

Immunité anti-infectieuse ; Sensibilité aux infections

I.

(d'après Jennison and Verma (2004) *FEMS Microbiology Reviews*, 28:43 ; Sansonetti *et al.* (1999) *Infection and Immunity*, 67:1471 ; Zhang *et al.* (2001) *Infection and Immunity*, 69:3240 ; Wenneras *et al.* (2000) *Journal of Immunology*, 164:3214)

Shigella flexneri est une bactérie gram négative responsable d'une forme de dysenterie très contagieuse (shigellose). On dénombre 164 millions de cas et 1.1 millions de morts chaque année, la majorité des cas concernant des enfants dans les pays en voie de développement. La pathogénicité de *Shigella flexneri* est basée sur sa capacité à envahir l'épithélium et à s'y multiplier en causant une importante inflammation et une destruction de l'épithélium. La réaction inflammatoire est impliquée à la fois dans la destruction de l'épithélium et dans le contrôle de l'infection. La réponse humorale de l'hôte semble également jouer un rôle protecteur important alors que le rôle de la réponse cellulaire est encore controversé.

Partie 1 : Rôle de l'interleukine 8 dans l'infection par *S. flexneri*

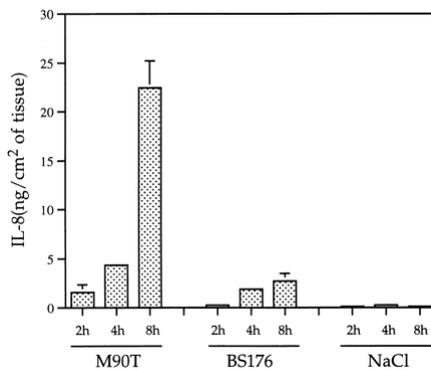


Figure 1 : Dosage de l'interleukine 8 dans les tissus intestinaux de lapins 2 à 8h après infection avec une souche normale (M90T) ou avec une souche mutée avirulente et non invasive (BS176) de *S. flexneri*

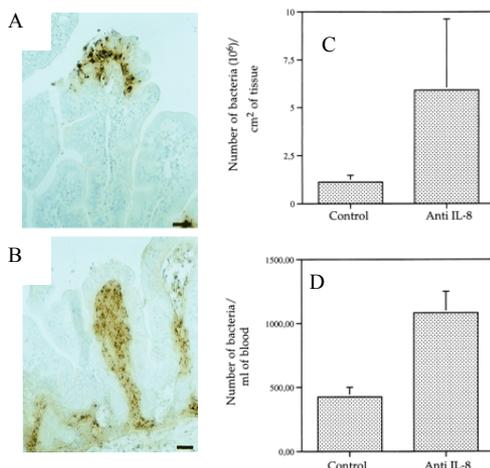


Figure 2 :

A et B : Marquage de coupes d'épithélium intestinal de lapins infectés avec la souche normale de *S. flexneri* et préalablement traités avec un anticorps contrôle (A) ou un anticorps anti IL-8 (B).

C et D : Mesure de la quantité de bactéries présentes dans l'épithélium intestinal (C) ou le sang (D) de ces lapins

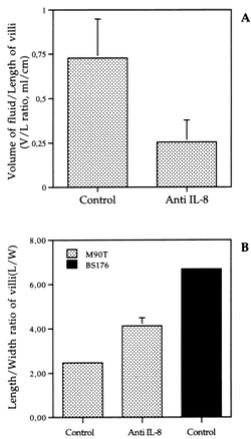


Figure 3 : Evaluation des altérations de l'épithélium intestinal de lapins infectés avec une souche normale (M90T) ou non invasive (BS176) de *S. flexneri* après traitement par un anticorps contrôle ou un anticorps anti IL-8.

A : Mesure de la sévérité de l'inflammation (ratio volume de fluide / taille des villi intestinaux)

B : Mesure de l'atrophie des villi (ratio longueur/épaisseur)

Question 1. Commentez les résultats obtenus.

Question 2. Quelles hypothèses peut-on formuler pour les expliquer ?

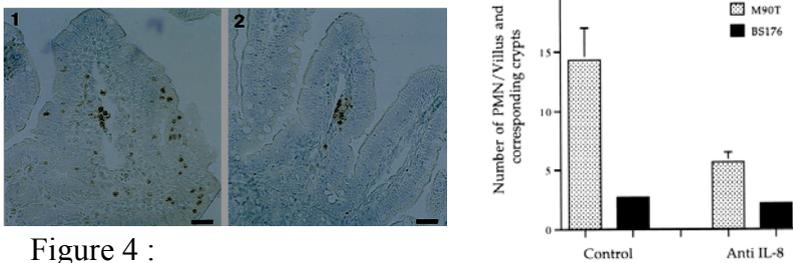


Figure 4 :

A : Coupes d'épithélium intestinal de lapins, infectés avec une souche virulente de *S. flexneri* après traitement avec un anticorps contrôle (1) ou avec un anticorps anti IL-8 (2), marquées avec un anticorps dirigé contre une protéine spécifique des polynucléaires : la protéine BPI (*bactericidal permeability increasing*).

B : Mesure du nombre de polynucléaires présents dans les villi intestinaux de lapins infectés avec une souche normale ou avirulente de *S. flexneri* après traitement avec un anticorps contrôle ou un anticorps anti IL-8.

Question 3. Analysez les résultats obtenus. Ces résultats confirment-ils vos hypothèses précédentes ?

Partie 2 : Rôle des polynucléaires

Afin de mieux comprendre le rôle des polynucléaires (PMN) dans la pathologie humaine, on utilise des souris SCID dans lesquelles on greffe des portions d'intestins humains qu'on infecte avec des souches normales ou avirulentes (CDV1203) de *S. flexneri* ou avec une bactérie non pathogène (*E. coli*). L'implication des polynucléaires est analysée en comparant la réponse de souris traitées avec un anticorps contrôle (148 D41) à celle de souris traitées avec un anticorps anti polynucléaires (RB6) permettant leur élimination.

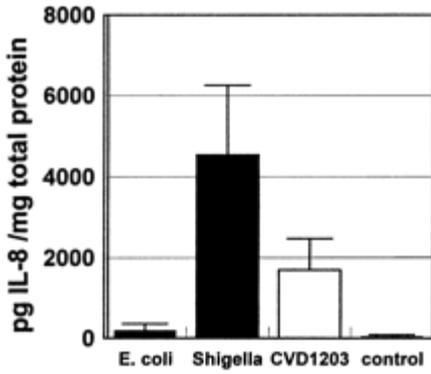


Figure 5 : Dosage de l'interleukine 8 dans des lysats de greffes d'intestins 4h après infection.

Le contrôle correspond à un lysat non infecté.

Les résultats indiqués correspondent à la moyenne de 5 à 8 souris selon les cas.

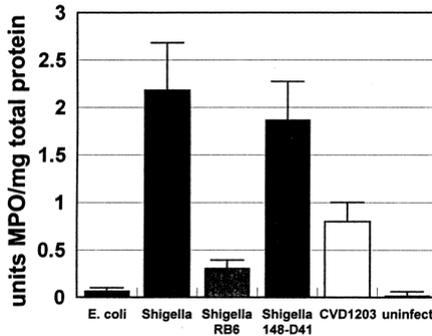


Figure 6 : Evaluation de l'influx de polynucléaires au niveau de l'intestin humain greffé.

La présence de polynucléaires est évaluée par mesure de l'activité myeloperoxydase dans les lysats d'intestins greffés et infectés après traitement des souris avec un anticorps contrôle (148-D41) ou un anticorps délétant anti polynucléaires (RB6). Les résultats indiqués correspondent à la moyenne de 7 à 8 souris selon les cas.

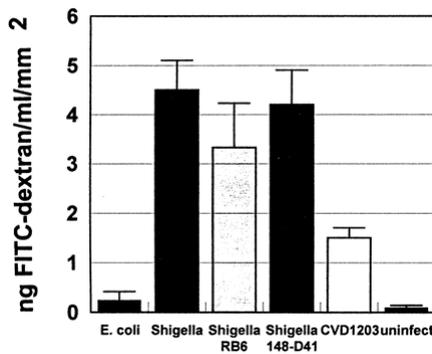


Figure 7 : Mesure de la perméabilité de l'épithélium intestinal.

La perméabilité de l'épithélium intestinal est mesurée en déposant une molécule fluorescente, le FITC-dextran, dans la lumière intestinale au moment de l'infection et en dosant son passage dans le sang des souris 4h après l'infection.

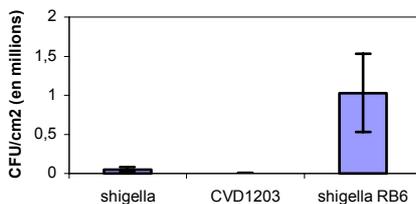


Figure 8 : Nombre de bactéries présentes dans les intestins humains greffés 4h après infection.

Question 4. Analysez l'ensemble des résultats obtenus. Ces résultats sont-ils cohérents avec ceux obtenus précédemment et les hypothèses proposées dans la Question 2 ?

Partie 3 : Rôle de la molécule CD14

Dans les figures qui suivent on traite des lapins avec un anticorps contrôle ou un anticorps bloquant anti-CD14 avant infection avec une souche virulente (M90T) ou non virulente (BS176) de *S. flexneri*.

Les analyses sont toujours effectuées 8h après infection. Lorsque le type d'infection n'est pas précisé il s'agit de la souche virulente.

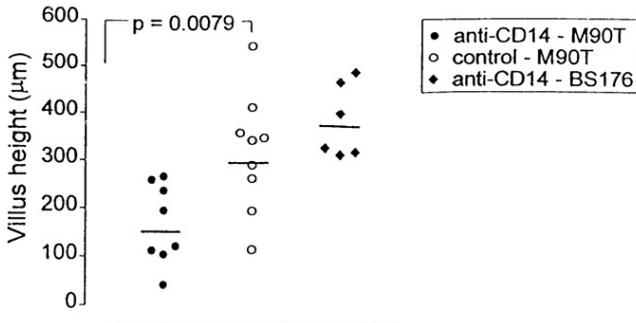


Figure 9 : Mesure du taux de destruction de l'épithélium intestinal

Le taux de destruction est évalué en mesurant la taille des villi intestinaux.

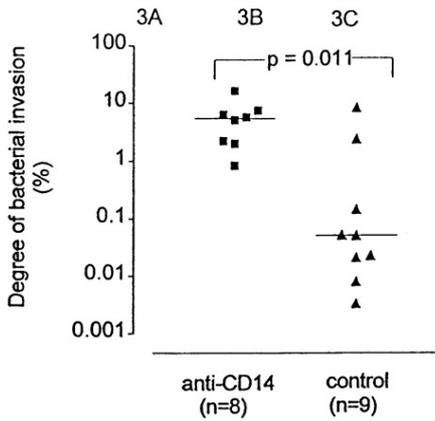


Figure 10 : Mesure du degré d'invasion de la muqueuse intestinale par *S. flexneri*.

8h après infection on prélève la zone d'intestin infectée et on la marque avec un anticorps anti-LPS afin de visualiser les bactéries. On mesure ainsi la surface de la muqueuse intestinale dans laquelle les bactéries sont présentes. Les résultats sont exprimés en % de surface.

Question 5. Justifiez ces expériences. Pourquoi traiter les lapins avec des anticorps anti-CD14 avant l'infection ?

Question 6. Que peut-on conclure de ces expériences ?

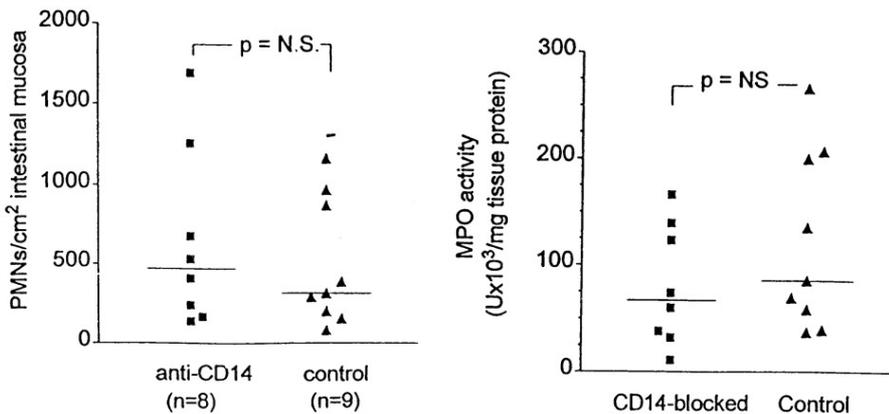


Figure 11 : Recrutement des polynucléaires au niveau du site de l'infection.

On évalue la quantité de PMN présents dans la muqueuse intestinale par marquage hématoxyline/éosine ou mesure de l'activité myéloperoxydase.

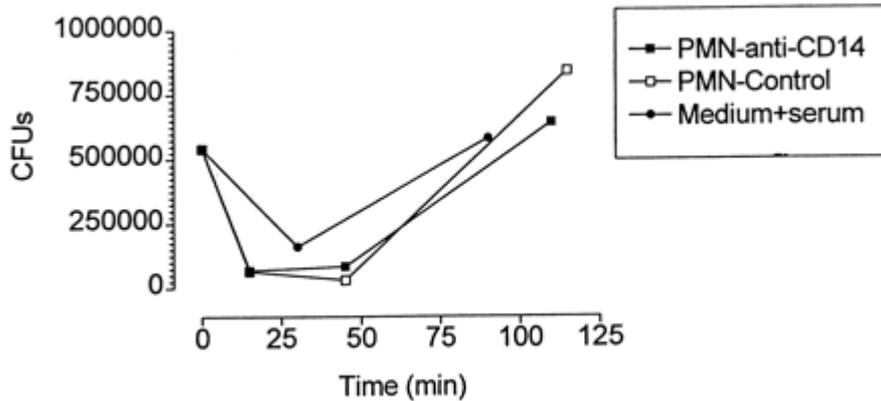


Figure 12 : Mesure de la destruction de *S. flexneri* par des PMN traités avec un anticorps contrôle ou un anticorps anti-CD14.

Question 7. D'après ces figures, que peut-on dire du rôle de CD14 dans le recrutement et l'activation des PMN au cours d'une infection par *S. flexneri* ?

Question 8. Ces résultats sont-ils cohérents avec ceux obtenus dans les figures 9 et 10 ?

Question 9. Proposez des mécanismes pouvant expliquer l'ensemble des résultats.

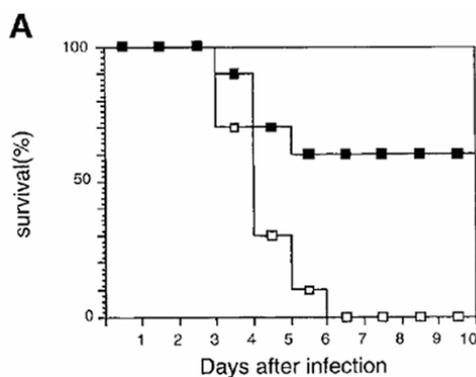
II. Comparaison de la réponse de deux lignées de souris (C57BL/6 et BALB/c) à l'infection par *Listeria monocytogenes*

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

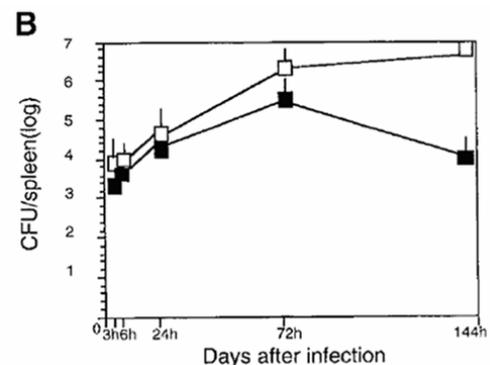
Des souris C57BL/6 et BALB/c sont infectées par injection intraveineuse avec *Listeria monocytogenes*, une bactérie gram + intracellulaire. Les auteurs étudient la survie des souris et la présence de bactéries dans leur rate. Les résultats sont présentés sur la Figure 1.

Question 1. Que peut on conclure de cette expérience ?

Figure 1



□ : BALB/c ; ■ : C57BL/6

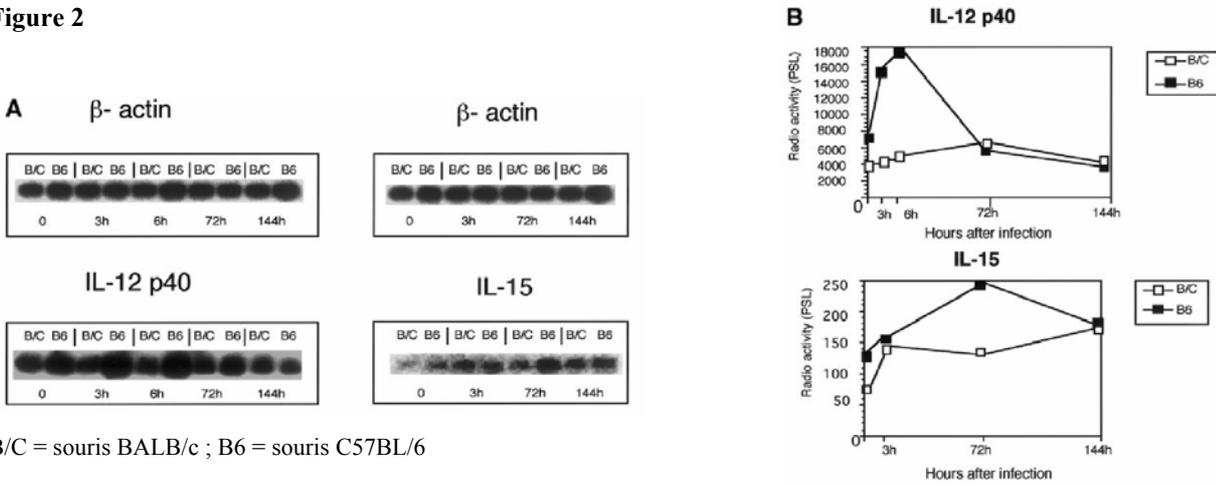


Afin de mieux comprendre la différence observée entre les deux lignées, les auteurs étudient les cytokines produites par les cellules dendritiques de ces souris.

Pour cela, ils étudient par RT-PCR l'expression des ARNm de l'interleukine 15 et de la sous unité inductible de l'interleukine 12 (IL12p40). Les ARNm sont amplifiés par RT-PCR et analysés (Figure 2A) et quantifiés (Figure 2B) après migration sur gel et hybridation avec une sonde radioactive.

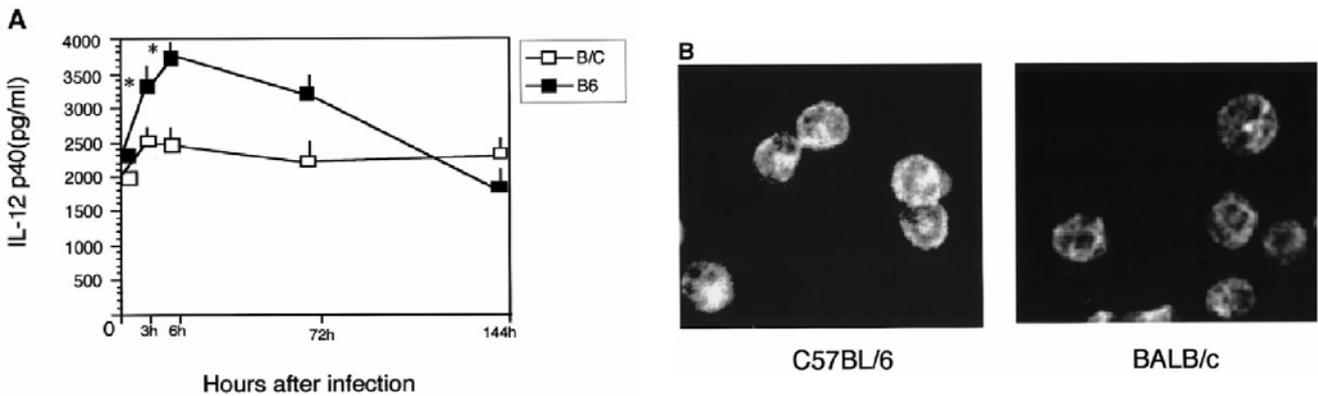
La production de ces cytokines est également étudiée au niveau protéique par ELISA (IL-12) (Figure 3C) ou immunofluorescence (IL-15) (Figure 3D).

Figure 2



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

Figure 3



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

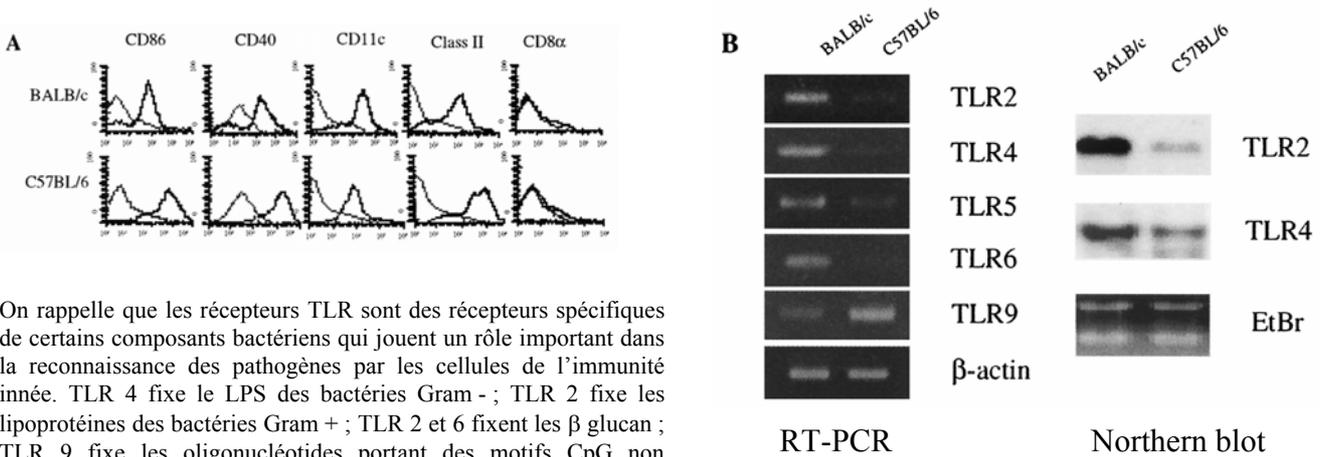
Question 2. Pourquoi étudier la production de cytokines par les cellules dendritiques ?

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 4.

Figure 4



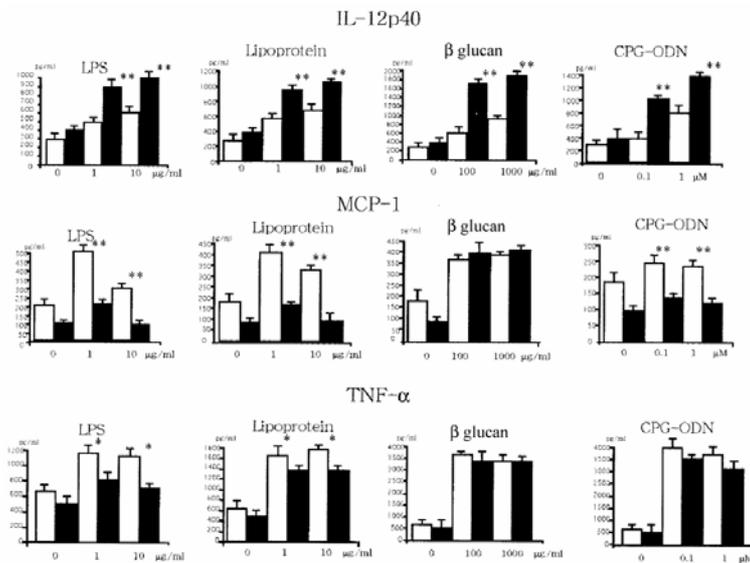
On rappelle que les récepteurs TLR sont des récepteurs spécifiques de certains composants bactériens qui jouent un rôle important dans la reconnaissance des pathogènes par les cellules de l'immunité innée. TLR 4 fixe le LPS des bactéries Gram - ; TLR 2 fixe les lipoprotéines des bactéries Gram + ; TLR 2 et 6 fixent les β glucan ; TLR 9 fixe les oligonucléotides portant des motifs CpG non méthylés.

Question 5. A partir de ces résultats, quelles hypothèses peut-on formuler pour expliquer les différences observées dans les Figure 2 et Figure 3 ?

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 5.

Figure 5

BALB/c □
C57BL/6 ■



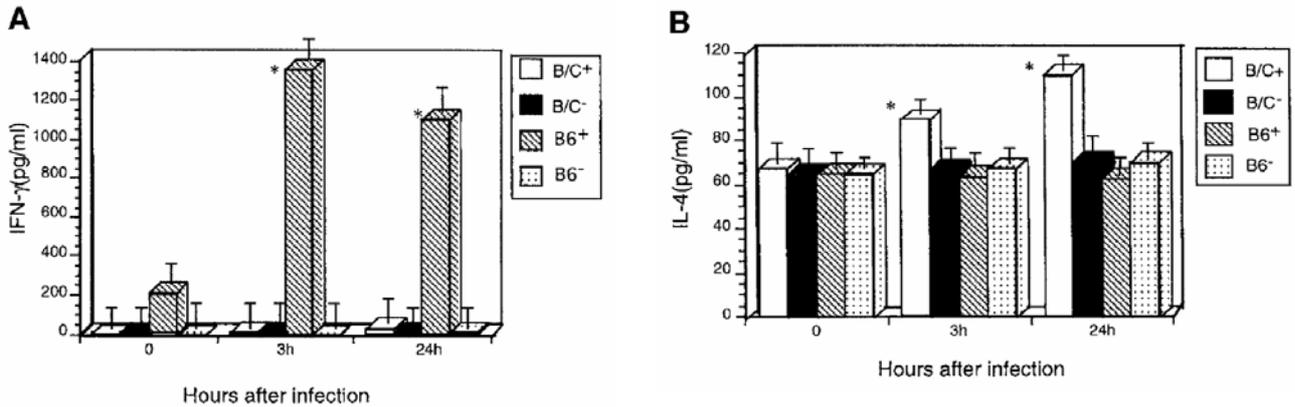
Question 6. Peut-on relier ces résultats aux résultats précédents ?

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 6.

Figure 6



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.

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

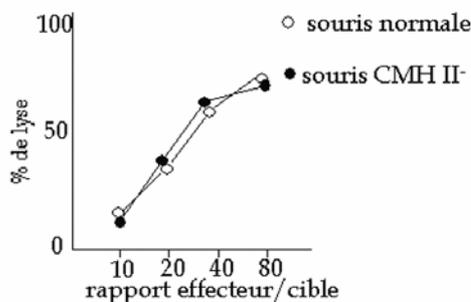
(d'après Thomsen, A.R. *et al.* (1996) *J. Immunol* 157:3074 ; Zajac, A.J. *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:14730)

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

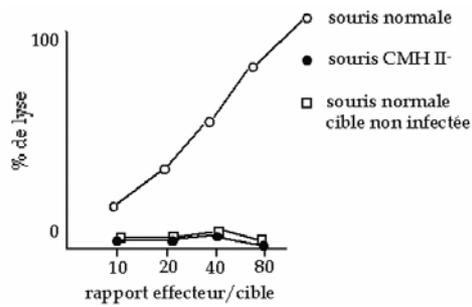
Dans une première expérience, des souris C57BL/6 normales ou déficientes en CMH II (CMH II⁻) sont infectées par le LCMV. Huit jours après l'infection, les rates de ces souris sont prélevées et on compare la capacité des splénocytes de ces souris à lyser des cellules cibles préalablement marquées au ⁵¹Cr. Le résultat de cette expérience est montré à la Figure 7 :

Figure 7



Dans une autre expérience, on infecte des souris avec le LCMV une première fois et une deuxième fois à 80 jours d'intervalle. On mesure alors la capacité des splénocytes extraits de ces souris à lyser des cellules cibles préalablement marquées au ⁵¹Cr. Le résultat de cette expérience est montré à la Figure 8 :

Figure 8



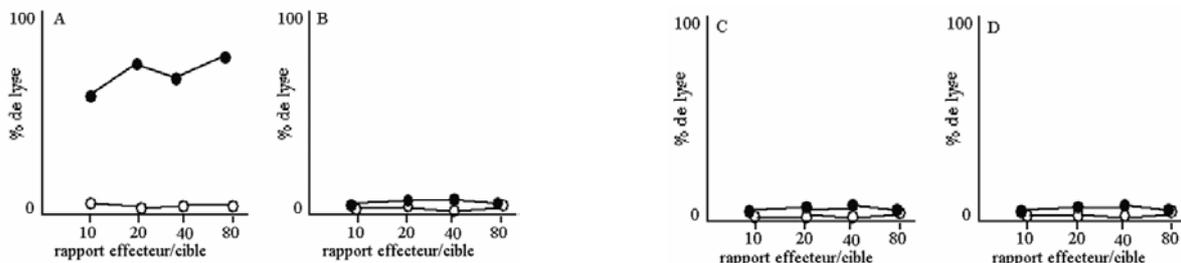
Question 1. Que peut-on conclure de ces expériences ? Quelles hypothèse(s) peut-on formuler pour expliquer le cas des souris CMH II- ?

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 9A), ou des splénocytes de souris normales ayant été sensibilisées au LCMV deux mois avant et débarrassés des cellules CD8⁺ juste avant le transfert (Figure 9B), ou des splénocytes de souris CMH II⁻ ayant été sensibilisés au LCMV deux mois avant (Figure 9C), 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 9D).

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 10.

Question 2. Commentez l'ensemble de ces résultats.

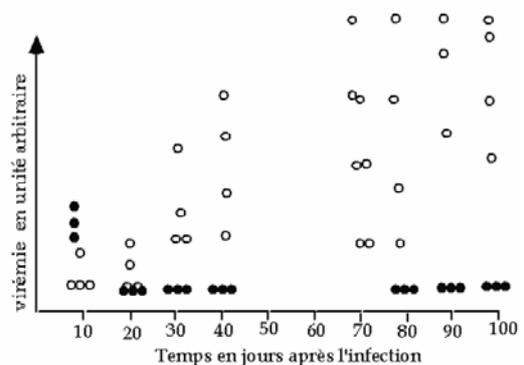
Figure 9



- : cellules cibles infectées
- : cellules cibles non infectées

Figure 10

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



Partie II

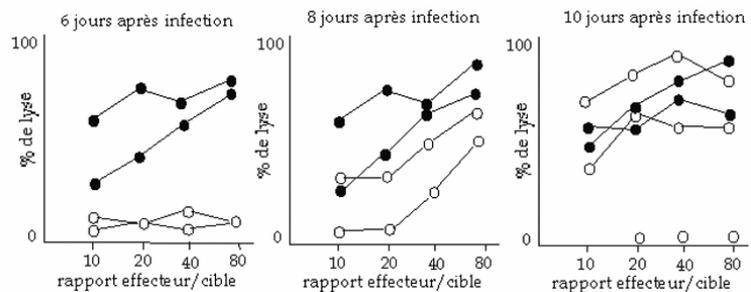
Des souris mutées dans le gène codant pour la chaîne lourde d'immunoglobuline C μ ont été obtenues par recombinaison homologue (souris μ MT/ μ MT). On constate que ces souris sont dépourvues de lymphocytes B.

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 11**.

Figure 11

- splénocytes de souris normales
- splénocytes de souris μ MT/ μ MT

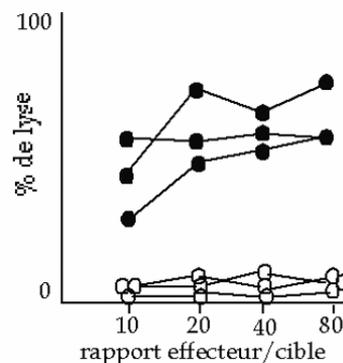


Question 4. Que pouvez-vous observer ? Proposez des hypothèses pour expliquer ces observations.

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 12**.

Figure 12

- splénocytes de souris normales
- splénocytes de souris μ MT/ μ MT



Question 5. Que peut-on en conclure ?

Partie III

Plusieurs mécanismes de cytotoxicité peuvent être employés, 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 β 2-microglobuline a été inactivé par recombinaison homologue (souris β 2-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 β 2-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. β 2-m ⁻
cellule cible:		
LB27.4	+	+
3B10	+	-

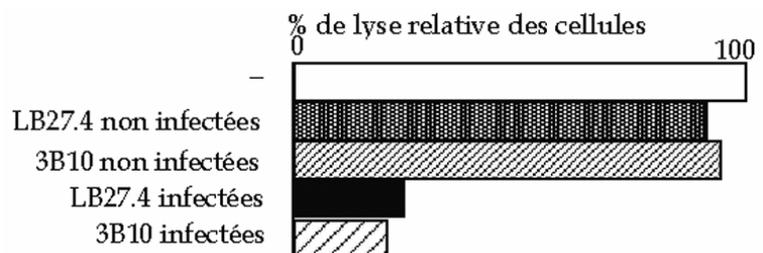
(+): lyse

(-): absence de lyse

On s'intéresse maintenant à la capacité des splénocytes issus de souris C57BL/6. β 2-m⁻ infectées par le LCMV à lyser les cellules LB27.4 infectées et radiomarquées au ⁵¹Cr, 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 13**.

Figure 13

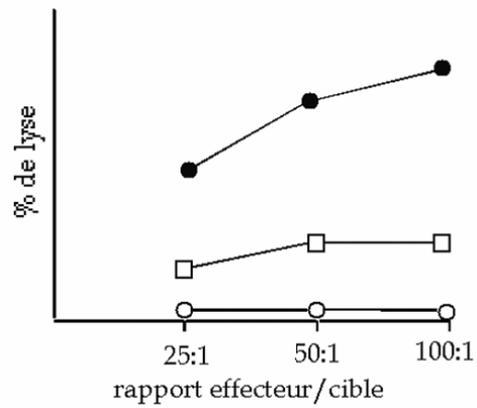
Les splénocytes issus des souris β 2m⁻ immunisées par le LCMV sont incubés en présence de cellules LB 27.4 radiomarquées et de cellules LB27.4 ou 3B10 non radiomarquées, infectées ou non par le LCMV.



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 β 2-m⁻ 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 14**.

Figure 14

- 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 $\beta 2-m^{-}$ infectées par le LCMV à des souris $\beta 2-m^{-}$ non infectées, les souris receveuses meurent. On réalise la même expérience de transfert dans des souris $\beta 2-m^{-}lpr$ (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	
	$\beta 2-m^{-}$	$\beta 2-m^{-}lpr$	$\beta 2-m^{-}$	$\beta 2-m^{-}lpr$
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 $\beta 2-m^{-}$ à juguler l'infection.*