

Université Pierre et Marie Curie
Master BMC
Immunotechnologie

Module Immunothérapie Cellulaire et Génique
Bertrand Bellier / François Lemoine

Examen Janvier 2008

Introduction (à lire attentivement)

L'actualité récente a malheureusement rapporté l'insuccès de certaines stratégies vaccinales pour prévenir l'infection par le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH). Cet échec renforce plus que jamais l'intérêt pour les approches préventives ou thérapeutiques reposant sur des stratégies de thérapie génique ou cellulaire.

Dans un article relativement récent (Chen SY et col. Gene Therapy, Vol. 9 page 889, 2002), des chercheurs tentent d'évaluer *in vitro* la possibilité de protéger les cellules contre l'infection par le VIH grâce à l'introduction dans ces cellules d'un gène codant pour la chimiokine RANTES (CCL5) qui interagit avec le récepteur CCR5. Cette stratégie a été dénommée « intrakine » puisqu'elle consiste à faire exprimer par les cellules une chimiokine non plus sécrétée mais qui reste bloquée à l'intérieur de la cellule. Cette approche représente une des formes possibles d'« immunisation intra cellulaire » comme proposé à la fin des années 80 par un des lauréats du prix Nobel, David Baltimore.

Au cours de ce travail, les auteurs ont 3 objectifs principaux :

- 1- Déterminer quel type de vecteur et notamment quel type de promoteur utiliser pour obtenir une expression maximale du produit du transgène.
- 2- Evaluer le retentissement de l'expression du transgène sur le phénotype cellulaire.
- 3- Evaluer la protection conférée aux cellules transfectées contre le VIH.

I. Vecteurs lentiviraux utilisés au cours de cette étude.

Dans l'expérience présentée figure 1, les auteurs ont testé différents vecteurs lentiviraux présentés en (a) pour déterminer lesquels permettaient d'obtenir la meilleure expression de RANTES par les cellules transduites. En (b), les auteurs ont analysé par immunoprécipitation (technique de Western-blot) les protéines provenant de lysat cellulaire (C) ou du milieu de culture (M) des cellules transduites. La membrane est révélée par un anticorps anti-RANTES humain, la taille attendue de la protéine RANTES humaine non modifiée est environ de 8kD.

Abréviations utiles pour la figure 1. LTR : « long terminal repeat », EF1 α : promoteur du gène humain EF1 α , GFP : gène codant pour la protéine verte fluorescente, humanisée (hr) ou non (e), WPRE : « woodchuck hepatitis post-transcriptional regulatory element », RANTES-SEKDEL : gène codant pour la chimiokine RANTES modifiée en 3' par l'ajout d'une séquence codant pour

un motif KDEL de rétention dans le réticulum endoplasmique, IRES : « Internal Ribosome Entry Site ».

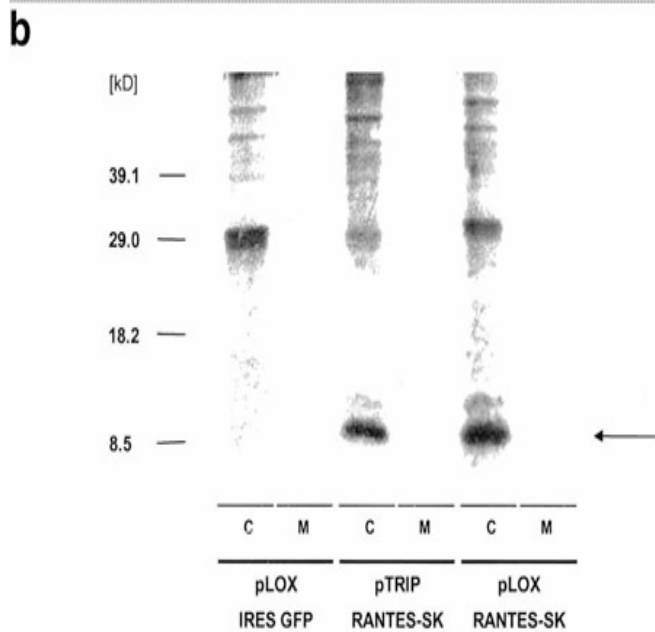
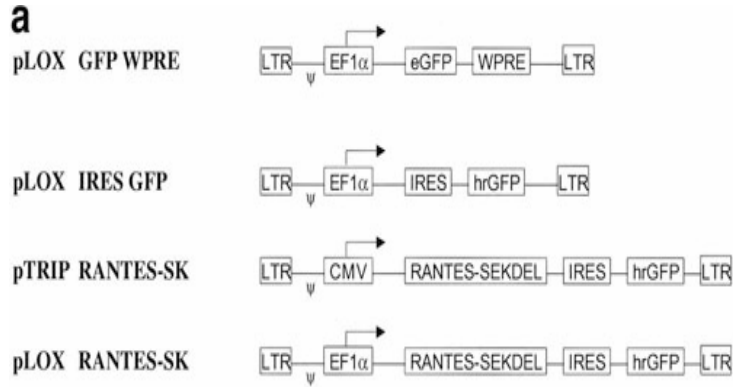


Figure 1

Question 1a: Les cellules transduites par les vecteurs pTrip RANTES-SK et pLOX RANTES-SK peuvent exprimer une ou plusieurs protéines étrangères, laquelle ou lesquelles ? Pourquoi ?

Question 1b: Quel est l'intérêt d'utiliser le vecteur pLOX IRES GFP dans cette expérience ? Que peut-on déduire de cette expérience ?

II. Phénotype des lymphocytes T après transfection

Dans cette expérience, les auteurs ont introduit dans une lignée lymphocytaire T (quatre expériences séparées: **a**, **b**, **c** et **d**) les vecteurs lentiviraux indiqués au dessus des histogrammes. Les cellules transfectées sont analysées par cytofluorométrie à l'aide d'anticorps fluorescents dirigés contre les marqueurs cellulaires également indiqués au dessus des histogrammes.

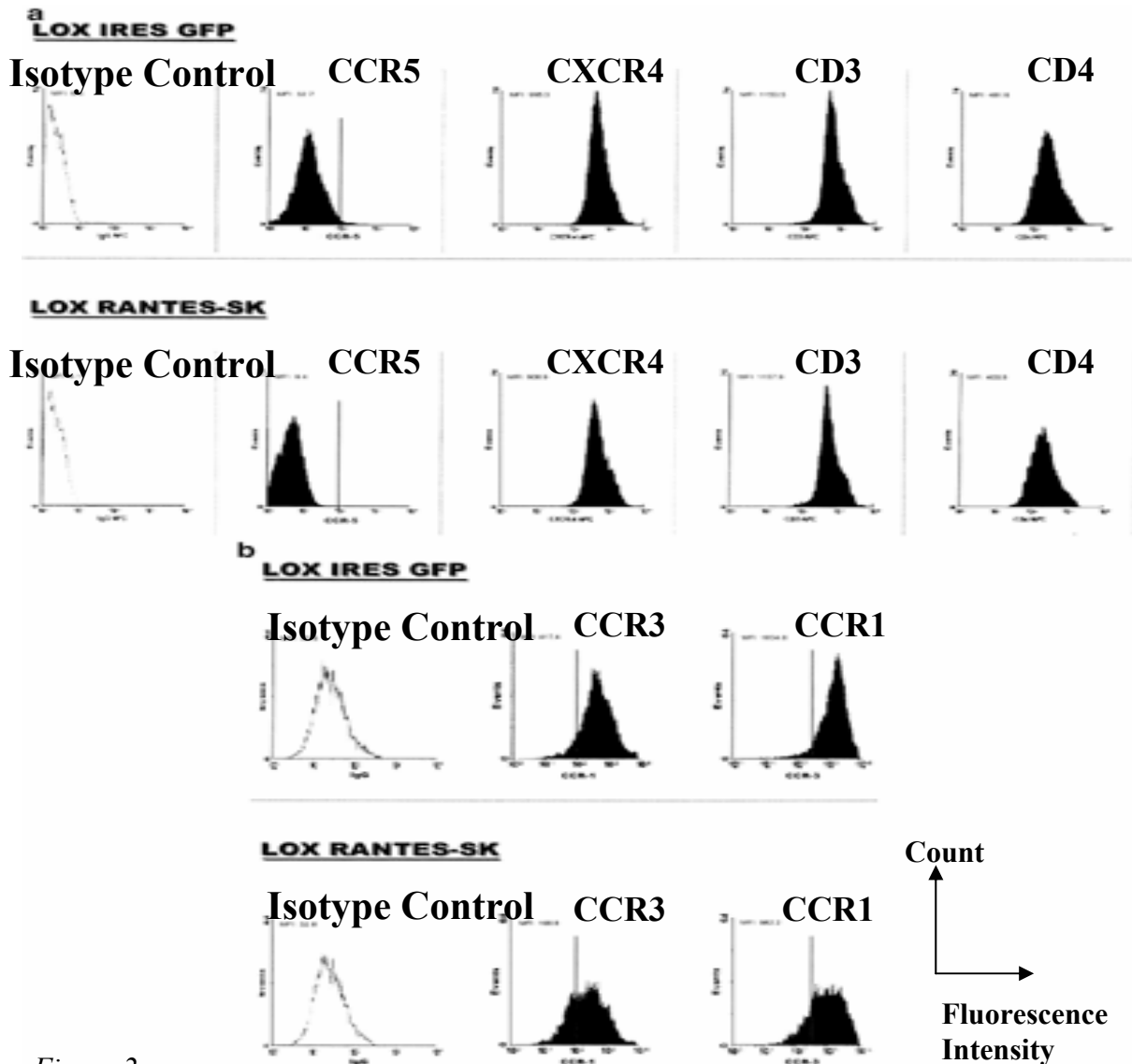


Figure 2

Question 2:

Quel est l'effet de l'introduction du gène codant pour RANTES-SKDEL (RANTES-SK dans la figure) sur le phénotype cellulaire ?

III. Réplication du virus HIV dans les lymphocytes exprimant les transgènes

Dans cette expérience les auteurs ont infecté des lymphocytes provenant de 2 sujets sains (a et b) à l'aide des vecteurs lentiviraux indiqués. Les auteurs ont ensuite purifié après 1 semaine de culture les cellules fortement fluorescentes et celles-ci ont été exposées au virus HIV-1. Après le temps indiqué, les auteurs ont ensuite recherché dans les surnageants la présence de la protéine p24 du virus HIV-1.

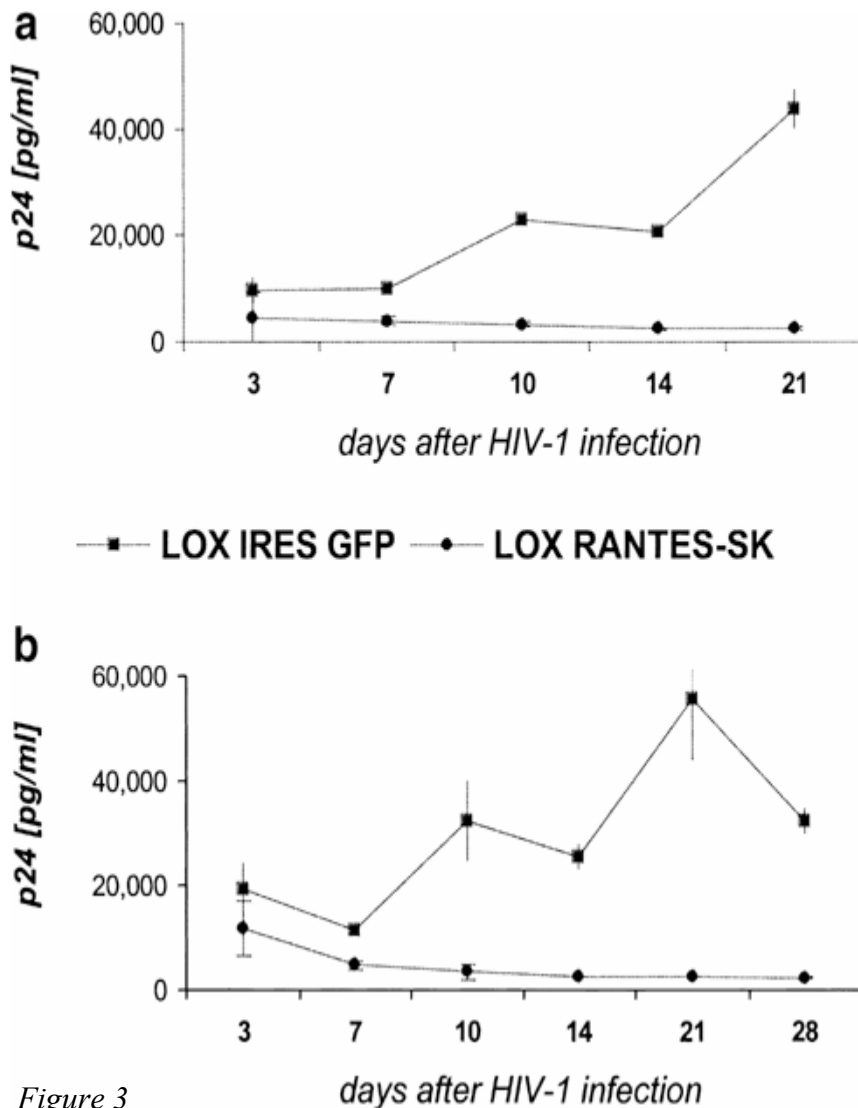


Figure 3

Question 3a: Quelle méthode les auteurs ont-ils pu utiliser pour purifier les cellules transduites?

Question 3b: Que déduire de cette expérience ?

IV. Discussion générale

Questions :

- 1) Expliquer très brièvement comment RANTES-SKDEL pourrait protéger les cellules de l'infection par le VIH ?
- 2) Préciser si le transgène RANTES-SKDEL interfère avec la pénétration ou avec la réplication virale ?
- 3) Les auteurs envisagent de prélever des cellules souches hématopoïétiques non infectées à des sujets porteurs du virus VIH-1, d'introduire le transgène RANTES-SKDEL dans ces cellules, puis de les réinjecter aux patients. Pourquoi les cellules transduites persisteraient-elles plus volontiers que d'autres après leur réintroduction chez les donneurs ? (Répondre par 1 seule phrase, maximum 10 mots).
- 4) Sur quel argument, à votre avis, les auteurs s'appuient-ils pour postuler que leur stratégie ne risque pas d'aggraver le déficit immunitaire de patients HIV+ portant un nombre important de cellules ainsi génétiquement modifiées ? Attention, il ne s'agit pas là de discuter de l'immunogénicité potentielle du transgène (Maximum 20 mots).
- 5) Dans le même but d'immunisation intracellulaire contre VIH-1, énumérer sous la forme d'une liste (sans commentaire) les autres molécules que l'on pourrait imaginer faire produire aux lymphocytes ?