

*Stage de formation*  
**17 & 18 mars 2014**

**Conférences**

*Institut français de l'Éducation*

**Ateliers**

*École normale supérieure de Lyon (site Monod)*

# **L'immunité innée : un système très conservé par l'évolution**

*Sandrine Beaudin*

*Marianne Naspetti*

*Informations et ressources* & **<http://acces.ens-lyon.fr/acces/ressources/immunité-et-vaccination>**

*immunité*



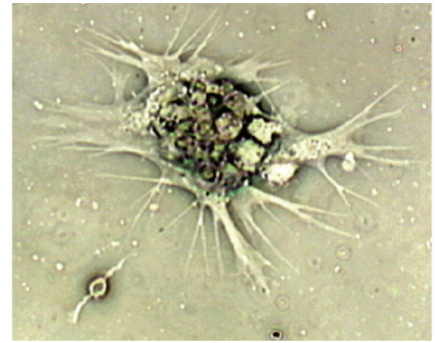
# Le système immunitaire des bivalves : l'huitre

## DOCUMENT 1 : Les différentes populations d'hémocytes de *Crassostrea gigas* et leurs principales caractéristiques

<i>Crassostrea gigas</i>				
Hemocyte type	Granulocyte		Agranulocyte	Vesicular cell
Subpopulation	BG	Intermix		
Proportion	25%	Rare	64%	Rare
Nucleus	Eccentric	ND	Central, eccentric	ND
Chromatin	Large chumps	ND	Stripped	ND
Cytoplasm				
Ectoplasm	Prominent	Unobvious	None	Prominent
Pseudopod	Prominent	Prominent	Long	Unobvious
N/C ratio	Low	ND	High	ND
Organelles	G, M, V	ND	G, M, V, rER	ND
Granules (Gr)	Basophilic	Eosinophilic and basophilic	Lake	Lake
Tinctures	Deep blue	Pink and blue		
EM	Electron-lucent	ND		
Size	0.4~0.9 μm			
Shape	Round, ovoid			

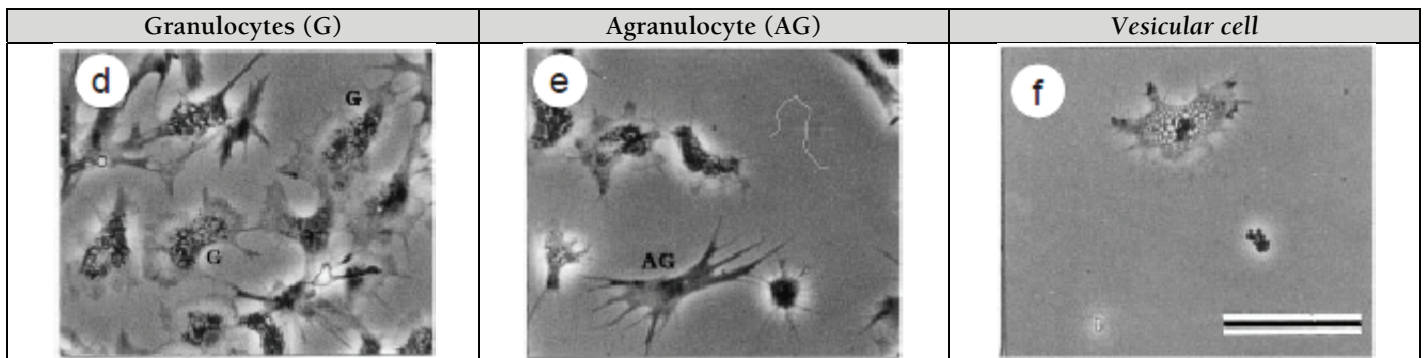
LEG, large eosinophilic granulocyte; SEG, small eosinophilic granulocyte; H, hyalinocyte; BLC, blast-like cell; EG, eosinophilic granulocyte; BG, basophilic granulocyte; Intermixed, hemocyte with eosinophilic and basophilic granules; Gr, granule; G, Golgi complex; M, mitochondria; V, vesicle; rER, rough endoplasmic reticulum; ND, not detected.

## DOCUMENT 3 : Hémocyte d'huitre (x400)



Videos : *Preparing the Hemolymph – Hemocytes in Action*  
[http://ww2.mdsg.umd.edu/interactive\\_lessons/oysters/oysblood.htm](http://ww2.mdsg.umd.edu/interactive_lessons/oysters/oysblood.htm)

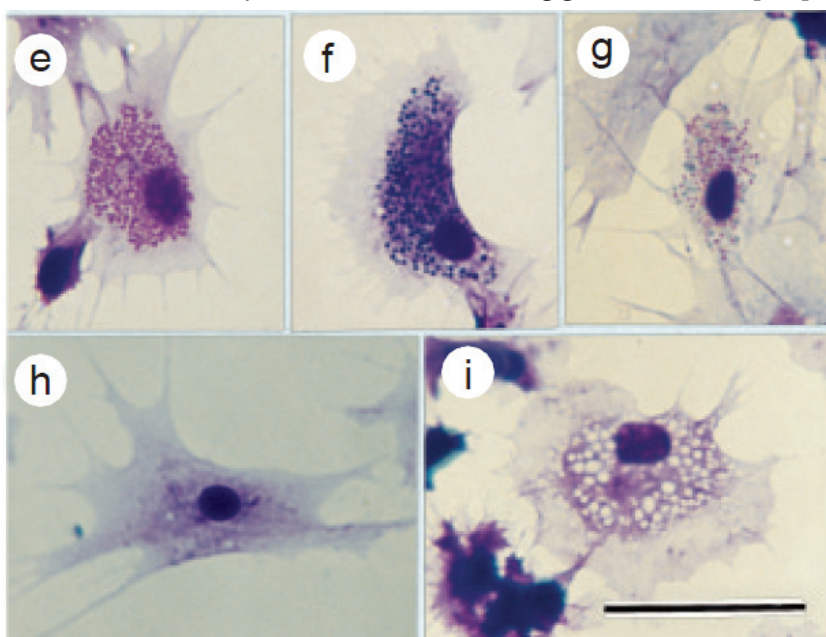
## DOCUMENT 2 : Hémocytes vivants d'huitre (*Crassostrea gigas*) au microscope optique à contraste de phase



Su-Jang Chang *et al.* (2005), « Morphological Characterization via Light and Electron Microscopy of the Hemocytes of two Cultured Bivalves : A Comparison Study between the Hard Clam (*Meretrix lusoria*) and Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) », *Zoological Studies*, vol. 44, n°1, p. 144-153.

Barre d'échelle doc C = 50 μm (toutes les photos sont à la même échelle)

## DOCUMENT 4 : Hémocytes d'huitre (*Crassostrea gigas*) au microscope optique après coloration au May-Grünwald Giemsa



### Légende :

#### > Granulocytes :

- (e) Eosinophilic granulocyte
- (f) basophile granulocyte
- (g) granulocyte avec des granules éosinophiles et basophililes

#### > Agranulocytes

- (h) agranulocyte

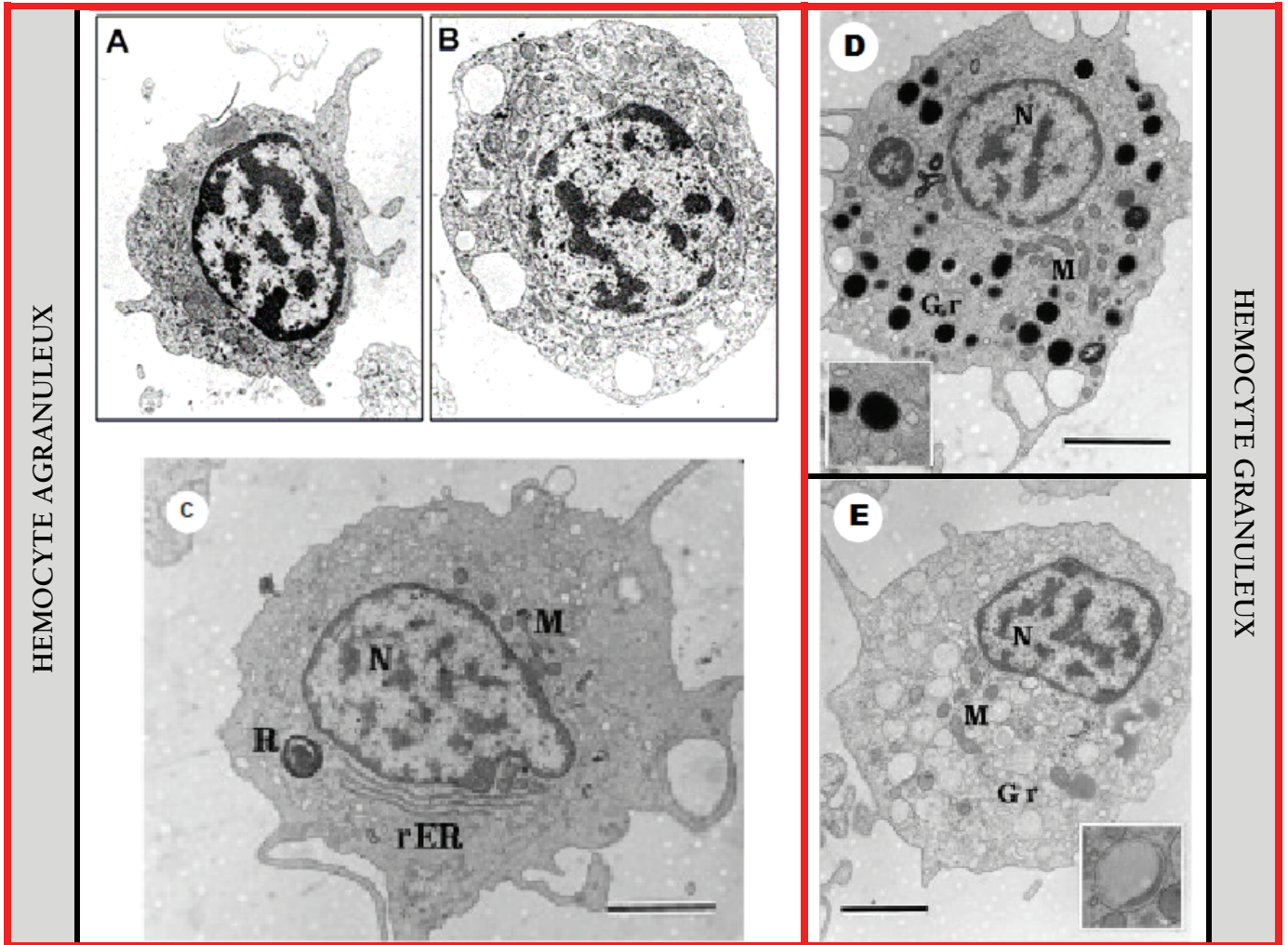
#### > (i) vesicular cell

Barre d'échelle = 20 μm

Toutes les photos sont à la même échelle

S.-J. Chang *et al.*, *op. cit.*

DOCUMENT 5 : Les cellules hémomocytaires de *Crassostrea gigas* au MET



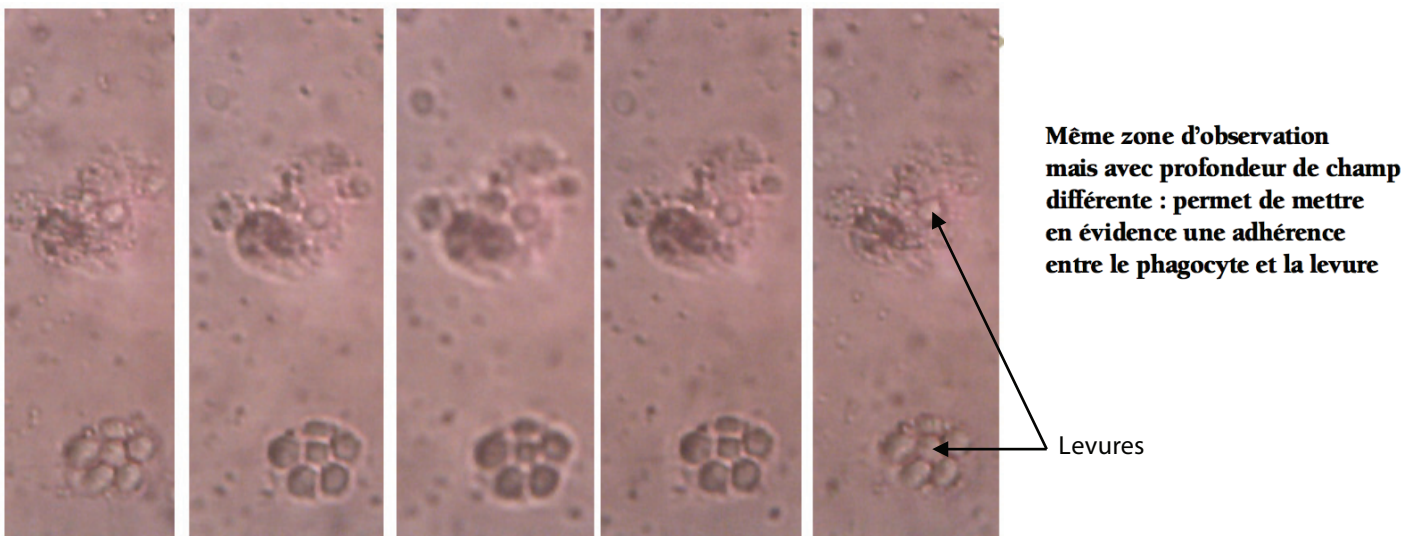
Légende

- A : petite cellule, probablement un hémocyte jeune (MET x15000)
- B : hémocyte basophile hyaline (MET x15000)
- C : grand hyalinocyte
- D : granulocyte contenant des granules denses
- E : granulocytes contenant des granules clairs aux électrons et de nombreux corps cytoplasmiques correspondant probablement à des résidus de phagocytose

- Encart D et E = fort grossissement des granules
- Barre d'échelle doc C-D-E = 2 µm
- N= noyau
- G= appareil de Golgi
- M= mitochondries
- rER= réticulum endoplasmique rugueux
- R= corps résiduel

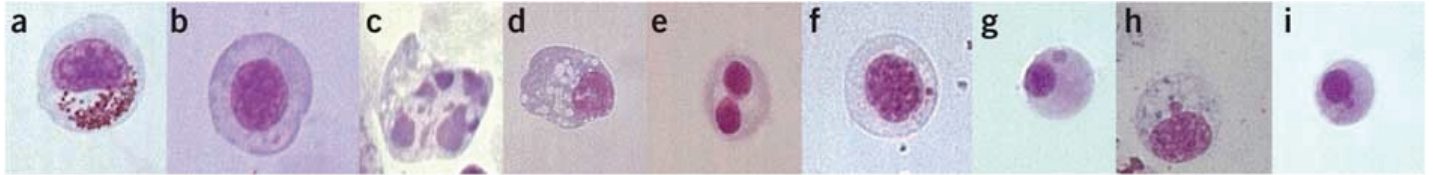
S.-J. Chang et al., op. cit. ; Bach7re et Al – 2004

DOCUMENT 6 : Résultats de nos observations (MO x400)



# Le système immunitaire des bivalves : la moule

DOCUMENT 1 : Les cellules hémomocytaires de la moule (*P. viridis*) coloration May-Grünwald Giemsa

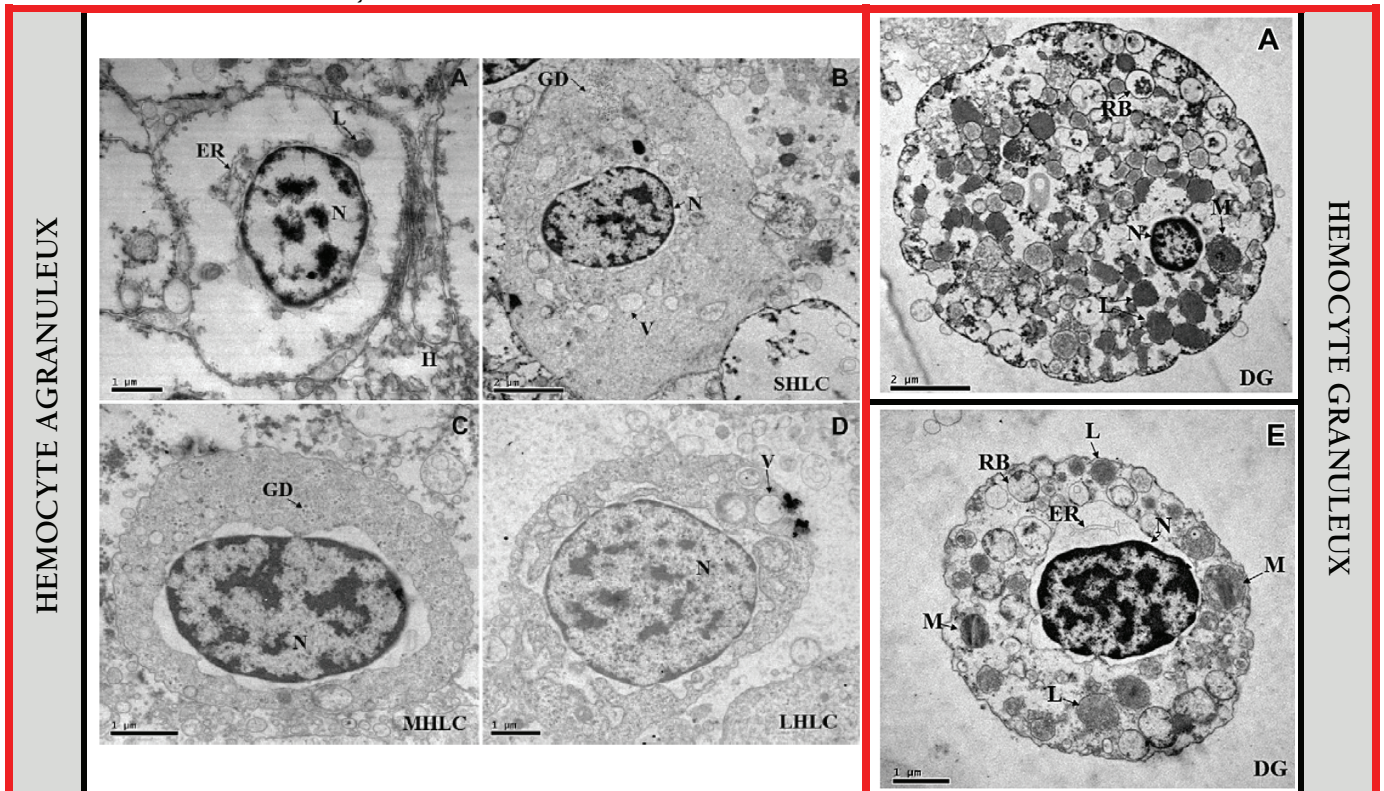


Légende

(a) Granular hemocyte (b) Agranular hemocyte (c) Apoptotic agranular hemocyte (d) Necrotic agranular hemocyte (e) Binucleated agranular hemocyte (f, g) Agranular hemocytes with MNi (h,i) Agranular hemocytes with buds (= bourgeons)

> [http://www.nature.com/nprot/journal/v7/n6/fig\\_tab/nprot.2012.043\\_F1.html](http://www.nature.com/nprot/journal/v7/n6/fig_tab/nprot.2012.043_F1.html)

DOCUMENT 2 : Les cellules hémocytaires de la moule (*P. Viridis*) au MET



Légende

➤ Les cellules agranuleuses de *P. viridis*

A : hyalinocyte (H)

B : hemoblast-like cell with small N/C ratio (SHLC)

C : hemoblast-like cell with medium N/C ratio (MHLC)

D : hemoblast-like cell with large N/C ratio (LHLC)

➤ Les cellules agranuleuses de *P. viridis*

A : dense-granulocyte (DG),

E : dense-granulocyte (DG) with ER

N= noyau

L = lysosome

V = vacuole

GD = dépôt de glycogène

G = appareil de Golgi

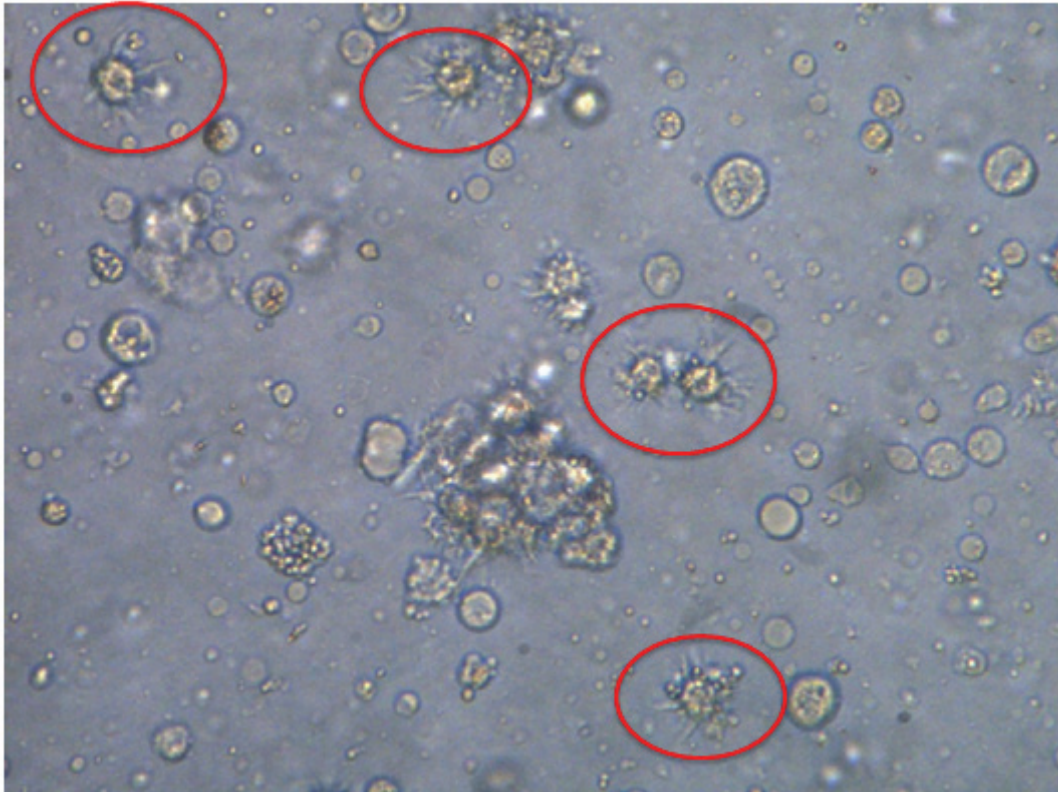
M = mitochondries

ER = réticulum endoplasmique

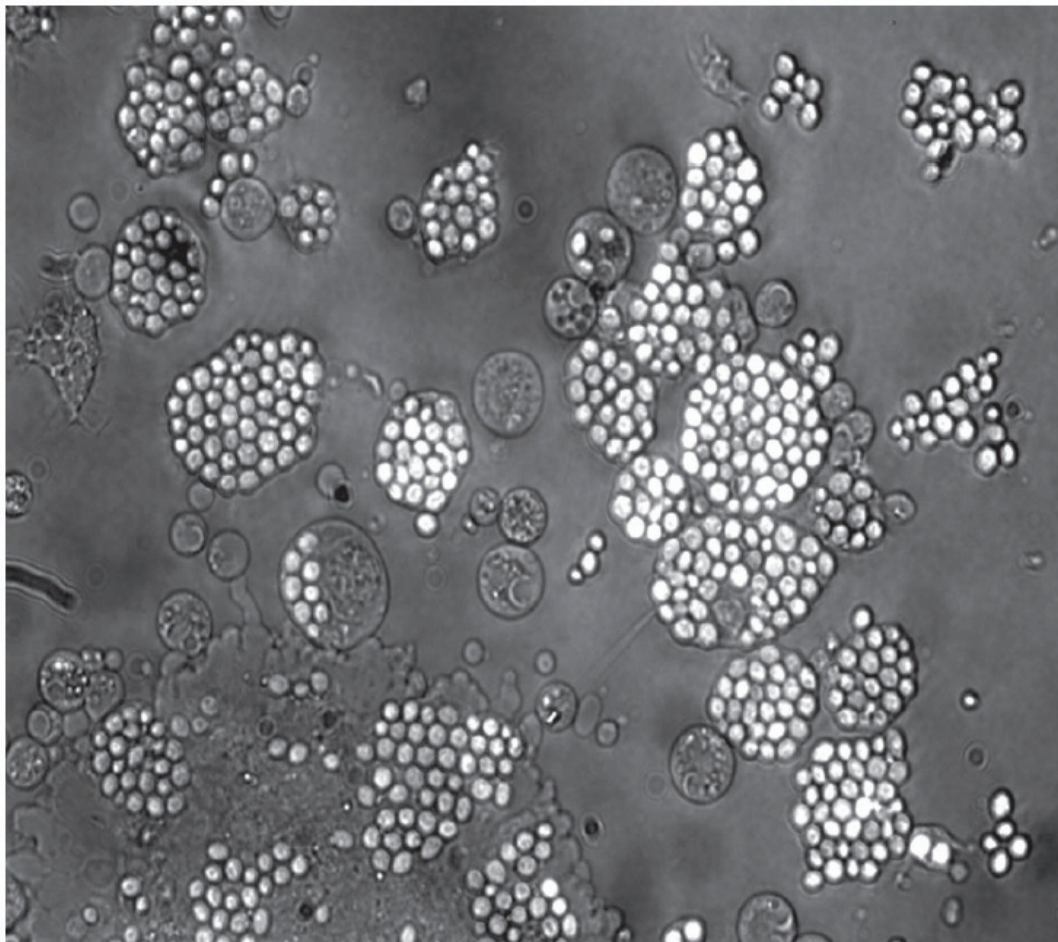
Rb= corps résiduel

Youji Wang, « Characterization of subpopulations and immune-related parameters of hemocytes in the green-lipped mussel *Perna viridis* », *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 32, p. 381-390

DOCUMENT 3 : Résultats de l'identification des cellules et de la phagocytose



Hémocytes fraîchement récoltées (objectif x40)



Hémocytes fraîchement récoltées attachés à la surface de la chambre Neubauer.  
Phagocytose des particules étrangères (contraste de phase ; x 200)

<http://eea.spaceflight.esa.int/attachments/parabolicflights/ID4fb112047b9fa.jpg>

# Le système immunitaire des échinodermes

## DOCUMENT 1 : Les cellules du coelomocyte chez l'oursin



Figure 1. Live coelomocytes from the sea urchin, *Paracentrotus lividus*. A) petaloid phagocyte. B) red spherule cell. C) colorless spherule cell. D) vibratile cell. Scale bar = 5 microns. Images taken by R. Bonaventura.

## DOCUMENT 2 : Composition et proportion des différentes cellules présentes dans le liquide coelomique de l'oursin Graft Rejection = rejet de greffe

Table 1. Coelomocytes in sea urchins

Cell Type	% in Coelomic Fluid	Function
<b>Phagocyte Types</b>		
Type 1—Discoidal cells	<i>Sp</i> * 40-80%	Encapsulation, Opsonization, Graft rejection, Chemotaxis, Phagocytosis, Antibacterial activity, Cellular clotting
Type 2—Polygonal cells	<i>Sd</i> 67%	
Type 3—Small phagocytes	<i>Pl</i> 80%	
<b>Red spherule cells</b>		
	<i>Sp</i> 7-40%	Oxygen transport. Antibacterial activity from echinochrome A.
	<i>Sd</i> 8%	
	<i>Pl</i> 4.7%	
<b>Colorless spherule cells</b>		
	<i>Sp</i> 3.7-25%	Cytotoxicity, Clotting?
	<i>Sd</i> 6.5%	
	<i>Pl</i> 7.8%	
<b>Vibratile cells</b>		
	<i>Sp</i> 11.9-20%	Movement or agitation of coelomic fluid? Associated with clotting.
	<i>Sd</i> 18.5%	
	<i>Pl</i> 7.5%	

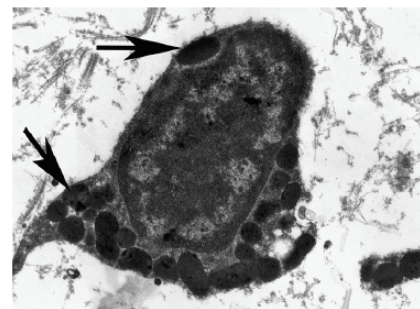
\**Sp*, *Strongylocentrotus purpuratus*. *Sd*, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Pl*, *Paracentrotus lividus*

Source : Kenneth Söderhäll (éd.), *Invertebrate Immunity*, New York (N. Y.), Springer Science+Business Media ; Austin, (Tex.), 2010

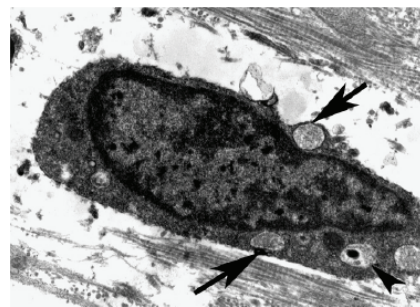
## DOCUMENT 2 : Les cellules hémomocytaires granuleuses de l'oursin au MET

HEMOCYTE AGRANULEUX

Aucun cliché de bonne qualité n'a pu être trouvé [S. B.]



x 20 000



x 20 000

HEMOCYTE GRANULEUX





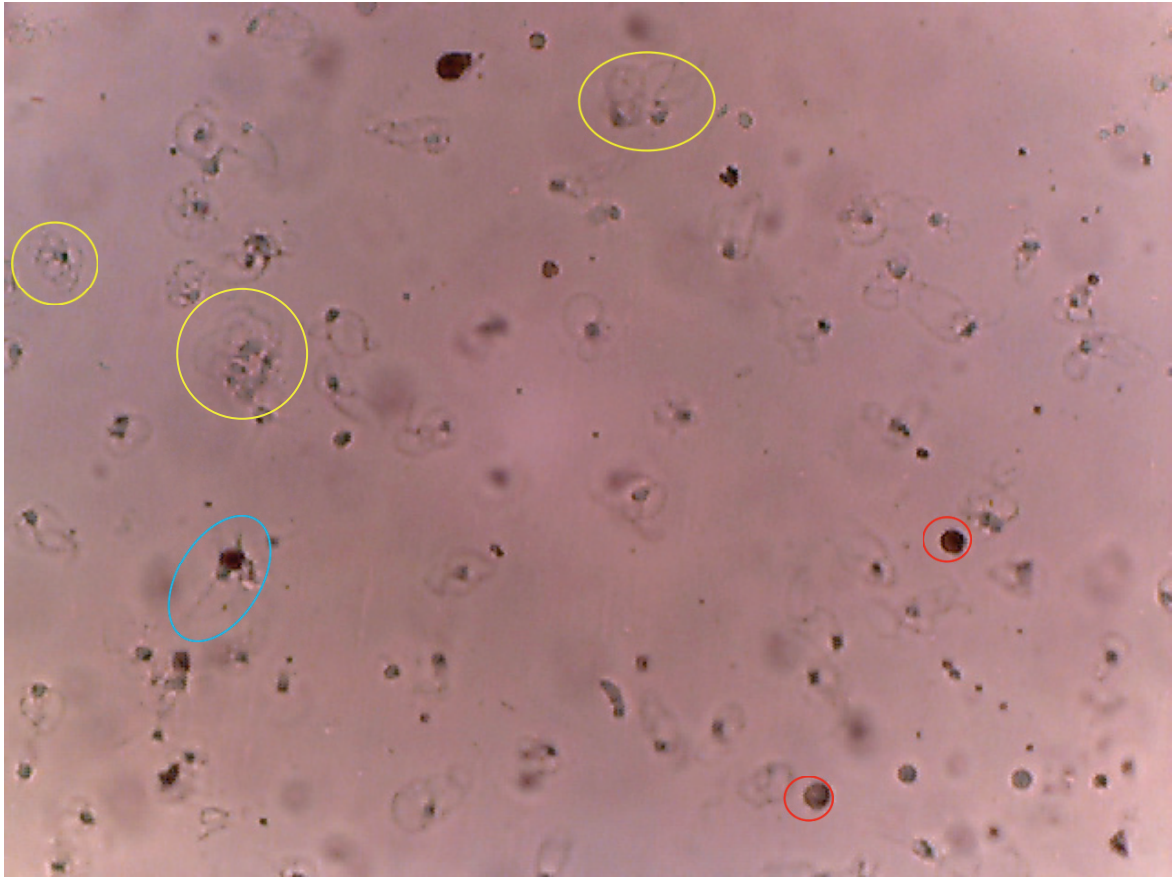
DOCUMENT 3 : Composition et proportion des différentes cellules présentes dans le liquide coelomique de l'oursin

**Table 2.** Summary of morphology and reactions to various cytochemical stains of echinoderm coelomocytes

Morphological parameter	Phagocyte		Spherule cell			Vibratile cell	Crystal cell	Progenitor cell	Haemocyte
	Petaloid form	Filopodial form	Type I	Type II	Type III				
Size	10-30 $\mu\text{m}$ diameter	20-40 $\mu\text{m}$ diameter	5-20 $\mu\text{m}$ diameter	5-20 $\mu\text{m}$ diameter	5-10 $\mu\text{m}$ diameter	Cell body: 5-10 $\mu\text{m}$ diameter; Flagellum: 20-50 $\mu\text{m}$ long	2-4 $\mu\text{m}$ long	7-8 $\mu\text{m}$ diameter	10-23 $\mu\text{m}$ diameter
Shape	Petal-like or bladder-like pseudopodia extend from central nuclear region three-dimensionally	Slender and long (up to 50 $\mu\text{m}$ ) branched pseudopodia, sometimes stellate	Spherical or ovoid, rough surface, sometimes with microprojections and holes on the cell surface			Spherical with 1 or 2 flagellum	Diamond or rhomboid	Spherical, ovoid or spindle	Biconvex or spherical
Cytoplasmic content	Numerous membrane-bound electron-dense bodies, 6-14 $\mu\text{m}$ diameter; well-developed RER, Golgi bodies and lysosomes		Abundance of tightly-packed membrane-bound electron-dense material	Granules with electron-dense core surrounded by a less dense "shell"	Void of granules, sometimes with residual inclusions	Numerous dark granules of different sizes (0.5-2 $\mu\text{m}$ diameter); well-developed Golgi apparatus	Rhomboidal or star-shaped or spherical inclusions	Lack of elaborated cytoplasmic specialization	Hemoglobin distributed evenly in the cytoplasmic matrix
Nucleus	Spherical or bean-shaped, 4-5 $\mu\text{m}$ diameter with single nucleolus		Regular or irregular-shaped, eccentrically located, 2.5 $\mu\text{m}$ diameter			Large, dominates the cell body	Usually indistinguishable	Large, dominates the cell body	Ovoid, lack of nucleolus in mature haemocyte
Motility in vitro	Actively motile, transforms to filopodial form after phagocytosis or under osmotic shock	Relatively stable, sometimes shows slightly motile	Stable, sometimes amoeboid movement			Active rotation by flagellum lashing	Stable	Stable	Stable



DOCUMENT 4 : Résultats de l'identification des cellules au microscope optique



Observation vitale des hémocytes de l'oursin Violet (MO x100)



Observation vitale des hémocytes de l'oursin Violet (MO x400)



Observation vitale des hémocytes de l'oursin noir (MO x400)



Observation vitale des hémocytes de l'oursin noir (MO x 400)

**DOCUMENT 5 : Résultats de la mise en contact avec des levures au microscope optique**

Oursin violet en présence de levures (Objectif x40) ; même zone d'observation mais avec une profondeur de champ différente

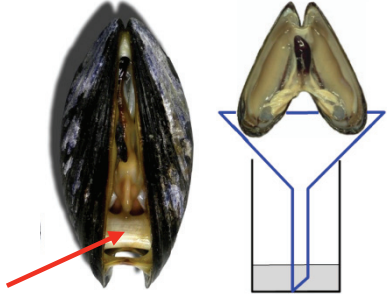




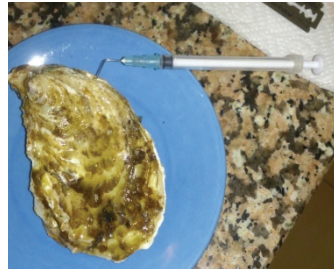



# Protocoles expérimentaux

## Matériel

- 1 Microscope
- Lamelles
- Lame à concavité
- Papier absorbant
- Matériel : biologique : oursin, huitre, moule + capsules levures de bière revivifiable *saccharomyces cerevisiae*
- Solution d'eau de mer pour les levures (1 capsule de 450 mg dans 500 ml d'eau de mer)  
500 ml d'eau :
  - 12.5 g de NaCl
  - 1.1 g de MgSO<sub>4</sub>-1.79 g de MgCl<sub>2</sub>
- 1 Ouvre boîte à lame fixe
- 1 paire de gants épais type mappa ou équivalent (pour protéger les mains lors de l'ouverture des huitres, oursin et moules)
- 1 Scalpel
- 1 Aiguille lancéolée
- 1 Ciseau assez gros et robuste pour ouvrir l'oursin
- 4 seringues de 1 ml avec aiguille (1 pour levure + 1 pour observation cœlomocyte + 1 pour observation cœlomocyte avec levure + 1 pour coloration des levures au BM)
- 1 flacon de réactif au bleu de méthylène
- 1 feutre fin permanent pour écrire sur les tubes et lames
- Bassine avec sac plastique pour ouvrir les bivalves et vider leur contenu
- Tubes de prélèvement à fond plat et à bouchon à vis (1 pour levure + 1 pour cœlomocytes seuls + 1 pour cœlomocytes avec levure) ou des tubes eppendorfs)
- 1 à 3 béchers de petite taille (30 ml) pour récolter les hémocytes (huitre + moule)
- 2 entonnoirs de petite taille en plastique (on lance en parallèle deux manips)
- 1 verre de montre pour la coloration des levures

	Moule	Huitre	Oursin
Identification des cellules	1/ Ouvrir l'animal et jeter le premier liquide cœlomique 2/ Inciser la moule au niveau du muscle puis la placer dans l'entonnoir afin de récupérer le deuxième liquide cœlomique au bout de quelques minutes (5 à 10 mn)	1/ Ouvrir l'animal et jeter le premier liquide cœlomique 2/ Inciser l'huitre au niveau du muscle puis la placer dans l'entonnoir afin de récupérer le deuxième liquide cœlomique au bout de quelques minutes (5 à 10 mn)	1/ Ouvrir l'animal et jeter le premier liquide cœlomique 2/ Attendre quelques minutes (5 à 10 mn) afin de récupérer le deuxième liquide cœlomique à l'aide d'une seringue
			
	3/ Prélever à l'aide de la seringue du liquide en prenant soin de ne pas prélever d'impuretés puis réaliser une préparation dans les lames à concavité 4/ Attendre quelques minutes que les cellules se déposent et réaliser l'observation 5/ Identifier les hémocytes à l'aide du document annexe fourni	3/ Prélever à l'aide de la seringue du liquide en prenant soin de ne pas prélever d'impuretés puis réaliser une préparation dans les lames à concavité 4/ Attendre quelques minutes que les cellules se déposent et réaliser l'observation 5/ Identifier les hémocytes à l'aide du document annexe fourni	3/ Prélever à l'aide de la seringue du liquide en prenant soin de ne pas prélever d'impuretés puis réaliser une préparation dans les lames à concavité 4/ Identifier les hémocytes à l'aide du document annexe fourni

Moule	Huitre	Oursin
<p>1/ Injecter une solution de levures, préalablement colorée au bleu de méthylène, à l'aide de la seringue directement entre les deux valves sans ouvrir l'animal (1 ml)</p>  <p>2/ Attendre minimum 30 minutes 3/ Ouvrir et récupérer le liquide coelomique comme indiqué précédemment. 4/ Réaliser une préparation microscopique dans les lames à concavité en prenant soin de ne pas prélever les particules en suspension 5/ Attendre quelques minutes que les cellules se déposent et réaliser l'observation</p>	<p>1/ Injecter une solution de levures, préalablement colorée au bleu de méthylène, à l'aide de la seringue directement entre les deux valves sans ouvrir l'animal (1 ml)</p>  <p>2/ Attendre minimum 30 minutes 3/Ouvrir et récupérer le liquide coelomique comme indiqué précédemment. 4/ Réaliser une préparation microscopique dans les lames à concavité en prenant soin de ne pas prélever les particules en suspension 5/ Attendre quelques minutes que les cellules se déposent et réaliser l'observation</p>	<p>1/ Injecter une solution de levures, préalablement colorée au bleu de méthylène, à l'aide de la seringue directement dans la cavité l'oursin (0,5 à 1 ml)</p>  <p>2/ Attendre minimum 30 minutes 3/Récupérer le liquide coelomique comme indiqué précédemment, en prenant soin de ne pas aspirer les gonades et les particules en suspension 4/ Réaliser une préparation microscopique dans les lames à concavité 5/ Attendre quelques minutes que les cellules se déposent et réaliser l'observation</p>

**⚠ REMARQUES**

- Bien laisser décanter les liquides coelomiques afin d'avoir des préparations les plus propres possibles
- La dilution des levures dans l'eau de mer artificielle n'a pas d'impact sur l'expérience. Il est toutefois préférable de la réaliser au dernier moment.



Levures colorées au BM 2 jours dans l'eau de mer (MO x400)



Levures colorées au BM 30 mn dans un tampon pH 6.2 (MO x400)



# Mise en évidence de la phagocytose chez les vertébrés (*Mus musculus*)

DOCUMENT I : Mise en évidence expérimentale de la phagocytose

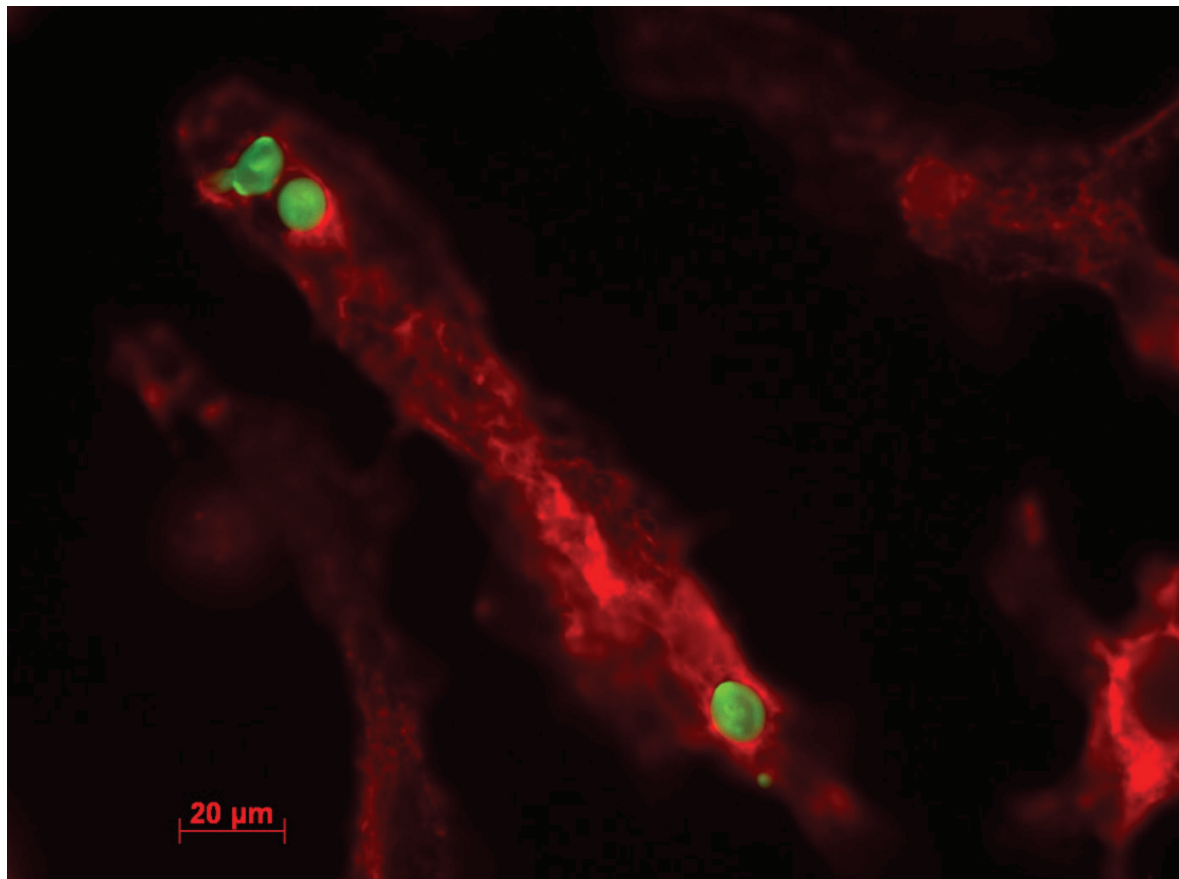
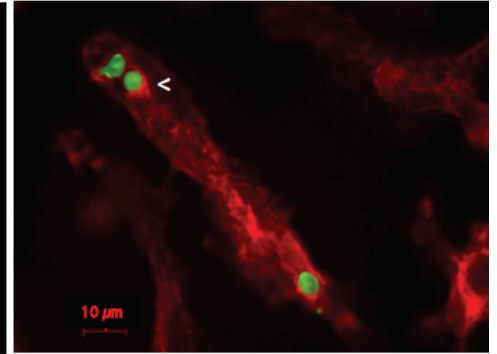
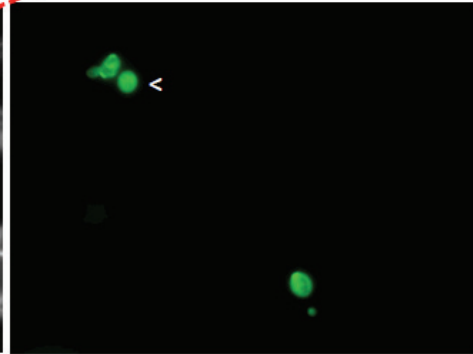
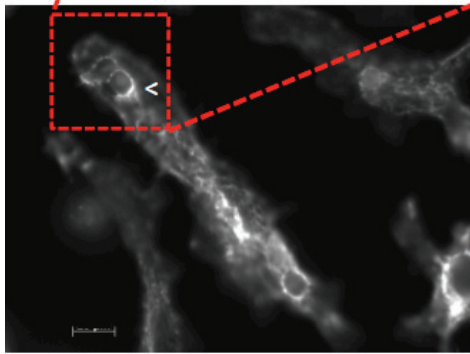
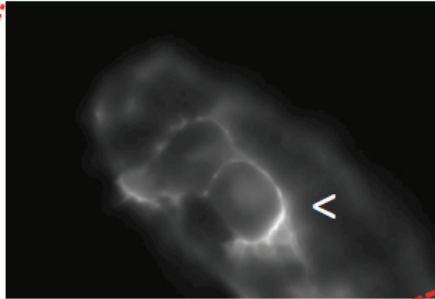
DOCUMENT Ia : Protocole expérimental simplifié

Des macrophages de souris sont mis en culture avec des particules de zymosan (extrait de levure) qui émettent une fluorescence verte.

Au bout d'une heure on fixe les macrophages pour stopper les réactions en cours.

Les macrophages sont ensuite perméabilisés afin de colorer le cytosquelette d'actine à la phalloïdine (en rouge).

DOCUMENT Ib : Résultats expérimentaux obtenus au microscope à fluorescence



Source : Chloé Journo et Nathalie Davoust-Nataf

DOCUMENT 2 : Impact de l'opsonisation sur la phagocytose

DOCUMENT 2a : Protocole expérimental simplifié

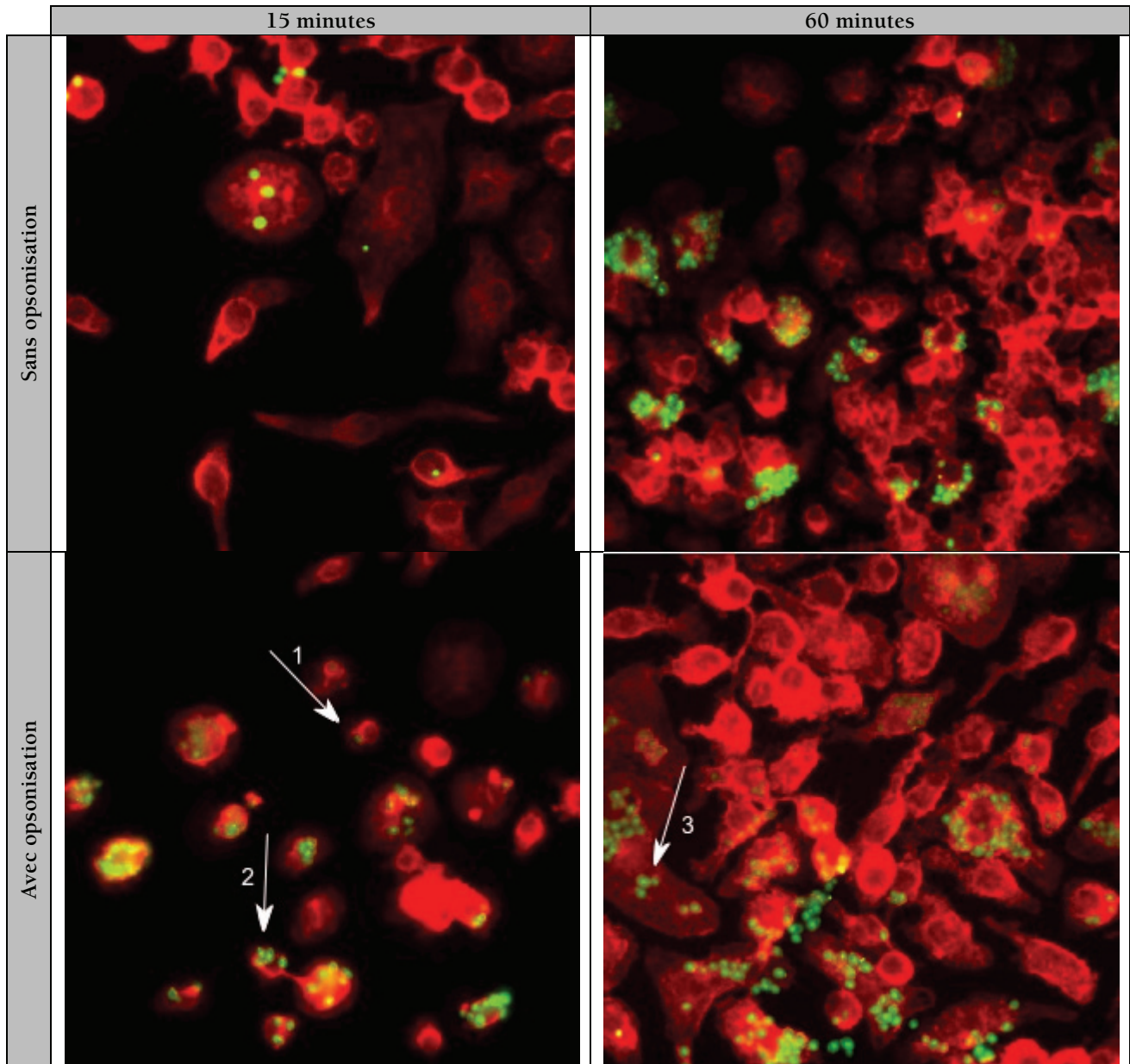
On réalise un test de phagocytose sur cultures de macrophages de souris :

- milieu 1 : les macrophages sont directement mis en culture avec des levures fluorescentes verte (= zymosan)
- milieu 2 : les macrophages en culture avec levures fluorescentes verte préalablement recouvertes d'anticorps spécifiques, c'est-à-dire ayant subies une opsonisation.

Au bout de 15 puis de 60 minutes on fixe les macrophages des deux milieux pour stopper les réactions en cours.

Les macrophages sont ensuite perméabilisés afin de colorer le cytosquelette d'actine à la phalloïdine (en rouge).

DOCUMENT 2b : Résultats expérimentaux obtenus au microscope à fluorescence



Échelle : voir documents précédents

Source : Chloé Journo et Nathalie Davoust-Nataf

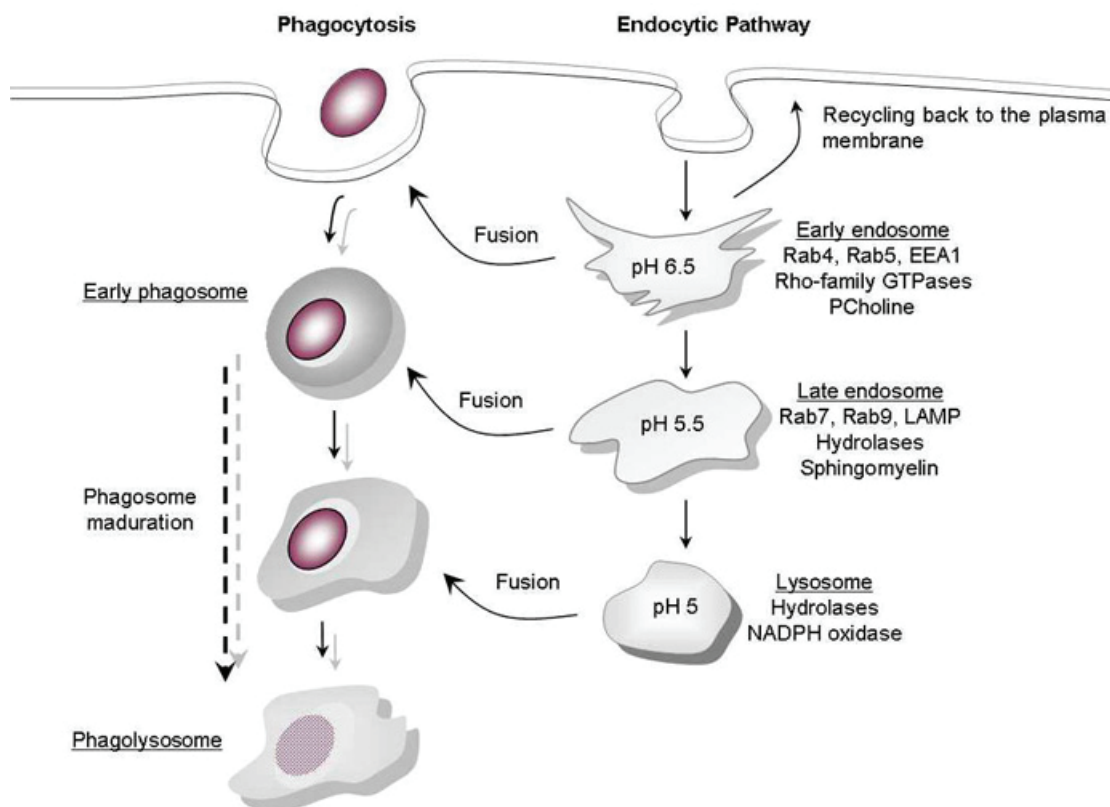
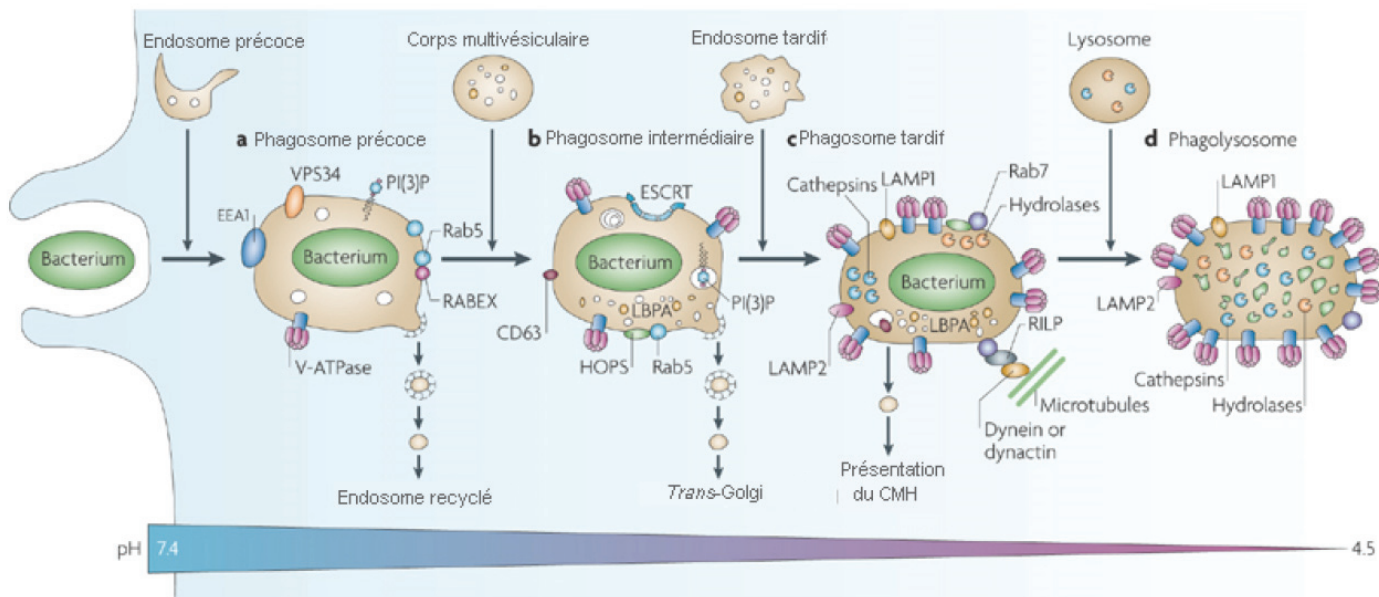
Légende :

- 1 = formation des pseudopodes entourant le zymosan
- 2 = fermeture du phagosome
- 3 = particules complètement internalisées

DOCUMENT 3 : Mise en évidence de la phagocytose avec un produit sensible au pH du phagosome.

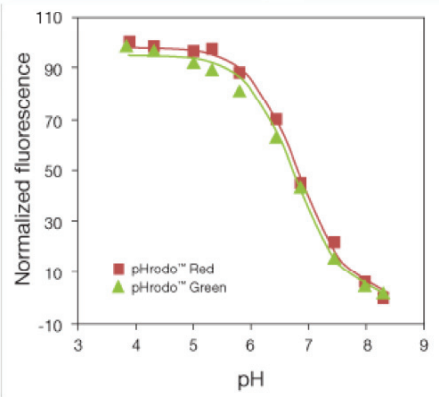
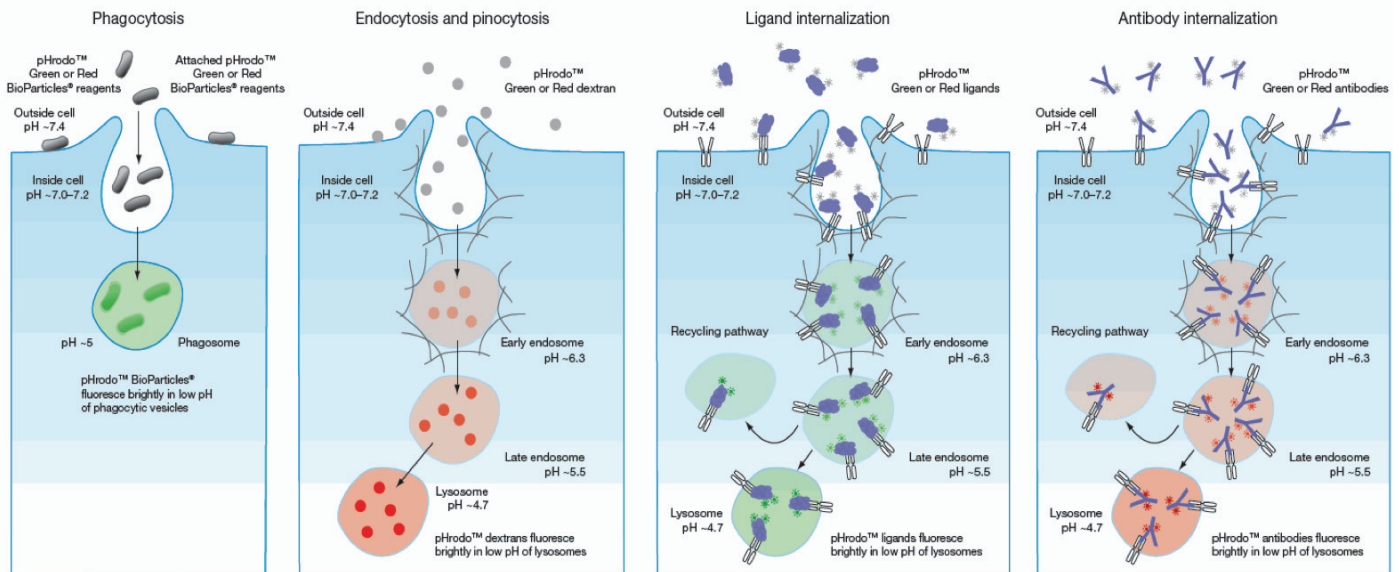
DOCUMENT 3a : Les étapes de maturation du phagosome adapté de Flannagan *et al.* (2009)

Après l'internalisation du pathogène, le phagosome subit une série de modifications qui résultent de son interaction séquentielle avec les sous-compartiments de la voie d'endocytose. Différents stades de maturation sont décrits : (a) phagosome précoce, (b) phagosome intermédiaire, (c) phagosome tardif et (d) phagolysosome



Source : Edurne IMBULUZQUETA, Carlos GAMAZO, Javier ARIZA, Maria J. BLANCO-PRIETO, « Drug delivery systems for potential treatment of intracellular bacterial infections », *Frontiers in Bioscience*, 2010, t. 15, p. 397-417 ; <http://www.bioscience.org/2010/v15/af/3627/fulltext.php?bframe=figures.htm>

DOCUMENT 3b : Principe d'utilisation du marquage du zymosan avec le pHrodo™ Green Zymosan

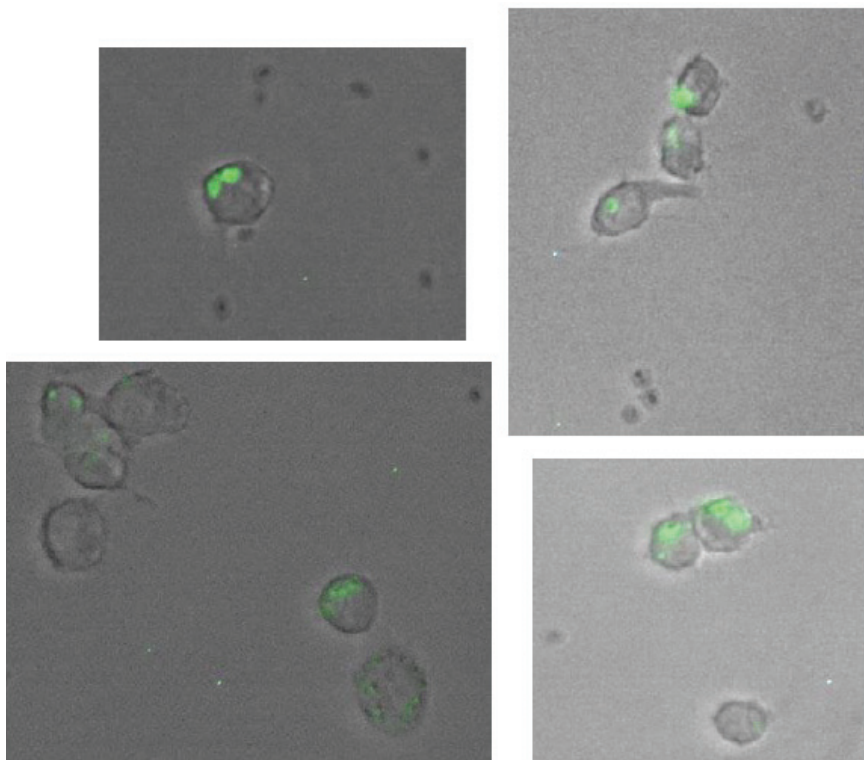


◀ pH sensitivity of pHrodo™ Red and pHrodo™ Green indicators

Source : « Tracking internalization in live cells with pHrodo™ dyes : pHrodo™ Red and NEW pHrodo™ Green pH indicators », *BioProbes : Journal of Cell Biology Applications*, 2012, t. 68, p. 12-14 ; <http://www.lifetechnologies.com/fr/fr/home/references/newsletters-and-journals/bioprobres-journal-of-cell-biology-applications/bioprobres-issues-2012/bioprobres-68-november-2012/phrodo-ph-indicators.html>

DOCUMENT 3c : Protocole expérimental et résultats du marquage du zymosan avec le pHrodo™ Green Zymosan

On incube des macrophages de souris avec des particules de zymosan qui émettent une fluorescence verte lorsque le pH devient acide. Le milieu est ensuite retiré, puis on procède à deux lavages successifs avant de remettre les macrophages dans un milieu de culture adéquat pour les observer au microscope (objectif x40). Les images correspondent à la superposition lumière blanche/fluor.



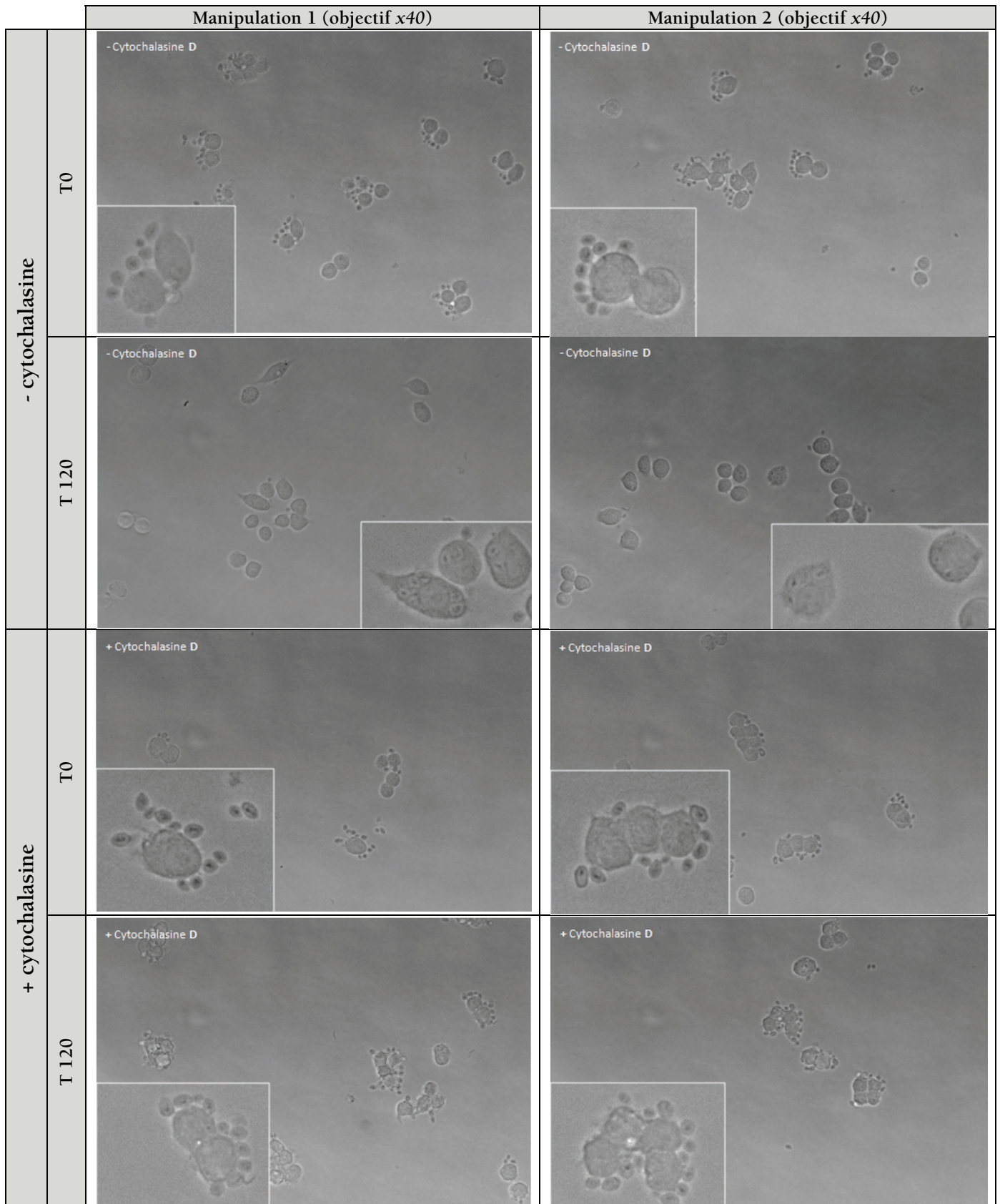
Images : Jean Thimonier | <http://touschercheurs.fr>

DOCUMENT 4 : Mise en évidence du rôle du cytosquelette dans la phagocytose

DOCUMENT : Macrophages traités ou non à la cytochalasine D

Cytochalasine D : se lie aux extrémités (+) du cytosquelette d'actine et empêche sa polymérisation (Toxine fongique).

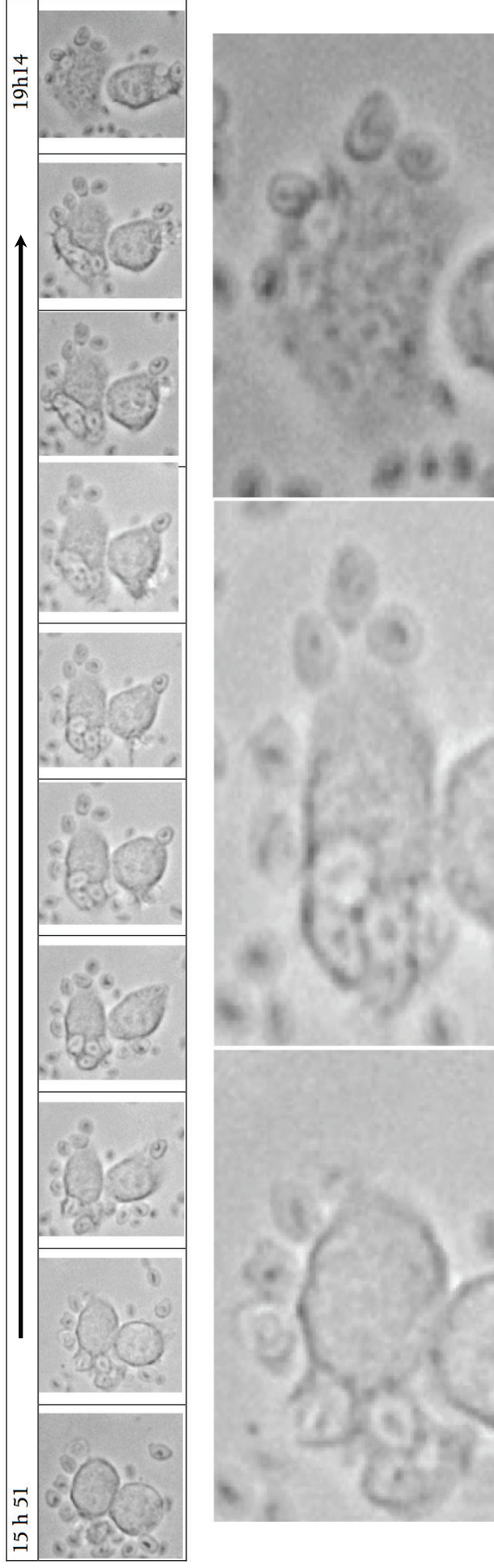
L'addition de cytochalasine à faible concentration bloque instantanément le mouvement le déplacement des cellules, la formation des pseudopodes, montrant l'implication de l'actine dans de tels mouvements.



**DOCUMENT 5 : Aspect cinétique de la phagocytose**

Des macrophages de souris sont cultivés en présence de particules de zymosan.

On réalise des photos sous microscope au microscope de la phagocytose (objectif x40)



Images : Jean Thimonier | <http://touschercheurs.fr/>

# Le processus de phagocytose chez les invertébrés : cas de la drosophile

La phagocytose est essentielle pour le déclenchement défenses de l'hôte contre les pathogènes envahisseurs chez les animaux.

## DOCUMENT 1 :

Le syndrome des taches blanches est une infection virale (virus = WSSV (*White Spot Syndrome Virus*) qui touche des crevettes Pénaéides. Cette maladie hautement contagieuse et létale tue les crevettes très rapidement. Des épidémies de la maladie des taches blanches ont affecté des élevages aquacoles de crevettes dans le monde entier, éliminant en l'espace de quelques jours des populations entières.

La maladie est provoquée par une famille de virus apparentés regroupés sous le nom de « Virus des taches blanches » et la maladie est désignée sous le nom de « Syndrome du virus des taches blanches ».

La première épidémie due à ce virus signalée dans le monde s'est produite en 1992 à Taiwan (Chen, 1995).

Le syndrome du virus des taches blanches n'affecte pas les êtres humains et la consommation éventuelle de crevettes infectées ne présente aucun risque pour la santé humaine.

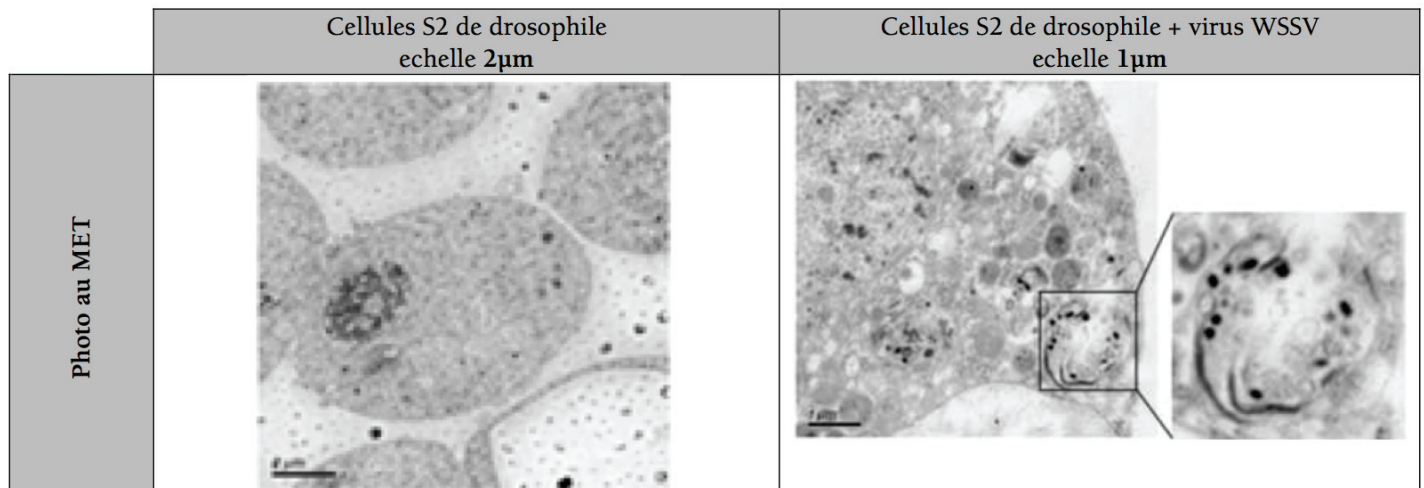
Le 31 octobre 2011, a été déposé le brevet d'un vaccin contre le virus causant le syndrome des taches blanches

[http://fr.wikipedia.org/wiki/Syndrome\\_des\\_taches\\_blanches](http://fr.wikipedia.org/wiki/Syndrome_des_taches_blanches)

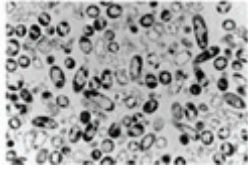
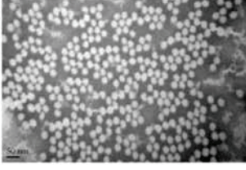
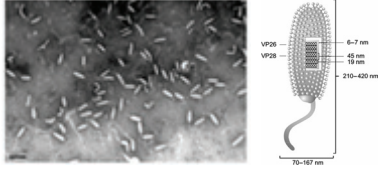
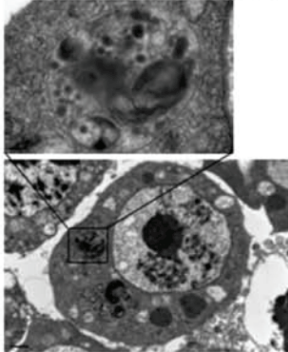
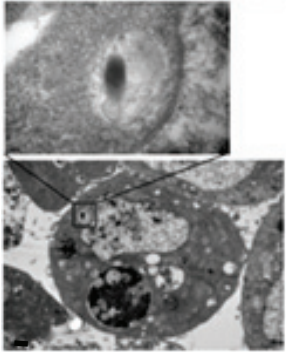
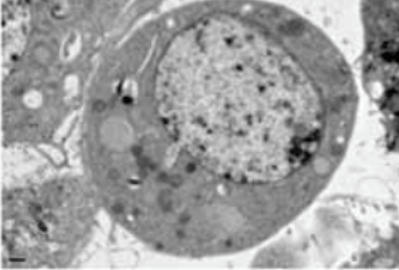
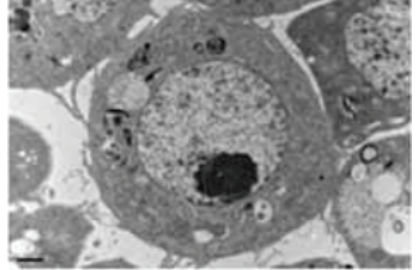
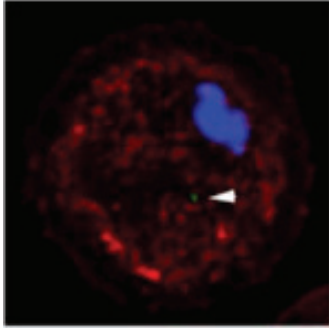
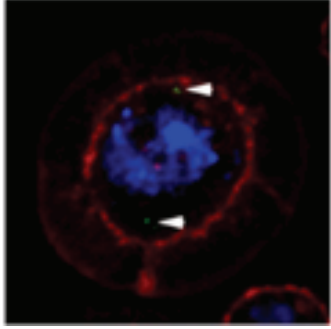
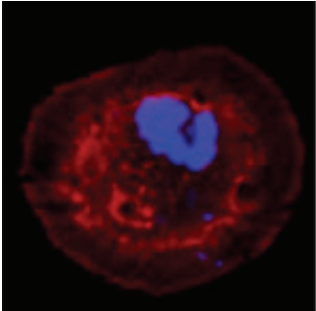
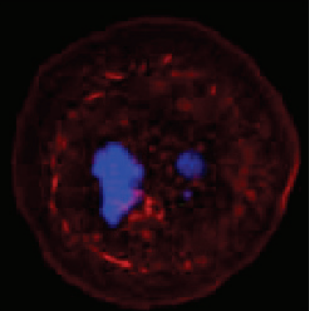
## DOCUMENT 2 : Le comportement des cellules S2 suite au contact d'un pathogène

Une lignée cellulaire est une population homogène de cellules, stables après des mitoses successives, et ayant en théorie une capacité illimitée de division. Elles sont d'un usage quotidien dans les laboratoires de recherches de biologie. Les cellules S2 (*Drosophila Schneider 2*) sont issues d'embryons de drosophile et ont une forte activité phagocytaire.

On ensemence des cellules S2 avec des bactéries (*E. coli*) et des virus (virus DCV et WSSV), puis on les examine au MET et au microscope confocal les cellules, après différents laps de temps suite à l'inoculation.



Fei Zhu & Xiaobo Zhang (2013), « The Wnt signaling pathway is involved in the regulation of phagocytosis of virus in *Drosophila* », *Nature : Scientific Reports*, n° 2069 ; doi:10.1038/srep02069

	Cellules S2 de drosophile + <i>Escherichia Coli</i> (Gram -)	Cellules S2 de drosophile + virus DCV (= <i>Drosophila C virus</i> )	Cellules S2 de drosophile + virus WSSV (ADN double brin)
Photo du pathogène	 Taille : 0,5 à 3 µm	 Taille :	 Taille : 350nm par 100nm
Observation au MET	1 h après injection (cadre = agrandissement de la vésicule) échelle 1µm		
	1 jour après injection		
Observation au microscope confocal (x100)	15 mn après injection		
	24 h après injection		

Fei Zhu & Xiaobo Zhang (2013), « The Wnt signaling pathway is involved in the regulation of phagocytosis of virus in *Drosophila* », *Nature : Scientific Reports*, n° 2069 ; doi:10.1038/srep02069

### Légende

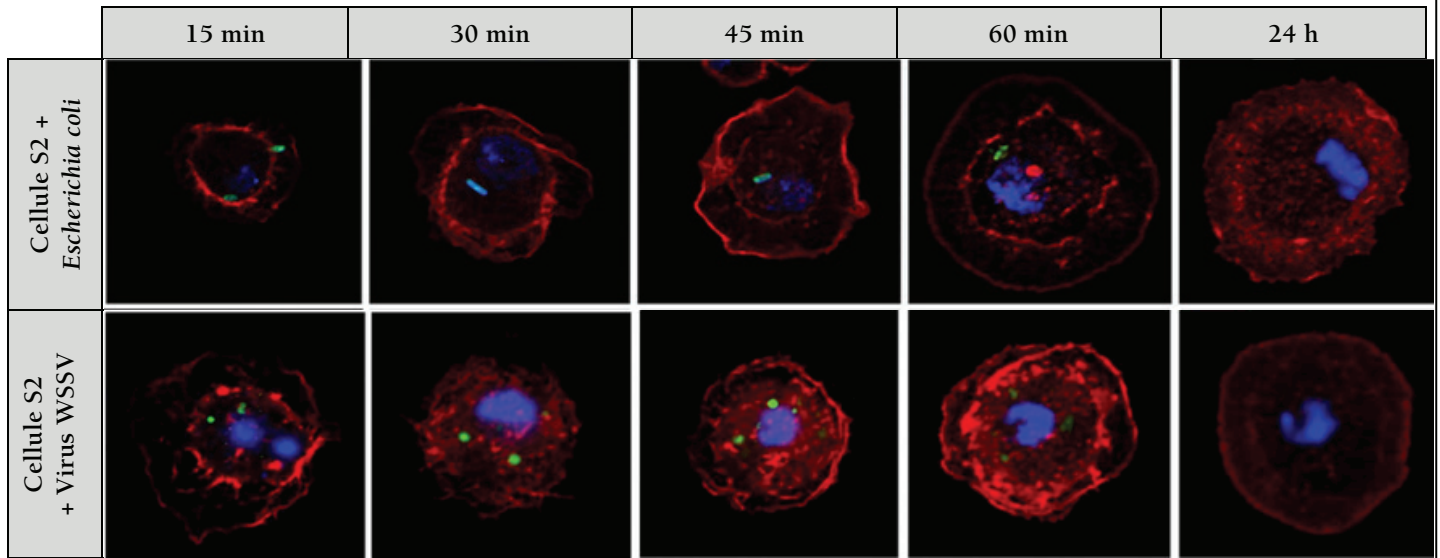
Couleur de la fluorescence	Molécule fluorescente utilisée	Structure marquée spécifiquement
Vert	Isothiocyanate de fluorescéine (FITC)	- bactéries - virus identifiés par des flèches blanches
Rouge	Phalloïdine couplée à un fluorochrome rouge : la rhodamine	- filament d'actine (= cytosquelettes du phagocyte)
Bleu	DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole)	- ADN

REMARQUE : Compte tenu du fait que le virus WSSV n'est pas spécifique de la drosophile, on traite les cellules S2 avec du LPS pour obtenir une dégradation complète de la particule virale dans le phagosome.



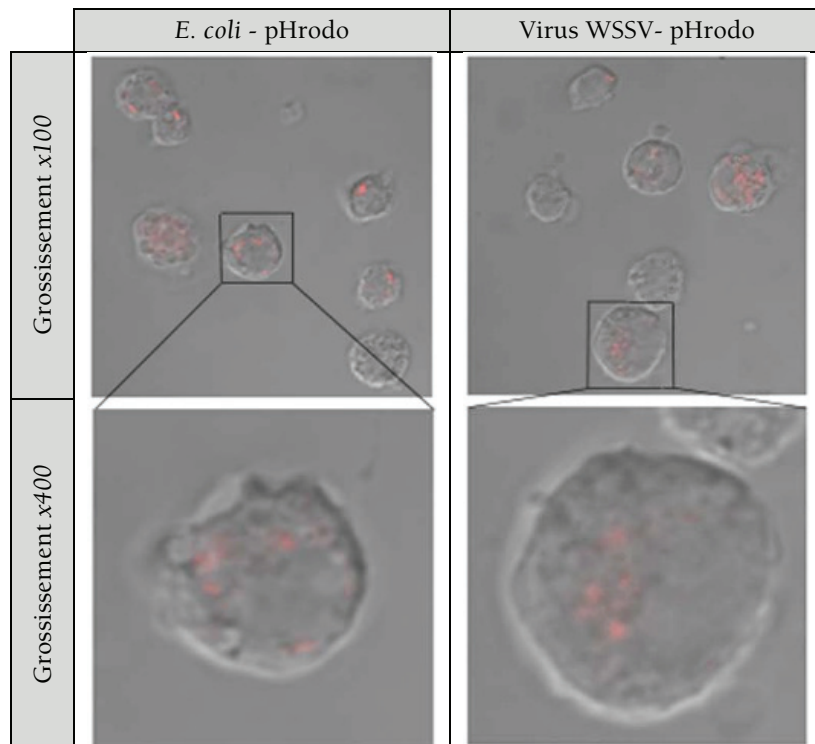
DOCUMENT 3 : Résultats en microscopie confocale (x400)

On incube des cellules S2 de drosophile soit avec la bactérie *E. coli* soit avec le virus WSSV.  
Compte tenu du fait que le virus WSSV n'est pas spécifique de la drosophile, on traite les cellules S2 avec du LPS pour obtenir une dégradation de la particule virale dans le phagolysosome.



DOCUMENT 4 : Résultats avec un produit sensible au pH

On marque des bactéries *E. coli* et le virus WSSV avec un produit qui émet de la fluorescence rouge (pHrodo™) uniquement lorsqu'il est en milieu acide. Une heure après l'inoculation, on observe les cellules au microscope confocal (x100).  
La fluorescence rouge à l'intérieur des cellules S2 de drosophile représente l'acidification de phagolysosome.  
Les images du bas sont grossies 400 fois

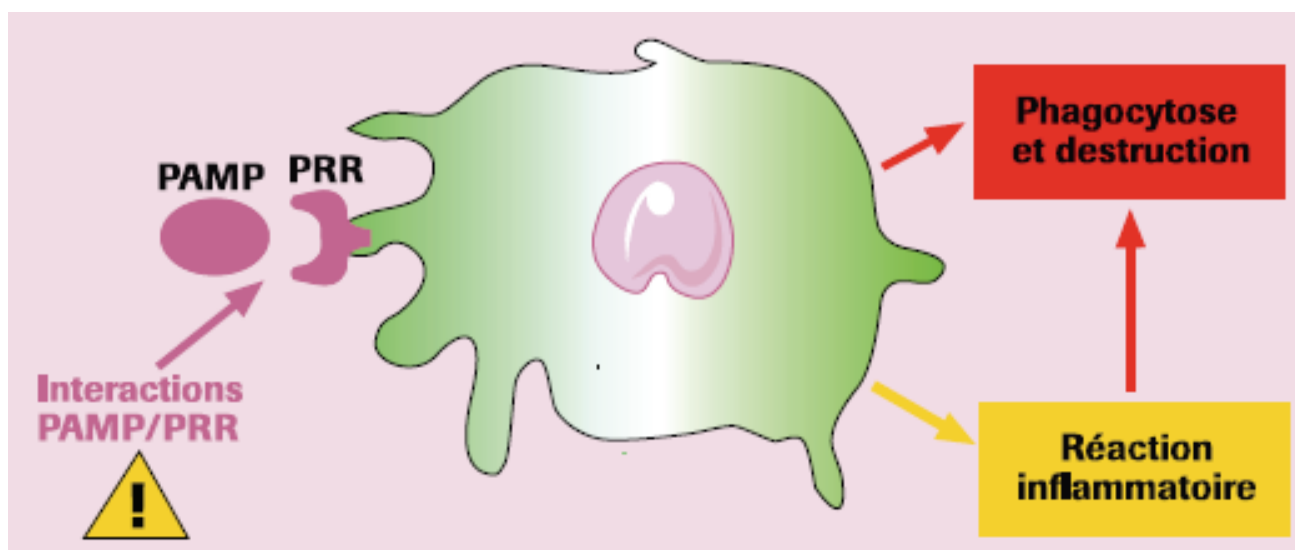


Fei Zhu & Xiaobo Zhang (2013), « The Wnt signaling pathway is involved in the regulation of phagocytosis of virus in *Drosophila* », *Nature : Scientific Reports*, n° 2069 ; doi:10.1038/srep02069



# Le Toll-Like Receptor (TLR) : conservation par l'évolution

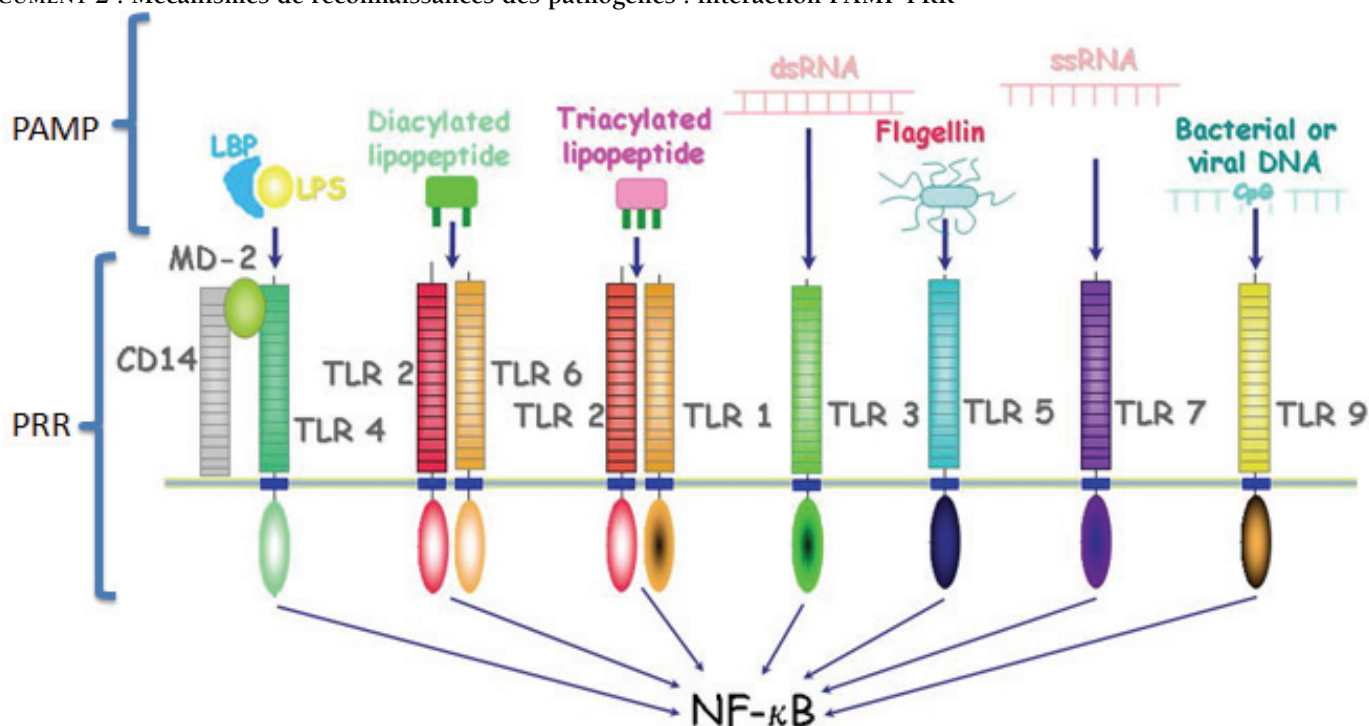
DOCUMENT 1 : La reconnaissance entre le phagocyte et les pathogènes dans l'immunité innée



Les PAMP (*Pathogen Associated Molecular Pattern*) sont des molécules présentes en grande quantité à la surface ou dans les micro-organismes. Ils sont diversifiés selon le type de micro-organisme mais invariants entre micro-organismes du même groupe.

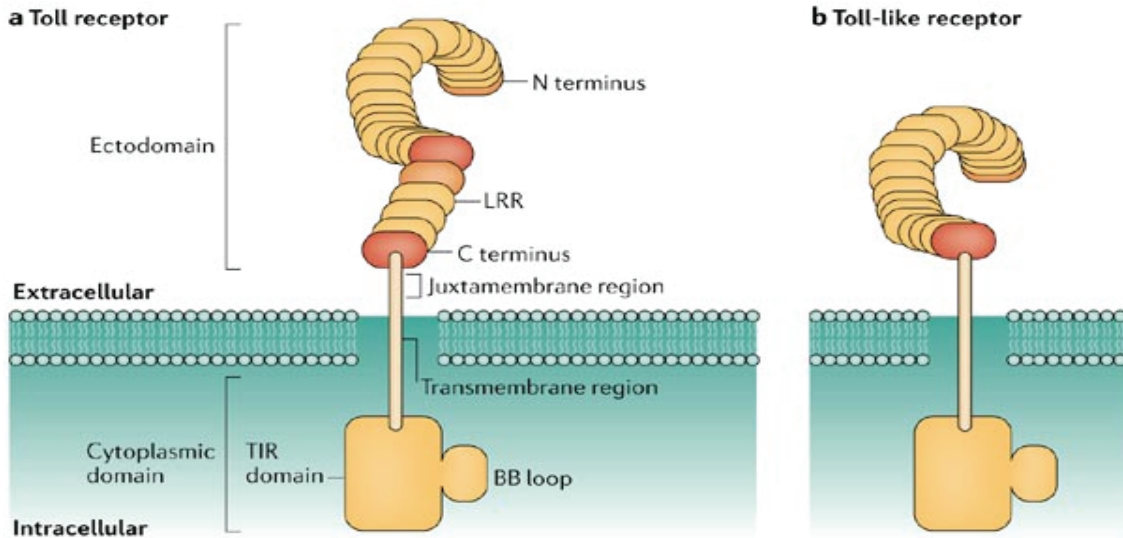
Les PRR (*Pattern Recognition Receptor*) sont les récepteurs des PAMP, diversifiés de telle sorte à reconnaître la diversité des PAMP. Au niveau fonctionnel, certains PRR permettent la phagocytose, d'autres l'activation des cellules : en effet, la fixation de PAMP à des PRR est indispensable pour déclencher les mécanismes de l'immunité innée (phagocytose ou sécrétion de médiateurs chimiques).

DOCUMENT 2 : Mécanismes de reconnaissances des pathogènes : interaction PAMP-PRR



Les Toll-Like Receptor (TLR) sont des récepteurs appartenant à la grande famille des pattern recognition receptors (PRR) qui jouent un rôle fondamental dans la reconnaissance des pathogènes pénétrant l'organisme. Les TLR sont activés sélectivement par différents types de PAMP.

DOCUMENT 3: Architecture de base des Toll receptor (a) et Toll-like receptor (b)

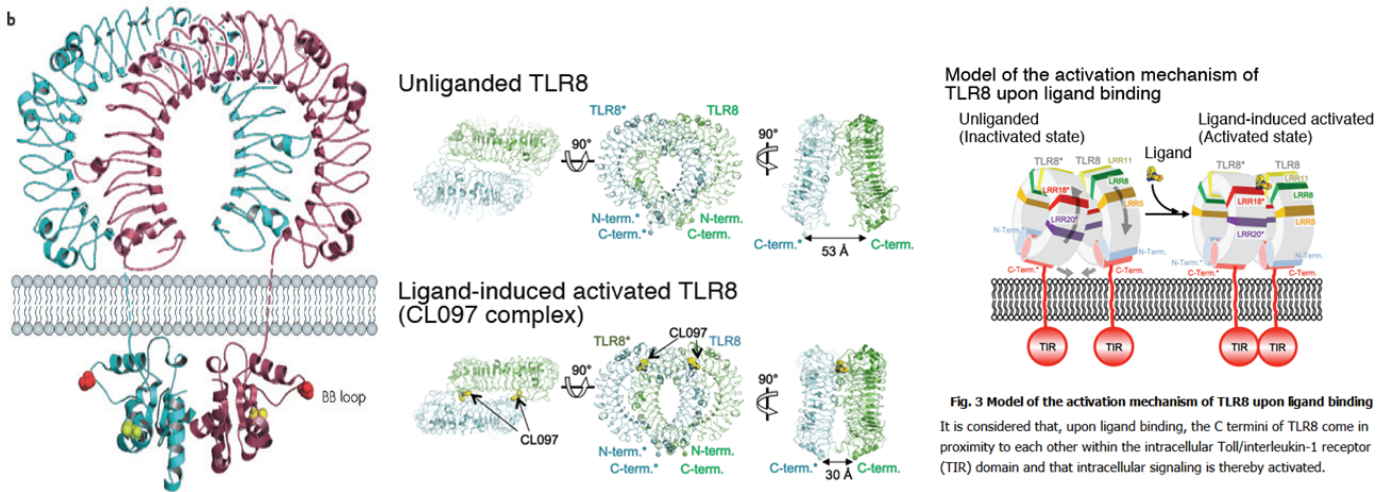


Copyright © 2006 Nature Publishing Group  
Nature Reviews | Immunology

Les TLR sont des protéines transmembranaires constituées par :

- un domaine extracellulaire (N-Ter) riche en Leucine (domaine LRR : *Leucine Rich Repeat*). De tels motifs sont fréquemment trouvés dans la séquence de récepteurs de l'immunité ;
- la partie transmembranaire est riche en cystéines;
- un domaine intracytoplasmique (C-Ter) que l'on retrouve chez les récepteurs des interleukines IL-1 et IL-18 (*TIR domain, Toll/interleukin-1-receptor-containing domain*).

DOCUMENT 4 : Structure tridimensionnelle des TLR



(b) Schematic organization of TLR based on the structure of the human TLR3 ectodomain and human TLR2 TIR domain : TLR are dimerized, the ectodomain forms a horseshoe-shaped solenoid and the intracellular domain is compact and globular. The BB loop site of the TIR domain is essential for TIR-TIR homotypic interactions between TLR and most intracellular signalling adaptors

## DOCUMENT : Séquences des TLR de différents êtres vivants

Espèce et nom du récepteur	Origine et référence des données	Protéine Nbre aa	Fichier .PBD
<i>Mytilus galoprovincialis</i> <b>TLRB</b>	NCBI Protéine AFU 48614.1	1189 aa TIR domaine	Inexistant
<i>Crassostrea gigas</i> <b>TLR1</b>	NCBI Protéine ADV 163851	1179 aa	Inexistant
<i>Crassostrea gigas</i> <b>TLR3</b>	NCBI Protéine AGY 49097.1	876 aa	Inexistant
<i>Azumapecten. farreri</i> <b>Toll Receptor</b>	NCBI Protéine ABC73693.1	1198 aa	Inexistant
<i>Drosophila melanogaster</i> <b>Tollo</b>	NCBI Protéine NP524757.1 – AAF18983.1	1514 aa	
<i>Drosophila melanogaster</i> <b>Toll6</b>	NCBI Protéine NP524757.1 – AAF18983.1	1346 aa	
<i>C elegans</i> <b>Tol-1</b>	NCBI Protéine NP001020983	1221 aa	
<i>Apis mellifera</i> <b>Toll like receptor</b>	NCBI Protéine AAX 33677.1	1370 aa	Inexistant
<i>Strongylocentrotus urpuratus</i> <b>TLR1.1</b>	NCBI Protéine AAK 25761.1	894 aa	Inexistant
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> Oursin violet <b>TLR1.2</b>	NCBI Protéine AAK 25762.1	933 aa	Inexistant
<i>Homo sapiens</i> <b>TLR3</b>	NCBI Protéine ABC86910.1	904 aa	Domaine extracellulaire riche en leucine
<i>Homo sapiens</i> <b>TLR6</b>	NCBI Protéine BAA78631.1	796 aa	
<i>Homo sapiens</i> <b>TLR8</b>	NCBI Protéine AAQ88663.1	1041 aa	Article *
<i>Mus musculus</i> <b>TLR4</b>	NCBI Protéine EDL31078.1	835 aa	
<i>Mus musculus</i> <b>TLR6</b>	NCBI Protéine BAA78632.1	806 aa	
<i>Mus musculus</i> <b>TLR8</b>	NCBI Protéine AAI32055.1	1032 aa	
<i>Xenopus</i> <b>TLR4</b>	NCBI Protéine	944 aa	
<i>Arabidopsis Thaliana</i> <b>TIR-NBS-LRR</b>	NCBI Protéine AED95221.1	1217 aa	Inexistant

\* H. Tanji *et al.*, « Structural Reorganization of the Toll-Like Receptor 8 Dimer Induced by Agonistic Ligands », *Science*, 2013, vol. 339, n° 6126, p. 1426-1429 (doi : 10.1126/science.1229159)

Production des fichiers .edi : Marianne Naspetti

<http://acces.ens-lyon.fr/evolution/logiciels/anagene/complements-2011-2012/tlr/TLR4.edi/view>

Fichier TLR4.edi – renommé **TLR4 plusieurs vertébrés.edi**

Il comprend les séquences protéiques de plusieurs espèces

*Homo sapiens*

*Bos taurus* = Bovins domestiques

*Canis lupus* = Loup commun

*Danio rerio* = Poisson zèbre

*Gallus gallus* = Poulet domestique

*Macaca mulatta* = Macaque rhésus

*Mus musculus* = Souris grise

*Pan troglodytes* = Chimpanzé commun

*Rattus norvegicus* = Rat brun- rat domestique

DOCUMENT : Séquences .pdb pour Rastop sur le site Libmol



<http://www.librairiedemolecules.education.fr>

Un complexe entre récepteurs de l'immunité innée, TLR1 & TLR2 et une lipoprotéine bactérienne

**Origine :** Homme **Source :** PDB **Identifiant :** 2z7x  
**Auteurs :** Jin, M.S., Kim, S.E., Heo, J.Y., Lee, M.E., Kim, H.M., Paik, S.G., Lee, H., Lee, J.O.  
**Modification :** Aucune

**Description :** Les macrophages possèdent plusieurs types de récepteurs membranaires capables de reconnaître quelques molécules caractéristiques de microorganismes. Parmi ces...

[En savoir plus...](#)

Un complexe entre récepteurs de l'immunité innée, TLR6 & TLR2 et une lipoprotéine bactérienne

**Origine :** Myxine **Source :** PDB **Identifiant :** 3a79  
**Auteurs :** Kang, J.Y., Nan, X., Jin, M.S., Youn, S.-J., Ryu, Y.H., Mah, S., Han, S.H., Lee, H., Paik, S.-G., Lee, J.-O.  
**Modification :** Aucune

**Description :** Les macrophages possèdent plusieurs types de récepteurs membranaires capables de reconnaître quelques molécules caractéristiques de microorganismes. Parmi ces...

[En savoir plus...](#)

Un complexe entre récepteurs de l'immunité innée, TLR4, MD2 et une endotoxine

**Origine :** Homme **Source :** PDB **Identifiant :** 3FXI  
**Auteurs :** Park, B.S., Song, D.H., Kim, H.M., Choi, B.-S., Lee, H., Lee, J.-O.  
**Modification :** Les N-acétyl-glucosamines du fichier original ont été supprimés de façon à pouvoir sélectionner plus facilement les LPS par le mot clé "LIGAND"

**Description :** Les macrophages possèdent plusieurs types de récepteurs membranaires capables de reconnaître quelques molécules caractéristiques de microorganismes. Parmi ces...

[En savoir plus...](#)

Un récepteur de l'immunité innée, TLR3, en complexe avec un double brin d'ARN

**Origine :** Souris **Source :** PDB **Identifiant :** 3ciy  
**Auteurs :** Liu, L., Botos, I., Wang, Y., Leonard, J.N., Shiloach, J., Segal, D.M., Davies, D.R.  
**Modification :** Aucune

**Description :** Les macrophages possèdent plusieurs types de récepteurs membranaires capables de reconnaître quelques molécules caractéristiques de microorganismes. Parmi ces...

[En savoir plus...](#)

Un récepteur de l'immunité innée, TLR5, en complexe avec un composant du flagelle bactérien, la flagelline  
**Origine :** Myxine **Source :** PDB **Identifiant :** 3v47  
**Auteurs :** Yoon, S.I., Kamasov, O., Natarajan, V., Hong, M., Gudkov, A.V., Osterman, A.L., Wilson, I.A.  
**Modification :** Aucune  
**Description :** Les macrophages et les cellules dendritiques possèdent plusieurs types de récepteurs membranaires capables de reconnaître quelques molécules caractéristiques de...

[En savoir plus...](#)

DOCUMENT : Séquences .pdb pour Rastop équivalentes sur le site de l'équipe internet ACCES

Code PDB	Organisme	Description
<a href="#">2Z7X</a>	<i>Homo sapiens</i>	Structure de l'hétérodimère TLR1-TLR2. L'association entre les deux TLR est induite par la fixation d'un lipopeptide tri-acétylé (domaines extracellulaires) A : <i>Toll-like receptor 2</i> (domaine extracellulaire) B : <i>Toll-like receptor 1</i> (domaine extracellulaire) C : lipopeptide.
<a href="#">3FXI</a>	<i>Homo sapiens</i>	Domaines extracellulaires de 2 TLR4 associés chacun à un élément activateur (MD-2, qui ensemble reconnaissent des motifs de lipopolysaccharides bactériens. A et B : 2 TLR4 ; C et D : 2 MD-2 La fixation entre le LPS et le TLR4 n'est possible que si le LPS fait intervenir un corécepteur membranaire : MD2 (chaînes C et D). La formation d'un dimère de TLR4 est responsable de la formation d'un signal intracellulaire à l'origine d'une réponse inflammatoire intense
<a href="#">3CIY</a>	<i>Mus musculus</i>	TLR3 + double brin ARN (caractéristique de nombreux virus). Les expérimentations ont par ailleurs montré que l'affinité entre deux chaînes de TLR était trop faible pour qu'elles puissent former spontanément un dimère. Ce sont donc les contacts établis avec l'ARN double brin qui stabilisent cette association et entraînent l'apparition d'un signal dans le cytoplasme.
<a href="#">2J67</a>	<i>Homo sapiens</i>	Domaine TIR du TLR10. (domaine intracellulaire) Ce domaine ressemble beaucoup au domaine intracellulaire des récepteurs à l'interleukine 1 (TIR) qui sert à la transduction du signal en recrutant une protéine adaptatrice. A = acides aminés 628 à 776 de la molécule B = acides aminés 630 à 776 de la molécule
<a href="#">3V47</a>	Zebrafish	TLR5 : domaine N-terminal extracellulaire dimérisé (reconnaissance de la flagelline bactérienne) Les TLR5 ainsi rapprochés forment un dimère, ce qui conduit au déclenchement d'un signal intracellulaire responsable de l'activation du facteur de transcription NF-κB C et D = antigène
<a href="#">3W3G</a>	<i>Homo sapiens</i>	TLR 8 (dimérisé) Crystal structure of human TLR8 (unliganded form) Beta-d-mannose C6 H12 O6 (R,R)-2,3-butanediol C4 H10 O2 N-acetyl-d-glucosamine C8 H15 N O6 } ligands n'entraînant pas la dimérisation
<a href="#">3W3J</a>	<i>Homo sapiens</i>	TLR 8 (dimérisé) + changement de conformation suite à la fixation du ligand CL097

En bleu : travaux de Jean François Madre

Logiciel MolUSc : Visualisation et analyse de molécules à usage scolaire

<http://molusc.free.fr>

<http://acces.ens-lyon.fr/acces/ressources/immunité-et-vaccination/reponse-immunitaire/ressources/rastop-et-anagene/molecules>

# Aspect évolutif

## DOCUMENT 1 : Vue d'ensemble des systèmes immunitaires innés et adaptatifs chez différentes espèces

	Drosophile <i>Insecte</i>	Oursin <i>Echinoderme</i>	Ascidie <i>Tunicier</i>	Lamproie <i>Agnathe</i>	Requin <i>Elasmobranchie</i>	Carpe <i>Téléostéen</i>	Grenouille <i>Amphibien</i>	Serpent <i>(Reptile)</i>	Poulet <i>(Oiseau)</i>	Homme <i>Mammifère</i>
Immunité adaptative	NON	NON	NON	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI
Réarrangement des Ig	NON	NON	NON	NON	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI
Réarrangements des gènes VLR	NON	NON	NON	OUI	NON	NON	NON	NON	NON	NON
Réarrangements combinatoires du récepteur T	NON	NON	NON	NON	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI
Molécules polymorphes du CMH	NON	NON	NON	NON	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI
Voie classique du complément	NON	NON	NON	NON	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI
C <sub>3</sub> et facteur B	NON	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI
Lectine liant le mannose	NON	?	OUI	Déduit	Déduit	OUI	Déduit	Déduit	OUI	OUI
Ficoline	NON	?	OUI	Déduit	Déduit	Déduit	Déduit	Déduit	Déduit	OUI
MASP	NON	?	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI
Présence de récepteur de type toll = PRR	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI
Peptide antibactérien	OUI	Déduit	Déduit	Déduit	Déduit	Déduit	OUI	OUI	OUI	OUI

VLR : *Variable Lymphocyte Receptor* (Récepteurs lymphocytaires variables). Les *Agnathes* possèdent donc bien un système immunitaire adaptatif qui partage les principales caractéristiques du système adaptatif des *Gnathostomes*, même si les acteurs moléculaires sont de nature différente.

### DOCUMENT 2 : Quelques citations à propos du système immunitaire et de l'évolution

« Des moyens sophistiqués de défense existaient déjà dans le génome avant que les organismes divergent en plantes et animaux ».

« Beaucoup de gènes opérationnels dans l'immunité de la drosophile sont actifs chez l'Homme et les plantes et paraissent être des composants universels de défense de l'hôte ».

### DOCUMENT 3 : Co-évolution hôte – agent infectieux.

« Le système immunitaire a pour fonction de maintenir l'intégrité de l'organisme en éliminant les pathogènes soit complètement, soit en limitant l'extension et la localisation de la population de pathogène dans l'organisme infecté.

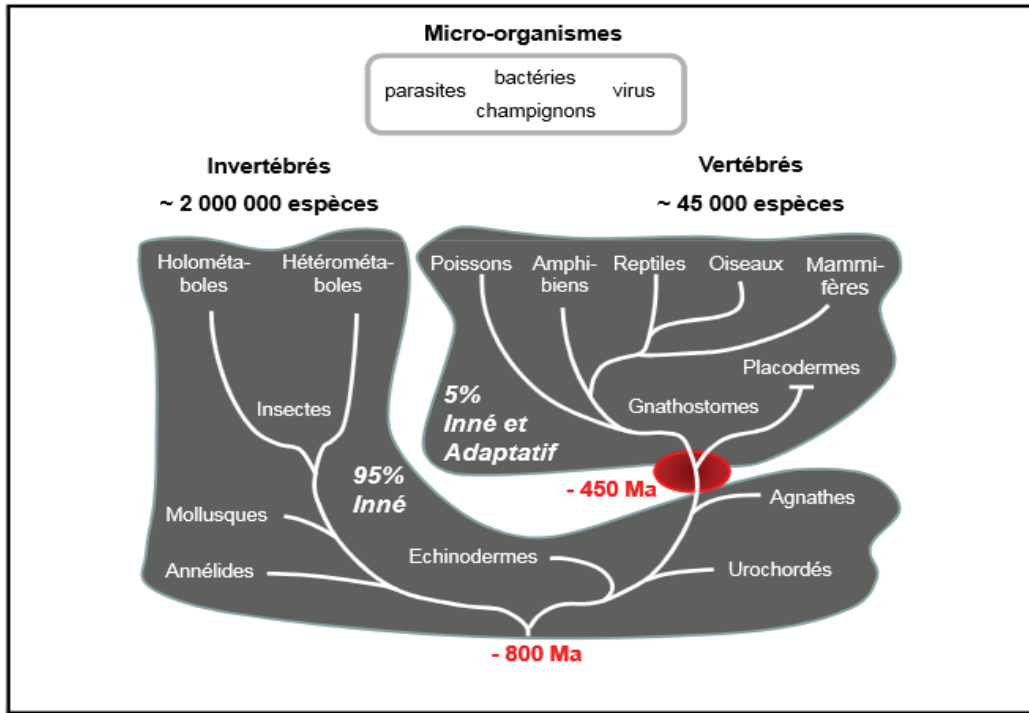
A l'échelle de l'évolution, les interactions entre le pathogène et ses hôtes humains peuvent changer, tout en influençant la sévérité de la maladie qui en résulte.

La plupart des pathogènes ont développé des mécanismes d'adaptation spéciaux, leur permettant d'envahir leur hôtes, de s'y répliquer et d'être transmis. Cependant, la mort rapide de leur victime est rarement dans l'intérêt des microbes, puisqu'elle détruit en même temps son lieu d'asile et sa source de nourriture. En conséquence, les pathogènes capables de déclencher des maladies à issue rapidement fatale ont tendance à évoluer vers un accommodement avec leurs hôtes.

De manière complémentaire, ceux-ci (*les hôtes*) ont développé un certain degré de résistance génétique vis-à-vis des germes en cause dans les maladies communes et ont acquis à la suite des infections dont ils ont été victimes durant l'enfance une immunité qui dure toute la vie vis-à-vis des maladies endémiques.

A cause de ces interactions entre pathogène et son hôte, la nature et la sévérité des maladies infectieuses dans les populations sont en perpétuel changement. »

DOCUMENT 4 : Phylogénie et système immunitaire



DOCUMENT 5 : Origine, distribution et fonctions des récepteurs Toll-like dans le règne animal.

