Interface Immunité innée/Immunité adaptative

I. Les récepteurs Toll

(d'après Takeuchi, O. *et al.* (1999) *Immunity* 11:443 ; Kawai, T. *et al.* (1999) *Immunity* 11:115 ; Hemmi, H. *et al.* (2000) *Nature* 408:740 ; Muzio, M. *et al.* (2000) *J.Immunol.* 164:5998)

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.

1ère partie

Dans une 1ère 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 stimulus 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).

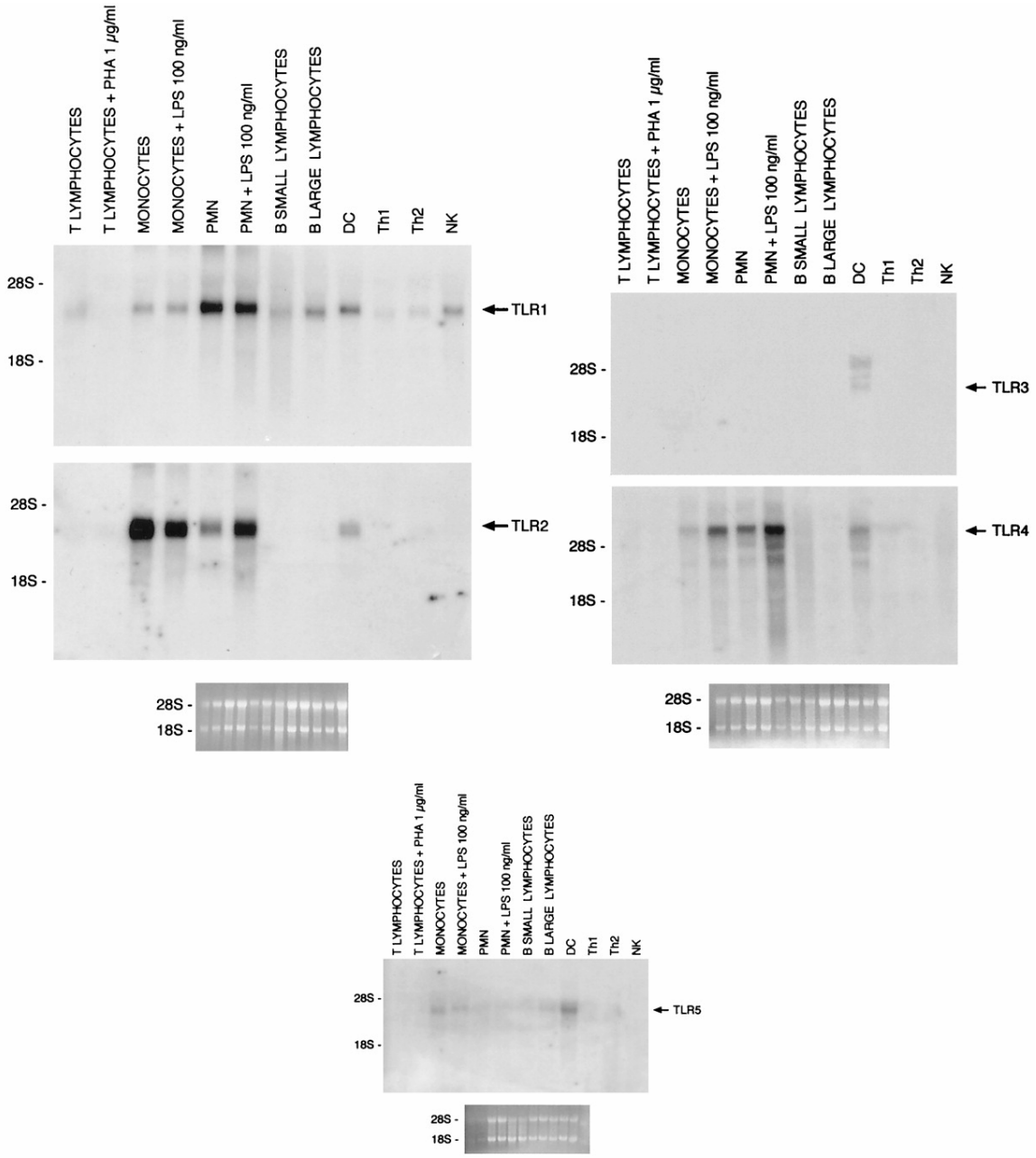


Figure 1 : Expression de TLR1 à 5 dans différentes cellules du système immunitaire.

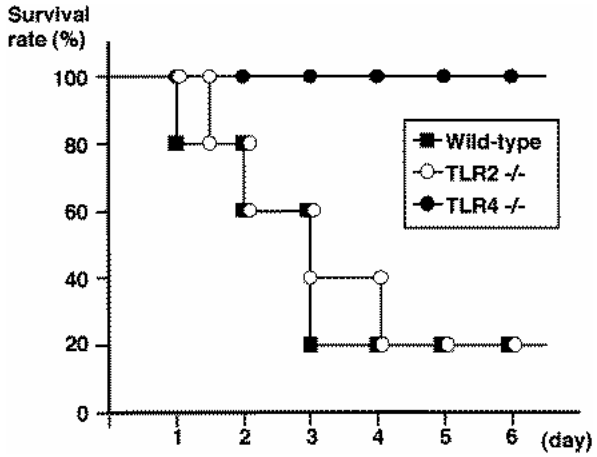
Question 1. Que pouvez-vous conclure de l'expression des récepteurs Toll par les différents types cellulaires ? Pourquoi a-t-on traité certains types cellulaires par la PHA ou le LPS ? Quels sont les effets de la stimulation des cellules par la PHA ou le LPS sur l'expression de ces récepteurs ?

2ème partie

Pour étudier *in vivo* le rôle des récepteurs Toll 2 et 4 (TLR2 et TLR4), des souris de type sauvage (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 normalement la mort des animaux de type sauvage), et leur survie a été observée (Figure 2).

Figure 2 :

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

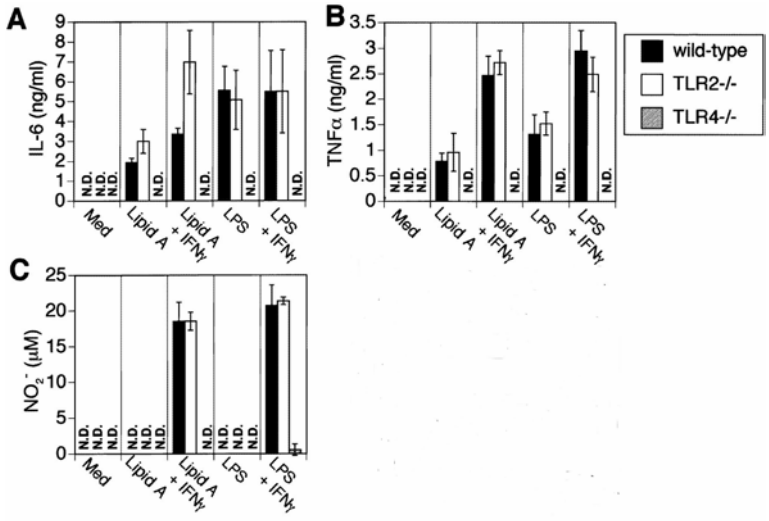


Question 2. Quelle conclusion tirez-vous de cette expérience ?

Des macrophages provenant de souris de type sauvage, de souris TLR2-/- ou de souris TLR4-/- ont été mis en culture en absence ou en présence d'IFNγ, et traités avec 1 ng/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)



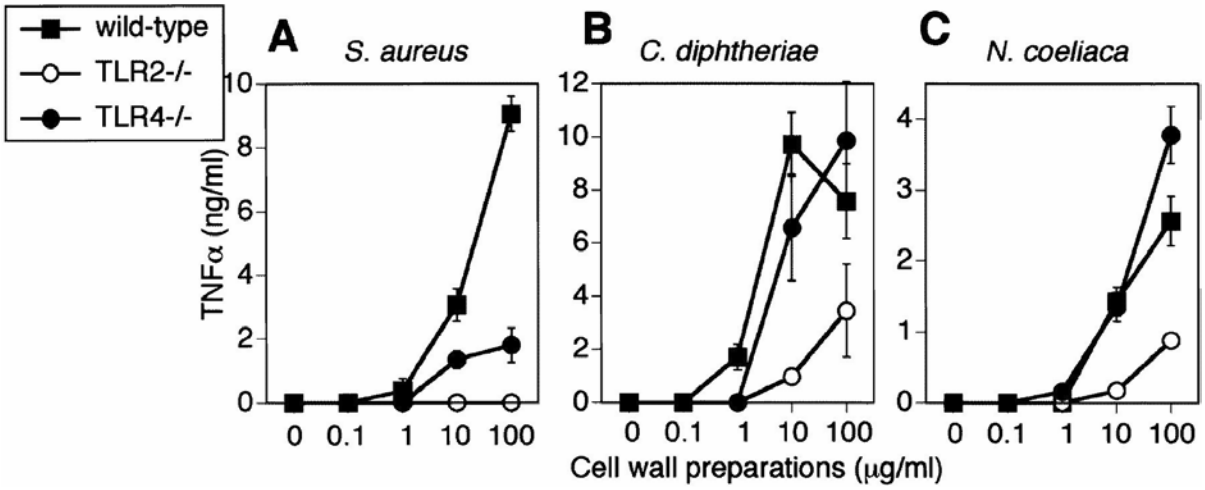
Question 3. Pourquoi a-t-on dosé les concentrations d'IL-6, de TNF-α et d'oxyde nitrique ? Rappelez les rôles de ces molécules dans la réponse immunitaire innée.

Question 4. Quel est l'effet de l'IFNγ ?

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 positif (*Staphylococcus aureus, Corynebacterium diphteriae* et *Nocardia coeliaca*) a été étudiée. Pour cela, des macrophages provenant de souris de type sauvage, 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).

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 de type sauvage (wild type) ou de souris TLR9-/- ont été ont été mis en culture en absence ou en présence d'IFNγ, 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 :

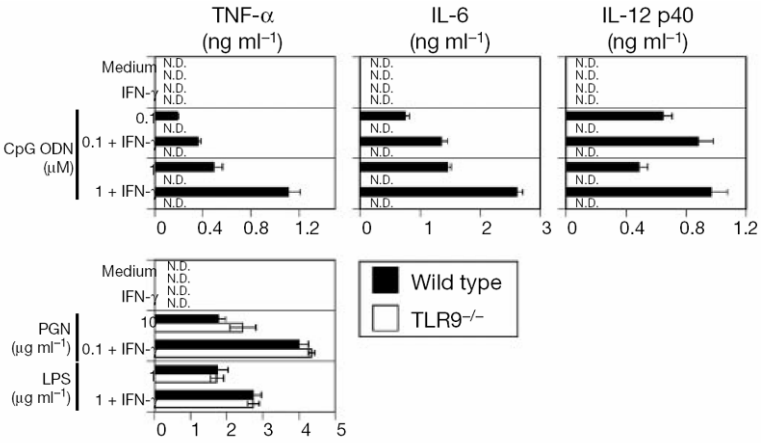
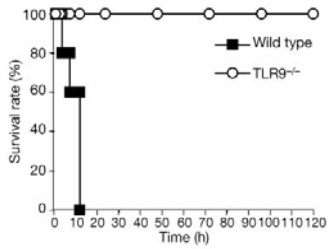


Figure 6 :



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

3ème 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 de type sauvage, 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 de type sauvage 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-κB. Les complexes inductibles contenant NF-κB sont indiqués par les flèches.

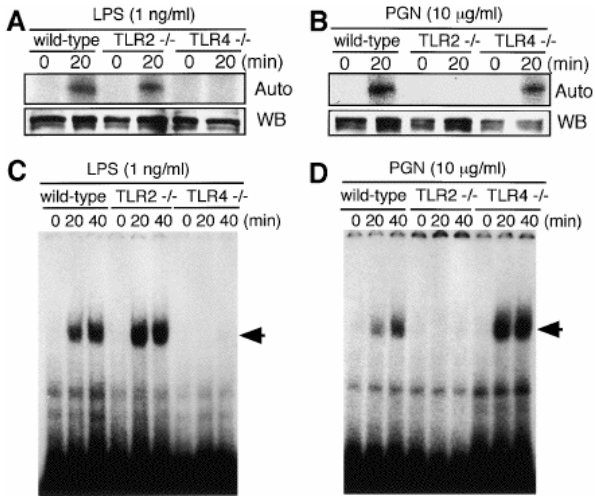
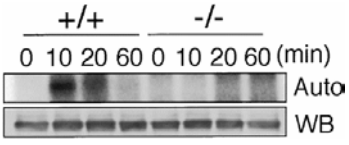


Figure 8 :



Question 9. En utilisant vos connaissances et les résultats de ces expériences, faites un schéma récapitulatif de la voie de transduction des récepteurs Toll (cf. Figure 9 et Figure 10).

Figure 9 :

Aderem, A., and Ulevitch, R. J. (2000) *Nature* 406:782.

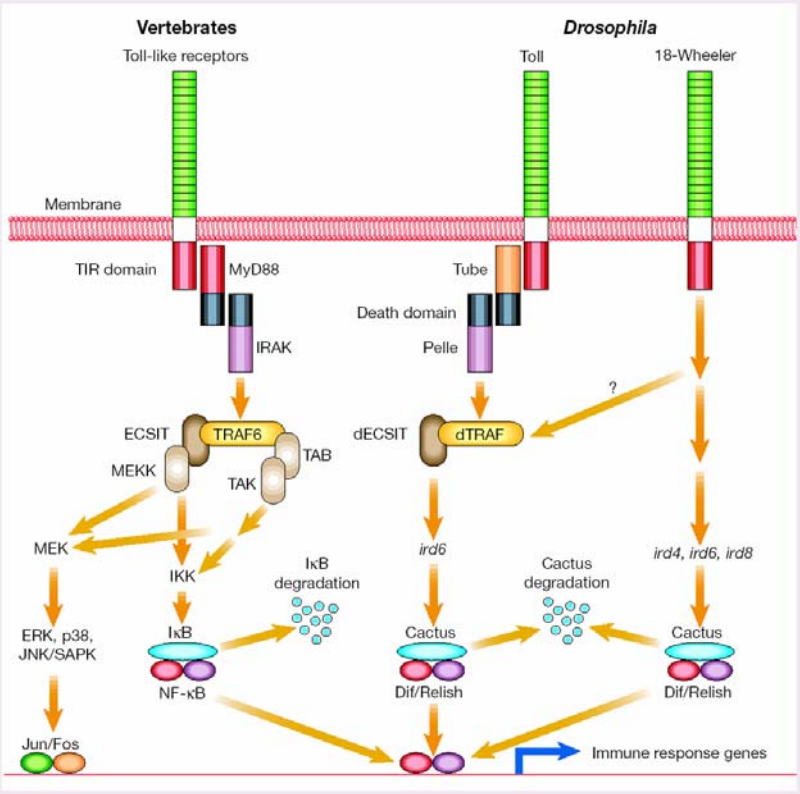


Figure 2 Signalling pathways activated by TLRs in vertebrates and in *Drosophila*. The TLRs have an intracellular domain that is homologous with that of the IL-1 receptor, and is known as TIR. TIR binds to a homologous domain in an adaptor protein, MyD88, which also contains a death domain; this interacts with a death domain in the serine kinase IRAK. IRAK interacts with an adaptor known as TRAF6. TRAF6 links to the MAP 3-kinase TAK-1, through an adaptor TAB2. TAK-1 is involved in the activation of the transcription factor NF-κB through the activation of IκB kinases, and in the activation of the AP-1 transcription family members Jun and Fos, by way of additional MAP kinases. Both AP-1 transcription family members and NF-κB are required for the transcription of immune response genes. TRAF6 is known to act through more than one pathway. For example, the adaptor ECSIT (evolutionarily conserved intermediate in Toll pathways) bridges TRAF6 to the MAP 3-kinase MEKK-1. The *Drosophila* Toll pathway is similar to that of the vertebrate TLRs. Toll links to an adaptor tube, the functional homologue of MyD88. Tube binds the kinase Pelle, a homologue of IRAK. A number of other homologues of the vertebrate pathways are found in *Drosophila*, including dTRAF and dECSIT, although it is not yet clear where precisely they fit in to the signalling pathway. Similarly, additional *Drosophila* genes, including *ird4*, *ird6* and *ird8*, have been have been found through genetic screens, although precisely how they fit into the toll signalling pathway is not yet known. Finally, Cactus is a homologue of IκB, whereas Dif and Relish are homologues of NF-κB. See the text for a more complete description of the signalling pathway.

Figure 10 :

Imler, J.-L., and Hoffmann, J. A. (2003) *Nature Immunol.* 4:105.

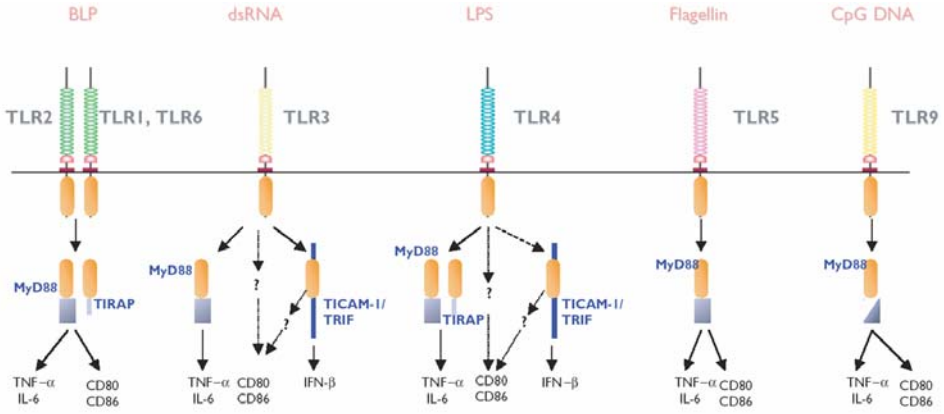


Figure 1. TLRs use different combinations of TIR domain adaptors to activate cellular responses. TLRs are activated by microbial-derived molecules and induce the inflammatory cytokines TNF-α and IL-6, as well as the costimulatory molecules CD80 and CD86 on DCs. Note that TLR2 associates with TLR1 or TLR6 to mediate activation by triacetylated or diacetylated bacterial lipopeptides (BLP), respectively. Up-regulation of cytokines involves MyD88 and TIRAP when cells are stimulated through TLR2 or TLR4, and MyD88 only in the case of stimuli acting through TLR3, TLR5 or TLR9. TLR3 can induce the antiviral cytokine IFN-β *via* association with TICAM-1. TLR4 can also induce IFN-β, suggesting that it may signal through TICAM-1 as well. Upregulation of CD80 and CD86 on DCs by TLR3 and TLR4 is mediated by a MyD88-independent pathway. It is not yet clear if this pathway involves TICAM-1. The TIR domains in the receptors and adaptors are represented in orange.

II.

(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)

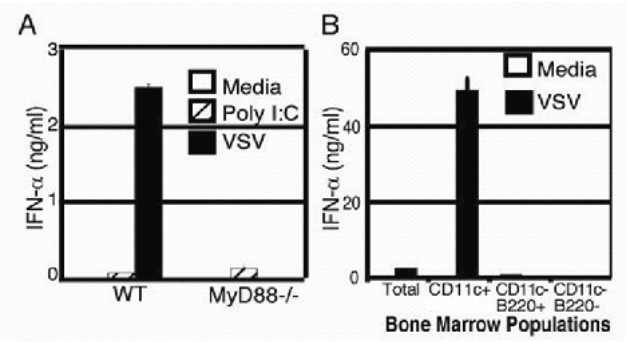
La présente étude s'intéresse à la voie d'activation mise en jeu en réponse à l'infection par des virus à ARN simple-brin comme le VSV (*vesicular stomatitis virus*) et le virus de la grippe (*influenza*). Dans une première expérience, les auteurs mesurent par ELISA la production d'IFN-α par des cellules 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 11**. 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 11

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)

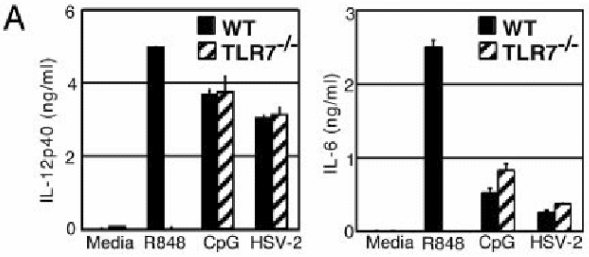
De nombreux TLR sont exprimés par les cellules dendritiques. Etant donné que le mode d'infection du VSV implique un mécanisme d'endocytose, les auteurs ont porté leur attention sur TLR7 et TLR9 qu'on retrouve au niveau des endosomes. La réponse de cellules dendritiques de moelle osseuse ou de macrophages à différents stimulus a été étudiée chez des souris de type sauvage, Myd88-/-, ou invalidées pour TLR7 (TLR7-/-) ou TLR9 (TLR9-/-) (**Figure 12**).

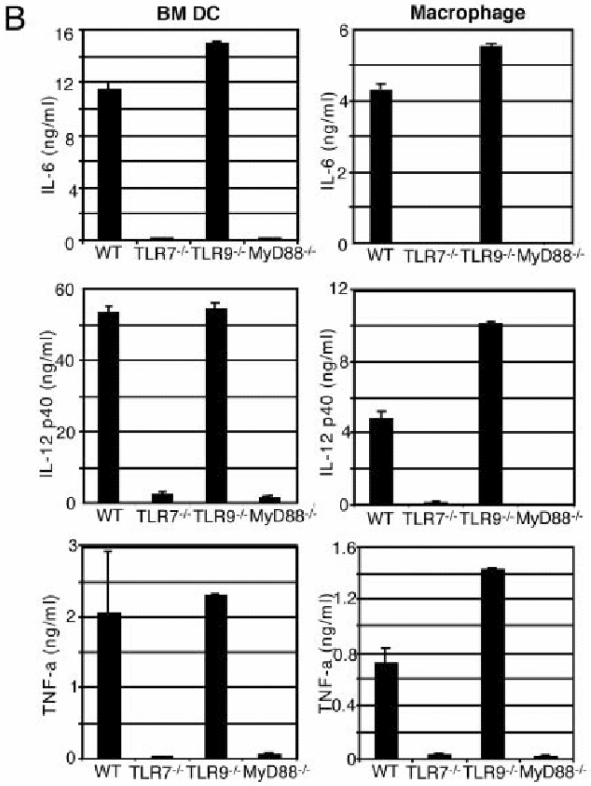
Question 5. Analysez et commentez ces résultats. (5 lignes maximum)

Figure 12

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.





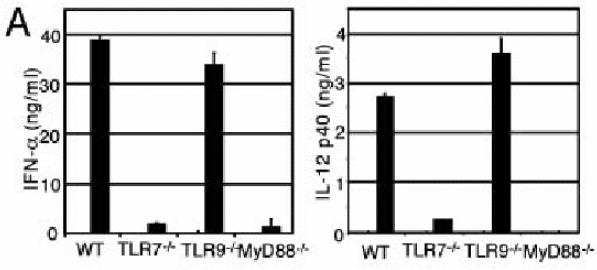
Les auteurs étudient ensuite le rôle de TLR7 pour la production d'IFN-α en réponse aux virus VSV et influenza. La réponse de cellules dendritiques de moelle osseuse a été étudiée chez des souris de type sauvage, TLR7-/-, TLR9-/-, TLR3-/- ou Myd88-/- (**Figure 13**).

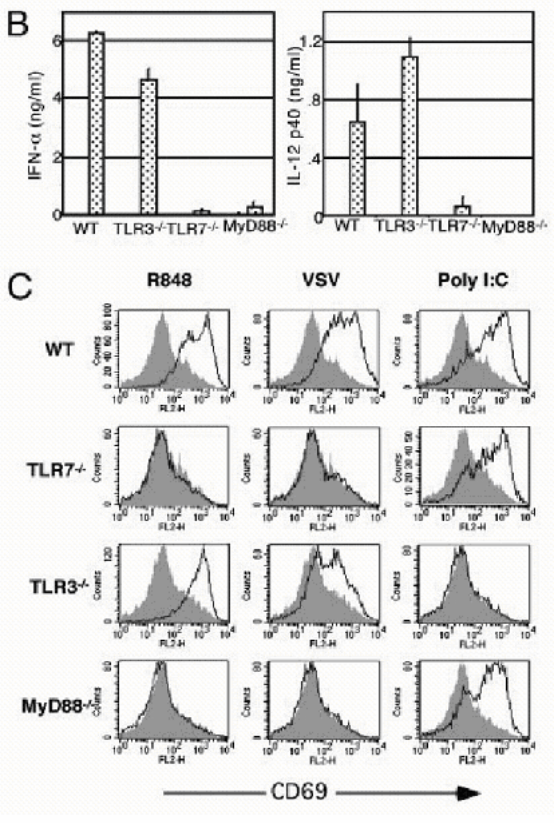
Figure 13

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 14**).

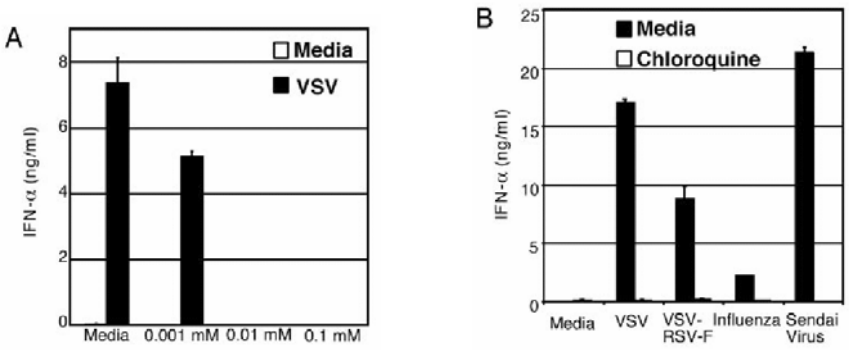


Figure 14

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 syncitial 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.