

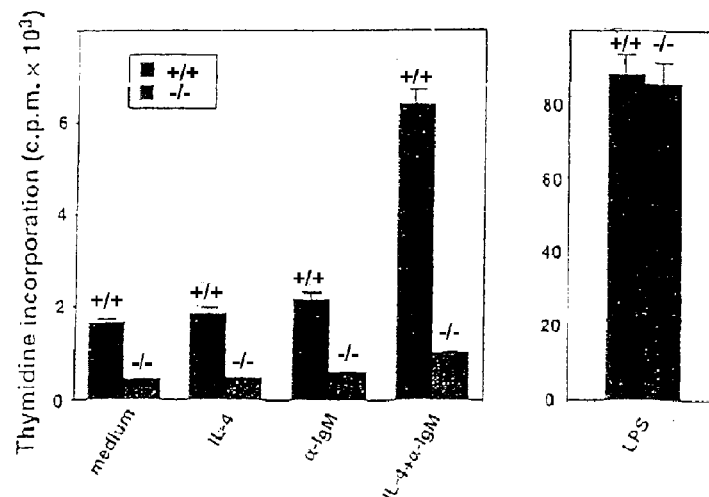
Immunité anti-infectieuse ; Sensibilité aux infections

I.

Les cytokines activent la phosphorylation de nombreuses protéines intracellulaires, dont les facteurs de transcription de la famille Stat (*Signal Transducers and Activators of transcription*). Une fois phosphorylés, ces facteurs de transcription Stat se dimérisent, vont dans le noyau et activent l'expression de gènes. On étudie le rôle du facteur de transcription Stat6 dans la réponse des lymphocytes B et T à l'IL4, une cytokine produite par les lymphocytes T, les mastocytes et les basophiles. Pour cela on produit des souris où le gène codant pour Stat6 a été invalidé.

On analyse la réponse à l'IL4 des lymphocytes B des souris normales (+/+) et des souris invalidées (-/-). Pour cela, on cultive les lymphocytes B au repos en présence d'IL4 recombinante additionnée ou non de Fab'2 d'anti-IgM, ou en présence de LPS et on mesure la prolifération cellulaire par incorporation de [³H]-Thymidine au jour 2 de la culture. Les résultats obtenus sont présentés sur la **Figure 1**.

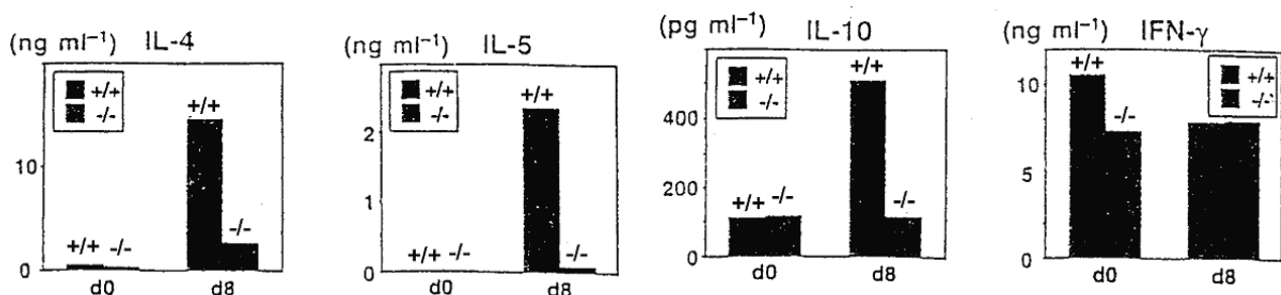
Figure 1



Question 1. Comment interprétez-vous ces résultats ?

On analyse ensuite la réponse des lymphocytes T des souris +/+ et -/- au jour 0 ou au jour 8 de l'infection des souris par *Nippostrongylus brasiliensis*, un parasite qui active les réponses de type Th2. Pour cela on isole les lymphocytes T spléniques des souris infectées et on les cultive pendant 24h en présence d'anti-CD3. On mesure ensuite par ELISA la concentration de cytokines présentes dans les surnageants de culture (**Figure 2**).

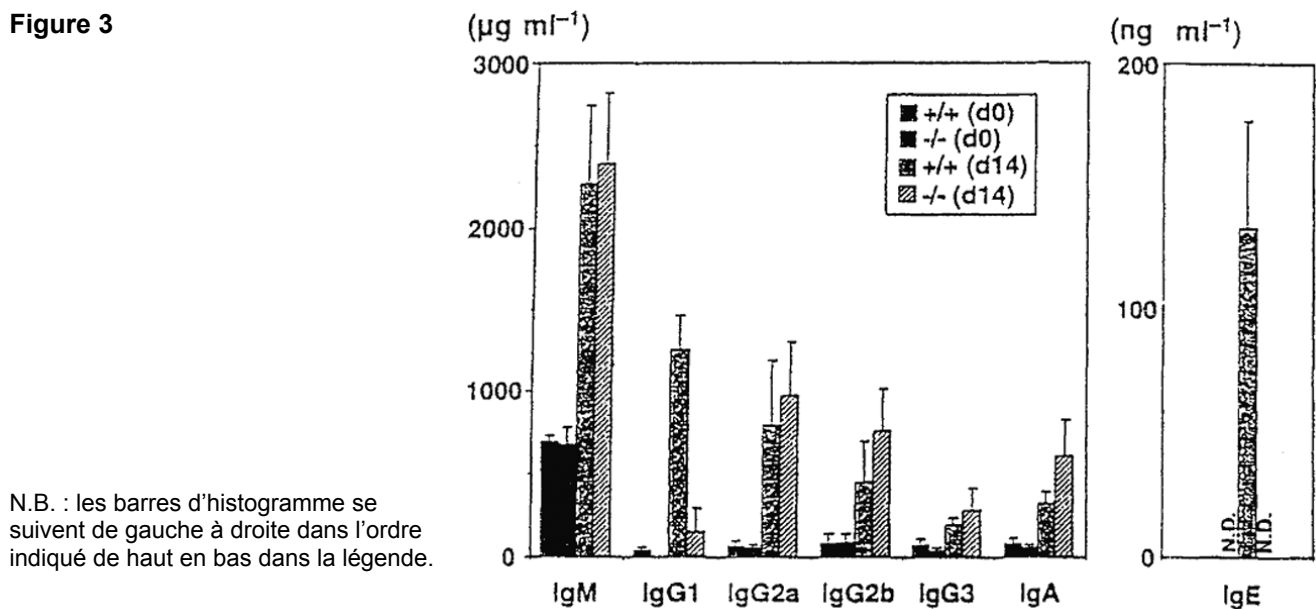
Figure 2



Question 2. Comment interprétez-vous ces résultats ?

L'IL4 est nécessaire pour la commutation isotypique vers les IgE. Aux jours 0 et 14 après infection par *N. brasiliensis*, on mesure la concentration des différents isotypes d'Ig dans les sérums des animaux +/+ ou -/- (Figure 3).

Figure 3



Question 3. Qu'en concluez-vous ?

Question 4. Quel(s) autre(s) gène(s) faudrait-il invalider pour obtenir les mêmes effets ?

II. Sujet d'examen de juin 1998 (2 heures)

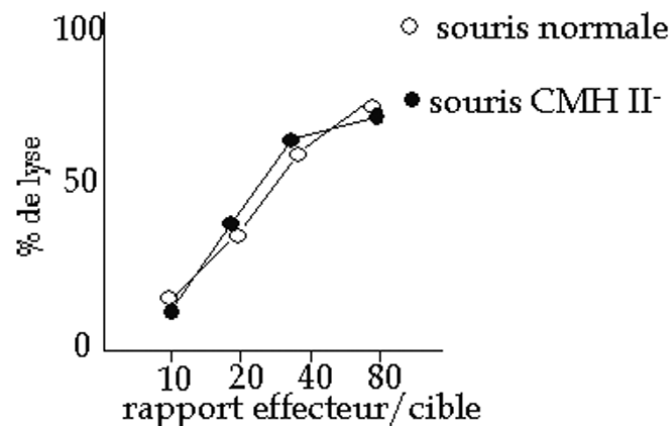
(d'après Thomsen, A.R. *et al.* (1996) *J. Immunol* 157:3074 ; Zajac, A.J. *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:14730)

L'ensemble des expériences suivantes concerne la réponse immunitaire dirigée contre le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) chez la souris. Les parties I et II peuvent être traitées séparément.

Partie I

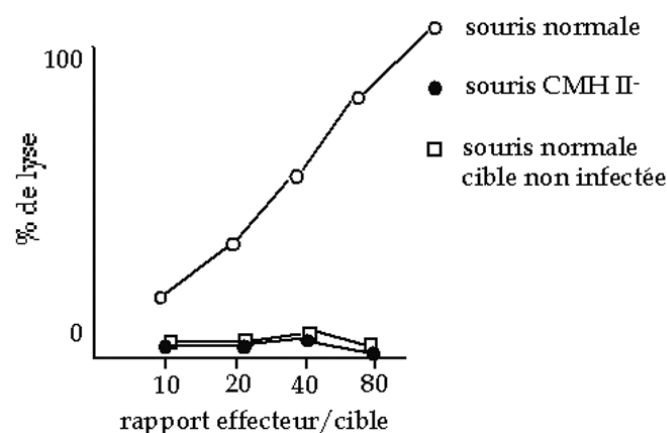
Dans une première expérience, des souris C57BL/6 normales ou déficientes en CMH II (CMH II⁻) sont infectées par le LCMV. Huit jours après l'infection, les rates de ces souris sont prélevées et on compare la capacité des splénocytes de ces souris à lyser des cellules cibles préalablement marquées au ⁵¹Cr. Le résultat de cette expérience est montré à la Figure 4 :

Figure 4



Dans une autre expérience, on infecte des souris avec le LCMV une première fois et une deuxième fois à 80 jours d'intervalles. On mesure alors la capacité des splénocytes extraits de ces souris à lyser des cellules cibles préalablement marquées au ^{51}Cr . Le résultat de cette expérience est montré à la **Figure 5** :

Figure 5



Question 1. Que peut-on conclure de ces expériences ? Quelles hypothèse(s) peut-on formuler pour expliquer le cas des souris CMH II- ?

Des souris CMH II- sont infectées avec le LCMV. 80 jours après, elles sont réinfectées avec le LCMV en même temps que leur sont injectés des splénocytes de souris normales ayant été sensibilisées au LCMV 2 mois avant (**Figure 6A**), ou des splénocytes de souris normales ayant été sensibilisées au LCMV deux mois avant et débarrassés des cellules CD8⁺ juste avant le transfert (**Figure 6B**), ou des splénocytes de souris CMH II- ayant été sensibilisés au LCMV deux mois avant (**Figure 6C**), ou simultanément des cellules provenant de ces dernières souris et les cellules de souris normales ayant été sensibilisées au LCMV deux mois avant et débarrassées des cellules CD8⁺ juste avant le transfert (**Figure 6D**).

Après infection par le LCMV la quantité de virus dans le sang des souris normales ou CMH II- est mesurée en fonction du temps après l'infection. Le résultat est présenté sur la **Figure 7**.

Question 2. Commentez l'ensemble de ces résultats.

Figure 6

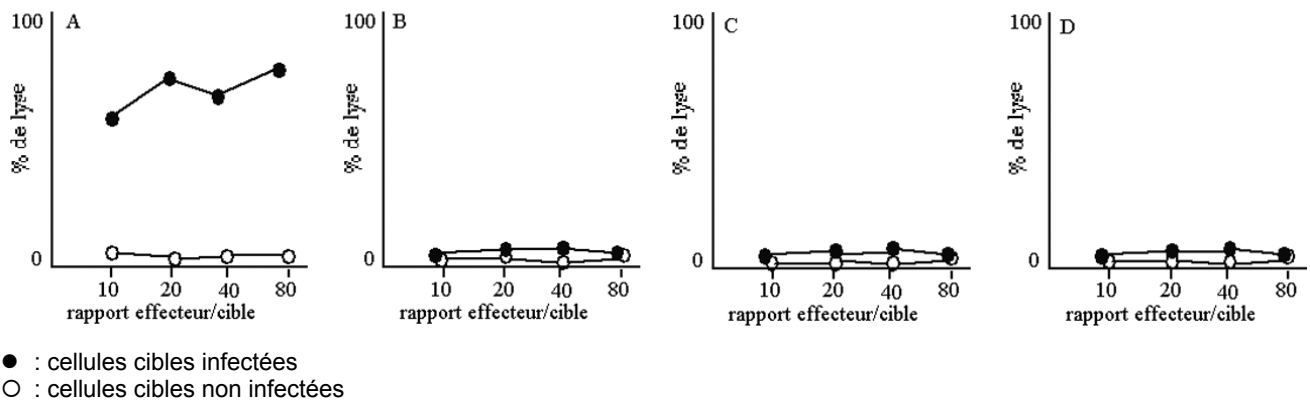
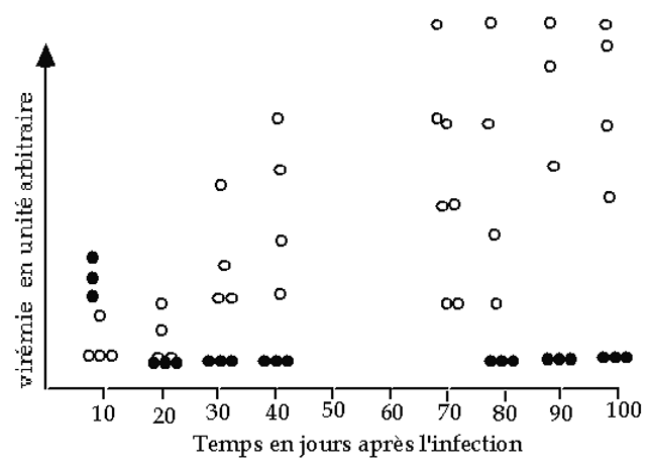


Figure 7

Chaque ● représente une souris normale
Chaque ○ représente une souris CMH II-



Partie II

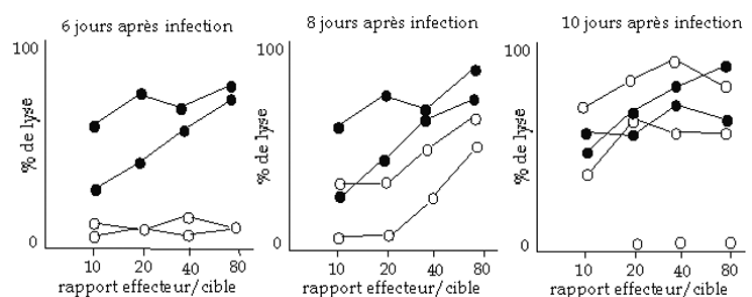
Des souris mutées dans le gène codant pour la chaîne lourde d'immunoglobuline C_μ ont été obtenues par recombinaison homologue (souris μ MT/ μ MT). On constate que ces souris sont dépourvues de lymphocytes B.

Question 3. Expliquez pourquoi.

La capacité des splénocytes de ces souris à lyser des cellules cibles préalablement marquées au ^{51}Cr est évaluée 6, 8 et 10 jours après l'infection. Le résultat de cette expérience est montré en **Figure 8**.

Figure 8

● splénocytes de souris normales
○ splénocytes de souris μ MT/ μ MT

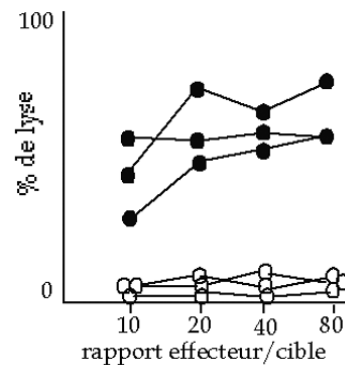


Question 4. Que pouvez-vous observer ? Proposez des hypothèses pour expliquer ces observations.

La capacité des splénocytes de ces souris à lyser des cellules cibles préalablement marquées au ^{51}Cr est évaluée 100 jours après l'infection. Le résultat de cette expérience est montré en **Figure 9**.

Figure 9

- splénocytes de souris normales
- splénocytes de souris $\mu\text{MT}/\mu\text{MT}$



Question 5. *Que peut-on en conclure?*

Partie III

Plusieurs mécanismes de cytotoxicité peuvent être employés par les cellules cibles. Les deux principaux sont:

- 1- Libération de granules contenant perforines et protéases qui une fois libérées perforent et détruisent la cellule cible.
- 2- Induction d'apoptose dans la cellule cible dépendante de la présence de la molécule Fas à la surface de la cellule cible et de la présence de la molécule Fas-L à la surface des CTL.

Contrairement aux souris normales, les souris ne possédant pas de perforine ne peuvent contrôler et juguler l'infection par le LCMV bien qu'elles possèdent de nombreux LT CD4 ou CD8 exprimant Fas-L.

Des souris C57BL/6 dont le gène de la $\beta 2$ -microglobuline a été inactivé par recombinaison homologue (souris $\beta 2\text{-m}^-$) ne possèdent ni molécules de classe I du CMH, ni lymphocytes T CD8.

Question 6. *Expliquez pourquoi.*

En réponse à l'infection par le LCMV, ces souris produisent des lymphocytes T restreints par le CMH II, mais elles sont incapables de combattre l'infection et meurent d'une maladie chronique contrairement aux souris normales.

Question 7. *Que suggèrent ces observations ?*

La lignée cellulaire LB27.4, de même haplotype CMH que la lignée de souris C57BL/6 est sensible à la mort induite par des anticorps anti-Fas.

La lignée 3B10 est une lignée cellulaire dérivée de la lignée LB27.4, qui après irradiation, mutagenèse et sélection est devenue résistante aux anticorps anti-Fas. Des souris C57BL/6 et C57BL/6 $\beta 2\text{-m}^-$ sont infectées par le LCMV. Après 8 jours, on évalue la capacité des splénocytes de ces souris à lyser les cellules cibles LB27.4 et 3B10 infectées par le LCMV. Le **Tableau 1** montre le résultat de cette expérience.

Question 8. *Commentez cette expérience et proposez des hypothèses pour expliquer ce résultat.*

Tableau 1

origine des splénocytes:	C57BL/6	C57BL/6. $\beta 2m^{-}$
cellule cible:		
LB27.4	+	+
3B10	+	-

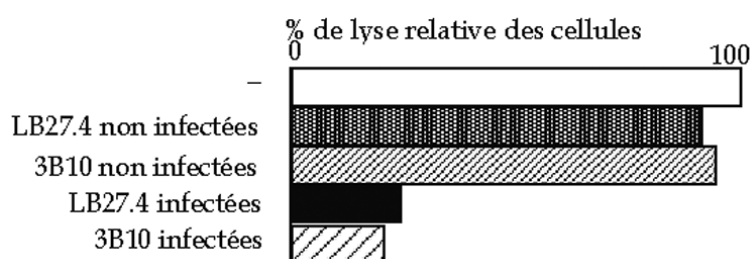
(+): lyse

(-): absence de lyse

On s'intéresse maintenant à la capacité des splénocytes issus de souris C57BL/6. $\beta 2m^{-}$ infectées par le LCMV à lyser les cellules LB27.4 infectées et radiomarquées au ^{51}Cr , en présence de cellules LB27.4 et 3B10 infectées ou non par le LCMV et non radiomarquées. Le résultat de cette expérience est montré sur la **Figure 10**.

Figure 10

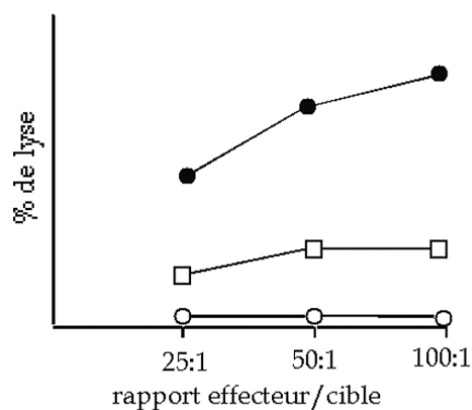
Les splénocytes issus des souris $\beta 2m^{-}$ immunisées par le LCMV sont incubés en présence de cellules LB 27.4 radiomarquées et de cellules LB27.4 ou 3B10 non radiomarquées, infectées ou non par le LCMV.



L'émétine est un inhibiteur de la synthèse des protéines et donc de Fas-L dans les CTL. Ce traitement inhibe la lyse de cellules cibles par la voie dépendante de Fas mais pas par la voie des perforines. On évalue la capacité des splénocytes issus de souris C57BL/6 $\beta 2m^{-}$ infectées par le LCMV et préincubées dans un milieu contenant ou non de l'émétine à lyser les cellules cibles infectées ou non par le LCMV. Le résultat de cette expérience est montré en **Figure 11**.

Figure 11

- cellules effectrices préincubées en milieu normal
- cellules effectrices préincubées en milieu contenant de l'émétine
- cellules cibles infectées
- cellules cibles non infectées



Si l'on transfère les LT CD4 provenant de souris $\beta 2m^{-}$ infectées par le LCMV à des souris $\beta 2m^{-}$ non infectées, les souris receveuses meurent. On réalise la même expérience de transfert dans des souris $\beta 2m^{-}lpr$ (les souris *lpr* sont des souris qui n'expriment pas la molécule Fas). On compare la mortalité obtenue dans les souris receveuses à celles des souris n'ayant pas reçu de cellules (souris non-receveuses). Le résultat de cette expérience est présenté sur le **Tableau 2** dans lequel les chiffres indiquent le nombre de souris étudiées.

Tableau 2

	souris receveuses		souris non-receveuses	
	$\beta 2\text{-m}^-$	$\beta 2\text{-m}^-lpr$	$\beta 2\text{-m}^-$	$\beta 2\text{-m}^-lpr$
Expérience n°1	3/3	non réalisé	0/3	non réalisé
Expérience n°2	2/2	0/4	0/3	0/3
Expérience n°3	2/2	0/2	0/2	0/2
Total	7/7	0/6	0/8	0/5

Question 9. Discutez l'ensemble de ces résultats.

Question 10. Proposez des hypothèses pour expliquer l'incapacité des souris $\beta 2\text{-m}^-$ à juguler l'infection.

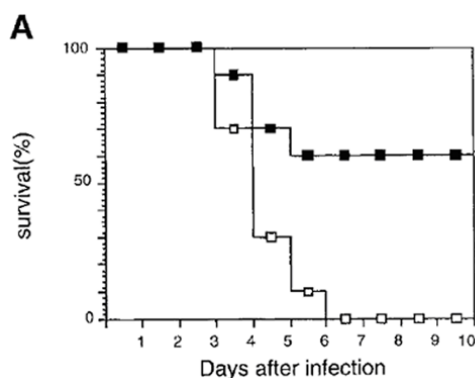
III. Comparaison de la réponse de deux lignées de souris (C57BL/6 et BALB/c) à l'infection par *Listeria monocytogenes*

(d'après Liu *et al.* (2000) *Cellular Immunology* 202:31 ; Liu *et al.* (2002) *Infection & Immunity* 70:6638)

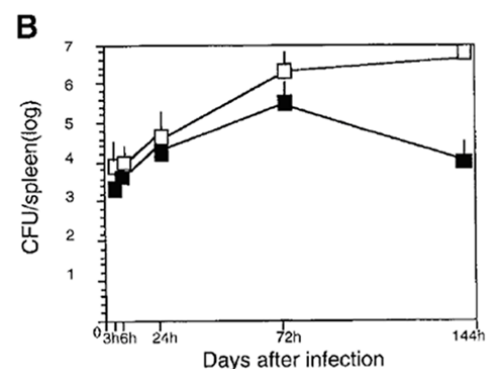
Des souris C57BL/6 et BALB/c sont infectées par injection intraveineuse avec *Listeria Monocytogenes*, une bactérie gram + intracellulaire. Les auteurs étudient la survie des souris et la présence de bactéries dans leur rate. Les résultats sont présentés sur la **Figure 12**.

Question 1. Que peut on conclure de cette expérience ?

Figure 12



□ : BALB/c ; ■ : C57BL/6

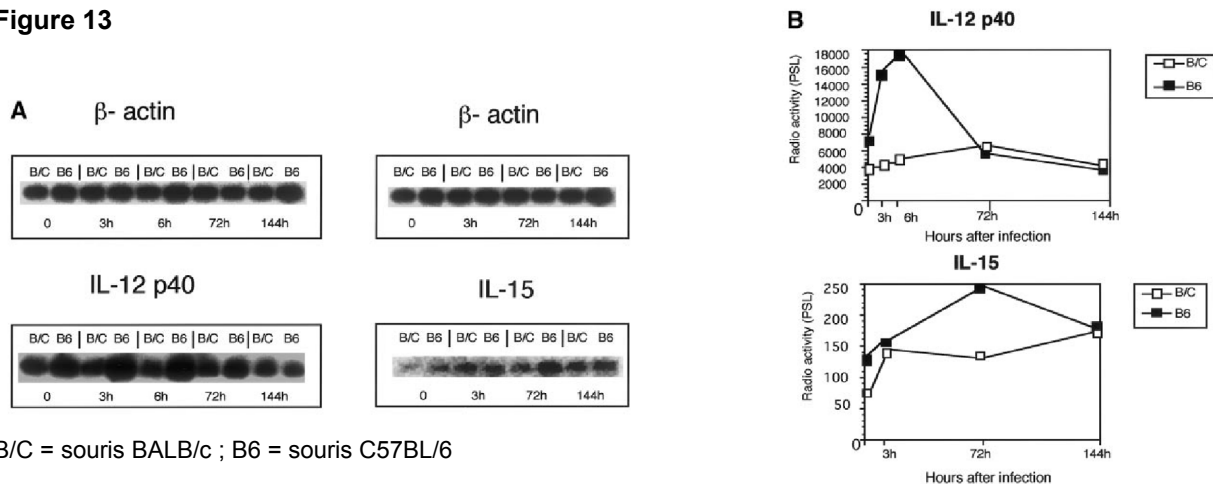


Afin de mieux comprendre la différence observée entre les deux lignées, les auteurs étudient les cytokines produites par les cellules dendritiques de ces souris.

Pour cela ils étudient par RT-PCR l'expression des ARNm de l'interleukine 15 et de la sous unité inducible de l'interleukine 12 (IL12p40). Les ARNm sont amplifiés par RT-PCR et analysés (**Figure 13A**) et quantifiés (**Figure 13B**) après migration sur gel et hybridation avec une sonde radioactive.

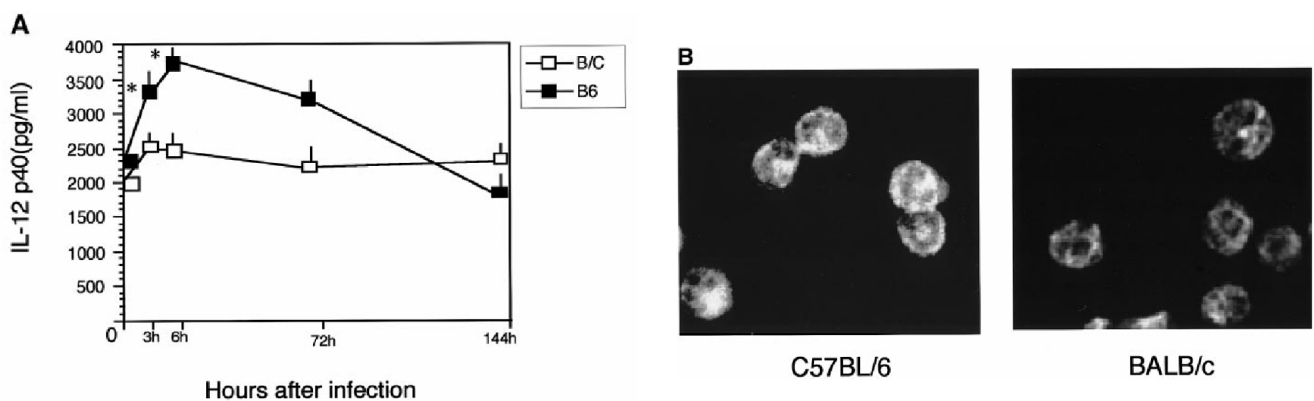
La production de ces cytokines est également étudiée au niveau protéique par ELISA (IL-12) (**Figure 14C**) ou immunofluorescence (IL-15) (**Figure 14D**) .

Figure 13



B/C = souris BALB/c ; B6 = souris C57BL/6

Figure 14



B/C = souris BALB/c ; B6 = souris C57BL/6

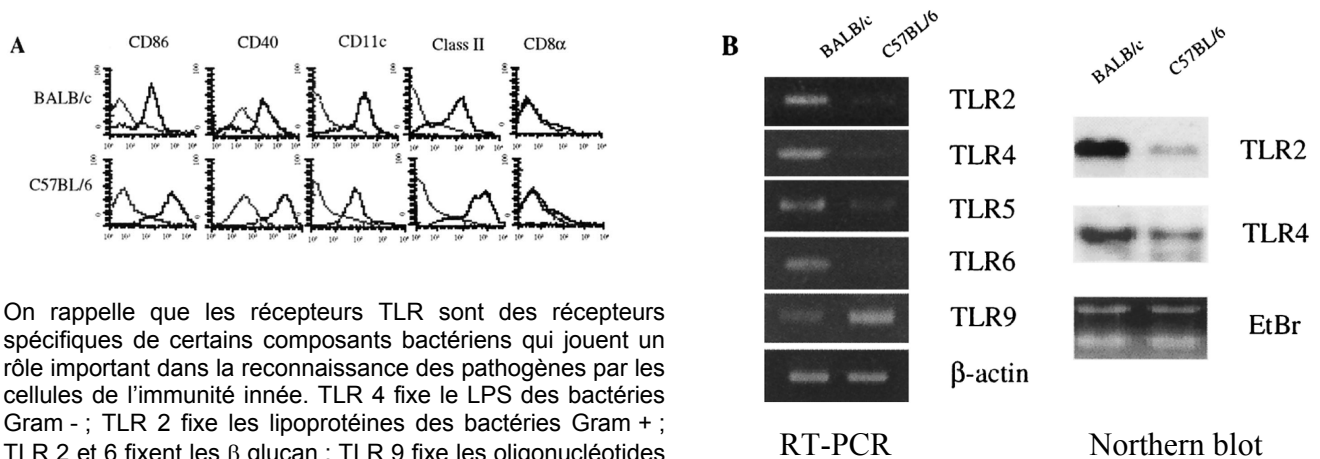
Question 2. Pourquoi étudier la production de cytokines par les cellules dendritiques ?

Question 3. Justifier le choix des cytokines étudiées et des techniques d'étude.

Question 4. Que peut on conclure de ces résultats ?

Les auteurs poursuivent la caractérisation des cellules dendritiques des deux lignées en étudiant différents marqueurs de surface et l'expression d'ARNm de différents récepteurs TLR (*Toll Like receptor*). Les résultats sont présentés sur la **Figure 15**.

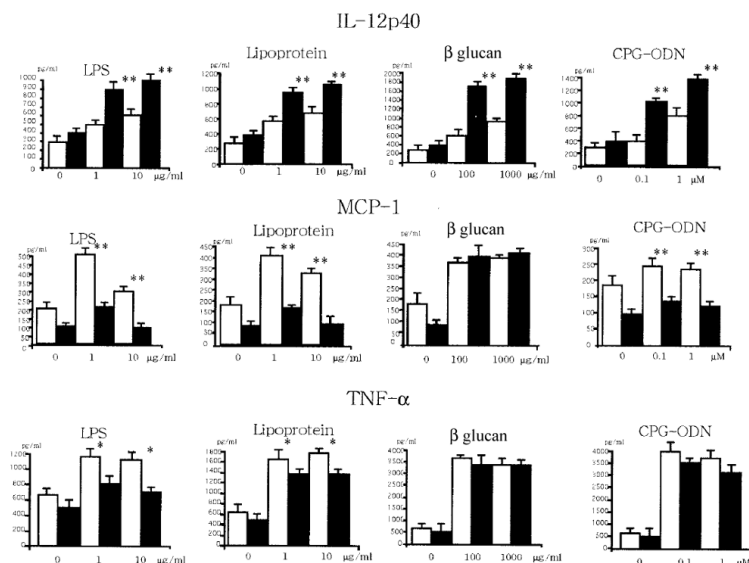
Figure 15



Question 5. A partir de ces résultats quelles hypothèses peut on formuler pour expliquer les différences observées dans les Figure 13 et Figure 14 ?

Les auteurs étudient par ELISA la production de cytokines par les cellules dendritiques des deux lignées de souris en présence de différents composants bactériens. (les cellules dendritiques sont produites à partir de souris naïves et stimulées *in vitro* par les différents produits bactériens indiqués). Les résultats sont présentés dans la Figure 16.

Figure 16



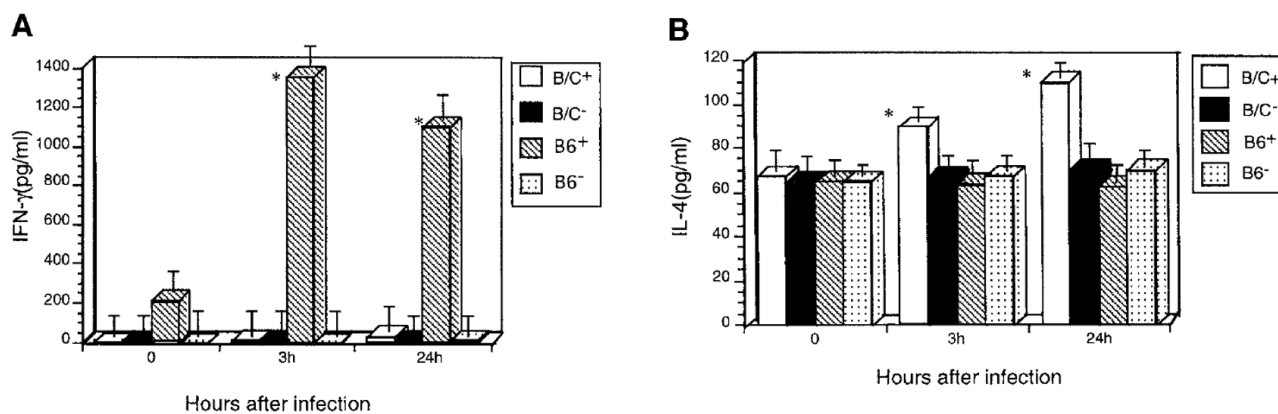
Question 6. Peut on relier ces résultats aux résultats précédents ?

Question 7. Quelles hypothèses peut on faire sur les résultats observés lors d'une infection avec *Listeria monocytogenes* ?

Question 8. Quelles seront les réponses des deux types de souris à d'autres infections bactériennes ?

Les auteurs étudient enfin par ELISA la production de cytokines par les lymphocytes T issus de la rate de souris infectées ou non par *Listeria monocytogenes*. Les résultats sont présentés dans la Figure 17.

Figure 17



B/C+ : BALB/C infectées
 B/C- : BALB/C non infectées
 B6+ : C57BL/6 infectées
 B6- : C57BL/6 non infectées

Question 9. Que peut-on conclure de ces résultats ?

Question 10. Relier les différents résultats obtenus pour expliquer la différence de sensibilité à l'infection par *Listeria monocytogenes* des deux lignées de souris étudiées.