

## Immunité anti-infectieuse/Sensibilité aux infections (2)

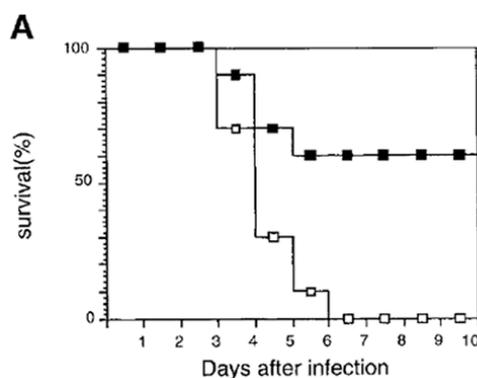
### I. Comparaison de la réponse de deux lignées de souris (C57BL/6 et BALB/c) à l'infection par *Listeria monocytogenes*

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

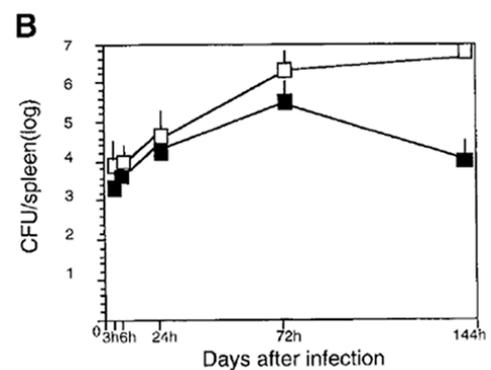
Des souris C57BL/6 et BALB/c sont infectées par injection intraveineuse avec *Listeria monocytogenes*, une bactérie gram + intracellulaire. Les auteurs étudient la survie des souris et la présence de bactéries dans leur rate. Les résultats sont présentés sur la **Figure 1**.

Question 1. Que peut-on conclure de cette expérience ?

Figure 1



□ : BALB/c ; ■ : C57BL/6

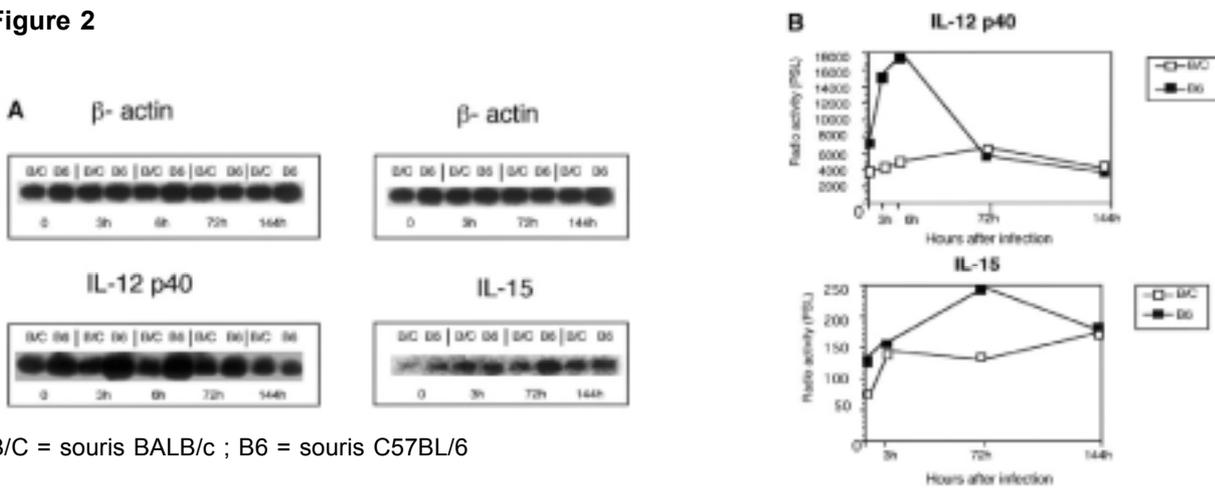


Afin de mieux comprendre la différence observée entre les deux lignées, les auteurs étudient les cytokines produites par les cellules dendritiques de ces souris.

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.

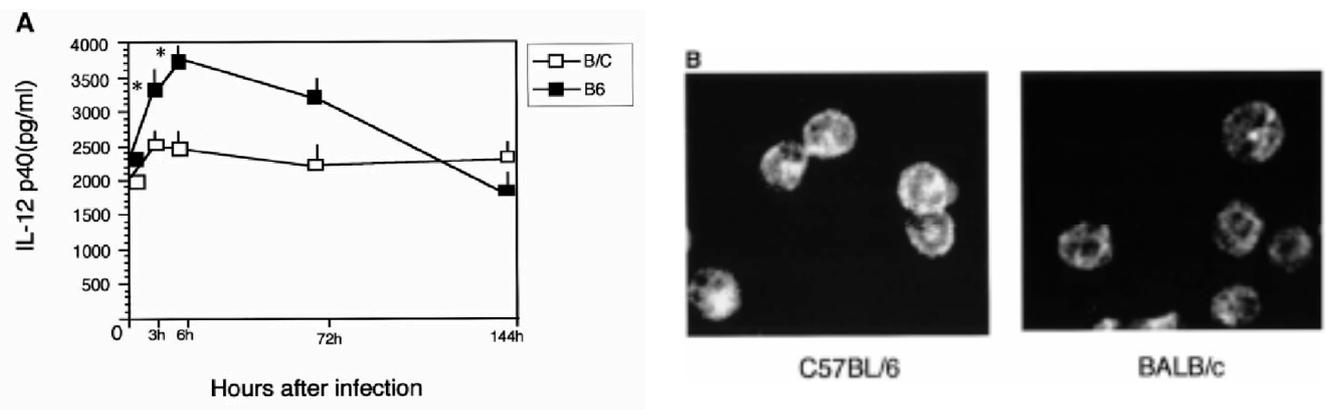
La production de ces cytokines est également étudiée au niveau protéique par ELISA (IL-12) (**Figure 3C**) ou immunofluorescence (IL-15) (**Figure 3D**).

Figure 2



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

Figure 3



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

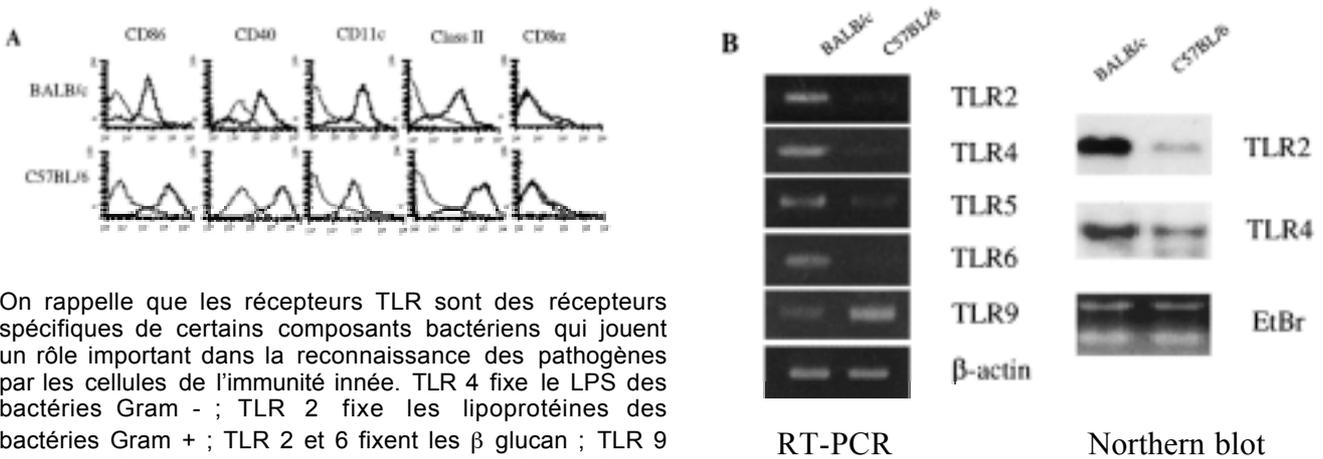
Question 2. Pourquoi étudier la production de cytokines par les cellules dendritiques ?

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



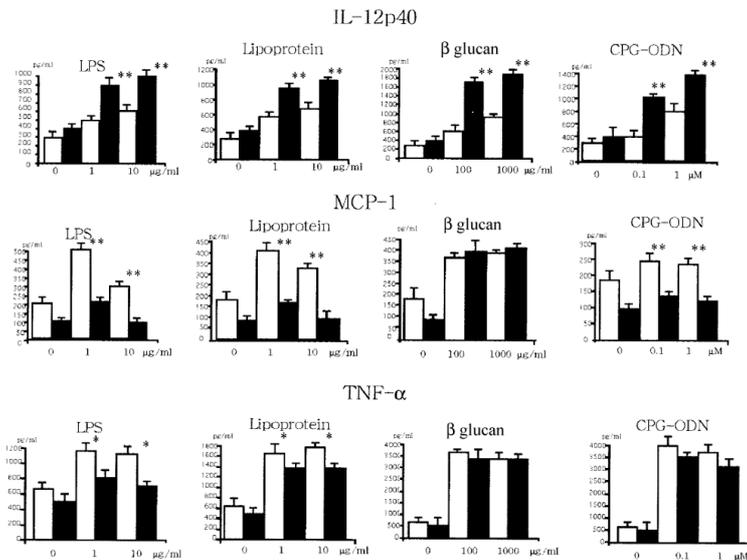
On rappelle que les récepteurs TLR sont des récepteurs spécifiques de certains composants bactériens qui jouent un rôle important dans la reconnaissance des pathogènes par les cellules de l'immunité innée. TLR 4 fixe les LPS des bactéries Gram - ; TLR 2 fixe les lipoprotéines des bactéries Gram + ; TLR 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 ■



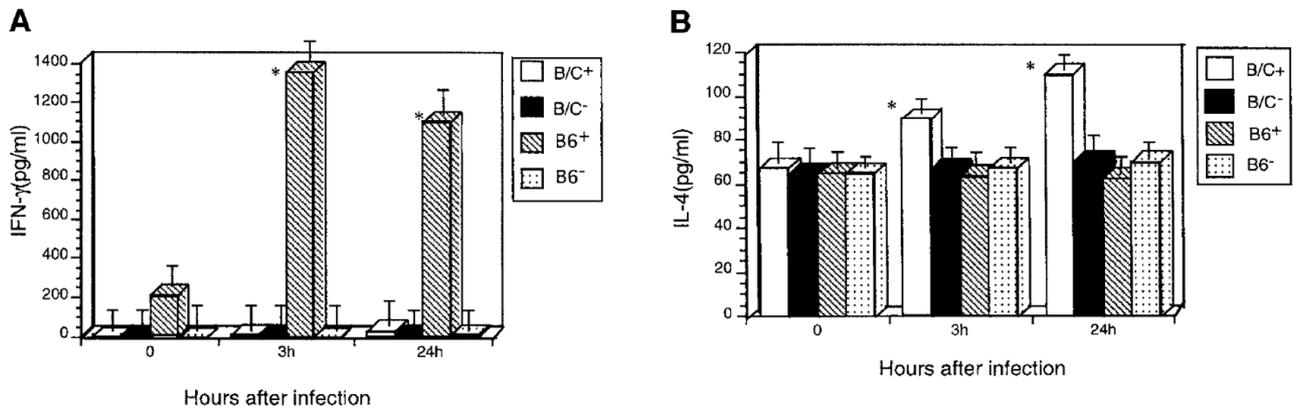
Question 6. Peut-on relier ces résultats aux résultats précédents ?

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.

## II.

(d'après Stäger S. et al. (2003) *Nature Medicine* 9:1287 – 1292)

L'importance des cellules T CD8<sup>+</sup> dans la protection de l'hôte contre des pathogènes intracellulaires est reconnue, et le priming des cellules T CD8<sup>+</sup> est nécessaire pour une vaccination efficace contre la leishmaniose. Bien que le projet de séquençage du génome indique pléthore de candidats potentiels pour la vaccination, peu de critères existent pour les sélectionner, et le choix de l'antigène reste empirique. De plus, une vaccination efficace nécessite de cibler l'antigène au CHM de classe I et un environnement cytokinique favorisant le priming et la différenciation des cellules T CD8<sup>+</sup>.

La capture des complexes immuns par les récepteurs pour les portions Fc des Igs (FcR) facilite la présentation antigénique restreinte par le CMH I, ce qui suggère que l'efficacité de vaccination peut-être améliorée par une immunisation avec des complexes immuns préformés. Les souris déficientes pour le composant C3 du complément (C3<sup>-/-</sup>) ont une réponse T cytotoxique faible à une infection par le virus influenza et le virus de la chorioméningite lymphocytaire.

Les anticorps naturels IgM, IgG and IgA sont présents chez les individus sains et chez d'autres espèces animales. Ils sont de faible affinité comparé aux anticorps produits pendant la réponse immunitaire, et ont une réactivité large vis-à-vis d'antigènes du soi. La plupart des anticorps naturels sont produits par les cellules B B1, qui ont la capacité d'auto-renouvellement, et qui sont surtout localisés dans le péritoine. Ces anticorps naturels peuvent servir de récepteurs pour la reconnaissance innée de composants des parois des certaines bactéries.

La protéine HASP (« Hydrophilic acylated surface protein ») B-1, un membre d'une famille de protéines exprimées pendant les stades infectieux du parasite *Leishmania*, a été récemment identifiée comme candidat pour la vaccination contre la leishmaniose viscérale. L'immunisation avec la protéine HASPB-1 recombinante induit des cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques de l'antigène et une protection à long terme, ce qui est caractéristique des vaccins ADN.

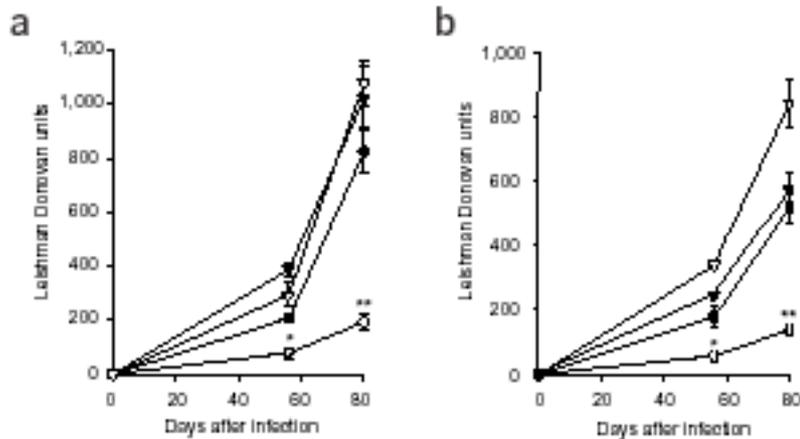
Des souris de type sauvage, des souris déficientes pour l'IL-4 (IL-4<sup>-/-</sup>) ou des souris déficientes pour le récepteur de l'IL-4 (IL-4ra<sup>-/-</sup>) ont été immunisées avec la protéine HASPB-1 recombinante et ont été infectées 3 semaines plus tard par *leishmania donovani*. Le bourgeonnement du parasite dans la rate a ensuite été déterminé à différents temps après l'infection (**Figure 7**).

**Figure 7**

Mesure du bourgeonnement du parasite dans la rate aux temps indiqués

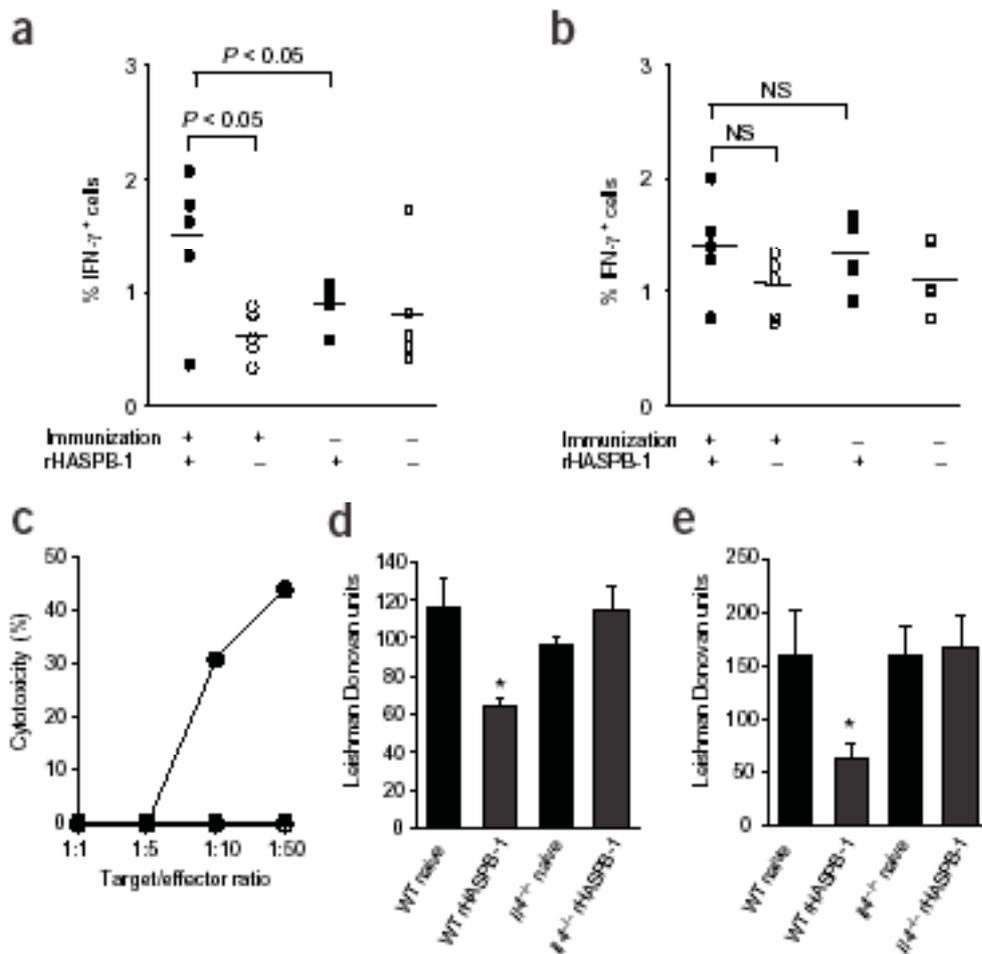
a : Souris contrôles (●▲) et souris vaccinées (○△) BALB/c (●○) et IL4<sup>-/-</sup> (▲△) infectées par *leishmania donovani*.

b : Souris BALB/c (●○) et souris IL-4ra<sup>-/-</sup> (▲△) infectées par *leishmania donovani*.



Les cellules spléniques ont été isolées de souris BALB/c ou de souris IL-4<sup>-/-</sup> immunisées par HASPB-1 avant infection et re-stimulées *in vitro* avec la protéine HASPB-1. La fréquence de cellules productrices d'IFN- $\gamma$  a été déterminée (**Figure 8 a et b**), l'activité cytotoxique des cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques de la protéine HASPB-1 a été analysée *in vitro* (**Figure 8 c**) et la capacité de ces cellules T CD8<sup>+</sup> à conférer une protection a été déterminée par transfert adoptif (**Figure 8 d et e**).

Figure 8



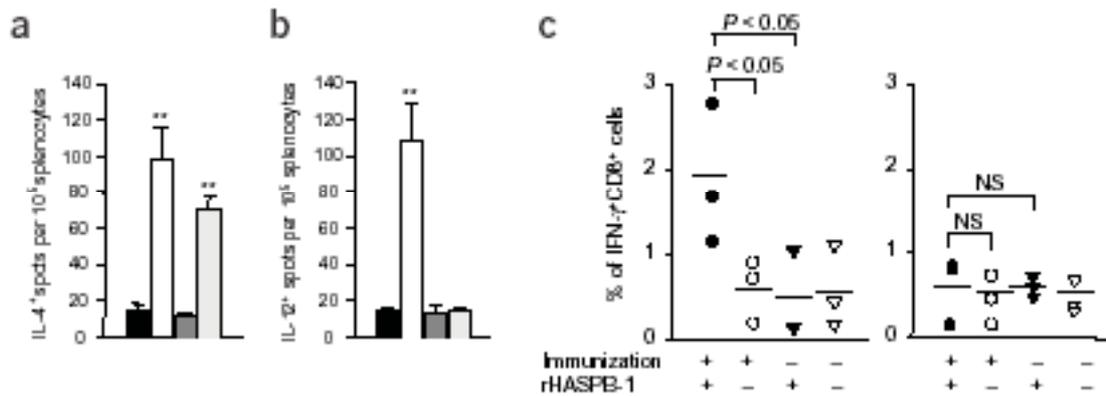
(a, b) Les cellules spléniques de souris BALB/c (a) ou de souris IL-4<sup>-/-</sup> (b) immunisées par HASPB-1 (●○) ou par l'ovalbumine (■□) ont été cultivées en absence (○□) ou en présence (●■) de rHASPB-1 et le pourcentage de cellules T CD8<sup>+</sup> produisant l'IFN $\gamma$  a été déterminé. NS : non significatif.

(c) Activité cytotoxique des cellules T CD8<sup>+</sup> de souris BALB/c (●○) ou de souris IL-4<sup>-/-</sup> (■□) contre des cellules cibles contrôles (○□) ou contre des cellules cibles exprimant HASPB-1 (●■).

(d, e) Les cellules T CD8<sup>+</sup> de souris BALB/c ou de souris IL-4<sup>-/-</sup>, naïves ou vaccinées par HASPB-1 ont été transférées dans des souris receveuses BALB/c, et le bourgeonnement du parasite dans la rate (d) et dans le foie (e) a été déterminé 50 jours après infection des souris par le parasite leishmania.

Pour déterminer si l'injection de la protéine HASPB-1 induit la sécrétion d'IL-4 et d'IL-12, des souris BALB/c ou des souris déficientes pour le récepteur de l'IL-4 (IL-4ra<sup>-/-</sup>) ont reçu une injection de la protéine HASPB-1 (Figure 9).

Figure 9



(a, b) Production d'IL-4 (a) ou d'IL-12 (b) par les cellules spléniques de souris BALB/c (■ □) ou de souris IL-4ra<sup>-/-</sup> (■ ■) non traitées (■ ■) ou ayant reçu une injection de HASPB-1 (□ ■).

(c) Les cellules spléniques de souris C57BL/6 (gauche) ou de souris IL-12<sup>-/-</sup> (droite) immunisées par HASPB-1 (● ○) ou par OVA (▲ △) ont été cultivées in vitro sans (○ △) ou avec (● ▲) HASPB-1 et la production d'IFN-γ par les cellules T CD8<sup>+</sup> a été déterminée.

NS : Non significatif

**Question 1.** Commentez les résultats présentés sur les Figures 7 et 8. Indiquez les médiateurs et les cellules impliqués dans ce phénomène.

**Question 2.** Expliquez et discutez les techniques utilisées pour obtenir les résultats présentés dans les figures 8a, 8b ou 8c.

**Question 3.** Proposez une vue schématique du réseau de cytokines impliquées dans les réponses vaccinales.

La production d'IL-4 par les souris BALB/c contrôles ou par les souris IL-4ra<sup>-/-</sup> naïves ou ayant reçu une injection de la protéine HSAPB-1 a ensuite été déterminée dans les différents types cellulaires (**Figure 10 a, b**). Pour mieux caractériser la réponse IL-4 par les cellules CD11b<sup>+</sup>, des expériences de RT-PCR en temps réel ont été réalisées (**Figure 10 c**). Enfin, des souris contenant le gène codant la protéine EGFP sous contrôle du promoteur de l'IL-4 (4get mice) ont reçu ou non une injection de la protéine HASPB-1, puis les cellules spléniques de ces souris ont été marquées avec un anticorps anti-CD11c et anti-CD11b (**Figure 10 d**) et analysées en cytométrie de flux. Dans une dernière expérience, des souris BALB/c naïves ou ayant reçu une injection de HASPB-1 ont été traitées avec des liposomes contenant ou non du clodronate (on précise que ce traitement induit sélectivement l'apoptose des cellules phagocytaires mononuclées), ou bien ont reçu une injection de l'anticorps anti-cKit. L'IL-4 a été dosée de cellules spléniques isolées après ces différents traitements (**Figure 10 e, f**).

Figure 10

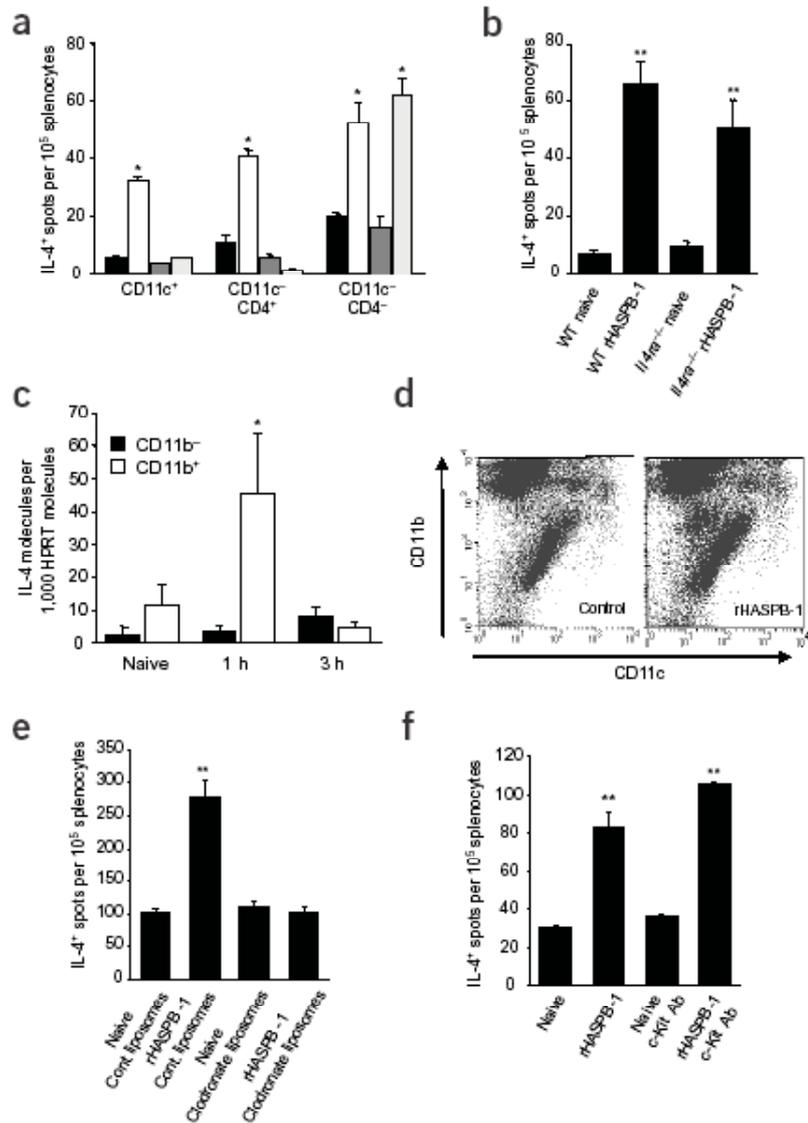
(a) Détection de la sécrétion d'IL-4 par différentes populations de cellules spléniques triées de souris contrôles BALB/c (noir) ou IL-4ra<sup>-/-</sup> (gris foncé) ou de souris immunisées par HASPB-1 BALB/c (blanc) ou IL-4ra<sup>-/-</sup> (gris clair).

(b) Détection de la sécrétion d'IL-4 par les cellules CD11b+

(c) Détection de la production d'IL-4 par PCR en temps réel par les cellules CD11b<sup>-</sup> ou CD11b<sup>+</sup> après injection de HASPB-1 aux souris.

(d) Double marquage CD11b/CD11c de cellules spléniques EGFP<sup>+</sup> de souris contrôle (gauche) ou de souris ayant reçu 3h avant le prélèvement de la rate une injection de HASPB-1 (droite).

(e, f) Détection de la sécrétion d'IL-4 par les cellules spléniques de souris BALB/c naïves ou de souris ayant reçu une injection de HASPB-1. Les cellules spléniques ont été traitées avec des liposomes contenant ou non du clodronate (e), ou avec un anticorps anti-c-Kit (f).

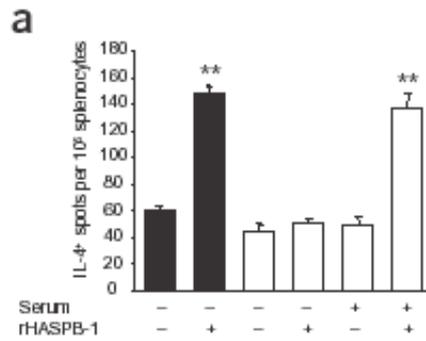


Question 4. Quelles cellules sécrètent l'IL-4 ? Expliquez.

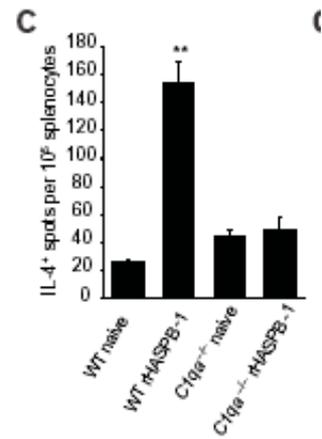
La production d'IL-4 a ensuite été étudiée dans des souris SCID immunisées ou non par la protéine HASPB-1, ayant reçu ou non du sérum de souris BALB/c (Figure 11 a), et dans des souris déficientes pour la protéine C1q (C1qa<sup>-/-</sup>) immunisées ou non par la protéine HASPB-1 (Figure 11 c). La production d'IFN-γ par les cellules T CD8<sup>+</sup> des souris C1qa<sup>-/-</sup> a été mesurée après immunisation des animaux par la protéine HASPB-1 ou par l'ovalbumine (Figure 11 e et f).

Figure 11

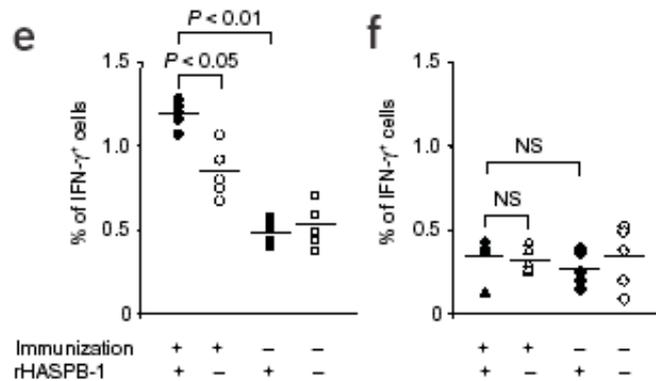
(a) Détection de la production d'IL-4 par les cellules spléniques de souris BALB/c (barres noires) ou de souris SCID (barres blanches) ayant ou non reçu une injection de HASPB-1. Les souris SCID ont également reçu ou non du sérum de souris BALB/c.



(c) Détection de la production d'IL-4 par les cellules spléniques de souris C57BL/6 de type sauvage (WT) ou de souris déficientes pour le C1q (C1qa<sup>-/-</sup>) ayant ou non reçu une injection de HASPB-1.



(e,f) Détection de la production d'IFN-γ par les T CD8<sup>+</sup> de splénocytes de souris C57BL/6 (e) ou de souris C1qa<sup>-/-</sup> (f) immunisées avec HASPB-1 (ronds et triangles) ou avec l'ovalbumine (carrés et losanges), et ayant ou non été re-stimulées in vitro par HASPB-1 (rHASPB-1).



Question 5. Les cellules T et B sont-elles impliquées dans la production d'IL-4? Pourquoi? Quelle expérience clé a permis cette démonstration?

Question 6. Les complexes immuns jouent-ils un rôle dans la production d'IL-4? Comment? Proposez un titre pour cet article.