

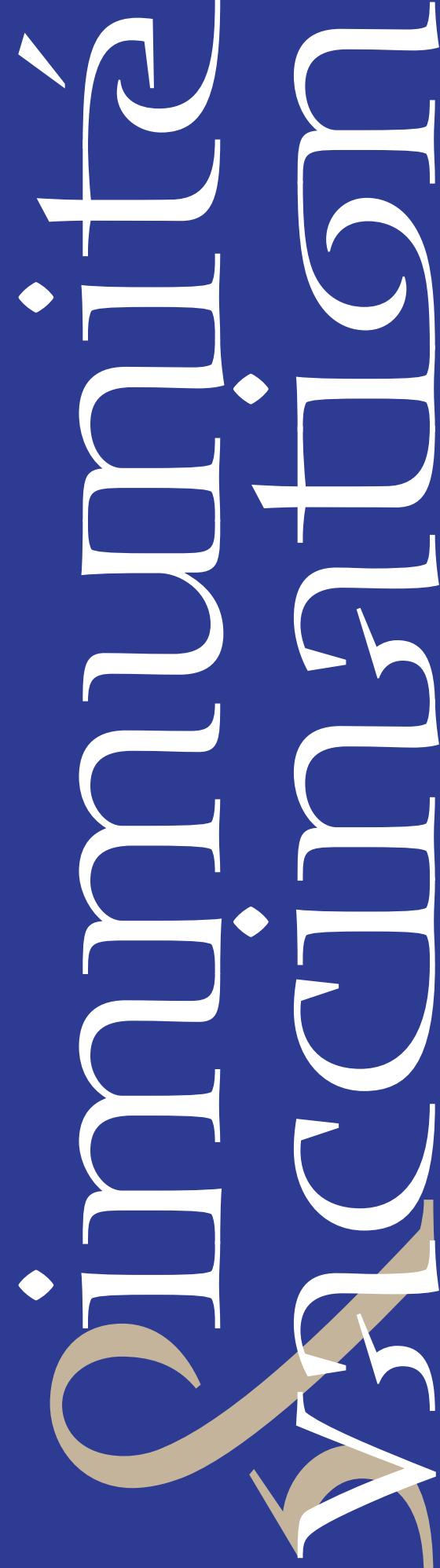
stage de formation
5 & 6 février 2015

atelier n° 6

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

Sandrine Beaudin
Marianne Naspetti

contact ✉ nathalie.davoust-nataf@ens-lyon.fr
informations et ressources ✉ [http://acces.ens-lyon.fr/
acces/ressources/immunité-et-vaccination](http://acces.ens-lyon.fr/acces/ressources/immunité-et-vaccination)





Cette œuvre est mise à disposition selon les termes de la
[Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale -](#)
[Partage dans les Mêmes Conditions 4.0 International](#)

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

Sandrine Beaudin & Marianne Naspetti, enseignantes de SVT, lycée Marseilleveyre, académie d'Aix-Marseille,
équipe ACCES, IFE-ENS de Lyon

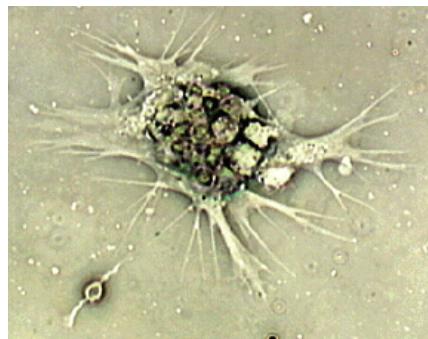
LE SYSTEME IMMUNITAIRE DES BIVALVES : L'HUITRE

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

Crassostrea gigas				
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			

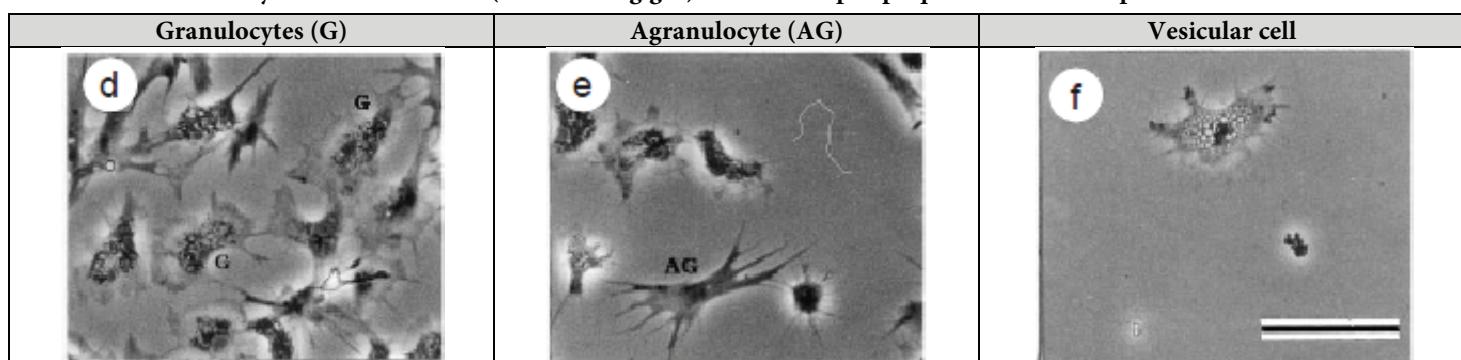
LEG, large eosinophilic granulocyte; SEG, small eosinophilic granulocyte; H, hyalinocyte; BLC, blast-like cell; EG, eosinophilic granulocyte; BG, basophilic granulocyte; Intermixed, hemocyte with eosinophilic and basophilic granules; Gr, granule; G, Golgi complex; M, mitochondria; V, vesicle; rER, rough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

DOCUMENT 3 : Hémocyte d'huitre (400 x)



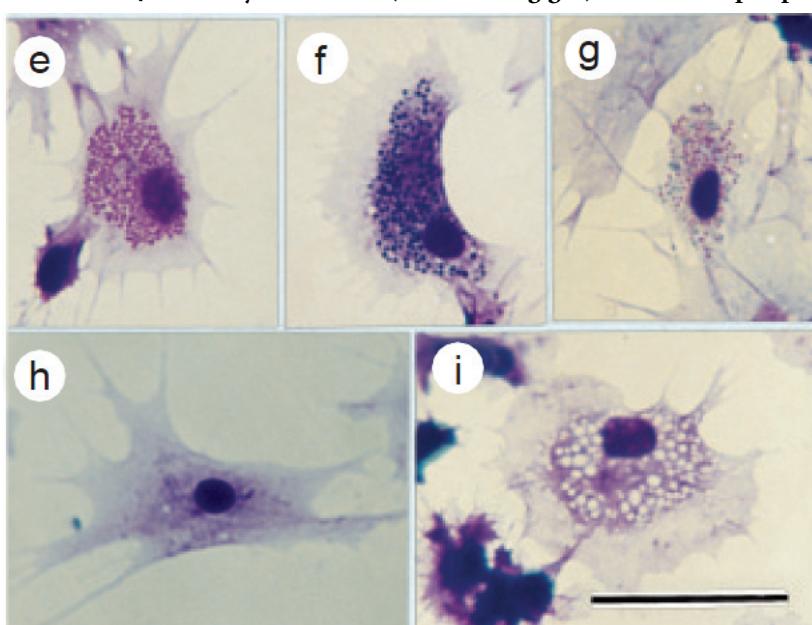
Videos : Preparing the HemolymphHemocytes in Action
http://ww2.mdsg.umd.edu/interactive_lessons/oysters/oysblood.htm

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



Barre d'échelle doc C = 50 µm. Toutes les photos sont à la même échelle
(Chang et al., « Hemocytes of Hard Clam and Oyster », Zoological Studies, 2005, 44)

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 eosinophiles et basophiles

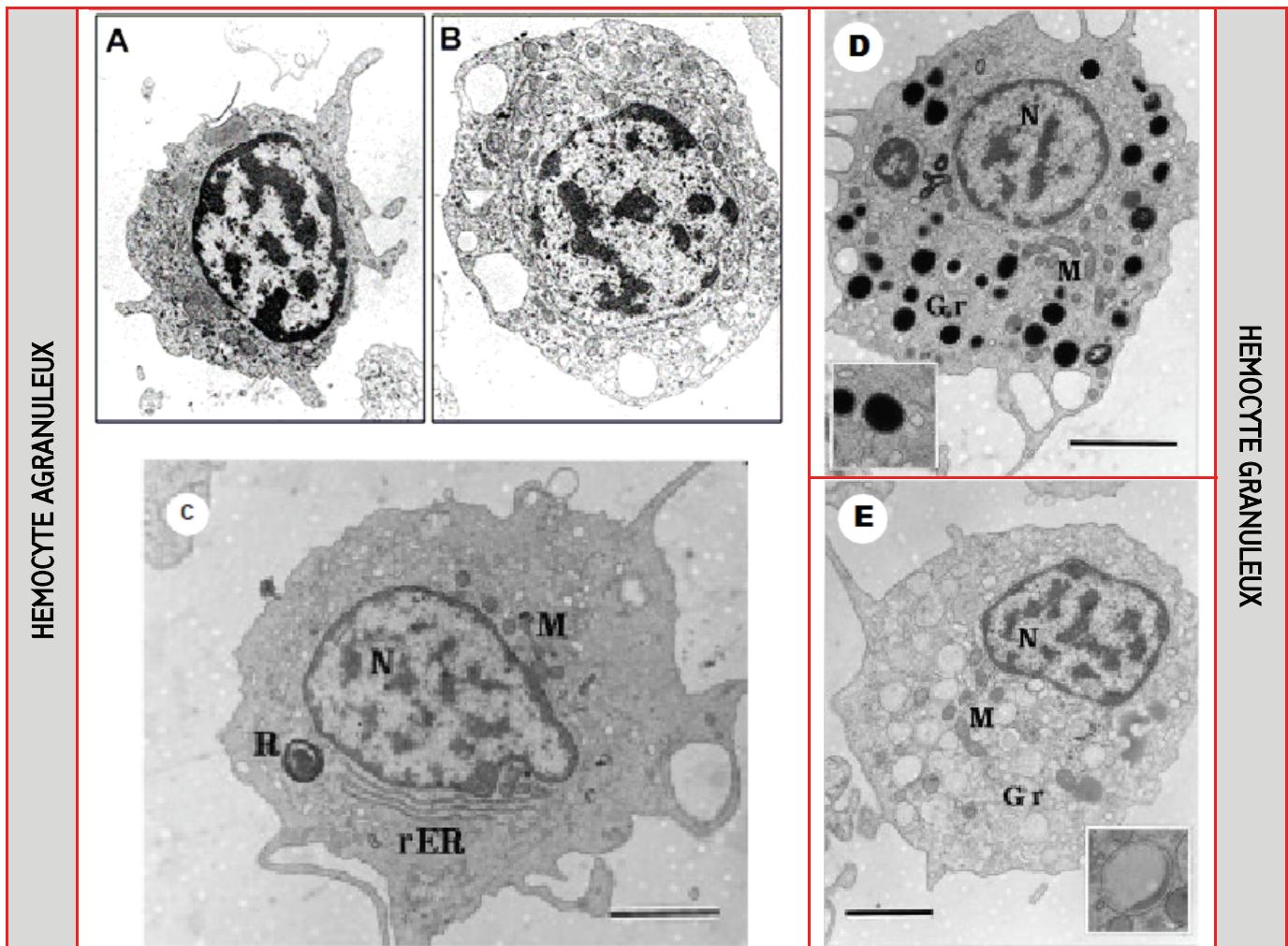
- Agranulocytes
(h) agranulocyte

- (i) vesicular cell.

Barre d'échelle = 20 µm.
Toutes les photos sont à la même échelle

Chang et al., « Hemocytes of Hard Clam and Oyster », Zoological Studies, 2005, 44

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



Légende

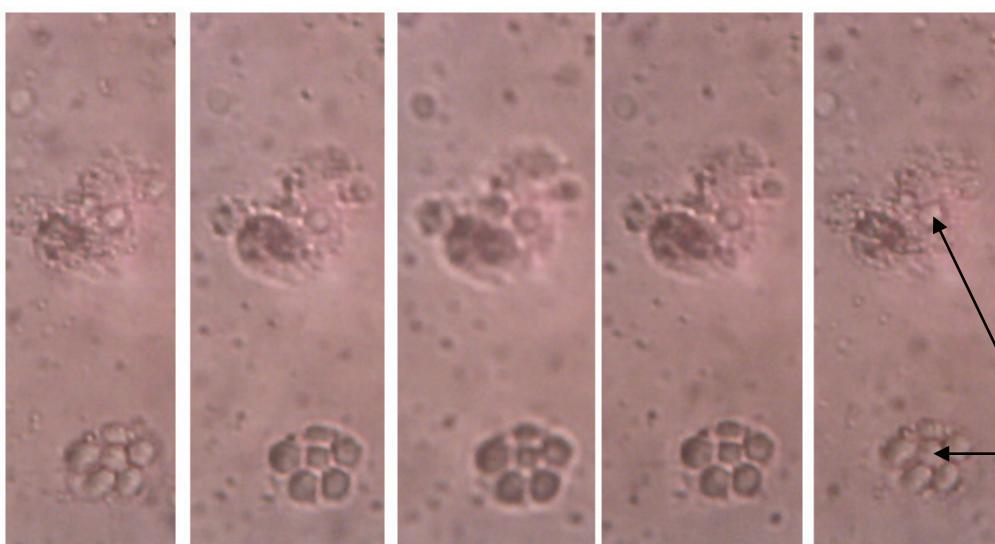
- A. petite cellule, probablement un hémocyte jeune (MET x 15 000)
- B. hémocyte basophile hyalin (MET x 15 000)
- C. grand hyalinocyte
- D. granulocyte contenant des granules denses
- E. granulocytes contenant des granules clairs aux électrons et de nombreux corps cytoplasmiques correspondant probablement 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

Chang *et al.*, « Hemocytes of Hard Clam and Oyster », *Zoological Studies*, 2005, 44 ; Bachyre *et al.*, 2004

DOCUMENT 6 : Résultats de nos observations (MO x 400)

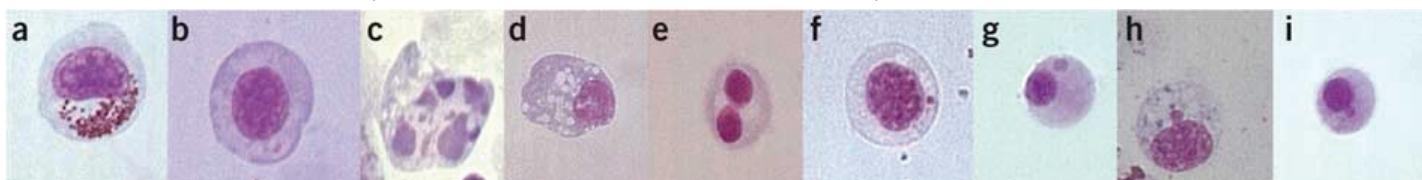


Même zone d'observation mais
avec profondeur de champ
différente : permet de mettre en
évidence une adhérence entre le
phagocyte et la levure

Levures

LE SYSTEME IMMUNITAIRE DES BIVALVES : LA MOULE

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

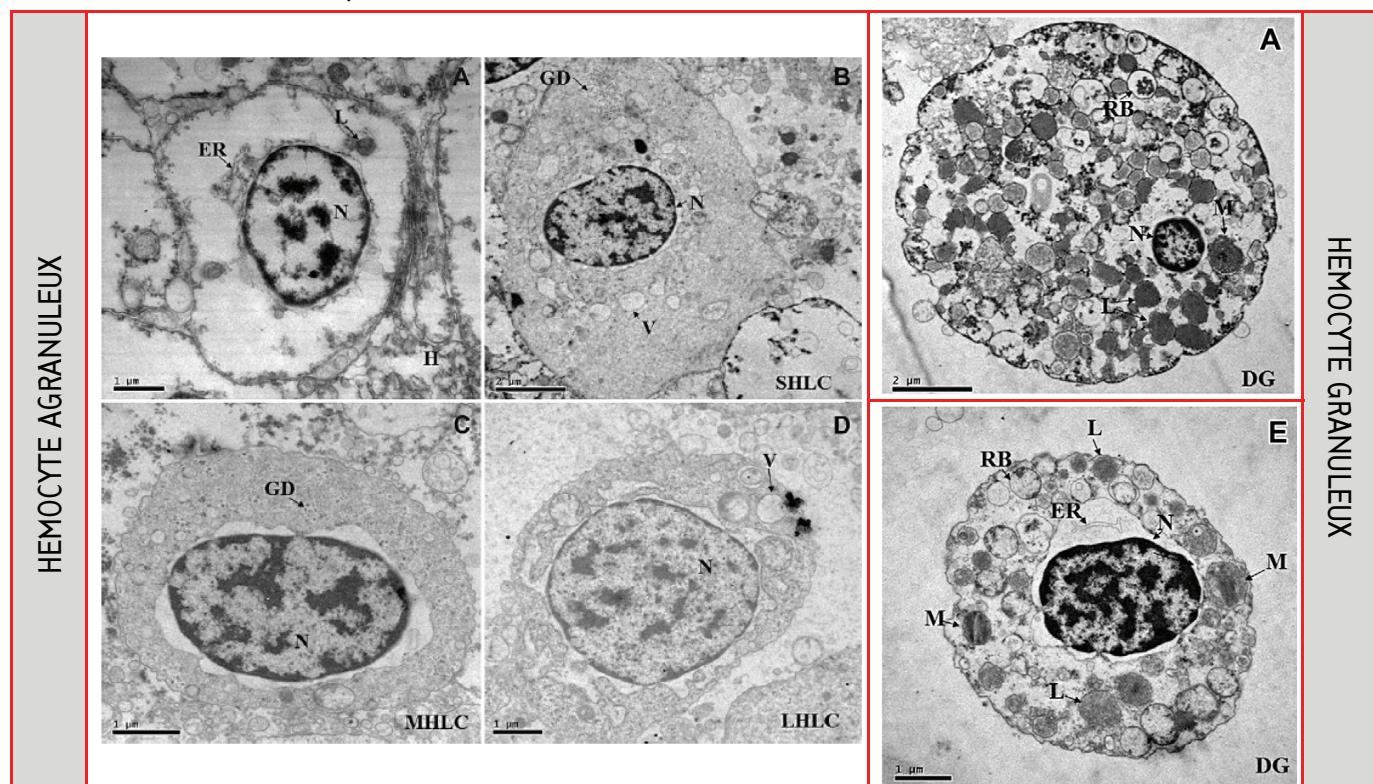


http://www.nature.com/nprot/journal/v7/n6/fig_tab/nprot.2012.043_F1.html

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)

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



LEGENDE

➤ 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

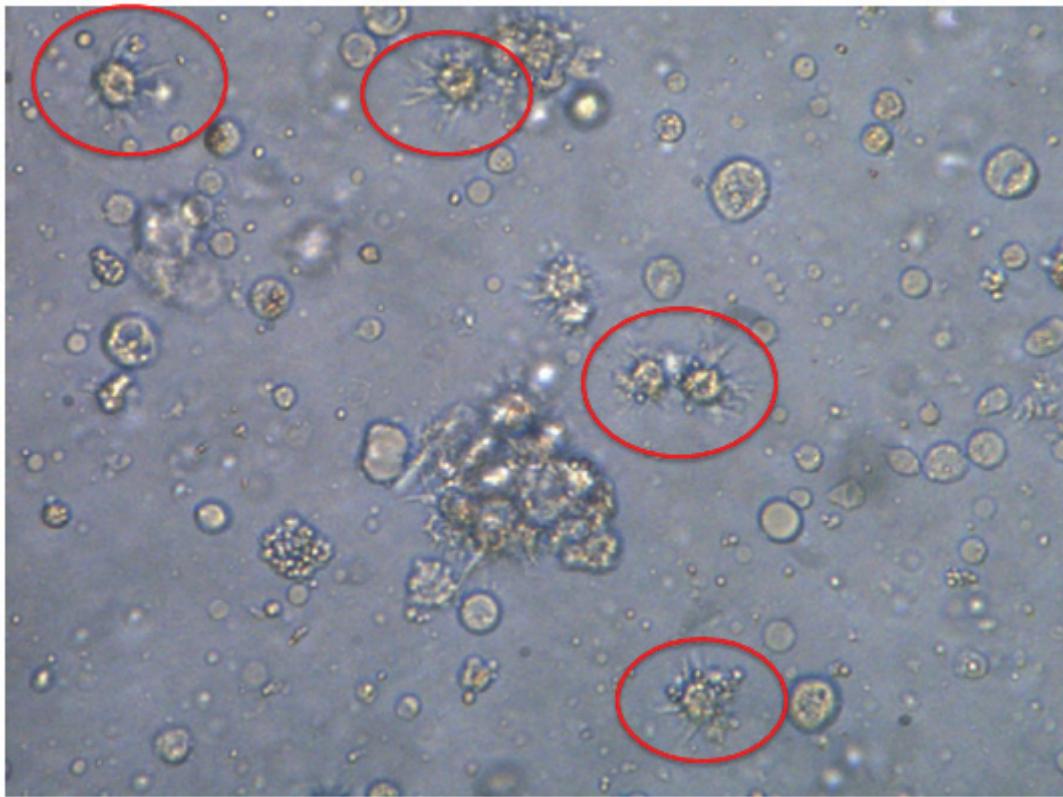
M = mitochondries

ER = réticulum endoplasmique

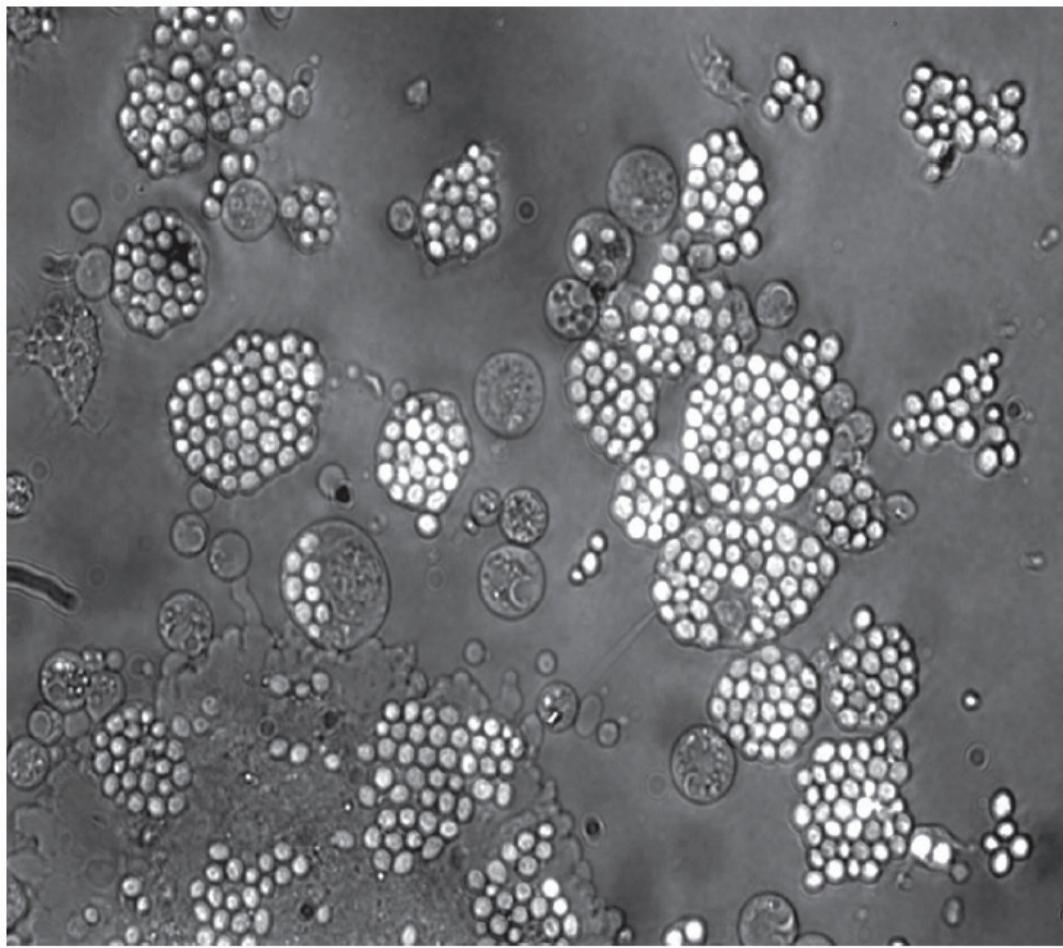
Rb = corps résiduel

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

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



Hémocytes fraîchement récoltés (objectif $\times 40$)



Hémocytes fraîchement récoltés attachés à la surface de la chambre Neubauer.

Phagocytose des particules étrangères (contraste de phase $\times 200$).

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

LE SYSTEME IMMUNITAIRE DES ECHINODERMES

DOCUMENT 1 : Les cellules du liquide cœlomique (cœlomocytes) de l'oursin

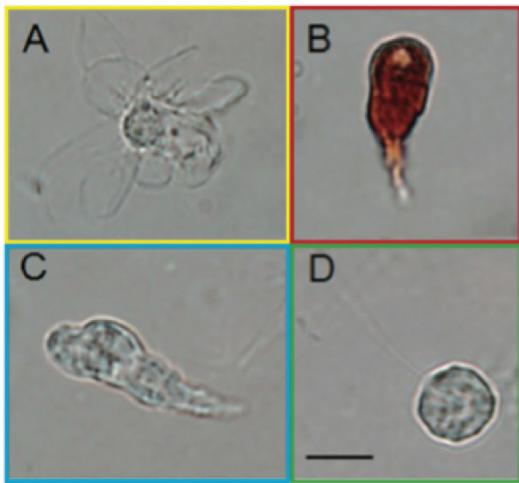


Figure 1. Live coelomocytes from the sea urchin, *Paracentrotus lividus*. A) petaloid phagocyte. B) red spherule cell. C) colorless spherule cell. D) vibratile cell. Scale bar = 5 microns. Images taken by R. Bonaventura.

DOCUMENT 2 : Composition et proportion des différentes cellules présentes dans le liquide cœlomique de l'oursin

Graft Rejection = rejet de greffe

Table 1. Coelomocytes in sea urchins

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

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

Source : *Invertebrate Immunity*, edited by Kenneth Söderhäll. ©2010 Landes Bioscience and Springer Science+Business Media

DOCUMENT 3 : Les cellules hémocytaires granuleuses de l'oursin au MET

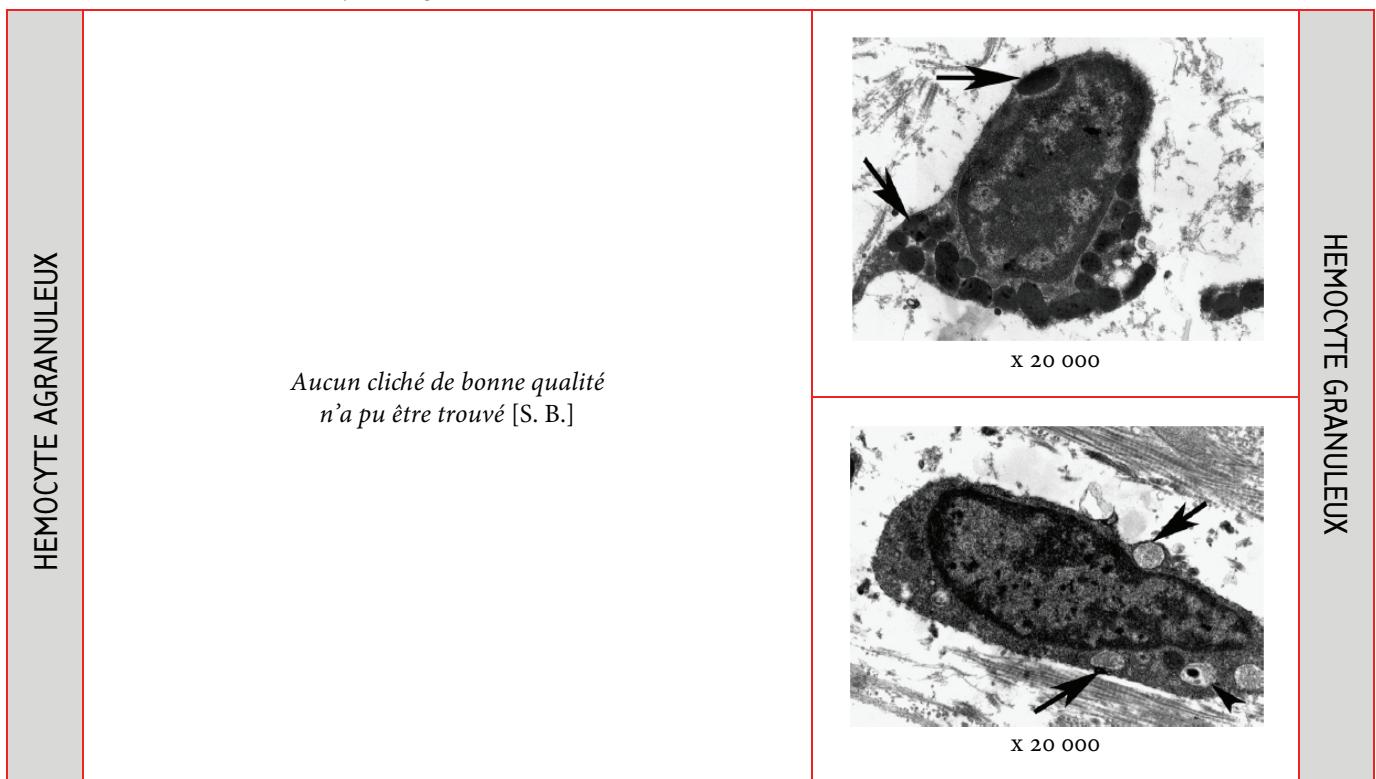
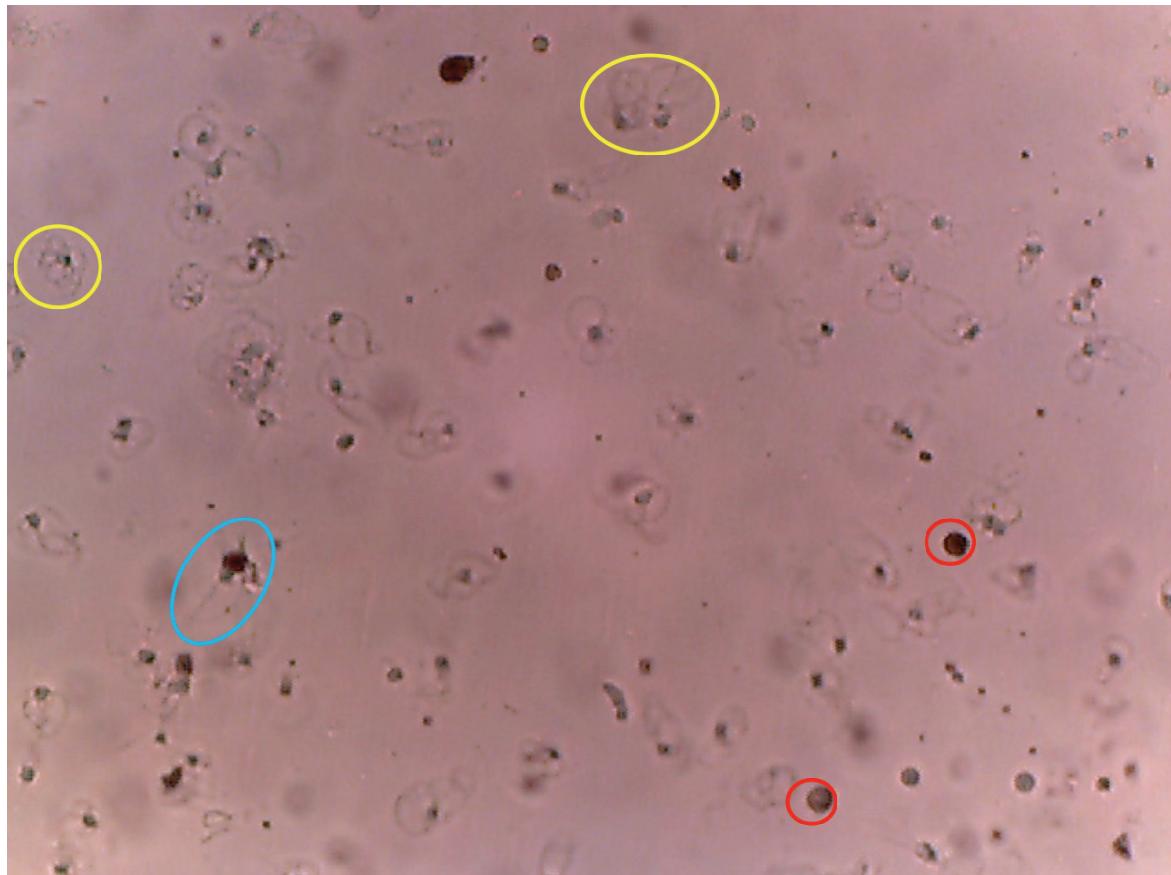


Table 2. Summary of morphology and reactions to various cytochemical stains of echinoderm coelomocytes

Morphological parameter	Phagocyte	Filopodial form	Type I	Type II	Type III	Spherule cell	Vibratile cell	Crystal cell	Progenitor cell	Haemocyte
Size	Petaloid form	20-40 μm diameter	5-20 μm diameter	5-20 μm diameter	5-10 μm diameter	Cell body: 5-10 μm diameter; Flagellum: 20-50 μm long	Cell body: 5-10 μm diameter; Flagellum: 20-50 μm long	2-4 μm long	7-8 μm diameter	10-23 μm diameter
Shape	Petal-like or bladder-like pseudopodia extend from central nuclear region three-dimensionally	Slender and long (up to 50 μm) branched pseudopodia, sometimes stellate	Spherical or ovoid, rough surface, sometimes with micropressions and holes on the cell surface	Spherical with 1 or 2 flagellum	Spherical with 1 or 2 flagellum	Diamond or rhomboid	Spherical, avoid or spindle	Biconvex or spherical		
Cytoplasmic content	Numerous membrane-bound electron-dense bodies, 6-14 μm 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 μm diameter); well-developed Golgi apparatus	Rhomboidal or star-shaped or spherical inclusions	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 μm diameter with single nucleolus	Regular or irregular-shaped, eccentrically located	2.5 μm diameter	2.5 μm 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	Stable		

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



Observation vitale des hémocytes de l'oursin Violet (MO $\times 100$) (voir code couleur)



Observation vitale des hémocytes de l'oursin Violet (MO $\times 400$)



Observation vitale des hémocytes de l'oursin noir (MO $\times 400$)



Observation vitale des hémocytes de l'oursin noir (MO $\times 400$)

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

Oursin violet en présence de levures (objectif $\times 40$) ; même zone d'observation mais avec une profondeur de champ différente



PROTOCOLES EXPERIMENTAUX

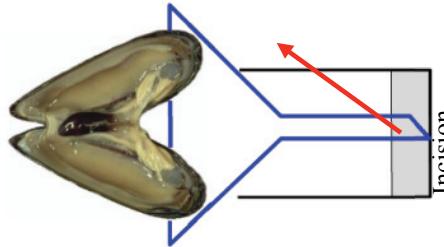
Matériel

Le matériel	
	Huître
	Oursin
	Oursin

Remarques pour l'utilisation en classe :

- la solution de levures dans l'eau de mer colorées au bleu de méthylène est directement donnée aux élèves
- distribuer deux échantillons par binôme afin que chaque élève réalise la manipulation : un élève récupère les hémocytes pour l'identification et l'autre réalise l'injection pour la phagocytose

- 1 Microscope
- Lamelles
- lame à concavité
- Papier absorbant
- Matériel : biologique : oursins, huîtres, moules + capsules levures de *bière 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 - 1,79 g de MgCl₂
 - 1,1 g de MgSO₄
 - 1 Ouvre boîte à lame fixe
 - 1 paire de gants épais type mappa ou équivalent (pour protéger les mains lors de l'ouverture des huîtres, oursins et moules)
 - 1 Scalpel
 - 1 Aiguille lancéolée
- Bassine avec sac plastique pour ouvrir les bivalves et vider leur contenu
- Tubes de prélèvement à fond plat et à bouchon à vis ou bêcher de petite taille (30 ml) ou tubes Eppendorf
 - 1 pour la solution de levures colorées au bleu de méthylène
 - 1 pour récolter les hémocytes servant à l'identification des cellules
 - 1 pour récolter les hémocytes coelomocytes incubés avec les levures
 - 2 entonnoirs de petite taille en plastique (on lance en parallèle deux manipulations)
- 1 Ciseau assez gros et robuste pour ouvrir l'oursin
- 4 seringues de 1 ml avec aiguille (1 pour levure + 1 pour observation coelomocyte + 1 pour observation coelomocyte 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

Moule	Huître	Oursin
<p>1/ Ouvrir l'animal et jeter le premier liquide coelomique.</p> <p>2/ Inciser la moule au niveau du muscle puis la placer dans l'entonnoir afin de récupérer le deuxième liquide coelomique au bout de quelques minutes (5 à 10 mn).</p>  	<p>1/ Ouvrir l'animal et jeter le premier liquide coelomique.</p> <p>2/ Inciser l'huître au niveau du muscle puis la placer dans l'entonnoir afin de récupérer le deuxième liquide coelomique au bout de quelques minutes (5 à 10 mn). Il est également possible de prélever directement le liquide à l'aide d'une seringue dans la cavité péricardique au niveau du muscle adducteur.</p>  	<p>1/ Ouvrir l'animal et jeter le premier liquide coelomique.</p> <p>2/ Attendre quelques minutes (5 à 10 mn) afin de récupérer le deuxième liquide coelomique à l'aide d'une seringue.</p> 

Moule	Huître	Oursin
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 (1ml)	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 (1ml)	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 1ml)
		
<p>2/ Attendre minimum 30 minutes</p> <p>3/Ouvrir et récupérer le liquide célonique comme indiqué précédemment.</p> <p>4/ Réaliser une préparation microscopique dans les lames à concavité en prenant soin de ne pas prélever les particules en suspension</p> <p>5/ Attendre quelques minutes que les cellules se déposent et réaliser l'observation</p>	<p>2/ Attendre minimum 30 minutes</p> <p>3/Ouvrir et récupérer le liquide célonique comme indiqué précédemment.</p> <p>4/ Réaliser une préparation microscopique dans les lames à concavité en prenant soin de ne pas prélever les particules en suspension</p> <p>5/ Attendre quelques minutes que les cellules se déposent et réaliser l'observation</p>	<p>2/ Attendre minimum 30 minutes</p> <p>3/Récupérer le liquide célonique comme indiqué précédemment, en prenant soin de ne pas aspirer les gonades et les particules en suspension</p> <p>4/ Réaliser une préparation microscopique dans les lames à concavité</p> <p>5/ Attendre quelques minutes que les cellules se déposent et réaliser l'observation</p>

⚠ Remarques :

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



Levures colorées au BM 2 jours dans l'eau de mer (MO x 400) Levures colorées au BM 30mn dans un tampon pH 6.2 (MO x 400)

DOCUMENT 1 : Mise en évidence expérimentale de la phagocytose

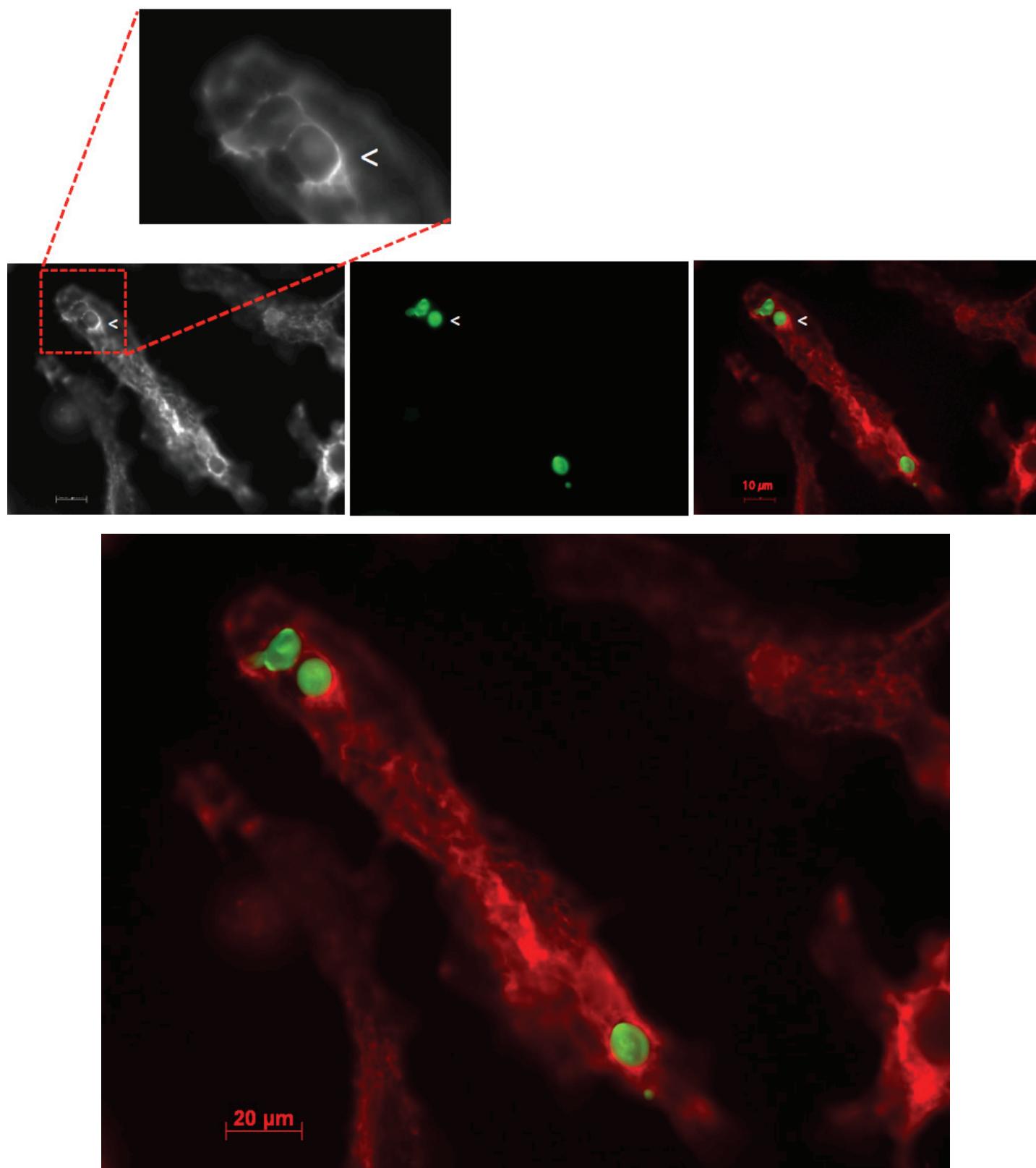
DOCUMENT 1a : Protocole expérimental simplifié

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 1b : Résultats expérimentaux obtenus au microscope à fluorescence



Source : Chloé Journo & Nathalie Davoust-Nataf, ENS de Lyon

DOCUMENT 2 : Impact de l'opsonisation sur la phagocytose

DOCUMENT 2a : Protocole expérimental simplifié

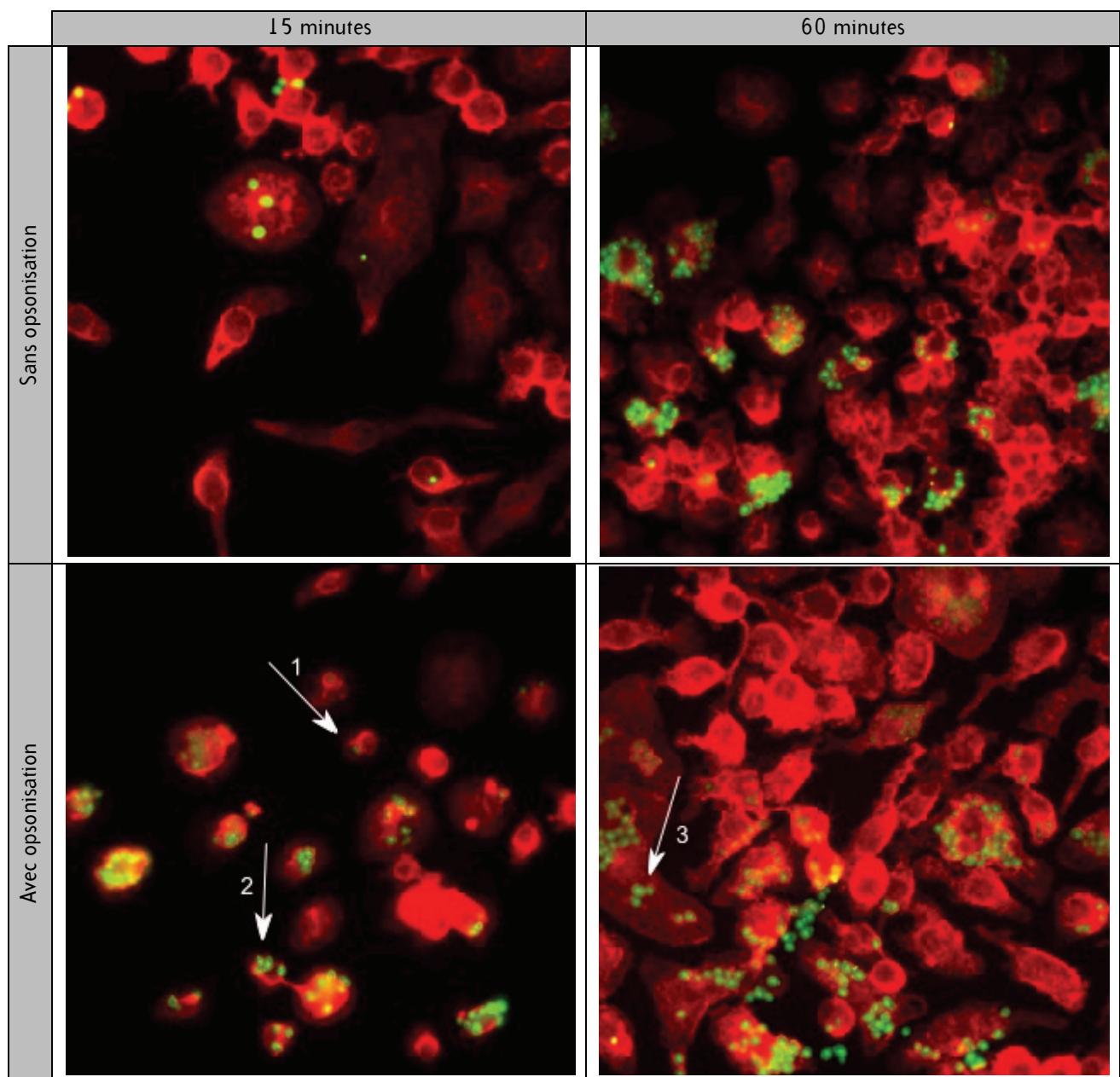
On réalise un test de phagocytose sur cultures de macrophages de souris :

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

Au bout de 15 et 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 & Nathalie Davoust-Nataf, ENS de Lyon

Légende

1 = formation des pseudopodes entourant le zymosan

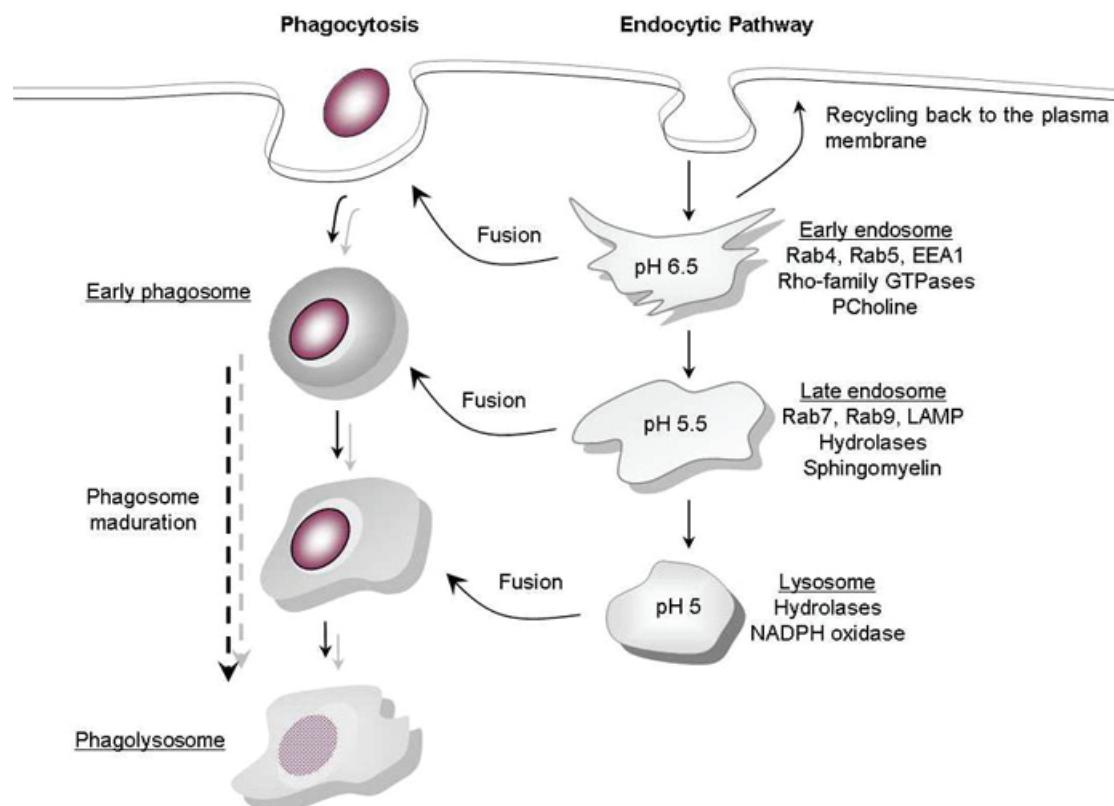
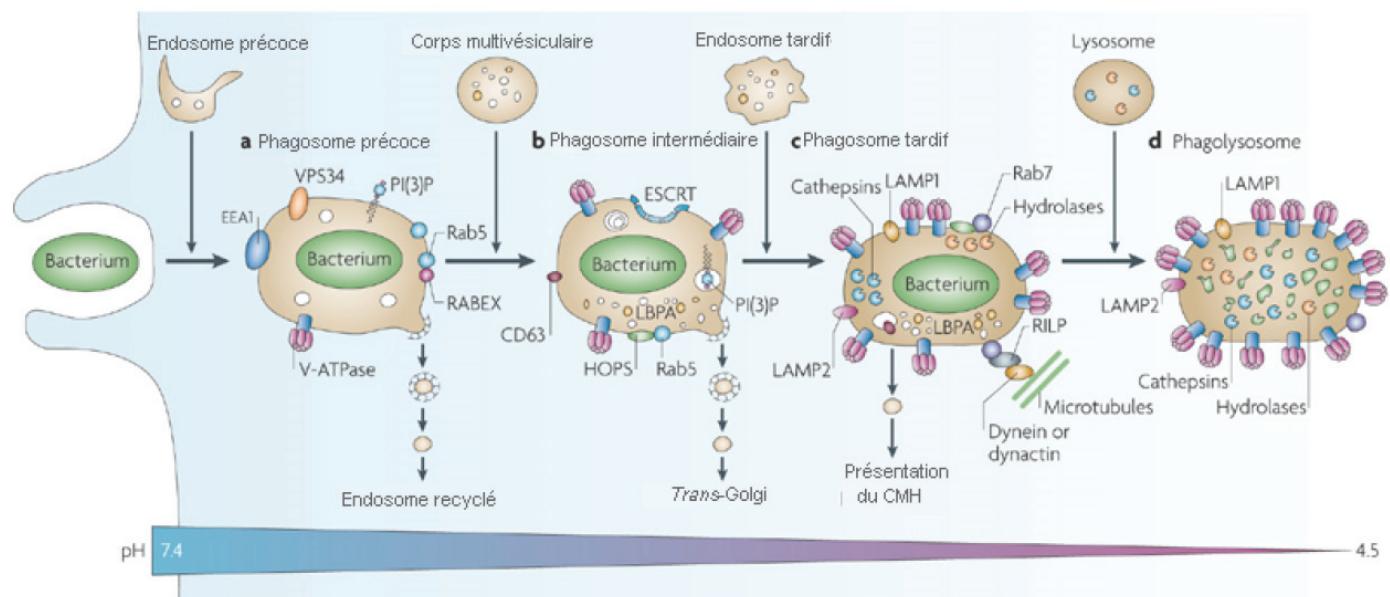
2 = fermeture du phagosome

3 = particules complètement internalisées

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

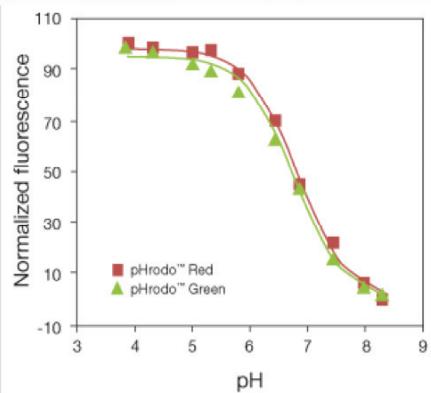
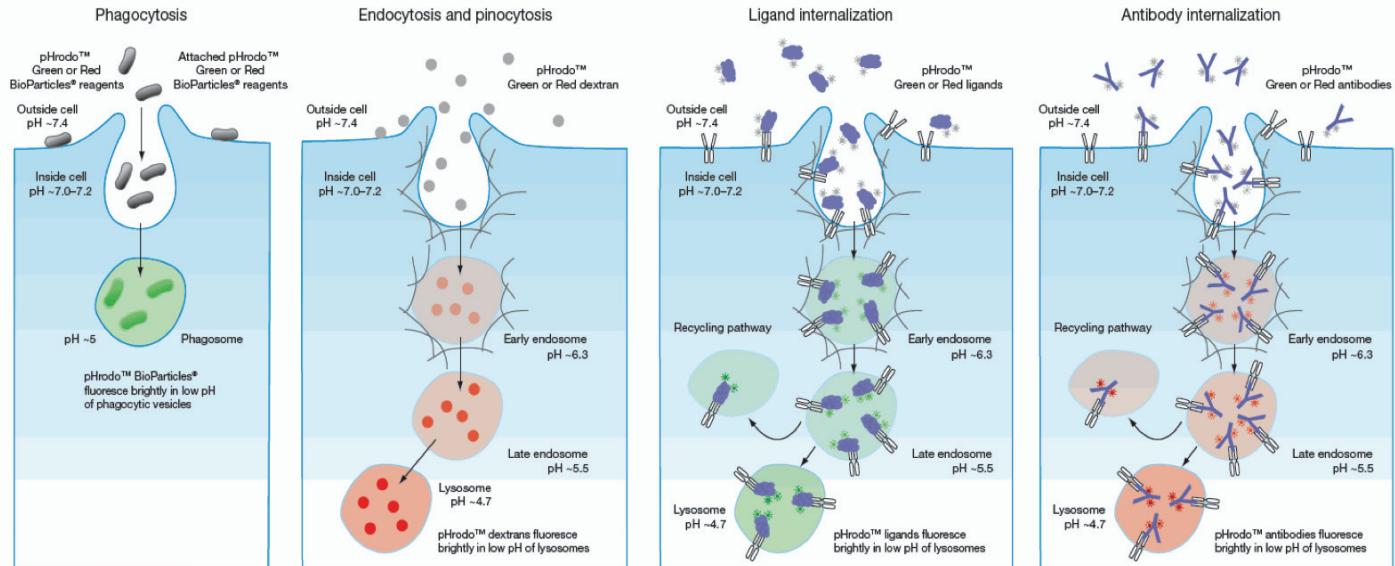
DOCUMENT 3a : Les étapes de maturation du phagosome adapté de Flannagan et al. 2009

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 : Yann Leverrier, ENS de Lyon (TP licence de biologie)

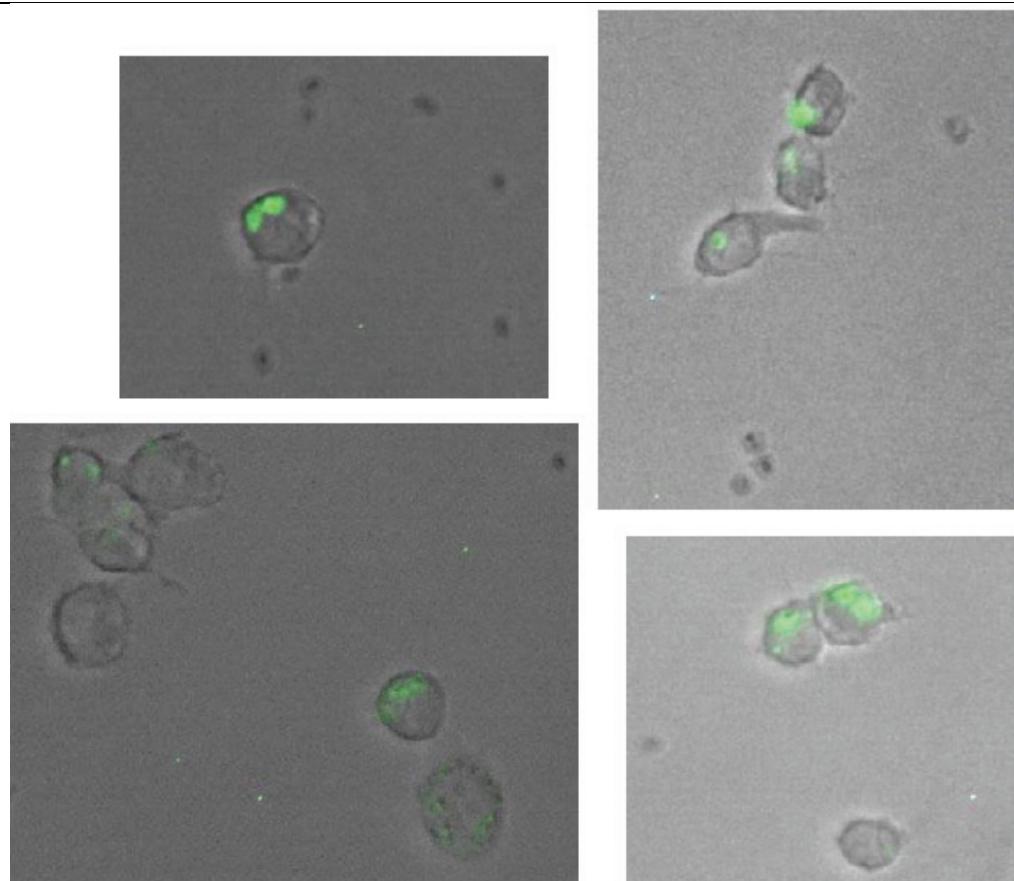
DOCUMENT 3b : Principe d'utilisation du marquage du zymosan avec le pHrodo Green Zymosan



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

Source : <http://www.lifetechnologies.com/fr/fr/home/references/newsletters-and-journals/bioprobejournal-of-cell-biology-applications/bioprobeissues-2012/bioprobe-68-november-2012/phrodo-ph-indicators.html>

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



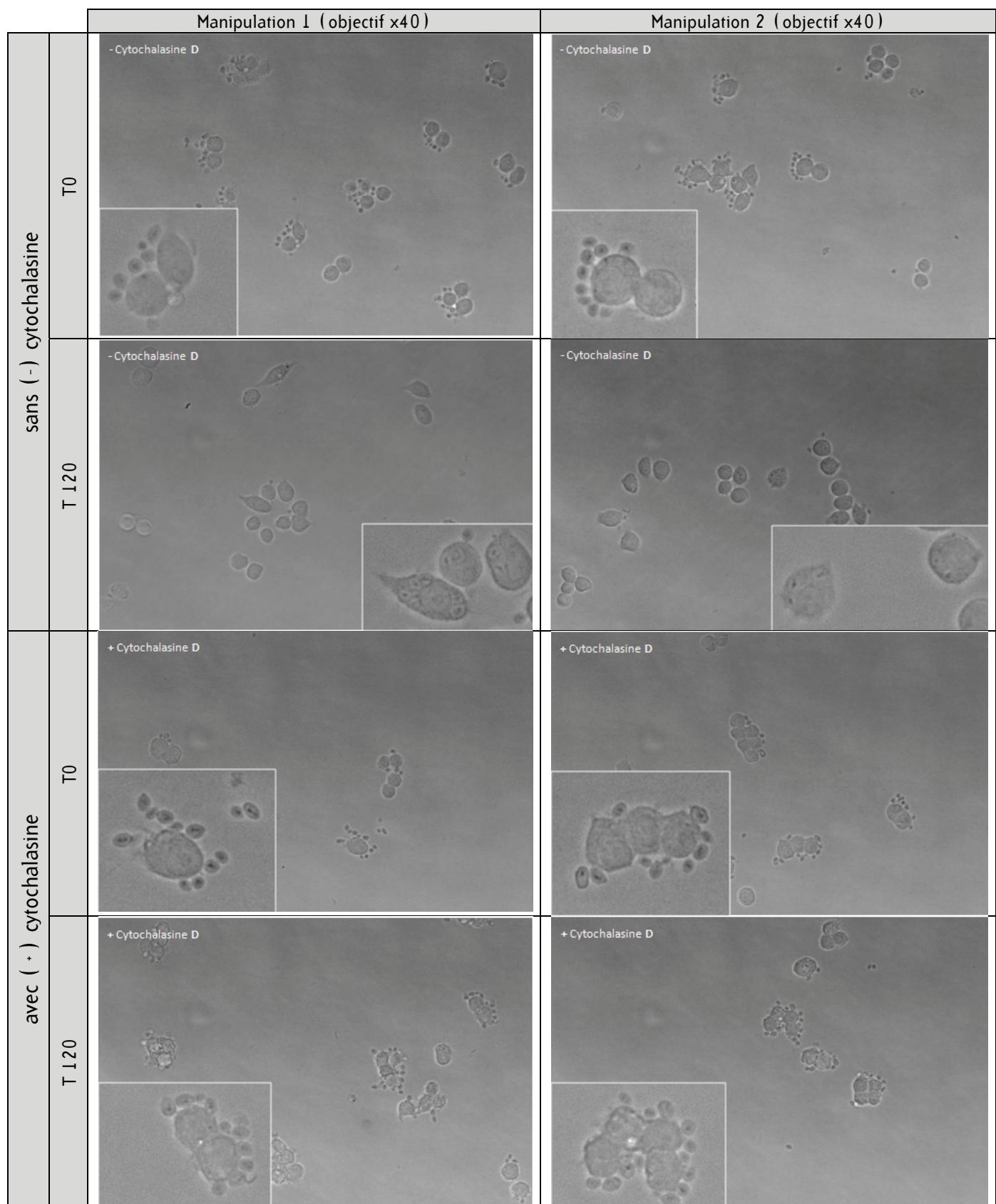
On incube des macrophages de souris avec des particules de zymosan qui émettent une fluorescence verte lorsque le pH devient acide. Le milieu est ensuite retiré, puis on procède à deux lavages successifs avant de remettre les macrophages dans un milieu de culture adéquat pour les observer au microscope (objectif $\times 40$). 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 de déplacement des cellules, la formation des pseudopodes, montrant l'implication de l'actine dans de tels mouvements.

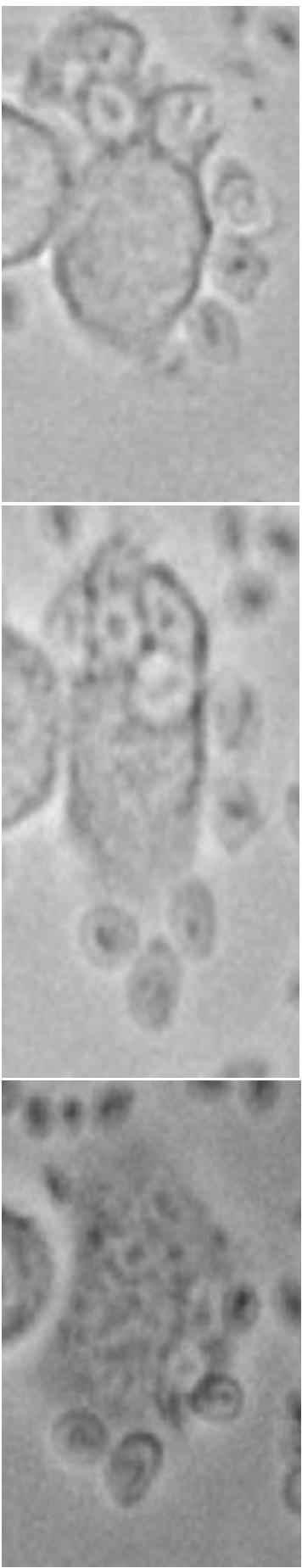
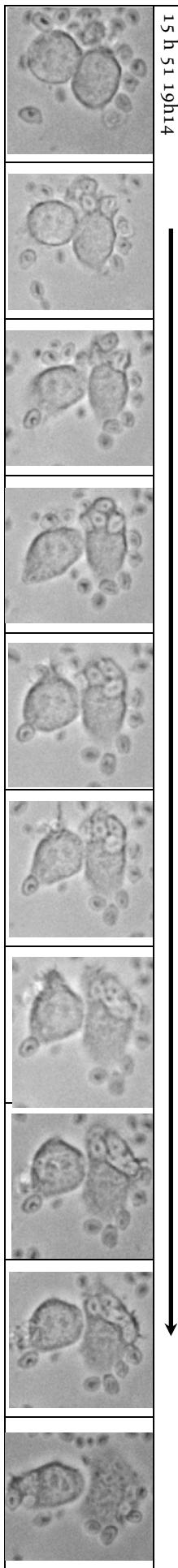


Images : Jean Thimonier – <http://touschercheurs.fr>

DOCUMENT 5 : Aspect cinétique de la phagocytose

Des macrophages de souris sont cultivés en présence de particules de zymosan.
On réalise des photos au microscope optique de la phagocytose (objectif $\times 40$)

15 h 51 19h14



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

LE PROCESSUS DE PHAGOCYTOSE CHEZ LES INVERTEBRES : CAS DE LA DROSOPHILE

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

DOCUMENT 1 :

Le syndrome des taches blanches est une infection virale (**virus = WSSV = The White spot syndrome virus**) qui touche des crevettes Pénaïdes. 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 Taïwan (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.

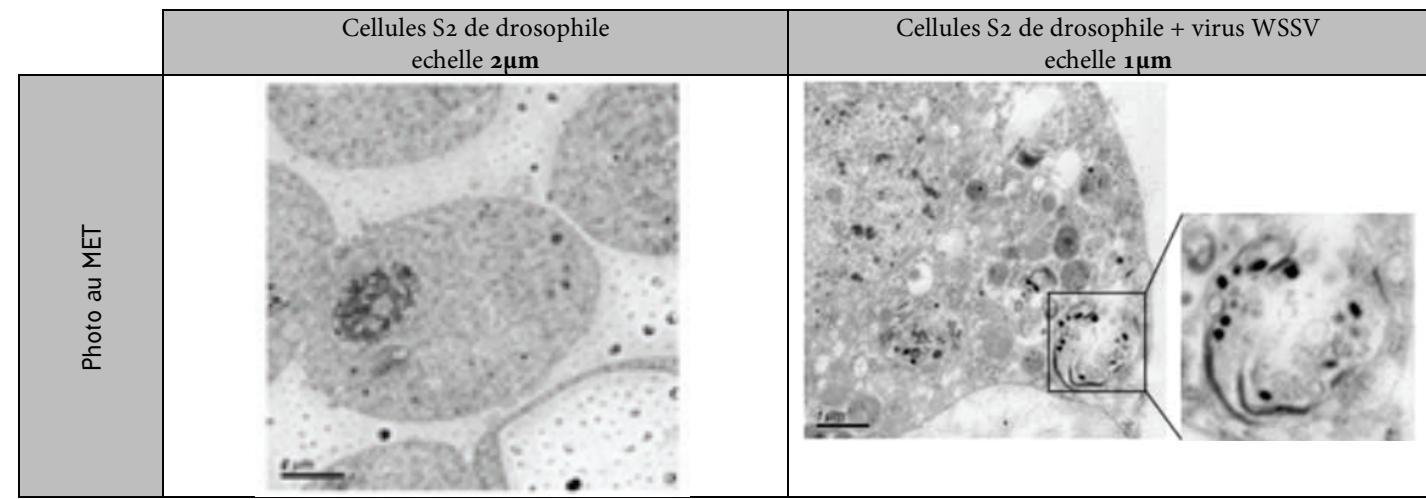
Le 31 octobre 2011, a été déposé le brevet d'un vaccin contre le virus causant le syndrome des taches blanches

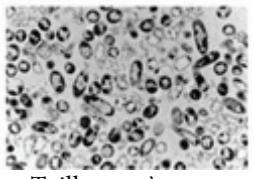
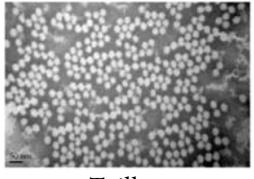
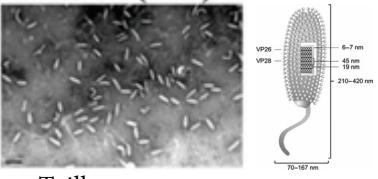
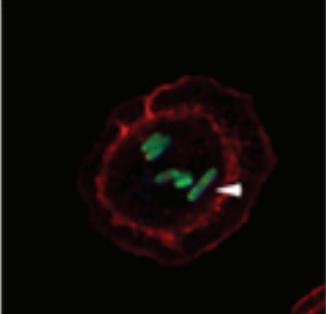
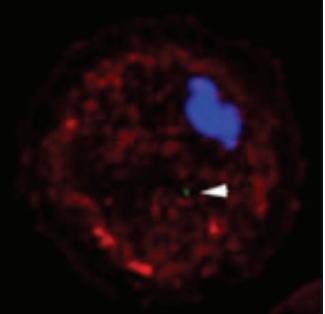
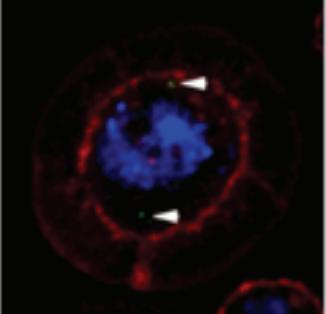
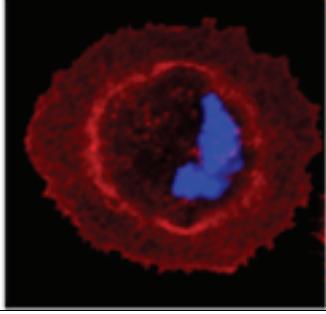
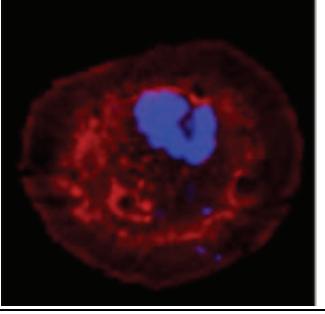
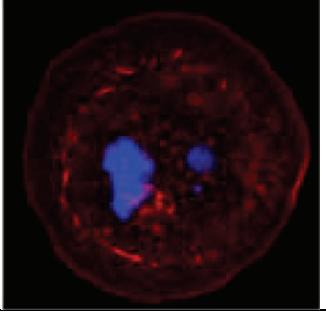
http://fr.wikipedia.org/wiki/Syndrome_des_taches_blanches

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 en 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 les cellules au MET et au microscope confocal, après différents laps de temps suite à l'inoculation.



	Cellules S2 de drosophile + Escherichia Coli (Gram -)	Cellules S2 de drosophile + virus DCV (= <i>Drosophila C</i> virus)	Cellules S2 de drosophile + virus WSSV (ADN double brin)
Photo du Pathogène			
Observation au MET	1 jour après injection (cadre = agrandissement de la vésicule) échelle 1 μm	1h après injection	Taille : 350 nm par 100 nm
Observation au microscope confocal (X100)	1 jour après injection	1h après injection	1h après injection
24h après injection			
			

LEGENDE

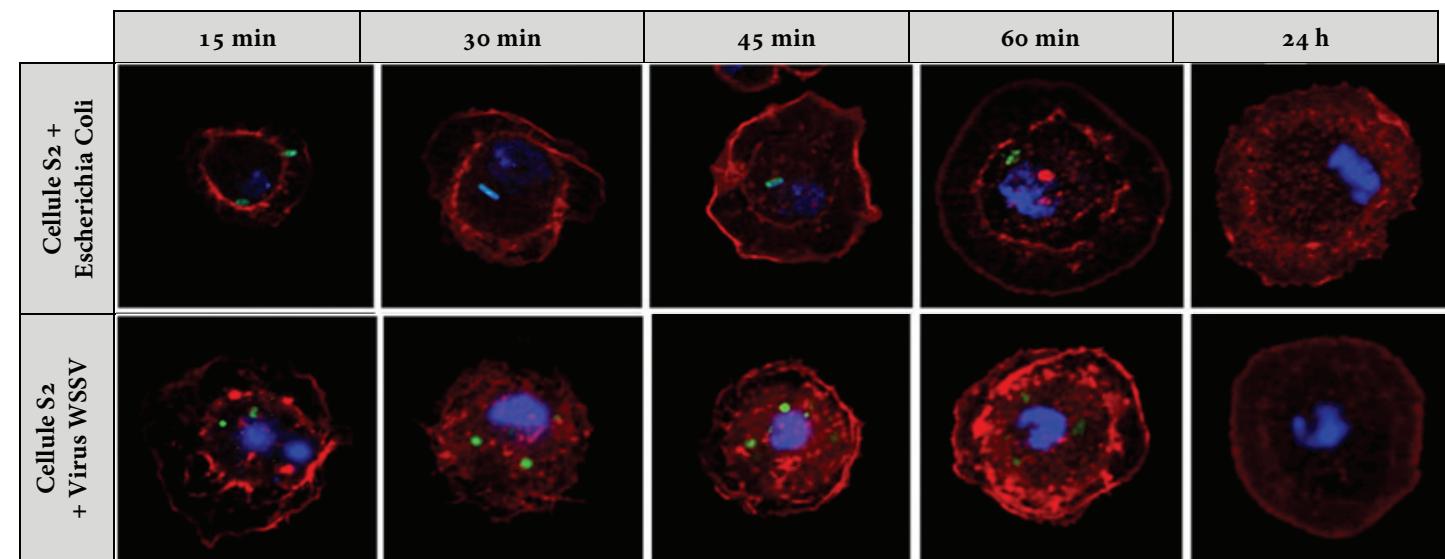
Couleur de la fluorescence	Molécule fluorescente utilisée	Structure marquée spécifiquement
Vert	Isothiocyanate de fluorescéine (FITC)	- bactéries - virus identifiés par des flèches blanches
Rouge	Phalloïdine couplée à un fluorochrome rouge : la rhodamine	- filament d'actine (= cytosquelette du phagocyte)
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 ($\times 400$)

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.

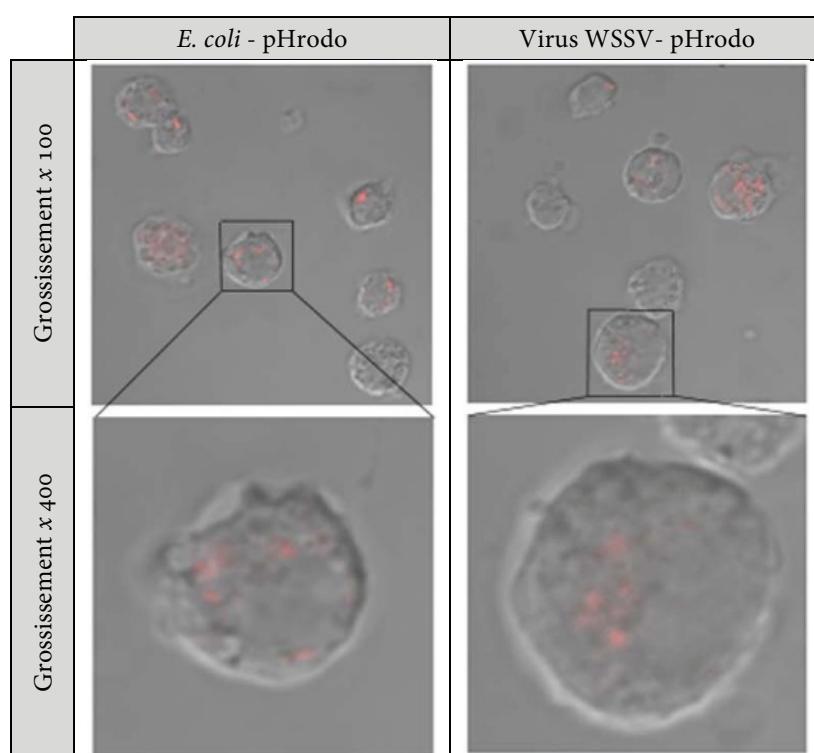


DOCUMENT 4 : Résultats avec un produit sensible au pH

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 ($\times 100$).

La fluorescence rouge à l'intérieur des cellules S2 de drosophile représentent l'acidification de phagolysosome

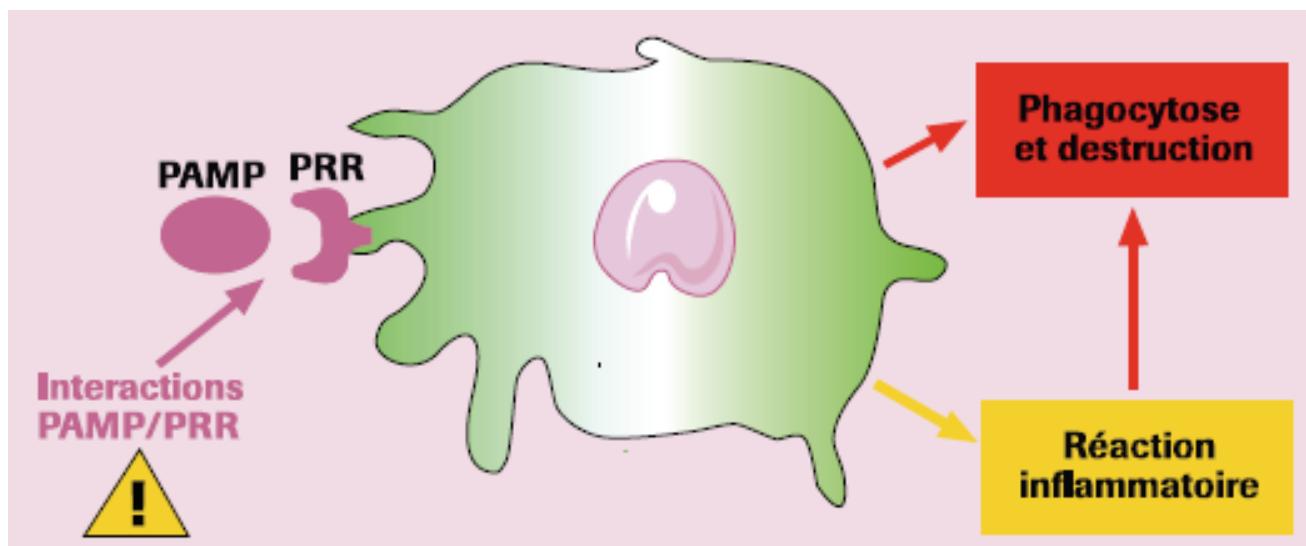
Les images du bas sont grossies 400 fois



Fei Zhu & Xiaobo Zhang, « The Wnt signaling pathway is involved in the regulation of phagocytosis of virus in Drosophila », *Nature*

LES "TOLL LIKE RECEPTOR" (TLR) : CONSERVATION PAR L'EVOLUTION

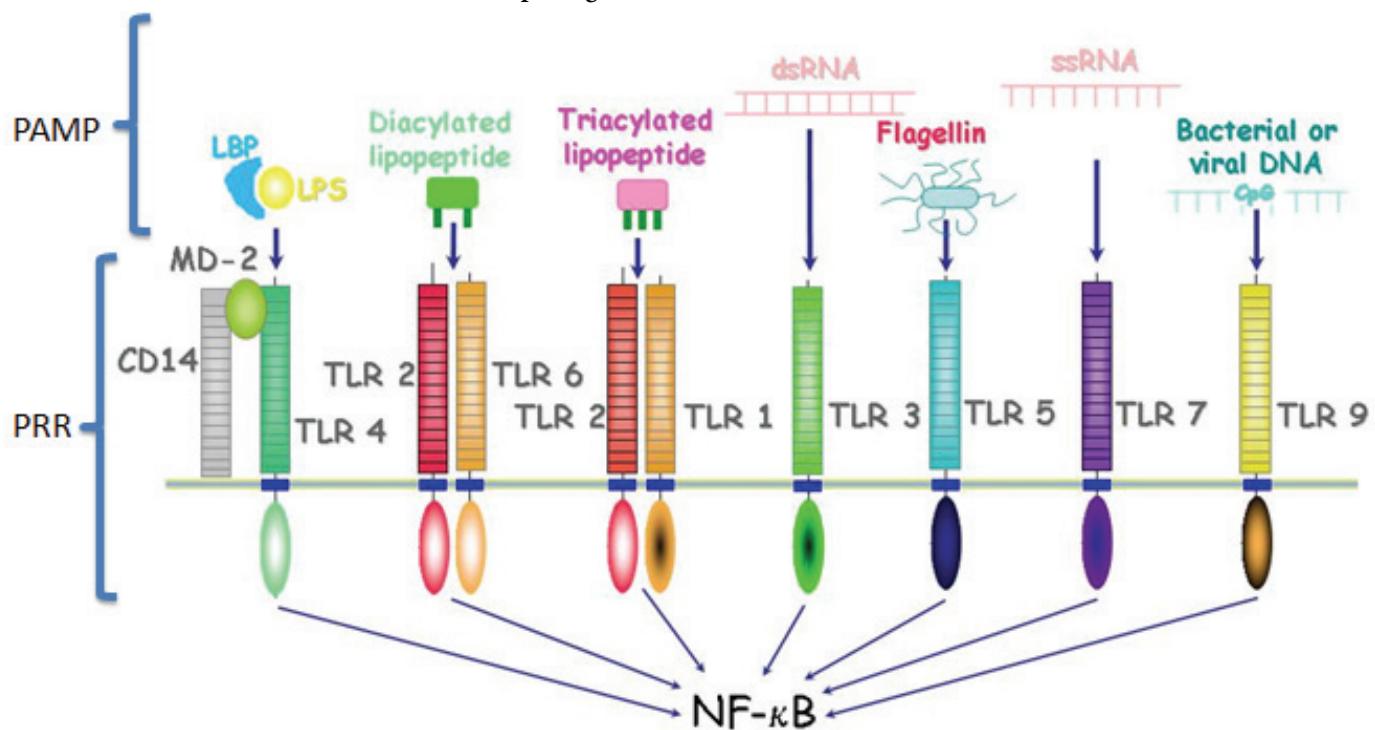
DOCUMENT 1 : La reconnaissance entre le phagocyte et les pathogènes dans l'immunité innée



Les PAMP (de *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**.

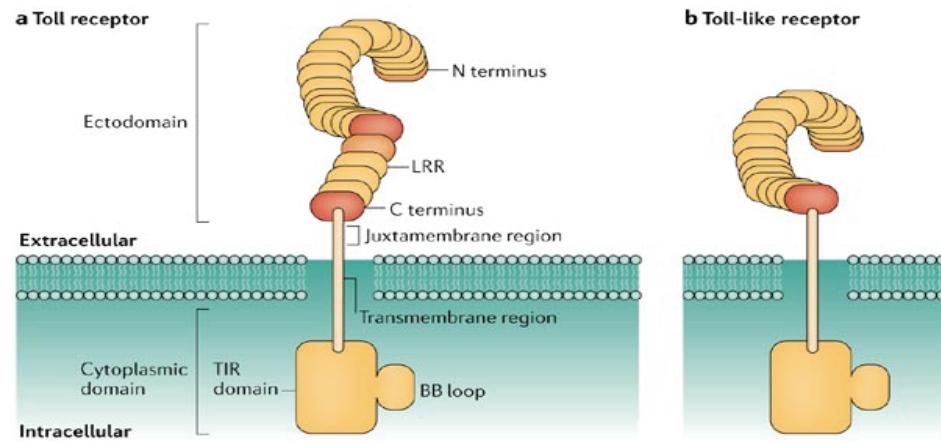
Les PRR (de *Pattern Recognition Receptor*) sont les **récepteurs des PAMP**, diversifiés de telle sorte à reconnaître la diversité des PAMP. Au niveau fonctionnel, certains PRR permettent la **phagocytose**, d'autres l'**activation des cellules**: en effet, la fixation de PAMP à des PRR est indispensable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

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



Les *Toll-like receptors* (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* (a) et *Toll-like receptors* (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

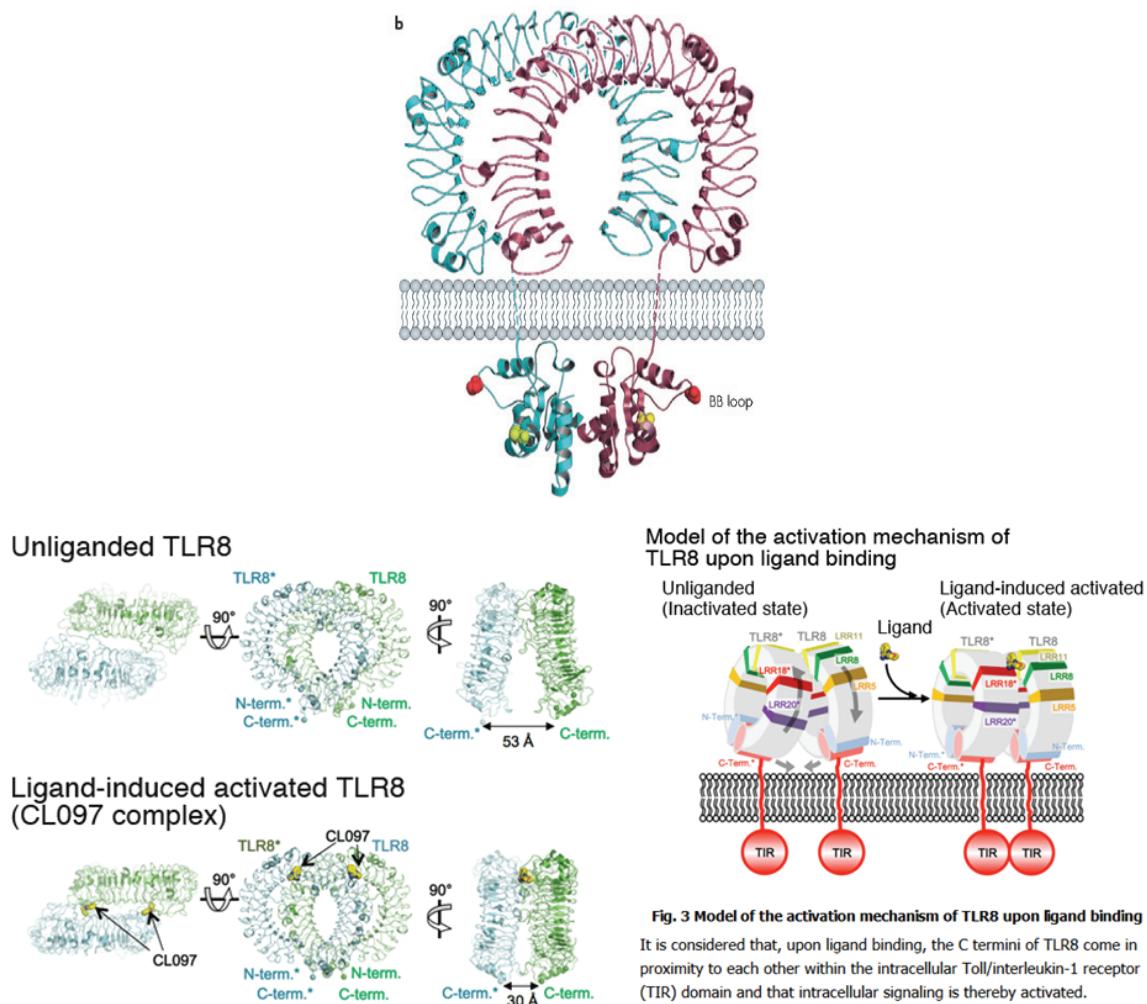


Fig. 3 Model of the activation mechanism of TLR8 upon ligand binding

It is considered that, upon ligand binding, the C termini of TLR8 come in proximity to each other within the intracellular Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain and that intracellular signaling is thereby activated.

(b) Schematic organization of TLRs based on the structure of the human TLR3 ectodomain and human TLR2 TIR domain: TLRs 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 TLRs and most intracellular signalling adaptors.

DOCUMENT : Séquences des TLR(s) de différents êtres vivants

Espèce et nom du récepteur	Origine et référence des données	Protéine Nombre aa	Fichier .pdb
<i>Mytilus galloprovincialis</i> TLRB	NCBI Protéine AFU48614.1	1189 aa TIR domaine	Aucun fichier trouvé
<i>Crassostrea gigas</i> TLR1	NCBI Protéine AGY49095	703 aa	Aucun fichier trouvé
<i>Crassostrea gigas</i> TLR3	NCBI Protéine AGY49097.1	876 aa	Aucun fichier trouvé
<i>Azumapecten. farreri</i> Toll Receptor	NCBI Protéine ABC73693.1	1198 aa	Aucun fichier trouvé
<i>Drosophila melanogaster</i> Tollo	NCBI Protéine AAF18983.1	1346 aa	
<i>Drosophila melanogaster</i> Toll6	NCBI Protéine AAF86226.1	1514 aa	
<i>Caenorhabditis elegans</i> Tol-1	NCBI Protéine NP001020983	1221 aa	
<i>Apis mellifera</i> Toll like receptor	NCBI Protéine AAX33677.1	1370 aa	Aucun fichier trouvé
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> TLR1.1	NCBI Protéine AAK25761.1	894 aa	Aucun fichier trouvé
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> Oursin violet TLR1.2	NCBI Protéine AAK25762.1	933 aa	Aucun fichier trouvé
<i>Homo sapiens</i> TLR3	NCBI Protéine ABC86910.1	904 aa	Domaine extracellulaire riche en leucine
<i>Homo sapiens</i> TLR6	NCBI Protéine BAA78631.1	796 aa	
<i>Homo sapiens</i> TLR8	NCBI Protéine AAQ88663.1	1041 aa	Journal: (2013) Science 339: 1426-1429 PubMed: 23520111
<i>Mus musculus</i> TLR4	NCBI Protéine EDL31078.1	835 aa	
<i>Mus musculus</i> TLR6	NCBI Protéine BAA78632.1	806 aa	
<i>Mus musculus</i> TLR8	NCBI Protéine AAI32055.1	1032 aa	
<i>Xénopus tropicalis</i> TLR5	NCBI Protéine AAH84773	878 aa	Aucun fichier trouvé
<i>Arabidopsis thaliana</i> TIR-NBS-LRR	NCBI Protéine AED95221.1	1217 aa	Aucun fichier trouvé

Production des fichiers « .edi » : Marianne Naspetti & Sandrine Beaudin

<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



Banque nationale coopérative pour les SVT

<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, 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-acetyl-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 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 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 : 3w47

Auteurs : Yoon, S.I., Kumasov, O., Natajaj, 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 ACCES (IFE-ENS de Lyon)

Code .PDB	Organisme	Description
2Z7X	<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-acétyle (domaines extracellulaires) A : <i>Toll-like receptor 2</i> (domaine extracellulaire) B : <i>Toll-like receptor 1</i> (domaine extracellulaire) C : lipopeptide.
3FXI	<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
3CIY	<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.
2J67	<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
3V47	<i>Zebrafish</i>	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
3W3G	<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 ligands } n'entrant pas la dimérisation N-acetyl-d-glucosamine C8 H15 N O6
3W3J	<i>Homo sapiens</i>	TLR 8 (dimérisé) + changement de conformation suite à la fixation du ligand CL097

En bleu : travaux de Jean François Madre (équipe ACCES, IFE-ENS de Lyon) | <http://acces.ens-lyon.fr/acces/ressources/immunité-et-vaccination/reponse-immunitaire/ressources/rastop-et-anagene/molecules>

Logiciel MolUSc : « Visualisation et analyse de molécules à usage scolaire »

<http://molusc.free.fr>

Aspect évolutif

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

	Drosophile Insecte	Oursin Echinoderme	Ascidie Tunicier	Lamproie Agnathe	Requin Elasmobranche	Carpe Téléostéen	Grenouille Amphibien	Serpent (Reptile)	Poulet (Oiseau)	Homme Mammifère
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 ₃ 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 = récepteur lymphocytaire variable présent chez la lamproie

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 : Coévolution 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.

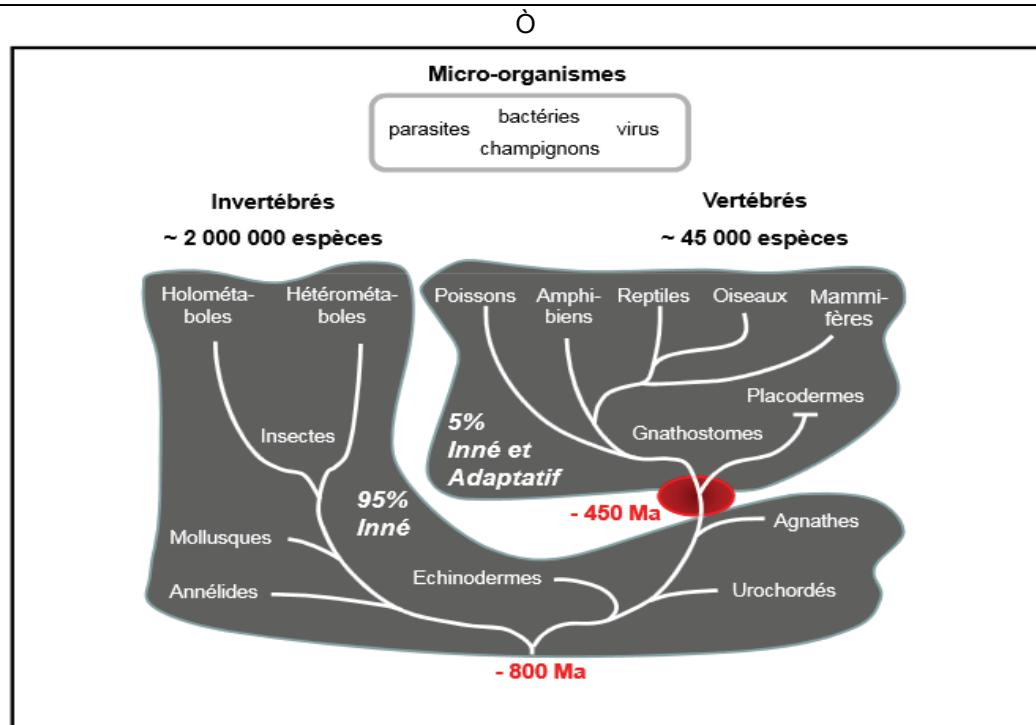
La plupart des pathogènes ont développé des mécanismes d'adaptation spéciaux, leur permettant d'envahir leur hôtes, de s'y répliquer et d'être transmis. Cependant, la mort rapide de leur victime est rarement dans l'intérêt des microbes, puisqu'elle détruit en même temps son lieu d'asile et sa source 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.

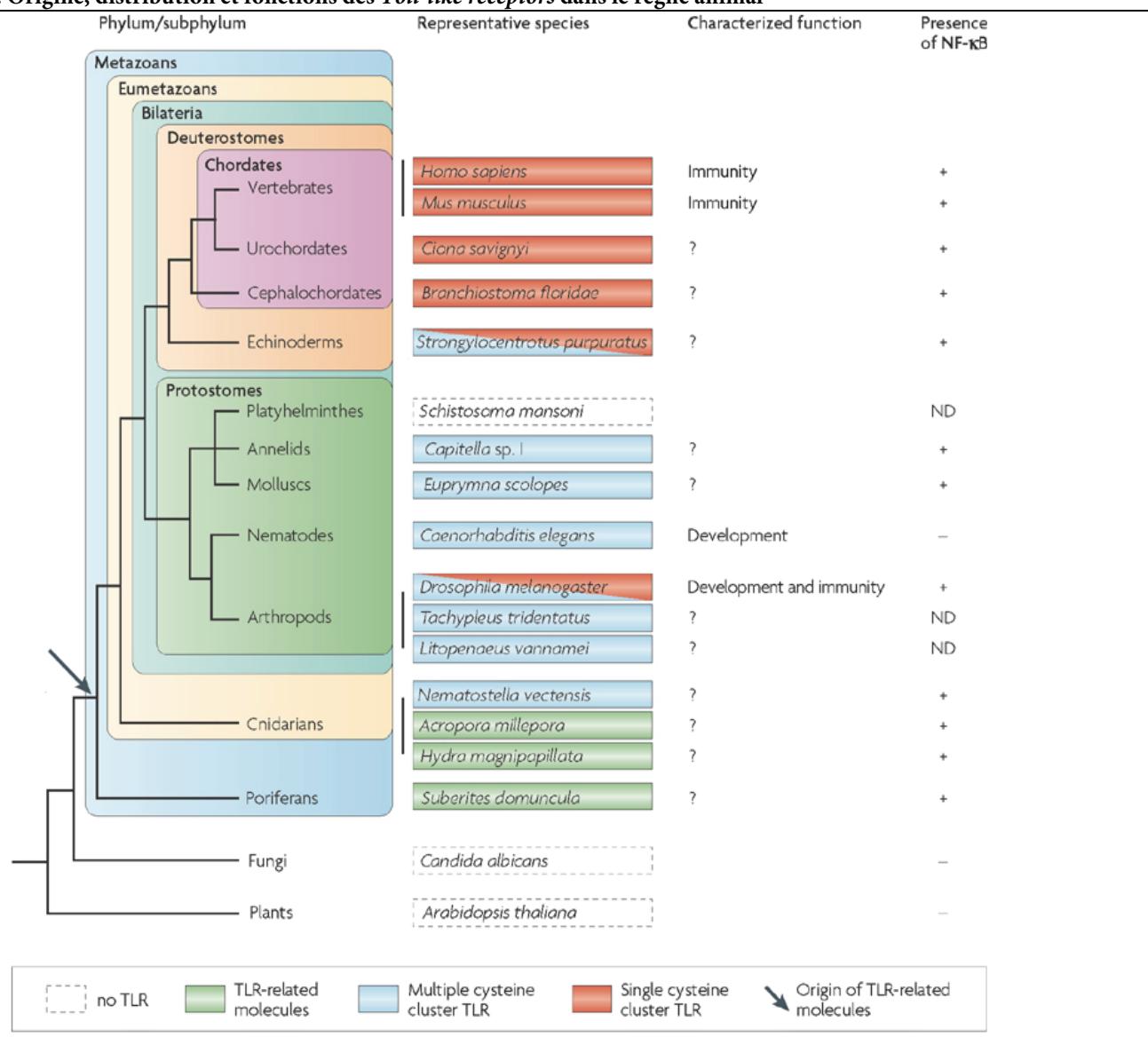
A cause de ces interactions entre pathogène et son hôte, la nature et la sévérité des maladies infectieuses dans les populations sont en permanents changement. »

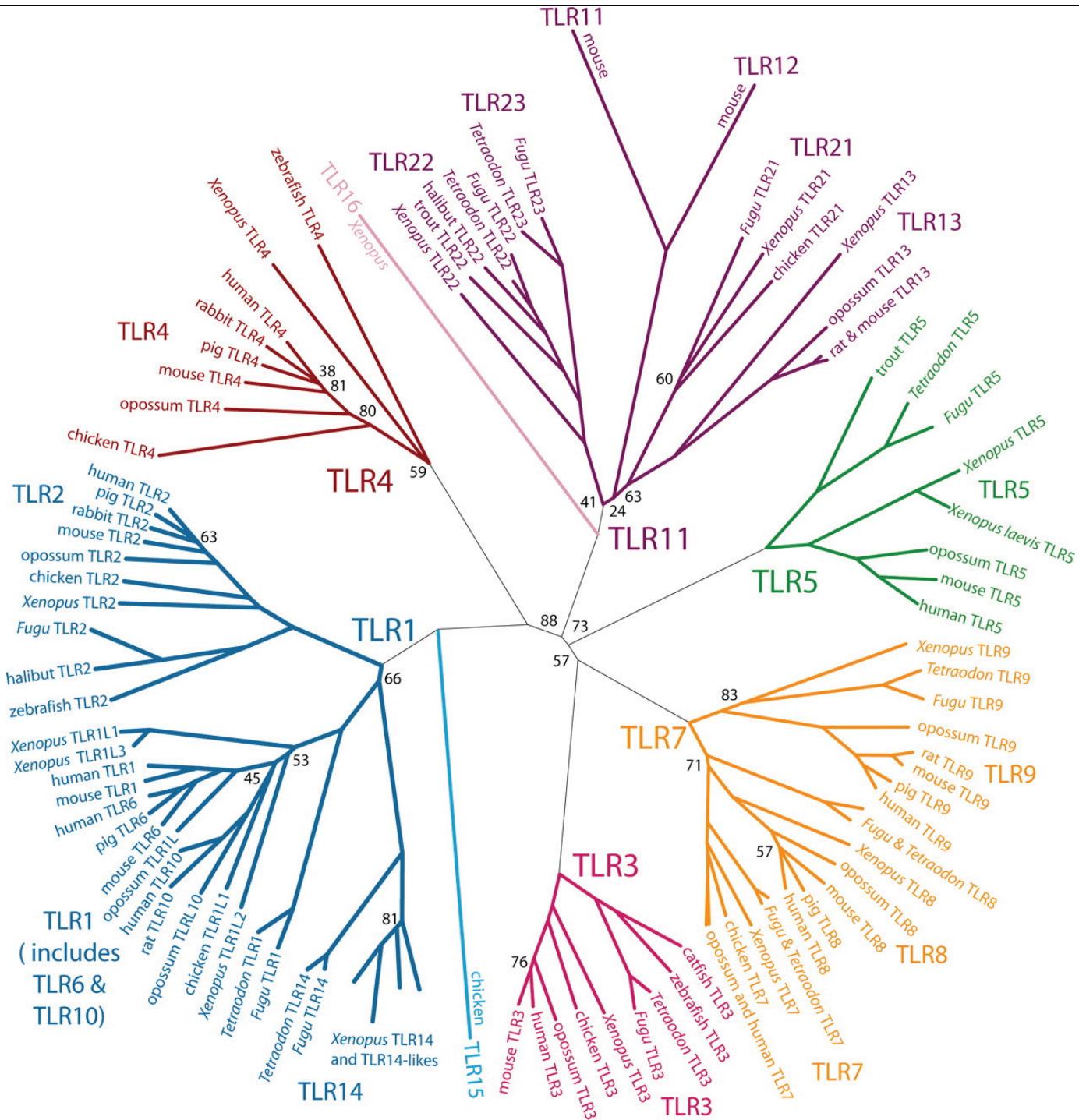
Sources (documents 1, 2 & 3) : Charles A. Janeway, Paul Travers, *Immunobiologie: Le système immunitaire fondamental et pathologique*. Bruxelles : De Boeck,

DOCUMENT 4 : Phylogénie et système immunitaire



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





<http://www.pnas.org/content/102/27/9577/F1.expansion.html>

Molecular tree of the vertebrate TLR.

Branches of each major family are shown in a unique color. TLR16 may belong in the TLR11 family; TLR15 may belong in the TLR1 family. "Xenopus" without a species name indicates *X. tropicalis*.

The species is listed along the branch for subfamilies with only one member. To avoid crowding, some known TLRs are not displayed. Bootstrap values <90 are shown as percentages; the preponderance of bootstrap values are 100%. The few low bootstrap values present tend to be associated with uncertainties in placement of very divergent TLRs (e.g., TLR16) or with very short branches.