

Université Pierre et Marie Curie (Paris 6)

Epreuve d'Immunologie Fondamentale - juin 2004

Durée de l'épreuve : 3 heures

Vous devez obligatoirement traiter les exercices I, II et III sur des copies distinctes.

Barème indicatif :

Exercice I noté sur 7 points

Exercice II noté sur 6 points

Exercice III noté sur 7 points

Exercice I (noté sur 7 points)

(D'après Lund, J. M., *et al.* (2004) *PNAS* 101:5598)

Les infections virales chez les mammifères mettent en jeu les voies d'activation de l'immunité innée impliquant notamment les TLR (*Toll-like receptors*).

Question 1. *Rappelez les caractéristiques fonctionnelles des TLR. (5 lignes maximum)*

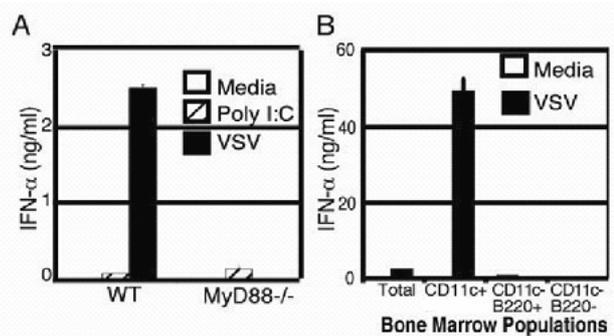
La présente étude s'intéresse à la voie d'activation mise en jeu en réponse à l'infection par des virus à ARN simple-brin comme le VSV (*vesicular stomatitis virus*) et le virus de la grippe (*influenza*). Dans une première expérience, les auteurs mesurent par ELISA la production d'IFN- α par des cellules de moelle osseuse de souris de type sauvage (WT) ou invalidées pour le gène MyD88 (MyD88^{-/-}) cultivées en présence de VSV ou de PolyI:C, un ARN double-brin synthétique. Dans un deuxième temps, une expérience similaire est réalisée à partir de populations de moelle osseuse triées comme indiqué. Les résultats sont montrés sur la **Figure 1**. Par ailleurs, des cellules de moelle osseuse incubées en présence d'ARN simple brin synthétique produisent des quantités comparables d'IFN- α à celles observées pour VSV chez les souris WT et MyD88^{-/-}.

Figure 1

A : Des cellules de moelle osseuse de souris de type sauvage (WT) ou invalidées pour le gène MyD88 (MyD88^{-/-}) ont été cultivées en présence de VSV ou de PolyI:C, un ARN double-brin synthétique, ou sans stimulus (Media). Après 18h de culture, l'IFN- α produit a été mesuré dans les surnageants de culture par ELISA.

B : La même expérience est réalisée à partir de populations triées de moelle osseuse (Total ; CD11c⁺B220⁻ ; CD11c⁻B220⁺ ; CD11c⁻B220⁻).

N.B : La faible production d'IFN- α observée en réponse à polyI:C est néanmoins significative.



Question 2. *A l'aide d'un tableau comparatif, rappelez le principe de l'ELISA et d'une autre technique permettant de mesurer la production de cytokines.*

Question 3. *Analysez ces résultats en comparant les voies d'activation mises en jeu par les ARN double-brin et simple-brin. (5 lignes maximum)*

Question 4. *Quelle population pensez-vous être activée par le VSV ? (5 lignes maximum)*

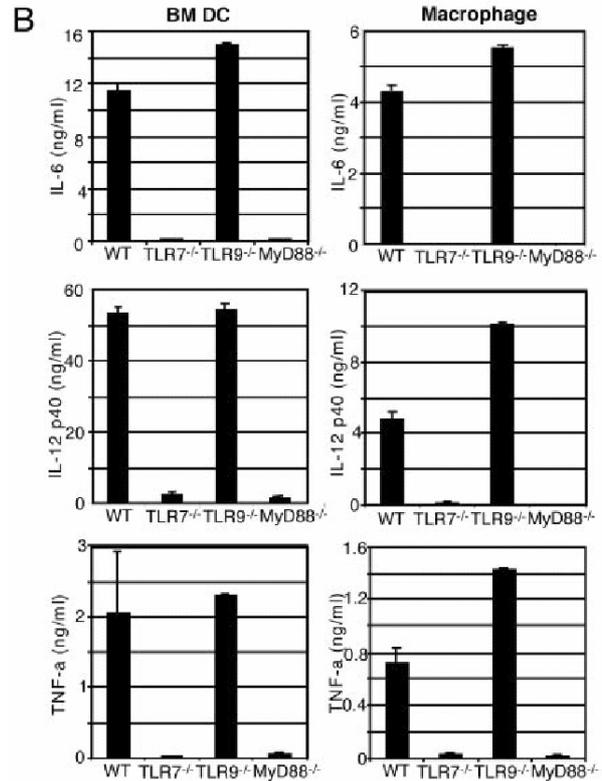
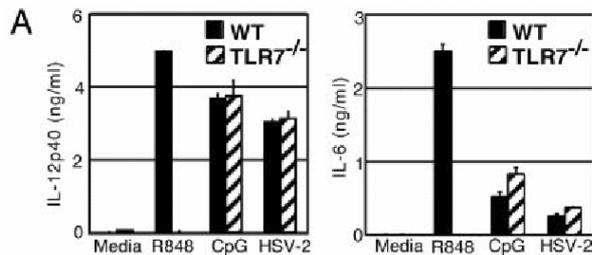
De nombreux TLR sont exprimés par les cellules dendritiques. Etant donné que le mode d'infection du VSV implique un mécanisme d'endocytose, les auteurs ont porté leur attention sur TLR7 et TLR9 qu'on retrouve au niveau des endosomes. La réponse de cellules dendritiques de moelle osseuse ou de macrophages à différents stimulus a été étudiée chez des souris de type sauvage, Myd88^{-/-}, ou invalidées pour TLR7 (TLR7^{-/-}) ou TLR9 (TLR9^{-/-}) (**Figure 2**).

Question 5. *Analysez et commentez ces résultats. (5 lignes maximum)*

Figure 2

A : Des cellules de moelle osseuse de souris de type sauvage (WT) ou invalidées pour TLR7 (TLR7^{-/-}) ont été cultivées en présence de R848 (un ligand synthétique de TLR7), d'ADN CpG ou de HSV2 (un virus à ADN) ou sans stimulus (Media). Après 18h de culture, l'IL-12 et l'IL-6 produites ont été mesurées dans les surnageants de culture par ELISA.

B : Des cellules dendritiques de moelle osseuse (BM DC) et des macrophages de souris de type sauvage (WT), TLR7^{-/-}, invalidées pour le gène TLR9 (TLR9^{-/-}), ou MyD88^{-/-} ont été cultivées en présence de R848. Après 48h de culture, l'IL-6, l'IL-12 et le TNF- α produits ont été mesurés dans les surnageants de culture par ELISA.



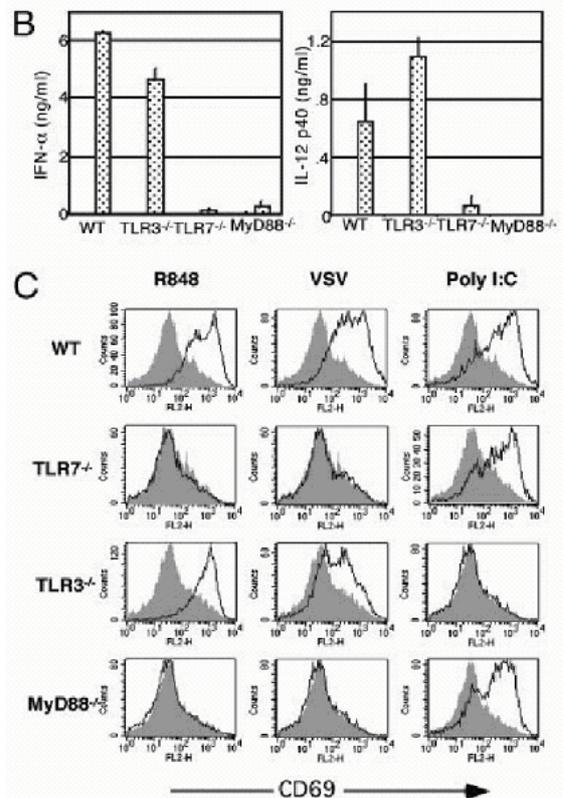
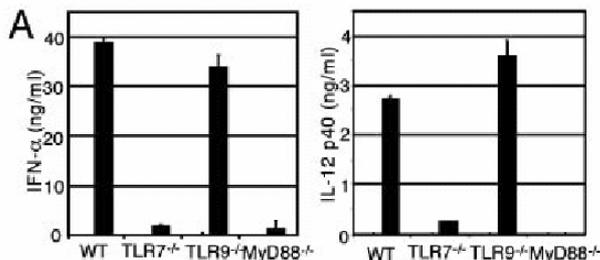
Les auteurs étudient ensuite le rôle de TLR7 pour la production d'IFN- α en réponse aux virus VSV et influenza. La réponse de cellules dendritiques de moelle osseuse a été étudiée chez des souris de type sauvage, TLR7^{-/-}, TLR9^{-/-}, TLR3^{-/-} ou Myd88^{-/-} (Figure 3).

Figure 3

A : Des cellules dendritiques de moelle osseuse de souris de type sauvage (WT), TLR7^{-/-}, TLR9^{-/-} ou MyD88^{-/-} ont été infectées par le virus VSV. Après 18h, l'IFN- α et l'IL-12 produits ont été mesurés dans les surnageants de culture par ELISA.

B : Des cellules de moelle osseuse de souris de type sauvage (WT), TLR3^{-/-} (invalidées pour le gène TLR3), TLR7^{-/-} ou MyD88^{-/-} ont été cultivées en présence de virus influenza. Après 18h, l'IFN- α et l'IL-12 produits ont été mesurés dans les surnageants de culture par ELISA.

C : Des splénocytes de souris de type sauvage (WT), TLR7^{-/-}, TLR3^{-/-} ou MyD88^{-/-} ont été cultivés en présence de R848, de virus VSV ou de PolyI:C. Après 18h de culture, les cellules sont analysées par cytométrie de flux avec un anticorps anti-CD69. Les histogrammes montrent le profil d'expression des cellules B220⁺. Les profils ombrés correspondent au témoin sans stimulus.



Question 6. Qu'apportent ces nouveaux résultats ? (10 lignes maximum)

Après liaison sur son récepteur membranaire, la particule virale VSV pénètre par endocytose ; après fusion avec un lysosome, l'environnement acide entraîne la fusion de la membrane virale avec la membrane du lysosome et la nucléocapside virale est libérée dans le cytosol. Afin de préciser la localisation cellulaire où a lieu l'activation de TLR7 par VSV, les auteurs étudient l'activation de cellules dendritiques de souris de type sauvage par VSV en présence de chloroquine, un inhibiteur de l'acidification des lysosomes (**Figure 4**).

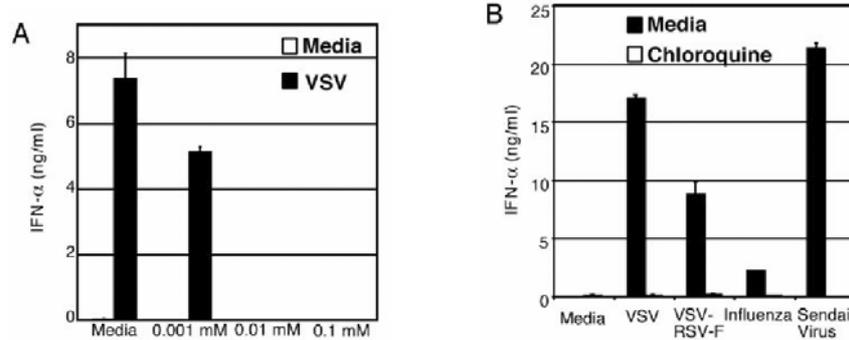


Figure 4

A : Des cellules de moelle osseuse de souris de type sauvage ont été prétraitées pendant 2h en présence de milieu seul (Media) ou de concentrations croissantes de chloroquine comme indiqué. Les cellules ont alors été infectées par le virus VSV. Après 18h, l'IFN- α produit a été mesuré dans les surnageants de culture par ELISA.

B : Des cellules de moelle osseuse de souris de type sauvage prétraitées pendant 2h en présence de milieu seul (Media) ou de chloroquine (0,1 mM) ont été stimulées par les virus VSV, VSV-RSV-F, Influenza ou Sendai. Après 18h, l'IFN- α produit a été mesuré dans les surnageants de culture par ELISA. VSV-RSV-F est un virus VSV recombinant exprimant la protéine F du virus RSV (*respiratory syncytial virus*) qui permet la pénétration du virus par fusion avec la membrane plasmique de manière indépendante du pH ; VSV-RSV-F exprime toujours la protéine G de VSV impliquée dans la pénétration du virus par la voie lysosomale dépendante du pH. Le virus Sendai est un autre virus à ARN simple-brin qui pénètre exclusivement par fusion avec la membrane plasmique.

Question 7. Analysez soigneusement ces résultats. (5 lignes maximum)

Question 8. A l'aide d'un schéma récapitulatif, résumez la voie TLR activée par les virus à ARN simple-brin.

Exercice II (noté sur 6 points)

(D'après Grandjean, I., *et al.* (2003) *J.Exp.Med.* 198:1089)

Le clone T CD4⁺ *Marylin* a été établi chez une souris de CMH H-2^bxH-2^k. Ce clone est dirigé contre un peptide de l'antigène H-Y présenté par la molécule I-A^b. Les chaînes TCRβ et TCRα du clone *Marylin* ont été clonées pour produire des souris transgéniques (Tg) pour le TCR *Marylin*, de fonds génétique C57BL/6 (B6) et d'haplotype H-2^b ou H-2^k. Les souris *Marylin* TCR Tg H-2^b (ou H-2^k) ainsi obtenues ont alors été croisées avec des souris RAG-2^{-/-} H-2^b (ou H-2^k) de fonds B6 afin d'obtenir les souris *Marylin* TCR Tg RAG-2^{-/-} H-2^b (ou H-2^k).

Grâce à ces souris et aux lignées supplémentaires de souris B6 RAG-2^{-/-} H-2Aβ^b et B6 RAG-2^{-/-} β2m⁻, on a également pu obtenir les lignées de souris *Marylin* TCR Tg RAG-2^{-/-} H-2Aβ^b ou H-2^kβ2m⁻ ou H-2^{b^{xk}} ou H-2Aβ^bx^b ou H-2Aβ^bx^k, toutes de fonds B6.

Question 9. *A l'aide d'un schéma de croisements, expliquer comment ces dernières lignées de souris ont été obtenues :*

- *Marylin TCR Tg RAG-2^{-/-} H-2Aβ^b*
- *Marylin TCR Tg RAG-2^{-/-} H-2^kβ2m⁻*
- *Marylin TCR Tg RAG-2^{-/-} H-2^{b^{xk}}*
- *Marylin TCR Tg RAG-2^{-/-} H-2Aβ^bx^b*
- *Marylin TCR Tg RAG-2^{-/-} H-2Aβ^bx^k*

Question 10. *Rappelez l'effet de la mutation RAG-2^{-/-}. (5 lignes maximum)*

Le développement lymphocytaire T a été étudié chez ces différentes lignées de souris, dans le thymus et la rate, par cytométrie de flux avec les anticorps anti-TCRβ, anti-CD4 et anti-CD8 (**Figure 5**).

Question 11. *A l'aide d'un tableau comparatif, vous analyserez ces résultats en précisant, pour chaque lignée,*

- *quelles molécules du CMH sont exprimées*
- *quelle cellularité est observée dans le thymus et dans la rate*
- *quelles populations sont absentes ou présentes*
- *comment ces observations cadrent avec vos connaissances du développement lymphocytaire T*

Question 12. *A la fin de ce tableau comparatif, vous terminerez votre analyse en indiquant quelle(s) population(s) supplémentaire(s) vous attendriez-vous à observer si les souris ne portaient la mutation RAG-2^{-/-}.*

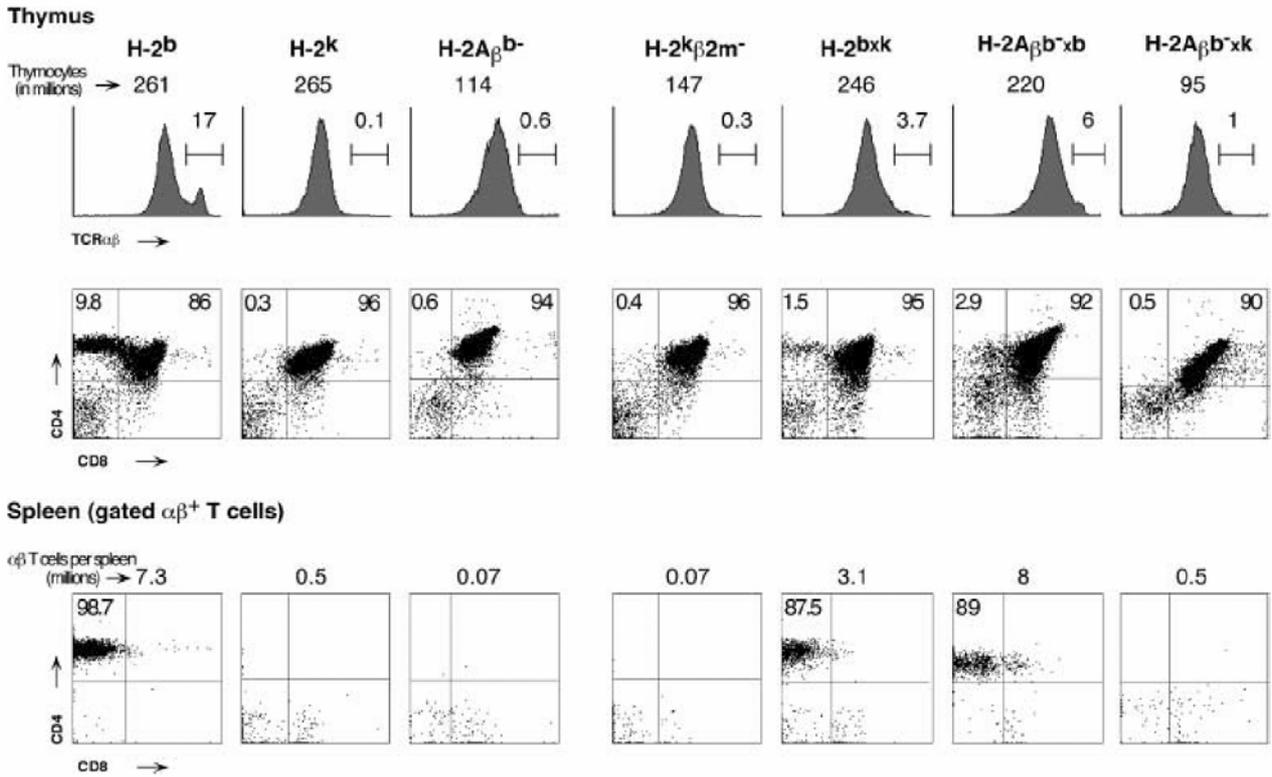


Figure 5

Le développement lymphocytaire T a été étudié dans les différentes lignées de souris *Marylin* TCR Tg. Le génotype du CMH des lignées étudiées est indiqué en haut de chaque colonne. Les thymocytes et splénocytes ont été analysés par cytométrie en flux avec les anticorps anti-TCR β (TCR $\alpha\beta$), anti-CD4 et anti-CD8. Pour les splénocytes, l'analyse ne montre que les cellules TCR $\alpha\beta^+$. Pour chaque organe étudié, le nombre total de cellules est indiqué (en millions). Les nombres inscrits dans les quadrants des profils correspondent à la proportion de cellules du phénotype correspondant.

N.B. : On rappelle que toutes les souris sont ici déficientes pour RAG-2.

Exercice III (noté sur 7 points)

(D'après Marie J., *et al.* (2001) *Immunity* 14:69)

Le virus de la rougeole induit une immunosuppression sévère chez les individus infectés. Les mécanismes précis de cette immunodéficiency sont peu connus du fait du manque d'un modèle animal adéquat. Les auteurs de cette étude ont recherché le(s) rôle(s) des protéines virales du virus de la rougeole sur l'induction de l'immunosuppression chez des souris C57BL/6. Pour cela, ils ont étudié deux types de réactions inflammatoires dépendantes des cellules T :

- 1) l'hypersensibilité retardée (DTH) en réponse à KLH (*keyhole limpet hemocyanin*) due aux lymphocytes T CD4⁺ ;
- 2) l'hypersensibilité de contact (CHS) en réponse à l'haptène DNFB (*dinitrofluorobenzene*) due aux lymphocytes T CD8⁺.

Question 13. Proposez deux modèles animaux pouvant servir à l'étude de l'infection par le virus de la rougeole (on précise que le récepteur du virus est une molécule membranaire, le CD46 humain, et que ce virus n'infecte pas normalement les cellules de souris). (5 lignes maximum)

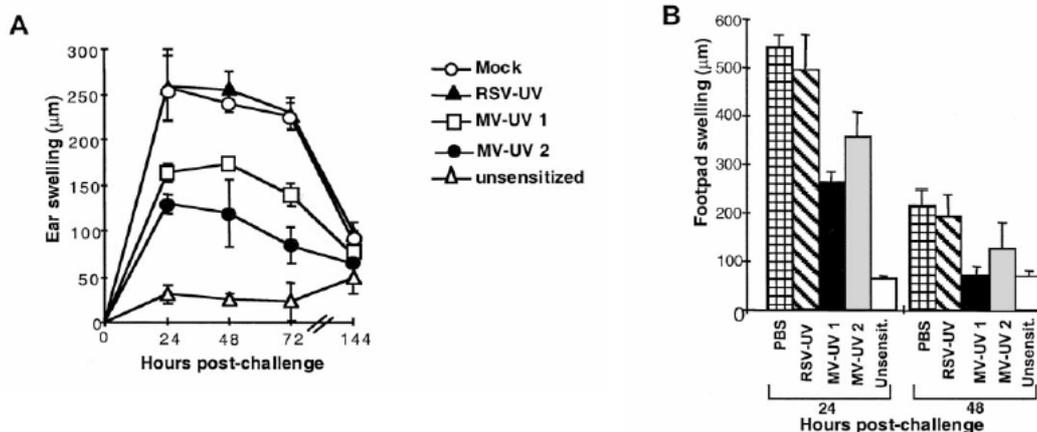


Figure 6

Des souris C57BL/6 ont reçu des injections intrapéritonéale de la préparation « Mock », de PBS, de 200 µg (MV-UV 1) ou 40 µg (MV-UV 2) de virus de la rougeole inactivé par les UV, ou de 200 µg du virus du sarcome de roux inactivé par les UV (RSV-UV).

A : Les souris ont été sensibilisées 6 heures après par une application de DNFB sur la peau du ventre et ont reçu 5 jours plus tard par une application de DNFB sur l'oreille.

B : Les souris ont été sensibilisées par une injection sous-cutanée de KLH et ont reçu 7 jours plus tard par une injection sous-cutanée de KLH dans la patte.

Les résultats sont exprimés en gonflement de l'oreille (A) ou de la patte (B). On précise que « Mock » correspond à une préparation contenant le milieu de culture sans virus. Les souris témoins (unsensitized (A) ou Unsensit. (B)) n'ont pas été sensibilisées.

Question 14. Commentez les résultats obtenus. (5 lignes maximum)

L'analyse des préparations de MV-UV par un test ELISA a montré la présence importante d'une protéine virale nucléaire libre (NP). Pour déterminer le rôle de cette protéine dans l'immunosuppression, les auteurs ont réalisé des expériences complémentaires (**Figure 7**) chez des souris C57BL/6 et chez des animaux FcR -/- à la fois déficients pour FcγRII et FcRγ.

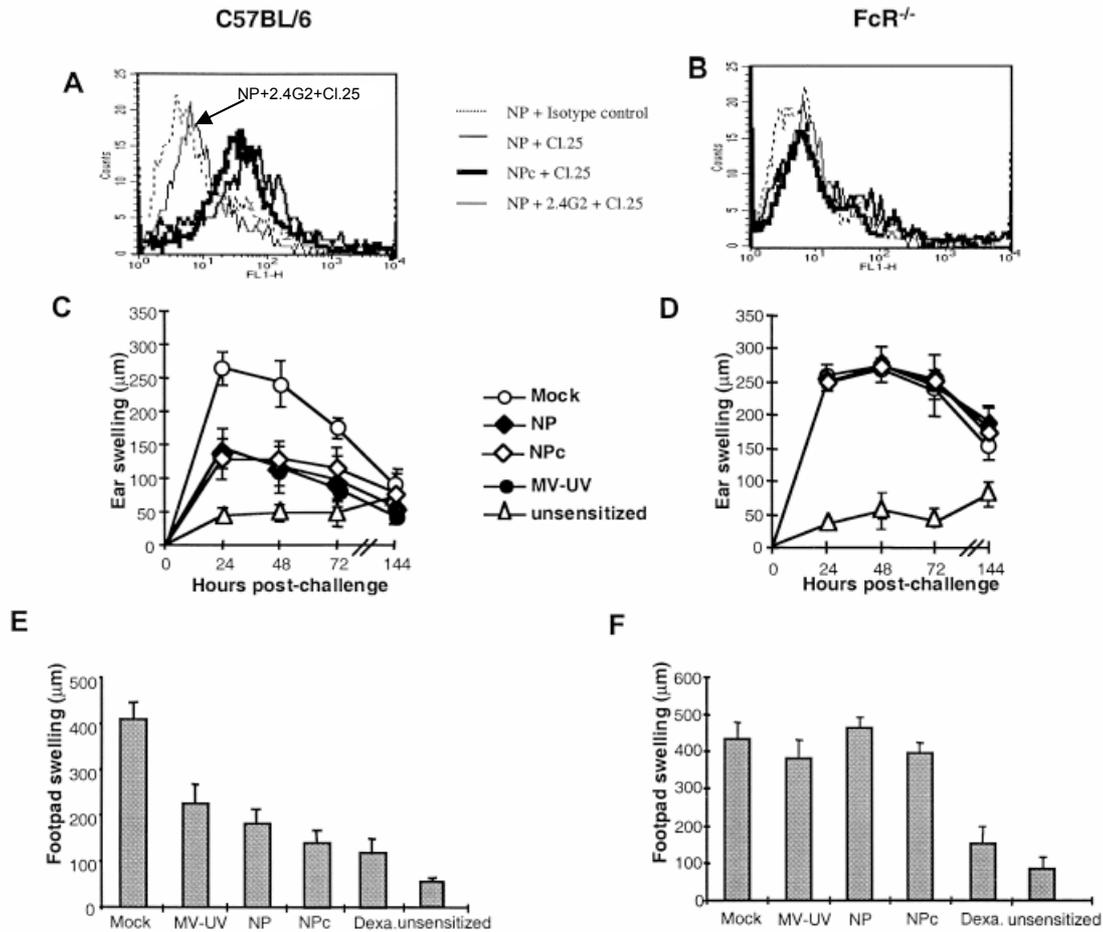


Figure 7

(A, B) Des cellules dendritiques provenant de souris C57BL/6 (A) ou déficientes en FcR (FcR^{-/-}) (B) ont été incubées avec la protéine NP entière, en absence ou en présence d'anticorps monoclonal anti-FcR (2.4G2), ou avec la protéine NPc (contenant les 126 acides aminés C-terminaux de la protéine). La liaison a été révélée avec un anticorps anti-NP biotinylé (Cl.25) et la streptavidine-FITC.

Les souris C57BL/6 (C, E) ou FcR^{-/-} (D, F) ont reçu des injections de la préparation Mock, de la protéine NP ou NPc, du virus de la rougeole inactivé par les UV (MV-UV), ou de dexaméthasone (un immunosuppresseur).

(C, D) Les souris ont été sensibilisées 6 heures après par du DNFB et ont reçu 5 jours plus tard une application de DNFB sur l'oreille.

(E, F) Les souris ont été sensibilisées 6 heures après avec du KLH et ont reçu 7 jours plus tard une application de KLH sur la patte.

Les gonflements de l'oreille ou de la patte ont été mesurés 24h après l'application. On précise que « Mock » correspond à une préparation contenant le milieu de culture sans virus. Les souris témoins (unsensitized) n'ont pas été sensibilisées.

Question 15. Pourquoi a-t-on invalidé à la fois *FcγRII* et *FcRγ* pour obtenir les souris FcR^{-/-} ?

Question 16. Analysez ces résultats. Quelles conclusions pouvez-vous émettre quant au rôle de la protéine virale NP ? (8 lignes maximum)

Pour étudier les mécanismes cellulaires précis induisant une immunosuppression, les auteurs ont réalisé les expériences suivantes : des souris C57BL/6 et des souris FcR^{-/-} ont reçu des injections intrapéritonéales de MV-UV, de protéine recombinante NP ou de PBS. Six heures après, les

animaux ont été sensibilisés par le DNFB. Les lymphocytes T CD8⁺ ont été purifiés à partir des ganglions drainant 4 jours après la sensibilisation et ont été testés pour leur capacité à proliférer en réponse aux haptènes DNBS ou TNBS (**Figure 8**).

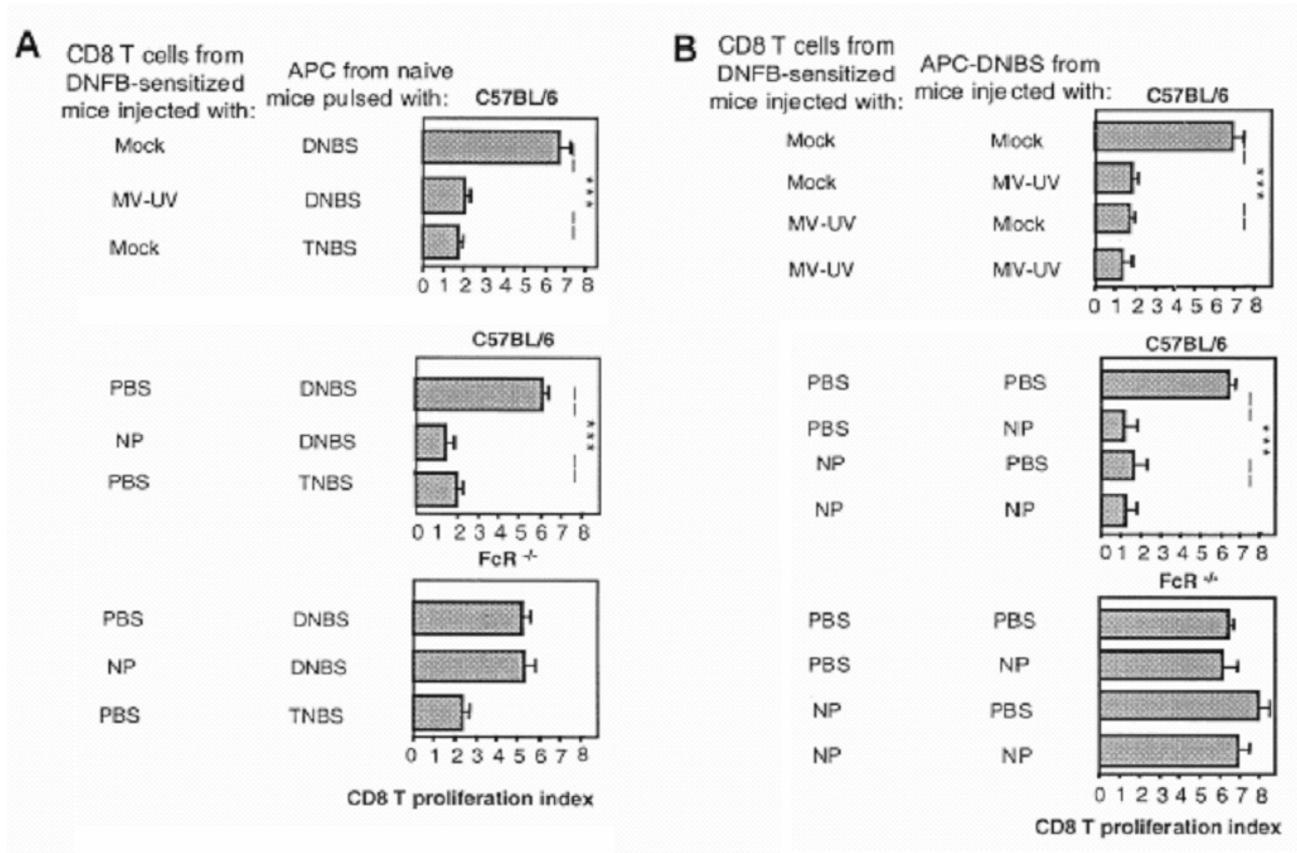


Figure 8

Les lymphocytes T CD8⁺ ont été purifiés chez des souris C57BL/6 ou FcR^{-/-} ayant reçu des injections de la préparation Mock, de MV-UV, de NP ou de PBS et ayant été sensibilisées par le DNFB 6 heures après l'injection.

A : Des splénocytes prélevés chez des souris syngéniques naïves ont été irradiés, couplés au DNBS ou au TNBS, puis incubés avec les lymphocytes T CD8⁺ pendant 3 jours.

B : Des splénocytes prélevés chez des souris préalablement traitées comme les souris donneuses de cellules T CD8⁺ ont été irradiés, couplés au DNBS, puis incubés avec les lymphocytes T CD8⁺ pendant 3 jours.

La prolifération des LT CD8⁺ a été mesurée par incorporation de thymidine tritiée. Les résultats sont présentés en indice de prolifération. On précise que le DNBS est le dinitrofluorobenzène-sulfonate et le TNBS est le 2,4,6-trinitrofluorobenzène-sulfonate.

Question 17. D'après ces expériences, quelles sont les différentes phases de la réponse immunitaire qui sont affectées ? (8 lignes maximum)

Dans une dernière expérience, des souris C57BL/6 et FcR^{-/-} ont reçu une injection de la préparation Mock ou MV-UV, puis ont été sensibilisées au DNFB 6 heures après. Les ganglions drainants ont été prélevés à 24h après l'injection. Une population cellulaire d'intérêt a été enrichie et la production d'IL-12 intracellulaire a été analysée par cytométrie de flux (**Figure 9**).

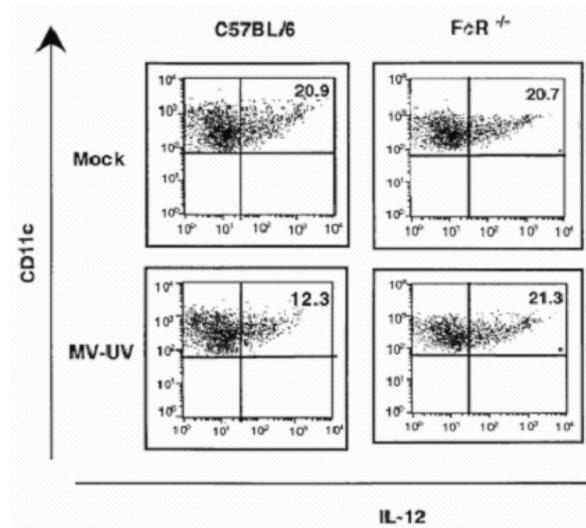


Figure 9

Des souris C57BL/6 et FcR^{-/-} ont reçu une injection de MV-UV ou de la préparation Mock et ont été sensibilisées au DNFB 6 heures après. Les ganglions drainants ont été prélevés 24h après l'injection. Une population cellulaire d'intérêt a été enrichie de ces ganglions et analysée par double marquage membranaire pour le CMH de classe II et CD11c, suivi d'un marquage intracellulaire pour l'IL-12. Ces données sont montrées sur la population CMH II⁺.

Question 18. *Quelle population cellulaire a été enrichie dans cette expérience ? (1 ligne)*

Question 19. *Citez deux techniques permettant d'enrichir cette population. (2 lignes)*

Question 20. *Ces résultats vous permettent-ils de préciser vos conclusions précédentes ? (8 lignes maximum)*