

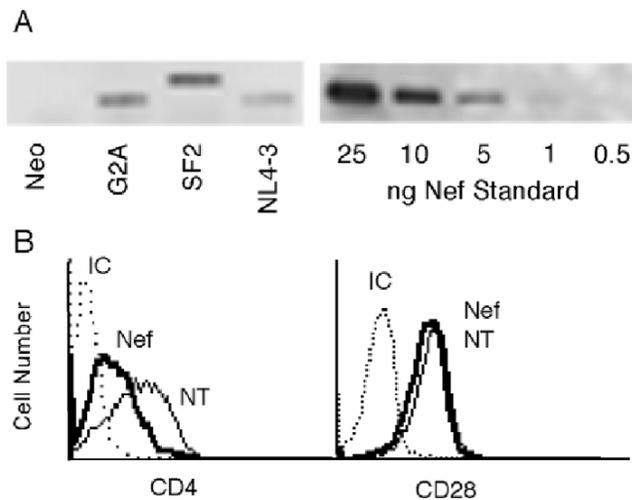
Infection par HIV

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 µg/puits), ou par PMA et PHA (Phytohémagglutinine 10 µg/ml), ou par des anticorps anti-CD3 insolubilisés et des anticorps anti-CD28 solubles (0,33 µg/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**.

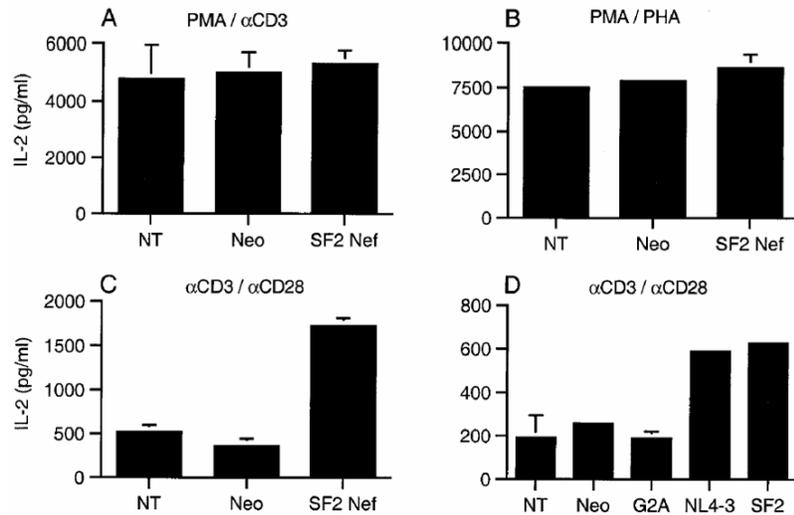
Question 2. Expliquez à quoi correspondent les différents modes de stimulation.

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.

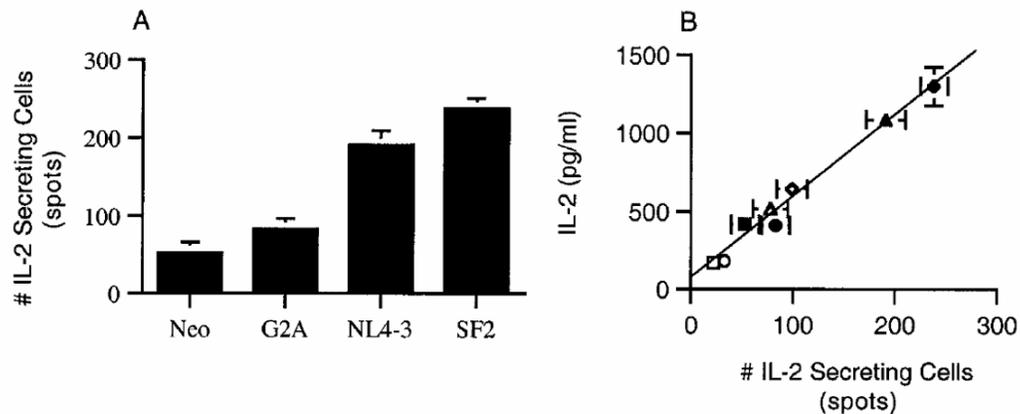


Figure 3

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 ?

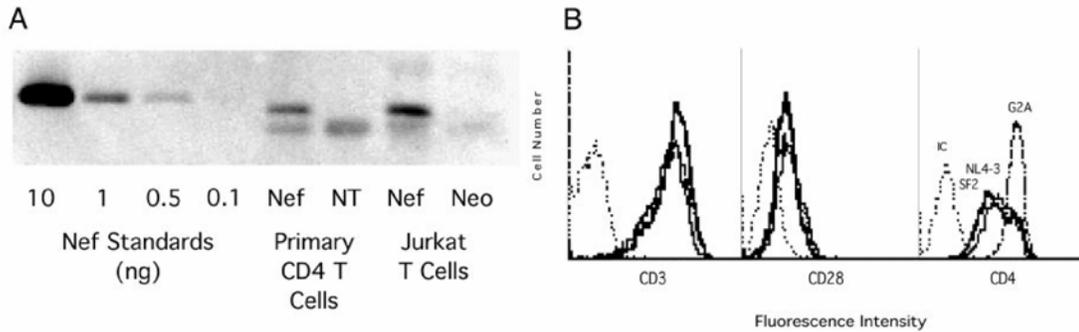
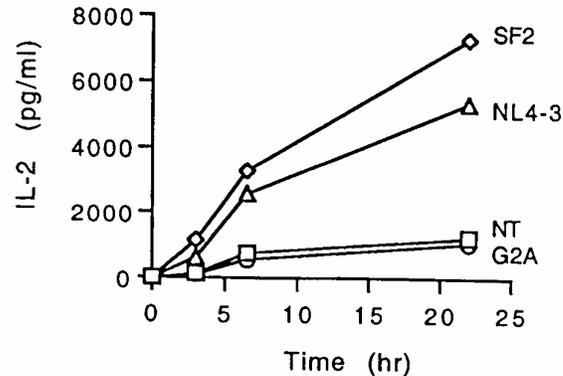


Figure 5



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 NKRs			
	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

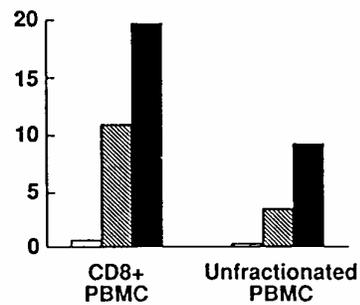


Figure 7

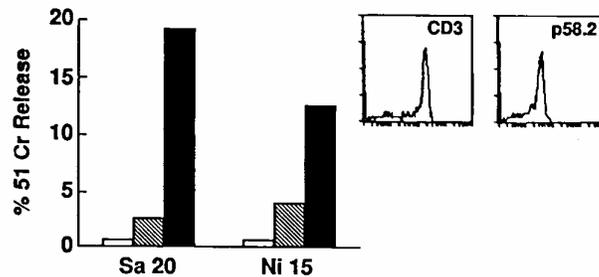
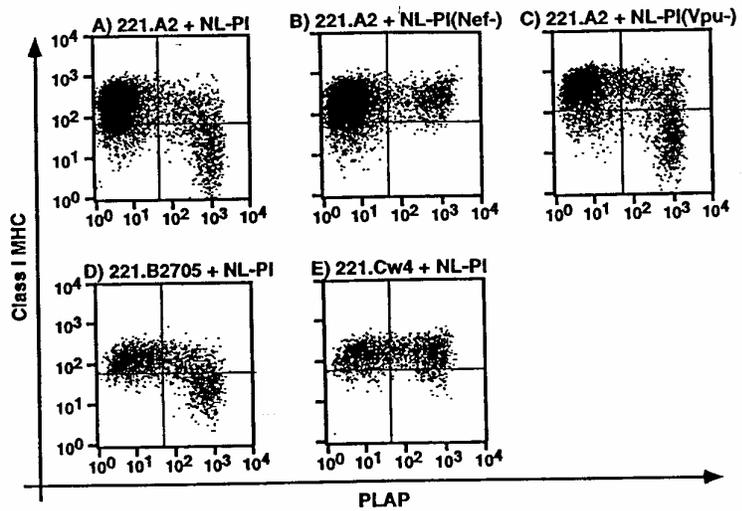


Figure 8



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

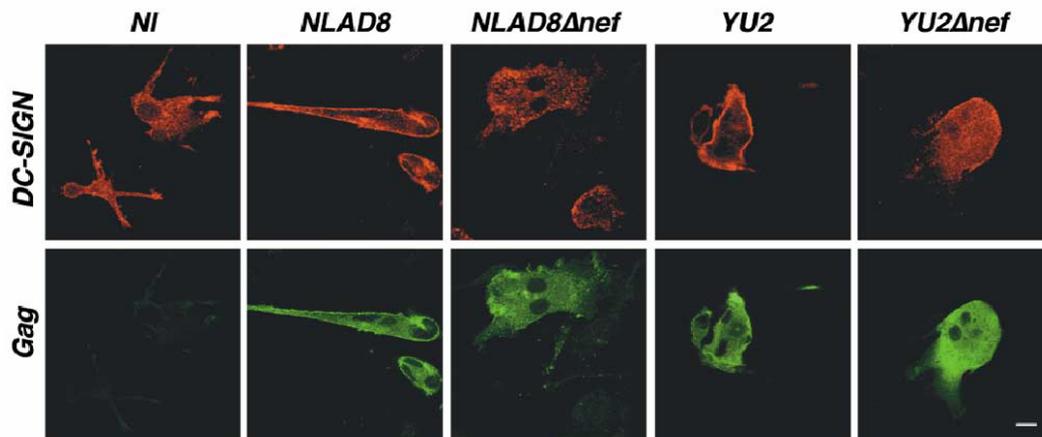
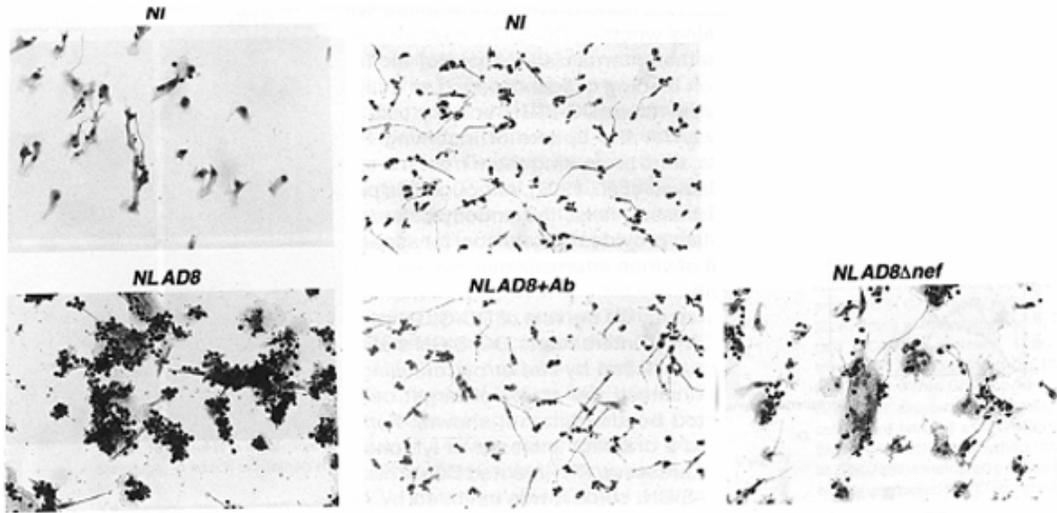


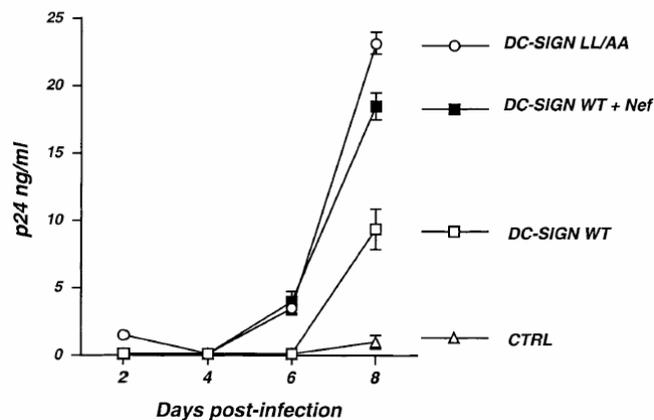
Figure 10



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), 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.

IV.

(D'après Yamada T. *et al.* Blood. (2004), 172 : 2401-2406)

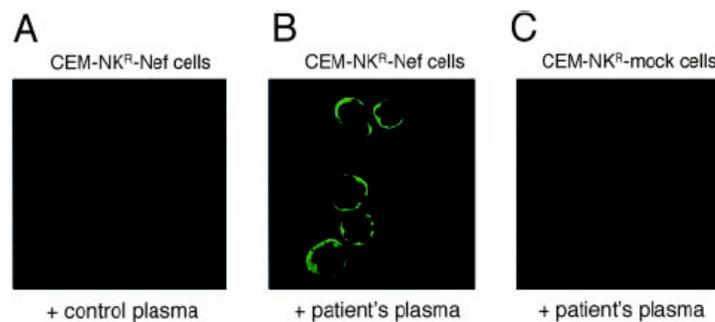
La cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC « Ab-dependent cellular cytotoxicity ») et les activités cytotoxiques des lymphocytes T sont deux mécanismes qui jouent un rôle important dans la protection contre les infections virales. Dans le cas de l'infection par le VIH, l'ADCC peut inhiber la réplication virale et l'infection cellule à cellule en tuant les cellules infectées par le VIH avant la maturation des particules virales.

La protéine virale Nef est une protéine accessoire impliquée dans la pathogénèse de l'infection à VIH. Cette protéine peut être exprimée à la surface des cellules infectées. Les auteurs de cette étude ont montré qu'un peptide de Nef, très conservé et exprimé à la surface de cellules infectées, pouvait servir d'épitope pour une réponse anticorps. De plus, il a été montré que le taux plasmatique d'anticorps dirigés contre ce peptide chez les patients infectés est corrélé avec la progression de la maladie.

Pour élucider les mécanismes de cette corrélation, les auteurs ont réalisé les expériences suivantes :

Des cellules CEM-NK^R exprimant la protéine virale Nef (CEM-NK^R-Nef cells) ont été incubées avec du plasma provenant d'un donneur sain (control plasma) ou d'un donneur (patient's plasma) infecté par le VIH (donneur LTNP 5). Les cellules ont ensuite été incubées avec un ac secondaire anti-Ig humaine couplé à la fluorescéine. Les cellules ont été analysées en microscopie confocale (**Figure 12**).

Figure 12



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

Des cellules CEM-NK^R-Nef préalablement marquées au Cr⁵¹ ont été incubées pendant 30 min à 37°C en présence de plasma provenant des patients LTNP 2, 5 et 6 (« Long-Term Non Progressors », qui sont des patients infectés par le VIH chez lesquels la maladie évolue lentement), ou en présence de plasma provenant de donneurs sains. Ces sérums ont été préalablement chauffés pendant 30 min à 56°C.

Des PBMC (cellules mononuclées du sang périphérique) provenant de donneurs sains ou de patients infectés par le VIH (dont les caractéristiques sont résumées dans le **Tableau I**) ont ensuite été ajoutés aux cellules CEM-NK^R-Nef, pendant 4 heures, à 37°C.

L'émission de rayons γ dans les surnageants a ensuite été comptée avec un compteur gamma et les résultats de lyse spécifique des cellules sont déterminés (**Figure 13**).

Tableau I

Table I. Patient profiles

Patient	Age	Sex	CD4 ⁺ Count (cells/ μ l)	CD8 ⁺ Count (cells/ μ l)	NK Cell Count (cells/ μ l)	% NK Cell in FBMC	HIV RNA (copies/ml) ^a	Antiretroviral Drugs ^b
P1	37	M	754	996	155	8.0	<400	d4T + 3TC + NFV
P2	32	M	63	214	20	3.7	770	d4T + 3TC + NFV
P3	45	M	204	620	220	12.6	<400	AZT + ddC + IDV
P4	37	M	638	1034	102	5.7	<400	d4T + 3TC + NFV
P5	35	M	372	877	73	5.0	2200	AZT + ddC + IDV

^a Amplicor HIV monitor test (Roche Diagnostics Systems, Somerville, NJ).

^b AZT, zidovudine; d4T, stavudine; 3TC, lamivudine; ddC, zalcitabine; NFV, nelfinavir; IDV, indinavir.

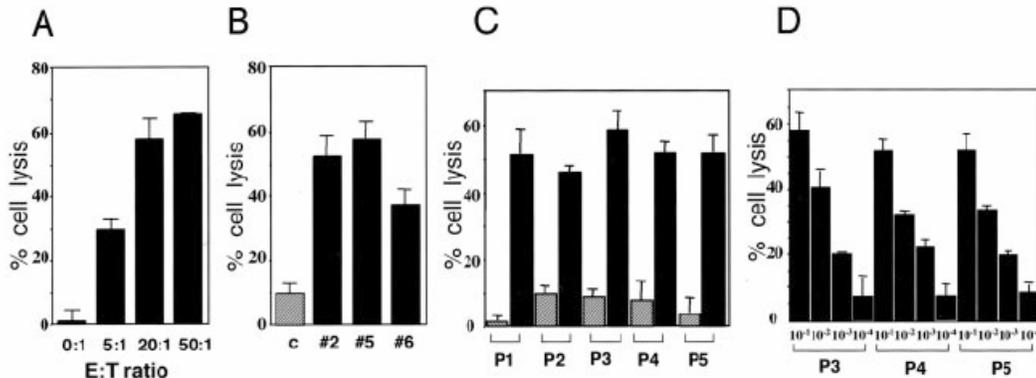


Figure 13

Les pourcentages de lyse spécifique sont calculés : $100 \times (\text{comptage échantillon} - \text{comptage relargage spontané}) / (\text{comptage maximum} - \text{comptage relargage spontané})$. A. Lyse spécifique en présence de différents ratios de PBMC provenant de donneurs sains, en présence de plasma du patient LTNP 5. B. Lyse spécifique en présence de PBMC provenant de donneurs sains (ratio 20 :1) en présence de plasma de patient sain (c) ou de plasma des patients LTNP 2, 5 et 6. C. Lyse spécifique en présence de PBMC de 5 patients (P1-5) (ratio 20 :1) en présence de plasma de donneur sain (colonnes hachurées) ou en présence de plasma du patient LTNP 5 (colonnes noires). D. Idem C, mais avec des dilutions sériées (10^{-1} - 10^{-4}) du plasma du patient LTNP 5.

Question 2. D'après le tableau 1 quelles corrélations pouvez-vous observer entre les différentes données pour les patients 1 à 5?

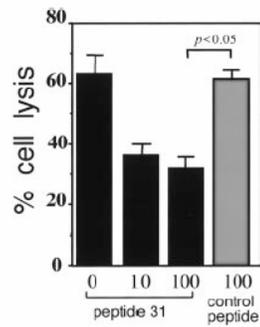
Question 3. Que permettent de mettre en évidence les expériences présentées dans la figure 2 ?

Question 4. Quelles conclusions tirez-vous de ces expériences ?

Dans l'expérience suivante, les auteurs ont incubé des cellules CEM-NK^R-Nef marquées au Cr⁵¹, des PBMC du patient 3 et du plasma du patient LTNP 5, en présence du peptide synthétique 31. On précise que le peptide 31 est reconnu par les anticorps anti-Nef. Les résultats de lyse spécifiques ont été déterminés (Figure 14).

Figure 14

Lyse spécifique en présence de PBMC du patient 3 (ratio 20 :1), de plasma du patient LTNP 5 et du peptide 31 (0 à 100 µg/ml, colonnes noires) ou d'un peptide contrôle (100 µg/ml colonne hachurée).



Question 5. Que pouvez-vous conclure de cette expérience ?

Des PBMC de 41 patients infectés par le VIH et de 16 donneurs sains ont été analysés par cytométrie de flux. Les nombres de cellules NK (CD3-, CD19-, CD16+, CD56+) et le pourcentage de cellules NK exprimant la perforine ont été déterminés (Figure 15).

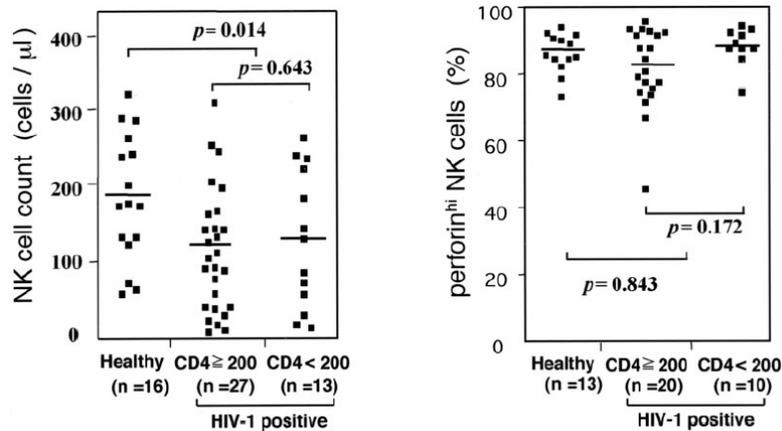


Figure 15

A. Nombre de cellules NK parmi les PBMC de donneurs sains et les PBMC de patients infectés par le VIH, ayant plus ou moins de 200 cellules T CD4+ par µl de sang. B. Pourcentages de cellules NK exprimant la perforine parmi les PBMC de donneurs sains et de patients infectés par le VIH ayant plus ou moins de 200 cellules T CD4+ par µl de sang.

Question 6. Que pouvez-vous conclure du rôle des cellules NK ?