SIGN WT plus Nef. Les cellules ont ensuite été exposées pendant 2 heures à du VIH (souche NL43)CC, lavées puis incubées avec des lymphocytes T activés. La réplication virale a été mesurée dans les surnageants de culture, par dosage de la protéine virale p24 (Figure 11 ; on ne tiendra pas compte de la courbe « DC-SIGN LL/AA »).

Figure 11



Question 2. Les cellules HeLa peuvent-elles être infectées par le VIH ? Pourquoi ?

Question 3. Commentez les résultats de cette expérience.