

## Interface Immunité innée/Immunité adaptative

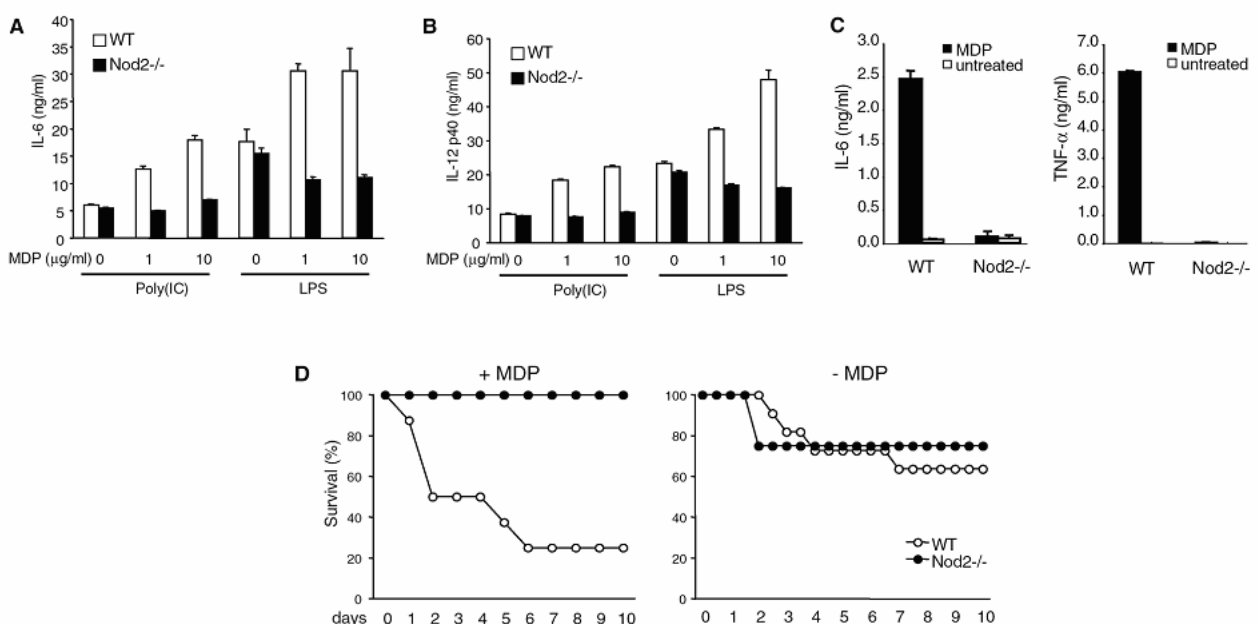
### I. Les récepteurs Nod

(D'après Kobayashi, K.S., *et al.* (2005) *Science* 307:731)

Dans cette étude, les auteurs s'intéressent au rôle de Nod2, une molécule appartenant à une famille de récepteurs de l'immunité innée nouvellement identifiée. Pour cela, une lignée de souris déficiente pour Nod2 (Nod2<sup>-/-</sup>) a été produite par invalidation et les auteurs étudient les conséquences de l'absence de Nod2 sur le développement et le fonctionnement du système immunitaire en situation physiologique et pathologique.

**Question 1.** *Rappelez, à l'aide d'un tableau synthétique, les différents types et le rôle des récepteurs de l'immunité innée.*

Dans une première expérience, les auteurs étudient la réponse *in vitro* et *in vivo* de souris de type sauvage (WT) ou déficientes pour Nod2 (Nod2<sup>-/-</sup>) après stimulation par différents stimulus mettant en jeu certains récepteurs de l'immunité innée. Les résultats sont présentés sur la **Figure 1**.



**Figure 1**

A & B : Mesure de la production par ELISA d'IL-6 et d'IL-12 par des macrophages de souris de type sauvage (WT) ou déficientes pour Nod2 (Nod2<sup>-/-</sup>) après stimulation *in vitro* pendant 24 h par du Poly(I:C) ou du LPS en présence de concentrations croissantes de MDP (muramyl dipeptide).

C : Mesure de la production par ELISA d'IL-6 et de TNFα par des macrophages de souris WT ou Nod2<sup>-/-</sup> après stimulation *in vitro* pendant 20 h en présence ou en absence de MDP.

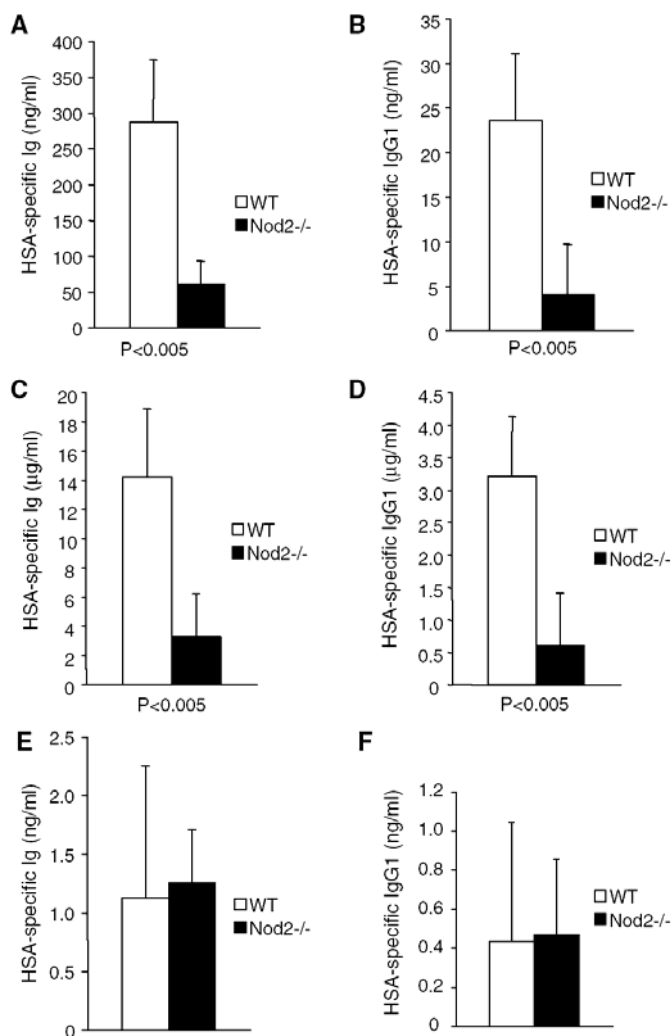
D : Courbes de survie de souris WT ou Nod2<sup>-/-</sup> après injection de LPS en présence ou en absence de MDP.

Dans une deuxième expérience, les auteurs étudient la réponse anticorps spécifique suite à une immunisation avec la sérum albumine humaine (HSA) chez des souris de type sauvage (WT) ou déficientes pour Nod2 (Nod2<sup>-/-</sup>) en présence ou en absence de MDP (muramyl dipeptide). Les résultats sont présentés sur la **Figure 2**.

**Figure 2**

La réponse anticorps sérique totale (A, C & E) et IgG1 (B, D & F) spécifique de HSA a été mesurée par ELISA chez des souris de type sauvage (WT) ou déficientes pour Nod2 (Nod2<sup>-/-</sup>) deux semaines après immunisation avec la sérum albumine humaine (HSA) en présence de MDP (A & B) et après un rappel trois semaines après la première immunisation (C & D). En E & F, la réponse anticorps anti-HSA a été mesurée deux semaines après immunisation avec HSA en présence de R-848, un ligand synthétique de TLR7.

N.B. : Les valeurs «  $P < 0.005$  » indiquent des différences statistiquement significatives entre les deux lignées de souris pour les paramètres considérés.



**Question 2.** Analysez soigneusement des résultats présentés à la Figure 2. (10 lignes maximum)

Dans une dernière expérience, les auteurs mesurent la charge bactérienne chez des souris de type sauvage (WT) ou déficientes pour Nod2 (Nod2<sup>-/-</sup>) après injection de *Listeria monocytogenes* par voies intraveineuse, intrapéritonéale ou intragastrique. Les résultats sont présentés sur la Figure 3.

**Question 3.** Analysez soigneusement des résultats présentés à la Figure 3. (10 lignes maximum)

**Question 4.** Que concluez-vous quant au rôle de Nod2 dans la protection contre des pathogènes bactériens. (5 lignes maximum)

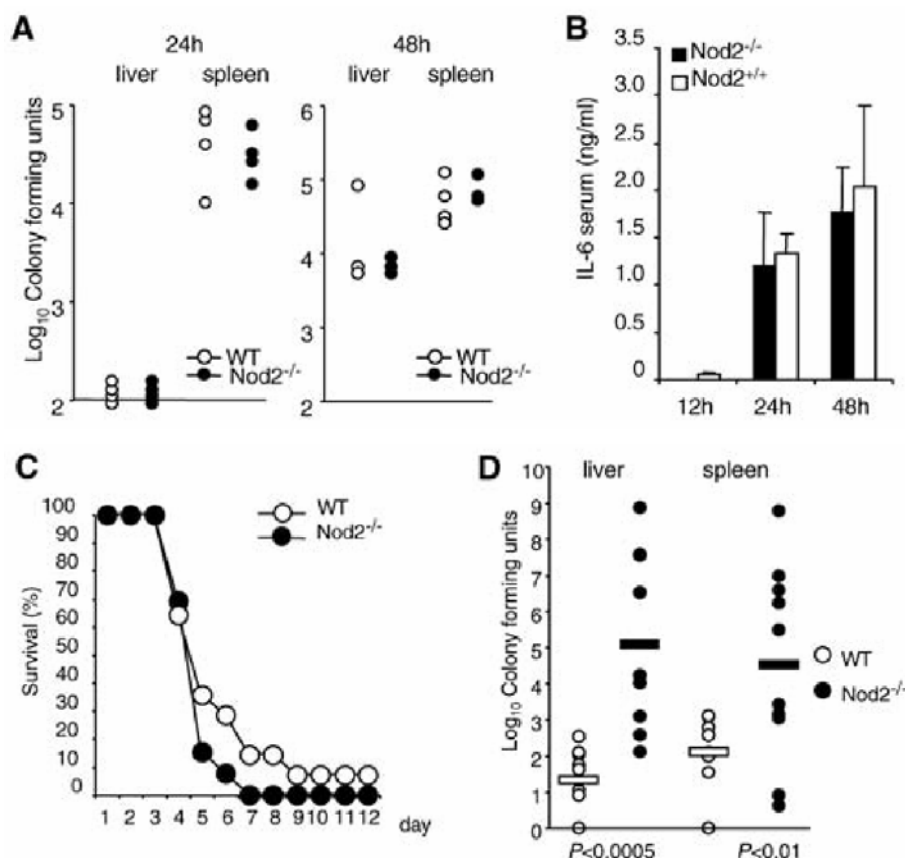


Figure 3

A : La charge bactérienne (colony forming unit) de souris de type sauvage (WT) ou déficientes pour Nod2 (Nod2<sup>-/-</sup>) est mesurée dans le foie (liver) et dans la rate (spleen) 24h et 48h après infection par *Listeria monocytogenes* par voie intraveineuse.

B : La production d'IL-6 est mesurée dans le sérum de souris WT (Nod2<sup>+/+</sup>) ou Nod2<sup>-/-</sup> 12h, 24h et 48h après infection par *L. monocytogenes* par voie intraveineuse.

C : La survie de souris WT ou Nod2<sup>-/-</sup> est mesurée après infection par *L. monocytogenes* par voie intrapéritonéale.

D : La charge bactérienne (colony forming unit) de souris WT ou Nod2<sup>-/-</sup> est mesurée dans le foie (liver) et dans la rate (spleen) 72h après infection par *Listeria monocytogenes* par voie intragastrique.

N.B. : Les valeurs «  $P < 0.0005$  » et «  $P < 0.01$  » indiquent des différences statistiquement significatives entre les deux lignées de souris pour les paramètres considérés.

## II. Les récepteurs Toll-like

(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- $\alpha$  par des cellules de moelle osseuse de souris de type sauvage (WT) ou invalidées pour le gène MyD88 (MyD88<sup>-/-</sup>) 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 4**. Par ailleurs, des cellules de moelle

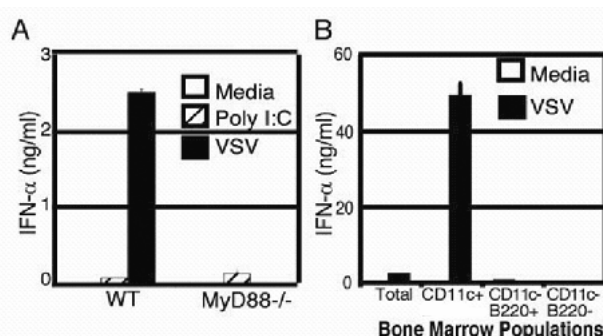
osseuse incubées en présence d'ARN simple brin synthétique produisent des quantités comparables d'IFN- $\alpha$  à celles observées pour VSV chez les souris WT et MyD88 $^{-/-}$ .

**Figure 4**

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- $\alpha$  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- $\alpha$  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)

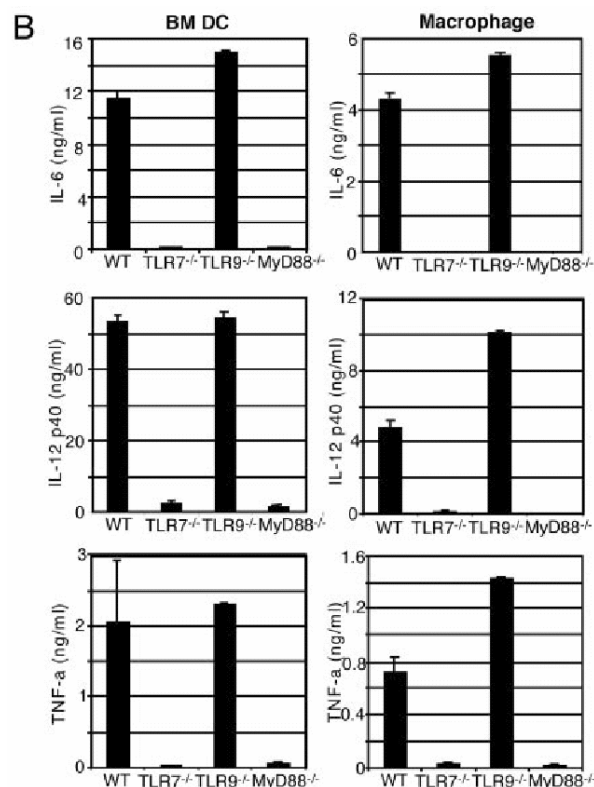
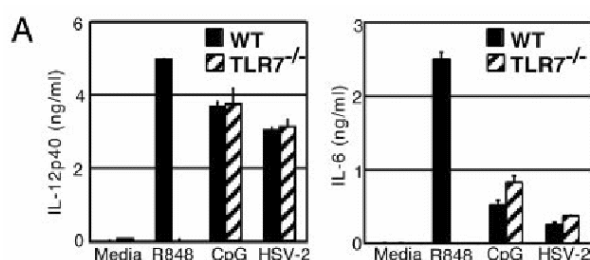
De nombreux TLR sont exprimés par les cellules dendritiques. Etant donné que le mode d'infection du VSV implique un mécanisme d'endocytose, les auteurs ont porté leur attention sur TLR7 et TLR9 qu'on retrouve au niveau des endosomes. La réponse de cellules dendritiques de moelle osseuse ou de macrophages à différents stimulus a été étudiée chez des souris de type sauvage, Myd88 $^{-/-}$ , ou invalidées pour TLR7 (TLR7 $^{-/-}$ ) ou TLR9 (TLR9 $^{-/-}$ ) (**Figure 5**).

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

**Figure 5**

A : Des cellules de moelle osseuse de souris de type sauvage (WT) ou invalidées pour TLR7 (TLR7<sup>-/-</sup>) 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<sup>-/-</sup>, invalidées pour le gène TLR9 (TLR9<sup>-/-</sup>), ou MyD88<sup>-/-</sup> ont été cultivées en présence de R848. Après 48h de culture, l'IL-6, l'IL-12 et le TNF- $\alpha$  produits ont été mesurés dans les surnageants de culture par ELISA.



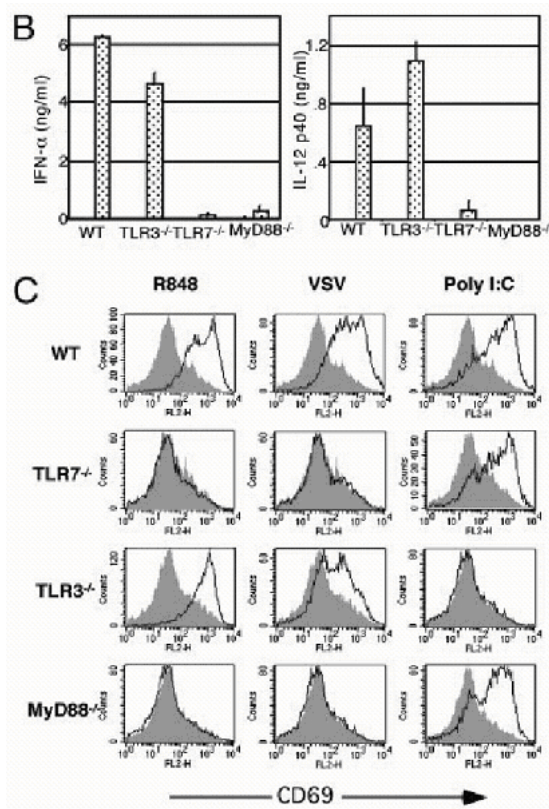
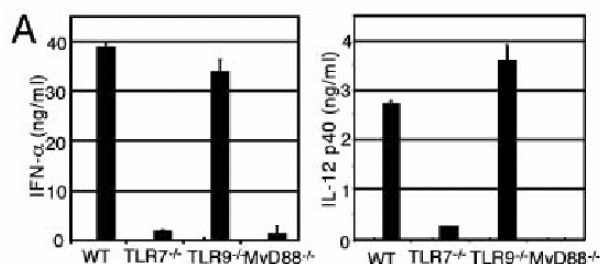
Les auteurs étudient ensuite le rôle de TLR7 pour la production d'IFN- $\alpha$  en réponse aux virus VSV et influenza. La réponse de cellules dendritiques de moelle osseuse a été étudiée chez des souris de type sauvage, TLR7<sup>-/-</sup>, TLR9<sup>-/-</sup>, TLR3<sup>-/-</sup> ou MyD88<sup>-/-</sup> (Figure 6).

**Figure 6**

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

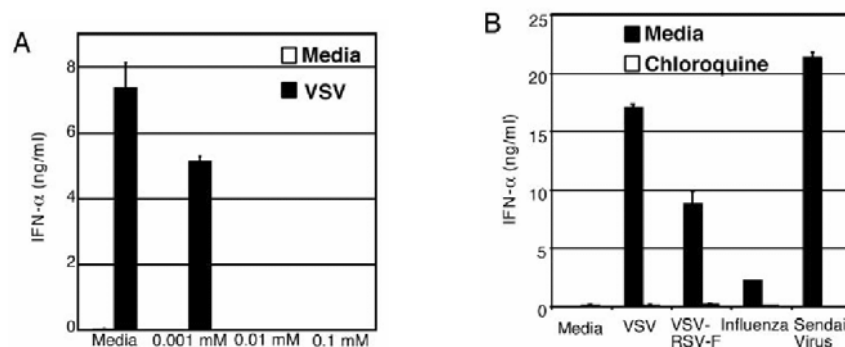
B : Des cellules de moelle osseuse de souris de type sauvage (WT), TLR3<sup>-/-</sup> (invalidées pour le gène TLR3), TLR7<sup>-/-</sup> ou MyD88<sup>-/-</sup> ont été cultivées en présence de virus influenza. Après 18h, l'IFN- $\alpha$  et l'IL-12 produits ont été mesurés dans les surnageants de culture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

C : Des splénocytes de souris de type sauvage (WT), TLR7<sup>-/-</sup>, TLR3<sup>-/-</sup> ou MyD88<sup>-/-</sup> 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<sup>+</sup>. 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 7**).



**Figure 7**

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- $\alpha$  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- $\alpha$  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.