

Immunité naturelle

I.

(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)*

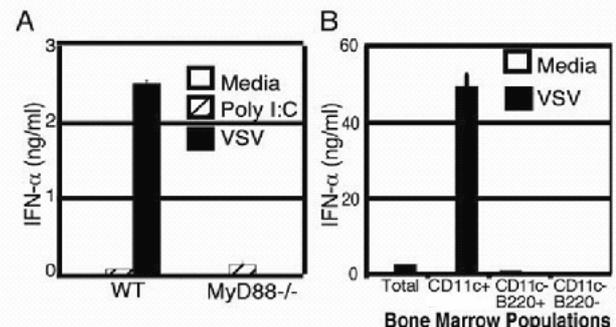
La présente étude s'intéresse à la voie d'activation mise en jeu en réponse à l'infection par des virus à ARN simple-brin comme le VSV (*vesicular stomatitis virus*) et le virus de la grippe (*influenza*). Dans une première expérience, les auteurs mesurent par ELISA la production d'IFN- α par des cellules 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)*

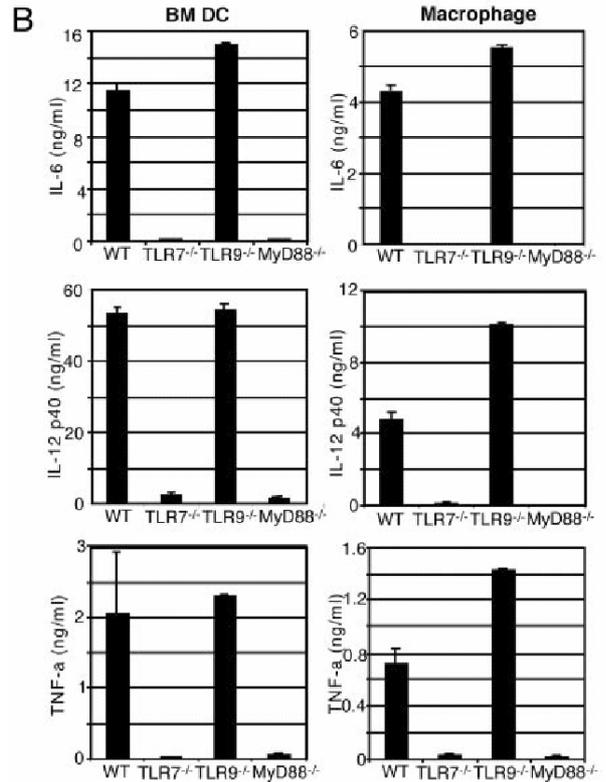
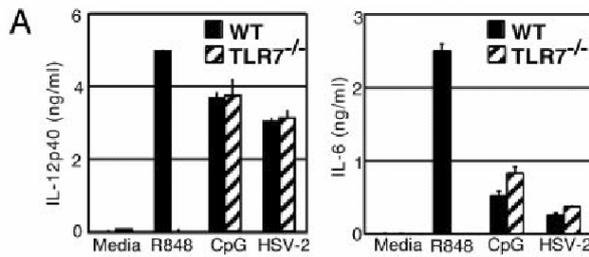
De nombreux TLR sont exprimés par les cellules dendritiques. Etant donné que le mode d'infection du VSV implique un mécanisme d'endocytose, les auteurs ont porté leur attention sur TLR7 et TLR9 qu'on retrouve au niveau des endosomes. La réponse de cellules dendritiques de moelle osseuse ou de macrophages 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) ou 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.



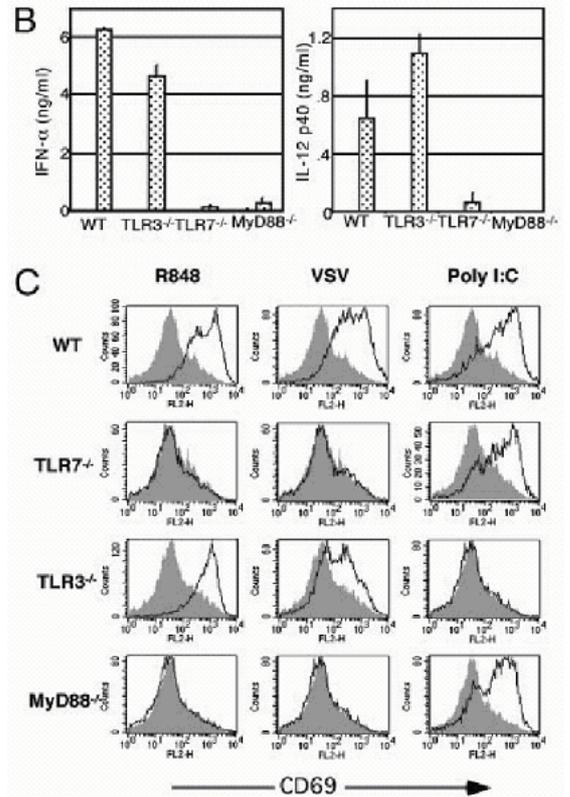
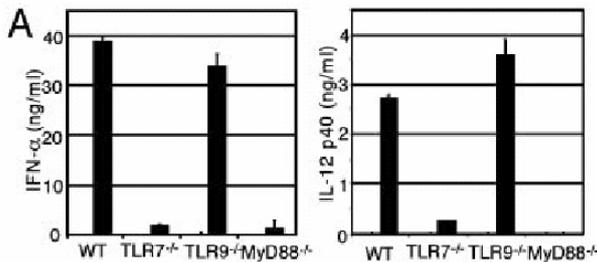
Les auteurs étudient ensuite le rôle de TLR7 pour la production d'IFN- α en réponse aux virus VSV et influenza. La réponse de cellules dendritiques de moelle osseuse a été étudiée chez des souris de type sauvage, TLR7^{-/-}, TLR9^{-/-}, TLR3^{-/-} ou Myd88^{-/-} (**Figure 3**).

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**).

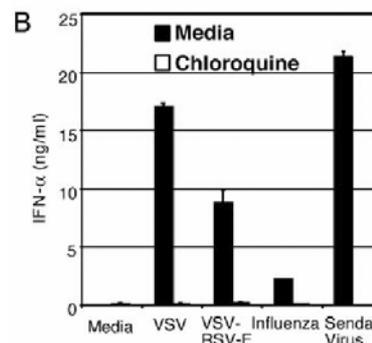
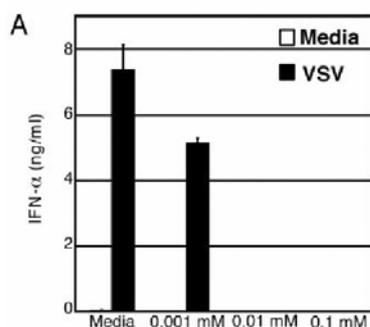


Figure 4

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.

II.

(d'après Nonaka, M. and M. Takahashi (1992) *J. Immunol.* 148:3290 ; Hughes, A. L. (1994) *Mol. Biol. Evol.* 11:417)

Le système du complément, qui peut être considéré comme un système immunitaire primitif sans spécificité fine pour un antigène particulier, comprend une trentaine de composés protéiques. Ces protéines interviennent dans deux voies de cascades enzymatiques : la voie classique et la voie alternative. Ces deux voies partagent les mêmes étapes terminales (cf. Figure 5). Les rôles et fonctions principaux de ce système sont :

1. Production d'anaphylatoxines (C3a et C5a) responsables de l'induction d'une réaction inflammatoire (par recrutement chimiotactique et activation des macrophages et des polynucléaires), de la contraction des muscles lisses, de l'augmentation de la perméabilité vasculaire ;
2. Fixation sur les micro-organismes de molécules (opsonines C3b, C4b) reconnues par les cellules phagocytaires ;
3. Formation du complexe de destruction membranaire (MAC) qui conduit à la lyse des micro-organismes.

Les molécules du complément appartiennent à plusieurs familles distinctes. Les molécules C3, C4 et C5 appartiennent à une même famille. Le clivage des molécules C3a et C4a à partir de C3 et C4 révèle une fonction thioester très réactive conduisant à la fixation sur le micro-organisme (opsonisation). La molécule C5 ne comporte pas cette fonction thioester. La molécule précurseur C4 comporte deux sites de clivage (β - α , α - γ) permettant la libération de trois sous-unités α , β et γ , alors que les molécules précurseurs C3 et C5 ne comportent qu'un site de clivage (β - α) conduisant à la libération de deux sous-unités seulement (Figure 6).

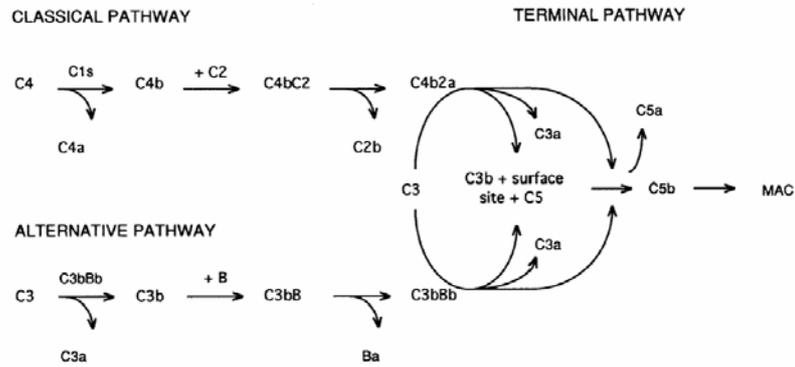


Figure 5 : Représentation schématique des voies classique et alternative et de l'étape terminale de la cascade du complément. Les étapes ne faisant pas intervenir les molécules C3, C4 et C5 ne sont pas représentées.

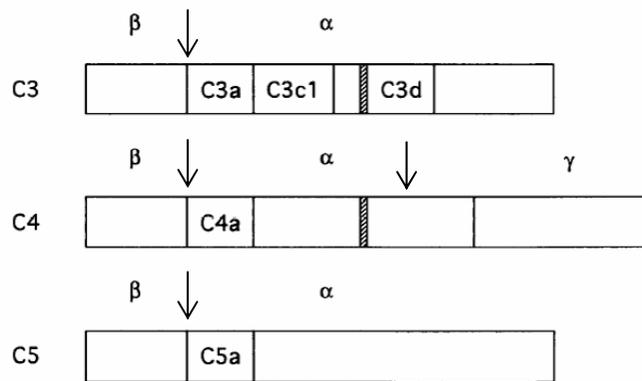


Figure 6 : Représentation schématique de la structure des molécules précurseurs des composants du complément C3, C4 et C5. La région hachurée représente la fonction thioester conservée entre les molécules C3 et C4.

La protéine α 2-macroglobuline (α 2M), appartient à la même famille que C3, C4 et C5. Elle est organisée en deux sous-unités et comporte la fonction thioester caractérisée sur C3 et C4.

La lamproie appartient au phylum des vertébrés sans mâchoire (Agnathes) dont la divergence d'avec les autres vertébrés (Gnathostomes) a eu lieu, il y a environ 450 millions d'années, très tôt après l'apparition des premiers vertébrés et avant l'embranchement des poissons cartilagineux et des poissons osseux.

Question 1. Tracez un arbre phylogénétique des vertébrés.

Dans cet exercice, on s'intéresse aux travaux d'une équipe qui a cloné et caractérisé des gènes de la lamproie appartenant à la famille C3/C4/C5/ α 2M et replacé ces gènes dans le contexte de l'évolution par duplication/divergence.

Question 2. Comment vous y prendriez-vous pour identifier le composant C3 du complément chez la lamproie sachant que les composants C3, C4, C5 et α 2M de mammifères sont connus ?

Des amorces dégénérées sens (5') et antisens (3'), consensus de la région thioester des molécules C3, C4 et α 2M de mammifère, ont été dessinées. De l'ADNc de foie de lamproie a été amplifié par PCR à l'aide de ces amorces. Après clonage et séquençage des produits d'amplification, deux séquences ont été caractérisées, La1 et La2 (Figure 7) :

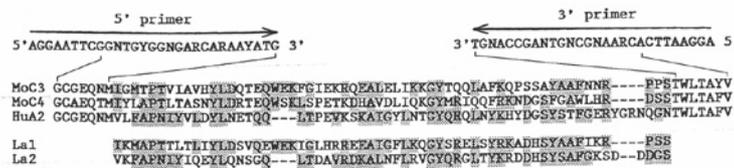


Figure 7 : Caractérisation de deux séquences de lamproie après amplification, clonage et séquençage d'ADNc de foie de lamproie avec des amorces consensus sens (5') et antisens (3') de la région thioester conservée sur les molécules C3, C4 et α 2M.

L'analyse de la séquence La1 révèle 42%, 33% et 30% d'identité avec la région correspondante de C3, C4 et α 2M alors que la séquence La2 présente 24%, 27% et 49% d'identité avec la région correspondante de C3, C4 et α 2M.

Question 3. Comment l'amplification des séquences de lamproie s'effectue-t-elle alors que les amorces ont été dessinées à partir de séquences de mammifères ?

Ensuite, la séquence La1 sert de sonde ADN pour cribler une banque d'ADNc de lamproie afin de caractériser le gène entier correspondant à La1. Un clone d'ADNc est caractérisé. La séquence protéique prédite de 1660 acides aminés présente 31%, 22%, 23% et 16% d'identité avec les séquences protéiques C3, C4, C5 et α 2M de mammifères. On note également que la distribution des résidus cystéine le long de la protéine est fortement conservée avec la protéine C3 de mammifère.

Question 4. Quelle(s) hypothèse(s) pouvez-vous faire quant à l'identité des séquences La1 et La2 caractérisées chez la lamproie ?

On note enfin que la protéine de lamproie identifiée par criblage présente des sites de coupures β - α et α - γ identiques à ceux de la protéine C4 de mammifère.

Question 5. Vos hypothèses sont-elles confirmées par cette dernière observation ?

Question 6. D'après vous, lequel des arbres phylogénétiques proposés ci-dessous est-il le plus vraisemblable pour rendre compte de l'évolution des gènes codant les molécules C3, C4 et C5 ?

