

**Licence : Sciences, Technologie, Santé. Mention : Biologie-Santé**

**UE : Immunologie-Virologie  
Année Universitaire 2015-2016, 1<sup>ère</sup> session.**

**Date de l'épreuve : 2 Mai 2015.**

**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 de Mme Géraldine Schlecht-Louf à traiter sur une copie séparée

(10 points)

### **Reconnaissance du non-soi par les cellules du système immunitaire :**

Présentez de façon précise et synthétique, avec des schémas lorsque nécessaire :

- les molécules reconnues par les cellules immunitaires innées (avec des exemples), par les lymphocytes B et par les lymphocytes T.
- Les récepteurs permettant cette reconnaissance et leurs caractéristiques.
- Les conséquences de cette reconnaissance.

Vous pourrez, si vous le souhaitez, présenter ces données sous forme de tableau.

### **Cytométrie en flux :**

On analyse les LT CD4 spléniques d'une souris contrôle et d'une souris génétiquement modifiée dépourvue de molécules de classe 2 du CMH (CMH-II-déficiente). D'après les « dot-plots » suivants, quelle est la fréquence des lymphocytes TCD8 et TCD4 chez la souris CMH-II-déficiente ? Commentez ce résultat par rapport au contrôle.

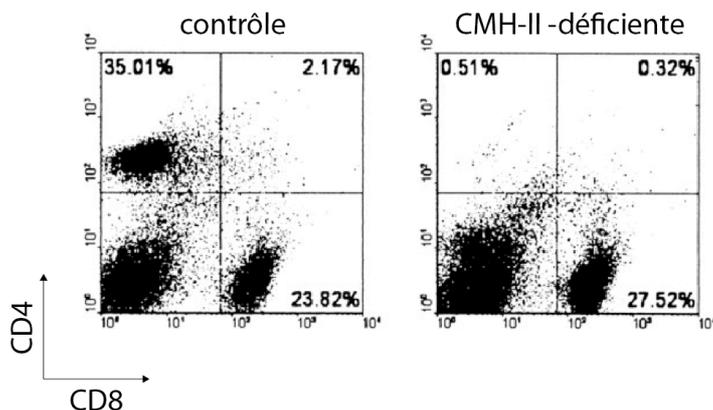


Figure 1 : Dot plot présentant l'analyse par cytométrie en flux de l'expression des marqueurs CD4 et CD8 par des cellules de la rate de souris contrôle et déficiente en molécules de classe 2 du CMH.

## Sujet de Mme Lagaudrière à traiter sur une copie séparée (10 points)

Les **cellules dendritiques** (DCs) sont des cellules immunes spécialisées dans la présentation antigénique. Au niveau des muqueuses, ces cellules capturent les antigènes, puis migrent vers les organes lymphoïdes secondaires où elles présentent ces antigènes (*via* les molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité) aux lymphocytes T. Ce processus permet d'initier la réponse immune adaptative.

Les expériences qui suivent visent à caractériser la protéine **DC-SIGN** qui est fortement exprimée à la surface des cellules dendritiques et à préciser son rôle dans l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), plus particulièrement dans **les premières étapes de la dissémination virale dans l'organisme**.

*Préambule : les niveaux d'expression des protéines CD4, CCR5 et DC-SIGN à la surface de différents types cellulaires sont précisés dans le tableau ci-après :*

cellules \ molécules	CD4	CCR5	DC-SIGN
DCs	+	-	+++
THP-1	-	-	-
293T	-	-	-

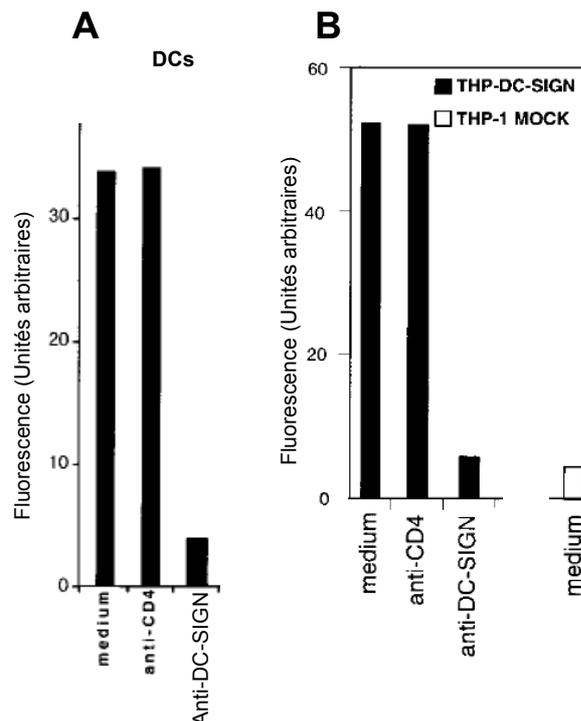
*Expression forte (+++), faible (+) ou absence (-).*

Dans les expériences qui suivent, la protéine d'enveloppe gp120 du VIH sera utilisée après purification. Pour mémoire, les molécules CD4 et CCR5 ont été caractérisées respectivement comme récepteur et co-récepteur du VIH-1 (souche R5) à la surface des lymphocytes T.

**Q1 : Décrivez brièvement le(s) mode(s) d'entrée des virus enveloppés dans la cellule hôte.**

Expérience 1 :

La protéine d'enveloppe gp120 du VIH a été fixée covalamment sur des billes d'agarose fluorescentes (fluo-billes-gp120). Des DCs, des cellules THP1 et des THP-DC-SIGN (pré-incubées ou non (*medium*) avec les anticorps anti-CD4 ou anti-DC-SIGN) sont incubées avec les fluo-billes-gp120 pendant 30 min. Après lavage, la fluorescence associée aux cellules a été mesurée. Les résultats sont présentés dans la figure 1.



**Figure 1 : Fluorescence associée aux DCs (panel A) et aux THP1, transfectées (THP-DC-SIGN) ou non (mock) avec la séquence codante de DC-SIGN (panel B), après incubation avec des fluo-billes-gp120. Avant incubation avec les billes, les cellules ont été pré-incubées dans un tampon sans anticorps (*medium*) ou contenant des anticorps anti-CD4 ou anti-DC-SIGN.**

**Q2 : Analysez les résultats présentés dans la figure 1. Qu'en concluez-vous ?**

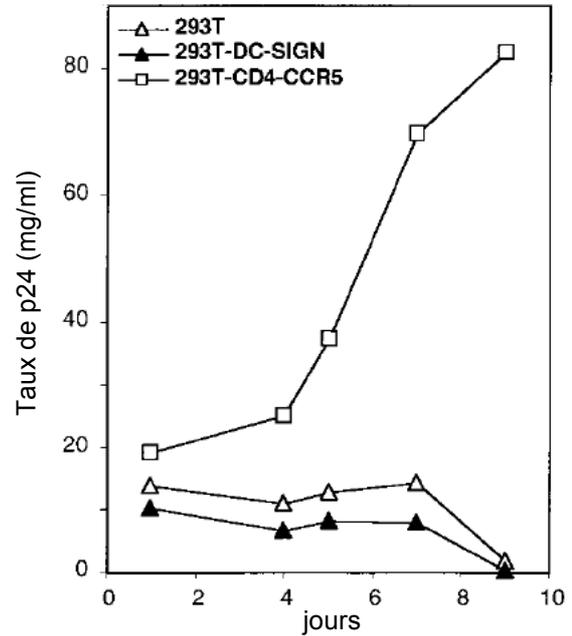
Expérience 2 :

Cette expérience a été réalisée avec des cellules 293T (fibroblastes humains) transfectées, ou non, avec les séquences codantes de CD4 et CCR5 ou DC-SIGN. Ces cellules ont été exposées 2 heures à des particules virales du VIH-1, lavées pour éliminer les virus libres, puis mises en culture à 37°C dans le milieu de culture habituel. Le taux de **protéine p24 (capside du VIH)** a alors été mesuré quotidiennement dans le milieu de culture (sur une période de 9 jours). Les résultats sont présentés dans la figure 2.

**Figure 2 : taux de p24 mesuré dans le milieu de culture après infection par le VIH-1.**

L'expérience a été réalisée sur trois types de cellules :

- cellules 293T non transfectées,
- cellules 293T-DC-SIGN transfectées avec la séquence codante de DC-SIGN,
- cellules 293T-CD4-CCR5 transfectées avec les séquences codantes de CD4 et CCR5.



**Q3 : Que reflète le taux de p24 dans le milieu de culture ?**

**Q4 : Analysez les résultats de la figure 2. Les trois catégories de cellules testées sont-elles permissives ou non au VIH-1 ? (Justifiez)**

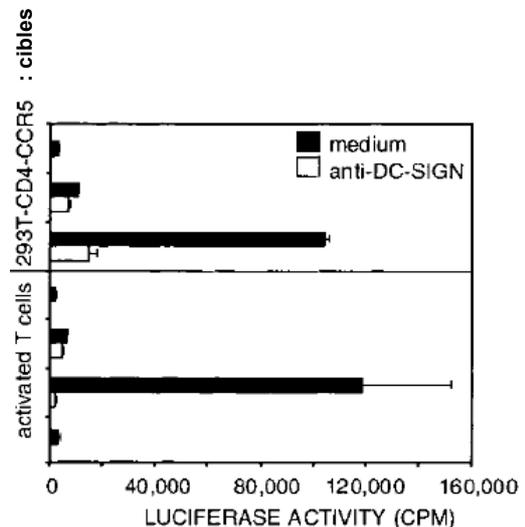
Expérience 3 :

Des particules virales sont incubées 1 heure à 37°C seules (-) ou en présence de cellules non infectables par le VIH : des cellules THP-1 ou des cellules THP-DC-SIGN. Ces cellules ont été pré-incubées 20 min en présence d'anticorps anti-DC-SIGN (« anti-DC-SIGN », histogrammes blancs) ou en absence d'anticorps (« medium », histogrammes noirs). Ces suspensions sont ensuite ajoutées soit à des cellules 293T-CD4-CCR5 (cf expérience 2), soit à des lymphocytes T activés (sensibles et permissifs au VIH). Pour ces expériences, les chercheurs ont utilisé des virus VIH modifiés dont le génome renferme la séquence codante du gène de la luciférase (VIH-luc). Après 2 jours, l'activité luciférase est mesurée dans les lysats cellulaires. Les résultats sont présentés dans la figure 3.

**Figure 3 : Mesure d'activité luciférase dans des cellules cibles (293T-CD4-CCR5 et lymphocytes T) infectées avec le virus VIH-luc.** Avant infection, les virus sont pré-incubés, ou non, avec différents types de cellules (THP1 ou THP-DC-SIGN).

Cellules :

- 
- THP-1
- THP-DC-SIGN
- 
- THP-1
- THP-DC-SIGN
- CD4<sup>+</sup> T cells



**Q5 : Analysez les résultats de l'expérience 3. En particulier, précisez :**

- dans quelle(s) condition(s) observe-t-on une infection optimale des 293T-CD4-CCR5 et des lymphocytes T activés ?
- la protéine DC-SIGN est-elle impliquée dans l'infection par le VIH ?

Des études d'immunohistochimie ont été réalisées sur les muqueuses susceptibles d'être exposées au VIH lors de la transmission virale par voie sexuelle. Ces études indiquent que les DCs résidentes de ces muqueuses expriment fortement DC-SIGN, ainsi que CD4, mais pas la molécule CCR5.

**Q6 : Proposez un modèle rendant compte du rôle de la molécule DC-SIGN dans l'infection des lymphocytes T (ganglionnaires) par le VIH (un schéma clairement annoté sera le bienvenu).**