

Immunité naturelle

I. Les récepteurs Toll

Pour se défendre contre les microorganismes, les vertébrés disposent de systèmes de défense immunitaire innée qui pré-existent chez tous les individus et qui sont activés dans les minutes qui suivent l'infection.

La reconnaissance des pathogènes se fait en partie grâce à des récepteurs « Toll » présents sur les cellules du système immunitaire qui reconnaissent spécifiquement des composants bactériens (lipopolysaccharide LPS, lipoarabinomanan LAM, lipopeptides, peptidoglycane ou ADN) et des composants fongiques.

On se propose d'étudier les mécanismes d'action de certains récepteurs Toll, et leur rôle dans les réponses immunitaires innées.

1^{ère} partie

Dans une 1^{ère} expérience, des sous-populations de leucocytes humains – lymphocytes T et B, lymphocytes Th1 et Th2, monocytes, polynucléaires (PMN), cellules dendritiques (DC), et cellules tueuses naturelles (NK) – ont été préparées et mises en culture *in vitro* en absence ou en présence des stimuli indiqués pendant 3 heures. L'ARN total des cellules a été extrait et des « Northern Blot » ont été réalisés pour détecter les transcrits des récepteurs Toll 1 à 5 (TLR 1 à 5) (Figure 1).

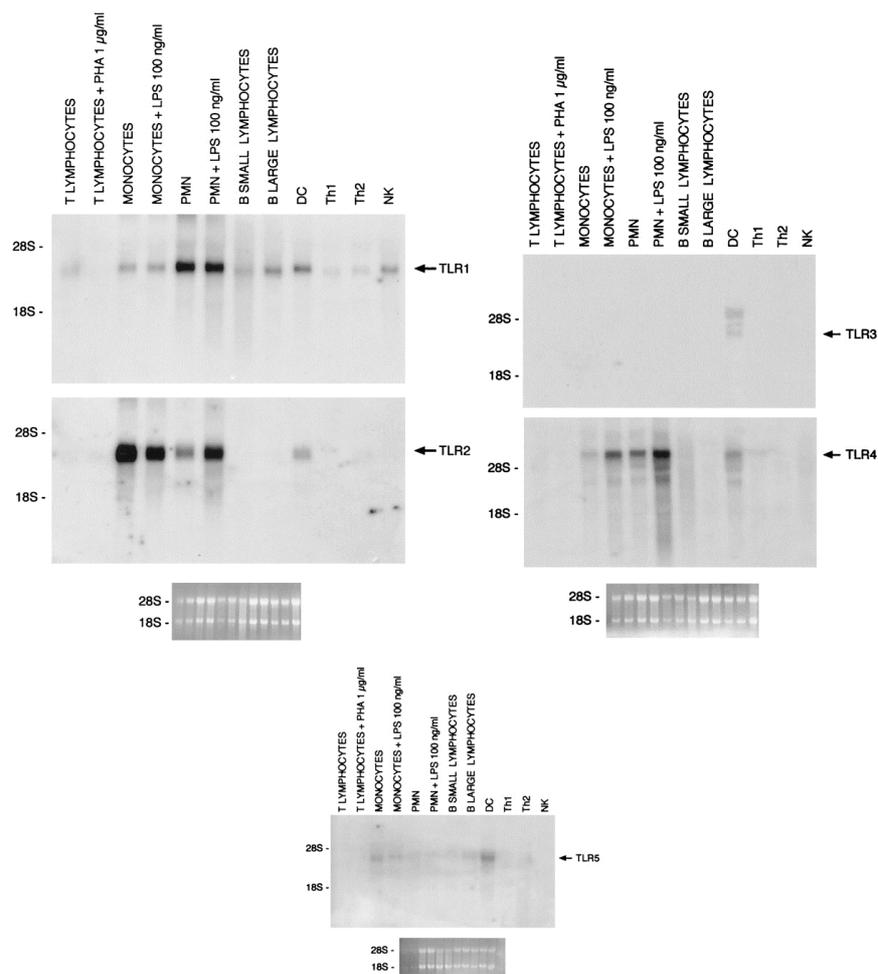


Figure 1 : Expression de TLR1 à 5 dans différentes cellules du système immunitaire.

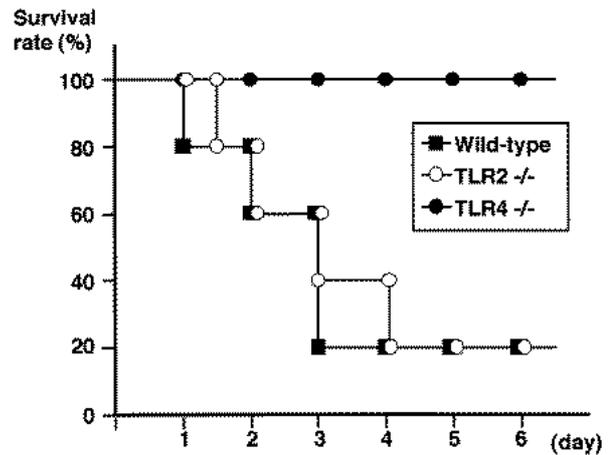
Question 1. Que pouvez-vous conclure de l'expression des récepteurs Toll par les différents types cellulaires ? Pourquoi a-t-on traité certains types cellulaires par la PHA ou le LPS ? Quels sont les effets de la stimulation des cellules par la PHA ou le LPS sur l'expression de ces récepteurs ?

2^{ème} partie

Pour étudier *in vivo* le rôle des récepteurs Toll 2 et 4 (TLR2 et TLR4), des souris sauvages (wild-type), déficientes pour TLR2 (TLR2^{-/-}) ou pour TLR4 (TLR4^{-/-}) ont reçu des injections de fortes doses de LPS (qui induisent un choc endotoxique entraînant la mort des animaux), et leur survie a été observée (Figure 2).

Figure 2 :

Les souris ont reçu une injection de 1mg de LPS par voie intrapéritonéale. La mortalité des animaux a été suivie pendant 6 jours.

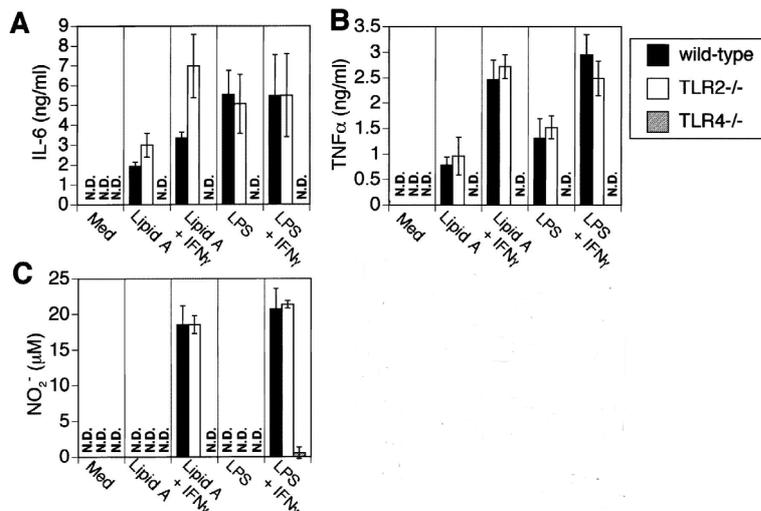


Question 2. Quelle conclusion tirez-vous de cette expérience ?

Des macrophages provenant de souris sauvages, de souris TLR2^{-/-} ou de souris TLR4^{-/-} ont été mis en culture en absence ou en présence d'IFN γ , et traités avec 1ng/ml de LPS dérivé de *Salmonella minnesota* ou de lipide A dérivé de *E. coli*, pendant 24 heures. Les productions d'IL-6, d'oxyde nitrique (NO $_2^-$) et de TNF- α ont été mesurées dans les surnageants de culture (Figure 3).

Figure 3 :

(ND : non détecté)

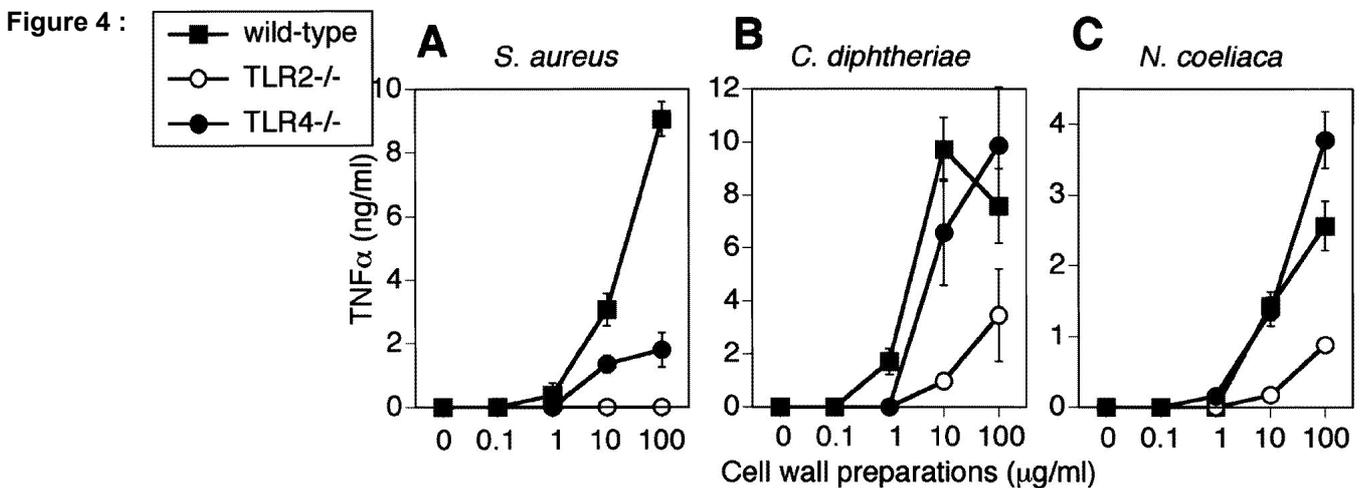


Question 3. Pourquoi a-t-on dosé les concentrations d'IL-6, de TNF- α et d'oxyde nitrique ?
Rappelez les rôles de ces molécules dans la réponse immunitaire innée.

Question 4. Quel est l'effet de l'IFN γ ?

Question 5. Quels sont les rôles respectifs des récepteurs TLR2 et TLR4 dans les réponses au LPS et au lipide A ?

La réponse à des composants de bactéries à gram positive (*S. aureus*, *Corynebacterium diphtheriae* et *Nocardia coeliaca*) a été étudiée. Pour cela, des macrophages provenant de souris sauvages, de souris TLR2 $^{-/-}$ ou de souris TLR4 $^{-/-}$ ont été mis en culture pendant 24 heures en absence ou en présence de concentrations croissantes des composants de bactéries gram +. La production de TNF- α a été mesurée dans les surnageants de culture (Figure 4).



Question 6. Commentez les résultats de cette expérience. Quelles conclusions faites-vous sur la spécificité des récepteurs toll ?

Un autre récepteur Toll a été identifié par la suite, il s'agit de TLR9. Les auteurs ont étudié *in vivo* le rôle de ce récepteur, en utilisant des souris déficientes pour TLR9 (TLR9 $^{-/-}$). Les macrophages de souris sauvages (wild type) ou de souris TLR9 $^{-/-}$ ont été mis en culture en absence ou en présence d'IFN γ , et traités avec de l'ADN bactérien (CpG ODN), du LPS ou du peptidoglycane (PGN). Les productions de TNF- α , d'IL-6 et d'IL-12 ont été mesurées dans les surnageants de culture (Figure 5).

La survie des souris TLR9 $^{-/-}$ en réponse à une injection d'une forte concentration d'ADN bactérien a également été évaluée (Figure 6).

Figure 5 :

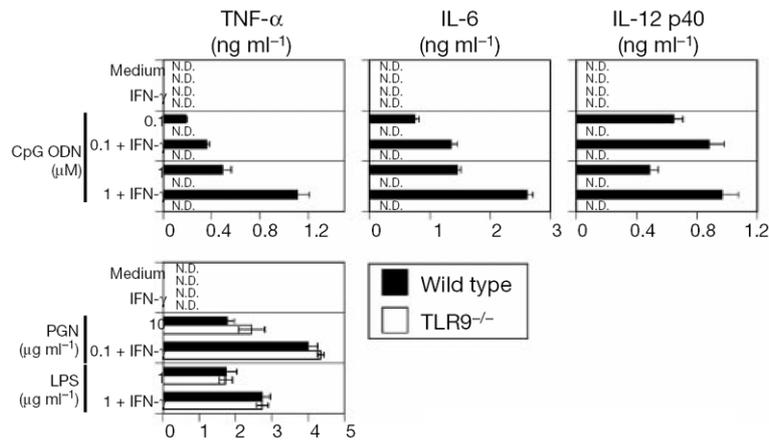
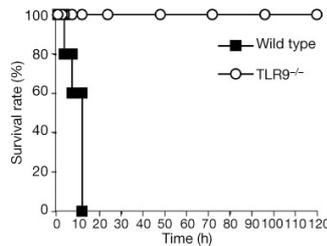


Figure 6 :



Question 7. Décrivez les résultats obtenus. Quels éléments nouveaux apportent ces 2 expériences ?

3^{ème} partie

Les auteurs ont ensuite identifié les mécanismes moléculaires intracellulaires intervenant lors de l'activation de TLR2 et TLR4. Pour cela, des macrophages provenant de souris sauvages, de souris TLR2^{-/-} ou de souris TLR4^{-/-} ont été traités pendant 20 minutes avec 1 ng/ml de LPS provenant de *S. minnesota* (LPS) ou avec 10 μg/ml de PGN provenant de *S. aureus*. Les cellules ont été lysées, les lysats immunoprécipités avec un anticorps anti-IRAK1 et l'activité kinase de la protéine IRAK a été mesurée *in vitro* (auto). Parallèlement un western blot anti-IRAK a été réalisé (WB) (Figure 7A et B).

L'activation de NF-κB dans des extraits nucléaires a ensuite été déterminée à différents temps après le traitement par le LPS ou le PGN, en réalisant une expérience de retard de migration sur gel (Figure 7C et D).

Question 8. Décrivez la technique de retard de migration sur gel. Pourquoi était-il recommandé d'effectuer un Western blot anti-IRAK ? Interprétez les résultats obtenus dans la Figure 7.

Des auteurs ont décrit que des souris déficientes en MyD88 ne répondent pas au LPS, ni à aucun composant bactérien comme par exemple, le PGN, les lipoprotéines ou l'ADN hypométhylé bactérien.

Ainsi, des macrophages provenant de souris déficientes en MyD88, qu'ils soient stimulés par le LPS ou le lipide A ne produisent pas d'IL-6, pas de TNF-α, et pas d'oxyde nitrique.

Les macrophages provenant de souris sauvages ou de souris MyD88^{-/-} ont été traités pendant 10, 20 et 60 minutes avec 2 μg/ml de lipide A. Les cellules ont ensuite été lysées, les lysats immunoprécipités avec un anticorps anti-IRAK et l'activité kinase de la protéine IRAK a été mesurée *in vitro* (Auto). Parallèlement un western blot anti-IRAK a été réalisé (WB) (Figure 8).

Figure 7 :

(C et D) : les extraits nucléaires des cellules ont été incubés avec une sonde spécifique contenant un site de fixation pour NF- κ B. Les complexes inductibles contenant NF- κ B sont indiqués par les flèches.

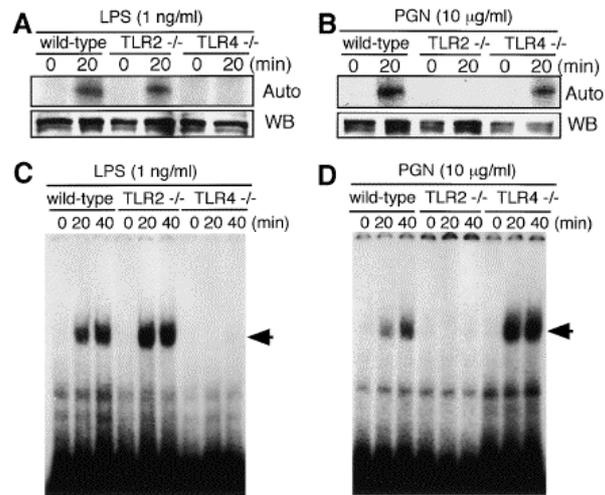
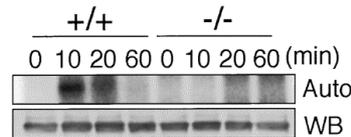


Figure 8 :



Question 9. En utilisant vos connaissances et les résultats de ces expériences, faites un schéma récapitulatif de la voie de transduction des récepteurs Toll.

II. Étude de cas : l'œdème angioneurotique héréditaire

Régulation de l'activation de complément.

Le complément est un système des protéines du plasma qui participe à une cascade de réactions produisant des composants actifs qui conduisent à la destruction des pathogènes et des complexes immuns et à leur élimination. L'activation de complément est généralement limitée à la surface des pathogènes et aux complexes immuns circulants.

Le complément peut être activé par l'une des trois voies suivantes : la voie classique activée par les complexes antigène:anticorps ou les anticorps fixés à la surface des pathogènes ; la voie dépendante des lectines activée par les cytokines sécrétées par les macrophages ; et la voie alternative, dans laquelle le complément est activé spontanément à la surface de certaines bactéries. Les premières étapes de chaque voie consiste en une série d'événements de clivages protéolytiques conduisant à la formation d'une convertase, une sérine-protéase qui clive le composant C3 du complément et amorce les actions effectrices du complément. Les convertases de C3 produites par ces trois voies sont différentes, mais homologues. Les composants, les voies d'activation et les fonctions principales du complément sont récapitulés sur la Figure 9.

La molécule effectrice principale, centrale dans l'activation de ce système, est le grand fragment de clivage de C3, C3b. Si la molécule active C3b, ou son homologue C4b moins puissant, se lie à la surface d'une cellule de l'hôte au lieu d'un pathogène, la cellule peut être détruite. Cette destruction accidentelle est normalement inhibée par l'hydrolyse rapide de C3b active (et C4b) lorsqu'elle ne se lie pas immédiatement à une surface. Des protéines régulatrices assurent aussi une protection contre l'activation inopportune du complément.

L'inhibiteur le plus puissant de la voie classique est l'inhibiteur C1 (C1INH). Il appartient à une famille d'inhibiteurs des sérine-protéase (appelés *serpines*) qui représentent 20 % de toutes les protéines de plasma. En plus d'être l'unique inhibiteur connu de C1, C1INH contribue à la régulation des sérine-protéases du système de coagulation et du système des *kinines*, qui est activé lors de lésions vasculaires ou par certaines toxines bactériennes.

C1INH intervient dans la 1^{ère} étape de la voie classique du complément, quand C1 se lie aux molécules d'immunoglobuline à la surface d'un pathogène ou d'un complexe antigène:anticorps (Figure 10). La liaison de deux complexes en tulipe (ou plus) du composant C1q est requise pour déclencher l'activation séquentielle des

deux sérine-protéases associées, C1r et C1s. C1INH inhibe ces deux sérine-protéases et les dissocie de C1q. Par ce mécanisme, C1INH limite le temps pendant lequel les molécules C1 fixées à l'anticorps peuvent cliver C4 et C2 pour produire C4b,2b, la convertase de C3 de la voie classique.

Figure 9 :

Overview of the main components and effector actions of complement.

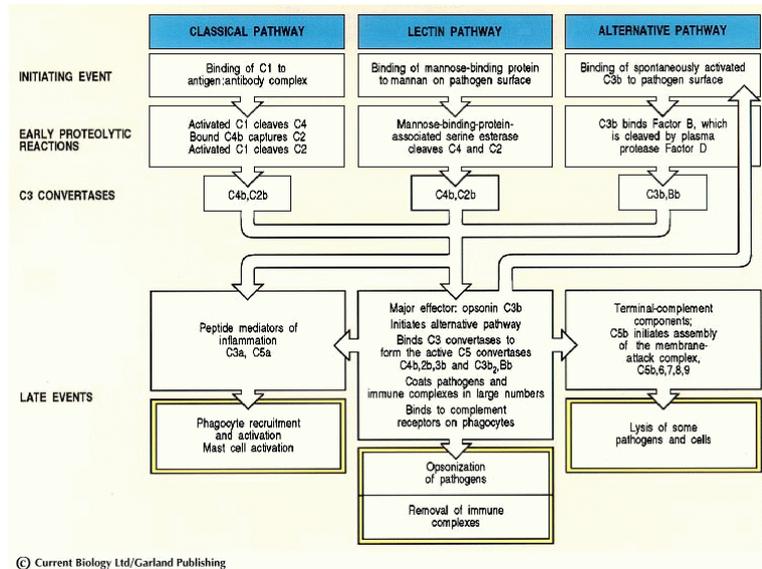
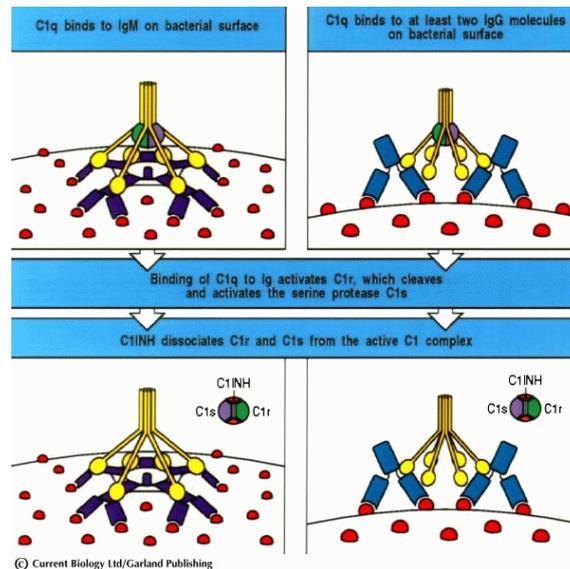


Figure 10 :

Activation of the classical pathway of complement and intervention by C1INH.



L'activation de C1 peut aussi se produire spontanément sans liaison à un complexe antigène:anticorps, et peut être déclenchée davantage par la *plasmine*, une protéase du système de coagulation, qui est également normalement inhibée par C1INH. En absence de C1INH, d'autres composants du complément peuvent ainsi être activés comme on le voit dans l'œdème angioneurotique héréditaire (OANH), une maladie causée par un déficit génétique de C1INH.

Étude du cas de Richard Crafton.

Richard Crafton avait 17 ans lorsqu'il a ressenti une douleur abdominale sévère à la fin d'un jour d'école. La douleur était caractérisée par des spasmes aigus fréquents et il a commencé à vomir. Après 3 heures, la douleur est devenue insupportable et il s'est rendu aux urgences de l'hôpital local. À l'hôpital, l'interne qui l'a examiné n'a trouvé aucune anomalie majeure, notamment pas de manifestation clinique d'une appendicite. Richard a continué à vomir toutes les 5 minutes indiquant que la douleur empirait.

Un chirurgien a été appelé. Il a été d'accord avec l'interne que Richard avait une condition abdominale aiguë, mais était incertain sur le diagnostic. Les analyses de sang ont montré un compte de globule rouge élevé, révélateur d'une déshydratation. Le chirurgien a décidé d'entamer une chirurgie abdominale exploratoire.

Une grande incision médiane a révélé un jejunum modérément gonflé et pâle sans autre anomalie. Le chirurgien a procédé à l'ablation l'appendice qui était normal. Richard a récupéré et est retourné à l'école 5 jours plus tard.

Ce que Richard a omis de mentionner est que, bien qu'il n'ait jamais eu de telles douleurs abdominales, il avait déjà eu des épisodes de douleurs abdominales depuis l'âge de 14 ans. Personne aux urgences ne lui a demandé s'il prenait une médication ou s'il avait connaissance d'antécédents familiaux similaires ; on aurait pourtant appris que la mère de Richard, un oncle maternel et la grand-mère maternelle avaient aussi des épisodes récurrents de douleurs abdominales sévères, de même que sa sœur de 19 ans.

Nouveau-né, Richard était sujet à des coliques sévères. A l'âge de 4 ans, un coup à la tête avait entraîné un gonflement anormal. Quand il avait 7 ans, un coup avec une batte de base-ball avait entraîné un doublement de son avant-bras gauche. Dans les deux cas, le gonflement n'avait pas été douloureux, ni n'était rouge ou démangeait ; il avait complètement disparu après 2 jours. A l'âge de 14 ans, il a commencé à se plaindre de douleurs abdominales tous les deux ou trois mois, parfois accompagnées de vomissements et, plus rarement, de diarrhées.

La mère de Richard l'avait emmené consulter un immunologiste à l'âge de 4 ans qui, écoutant l'histoire familiale, a immédiatement soupçonné un œdème angioneurotique héréditaire (AONH). Le diagnostic a été confirmé par la mesure des composants clés du complément. Le niveau de C1INH était 6 fois inférieur à la normale et le niveau de C4 était largement diminué, tandis que le niveau de C3 était normal.

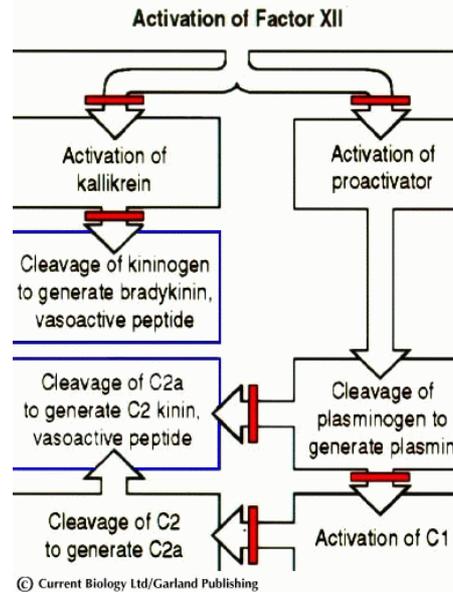
Lorsque Richard a eu 20 ans, le C1INH purifié est devenu disponible. A plusieurs reprises, une injection intraveineuse a pu soulager, en 25 minutes, les douleurs abdominales ou certains épisodes de gonflement de la lèvre, de l'arrière-bouche et du larynx. Par la suite, Richard s'est marié et a eu deux enfants chez lesquels le taux de C1INH est normal.

L'œdème angioneurotique héréditaire.

Les individus qui, comme Richard, présente un déficit héréditaire de C1INH, sont soumis à des épisodes récurrents de gonflements circonscrits de la peau, de l'intestin et des voies aériennes. Quand le gonflement survient au niveau de l'intestin, il entraîne des douleurs abdominales sévères et une obstruction de l'intestin cause de vomissements. Quand le colon est affecté, une diarrhée aqueuse sévère peut survenir. Le gonflement du larynx est le symptôme le plus dangereux puisque le patient peut rapidement étouffer. De tels épisodes peuvent être déclenchés par un traumatisme, les menstruations, un exercice excessif, l'exposition à des températures extrêmes, ou le stress. Ces types d'événements sont associés à l'activation de quatre sérine-protéases, qui sont normalement inhibées par C1INH. Au sommet de cette cascade on trouve le Facteur XII qui active, directement ou indirectement, les trois autres (Figure 11). Le facteur XII est activé par les lésions vasculaires et amorce la cascade des *kinines*, activant la *kallikréine*, qui produit le peptide vasoactif *bradykinine*. Le facteur XII active également indirectement la *plasmine*, qui, comme mentionné plus haut, active C1 lui-même. La *plasmine* clive aussi C2a pour produire un fragment vasoactif appelé C2 *kinine*. Chez des patients déficients pour C1INH, l'activation non contrôlée du Facteur XII entraîne l'activation de la *kallikréine* et de la *plasmine* ; la *kallikréine* catalyse alors la formation de *bradykinine* et la *plasmine* active C1, qui clive C2, produisant le petit fragment, C2a, à nouveau clivé par la *plasmine* pour produire la C2 *kinine*. La *bradykinine* et la C2 *kinine* augmentent la perméabilité des veinules post-capillaires en causant la contraction des cellules endothéliales créant des espaces dans la paroi des vaisseaux sanguins ; c'est ce qui est la cause de l'œdème. Le mouvement de liquide de l'espace vasculaire vers un autre compartiment du corps, comme l'intestin, cause les symptômes de déshydratation lorsque le volume vasculaire diminue.

Figure 11 :

Pathogenèse de l'œdème angio-neurotique héréditaire.[AS3] Les barres grises indiquent les points d'inhibition par C1INH.



Question 1. L'activation du système du complément aboutit à la production d'histamine et de chimiokines qui causent normalement de la douleur, de la chaleur et des démangeaisons. Pourquoi, dans le cas de l'OANH, le liquide de l'œdème est-il sans composants cellulaires et pourquoi le gonflement ne cause-t-il pas de démangeaisons ?

Question 2. Richard présente un taux manifestement réduit de C4 dans le sang du fait du clivage rapide par C1 activé. Quel autre composant de complément vous attendriez-vous à trouver diminué ? Vous attendriez-vous à ce que les taux des composants de la voie alternative soient bas, normaux ou élevés ? Qu'en est-il des composants terminaux ?

Question 3. Malgré le déficit du complément observé, les patients atteints de OANH ne sont pas excessivement susceptibles aux infections. Pourquoi ?

Question 4. La Figure 12 montre l'arbre généalogique de Richard. Quel est le mode de transmission (dominant ou récessif, lié de sexe ou pas) de l'OANH ? Les deux enfants de Richard peuvent-ils transmettre la maladie à leurs enfants ?

Figure 12 :

La transmission de l'OANH dans la famille de Richard.

