

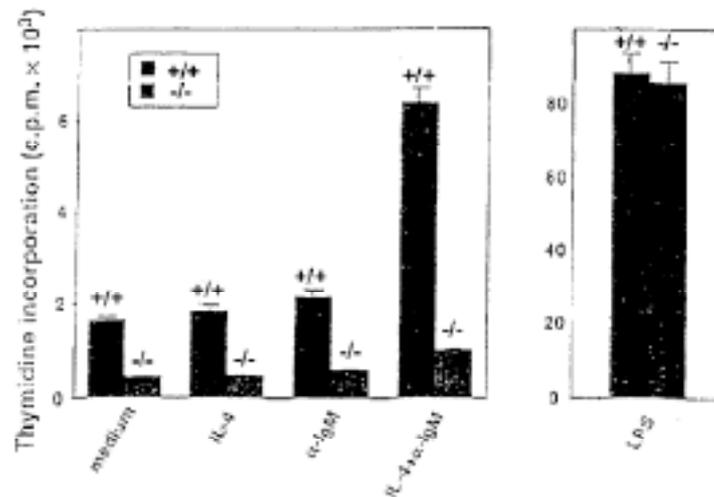
Immunité anti-infectieuse/Sensibilité aux infections (1)

I.

Les cytokines activent la phosphorylation de nombreuses protéines intracellulaires, dont les facteurs de transcription de la famille Stat (*Signal Transducers and Activators of transcription*). Une fois phosphorylés, ces facteurs de transcription Stat se dimérisent, vont dans le noyau et activent l'expression de gènes. On étudie le rôle du facteur de transcription Stat6 dans la réponse des lymphocytes B et T à l'IL4, une cytokine produite par les lymphocytes T, les mastocytes et les basophiles. Pour cela on produit des souris où le gène codant pour Stat6 a été invalidé.

On analyse la réponse à l'IL4 des lymphocytes B des souris normales (+/+) et des souris invalidées (-/-). Pour cela, on cultive les lymphocytes B au repos en présence d'IL4 recombinante additionnée ou non de Fab'2 d'anti-IgM, ou en présence de LPS et on mesure la prolifération cellulaire par incorporation de [³H]-Thymidine au jour 2 de la culture. Les résultats obtenus sont présentés sur la **Figure 1**.

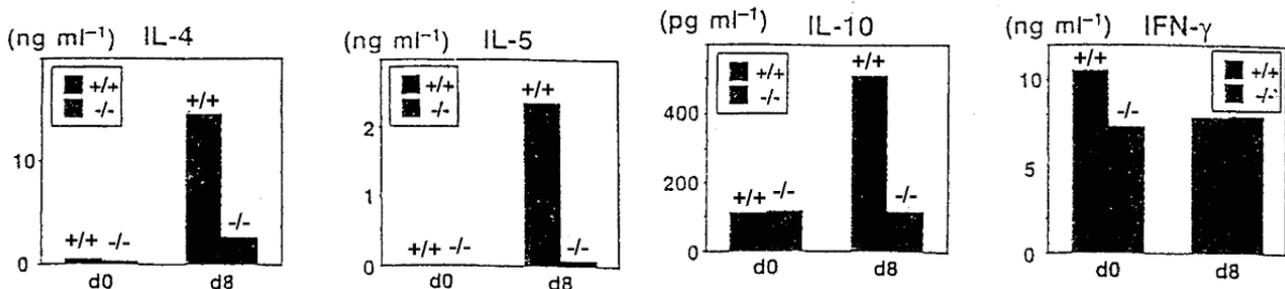
Figure 1



Question 1. Comment interprétez-vous ces résultats ?

On analyse ensuite la réponse des lymphocytes T des souris +/+ et -/- au jour 0 ou au jour 8 de l'infection des souris par *Nippostrongylus brasiliensis*, un parasite qui active les réponses de type Th2. Pour cela on isole les lymphocytes T spléniques des souris infectées et on les cultive pendant 24h en présence d'anti-CD3. On mesure ensuite par ELISA la concentration de cytokines présentes dans les surnageants de culture (**Figure 2**).

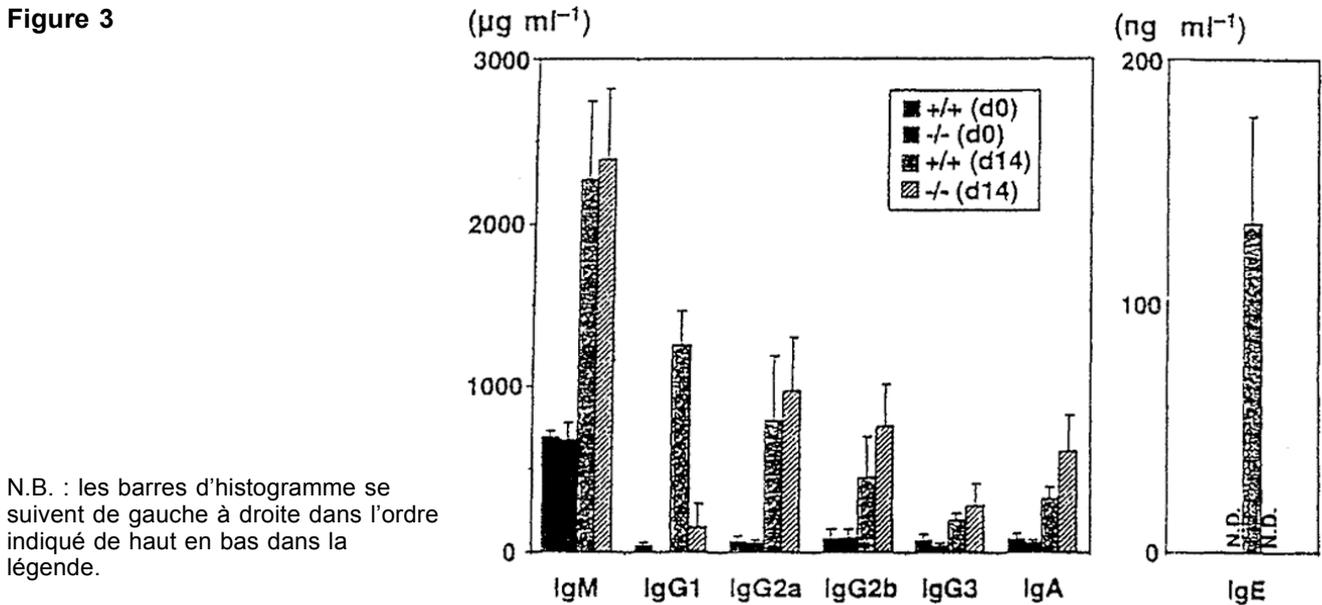
Figure 2



Question 2. Comment interprétez-vous ces résultats ?

L'IL4 est nécessaire pour la commutation isotypique vers les IgE. Aux jours 0 et 14 après infection par *N. brasiliensis*, on mesure la concentration des différents isotypes d'Ig dans les sérums des animaux +/+ ou -/- (Figure 3).

Figure 3



Question 3. Qu'en concluez-vous ?

Question 4. Quel(s) autre(s) gène(s) faudrait-il invalider pour obtenir les mêmes effets ?

II.

(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 4

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

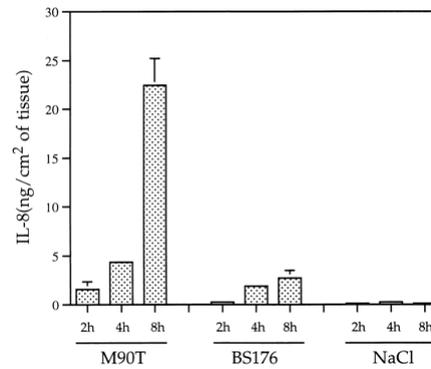


Figure 5

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

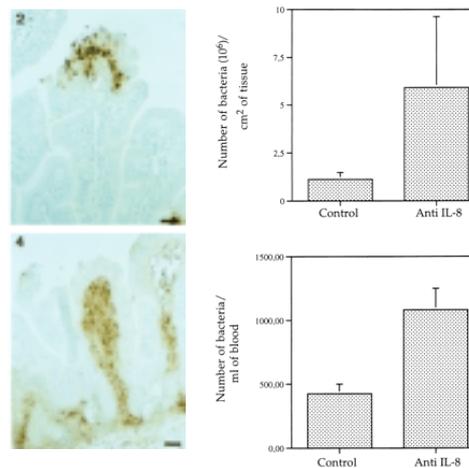
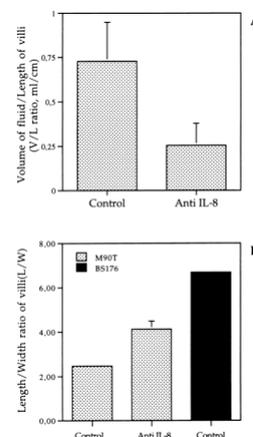


Figure 6

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)

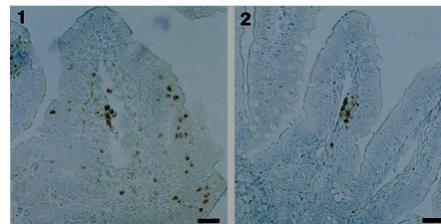


Question 1. Commentez les résultats obtenus.

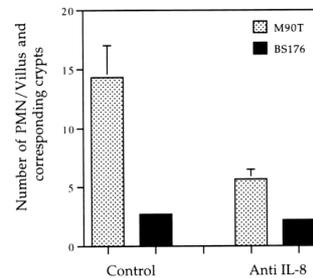
Question 2. Quelles hypothèses peut-on formuler pour les expliquer ?

Figure 7

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 8

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.

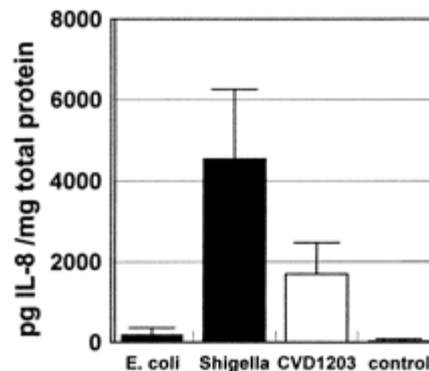
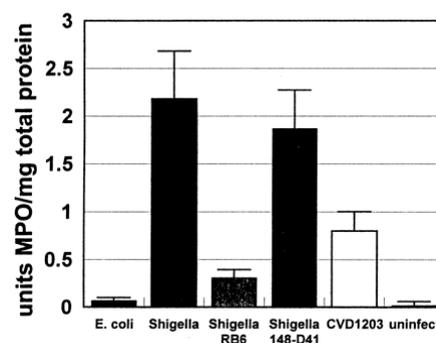


Figure 9

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



souris selon les cas.

Figure 10

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.

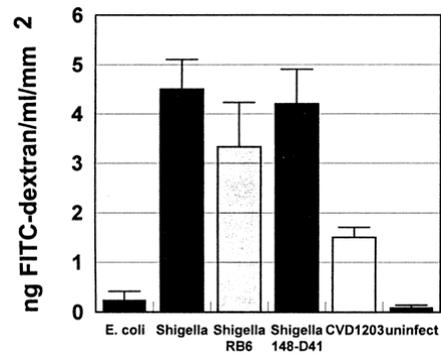
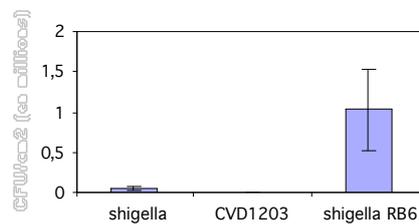


Figure 11

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 12

Mesure du taux de destruction de l'épithélium intestinal

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

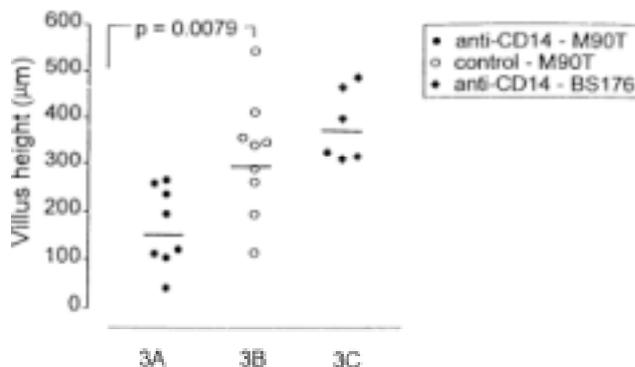
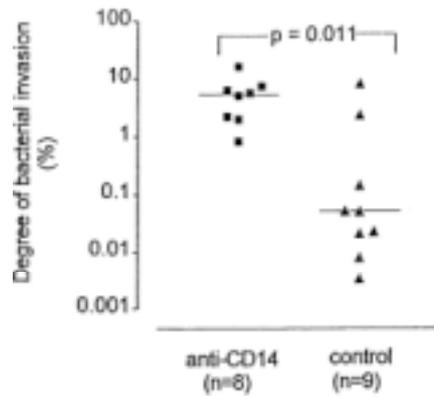


Figure 13

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 14

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

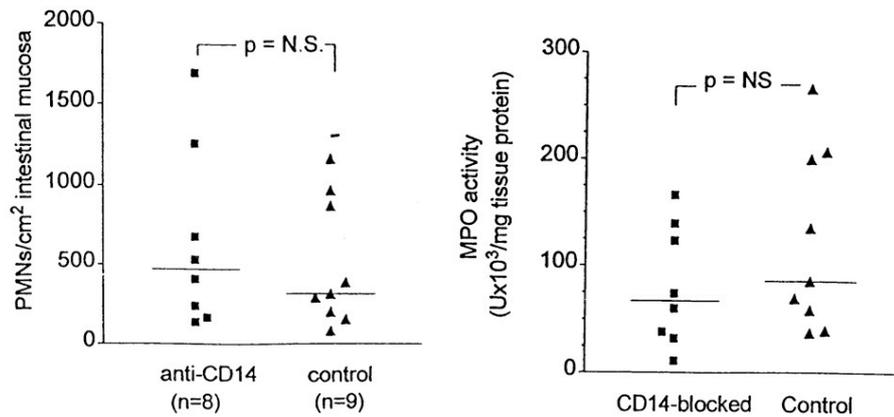
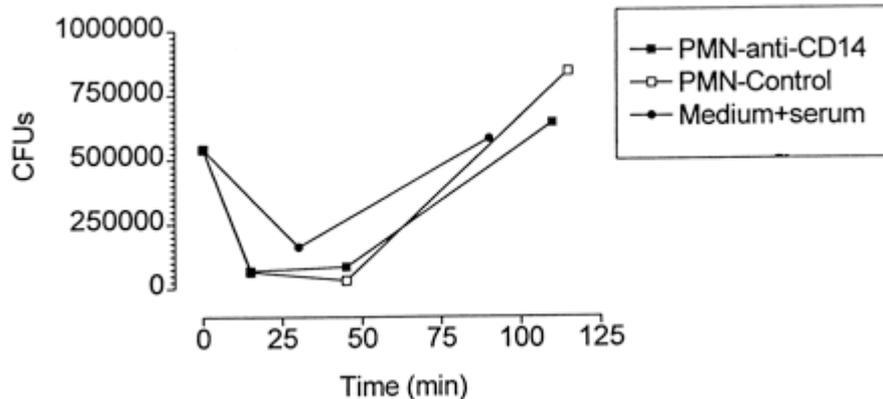


Figure 15

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.

III. Immunosuppression induite par le virus de la rougeole

(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 immunodéficience 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 1. 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)

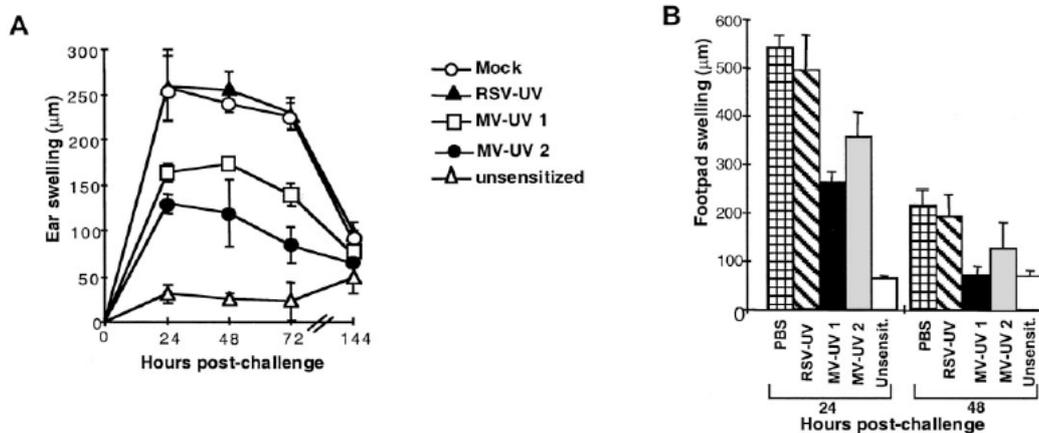


Figure 16

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 2. 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 17) chez des souris C57BL/6 et chez des animaux FcR^{-/-} à la fois déficients pour FcγRII et FcRγ.

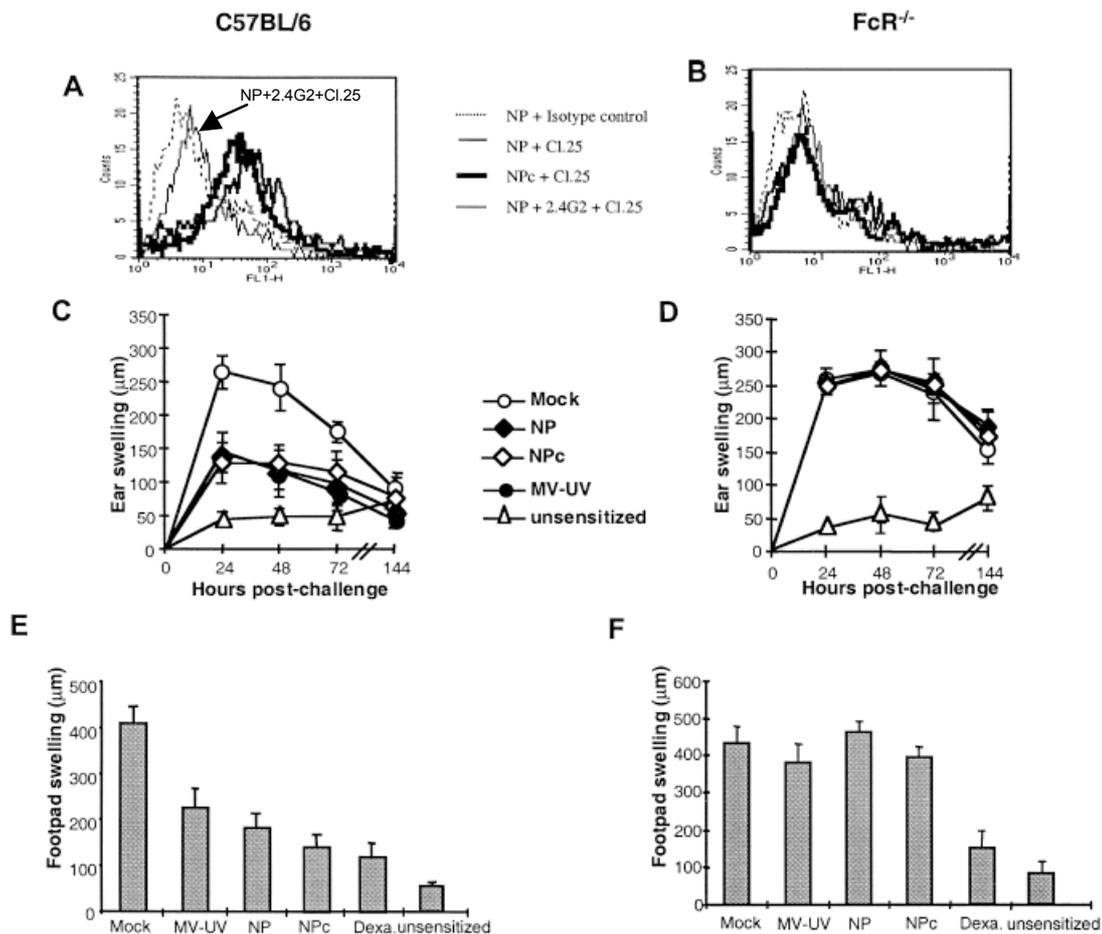


Figure 17

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

Question 4. 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 18).

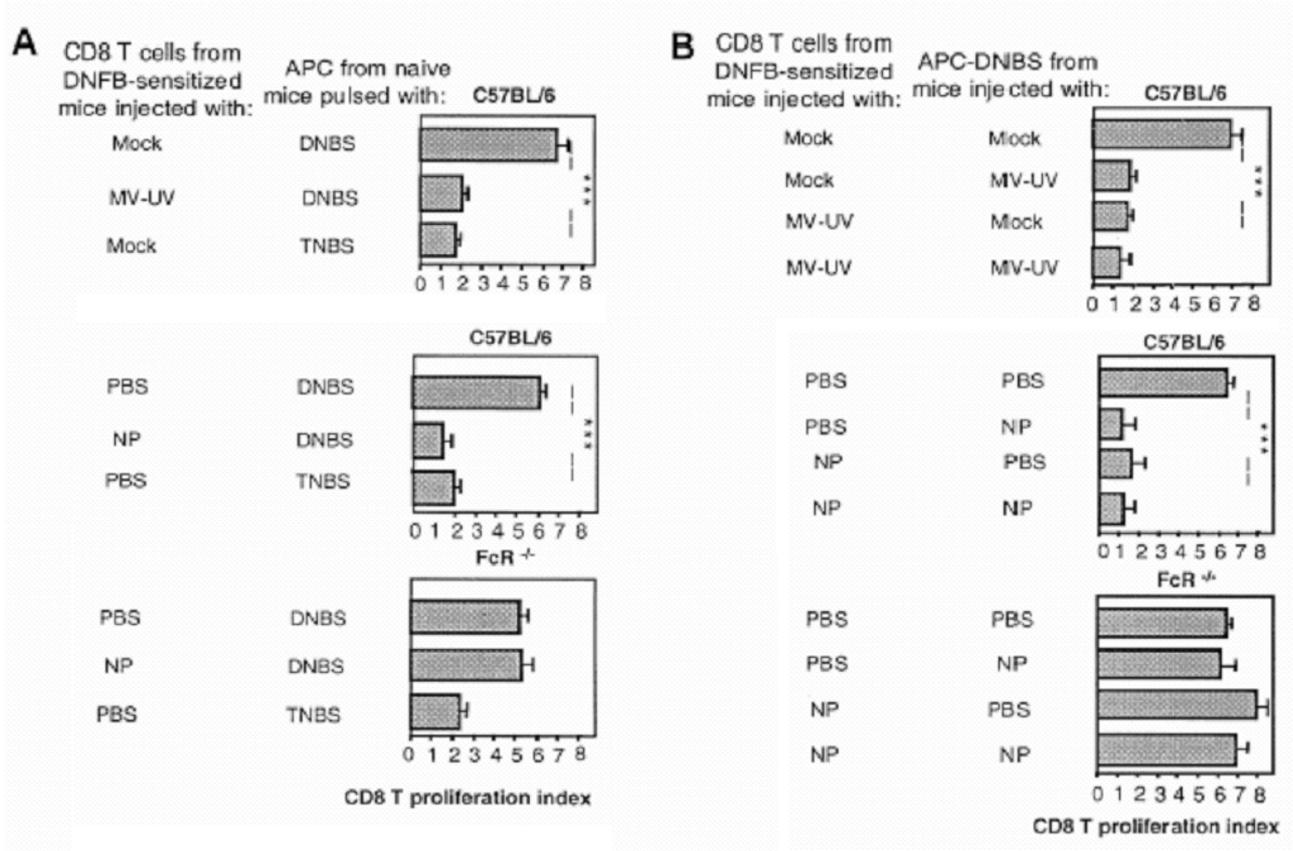


Figure 18

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-sulfonic acid et le TNBS est le 2,4,6-trinitrofluorobenzène-sulfonic acid.

Question 5. 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 19**).

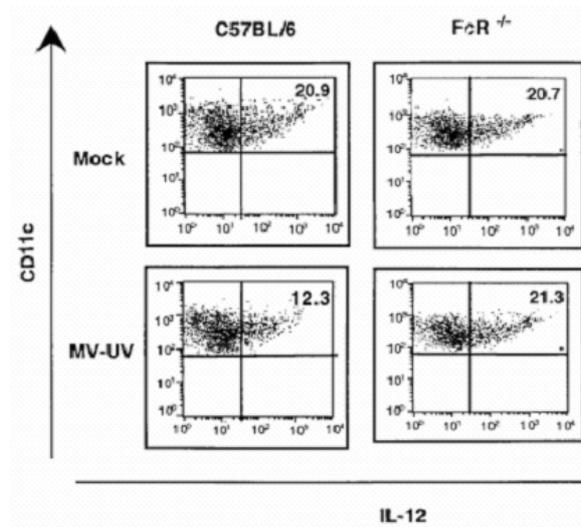


Figure 19

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

Question 7. *Citez deux techniques permettant d'enrichir cette population. (2 lignes)*

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